

**Univerzita Karlova**  
**Prírodovedecká fakulta**

Študijní program: Špeciálne chemicko-biologické odbory  
Študijní odbor: Molekulárna biológia a biochémia organizmov



**Michal Vaško**

Terapeutické využitie bakteriofágov a ich modifikácie  
Therapeutic use of bacteriophages and their modifications

Typ záverečnej práce:

Bakalárska práca

Školiteľ: Mgr. Martin Fraiberk, Ph.D.

Praha, 2020

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 12.08.2020

Podpis.....

## **Pod'akovanie**

Týmto by som chcel poďakovať Mgr. Martinovi Fraiberkovi, Ph.D. za trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval počas písanie tejto práce. Ďalej tiež mojím priateľom a rodine za podporu a tolerantný prístup počas celého štúdia a písania tejto práce.

## Abstrakt

Bakteriofágy tvoria rozsiahlu skupinu vírusov, ktorých hostiteľom sú baktérie, a sú jednými z najviac rozšírených organizmov. Od ich objavenia boli používané na liečbu ochorení spôsobovaných baktériami ale vývoj antibiotík znížil ich využívanie. V súčasnej dobe vzniká stále viac bakteriálnych kmeňov nesúcich multirezistenciu voči antibiotikám a pozornosť je preto opäť viac smerovaná na využívanie bakteriofágov. Použitie prirodzených bakteriofágov má ale určité limitácie, ako je napríklad príliš široký alebo naopak príliš úzky rozsah rozpoznávaných baktérií alebo nízka efektivita a pod. ktoré molekulárne modifikácia bakteriofágov môže prekonať. Táto práca stručne popisuje ich terapeutické využitie v bakteriofágovej terapii. Hlavná časť práce je zameraná na možné metódy získavania modifikovaných fágov a následné použitie takto pripravených fágov, charakteristických konkrétnymi upravenými vlastnosťami, nie len ako presné baktericídne činidlo ale aj ako nástroj na zlepšenie aktivity antibiotík, transport liečiv, diagnostiku a prípravu vakcín. Existuje veľa štúdií popisujúcich zlepšenie alebo zmenu vlastností bakteriofágov docielené ich modifikáciou. Ich klinické využitie je zatiaľ stále nízke kvôli nízkemu počtu *in vivo* experimentov.

**Kľúčové slová:** metódy modifikácie bakteriofágov, typy modifikácie bakteriofágov, vakcinácia, antibakteriálna liečba, nádorová terapia

## **Abstract**

Bacteriophages, which infect the bacteria, form a vast group of viruses, are one of the most wide-spread organisms. Since their discovery they have been used to treat various diseases caused by the bacteria, but the development of antibiotics hindered their usage significantly. Since various bacteria strains acquire multiresistance nowadays more attention is brought to the usage of bacteriophages once again. But since the application of native bacteriophages has its limitations, e.g. too broad or too narrow host range, low efficiency, they can be overcome using molecular modifications. The goal of this thesis is to provide a brief outline of the therapeutic utilization of phages in bacteriophage therapy. The majority of this thesis focuses on potential methods of acquiring modified phages and their subsequent usage. So prepared bacteriophages characterized by their specific modified properties are not only used as bactericidal reagents but also as a tool to enhance the efficiency of antibiotics, drug delivery, diagnostics and vaccine development. Various studies describe the improvement or alteration of properties gained by phage modifications. Their clinical application, however, is still limited due to small number of *in vivo* trials.

**Key words:** methods of modifications of bacteriophages, types of genome modifications of bacteriophages, vaccination, antibacterial treatment, gene therapy

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Bakteriofágy .....</b>	<b>2</b>
2.1	Životné cykly bakteriofágov.....	2
<b>3</b>	<b>Využitie bakteriofágov.....</b>	<b>3</b>
3.1	Bakteriofágová terapia.....	3
<b>4</b>	<b>Modifikované bakteriofágy .....</b>	<b>4</b>
4.1	Metódy génovej modifikácie na prípravu syntetických bakteriofágov .....	4
4.1.1	Homologická rekombinácia .....	4
4.1.2	CRISPR-Cas systém.....	5
4.1.3	Bacteriophage recombineering of electroporated DNA (BRED) .....	6
4.1.4	In vivo recombineering .....	6
4.1.5	Prestavba genómi bakteriofágov in vitro .....	6
4.1.6	Skladanie genómu bakteriofágov použitím kvasiniek .....	7
4.1.7	Syntéza celého genómu bakteriofága použitím syntetických oligonukleotidov ..	7
<b>5</b>	<b>Molekulárne modifikácie bakteriofágov.....</b>	<b>8</b>
5.1	Zmena hostiteľa .....	8
5.2	Zvýšenie bakteriocídnej aktivity antibiotík .....	11
5.3	Bakteriofágy so sekvenčne špecifickou antimikrobiálnou aktivitou.....	14
5.4	Antimikrobiálne látky odvodené od bakteriofágov .....	17
5.5	Modifikované bakteriofágy na diagnostiku patogénov .....	20
5.6	Modifikované bakteriofágy na transport liečiv .....	22
5.6.1	Modifikované bakteriofágy na transport antibiotík.....	23
5.6.2	Modifikované bakteriofágy na transport liečiv proti nádorom .....	24
5.7	Modifikované bakteriofágy na prípravu vakcín .....	25
<b>6</b>	<b>Záver.....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>28</b>

## Zoznam použitých skratiek

BRED		z angl. bacteriophage recombeneering of electroporated DNA
Cas	CRISPR asociované	z angl. CRISPR-associated
CBD	doména viažuca bunkovú stenu	z angl. cell wall binding domain
CRISPR		z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR DNA	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	z angl. deoxyribonucleic acid
EAD	enzymaticky aktívna doména	z angl. enzymatically active domain
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti	z angl. Human Immunodeficiency Virus
HR	homologická rekombinácia	
Hoc	vysoko antigénny proteín vonkajšieho obalu	z angl. highly antigenic outer capsid protein
IgG	imunoglobulín G	
MIC	inimálna inhibičná koncentrácia	z angl. Minimum inhibitory concentration
MOI	multiplacita infekcie	z angl. Multiplicity of infection
MRSA	metecilín-rezistentný zlatý stafylokok	z angl. methicilin-resistant Staphylococcus aureus
MSSA	metecilín-senzitívny zlatý stafylokok	z angl. methicilin-sensitive Staphylococcus aureus
ncRNA	nekódujúca RNA	z angl. non-coding RNA
PA	antrax-ochranný antigén	z angl. anthrax protective antigen
PCA	polymerázové cyklické skladanie	z angl. Polymerase cycling assembly
PG	peptidoglykán	
RBP	receptor-viažuci proteín	z angl. receptor-binding protein
RGN	RNA-vedená nukleáza	z angl. RNA-guided nuclease
RNA	ribonukleová kyselina	z angl. ribonucleic acid
Soc	malý proteín vonkajšieho obalu	z angl. small outer capsid protein
tracrRNA	trans aktivačná CRISPR RNA	
YAC	umelý kvasinkový chromozóm	z angl. yeast artificial chromosome

