

Faagihoidot

LuK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biokemia
03/2024
Jasmin Lankila

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

Jasmin Lankila: Faagihoidot

LuK-tutkielma, 16 s.

Biokemia

03/2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Antibioottiresistenssin vuoksi tarvitaan menetelmiä, joilla voidaan hoitaa moniresistettien bakteerien aiheuttamia infektioita. Mahdollinen vaihtoehto antibiooteille on bakteriofagien, eli bakteereja infektioivien virusten hyödyntäminen. Faagihoidolla on pitkä historia entisen Neuvostoliiton maissa, mutta kiinnostus länsimaissa on herännyt vasta viime vuosikymmenien aikana lisääntyneen antibioottiresistenssin myötä.

Faagihoidon soveltaminen kliinisessä tarkoituksessa edellyttää faagien laajaa karakterisointia, eli bakteerien ja faagien yhteensopivuuden määrittämistä erilaisten bioinformatiikan työkalujen avulla. Kehittyneet sekvensointimenetelmät mahdollistavat oikean faagin löytämisen halutulle bakteerille. Faagihoidosta on viime vuosien aikana tehty useita kliinisiä kokeita, joissa on havaittu onnistuneita tuloksia bakteri-infektioiden hoidossa. Pelkät faagit eivät kuitenkaan välttämättä riitä, vaan usein faagien lisäksi hyödynnetään synergistisiä vuorovaikutuksia, joita saadaan esimerkiksi antibioottien kanssa. Faagin genomia voidaan myös muokata haluttujen ominaisuuksien saamiseksi ja siten hoidon tehostamiseksi.

Avainsanat: bakteriofagi, faagi, antibioottiresistenssi, bakteri-infektio, synergia, genomien muokkaus

Sisällys

1	Johdanto	2
2	Faagien karakterisointi	3
2.1	Faagien rakenne ja toimintamekanismi	3
2.2	Faagien etsiminen	5
3	Bakteeri-infektioiden hoito faagien avulla	7
3.1	Faagihoidon sovelluskohteet	7
3.2	Synergia faagihoidon tehostamisessa	9
3.3	Faagit antibioottiresistenssin ja virulenssin minimoinnissa	10
4	Faagien genomin muokkaus	12
4.1	Homologinen rekombinaatio	12
4.2	BRED	13
4.3	CRISPR-Cas	13
4.4	Synteettiset faagit	14
5	Yhteenveto	16
	Lähteet	17

1 Johdanto

Bakteriofagit, eli faagit ovat viruksia, jotka infektoivat bakteerisoluja ja hyödyntävät niitä lisääntymistarkoituksessa. Faageja on kaikkialla, missä elää bakteereja ja biosfäärissä on arvioitu olevan noin 10^{31} faagipartikkelia. Faagien uskotaan olevan maailmassa vanhimpia ja runsaiten esiintyviä organismeja. Faageilla on merkittävä rooli bakteeriyhteisöjen säätelyssä ja siten faagit ovat myös osa ihmisen mikrobiomia. (Strathdee ja muut 2023.)

Bakteriolyttisestä, eli bakteereja hajottavasta aktiivisuudesta on tehty havaintoja historian saatossa. Vuonna 1917 mikrobiologi Felix d'Herelle päätteli bakteereilla olevan niitä infektoivia parasitteja, jotka hän nimesi bakteriofageiksi. Faageja sovellettiin bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa 1940-luvulle asti, kunnes penisilliini tuli markkinoille. Ensimmäiset yhä käytössä olevat faagihoido-ohjelmat kehitettiin Tbilisissä Georgiassa ja Wrocławissa Puolassa. Faagihoidon kehitys jatkui entisen Neuvostoliiton maissa, mutta jäi länsimaissa huomiotta toisen maailmansodan jälkeen antibioottien löytämisen myötä. (Strathdee ja muut 2023.)

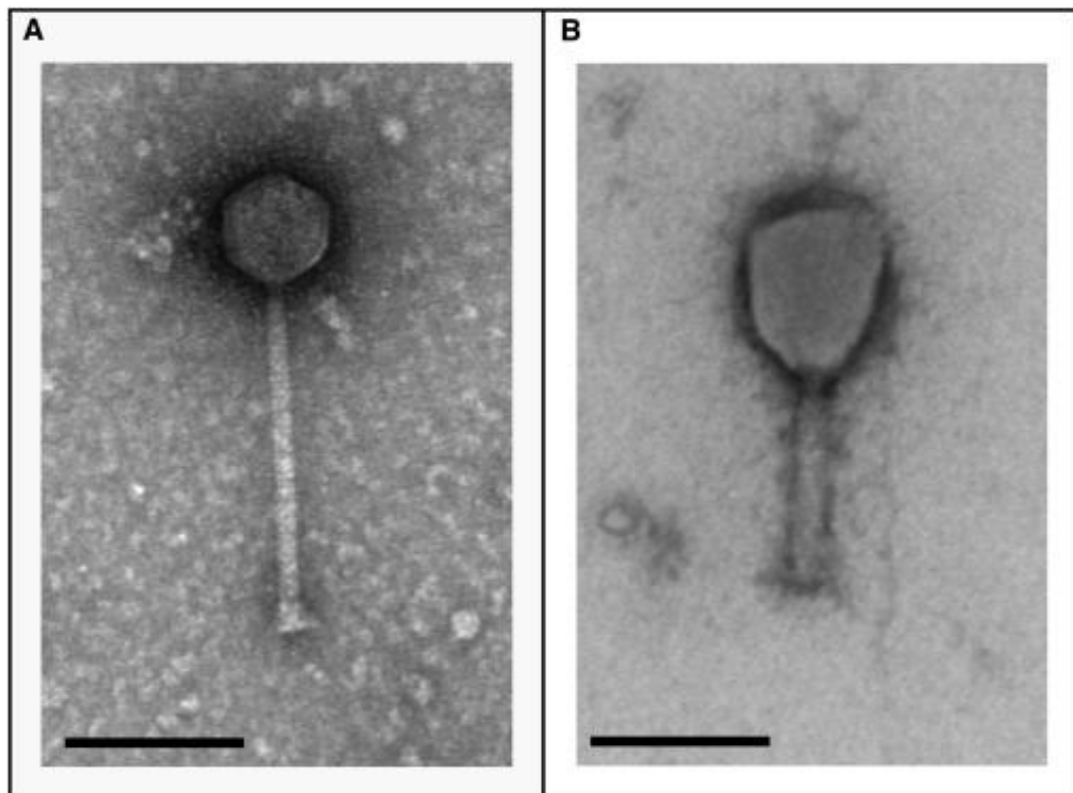
Antibiootteja pidettiin helpompana vaihtoehtona niiden laaja-alaisuuden vuoksi, eikä aikaisemmin ollut tehokkaita tekniikoita faagien etsimiseen. Liiallinen antibioottien käyttö on kuitenkin johtanut resistenssin kehittymiseen, minkä vuoksi vaihtoehtoiset hoitomenetelmät ovat tarpeen ja faagihoidot ovat alkaneet herättämään kiinnostusta länsimaissa viime vuosikymmenien aikana. (Dąbrowska ja Abedon 2019; Strathdee ja muut 2023.)

