

# Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie

## Deel 3: De genetische basis van faag-resistentiemechanismen

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

De enorme complexiteit in prokaryotische genomen verklaart de vele verschillende manieren waarop bacteriën zich kunnen aanpassen en resistentie tegen een faaginfectie kunnen ontwikkelen (figuur 1). Bacteriën kunnen zich in een zeer snel tempo delen en zijn aan een constante selectiedruk onderhevig. Zo kunnen mutaties zich in hoog tempo in een bacteriepopulatie verspreiden. Dat fagen een mutageen effect kunnen hebben op bacteriën is al sinds 1963 bekend.[1]

### *Profagen en plasmiden*

Veranderingen in het bacterieel genoom vinden vaak niet willekeurig verspreid plaats. Veel van de in deel twee beschreven resistentiemechanismen worden gecodeerd door genen die geclusterd zijn in zogenoemde 'defence islands'.[2] In deze geclusterde regio's is sprake van geprogrammeerde genetische variatie, die de diversiteit van het genoom sneller en efficiënter kan verhogen dan willekeurig voorkomende puntmutaties. Deze defence islands kunnen worden gereguleerd door mobiele of flexibele genetische elementen. Deze elementen worden wel beschreven als bacterieel mobiloom. De belangrijkste bron voor verrijking van het mobiloom zijn gematigde fagen.[3] Deze elementen kunnen worden overgenomen door volgende generaties of, in het geval van plasmiden, horizontaal worden overgedragen door middel van conjugatie. Deze geïntegreerde elementen kunnen gunstige eigenschappen bevatten die oorspronkelijk ontwikkeld zijn voor faag-faaginteractie.

Homotypische competitie, oftewel competitie tussen fagen van dezelfde of een nauw verwante soort, is een veelvoorkomend fenomeen. Veel profagen coderen voor repressorgen, Sie-systemen of restrictie-modificatiemechanismen

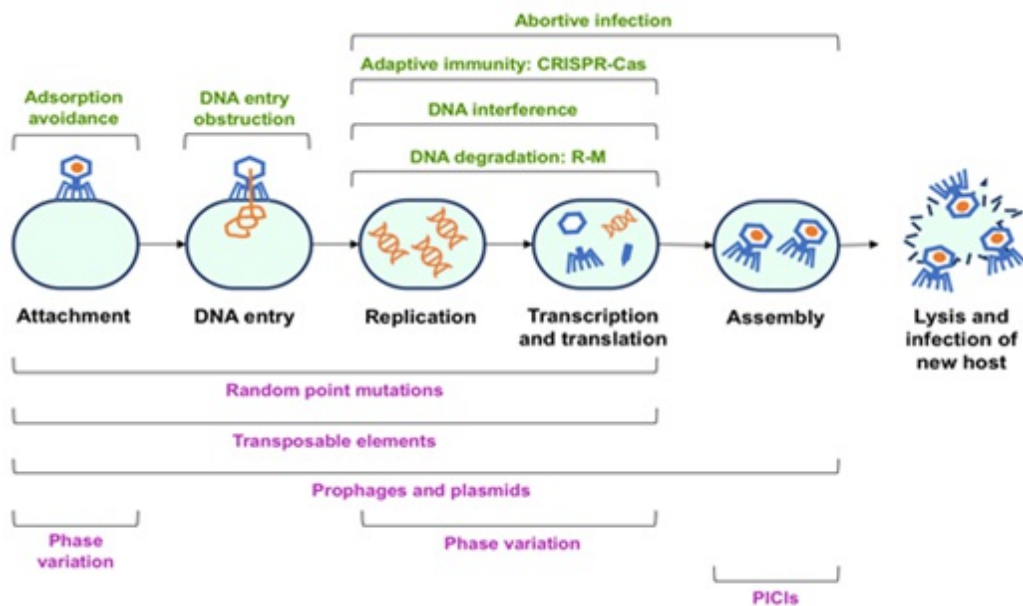
die zich richten op hun eigen of een nauw verwante soort.[4] Op deze manier wordt het aantal vrije fagen, dat andere bacteriën kan koloniseren, vergroot. Competitie tussen verschillende faagsoorten komt veel voor.[5]