# 1 Úvod

Krátko po ich objavení, bakteriofágy začali byť používané ako nástroj na účinnú liečbu bakteriálnych infekcií. Objavením antibiotík klesol záujem o ich používanie vo väčšine častí sveta. V posledných rokoch s rastúcim počtom multirezistentných bakteriálnych kmeňov a nízkym záujmom o vývoj nových antibiotík sa opäť vracia pozornosť na používanie bakteriofágov ako alternatívy k antibiotickej liečbe bakteriálnych infekcií. Použitie prirodzených bakteriofágov má ale určité limitácie, ktoré znižujú efektivitu alebo možnosť ich použitia. Molekulárne modifikácie bakteriofágov predstavujú možnosť prekonania týchto limitácií, ktorá nie len zlepšuje ich vlastnosti pri použití v bakteriofágovej terapii ale umožňuje ich využitie aj na ďalšie terapeutické účely vo veterinárnej alebo humánnej medicíne a ďalej otvára možnosti ich použitia aj v poľnohospodárskom alebo potravinárskom priemysle.

Táto práca sa venuje hlavne možnostiam terapeutického využitia modifikovaných bakteriofágov vo veterinárnej alebo humánnej medicíne a jej cieľom je popísať metódy, ktoré je možné použiť na prípravu a získavanie modifikovaných bakteriofágov. Ďalej táto práca popisuje prípravu a využitie upravených bakteriofágov nesúcich konkrétne modifikácie zlepšujúce ich vlastnosti v smere ich možného využitia ako je zvýšenie alebo zníženie ich špecificity, prenos konkrétnych génov do hostiteľa, prenos antibiotických alebo protinádorových liečiv, presnú a efektívnu diagnostiku a prenos antigénov pri vytváraní vakcín. Práca tiež popisuje efektivitu použitia modifikovaných bakteriofágov *in vitro* a *in vivo* v animálnych modeloch.



## 2 Bakteriofágy

Bakteriofágy tvoria veľkú skupinu vírusov, pre ktorú je charakteristické využívanie baktérií ako hostiteľa. Spoločným znakom všetkých bakteriofágov je výskyt proteínovej hlavičky, ktorá obsahuje nukleovú kyselinu. Ich genóm je tvorený jednovláknovou alebo dvojitou DNA alebo RNA v lineárnej alebo kruhovej forme. Jednotlivé druhy sa od seba líšia morfológicky veľkosťou a stavbou. Odlišná je aj veľkosť ich genómu, ktorá sa u rôznych druhov pohybuje v rozmedzí od jednotiek až po stovky génov na genóm. Oblasť ich výskytu je veľmi široká, vyskytujú sa všade tam, kde sa vyskytuje aj ich prirodzený hostiteľ – baktérie. Jedným z biotopov s najhustejším obsadením bakteriofágmi je morská voda.

### 2.1 Životné cykly bakteriofágov

Po vstupe do bakteriálnej bunky bakteriofágy uskutočňujú rôzne životné cykly. Môže to byť cyklus lyzogenný, pseudolyzogenný, lytický alebo chronická infekcia. V lyzogénnom cykle dochádza k integrácii genómu bakteriofága do genómu baktérie, čím dochádza k vytvoreniu tzv. profága. Profág je latentná forma genómu fága. Túto latentnú fázu môže vplyvom vonkajších faktorov kedykoľvek zmeniť zahájením lytického cyklu. Pseudolyzogenný cyklus predstavuje formu fágovej nukleovej kyseliny, ktorá nie je dlhodobo integrovaná do genómu hostiteľa ako v lyzogénnom cykle ale nepodlieha ani lytickému cyklu. V bakteriálnej bunke môže byť uložená vo forme profága alebo plazmidu. Po zlepšení podmienok fág aktivuje lytický cyklus. V lytickom cykle dochádza k okamžitej replikácii a génovej expresii fágovej nukleovej kyseliny vo veľkom množstve. Následne dochádza k tvorbe veľkého počtu viriónov, ktoré sa prostredníctvom lýzy hostiteľskej bunky dostávajú do prostredia, kde sú schopné infikovať ďalšie bakteriálne bunky (zhrnuté v Cenens et al., 2013). Pre terapeutické využitie bakteriofágov je najdôležitejší práve lytický cyklus. Pri chronickej infekcii dochádza k tvorbe nových viriónov bakteriofágov ale nedochádza k lýze hostiteľskej bunky (zhrnuté v Secor et al., 2020).

### 3 Využitie bakteriofágov

Rozsah možností využitia bakteriofágov je široký a zahŕňa niekoľko oblastí. Najväčšia pozornosť je v posledných rokoch venovaná využitiu bakteriofágov vo veterinárnej a humánnej medicíne. Najviac využívané fágy v medicíne sú v tzv. bakteriofágovej terapii, ktorá využíva fágy ako nástroj na boj s bakteriálnymi infekciami. Použitím bakteriofágov je možné obísť alebo riešiť niektoré problémy v klasickej medicíne ako je napríklad stále rastúci vznik bakteriálnych rezistencií alebo zdĺhavé a v určitých prípadoch neúčinné diagnostické postupy.

#### 3.1 Bakteriofágová terapia

Existencia bakteriofágov ako baktericídneho činiteľa s vírusovým pôvodom bola navrhnutá Frederikom Twortom v roku 1915 (Twort, 1915) ale jednoznačne potvrdil ich existenciu až d'Hérelle izolovaním baktericídneho činiteľa ničiaceho baktérie rodu *Shigella*, ktorý nazval bakteriofág. Tieto výsledky publikoval v roku 1917. Krátko po identifikácii bakteriofágov ako anti-bakteriálneho činiteľa boli skúmané možnosti ich využitia na liečbu ochorení spôsobovaných baktériami a po krátkej dobe začali byť bakteriofágové preparáty využívané ako účinné baktericídne činidlá v humánnej medicíne (zhrnuté v Sulakvelidze et al., 2001). Využívanie bakteriofágov na liečbu bakteriálnych ochorení bolo zastavené hlavne v západnej časti sveta objavením a vývojom antibiotík. V dnešnej dobe, kedy vzniká stále viac bakteriálnych kmeňov nesúcich rezistenciu voči jednému alebo viacerým antibiotikám sa pozornosť opäť vracia k používaniu bakteriofágov hlavne na boj proti rezistentným kmeňom (Kebriaei et al., 2020) ale aj baktériám nekódujúcim rezistenciu (Olszak et al., 2015).