Faagihoidon etuna antibiootteihin verrattuna on se, että faagit kykenevät monistumaan itsenäisesti bakteerisolussa, eikä faagilääkessä tarvita useita annostelukertoja. Spesifisyyden ansiosta faagit eivät myöskään vahingoita mikrobiomia. Faagihoido on myös havaittu turvalliseksi menetelmäksi, ja sivuvaikutukset ovat minimaalisia verrattuna antibiootteihin. (Gordillo Altamirano ja Barr 2019.) Tutkielmassa tutustutaan faagien karakterisoinnin menetelmiin sekä esitellään faagihoidon sovelluskohteita ja kliinisiä kokeita. Tutkielmassa käsitellään myös faagihoidon tehokkuuden edistämistä synergistisillä vuorovaikutuksilla ja faagin genomien muokkauksella.

2 Faagien karakterisointi

2.1 Faagien rakenne ja toimintamekanismi

Faagit ovat erittäin spesifisiä tietyille isäntäbakteerille, jota ne hyödyntävät lisääntymistarkoituksessa. Faagin genomi on proteiineista koostuvan kapsidin sisällä. Genomi on usein kaksijuosteisessa DNA-muodossa, mutta myös yksijuosteinen DNA tai RNA ovat mahdollisia. Faagin aiheuttama infektiio käynnistyy faagin sitoutuessa isäntäbakteerinsa spesifiseen pintareseptoriin. Reseptorit ovat proteiimirakenteita, kuten flagelloja ja piluksia sekä soluseinän poriineja tai ulosvirtauspumppuja. Myös lipopolysakkaridien sokeriosat voivat olla faagireseptoreita. Faagi sitoutuu tunnistamaansa reseptoriin häntäosalla ja injektioi genominsa bakteerin sytoplasmaan. (Kortright ja muut 2019; Strathdee ja muut 2023.)



Kuva 1. Mikroskooppikuva faageista. A) *Muddy* ja B) *Maestro*, joita on käytetty *Mycobacterium abscessus* ja *Acinetobacter baumannii* aiheuttamien infektioiden hoidossa. *Muddy*-faagilla on sifoviraalinen morfotyyppi, jolloin faagi koostuu ikosaherdaalisesta, eli pallomaisesta kapsidista ja ei-supistuvasta hännästä. *Maestro*-faagilla on myoviraalinen morfologia, eli faagilla on supistuva häntä. Häntien rakenteet

tunnistavat bakteerisolun pinnalla olevia spesifisiä reseptoreja. Mittaviivat 100 nm. Kuvat: Graham Hatfull ja Adriana Carolina Hernandez. (Strathdee ja muut 2023.)

Faagit voivat olla lyyttisiä tai lysogeenisiä. Lyyttisessä syklissä genomien injektioinnin seurauksena bakteerisolussa alkaa biosynteesi, jossa tuotetaan faagin osia. Uusia faageja muodostuu runsaasti, kunnes faagin koodaamat holiinit ja endolysiinit aktivoivat bakteerisolun lyysaantumisen. Tällöin faagit pääsevät poistumaan solusta ja sykli toistuu uusissa bakteereissa. (Gordillo Altamirano ja Barr 2019.)

Lyyttisten faagien lisäksi luonnossa esiintyy myös lysogeenisiä faageja. Lysogeenisessä syklissä faagin lyyttiseen sykliin vaadittavat geenit sammutetaan ja faagin genomi integroidaan osaksi bakteerin genomia joko kromosomiin tai plasmidiksi. Bakteeriin integroitua faagin genomia kutsutaan profaagiksi. Profaagi voi säilyä bakteerissa useiden sukupolvien ajan, eli lysogeeniset faagit eivät tapa infektoimiaan bakteereja heti. Lyyttiset faagit sen sijaan pystyvät tappamaan suuren määrän bakteereja nopeasti, minkä vuoksi ne soveltuvat paremmin faagihoidoihin. (Strathdee ja muut 2023.)

Faageilla on spesifinen isäntäjoukko, eli bakteerit, joita ne infektoivat. Isäntäjoukko voi olla laaja, jolloin faagi infektoi useaa bakteerilajia saman suvun sisällä. Osa faageista on vielä spesifisempiä infektoidessaan vain muutamaa yksilöä yhdestä bakteerilajista, jolloin isäntäjoukko on kapea. Kapea isäntäjoukko on seurausta bakteerien kehitymisestä selviytymään faagi-infektioista, ja faagien täytyy kehittyä mukana. Evoluution seurauksena bakteereille on kehittynyt immuunipuolustusmenetelmiä, kuten CRISPR-Cas (engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) ja faageille taas vastamekanismeja, kuten anti-CRISPR-Cas. (Strathdee ja muut 2023.)