Ook plasmiden kunnen verantwoordelijk zijn voor faag-resistentie hoewel ze met name uitgebreid beschreven zijn in relatie tot antibioticumresistentie. Vooral in de voedingsmiddelenindustrie is onderzoek gedaan naar plasmide-gemedieerde faagresistentie voor de bescherming van bacteriestammen die gebruikt worden voor de productie van onder andere zuivelproducten. Dit soort plasmiden zijn beschreven in *Lactococcus lactis*. [6-9]

Plasmiden kunnen daarnaast genetische variaties aanbrengen in het bacteriële genoom door te coderen voor geclusterde inversiegebieden oftewel 'shufflons'. [10] Deze systemen worden maar in enkele bacteriën beschreven. Ze werden voor het eerst gevonden in het plasmide R64 van de *Salmonella* spp. Ze bestaan uit verschillende recombinatiesequenties en een recombinase, Rci, die een inversie of deletie van het tussenliggende DNA teweeg kan brengen. Zo kan geschakeld worden tussen de aan- of afwezigheid van oppervlaktestructuren, zoals pili, die door fagen herkend kunnen worden.[11-12]

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).



**Figuur 1.** Samenvatting van de bacteriële resistentiemechanismen (in groen), en van de genetische elementen die daarvoor verantwoordelijk zijn (in magenta) in de opeenvolgende stadia van de infectiecyclus. De aanhechting van de faag kan worden tegengegaan door maskeren, blokkeren, veranderen of onderdrukken van de oppervlaktereceptoren die worden herkend. Obstructie van binnendringen van DNA in het bacteriële cytoplasma wordt bereikt door proteïnen die DNA-ejectie, degradatie van de peptidoglycaanmembraan, of translocatie over de binnenmembraan blokkeren. Faag-DNA is zodra het zich binnen de bacterie bevindt doelwit, waarbij replicatie, transcriptie en translatie van genproducten worden voorkomen. Dit gebeurt door systemen die DNA afbreken, zoals R-M en CRISPR-Cas, en door systemen die het DNA niet alleen knippen maar ook binden, zoals BREX en Argonaute. Abortieve infectiesystemen hebben als doel verspreiding van fagen naar andere bacteriën te voorkomen door het laten afsterven van de geïnfecteerde bacterie in elk stadium van de infectiecyclus.

Expressie van de genen die de voor meeste processen coderen kan worden gehinderd door mutatie op aselechte plaatsen van het genoom, door reguliere puntmutaties of door integratie of deletie van een transposon. De aanwezigheid van DNA van een andere faag in de vorm van een profaag of plasmide kan zorgen voor de verandering van oppervlaktereceptoren of voor het coderen van resistentiemechanismen zoals proteïnen die gerelateerd zijn aan Sie, R-M-systemen of genen die verbonden zijn aan abortieve infectie. Fasevariatiestystemen kunnen voeren tot verandering van het bacteriële fenotype, wat resulteert in veranderingen van de conformatie, of van de expressieniveaus van oppervlaktereceptoren, of in de specificiteit van R-M-systemen. Ten slotte worden PIC's geactiveerd in de aanwezigheid van een invaderende faag, die door de assemblage van nieuwe faagpartikels competeren om de verspreiding naar nieuwe gastheercellen.

### Bacteriële fasevariatie

Zoals boven beschreven kan door fasevariatie faaginfectie vermeden worden. Er zijn drie mechanismen die hieraan ten grondslag liggen: locatiespecifieke recombinatie, *slipped-strand mispairing* en epigenetische modificatie.[13] Locatiespecifieke recombinatie vindt plaats op een specifieke plek binnen een korte recombinatiereeks en wordt gemedieerd door een specifiek recombinase.[14] Door inversie van een DNA-segment in het regulatiegebied kan de expressie van een gen worden in- of uitgeschakeld. In sommige gevallen zijn recombinasen in staat om deze inversie de andere kant op te katalyseren, in andere gevallen is hier een ander enzym voor nodig. De aan- of afwezigheid van oppervlaktestructuren

van een bacterie is een van de eigenschappen die kunnen worden gereguleerd door dit mechanisme. Dit gebeurt bijvoorbeeld bij de ontwikkeling van flagellen in *Salmonella* spp en fimbriae in *E. coli*. [15-17] Ook *slipped strand mispairing* vindt plaats in specifieke regio's, maar deze regio's bestaan juist uit korte herhalende DNA-segmenten.[18] Slipped strand mispairing is een mutatieproces dat optreedt in specifieke regio's tijdens DNA-recombinatie, waarbij de verkeerde complementaire basen tegenover elkaar komen te liggen. De regio's waarin dit optreedt bestaan uit korte herhalingen van een bepaalde sequentie.[18] Deze mutaties kunnen stroomopwaarts van het gen of binnen de coderende sequentie optreden.[19]

