

Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie

Deel 5: Discussie en conclusie

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

Discussie

De opkomst van multiresistente bacteriën in de afgelopen paar decennia is een zorgwekkende ontwikkeling. De snelheid waarmee nieuwe antibiotica worden ontwikkeld, is lager dan de snelheid waarmee bacteriën resistentie ontwikkelen tegen nieuwe antimicrobiële middelen. Het is daarom noodzakelijk nieuwe spelers toe te voegen aan dit veld.

Faagtherapie biedt interessante mogelijkheden om het probleem het hoofd te bieden. Om te beginnen zijn bacteriofagen overvloedig aanwezig en zeer gevarieerd, waardoor nieuwe fagen met therapeutische potentie altijd voor handen zijn. Bovendien beschikken zij over het vermogen tot amplificatie zolang de bacterie aanwezig is. Virulente fagen doden bacteriën snel, waardoor soms al binnen enkele uren de bacteriepopulatie vermindert.

Er zijn echter enkele factoren die eventuele therapeutische toepassing van fagen compliceren. Bacteriële resistentie is misschien wel de meest belangrijke. Prokaryoten vertonen een enorme diversiteit aan strategieën om zich immuun te maken voor fagen. Maar nog belangrijker, hun genomen worden gekenmerkt door een fascinerende complexiteit en ze coderen voor elementen die voortdurend kunnen evolueren en veranderen. We moeten daarbij niet vergeten dat veel onderdelen van het bacteriële genoom een voor ons nog onbekende functie kunnen vertegenwoordigen, die mogelijk een rol spelen bij antibioticum- en faagresistentie. Desondanks mogen we de therapeutische potentie van bacteriofagen als antibacteriële therapie niet onderschatten. Fagen hebben een breed scala aan middelen om de verdedigingsbarrières van bacteriën te bestrijden.

Constance evolutie en mutaties in de genomen van zowel bacteriën als fagen leiden tot een oneindige strijd waarin elke deelnemer continu probeert de ander te slim af te zijn. Dit co-evolutiemodel kan voor de mens enkele voordelen hebben. Een daarvan is dat veranderingen in bacteriële oppervlakte-eiwitten door mutaties of faseverandering, kunnen leiden tot een verminderde virulentie [1]. Dit kan bacteriën vatbaarder maken voor het immuunsysteem van de gastheer. Bovendien kunnen genen die betrokken zijn bij antibioticumresistentie worden aangetast door het opnemen van mutaties ter vermindering van faag-infectie. Al met al zou dit kunnen resulteren in een mildere en gemakkelijker te behandelen infectie. Verschillende studies hebben inderdaad aangetoond dat gecombineerde behandeling met antibiotica en fagen efficiënter is in de eradicatie van bacteriën dan beide therapieën afzonderlijk [2-4]. Een interessant idee is om gemodificeerde fagen te gebruiken ter neutralisatie van bepaalde bacteriële genen die betrokken zijn bij de acquisitie van resistentie. Een voorbeeld hiervan is het SOS-systeem dat is betrokken bij het herstellen van DNA en dat geassocieerd is overleving en ontwikkeling

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.

van resistentiemechanismen in stressomstandigheden [5,6].

Met behulp van genetische modificatie kunnen in vitro fagen worden gemaakt die een repressor van het SOS-systeem tot expressie kunnen brengen, *lexA3* [7]. Deze strategie vertoont synergisme met verschillende antibiotica, waarbij een hogere afdoening wordt bereikt dan met antibiotica alleen of in combinatie met een wildtypefaag.

Ook kunnen fagen worden aangezet om fluorescerende proteïne bij wijze van probe tot expressie te brengen, waardoor hun rol in bacteriën in een humane celkweek kan worden bestudeerd [8].

Een andere toepassing van gemodificeerde fagen is het incorporeren van een CRISPR/Cas-systeem in het genoom van een lysogene faag [9]. Deze strategie, die bacteriën aanvalt met hun eigen afweersysteem, maakt het mogelijk om interspacers van de CRISPR-regio zo te ontwerpen dat het systeem zich gaat richten tegen genen die betrokken zijn bij antibioticumresistentie.

Dit idee kan ook worden toegepast door bijvoorbeeld DNA, plasmiden of profagen af te breken die resistentie veroorzaken tegen andere fagen. Het gebruik van genetisch gemodificeerde fagen brengt echter wel enkele gevaren met zich mee. Zo wordt het therapeutisch gebruik van gematigde fagen bemoeilijkt door het risico op ongecontroleerde overdracht van genetisch materiaal tussen bacteriën. Implementatie van een dergelijk therapeutisch middel zal binnen de huidige regelgeving nog moeilijker worden dan toepassing van wildtypefagen.

Vergelijkbaar met het gecombineerde effect van fagen en antibiotica op het elimineren van resistente bacteriën, kan ook het immuunsysteem worden aangezet om een infectie te bestrijden door het toedienen van fagen. Statistische modellen laten zien dat zowel het aangeboren afweersysteem als fagen, individueel niet in staat zijn bacteriën volledig te elimineren [10]. De combinatie van beide biedt daarentegen wel kans van slagen.

Dergelijke modellen maken het tevens mogelijk om in te spelen op bepaalde variabelen zoals het type faag dat gebruikt wordt, de concentratie antibioticum en hoever de infectie gevorderd moet zijn voordat

faagtherapie optimaal werkzaam is. Maar dit zal moeten worden aangevuld met onderzoek van faag-bacterie-interacties in een model dat gebruikmaakt van humane cellen. Fagen kunnen, zoals is waargenomen, interacteren met en aanhechten aan humane cellen, waardoor zij zich kunnen handhaven en bacteriën kunnen infecteren en doden [11].