Faagien isäntäjoukko määräytyy bakteerisolun pinnalla tapahtuvien prosessien sekä faagi-DNA:n injektioinnin jälkeen tapahtuvien puolustusmekanismien perusteella. (Strathdee ja muut 2023.) Faagit, joilla on laaja isäntäjoukko ovat usein tehokkaampia, sillä faagin ja bakteerin yhteensopivuuden todennäköisyys kasvaa (Hyman 2019).

2.2 Faagien etsiminen

Yksinkertaisimmillaan halutulle bakteerille sopivia faageja voidaan etsiä luonnosta, sillä faageja esiintyy kaikkialla missä on bakteereja: merissä, järvissä maaperässä, kasveissa ja eläimissä. Faagien etsintä voidaan aloittaa esimerkiksi jätevesistä tai maaperästä, jossa elää haluttua bakteerilajia. Faagien tunnistamiseksi vesi- ja maaperänäytteistä suodatetaan pois viruksia suuremmat kokonaisuudet ja suodokset laitetaan esimerkiksi agarmaljalle bakteerinäytteiden päälle, joita varten halutaan löytää faagi. Lyyttisten faagien läsnäolo näkyy bakteerinäytteissä tyhjinä bakteereja sisältämättöminä alueina, joista faagit voidaan eristää. (Strathdee ja muut 2023.)

Laboratorioviljelyssä on kuitenkin useita rajoitteita. Faagit saattavat vaatia spesifiset kasvuolosuhteet tai isäntäbakteeria ei ole saatavilla laboratoriossa. Myös lysogeenisten faagien havaitseminen voi olla vaikeaa. (Coclet ja Roux 2021.) Faagien etsinnän helpottamiseksi voidaan hyödyntää metagenomiikan sovelluksia, eli kokonaisen yhteisön geenien tutkimista (Hultman ja Auvinen 2010). Metagenomiikan ansiosta faageja ei tarvitse kasvattaa laboratoriossa, mikä antaa enemmän mahdollisuuksia erilaisten faagien löytämiselle. Metagenomiikan avulla on löydetty paljon uusia faageja, mutta ongelmana saattaa olla, ettei näytteistä löytyneiden faagien isäntäbakteereja tiedetä. (Coclet ja Roux 2021.)

Ratkaisuna faagien isäntäbakteerien löytämiseksi käytetään bioinformatiikan työkaluja, joissa hyödynnetään metagenomia. Faagin ja isäntäbakteerin yhteensopivuus voidaan ennustaa faagin genomin sekvenssin perusteella. Sekvenssin kohdentamismenetelmä perustuu nukleotidien samankaltaisuuteen faagin ja bakteerin genomin välillä. Mahdollisten isäntäbakteerien genomit voidaan löytää esimerkiksi NCFI RefSeq -tietokannasta, jota käytetään nukleotidisekvenssien samankaltaisuuden tunnistamiseen halutun faagin genomin ja bakteerin välillä. (Coclet ja Roux 2021.)

Suuret samankaltaiset alueet faagin ja bakteerin genomissa johtuvat usein bakteerin genomiin integroituneesta profaagista. Lyhyemmät samankaltaiset alueet johtuvat usein bakteerin ja faagin välillä horisontaalisesti siirtyneistä geeneistä, joita ovat esimerkiksi avustavat metaboliset geenit (eng. auxiliary metabolic genes, AMG). Nämä yhdistetään aiemmin onnistuneeseen infektiin, eli faagi voisi olla toimiva faagihoitoa ajatellen.

Virusgenomi voi myös olla yhteensopiva bakteerin CRISPR-spacer-sekvenssin kanssa, mikä kertoo bakteerin puolustuskyvystä faagia vastaan, eikä kyseinen faagi ole sopiva faagihoitoihin tämän isäntäbakteerin tapauksessa. (Coclet ja Roux 2021.)

Isäntäbakteerille sopivaa faagia voidaan etsiä myös virusmarkkereiden avulla. Markkerit ovat virusgeenejä, joita vain spesifistä isäntäbakteerisukua infektoivat faagit koodaavat. Virusmarkkereihin perustuvassa faagien etsimisessä käytössä on Viral Host Unveiling Kit (vHULK), jossa faagin ennustetut proteiinisekvenssit yhdistetään Prokaryotic Virus Orthologus Group (pVOG) -tietokannasta löytyviin virusproteiineihin. pVOG:n antama lista faagigenomeista syötetään kahteen syvään neuroverkostoon, joka pystyy ennustamaan isäntäbakteerilajin ja -suvun, sekä kertomaan ennustuksen luotettavuuden. (Coclet ja Roux 2021.)

Kun isäntäbakteerille on löydetty sopiva faagi, käyttö kliinisessä tarkoituksessa vaatii faagin karakterisointia. Karakterisointi sisältää faagin isäntäjoukon määrittämisen ja koko genomisen sekvensoinnin. Karakterisoinnissa pyritään myös etsimään antimikrobiaalista resistenssiä ja toksineja koodaavia geenejä sekä lysogeenisyyteen viittaavia geenejä, jotta näiltä voidaan välttyä. Ennen kliinistä käyttöä faageja monistetaan sille sopivassa karakterisoidussa isäntäbakteerissa ja endotoksiinit sekä muut haitalliset yhdisteet poistetaan. (Strathdee ja muut 2023.)

Karakterisoidut tiettyä isäntäbakteeria infektoivat faagit voidaan koota faagipankeiksi, joista saadaan faageja kliiniseen käyttöön sekä lähtömateriaali faagien geneettiseen muokkaamiseen tai synteettisten faagien rakentamiseen. Kattavasti karakterisoidut faagikirjastot mahdollistavat sopivien faagien löytämisen eri bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon. (Strathdee ja muut 2023.)