Slipped strand mispairing kan leiden tot veranderde expressie van een gen of ook tot verandering in het genproduct zelf.[20] Als gevolg daarvan kan slipped-strand mispairing aanleiding zijn voor faagresistentie door onder meer de non-expressie van receptoren [21-22] of R-M-systemen.[23]

Epigenetische modificaties zijn voornamelijk gebaseerd op veranderingen in methyleringspatronen op DNA-sequenties.[24] In bacteriën is methylering van adenine het meest voorkomend en dit wordt gekatalyseerd door het enzym Dam (DNA-adenine-methylase). Methylering door Dam kan een rol spelen bij de onderdrukking van bepaalde promotors.[25] Zo reguleert methylering door Dam het verkorten van O-antigeenketens in de lipopolysacharide van *Salmonella enterica*. [26] Dit maakt de bacterie resistent tegen fagen maar het gaat ten koste van de eigenschap zich te kunnen prolifereren binnen macrofagen, wat de bacterie minder virulent maakt.

#### *Transponeerbare elementen*

Ook transponeerbare elementen dragen bij aan de genetische variabiliteit, oftewel transposons. Transposons zijn DNA-fragmenten die hun positie binnen het genoom willekeurig kunnen veranderen. Dit creëert mutaties en in sommige gevallen veranderingen in de grootte van het genoom. Transposons kunnen tussen bacteriesoorten worden overgedragen door middel van fagen.[27] Transpositie van DNA-sequenties stimuleert mutagenese hetgeen de kans op de ontwikkeling van een faagresistent fenotype vergroot.

Een bijzonder voorbeeld van transpositie van bacteriën wordt gezien bij de bacteriofaag Mu. Het genoom van deze faag kan fungeren als een transposon en op willekeurige posities van het bacteriële genoom worden geplaatst. Op deze manier kunnen genen of operons worden verstoord en stimuleert het de mutatiefrequentie.[28] Het genoom kan zijn DNA inbrengen in elke willekeurige fase van de levenscyclus van de bacterie waarbij het meer dan één keer kan worden getransponeerd.[29]

Anderzijds kunnen transposons ook een technisch hulpmiddel zijn om genen die betrokken zijn bij faagresistentie te identificeren. Hierbij worden aselekt gekozen transposons in vitro gebruikt om bacteriële mutanten te selecteren. In deze faagresistente mutanten wordt de insertieplek geïdentificeerd door sequensen om zo het mechanisme

van faagresistentie op te helderen.[30]

#### *Faag-induceerbare chromosomale eilanden*

Sommige grampositieve bacteriën hebben een nog slimmere manier waarmee ze hun genoom gebruiken als bescherming tegen faaginfectie. Ze coderen voor zogeheten faag-induceerbare chromosomale eilanden (PIC1's). Dit zijn als het ware genetische parasieten die kunnen concurreren met binnengevallen fagen tijdens hun lytische cyclus. De meest bekende zijn de PIC1's die gevonden zijn in *Staphylococcus aureus*, de SaPI's.[31] SaPI's worden tot expressie gebracht als reactie op een faaginfectie. Ze kunnen zich repliceren en verpakken zich binnenin de capsid van de infecterende faag, waarmee het genoom van de faag zelf wordt verdreven. De nieuw gevormde SaPI-dragende virions barsten vervolgens uit de cel bij de lysis en verspreiden zich naar nabijgelegen bacteriën waar ze concurreren met faaginfectie.

In deel vier gaan we verder in op de mechanismen waarop bacteriofagen de tegenaanval inzetten.