Použitie fágov v bakteriofágovej terapii môže byť buď vo forme bakteriofágového lyzátu alebo využitím enzybiotík. Forma fágového lyzátu predstavuje bakteriálnu kultúru lyzovanú vznikajúcimi fágmi po infikovaní bakteriálnej kultúry daným fágom. Tento proces slúži na amplifikáciu fágov a výsledný lyzát obsahuje veľké množstvo aktívnych bakteriofágov a lyzované bakteriálne bunky. Fágovú terapiu je možné podávať ako monofágovú terapiu, ktorá pozostáva z aplikácie len jedného typu fágov alebo ako polyfágú terapiu, ktorá je založená na aplikácii viacerých typov fága súčasne vo forme fágového kokteilu. Použitie fágových kokteílů vykazuje lepšie výsledky terapie (Hall et al., 2012) a menší výskyt vytvorenia rezistencie voči fágom v infikovaných bakteriálnych bunkách (Wei et al., 2011) ako použitie monofágovej. Enzybiotika sú enzýmy kódované bakteriofágom s baktericídnu aktivitou. Sú to endolyzíny, ktoré rozkladajú peptidoglykánovú vrstvu v bakteriálnych bunkách tým, že

rozrušujú konkrétne chemické väzby (Blasco et al., 2020). Bakteriofágové lyzáty aj enzybiotiká je možné použiť v kombinácii s antibiotikami (Blasco et al., 2020).

## **4 Modifikované bakteriofágy**

Existuje veľa možností terapeutického, poľnohospodárskeho aj priemyselného využitia bakteriofágov. Ich využitie má ale určité nedostatky. Môže to byť napríklad nutnosť používania fágových kokteíl vo fágovej terapii, čo môže spôsobovať problémy vzhľadom na morfológické rozdiely vo veľkosti a stavbe jednotlivých použitých bakteriofágov. Problémom sú aj rozdielne životné cykly, kde najvýhodnejším v terapeutickom využití je lytický cyklus. Nízka aktivita alebo nedostupnosť bakteriofága proti konkrétnemu kmeňu baktérií, existencia bakteriálnej rezistencie a mechanizmov na boj proti bakteriofágom (Hyman & Abedon, 2010) je ďalším z možných problémov. Použitie molekulárnych modifikácií alebo syntéza fágového genómu *de novo* môžu vyriešiť tieto nedostatky.

### **4.1 Metódy génovej modifikácie na prípravu syntetických bakteriofágov**

#### **4.1.1 Homologická rekombinácia**

Homologická rekombinácia (HR) je dej, pri ktorom dochádza k výmene nukleotidovej sekvencie medzi dvoma molekulami nukleovej kyseliny, ktoré obsahujú homologickú oblasť. V bunkách prebieha prirodzene a zabezpečuje väčšiu génovú diverzitu. HR je jednou z najpoužívanejších metód génového inžinierstva súčasnosti. Umožňuje inzerciu, deléciu alebo nahradenie konkrétneho úseku nukleovej kyseliny, je teda možné ju využiť aj na vkladanie cudzích génov do genómu. Pri aplikácii tejto metódy, na molekulárne modifikácie genómu bakteriofágov sa využíva bakteriálna bunka ako hostiteľ. Pred začatím samotnej HR je nutné pripraviť plazmid obsahujúci konkrétnu sekvenciu nukleovej kyseliny a bakteriálnu kultúru obsahujúcu takto pripravený plazmid. Takto pripravená bakteriálna kultúra je následne infikovaná bakteriofágom. Po vstupe fágovej nukleovej kyseliny do bunky dochádza v mieste homológie k HR medzi genómom fága a synteticky pripraveným plazmidom a teda dochádza k tvorbe fágovej nukleovej kyseliny obsahujúcej danú nukleotidovú sekvenciu. Pripravený fág obsahujúci danú sekvenciu je získavaný lýzou bakteriálnych buniek a následnou purifikáciou (Martin J. Loessner et al., 1996). Na potvrdenie správneho vloženia transgéennej sekvencie je možné k vkladanej sekvencii pridať gén kódujúci luciferázu a následne detekovať hodnotu bioluminescencie vznikajúcej po infikovaní bakteriálnych buniek takto pripraveným fágom (Martin J. Loessner et al., 1996). Tiež je možné použiť sekvenovanie (Lemon et al., 2019) alebo metódu plaque hybridization (Tanji et al., 2004). Experimentálne výsledky ukazujú, že

k správnej homologickej rekombinácii dochádza v relatívne nízkej početnosti rovnej približne  $10^{-8}$  (Le et al., 2013). Početnosť správnej HR sa môže meniť použitím iných fágov a baktérií. Vzhľadom na relatívne nízku početnosť správnej HR a relatívne vysokú prácnosť, kde vkladanie viacerých sekvencií nevyskytujúcich sa na jednom homologickom úseku vyžaduje viacnásobné opakovanie tejto metódy, je táto metóda potenciálne vysoko časovo náročná.

#### 4.1.2 CRISPR-Cas systém

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) je skupina repetícií vyskytujúca sa v genóme baktérií a archea. Sú to nekódujúce sekvencie v genóme, ktoré sú transkribované vo forme nekódujúcej RNA (ncRNA) (Ishino et al., 1987). CRISPR sekvencie pozostávajú z opakovania krátkych palindromických repetícií o veľkosti 21 - 37 párov báz (bp), ktoré sú oddelené nerepetitívnymi sekvenciami rovnaj veľkosti nazývanými spacers. U rôznych druhov baktérií a archea môže byť veľkosť repetícií aj spacerov odlišná. Veľmi odlišná medzi rôznymi druhmi baktérií je aj sekvencia nukleotidov tvoriaca CRISPR. V okolí CRISPR sekvencií sa nachádza tiež niekoľko génov kódujúcich CRISPR asociované (Cas) proteíny. Cas proteíny obsahujú domény, ktoré sú charakterizované helikázovou, nukleázovou a polymerázovou aktivitou a tiež domény, ktoré sa vyskytujú u proteínov so schopnosťou viazať sa na DNA (Jansen et al., 2002). CRISPR v spolupráci s Cas proteínmi tvorí adaptívnu imunitu u baktérií a archea, ktorá chráni bunky pred cudzou invazívnou DNA, ako je napríklad fágova nukleová kyselina po napadnutí bunky fágom (Makarova et al., 2006; Marraffini & Sontheimer, 2008). Systém CRISPR-Cas je momentálne rozdelený do troch základných typov (I, II, III), pričom každý základný typ je ešte ďalej delený do subtypov (zhrnuté v Makarova et al., 2012). Kiro *et al.* popísali metódu, v ktorej využili typ I-E CRISPR-Cas systému na zvýšenie efektivity prípravy molekulárne modifikovaného genómu fága T7. Najprv použili metódu homologickej rekombinácie, ktorou docielili deléciu génu 1.7 z genómu fága. Týmto získali zmes fágov, ktorá obsahovala fágy, u ktorých došlo k rekombinácii, aj fágy pôvodného typu (wt) bez prebehnutia rekombinácie. Lyzáť takto vytvorenej zmesi fágov preniesli na hostiteľskú bakteriálnu kultúru, ktorá obsahovala plazmidy kódujúce komponenty potrebné na správne fungovanie CRISPR-Cas systému. Pôsobením CRISPR-Cas následne došlo k selektívnemu zničeniu wt fágov u ktorých nedošlo k delícii génu 1.7 a tým došlo k negatívnej selekcii rekombinantných fágov a zvýšeniu ich početnosti vo výslednom lyzáte (Kiro et al., 2014). Táto metóda rieši problém nízkej početnosti výsledných rekombinantných fágov pri použití samostatnej homologickej rekombinácie.