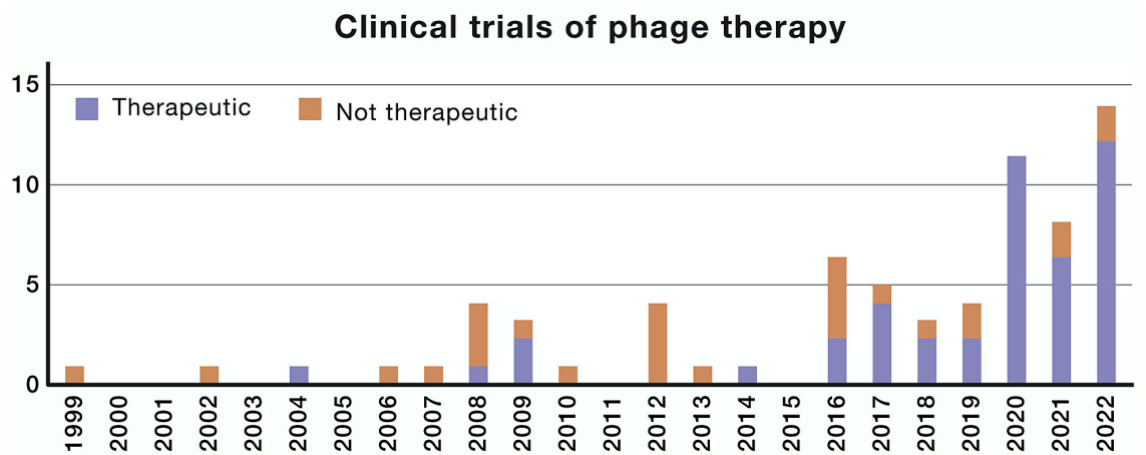
3 Bakteeri-infektioiden hoito faagien avulla

3.1 Faagihoidon sovelluskohteet

Faagien karakterisoinnin kehittymisen myötä kiinnostus faagihoidoista kohtaan on kasvanut länsimaissa viime vuosien aikana antimikrobiaalisen resistenssin lisääntyessä. Toistuvia infektoita aiheuttavat bakteerit kehittyvät helposti moniresistenteiksi, eli resistenteiksi useille antibiooteille. Kroonisten tulehdusten hoito antibiooteilla altistaa moniresistenttien bakteerien syntymiselle monien hoitoyritysten johdosta. Erityisesti kehonsisäiset hoitolaitteet, kuten tekonivelet ja sydämentahdistimet altistavat krooniselle tulehdukselle biofilmin syntymisen vuoksi. Biofilmi on pintaan tarttuvien mikrobien muodostama järjestäytynyt rakenne, jota antibiootit eivät välttämättä läpäise. (Suh ja muut 2022.)

Muita uusiutuvia infektoita ovat esimerkiksi virtsatietulehdus, ihon tulehdukset sekä hengitystieinfektiot kroonisissa keuhkosairauksissa. Tällaisten moniresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon vaaditaan uusia ratkaisuja ja hoito faageilla on tuottanut lupaavia tuloksia. (Suh ja muut 2022.)

Faagien tehosta moniresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa on näyttöä useiden tutkimusten perusteella. Faagihoidon tutkimuksissa on pitkälti keskitytty yleisimpiin moniresistentteihin, ESKAPE-ryhmään kuuluviin bakteereihin (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Enterobacter* -lajit). ESKAPE-ryhmään kuuluvien bakteerien aiheuttama tartunta on yleistä sairaalaolosuhteissa jonkin toisen sairauden hoidon yhteydessä. (Suh ja muut 2022.) Kuvassa 2 on esitetty faagihoidon kliinisten kokeiden määriä vuodesta 1999 lähtien. Faagihoidosta on raportoitu useita kliinisiä kokeita erityisesti vuodesta 2016 eteenpäin ja määrä on kasvanut vuoteen 2022 mennessä. (Strathdee ja muut 2023.)



Kuva 2. Faagihoidosta tehdyt raportit ja kliiniset kokeet vuosittain. Kliiniset kokeet, joita on raportoitu ClinicalTrials.gov -sivustolle vuodesta 1999 lähtien. Tiedot haettu hakusanalla ”phage” 9.9.2022. (Muokattu kuvasta Strathdee ja muut 2023.)

Suhin ja muiden katsauksessa (2022) esitellään kliinisiä kokeita faagihoidosta. Onnistuneita tuloksia faagihoidoissa on saatu uusiutuvien virtsatieinfektioiden hoidossa, joissa yleisimpiä aiheuttajabakteereja ovat *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ja *Pseudomonas aeruginosa*. Hoidoissa hyödynnettiin yhtä faagia tai useampia faageja sisältävää cocktailia. Faagicoctailit annosteltiin suun kautta, suonensisäisesti tai suoraan tulehduspaikalle. Tutkimuksissa esitellyissä tapauksissa virtsatieinfektion oireet saatiin poistettua ja suurimmassa osassa tapauksista infektiota aiheuttavista bakteereista päästiin kokonaan eroon. (Suh ja muut 2022.)

Faageja on hyödynnetty onnistuneesti myös hengitystieinfektioiden hoidoissa, joissa aiheuttajabakteereja olivat esimerkiksi *Mycobacterium abscessus*, *P. aeruginosa* ja *Acinetobacter baumannii*. Tutkittavat hengitystieinfektiot olivat kystisen fibroosin aiheuttamia infektioita sekä keuhkotransplantista tai COVID-19-jälkitaudista aiheutuneita keuhkokuumeita. Hoidoissa käytetyt faagicoctailit annosteltiin suonensisäisesti tai aerosolimuodossa. Kystisen fibroosin seurauksena saatujen keuhkoinfektioiden hoito oli onnistunut, mutta epäonnistumisia havaittiin *M. abscessuksen* aiheuttamassa keuhkotaudissa sekä kahdessa neljästä tapauksesta *A. baumannii*n aiheuttaman COVID-19-jälkitaudin hoidossa. *M. abscessuksen* tapauksessa epäonnistuminen syy oli faageja neutralisoivat vasta-aineet (Suh ja muut 2022.)

