

Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie

Deel 4: Tegenaanval van de faag

Julia Egido Egido, Pieter Jan Haas, Ana Rita Costa, Annabel Niessen

Feuilleton in vijf delen

Dit feuilleton bespreekt in vijf delen de huidige kennis van bacteriofaagresistentie, de genetische oorzaak die daarvoor verantwoordelijk is en de manier waarop fagen de tegenaanval inzetten. De eerste drie delen zijn verschenen in NTMM van september en december 2020. Nu volgen hier het vierde hoofdstuk, waarin aandacht wordt besteed aan de tegenaanval van de faag, en het vijfde, waarin op het gehele feuilleton wordt teruggeblikt.

De tegenaanval van de faag

Hoewel bacteriën over een zeer gevarieerd arsenaal aan resistentiemechanismen beschikken, lopen fagen niet achter als het gaat om het ontwikkelen van tegenstrategieën. Op dezelfde manier waarop bacteriële verdedigingsmechanismen op elke stap van de infectiecyclus kunnen ingrijpen, krijgt elke verdedigingslinie te maken met een tegenaanval van de faag. Fagen en bacteriën zijn op deze manier verwickeld in een continue wapenwedloop [1].

Vermijden van adsorptie

Als reactie op variaties in bacteriële oppervlaktereceptoren kunnen fagen hun tropisme veranderen door mutaties in hun receptorbindende eiwitten. Genen die coderen voor deze receptorbindende eiwitten of hieraan gerelateerde eiwitten, zijn in staat om zeer frequent te muteren door de activiteit van diversity-generating retroelements (DGR's) [2]. Deze DGR's zijn regio's die worden onderworpen aan gerichte mutatie door middel van de uitwisseling van twee iets van elkaar verschillende stukken DNA door een foutgevoelige reversetranscriptase [3]. Dit type gerichte mutagenese is template-afhankelijk en beïnvloedt

bepaalde adeninespecifieke plaatsen, terwijl een geconserveerde sequentie wordt behouden om de stabiliteit te waarborgen. Dit mechanisme is bij verschillende soorten fagen beschreven, met name in gematigde fagen. Dit proces werd als eerste beschreven in relatie tot een switch in specificiteit van het voor het tropisme bepalende eiwit in fagen tegen *Bordetella spp.* Sindsdien zijn diverse fagen geïdentificeerd die baat hebben bij dit systeem [4]. Hoewel het hierbij meestal gaat om gematigde fagen, die niet aantrekkelijk zijn voor faagtherapie, zijn hun interacties met het microbiom van de mens de moeite waard om bestudeerd te worden.

Zoals beschreven kan receptorbinding ook worden geblokkeerd door het creëren van een fysieke barrière zoals een kapsel of een laag extracellulaire polymeren. Sommige fagen zijn in staat tot binding aan deze polymeren [5]. Daarnaast kunnen veel fagen de extracellulaire matrix afbreken door middel van hydrolasen en lysasen, die de polymeren afbreken en de viscositeit van de matrix verminderen [6]. Deze enzymatische activiteit kan zich voordoen bij eiwitten die deel uit maken van de staart. In andere gevallen komen dergelijke enzymen vrij bij lysis van een geïnfecteerde bacterie.

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie, J. Egido Egido, promovendus, P.-J. Haas, arts-microbioloog. TU Delft, afdeling Bionanoscience, A.R. Costa, post-doc. Correspondentieadres: P.J.A.Haas@umcutrecht.nl. Oorspronkelijke titel van dit artikel: Understanding and overcoming resistance mechanisms in bacteriophage therapy. Vertaling: Annabel Niessen, arts-onderzoeker.

Dit mechanisme kan ook bijdragen aan de virulentie van bacteriën door aanwezigheid van een profaag. Door profagen gecodeerde hyaluronidasen kunnen namelijk ook menselijk hyaluronzuur in bindweefsel afbreken waarmee diffusie van bacteriële toxines wordt gefaciliteerd [7].

DNA-degradatie: restrictiemodificatie

De meest directe manier waarop R-M-systemen door fagen worden ontweken, is door mutatie van restrictiesequenties. Dit fenomeen wordt palindroomvermijding genoemd en is frequent beschreven in bacteriën [8]. Sommige restrictie-enzymen (REasen) moeten twee sequenties herkennen binnen een vaste afstand en in een specifieke oriëntatie ten opzichte van elkaar [9]. Veranderingen in oriëntatie en afstand van deze twee sequenties zijn in dat geval genoeg om restrictie te vermijden.