### **4.1.3 Bacteriophage recombineering of electroporated DNA (BRED)**

Bacteriophage recombineering of electroporated DNA (BRED) prvýkrát použili Marinelli *et al.* na molekulárnu modifikáciu mycobakteriofágov, ktorých hostiteľom sú mycobaktérie (Marinelli *et al.*, 2008), neskôr bola táto metóda použitá aj na modifikácie fága P1, ktorého hostiteľom je *Escherichia Coli* (Fehér *et al.*, 2012). Metóda BRED umožňuje presnú inzerciu, deléciu alebo nahradenie konkrétnej sekvencie, ako aj pridávanie génových značiek a vytváranie bodových mutácií v genóme bakteriofágov. Spôsob fungovania tejto metódy spočíva v elektroporácii fágovej DNA a dvojvláknovej DNA (dsDNA) obsahujúcej cielejú sekvenciu do hostiteľskej bunky, ktorá obsahuje plazmidy, ktorých produkty podporujú priebeh homologickej rekombinácie. Prebehnutie homologickej rekombinácie a tvorba modifikovaných viriónov je následne testovaná pomocou PCR. Metóda BRED umožňuje získanie modifikovaných bakteriofágov vo vysokých početnostiach rovných 10 – 15 % (Marinelli *et al.*, 2008).

### **4.1.4 In vivo recombineering**

Oppenheim *et al.* rozšírili metódu homologous recombination-mediated genetic engineering (recombineering), využitím DNA fragmentov vytvorených pomocou PCR a jednoreťazcových oligonukleotidov (ss-oligos), na molekulárnu modifikáciu genómu fágov. Ako predošlé, aj táto metóda využíva homologickú rekombináciu. Oppenheim *et al.* využili na modifikáciu bakteriofága  $\lambda$  kultúru *Escherichia. Coli* obsahujúcu defektný profág  $\lambda$ , ktorý obsahoval  $p_L$  operón kódujúci produkty potrebné na priebeh homologickej rekombinácie. Tento operón bol krytý represorom citlivým na teplo. Takúto kultúru infikovali fágom  $\lambda$ , ktorý chceli modifikovať. Následne deaktivovali represor a pomocou elektroporácie vložili do bunky PCR produkty alebo oligonukleotidy. Po prebehnutí rekombinácie získali z lyzátu bakteriálnych buniek modifikované fágy. Pomocou tejto metódy Oppenheim *et al.* vytvorili niekoľko typov mutantných bakteriofágov  $\lambda$  s početnosťou 1 – 3 % (Oppenheim *et al.*, 2004).

### **4.1.5 Prestavba genómi bakteriofágov in vitro**

Genóm bakteriofágov je možné modifikovať aj in vitro, ešte predtým, ako je vložený do hostiteľskej bakteriálnej bunky. Chan *et al.* použili túto metódu na vytvorenie bakteriofága T7.1 modifikáciou fága T7. Genóm fága rozdelili na 73 častí, pričom medzi žiadnymi dvoma časťami nedochádzalo k prekrytiu sekvencie kódujúcej konkrétny genetický element. Tieto časti následne združili do 6 skupín. Medzi každé susediace skupiny pridali miesta umožňujúce restričné štiepenie, ktoré zabezpečovali možnosť nahradenia jednotlivých skupín bez toho,

aby to ovplyvnilo ďalšie skupiny. Z týchto častí pomocou klonovania vytvorili *in vitro* genóm, ktorý následne vložili do hostiteľských baktérií. Z baktérií získali výsledné modifikované bakteriofágy. Výsledné T7.1 fágy sa mierne geneticky líšili od pôvodne navrhovaných, tým, že došlo k niekoľkým jednonukleotidovým deléciám a substitúciám jednotlivých aminokyselín. Fitness T7.1 fágov bola nižšia oproti fitness fágom T7 prirodzeného typu (Chan et al., 2005). Nevýhoda tejto metódy je nutnosť práce s dlhými úsekmi DNA *in vitro* a obťažná príprava baktérií nesúcich takto pripravený genóm.

#### **4.1.6 Skladanie genómu bakteriofágov použitím kvasiniek**

Na molekulárnu modifikáciu genómu bakteriofágov je možné použiť aj kvasinky. Pri použití tejto metódy je využívaná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Bakteriofágový genóm je spolu s lineárnymi molekulami umelého kvasinkového chromozómu (YAC) pomocou elektroporácie vkladajú do bunky kvasinky. Lineárne molekuly YAC musia obsahovať na oboch koncoch homologickú sekvenciu k sekvencii genómu fágov. Táto homológia zabezpečí priebeh homologickej rekombinácie medzi YAC a genómom fágov a tým vytvorenie YAC-fág. Do kvasiniek je následne vkladaná genetická kazeta, ktorá obsahuje ciele modifikácie. Po prebehnutí modifikácií pomocou homologickej rekombinácie dochádza k vytvoreniu modifikovaného YAC-fág, ktorý je získavaných lýzou kvasiniek. Takto získaný modifikovaný YAC-fág je vkladajú do hostiteľskej bakteriálnej bunky, z ktorej je následne získavaný modifikovaný fág (Timothy et al., 2012). Túto metódu využili Ando *et al.* na molekulárnu modifikáciu ôsmich rôznych bakteriofágov (T7, T3, K1E, K1F, K1-5, SP6, gh-1, K11) (Ando et al., 2015). Použitie kvasiniek na modifikáciu fágového genómu obchádza problémy, ktoré vznikajú pri používaní metód využívajúcich na modifikáciu len bakteriálne bunky, ako je napríklad toxicita vznikajúcich fágov pre bakteriálnu bunku. Táto metóda vyžaduje získavanie fágového genómu vo forme YAC-fág a následný prenos YAC-fág do hostiteľskej baktérie. Efektívnosť tejto metódy teda závisí na schopnosti baktérie prijať YAC-fág.