Krooniset tulehdukset ovat usein seurausta biofilmistä, jota immuunijärjestelmän sekä antibioottien on vaikea läpäistä. Biofilmin muodostuminen on riski kehonsisäisissä hoitolaitteissa. Biofilmi voi muodostua myös luuhun aiheuttaen luutulehduksen, eli osteomyeliitin. Faagit pystyvät kuitenkin läpäisemään biofilmin ja tällaisten infektioiden hoidosta on raportoitu onnistuneita tuloksia *Staphylococcus aureuksen* ja *P. aeruginosan* ollessa yleisempiä luihin, tekoniveleihin sekä sydämentahdistimiin liittyvien tulehduksen aiheuttajia. Infektioita hoidettiin yhden faagin avulla tai faagicoctaileilla, jotka syötettiin suonensisäisesti tai paikallisesti. Faagihoito toimi suurimmassa osassa tapauksista, mutta *P. aeruginosan* aiheuttama infektio uusiutui kahdessa sydäntahdistimeen liittyvässä tapauksessa. (Suh ja muut 2022.)

Faagihoito moniresistenttien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa on tuottanut onnistuneita tuloksia, mutta menetelmässä on rajoitteita. Faagien spesifisyys on hyvä asia siinä mielessä, että tällöin vain halutut bakteerit tuhotaan eikä normaaliflooraan kohdistu tuhoavaa vaikutusta kuten esimerkiksi antibiooteilla. Spesifisyys saattaa kuitenkin olla rajoite tilanteissa, joissa ei olla varma infektion aiheuttajabakteerista. (Kortright ja muut 2019.) Myös immuunipuolustus saattaa vaikuttaa alentavasti faagihoidon tehoon faageja neutralisoivien vasta-aineiden tuotannon myötä (Hatfull ja muut 2022).

Faagien karakterisointi on aikaa vievä prosessi, eikä sopivia faageja ole välttämättä heti valmiina käyttöön. Faagit eivät myöskään välttämättä pääse infektoimaan eukaryoottisolun sisällä olevaa bakteeria, sillä kaikilla faageilla ei ole mekanismeja päästä solun sisään. Myös endotoksiinien vapautuminen bakteerien lyysaantuessa saattaa herättää huolenaiheita. Kehittynyt faagien karakterisointi kuitenkin mahdollistaa faagihoidon tehokkuuden ja turvallisuuden. (Kortright ja muut 2019.)

3.2 Synergia faagihoidon tehostamisessa

Synergia on farmakologiassa ilmiö, jossa kaksi lääkettä tuottaa paremman vasteen kuin kumpikin yksinään, mikä parantaa hoidon onnistumisprosenttia. Faagihoito ei välttämättä toimi yksinään bakteerien eliminointiin ja esimerkiksi tulehtuneiden palovammojen hoidossa pelkkä faagihoito saattaa olla tehotonta, sillä spesifiset faagit eivät pysty hoitamaan usean bakteerin aiheuttamia tulehduksia (Lin ja muut 2017.) Tällöin saatetaan tarvita hoitoa tehostavaa adjuvanttia synergististen vuorovaikutusten aikaansaamiseksi.

Useimmissa onnistuneissa faagihoidoissa on käytetty antibiootteja faagien lisäksi. Antibiootit saattavat parantaa faagilääkkeen toimintaa, sillä kaksi erilaista menetelmää tuottaa todennäköisesti paremman vasteen verrattuna yhteen. (Gordillo Altamirano ja Barr 2019.)

Synergia faagien ja antibioottien välillä on havaittu ensimmäistä kertaa Comeaun ja muiden tutkimuksessa (2007). Tutkimuksessa synergiaa testattiin beetalaktaamaaseilla ja kinoloneilla *E. colia* vastaan. Tarpeeksi alhaisessa antibioottipitoisuudessa bakteerisolun jakautuminen estyi, muttei aiheuttanut solun kuolemaa. Tämä mahdollisti faagien nopean leviämisen ja siten bakteeripopulaation vähenemisen. (Gordillo Altamirano ja Barr 2019.) Kaikki antibiootit eivät kuitenkaan tuota synergistisiä vuorovaikutuksia, sillä osa antibiooteista saattaa häiritä faagin replikaatiota. (Kortright ja muut 2019.)

3.3 Faagit antibioottiresistenssin ja virulenssin minimoinnissa

Kuten antibioottien tapauksessa, myös faagien käyttö bakteeri-infektioiden hoidossa saattaa johtaa bakteerien resistenssin kehittymisen faageja vastaan. Vaikka resistenssin syntyminen faagia kohtaan vähentää faagihoidon tehokkuutta, resistenssin kehittymisestä voi kuitenkin olla hyötyä bakteeri-infektioiden hoidossa. Faagien käyttö voi esimerkiksi auttaa antibioottiresistenssin vähenemisessä bakteerien evoluution seurauksena. Bakteeri kehittyi suojaamaan itseään faagilta ja esimerkiksi faagin sitoutuminen antibioottien ulosvirtauspumppuun aiheuttaa selektiota tätä rakennetta vastaan, mikä tekee bakteereista taas herkkiä antibiooteille. (Kortright ja muut 2019.)

