

# Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie

## Deel 2: Bacteriële resistentiemechanismen

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

### Feuilleton in vijf delen

In vijf delen (in achtereenvolgende uitgaven van het *NTMM*) worden de huidige kennis van bacteriofaag-resistentie, de genetische oorzaak die daarvoor verantwoordelijk is en de manier waarop fagen de tegenaanval inzetten, besproken. Na het eerste deel van in totaal vijf delen in de vorige editie volgen hier en tweede en derde hoofdstuk. In deel 2 wordt aandacht gegeven aan de bacteriële resistentiemechanismen die een faag moet overwinnen. Deel drie is aansluitend in deze editie opgenomen.

### Resistentiemechanismen

Het tweede van de vijf delen over faagtherapie gaat over de resistentiemechanismen waarover de bacterie beschikt om zich te beschermen tegen een faag.

Om faagtherapie te laten slagen, moet rekening gehouden worden met de resistentieontwikkeling door de bacterie. In een overzichtsartikel publiceerde Oeschlin in 2018 een uitgebreid overzicht waarin de uitkomst van verschillende casus beschreven worden met faagtherapie zowel binnen de veehouderij als in een klinische setting.[1] Hierin laat hij zien dat in de meeste onderzoeken bij zoogdieren de resistente populaties al vaak binnen uren na de eerste gift fagen worden waargenomen. De exacte mechanismen die hieraan ten grondslag liggen, worden echter zelden onderzocht in deze experimenten.

### Blokkeren van adsorptie

De verschillende bacteriële verdedigingsmechanismen kunnen zich richten op vrijwel elke stap binnen de infectiecyclus van de bacteriofaag.[2] De eerste barrière die bacteriën kunnen opwerpen is het blokkeren de van voor de faag noodzakelijke receptoren. Door het produceren van extracellulaire matrix ontstaat een fysieke barrière

die de oppervlaktereceptoren verbergen. Ook beschermen extracellulaire polymeren zoals alginaat en hyaluronzuur bacteriën tegen vijandige omgevingscondities; zij fungeren als virulentiefactor en spelen een rol bij het vormen van biofilms.[3]

Een andere manier om het aanhechten van fagen te blokkeren, is het produceren van eiwitten die de receptoren blokkeren of maskeren. Een voorbeeld is het eiwit TraT; dit gaat een interactie aan met de OmpA-receptor in *Escherichia coli* waarmee deze ontoegankelijk wordt voor bepaalde fagen.[4] Fagen kunnen zelf ook eiwitten produceren waarmee receptoren geblokkeerd worden. Hiermee worden aanvullende infecties met dezelfde of nauw gerelateerde faagsoorten voorkomen. Dit fenomeen wordt superinfection exclusion (Sie) genoemd. Het Sie-mechanisme voorkomt tevens de inactivatie van nieuwe viruspartikels door binding aan receptoren van bacterieresten vroeg na de lysis. Dit mechanisme werd waargenomen in faag T5. Deze faag produceert het lipoproteïne Llp dat zijn eigen receptoren blokkeert.[5] Ook bacteriën onder stress kunnen dergelijke maskerende moleculen produceren.[6] Een ander verdedigingsmechanisme van bacteriën is het produceren van buitenmembraanvesikels die fungeren als lokaas, waardoor een deel

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie, J. Egido Egido, promovendus, P.-J. Haas, arts-microbioloog, TU Delft, afdeling Bionanoscience, dr. A.R. Costa. Correspondentie: P.J.A.Haas@umcutrecht.nl.

Oorspronkelijke titel van dit artikel: Understanding and overcoming resistance mechanisms in bacteriophage therapy. Vertaling: Annabel Niessen, arts-onderzoeker (F.A.Niessen@umcutrecht.nl).