#### **4.1.7 Syntéza celého genómu bakteriofága použitím syntetických oligonukleotidov**

Ďalšou z možností prípravy konkrétnych bakteriofágov je skladanie celého fágového genómu *in vitro* použitím oligonukleotidov pripravených chemickou syntézou. Túto metódu už využili Stemmer *et al.* na vytvorenie plazmidu zo syntetických oligonukleotidov, ktorý bol v *Escherichia coli* schopný replikácie (Stemmer et al., 1995). Smith *et al.* adaptovali túto metódu na vytvorenie genómu fága  $\phi$ X174 o veľkosti 5386 bp (Smith et al., 2003), ktorý je tvorený kruhovou, jednoretazcovou molekulou DNA (Sinsheimer, 1959). Postup práce pri

využití tejto metódy zahŕňa niekoľko krokov. Smith *et al.* syntetické oligonukleotidy purifikovali, fosforilovali, ligovali a následne z nich skladali celý genóm *in vitro* použitím polymerázového cyklického skladania (PCA). Takto vytvorený genóm amplifikovali použitím PCR, enzymaticky rozštiepili a použitím ligázy vytvorili kruhové molekuly DNA. Tieto kruhové molekuly pomocou elektroporácie vložili do hostiteľskej bakteriálnej bunky *Escherichia coli*, z ktorých získali výsledné virióny. Sekvenovaním výsledných fágov zistili, že sa sekvenčne v niekoľkých miestach líšia od prirodzených fágov  $\phi$ X174. Synteticky pripravené fágy mali tiež nižšiu infekčnosť v porovnaní s prirodzenými fágmy. Tieto rozdiely sú pripisované mutáciám, ktoré vznikli v priebehu PCR reakcie (Smith et al., 2003). Limitom použitia tejto metódy je veľkosť výsledného genómu, keďže príprava fágov s väčším genómom zahŕňa obťažnú prácu s dlhými molekulami DNA.

## 5 Molekulárne modifikácie bakteriofágov

### 5.1 Zmena hostiteľa

V procese napadnutia hostiteľskej bakteriálnej bunky bakteriofágom je prvým krokom v interakcii medzi bakteriálnou bunkou a fágom adsorpcia fága na povrch bunky. Bakteriofágy voľne difundujú do priestoru obsahujúceho hostiteľské bunky. Po strete s hostiteľskou bunkou ďalej pokračujú v difúzii po povrchu bunky s cieľom nájsť receptor, na ktorý by sa naviazali a tým by začali proces infekcie. Pokiaľ sa nedostanú do oblasti bunky obsahujúcej daný receptor, uvoľnia sa z bunky späť voľne do priestoru (Rothenberg et al., 2011). Po rozpoznaní receptora sa mechanizmus priebehu samotnej infekcie u rôznych druhov fágov líši. Napríklad u T4 podobných bakteriofágov (*E. coli* fág) najprv dochádza k reverzibilnému naviazaniu dlhých koncových vlákien na konkrétny receptor. Následne dochádza k zmene konformácie bazálnej platničky a tým k ireverzibilnému naviazaniu krátkych koncových vlákien k lipopolysacharidom hostiteľskej bunky, čím vzniká signál na uvoľnenie DNA z hlavičky do hostiteľskej bunky (zhrnuté v Bartual et al., 2010). U TP901-1 podobných fágov (*Lactococcus lactis* fág) je bazálna platnička v správnej konformácii na priebeh adhézie a teda nedochádza ku konformačnej zmene (Veesler et al., 2012).

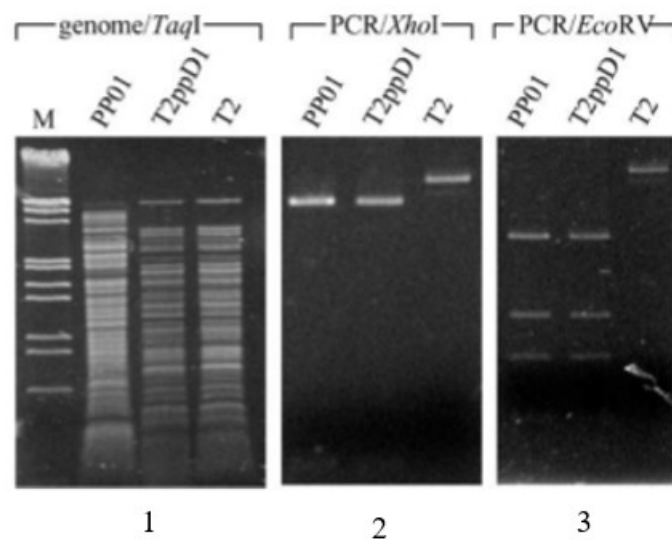
Konkrétny bakteriofág dokáže rozpoznať len veľmi úzke spektrum hostiteľských buniek, zvyčajne je limitovaný na jeden alebo niekoľko príbuzných kmeňov. Táto špecificita je určená receptor-viažucimi proteínmi (RBPs) na koncovom vlákne bakteriofága, typom receptorov na hostiteľskej bunke, ich množstve, hustote a rozmiestneniu na povrchu bunky. Gram-negatívne a Gram-pozitívne baktérie sa mimo proteínových receptorov líšia aj v hlavnom rozpoznávanom

komponente. U Gram-negatívnych baktérií sú to lipopolysacharidy, u Gram-pozitívnych baktérií to je peptidoglykan a teichoová kyselina (zhrnuté v Nobrega et al., 2018). Takto vysoká špecificita vyžaduje v bakteriofágovej terapii použitie tzv. fágových koktejlů, ktoré obsahujú niekoľko druhů fágů. To môže byť v niektorých prípadoch problematické kvôli rozdielnym morfológickým vlastnostiam daných použitých druhů bakteriofágů. Ďalším problémom môže byť ich nedostupnosť, prípadne to, že daný konkrétny bakteriofág ešte nebol objavený. Molekulárnou modifikáciou fágů je možné obísť tieto problémy rozšírením spektra možných hostiteľských kmeňů baktérií (Lin et al., 2012; Yosef et al., 2017) alebo úplnou zmenou hostiteľa (Mahichi et al., 2009; Yoichi et al., 2005).