Esimerkkitapaus antibioottiresistenssin poistamisessa on *P. aeruginosa*-bakteeria infektoiva faagi OMKO1, jonka sitoutumiskohta on antibiootteja ulos pumpaavien MexAB ja MexXY-ulosvirtauspumppujen ulkoinen membraaniporiini M (OprM). Puolustautuessaan OMKO1-faagilta, *P. aeruginosan* ulosvirtauspumppua koodaavassa operonissa tapahtuu mutaatioita, mitkä tekevät ulosvirtauspumppun toimimattomaksi. Tämä johtaa siihen, että bakteerista tulee taas herkkä antibiooteille. Samankaltaisia mutaatioita saattaa tapahtua myös muilla bakteereilla, joiden antibioottiresistenssi on riippuvaista pumpun toiminnasta. Bakteerien kehittyminen resistenteiksi faageja kohtaan saattaa siis minimoida antibioottiresistenssiä. (Kortright ja muut 2019.)

Faagien aiheuttama selektiopaine vaikuttaa myös bakteerien virulenssiin. Faagin sitoutuminen bakteerin virulenssia aiheuttavaan kohtaan johtaa mutaatioihin kyseisessä kohdassa. Nämä mutaatiot voivat olla hyödyllisiä, sillä bakteeri muuntuu vähemmän virulentiksi. Virusfaktorit, kuten esimerkiksi kapselit saattavat peittää antigeenejä, aiheuttaa antibioottiresistenssiä tai estää fagosytoosia. Muihin faktoreihin, kuten piluksiin tai erityssystemeihin sitoutuminen estää bakteerien kiinnittymistä infektoitaviin ihmissoluihin. Jos faagi tarvitsee virulenssifaktoria sitoutuakseen, bakteerissa saattaa tapahtua selektiota virusfaktorien ekspressiota vastaan, mikä johtaa virulenssin vähenemiseen. (Kortright ja muut 2019.)

4 Faagien genomin muokkaus

4.1 Homologinen rekombinaatio

Faagihoidon tehostamiseksi luonnossa esiintyvät faagit saattavat vaatia genomin muokkausta, sillä halutun bakteerin tuhoamiseen tarvittava faagi ei välttämättä tapa bakteeria tarpeeksi tehokkaasti. Esimerkiksi luonnostaan lysogeeniset faagit eivät toimi faagihoidoissa yhtä hyvin kuin lyyttiset faagit. Faagin genomi saattaa myös koodata useita tuntemattomia proteiineja, jotka ovat mahdollisesti ihmiselle haitallisia. Faagien ominaisuuksia voi siis olla tarpeellista muokata, jotta niiden toimintaa saadaan tehokkaammaksi ja turvallisemmaksi. (Strathdee ja muut 2023.)

Faagien genomin muokkaamiseen on kehitelty vuosien saatossa useita eri tapoja. Genomin muokkaaminen tapahtuu bakteerisolussa, jossa haluttu geeni liittyy faagin genomiin rekombinaatiolla. Rekombinaatio on prosessi, jossa muodostuu uusia alleeliyhdistelmiä, kun DNA:n sekvenssit järjestäytyvät uudelleen (Carroll 2013). Bakteerisolun koneisto rakentaa uuden ominaisuuden sisältäviä faageja muokatun genomin perusteella. (Strathdee ja muut 2023). Perinteisin tapa genomin muokkaamisessa on homologinen rekombinaatio. Homologisessa rekombinaatiossa nukleotidisekvenssit vaihtavat paikkaa kahden DNA-molekyylin välillä, kun DNA-alueet ovat samankaltaisia eli homologisia. (Pires ja muut 2016.)

Faagiin siirrettävän geenin tulee olla isäntäbakteerissa replikoituvassa plasmidissa kahden alueen välissä, jotka ovat homologisia sen faagin genomin alueen kanssa, johon geeni halutaan liittää. Tämä mahdollistaa rekombinaation halutussa kohdassa faagin genomia. Siirron onnistumisen havaitsemiseen käytetään usein lusiferaasia tai fluoresoivaa proteiinia koodaavaa reportterigeeniä, joka siirretään faagiin halutun geenin mukana. Rekombinaatiota ei kuitenkaan välttämättä tapahdu, minkä vuoksi vain pieni osa uusista faageista sisältää halutun geenin. Tämän vuoksi homologinen rekombinaatio yksinään ei ole kovin tehokas menetelmä tuottamaan muokattuja faageja. (Pires ja muut 2016.)

4.2 BRED

Toinen faagien muokkaamiseen yleisesti käytetty rekombinaatiomenetelmä on BRED (engl. *bacterial recombineering of electroporated DNA*). Menetelmä on kehitetty alun perin mykobakteereja infektioivien faagien muokkaamiseen, minkä jälkeen käyttöä on laajennettu myös esimerkiksi *Echerichia colia* ja *Salmonella enterica* infektoiviin faageihin. BRED-menetelmässä faagi ei infektoi bakteeria, vaan faagin DNA sekä haluttu geeni saadaan bakteerisolun sisälle elektroporaation avulla. (Marinelli ja muut 2008.)

Bakteerisolussa faagin DNA sekä faagiin siirrettävä geeni rekombinoituvat homologisesti ja bakteerisolu alkaa rakentamaan uuden genomien sisältäviä faageja. BRED-menetelmällä rekombinaatioprosessi on tehokas ja onnistuneesti mutatoituneet faagit voidaan havaita PCR:llä. (Pires ja muut 2016). BRED-menetelmää on sovellettu faagihoidoissa esimerkiksi muuttamaan lysogeenisiä mykobakteeria infektoivia faageja lyyttisiksi. Muokattuja faageja on käytetty terapeuttisesti *Mycobacterium abscessus*-bakteerin aiheuttaman keuhkoinfektion hoidossa (Strathdee ja muut 2023.)