van de omringende fagen wordt weggevangen.[7] De expressie van faagreceptoren wordt vaak gereguleerd door genetische modulators die betrokken zijn bij fasevariatie. Fasevariatie is een soort aan-uitmechanisme waarmee bacteriën hun fenotype kunnen aanpassen aan bepaalde omgevingsomstandigheden. Dit proces wordt met name gezien als een manier om het immuunsysteem van de gastheer te vermijden, maar blijkt ook een rol te spelen bij het ontwijken van infecties door fagen.[8] Zo kan de expressie van bepaalde oppervlaktereceptoren worden verminderd door fasevariatie. Ook kunnen receptoren van samenstelling veranderen door verschillende voorgeprogrammeerde mutaties. Sommige fasespecifieke moleculen zijn tevens betrokken bij de bacteriële pathogenese, zoals virulentiefactoren, adhesinen en toxinen.[9] Fasevariatie als reactie op blootstelling aan fagen kan hierdoor resulteren in een verandering in virulentie van de bacterie. Dit zou betekenen dat bacteriën gevoeliger kunnen worden voor de werking van het humane immuunsysteem of voor bepaalde antibiotica. Virulentie kan echter ook toenemen als gevolg van fasevariatie. Het is belangrijk deze mogelijke effecten van bacteriofagen in beschouwing te nemen bij het ontwikkelen van faagtherapie. De onderliggende genetische mechanismen worden later in dit overzicht besproken.

### **Obstructie van toegang tot het bacteriële DNA**

De tweede stap in het infectieproces van de faag waar verdedigingsmechanismen op inspelen, is de toegang tot het cytoplasma.[2] Fagen degraderen hiervoor de peptidoglycaanlaag van de celwand; in het geval van gramnegatieve bacteriën zal het DNA ook het buitenmembraan moeten passeren. Hierna zal het DNA moeten worden getransloceerd door het binnenmembraan naar het cytoplasma. Deze stappen kunnen worden geblokkeerd door membraangeassocieerde eiwitten. Deze worden meestal gecodeerd door profaag-DNA. Dit is ook een voorbeeld van de rol van het Sie-systeem. Het obstruerende effect van deze membraangeassocieerde eiwitten berust op het remmen van de formatie van het kanaal waar het DNA doorheen migreert, het inhiberen van het faaglysozym dat de peptidoglycaanlaag degradeert of het voorkómen van translocatie door het veranderen van de conformatie van de eiwitten rondom de plaats van ejectie.[10]

### **Degradatie van DNA: restrictie-modificatiesystemen**

Als het faag-DNA eenmaal de gastheercel binnengedrongen is, zal het een van de meest beschreven bacteriële verdedigingsmechanismen tegenkomen: het restrictie-modificatie (R-M)-systeem. Dit werkingsmechanisme is gebaseerd op de het gecombineerde effect van methyltransferase en een restrictie-enzym.[11] Methyltransferase methyleert endogeen DNA op specifieke plekken, hetgeen voorkómt dat het DNA gesplitst wordt door een restrictie-enzym. Methyltransferases herkennen vaak hemigemethyleerd DNA, dit is het product van de replicatie van gemethyleerd DNA. Restrictie-enzymen herkennen daarentegen vreemd, ongewijzigd DNA en splitsen dit op specifieke locaties. Meestal zijn dit vier tot acht baseparen-lange palindromische sequenties. Het evenwicht tussen de activiteit van deze twee enzymen bepaalt het lot van het binnenkomende faag-DNA. Restrictie-enzymen hebben veelal een hogere verwerkingssnelheid dan methyltransferases. Maar als het faag-DNA gemethyleerd wordt voordat het restrictie-enzym het kan splitsen, kan het naburige cellen infecteren. Interessant is dat methyltransferases over het algemeen meer geconserveerd zijn dan restrictie-enzymen, die sneller evolueren om de mutaties in het faaggenoom bij te houden.[12] R-M-systemen worden daarom in de basenvolgorde van bacteriële genomen meestal geïdentificeerd door de genen die overeenkomen met methyltransferases. [12]

Er zijn vier klassieke typen van R-M systemen.[11] Het type II-systeem komt het meest voor en bestaat uit een methyltransferase en een restrictie-enzym, die onafhankelijk van elkaar werkzaam zijn als twee aparte eiwitten.