Het is ook mogelijk dat de restrictiesequenties aanwezig zijn maar onbereikbaar zijn gemaakt voor de REasen. Dit kan bijvoorbeeld door de activiteit van de DarA- en DarB-eiwitten van faag P1. Deze eiwitten worden tijdens infectie van de gastheer tegelijk geïnjecteerd met het faaggenoom en blokkeren de restrictiesequenties [10]. Hetzelfde effect wordt bereikt door eiwitten die REasen kunnen 'gijzelen' door de structuur van een DNA-helix na te bootsen, zoals Ocr van faag T7 [11]. Deze eiwitten kunnen de interactie met bacteriën nog verder beïnvloeden door te interfereren met de epigenetische regulatie van bepaalde genen, wat de groei ervan belemmert [12]. Een andere strategie is het laten methyleren van faageigen genoom door het oppikken van genen die coderen voor een MTase [13] of door MTase van de geïnfecteerde gastheer hiertoe te stimuleren [14]. Het splitsen van DNA door de REasen kan ook worden voorkomen door de sequenties aan te passen die door REasen worden herkend. Een voorbeeld hiervan is de E.coli-faag T4, deze beschikt over een modificatiemechanisme met in het genoom de gemodificeerde base hydroxymethylcytosine in plaats van cytosine. REasen, die cytosinen herkennen in hun restrictiesequenties, worden hiermee ontweken. Sommige E.coli-stammen maken echter gebruik

van type IV-restrictiesystemen die gemodificeerd DNA wel kunnen herkennen. Dit voorbeeld is illustratief voor de wapenwedloop tussen bacteriën en fagen [15]. De activiteit van deze type IV-restrictiesystemen kan gepareerd worden door glycosering van de hydroxymethylcytosine-residuen van het faaggenoom. E. coli is in staat deze tegenaanval te pareren door glucose-gemodificeerde restrictie-enzymen S en D (GmrS en GmrD) tot expressie te brengen. T4 kan deze eiwitten weer neutraliseren door het injecteren van zijn interne eiwit I (IPI) tijdens de infectie van de gastheer. IPI verstoort het GmrS-GmrD-complex en remt hiermee de restrictiefunctie. E. coli kan daar weer op inspelen door GmrS en GmrD samen als één polypeptide tot expressie te brengen waardoor IPI er niet op kan aangrijpen [16].

Adaptieve immuniteit: CRISPR-Cas

Ook CRISPR-Cassystemen kunnen op verschillende manieren door fagen worden ontweken. Ten eerste door het verkrijgen van mutaties of deleties in de PAM-sequenties of in de nabijgelegen protospacerregio's. Desondanks kan het DNA van nieuw gemuteerde fagen tijdens infectie opnieuw verwerkt worden in de CRISPR-reeks. Het gevolg is een continue cyclus van faagmutaties en uitbreiding van de bacteriële protospacercollectie. Een mogelijk efficiëntere strategie is die van anti-CRISPR-eiwitten. Deze werden voor het eerst beschreven in *Pseudomonas aeruginosa*-fagen [17] en sindsdien ook in andere fagen met een uiteenlopende specificiteit [18]. Deze systemen werken over het algemeen op twee verschillende manieren: de vorming van het crRNA-Cas-complex met het target-DNA wordt voorkomen door binding aan crRNA-Cas of door occlusie van de PAM-sequentie. Een ander mechanisme is het blokkeren van het endonucleasedomein van het Cas-eiwit zodat het faag-DNA niet geknipt kan worden.

Abortieve infectie

Fagen kunnen ook de laatste bacteriële verdedigingslinie, de abortieve infectiemechanismen, te slim af zijn. Zo kunnen toxine-

antitoxinemechanismen door fagen worden omzeild door het remmen van het protease dat het antitoxine afbreekt, of door het tot expressie brengen van een eigen analoog van het antitoxine [19-21]. Daarnaast hebben mutaties in genen die betrokken zijn bij het metabolisme van nucleïnezuren, bewezen effectief te zijn het in vermijden van toxine-antitoxine-systemen in *Lactococcus* spp [22]. Tot slot kan abortieve infectie worden verhinderd door mutaties in genen die coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de activatie van noodzakelijke enzymen, zoals de activator van Lit, Gol [23].