4.3 CRISPR-Cas

CRISPR-Cas on bakteerien immuunipuolustukseen kuuluva ominaisuus, joka suojelee bakteerisoluja vieraalta DNA:lta. CRISPR-sekvenssi sisältää vieraan DNA:n kanssa komplementaarisen crRNA:n (CRISPR-RNA). Cas-nukleaasi ja crRNA muodostavat vierasta DNA:ta sitovan kompleksin, jolloin Cas-nukleaasi pilkkoo tunnistetun alueen vieraasta DNA:sta. Pilkottu DNA-alue liitetään osaksi CRISPR-sekvenssiä spacer-sekvenssiksi muodostaen muistijäljen. Spacer-sekvenssin ansiosta saman faagin infektoidessa bakteerin uudestaan CRISPR-Cas-systeemi tunnistaa ja tuhoaa faagin. (Horvath ja Barrangou 2010.)

Homologinen rekombinaatio sekä BRED-menetelmä eivät yksinään ole toimivia faagihoidoissa, sillä rekombinaation tehokkuus vaihtelee. Tämä johtaa siihen, että halutun genomien sisältävien faagien joukossa on myös villityypin faageja. Faagien genomien muokkaamisessa terapeuttista käyttöä varten on tavoitteena, että koko uudella faagipopulaatiolla olisi halutun muokkauksen sisältävä genomi. Jotta saadaan vain muokatun genomien sisältäviä faageja, homologisen rekombinaation tai BRED-

menetelmien jälkeen voidaan tehdä CRISPR-Cas-välitteinen selektio. (Pires ja muut 2016.)

Kiron ja muiden tutkimuksessa (2014) käytettiin I-E CRISPR-Cas -menetelmää, jossa nukleaasina oli Cas3. Cas3 poikkeaa tunnetummasta Cas9:sta siten, että DNA-alueen leikkaamisen lisäksi se hajottaa koko leikatun palan. Tutkimuksessa homologisella rekombinaatiolla poistettiin *E. colia* infektoivasta T7-faagista kasvulle tarpeeton nukleotidikinaasia koodaava geeni 1.7. T7-faagista poistettiin ensin kyseinen geeni homologisella rekombinaatiolla. (Kiro ja muut 2014.)

Koska rekominanttifaagien joukossa oli geenin sisältäviä villityypin faageja, tehtiin mutatoituneet faagit erottelua selektio CRISPR-Cas-menetelmällä. Isäntäbakteerin kolme plasmidia koodaavat CRISPR-Cas:n aktiivisuuteen tarvittavia proteiineja, joita ovat Cas3-proteiinit, kohdentava kaskadikompleksi sekä 1.7-geenin tunnistava CRISPR-spacer. Tällöin geeniä 1.7 sisältävät genomit hajotettiin, mutta kyseistä geeniä sisältämättömät faagit säilyivät. CRISPR-Cas-menetelmää voidaan soveltaa myös muiden faagien muokkaamiseen. (Kiro ja muut 2014; Pires ja muut 2016.)

4.4 Synteettiset faagit

Faagien genomien muokkaaminen rekombinaation ja CRISPR-Casin yhdistelmällä tuottaa tehokkaasti uusia jälkeläisiä, mutta menetelmissä on rajoitteita. Mikäli faagin genomiin halutaan tehdä useita muokkauksia, vaaditaan useita kloonauksia sekä selektioita, mikä tekee prosessista aikaa vievää. Tehokasta muokattujen faagien syntymistä rajoittaa myös se, ettei muokattavan faagin isäntäbakteerilla ole välttämättä CRISPR-Cas-systeemiä. Faagin genomien monistaminen isäntäbakteerissa saattaa myös olla myrkyllistä solulle. Näiden syiden vuoksi on kehitetty menetelmiä, joilla saadaan muokattua faageja tehokkaammin ja ilman haittaa isäntäbakteerille. Yksi tapa on faagin koko genomien rakentaminen synteettisesti oligonukleotideista. (Pires ja muut 2016; Strathdee ja muut 2023.)

Synteettisten faagigenomien rakentamisessa voidaan hyödyntää *Saccharomyces cerevisiae*-hiivaa, jossa homologinen rekombinaatio on tehokkaampaa bakteerisoluun verrattuna. Faagigenomi ei myöskään aiheuta haittaa hiivasolulle. Haluttuja geenejä

sisältävän faagin genomi eristetään ja pilkotaan oligonukleotideiksi, joista uusi genomi halutaan rakentaa. Genomin rakentamiseen tarvitaan hiivasolussa monistuva lineaarinen vektori YAC (yeast artificial chromosome), jonka päissä on faagin genomin päiden kanssa homologiset 5'- ja 3'-päät. Faagin genomi ja lineaarinen vektori saadaan elektroporaatiolla hiivasoluun, jossa faagin genomi rekombinoituu YAC:n kanssa muodostaen synteettisen faagigenomin. (Pires ja muut 2016.)

Synteettisestä genomista saadaan tuotettua faageja transformoimalla genomi takaisin isäntäbakteeriin elektroporaation avulla, mikä mahdollistaa faagien synteessin uuden DNA:n perusteella. Suurten faagigenomien tapauksessa isäntäbakteerilta vaaditaan korkeaa transformaatiotehokkuutta, minkä vuoksi menetelmä ei sovi käytettäväksi kaikissa bakteereissa. (Pires ja muut 2016; Strathdee ja muut 2023.)

Myös isäntäbakteerin soluseinän paksuus vaikuttaa transformaatiotehokkuuteen. Transformaatiotehokkuus on alhaista gram-positiivisilla bakteereilla, sillä genomin transformointi paksun soluseinän läpi ei välttämättä onnistu. Suuret genomit ja gram-positiivisia bakteereja infektoivien faagien genomit voidaan kuitenkin transformoida soluseinättömiin listeriabakteereihin. Faagisynteessin soluseinättömissä listeriabakteereissa on havaittu olevan mahdollista myös muilla kuin *Listeria*-sukua infektoiville faageilla, ja menetelmällä on tuotettu myös basilleja ja stafylokokkeja infektoivia faageja. (Kilcher ja muut 2018.)