De kennis over R-M-gerelateerde systemen blijft groeien naarmate er meer bekend wordt over bacteriële genomen. Een voorbeeld hiervan is het verdedigingssysteem DISARM ('defence island system associated with restriction-modification'), dat geassocieerd wordt met restrictie-modificatie.[13] Dit systeem bevat ook een methyltransferase en een restrictiemodule. Deze restrictiemodule werkt echter anders dan de restrictie-enzymen en is afhankelijk van het samenspel van meerdere componenten. Het precieze werkingsmechanisme wordt nog niet volledig begrepen. Hoewel de faagadsorptie niet geblokkeerd wordt, voorkomt het circularisatie (tot cirkelvorm sluiten door verbinding van beide

DNA-uiteinden) van faag-DNA waardoor DNA-replicatie en lysogenie in een vroeg stadium van de infectie worden voorkomen. Vermoed wordt dat DISARM tevens samenwerkt met verschillende R-M-elementen waardoor er een synergistisch effect optreedt tegen faaginfectie.

Faagexclusie (Bacteriophage EXclusion BREX) is een ander verdedigingsmechanisme dat zich richt op het faag-DNA zodra het de gastheercel is binnengedrongen.[14] Ook dit systeem methyleert het gastheereigen DNA om dit te kunnen onderscheiden van exogeen DNA. Het BREX-systeem breekt het niet-gemethyleerde DNA echter niet af, in tegenstelling tot R-M-systemen. Analyse van DNA dat geëxtraheerd is uit door fagen geïnfecteerde bacteriën die BREX tot expressie brengen, wees erop dat BREX replicatie belemmert zonder het faag-DNA te splitsen of te verwerken.[14] Bijzonder aan dit systeem is dat de activiteit van de methylase nodig lijkt te zijn om resistentie te vormen tegen bacteriofagen. Daarnaast is bekend dat gemethyleerd of geglycosyleerd faag-DNA niet gevoelig is voor BREX.[15] In sommige bacteriën wordt vreemd DNA onderschept door eiwitten van de Argonaute (Ago)-familie. Deze eiwitten zijn ook aanwezig in eukaryote cellen. Daar reguleren zij de afbraak van exogeen RNA met behulp van interferentie-RNA's (small interfering RNA's, siRNA's) die het doel herkennen. Hoewel dit proces in prokaryote cellen minder goed is bestudeerd, zijn er prokaryotische Ago-eiwitten (pAgo) gevonden in *Thermus thermophilus* (TtAgo) en in *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo). Bij TtAgo berust dit mechanisme op DNA-DNA-interferentie in plaats van RNA-RNA-interferentie in tegenstelling tot eukaryoot Ago.[16] Het TtAgo-proteïne heeft tevens een endonucleasedomein dat zowel enkelstrengs-DNA als negatief *supercoiled* dubbelstrengs-DNA (circulair DNA met een tertiaire winding, dat zich meestal in plasmiden bevindt) kan splijten. Hoewel het onduidelijk is hoe het interferentie-RNA of -DNA wordt gevormd, lijkt de activiteit van het Ago-eiwit zelf nodig te zijn voor de productie hiervan. In tegenstelling tot TtAgo maakt RsAgo gebruik van kleine RNA-moleculen om vreemd DNA te herkennen.[17] RsAgo heeft geen endonucleasedomein, DNA-interferentie wordt in dit geval veroorzaakt door enkel de binding aan het target.

## Adaptieve immuniteit: CRISPR-Cas

Een ander mechanisme waarmee bacteriën faag-DNA kunnen degraderen, is met behulp van het CRISPR-Cas-systeem (CRISPR staat voor: 'Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats'; Cas staat voor 'CRISPR-Associated Proteins'). Het CRISPR-Cas-mechanisme is tot nu toe de enige vorm van adaptieve immuniteit die is beschreven in bacteriën. Ze worden verdeeld in zes typen,[18] waarvan type II de bekendste is door de toepassing binnen de biotechnologie.[19]