Existuje niekoľko štúdií, ktoré dokazujú, že je možné molekulárnou modifikáciou fága zmeniť alebo rozšíriť rozsah rozpoznávaných hostiteľů. Yoichi *et al.* modifikovali genóm fága T2 tak, aby bol schopný napádať kmeň *Escherichia coli* O157:H7. Infekcia enterohemoragickým kmeňom *E. coli* O157:H7 môže u ľudí prebehnúť bez príznakov ale môže skončiť aj smrťou infikovaného človeka a môže spôsobovať krvavé hnačky a hemolyticko-uremický syndróm. Rezervoárom tohto kmeňa sú prevažne domáce zvieratá (Banatvala et al., 2001). U T2 fága je za špecifické rozpoznávanie receptora zodpovedný produkt génu 38 (gp38), ktorý je exprimovaný na konci dlhých koncových vlákien (Riede et al., 1987). Na modifikáciu genómu T2 fága boli použité sekvencie fága PP01 kódujúce produkt analogický k gp38. Fág PP01 prirodzene, s vysokou špecificitou napáda *E. coli* O157:H7. Receptorom rozpoznávaným na hostiteľskej bakteriálnej bunke je proteín OmpC nachádzajúci sa na vonkajšej membráne (Morita et al., 2002). Yoichi *et al.* nahradili pôvodný úsek kódujúci gp37 a gp38 sekvenciou z fága PP01 kódujúcou analogický produkt. Fragment s rozsahom od 100 bp-upstream génu 37 po 80 bp-downstream génu 38 amplifikovali pomocou PCR, pričom ako templát použili DNA fága PP01. Následne využili transformovaný kmeň *E. coli* K12 na priebeh homologickej rekombinácie (HR) T2 génov 37 a 38. Po prebehnutí HR vytvorili bunkový lyzát, ktorým infikovali *E. coli* O157:H7 a *E. coli* RK4784, ktorá produkuje OmpC rovnaké ako kmeň O157:H7. Výsledný bakteriofág nazvali T2ppD1. Analýzou polymorfizmu dĺžky restriekčných fragmentů (RFLP) dokázali, že DNA T2ppD1 je takmer identická k DNA T2 fága. PCR amplifikáciou a následným štiepením úseku génov 37 a 38 tiež dokázali, že tento úsek bol odvodený z fága PP01 (Obr. 1). Rozsah možných hostiteľů fágů T2, T2ppD1 a PP01 testovali použitím jedenástich kmeňů *E. coli* (Tab. 1). Rozsah hostiteľů fága T2ppD1 sa nelíšil od rozsahu fága PP01, výmena génov 37 a 38 teda umožnila napadnutie O157:H7 modifikovaným fágom T2, ktorý dokázal rozpoznať OmpC tvorené *E. coli* O157:H7. Optická denzita O157:H7



po infikovaní fágom T2ppD1 klesla výrazne menej ako po infikovaní fágom PP01, teda efektívnosť infekcie T2ppD1 je v porovnaní s PP01 relatívne nízka (Yoichi et al., 2005). Rozpoznanie proteínového receptora fágovým gp38 tvorí reverzibilné spojenie. Na ireverzibilné spojenie je ale potrebná ešte interakcia medzi fágovým gp12 a oligosacharidovým jadrom (OS jadro) lypopolisacharidov vonkajšej membrány Gram-negatívnych baktérií. T2ppD1 nesie gp12 pôvodného fága T2, ktorý rozpoznáva OS jadro *E. coli* K12, ktoré je čiastočne odlišné od OS jadra O157:H7 (Amor et al., 2000). Fágu T2ppD1 teda chýba správny gp12, ktorým by mohlo dôjsť k efektívnemu rozpoznaní a infekcii hostiteľskej baktérie *E. coli* O157:H7. Tomuto deficitu gp12 schopného rozpoznávať OS jadro O157:H7 je pripisovaná nízka infekčnosť a modifikácie génu 12 fága T2ppD1 by mohla zvýšiť efektívnosť infekcie (Yoichi et al., 2005).



**Obr. 1:** RFLP celého genómu fágov PP01, T2ppD1 a T2 štiepeného *TaqI*(1), PCR fragmenty génov 37 a 38 fágov PP01, T2ppD1 a T2 štiepené *XhoI* (2) a *EcoRV* (3), upravené podľa (Yoichi et al., 2005).

Kmeň	Tvorba plaky		
	T2ppD1	PP01	T2
<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC43888)	+	+	-
<i>E. coli</i> K12 (W3110)	-	-	+
<i>E. coli</i> O157:H7 (CR-3)	+	+	-
<i>E. coli</i> O157:H19 (A2)	+	+	-
<i>E. coli</i> O157:H37 (CE273)	-	-	-
<i>E. coli</i> K12 (Hfr H)	-	-	+
<i>E. coli</i> B <sup>E</sup>	-	-	+
<i>E. coli</i> C600	-	-	+
<i>E. coli</i> K12 RK4784	-	-	+
<i>E. coli</i> K12 RK4784 pOMPC1	+	+	+
<i>E. coli</i> K12 RK4784 pOMPC1 T2 <sup>r</sup>	+	+	-

**Tab. 1:** Rozsah rozpoznávaných hostiteľov fágov T2ppD1, PP01 a T2, upravené podľa (Yoichi et al., 2005). (+): tvorí plaky, (-): netvorí plaky.

## 5.2 Zvýšenie baktericídnej aktivity antibiotík

Využívanie bakteriofágov priamo ako antibakteriálny prvok nie je jediná možnosť ich využitia. Ďalšou z možností je zvýšenie efektivity antibiotík pri ich použití v kombinácii s modifikovanými fágmy. Lu *et al.* využili modifikované bakteriofágy na inhibovanie génových sietí u baktérie *Escherichia coli* K12 EMG 2, ktoré by viedli k aktivácii SOS DNA opravného systému a tým zvýšili účinnosť baktericídneho efektu antibiotika ofloxacín (T. K. Lu & Collins, 2009). Ofloxacín je antibiotikum patriace do skupiny fluorochinolónov. Efekt jeho fungovania je založený na tvorbe hydroxylových radikálov, ktoré spôsobujú poškodenia DNA, lipidov a proteínov, čo vedie následne až k smrti bunky (Kohanski et al., 2007). Prítomnosť hydroxylových radikálov v bakteriálnej bunke spôsobuje aktiváciu SOS DNA opravného systému. SOS DNA opravný systém je výsledok tzv. SOS génov, expresiou ktorých dochádza k tvorbe produktov ako sú DNA opravné enzýmy a inhibitory bunkového cyklu. Po expresii SOS génov dochádza k niekoľkým individuálnym aktivitám ktoré sú súhrne nazvané SOS DNA opravný systém. Aktivácia expresie SOS génov je závislá na regulačných proteínoch, ktoré sú produktom génov *recA* a *lexA*. Proteín *lexA* funguje ako represor tým, že sa viaže do