Synteettisen faagin genomin koko voi rajoittaa transformaation tehokkuutta isäntäbakteerista riippuen, jolloin faagien synteesi ei ole tehokasta. Rajoituksista voidaan päästä eroon soluvapaan menetelmän (engl. *transcription-translation, TXTL*) avulla. TXTL-menetelmässä faagigenomi rakennetaan koeputkessa käyttäen synteettisiä oligonukleotideja tai faagitemplaatin DNA-pätkiä. TXTL-menetelmällä on onnistuttu tuottamaan kliinisesti käytettäviä faageja. Synteesimenetelmillä on mahdollista rakentaa suuria genomeja ja luoda pelkästään haluttuja ominaisuuksia sisältäviä faageja, minkä vuoksi synteettisten faagien suosion arvellaan kasvavan lähitulevaisuudessa. (Strathdee ja muut 2023.)

5 Yhteenveto

Kliinisessä tarkoituksessa hyödynnettävät faagit vaativat laajaa karakterisointia ennen käyttöä. Faageille haluttavia ominaisuuksia on lyytisyys, jotta bakteerien eliminointi onnistuu nopeammin. Karakterisoinnissa pyritään myös välttymään mahdollisilta antibioottiresistenssiä tai toksineja koodaavilta geneiltä. Faagien karakterisoinnissa hyödynnettäviä bioinformatiikan työkaluja ovat esimerkiksi sekvenssin kohdentaminen ja virusmarkkerit, joilla pystytään ennustamaan faagin ja isäntäbakteerin yhteensopivuus. Karakterisoiduista faageista kootaan faagikirjastoja, joiden perusteella voidaan löytää sopiva faagi tai faagicoctail tietyn bakteeri-infektion hoitoon.

Faagihoidoa on hyödynnetty onnistuneesti erityisesti moniresistenttien ESKAPE-ryhmään kuuluvien bakteerien aiheuttamien infektioiden hoidossa, joissa antibiootit eivät ole tehonneet. Useissa tutkimuksissa faagihoidon tehokkuutta on parannettu synergistisillä vuorovaikutuksilla, jotka on saatu aikaan antibiooteilla. Faageja voidaan hyödyntää bakteeri-infektioisen hoidon lisäksi antibioottilääkityksen palauttamisessa tai virulenssin minimoimisessa. Tämä on seurausta evoluutiosta bakteerin kehittyessä resistentiksi faagille. Mikäli faagi sitoutuu antibioottien ulosvirtauspumppuun tai virulenssia edistävään tekijään, bakteerissa tapahtuu mutaatioita näissä kohdissa, mikä siten aiheuttaa antibioottilääkityksen palautumisen tai virulenssin vähenemisen.

Faagit saattavat vaatia genomin muokkausta. Genomin muokkaus tapahtuu homologisella rekombinaatiolla tai BRED-menetelmällä, joita voidaan tehostaa CRISPR-Cas-selektiolla. Genomin muokkaus voi olla vahingollista bakteerisolulle, minkä vuoksi voidaan rakentaa synteettisiä faagigenomeja. Antibioottiresistenssin lisääntyminen vaatii uusia keinoja bakteeri-infektioiden hoitoon ja faagihoido on tuottanut lupaavia tuloksia. Genomin muokkauksen ja synteettisten faagien rakentamisen kehitys mahdollistaa sen, että faageille saadaan vain haluttuja ominaisuuksia. Tämä parantaa faagihoidon tehokkuutta, minkä vuoksi muokkaus- ja synteesisimenetelmiä tullaan todennäköisesti käyttämään laajemmin tulevaisuudessa.

Lähteet

- Carroll, D. (2013) Genetic Recombination. Teoksessa S. Maloy & K. Hughes (Toim.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (ss. 277–280). San Diego: Academic Press.
- Coclet, C. & Roux, S. (2021) Global overview and major challenges of host prediction methods for uncultivated phages. *Curr Opin Virol* **49**:117–126.
- Dąbrowska, K. & Abedon, S. T. (2019) Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies. *Microbiol Mol Biol Rev* **83**:10.1128/mmbr.00012-19.
- Gordillo Altamirano, F. L. & Barr, J. J. (2019) Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev* **32**:e00066-18.
- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M. & Schooley, R. T. (2022) Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annu Rev Med* **73**:197–211.
- Horvath, P. & Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* **327**:167–170.
- Hultman, J. & Auvinen, P. (2010) [Metagenomics opens up new frontiers in microbiology]. *Duodecim Lääketieteellinen Aikakauskirja* **126**:1278–1285.
- Hyman, P. (2019) Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals* **12**:35.
- Kilcher, S., Studer, P., Muessner, C., Klumpp, J. & Loessner, M. J. (2018) Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria. *Proc Natl Acad Sci* **115**:567–572.
- Kiro, R., Shitrit, D. & Qimron, U. (2014) Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biol* **11**:42–44.

Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L. & Turner, P. E. (2019) Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe* **25**:219–232.

Lin, D. M., Koskella, B. & Lin, H. C. (2017) Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* **8**:162–173.

Marinelli, L. J., Piuri, M., Swigoňová, Z., Balachandran, A., Oldfield, L. M., Kessel, J. C. van & Hatfull, G. F. (2008) BRED: A Simple and Powerful Tool for Constructing Mutant and Recombinant Bacteriophage Genomes. *PLOS ONE* **3**:e3957.

Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J. & Lu, T. K. (2016) Genetically Engineered Phages: A Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**:523–543.

Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K. & Schooley, R. T. (2023) Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell* **186**:17–31.

Suh, G. A., Lodise, T. P., Tamma, P. D., Knisely, J. M., Alexander, J., Aslam, S., ... for the Antibacterial Resistance Leadership Group (2022) Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. *Antimicrob Agents Chemother* **66**:e02071-21.