Na infectie door een faag of plasmide kan de bacterie het vreemd DNA afbreken in kleine fragmenten die als interspacers in de CRISPR-reeks worden geplaatst. De CRISPR-regio van het genoom bestaat uit repetitieve sequenties die worden gescheiden door deze interspacers.[20] Dit creëert een immunologisch geheugen dat het bacteriën mogelijk maakt om vreemd DNA te detecteren na een eerdere infectie. De CRISPR-regio wordt getranscribeerd waarmee korte RNA-fragmenten worden gevormd, zogenaamde CRISPR-RNA's (crRNA's). Elk crRNA-fragment koppelt zich aan een Cas-eiwit en leidt het naar het binnengedrongen DNA. Caseiwitten hebben een endonucleasefunctie en splijten daarmee het vreemd DNA op een sequentiespecifieke manier. Type I en type V CRISPR/Cas-systemen herkennen daarnaast ook een geconserveerde sequentie van drie nucleotiden naast de plek waar het DNA gesplitst is, het 'protospacer adjacent motif' (PAM).[21]

## Abortieve infectie

Als al deze verdedigingsmechanismen falen en de bacterie irreversibel is geïnfecteerd door een bacteriofaag, kan de geïnfecteerde bacterie zich opofferen om de rest van de populatie te beschermen. Verantwoordelijk hiervoor zijn de 'abortieve infectiesystemen'. Veel van deze systemen bestaan uit een toxine-antitoxinemechanisme en zijn afhankelijk van de balans tussen een stabiel toxine en een onstabiel anti-toxine.[22]

Infectie van de gastheercel door een faag onderdrukt de productie van antitoxine. Het gevolg hiervan is dat het toxine de overhand krijgt, waardoor de bacterie sterft en er geen nieuwe fagen gegenereerd kunnen worden.

Er zijn verschillende soorten abortieve infectiemechanismen, zoals het RexA-RexB-systeem,[23] het 'Lit'-systeem, het 'PrrC'-systeem,[24] exclusie

van T7 door PifA[25] en de faag-DNA-replicatie, zoals bijvoorbeeld gezien in *Lactococcus*-speciës.[26]

In het derde deel van dit feuilleton gaan we dieper in op de genetische mechanismen van faagresistentie.

## Referenties

1. Oechslin F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*. 2018;10(7).
2. Labrie S-J, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):317-27.
3. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108.
4. Riede I, Eschbach ML. Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 1986;205(2):241-245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527751>. Accessed February 19, 2019.
5. Pedruzzi I, Rosenbusch JP, Locher KP. Inactivation in vitro of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;168(1):119-25.
6. Decker K, Krauel V, Meesmann A, Heller KJ. Lytic conversion of *Escherichia coli* by bacteriophage T5: blocking of the FhuA receptor protein by a lipoprotein expressed early during infection. *Mol Microbiol*. 1994;12(2):321-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8057856>. Accessed March 8, 2019.
7. Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):258.
8. Henderson IR, Owen P, Nataro JP. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*. 1999;33(5):919-32.
9. Van Der Woude MW, Bäumlér AJ. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(3):581-611.
10. Bondy-Denomy J, Qian J, Westra ER, et al. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J*. 2016;10(12):2854-66.
11. Tock MR, Dryden DT. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):466-72.
12. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D269-70.
13. Ofir G, Melamed S, Sberro H, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol*. 2018;3(1):90-8.
14. Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J*. 2015;34(2):169-183.
15. Gordeeva J, Morozova N, Sierro N, et al. BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(1):253-65.
16. Swarts DC, Jore MM, Westra ER, et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*. 2014;507(7491):258-61.
17. Miyoshi T, Ito K, Murakami R, Uchiumi T. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat Commun*. 2016;7(1):11846.
18. Koonin E V, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*. 2017;37:67-78.
19. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80- ). 2014;346(6213):1258096.
20. Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem*. 2011;392(4):277-89.
21. Gleditzsch D, Pausch P, Müller-Esparza H, et al. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biol*. September 2018:1-14.
22. Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*. 2016;12(4):208-14.
23. Parma DH, Snyder M, Sobolevski S, Nawroz M, Brody E, Gold L. The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. *Genes Dev*. 1992;6(3):497-510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372278>. Accessed February 20, 2019.
24. Snyder L. Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol Microbiol*. 1995;15(3):415-420. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540246>. Accessed February 20, 2019.
25. Cheng X, Wang W, Molineux IJ. F exclusion of bacteriophage T7 occurs at the cell membrane. *Virology*. 2004;326(2):340-52.
26. Chopin M-C, Chopin A, Bidnenko E. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):473-9.