## Referenties

1. Taylor AL. Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1963;50(6):1043-51.
2. Koonin E V, Makarova KS, Wolf YI. Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71:23361.
3. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4).
4. Dedrick RM, Jacobs-Sera D, Bustamante CAG, et al. Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat Microbiol*. 2017;2(3):16251.
5. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(2):127-81.
6. Hill C, Romero DA, McKenney DS, Finer KR, Klaenhammer TR. Localization, cloning, and expression of genetic determinants for bacteriophage resistance (Hsp) from the conjugative plasmid pTR2030. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(7):1684-1689. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2504114>. Accessed February 6, 2019.
7. Jarvis AW, Heap HA, Limsowtin GK. Resistance against Industrial Bacteriophages Conferred on Lactococci by Plasmid pAJ1106 and Related Plasmids. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(6):1537-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347947>. Accessed February 6, 2019.
8. Ainsworth S, Mahony J, van Sinderen D. The Plasmid Complement of *Lactococcus lactis* UC509.9 Encodes Multiple Bacteriophage Resistance Systems. Björkroth J, ed. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(14):4341-9.
9. O' Sullivan D, Ross RP, Twomey DP, Fitzgerald GF, Hill C, Coffey A. Naturally Occurring Lactococcal Plasmid pAH90 Links Bacteriophage Resistance and Mobility Functions to a Food-Grade Selectable Marker. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(2):929-37.
10. Komano T. Shufflons: Multiple Inversion Systems and Integrons. *Annu Rev Genet*. 1999;33(1):171-91.

11. Sitaraman R, Dybvig K. The Hsd Loci of *Mycoplasma Pulmonis*: Organization, Rearrangements and Expression of Genes. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2958.1997.5571938.x>. Accessed March 9, 2019.
12. Blakely G, Murray N. DNA Restriction and Modification. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Vol. 3. ELSEVIER ACADEMIC PRESS INC; 2009:538-49.
13. Henderson IR, Owen P, Nataro JP. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*. 1999;33(5):919-32.
14. Dybvig K. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 1993;10(3):465-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968525>. Accessed February 18, 2019.
15. Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(17):5724-7.
16. Heichman KA, Johnson RC. The Hin invertasome: protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. *Science*. 1990;249(4968):511-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166334>. Accessed March 9, 2019.
17. Choi Y, Shin H, Lee J-H, Ryu S. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella*-infecting bacteriophage, iEPS5. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(16):4829-37.
18. Chandler M, Fayet O. Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol Microbiol*. 1993;7(4):497-503.
19. Belland R.J. H-DNA formation by the coding repeat elements of neisserial opa genes. *Mol Microbiol*. 1991;5(10):2351-60.
20. Zhou K, Aertsen A, Michiels CW. The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(1):119-41.
21. Sarkari J, Pandit N, Moxon ER, Achtman M. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing polycytidine. *Mol Microbiol*. 1994;13(2):207-17.
22. Willems R, Paul A, van der Heide HG, ter Avest AR, Mooi FR. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J*. 1990;9:2803-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975238>. Accessed March 9, 2019.
23. Adamczyk-Poplawska M, Lower M, Piekarowicz A. Deletion of One Nucleotide within the Homonucleotide Tract Present in the hsdS Gene Alters the DNA Sequence Specificity of Type I Restriction-Modification System NgoAV. *J Bacteriol*. 2011;193(23):6750-9.
24. Casadesús J, Low D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(3):830-56.
25. Marinus MG, Løbner-Olesen A. DNA Methylation. *EcoSal Plus*. 2014;6(1).
26. Cota I, Sánchez-Romero MA, Hernández SB, Pucciarelli MG, García-Del Portillo F, Casadesús J. Epigenetic Control of *Salmonella enterica* O-Antigen Chain Length: A Tradeoff between Virulence and Bacteriophage Resistance. *PLoS Genet*. 2015;11(11):e1005667.
27. Babakhani S, Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*. 2018;58(11):905-97.
28. Fields BN, Knipe DM (David M, Howley PM. *Virology*. Lippincott-Raven Publishers; 1996.
29. Harshey RM. Transposable Phage Mu. *Microbiol Spectr*. 2014;2(5).
30. Barquist L, Mayho M, Cummins C, et al. The TraDIS toolkit: sequencing and analysis for dense transposon mutant libraries. *Bioinformatics*. 2016;32(7):1109-11.
31. Ram G, Chen J, Kumar K, et al. Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):16300-5.