Referenties

1. Stern A, Sorek R. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays*. 2011;33:43-51. doi:10.1002/bies.201000071.
2. Guo H, Arambula D, Ghosh P, Miller JF. Diversity-generating Retroelements in Phage and Bacterial Genomes. *Microbiol Spectr*. 2014;2. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0029-2014.
3. Paul BG, Burstein D, Castelle CJ, et al. Retroelement-guided protein diversification abounds in vast lineages of Bacteria and Archaea. *Nat Microbiol*. 2017;2:17045. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.45.
4. Benler S, Cobián-Güemes AG, McNair K, et al. A diversity-generating retroelement encoded by a globally ubiquitous Bacteroides phage. *Microbiome*. 2018;6:191. doi:10.1186/s40168-018-0573-6.
5. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. Millard A, ed. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363:fnw002. doi:10.1093/femsle/fnw002.
6. Latka A, Maciejewska B, Majkowska-Skrobek G, Briers Y, Drulis-Kawa Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:3103-19. doi:10.1007/s00253-017-8224-6.
7. Singh SK, Bharati AP, Singh N, et al. The prophage-encoded hyaluronate lyase has broad substrate specificity and is regulated by the N-terminal domain. *J Biol Chem*. 2014;289:35225-36. doi:10.1074/jbc.M113.507673.
8. Rocha EP, Danchin A, Viari A. Evolutionary role of restriction/modification systems as revealed by comparative genome analysis. *Genome Res*. 2001;11:946-58. doi:10.1101/gr.153101.
9. Golovenko D, Manakova E, Tamulaitiene G, Grazulis S, Siksnyš V. Structural mechanisms for the 5'-CCWGG sequence recognition by the N- and C-terminal domains of EcoRII. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:6613-24. doi:10.1093/nar/gkp699.
10. Iida S, Streiff MB, Bickle TA, Arber W. Two DNA antirestriction systems of bacteriophage P1, darA, and darB: characterization of darA- phages. *Virology*. 1987;157:156-66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029954>. Accessed February 17, 2019.
11. Zaviļ'gelskiĭ GB, Kotova VI. Antirestriction activity of T7 Ocr protein in monomeric and dimeric forms. *Mol Biol (Mosk)*. 48:176-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25842838>. Accessed February 17, 2019.
12. Melkina OE, Goryanin II, Zaviļgelsky GB. The DNA-mimic antirestriction proteins ArdA ColIB-P9, Arn T4, and Ocr T7 as activators of H-NS-dependent gene transcription. *Microbiol Res*. 2016;192:283-91. doi:10.1016/j.micres.2016.07.008.
13. Hill C, Miller LA, Klaenhammer TR. In vivo genetic exchange of a functional domain from a type IIA methylase between lactococcal plasmid pTR2030 and a virulent bacteriophage. *J Bacteriol*. 1991;173:4363-70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1906061>. Accessed February 17, 2019.
14. Loenen WA, Murray NE. Modification enhancement by the restriction alleviation protein (Ral) of bacteriophage lambda. *J Mol Biol*. 1986;190:11-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3023633>. Accessed February 17, 2019.
15. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:317-27. doi:10.1038/nrmicro2315.
16. Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:675-87. doi:10.1038/nrmicro3096.
17. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*. 2012;493:429-32. doi:10.1038/nature11723.
18. Stanley SY, Maxwell KL. Phage-Encoded Anti-CRISPR Defenses. *Annu Rev Genet*. 2018;52:445-64. doi:10.1146/annurev-genet-120417-031321.
19. Otsuka Y, Yonesaki T. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnIA toxins. *Mol Microbiol*. 2012;83:669-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403819>. Accessed February 20, 2019.

20. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, et al. Discovery of Functional Toxin/Antitoxin Systems in Bacteria by Shotgun Cloning. *Mol Cell*. 2013;50:136-48. doi:10.1016/j.molcel.2013.02.002.
21. Blower TR, Evans TJ, Przybilski R, Fineran PC, Salmond GPC. Viral Evasion of a Bacterial Suicide System by RNA-Based Molecular Mimicry Enables Infectious Altruism. Casadesús J, ed. *PLoS Genet*. 2012;8:e1003023. doi:10.1371/journal.pgen.1003023.
22. Samson JE, Bélanger M, Moineau S. Effect of the abortive infection mechanism and type III toxin/antitoxin system *AbiQ* on the lytic cycle of *Lactococcus lactis* phages. *J Bacteriol*. 2013;195:3947-56. doi:10.1128/JB.00296-13.
23. Bingham R, Ekunwe SIN, Falk S, Snyder L, Kleanthous C. The Major Head Protein of Bacteriophage T4 Binds Specifically to Elongation Factor Tu. *J Biol Chem*. 2000;275:23219-26. doi:10.1074/jbc.M002546200.