oblasti operátora každého SOS génu a zabraňuje tak prebehnutiu replikácie. Proteín *recA* funguje naopak ako aktivátor tým, že zabezpečuje uvoľnenie *lexA* z miesta operátora (zhrnuté v Walker, 1984). Lu *et al.* modifikovali fág M13mp18 tak, aby bol schopný nadmernej expresie génu *lexA3*. Fág M13mp18 je modifikáciou odvodený od fága M13 a nemá lytickú aktivitu. Gén *lexA3* vložili za syntetický promotor P<sub>LtetO</sub>, za ktorým bola ešte umiestnená syntetická sekvencia viažuca ribozómy. P<sub>LtetO</sub> je promotor pod kontrolou represora TetR, ktorý sa nenachádza v bunkách *E. coli* K12 EMG2, takže je tento promotor stále aktívny. Takto modifikovaný fág nazvali  $\phi_{lexA3}$ . Následne testovali zvýšenie baktericídneho efektu ofloxacínu tak, že na baktérie *E. coli* K12 EMG2 aplikovali len ofloxacín, ofloxacín a nemodifikovaný fág a ofloxacín a modifikovaný fág  $\phi_{lexA3}$ . Efektivita ofloxacínu bola pri použití s fágom  $\phi_{lexA3}$  o 2,7 rádu väčšia ako pri použití ofloxacínu s nemodifikovaným fágom a o 4,5 rádu väčšia v porovnaní s použitím len ofloxacínu. Ďalej tiež testovali, či je modifikovaný fág  $\phi_{lexA3}$  schopný zvýšiť efektivitu aj iných antibiotík ako sú chinolóny. Použili gentamicín patriaci do skupiny aminoglykozidov a ampicilín patriaci medzi beta-laktámové antibiotiká. Efektivita gentamicínu bola pri použití s nemodifikovaným fágom o 2,5 rádu väčšia a o 3 rády väčšia pri použití s fágom  $\phi_{lexA3}$ . Efektivita ampicilínu bola o 2 rády väčšia pri použití s nemodifikovaným fágom a o 5,5 rádov väčšia pri použití s modifikovaným fágom  $\phi_{lexA3}$  v porovnaní s použitím samostatných antibiotík. Modifikovaný fág  $\phi_{lexA3}$  zvyšuje efektivitu antibiotík aj u baktérií, ktoré si už vytvorili rezistenciu voči antibiotikám. Použitím modifikovaného fága  $\phi_{lexA3}$  v kombinácii s ofloxacínom proti baktériám *E. coli* RFS289, ktoré nesú rezistenciu voči antibiotikám patriacim medzi chinolóny, zvýšili efektivitu o 3,5 rádu v porovnaní s použitím samotného ofloxacínu, čo znamená že modifikovanými fágmi je možné znižovať rezistencie baktérií voči antibiotikám. Fág  $\phi_{lexA3}$  tiež zvýšil efektivitu antibiotík proti baktériám tvoriacim biofilmy. Na určenie možnosti klinického použitia fága  $\phi_{lexA3}$  v kombinácii s antibiotikom testovali zvýšenie efektivity *in vivo* na myšiach infikovaných *E. coli* EMG2. 50 % myší, ktorým bol podaný ofloxacín s nemodifikovaným fágom a 80 % myší, ktorým bol podaný ofloxacín s modifikovaným fágom  $\phi_{lexA3}$  prežilo. Po podaní samostatného ofloxacínu bez fágov prežilo len 20 % myší. Použitie modifikovaných alebo aj nemodifikovaných fágov zvyšuje efektivitu baktericídneho efektu antibiotík aj *in vivo*, čo zvyšuje možnosť využitia tejto metódy aj v klinickej praxi (T. K. Lu & Collins, 2009).

Ďalšiu možnú stratégiu na zvýšenie efektivity baktericídnej aktivity antibiotík využili Edgar *et al.*, ktorý použili modifikovaného fága  $\lambda$  na vloženie génov zvyšujúcich senzitivitu baktérií voči antibiotikám streptomycín, patriaci do skupiny aminoglykozidov a kyselina

nalidixová patriaca medzi chinolony (Edgar et al., 2012). Streptomycín sa viaže na 30S podjednotku bakteriálneho ribozómu a spôsobuje nesprávny preklad translatovanej RNA, čím inhibuje proteosyntézu bakteriálnej bunky. Rezistencia voči streptomycínu je spôsobená mutáciou v proteíne S12, ktorý je kódovaný génom *rpsL* a mutáciou v 16S podjednotke bakteriálneho ribozómu, kódovanej génom *rrs* (zhrnuté v Zhang & Yew, 2015). Edgar *et al.* najprv vytvorili streptomycín rezistentné baktérie *E.coli* K12 tým, že naočkovali bakteriálnu kultúru *E. coli* K12 na agar obsahujúci streptomycín v koncentrácii 50 µg/ml a následne získali mutantov nesúcich rezistenciu voči streptomycínu. Táto procedúra simuluje priebeh selekcie rezistentných mutantov v nemocniciach používaním streptomycínu ako baktericídneho činidla. Z 22 rezistentných mutantov 21 nieslo mutáciu v géne *rpsL*. Z týchto mutantov vybrali kmene Sm6 a Sm13. Zmerali ich minimálnu inhibičnú koncentráciu (MIC), ktorá predstavuje najnižšiu koncentráciu antimikrobiálnej látky pri ktorej už nedochádza k viditeľnému rastu kolónie. MIC pôvodnej kultúry *E. coli* K12 bola 1,56 µg/ml a MIC kultúr rezistentných mutantov bola 100 µg/ml a 200 µg/ml. Tieto kultúry transformovali plazmidom pRpsL-wt, obsahujúcim prirodzenú alelu génu *rpsL* (bez mutácie) a plazmidom pRpsLΔ4 nesúci nefunkčnú alelu génu *rpsL* ako kontrolu. MIC transformovaných bakteriálnych kultúr nesúcich plazmid pRpsL-wt výrazne klesla zo 100 µg/ml na 12,5 µg/ml a z 200 na 3,125 µg/ml (Edgar et al., 2012). Prirodzená (wt) alela génu *rpsL* je dominantná oproti rezistentnej, ktorá je recesívna (LEDERBERG, 1951), čo znamená, že vloženie wt alely génu *rpsL*, ktorá je senzitívna voči streptomycínu, zníži MIC danej kultúry aj napriek tomu, že obsahuje aj rezistentnú alelu. Tento systém zamýšľali ako boj s patogénmi zachytenými na nemocničných povrchoch a presun plazmidov medzi jednotlivými jedincami je najčastejšie sprostredkovaný konjugáciou, čo by v praktickom využití znamenalo nutnosť rozšírenia baktérií nesúcich tento plazmid do okolia. To nie je z bezpečnostného hľadiska prijateľné, preto využili modifikovaný fág λ ako nástroj na prenos chcených sekvencií. Konkrétne použili geneticky modifikovaný fág λgt11, ktorý podlieha lytickému alebo lyzogennému cyklu v závislosti na teplote a nesie mutáciu, ktorá umožňuje stabilné vkladanie cudzej DNA do veľkosti 5 kb. Z tohto modifikovaného fága ďalej pomocou homologickej rekombinácie vytvorili fágov, ktorý niesli wt *rpsL*, *rpsL*-sil alebo nefunkčný *rpsL* gén. Ku každej z variant bol pridaný gén kódujúci rezistenciu voči teluritu, takže výsledné fágy boli nazvané λ-RpsL-wt-tell, λ-RpsL-sil-tell a λ-RpsLΔ4-tell. Kmeň Sm13 lyzogenizovali s rekombinantnými fágmy a naočkovali na médium obsahujúce 1,5 µg/ml teluritu pri teplote 32°C, pri ktorej daný fág podlieha lyzogennému cyklu. Následne zmerali MIC, ktorá bola pri použití λ-RpsLΔ4-tell bez zmeny a to rovná 200 µg/ml ale pri použití λ-

RpsL-wt-tell klesla na 25 µg/ml a pri použití λ-RpsL-sil-tell klesla na 50 µg/ml. Pokles MIC bol v porovnaní s použitím plazmidov nižší kvôli nižšiemu počtu kópií senzitivného *rpsL* génu v baktérii. Preto vytvorili fág nesúci dve alely *rpsL* génu nazvaného λ-2xRpsL-tell. Použitie tohto fága znížilo MIC kmeňa Sm13 z 200 µg/ml na 1,56 µg/ml, čo je porovnateľné s MIC pôvodného senzitivného kmeňa *E. coli*. K12 (Edgar et al., 2012).