Desondanks vormt het immuunsysteem eerder een obstakel dan een bondgenoot als het gaat om faagtherapie. Toediening van fagen in een levend organisme stimuleert zowel de aangeboren als specifieke immunrespons. Hoewel dit geen bedreiging vormt voor de patiënt, zorgt de vorming van faagspecifieke antilichamen voor snellere klaring van fagen en verlaagt het de replicatiesnelheid. Aan de andere kant kunnen fagen ervoor zorgen dat fagocyten en andere immuuncellen beter worden aangetrokken naar de plaats van de infectie. Ook de toedieningsroute van fagen speelt hierin een rol omdat dit bepalend is voor de distributie door het lichaam. Deze factoren worden uiteengezet in een review van Krut Bekeredjian-Ding uit 2018 [12]. Een veelbelovende benadering om de slagingskans van faagtherapie te vergroten, is toediening van fagen of daarvan afgeleide producten via een vector zoals liposomen. Op deze manier wordt het werkzame bestanddeel minder blootgesteld aan immunproducten in de bloedbaan en is er een grotere kans dat het specifiek op de plaats van infectie terecht komt.

Bij het ontwerpen van op fagen gebaseerde therapiemogelijkheden, dienen ook de interacties tussen fagen onderling in beschouwing te worden genomen. Competitie tussen soorten die deel uitmaken van een faagcocktail kan nadelige effecten hebben op de efficiëntie van het product, zeker in het geval van co-infecterende fagen. Daarnaast kan in het geval van lysogene infecties, het profaag-DNA worden aangepast in de volgende generaties, waardoor bij het opnieuw toepassen van het product faagresistentie kan ontstaan. Dit in acht nemend, samen met het probleem van de humorale immunrespons, lijkt een eenmalige toediening van een faagproduct met een gecontroleerde specificiteit tegen de bacterie het meest efficiënt.

Conclusie

Al met al zijn er veel aspecten aan faagtherapie die ontrafeld zullen moeten worden om brede implementatie mogelijk te maken. De faagwereld is complex en wordt gedomineerd door de complexiteit van interacties tussen fagen van dezelfde en van verschillende soorten en hun gastheer. Om faagtherapie te laten slagen, is het noodzakelijk om faagsoorten met therapeutische potentie uitgebreid te bestuderen: hoe ze zich verhouden tot elkaar en tot hun gastheren, hoe ze zich gedragen in aanwezigheid van menselijke cellen en hoe ze mogelijk worden bedreigd door het immuunsysteem. Om dit mogelijk te maken zal de regelgeving rondom geneesmiddelen moeten worden afgestemd op ontwikkelingen in therapeutische mogelijkheden. Dit zou tevens moeten leiden tot meer investering in onderzoek naar faagtherapie, wat het voor klinici mogelijk maakt de specificaties van therapeutisch middelen per infectie af te stemmen op de eigenschappen ervan. Er zou een doorbraak moeten plaatsvinden, waarbij toediening van genetisch gemodificeerde fagen tot de klinische praktijk gaat behoren. Faagtherapie zou zo een betekenisvolle rol kunnen spelen in het oplossen van de resistentieproblematiek.

Referenties

1. León M, Bastías R. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Front Microbiol.* 2015;6:343. doi:10.3389/fmicb.2015.00343.
2. Chaudhry WN, Concepción-Acevedo J, Park T, Andleeb S, Bull JJ, Levin BR. Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS One.* 2017;12:e0168615. doi:10.1371/journal.pone.0168615.
3. Oechslin F, Piccardi P, Mancini S, et al. Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *J Infect Dis.* 2017;215:703-12. doi:10.1093/infdis/jiw632.
4. Valério N, Oliveira C, Jesus V, et al. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. *Virus Res.* 2017;240:8-17. doi:10.1016/J.VIRUSRES.2017.07.015.
5. Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38:1126-45. doi:10.1111/1574-6976.12077.
6. Mo CY, Manning SA, Roggiani M, et al. Systematically Altering Bacterial SOS Activity under Stress Reveals Therapeutic Strategies for Potentiating Antibiotics. *mSphere.* 2016;1. doi:10.1128/mSphere.00163-16.
7. Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:4629-34. doi:10.1073/pnas.0800442106.
8. Møller-Olsen C, Ho SFS, Shukla RD, Feher T, Sagona AP. Engineered K1F bacteriophages kill intracellular *Escherichia coli* K1 in human epithelial cells. *Sci Rep.* 2018;8:17559. doi:10.1038/s41598-018-35859-6.
9. Yosef I, Manor M, Kiro R, Qimron U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:7267-72. doi:10.1073/pnas.1500107112.
10. Leung CY (Joey), Weitz JS. Modeling the synergistic elimination of bacteria by phage and the innate immune system. *J Theor Biol.* 2017;429:241-52. doi:10.1016/J.JTBI.2017.06.037.
11. Shan J, Ramachandran A, Thanki AM, Vukusic FBI, Barylski J, Clokie MRJ. Bacteriophages are more virulent to bacteria with human cells than they are in bacterial culture; insights from HT-29 cells. *Sci Rep.* 2018;8:5091. doi:10.1038/s41598-018-23418-y.
12. Krut O, Bekeredjian-Ding I. Contribution of the Immune Response to Phage Therapy. *J Immunol.* 2018;200:3037-44. doi:10.4049/jimmunol.1701745.