Na dôkaz toho, že je možné obnoviť rezistenciu voči antibiotikám aj u iných antibiotík ako u streptomycínu použili kyselinu nalidixovú, ktorá reprezentuje skupinu chinolónov. Prirodzená alela spôsobujúca senzitivitu voči chinolónom je tiež dominantná. Spôsob fungovania chinolónov je cielený na enzým gyráza, čím zastavujú priebeh transkripcie. Gyráza je kódovaná génom *gyrA* a rezistenciu voči chinolónom vytvárajú mutácie v konkrétnom úseku tohto génu (Robillard, 1990). Mutantov rezistentných voči chinolónom, z ktorých vybrali kmeň Nal2, získali rovnakým spôsobom ako mutantov s rezistenciou voči streptomycínu. Na vytvorenie rekombinantných fágov využili tiež rovnakú metódu ako v predošlom prípade. Takto pripravili fág λ-GyrA-tell nesúci prirodzenú alelu génu *gyrA*. Použitím tohto fága docielili zníženie MIC Nal2 kmeňa rezistentného voči vysokým dávkam kyseliny nalidixovej (MIC ≥ 256 µg/ml) o polovicu. Týmto dokázali, že modifikované bakteriofágy je možné použiť na obnovenie senzitivity voči antibiotikám minimálne u dvoch rôznych typov antibiotík (Edgar et al., 2012).

### 5.3 Bakteriofágy so sekvenčne špecifickou antimikrobiálnou aktivitou

Antibiotiká sú chemické látky s veľmi nízkou špecificitou, čo znamená že jeden typ antibiotík dokáže efektívne zničiť aj niekoľko druhov baktérií. Takýto široký rozsah účinku znamená, že použité antibiotikum nepôsobí len na cielený druh baktérie ale pôsobí tiež na ďalšie druhy baktérií nachádzajúcich sa v okolí. Pri terapeutickom použití antibiotík na liečenie bakteriálnych infekcií u živočíchov to môže byť veľmi problematické, pretože pri potláčaním infekčného druhu baktérií dochádza tiež k znižovaniu počtu baktérií prirodzených pre daného živočícha (tvoriacich tzv. prirodzenú mikroflóru), čo, pri zvýšenej miere, môže viesť k ďalším metabolickým alebo imunitným poruchám, hlavne pri používaní v mladom veku počas rastu a vývoja (zhrnuté v Blaser & Falkow, 2009). V tomto pohľade je vysoká špecificita bakteriofágov výhodou a je možné použiť geneticky modifikované fágy na ničenie baktérií na základe konkrétnych sekvencií (Citorik et al., 2014; Park et al., 2017). Citorik *et al.* vytvorili antimikrobiálny systém, ktorého rozsah je možné špecificky upraviť na ničenie baktérií nesúcich konkrétnu genetickú sekvenciu ako je sekvencia kódujúca virulenciu alebo rezistenciu voči antibiotikám. Tento prístup využíva CRISPR-Cas systém, ktorého špecificita je určovaná

krátkymi sekvenciami nazývanými spacersy ohraničených priamymi repetíciami kódovanými v CRISPR sekvencii (Citorik et al., 2014). Tieto sekvencie sú translatované vo forme CRISPR RNA (crRNA), ktoré pomocou trans aktivačných RNA (tracrRNA) umožňujú Cas endonukleázam štiepiť cieľné sekvencie DNA (Deltcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012). Cas endonukleázy sú označované ako RNA-vedené DNA nukleázy (RGN) a vytvárajú dvojvláknové prerušenia v cieľných DNA molekulách (Jinek et al., 2012). Modifikáciou spacer sekvencií v CRISPR úsekoch je možné určovať konkrétne cieľové sekvencie pre RGN. RGN je možné do cieľných baktérií vkladať pripojením na mobilizovateľný plazmid alebo uzavretím do fágovej častice. Citorik *et al.* vytvorili RGN vytvárajúce dvojvláknové zlomy v sekvenciách kódujúcich *bla<sub>SHV-18</sub>* a *bla<sub>NDM-1</sub>*, ktoré kódujú rezistenciu voči beta-laktámovým antibiotikám s rozšíreným spektrom a úplnú rezistenciu voči antibiotikám patriacim do skupiny beta-laktámov. Na transport RGN cieľných na *bla<sub>SHV-18</sub>* alebo na *bla<sub>NDM-1</sub>* do bakteriálnych kmeňov *E.coli* EMG2 nesúcich buď plazmid kódujúci *bla<sub>SHV-18</sub>* (pSHV-18) alebo plazmid kódujúci *bla<sub>NDM-1</sub>* (pNDM-1) použili častice bakterifága M13. Bakteriálne kmene nesúce dané plazmidy vytvorili vložení konkrétneho plazmidu získaného z klinického izolátu do baktérií *E. coli* EMG2. Použitím RGN uzavretých vo fágových časticiach ( $\phi$ RGN $shv-18$  a  $\phi$ RGN $ndm-1$ ) proti bakteriálnym kultúram EMG2 pSHV-18 a EMG2 pNDM-1 došlo k zníženiu počtu životaschopných bakteriálnych buniek o 2 až 3 rády. Tieto fágove častice nesúce RGN nespôsobili pokles v počte životaschopných baktérií v samotnom kmeni EMG2 ani v kmeni EMG2 nesúcom iný, nepodobný plazmid. Následne vytvorili fágové častice nesúce RGN cieľné na *bla<sub>SHV-18</sub>* a *bla<sub>NDM-1</sub>* súčasne ( $\phi$ RGN $ndm-1/shv-18$ ). Použitím takéhoto fága došlo tiež k poklesu počtu životaschopných EMG2 pSHV-18 a EMG2 pNDM-1 o 2 až 3 rády, pričom nedošlo k poklesu počtu prirodzených (wt) EMG2. Je teda možné tvoriť komplexné RGN cieľné na niekoľko sekvencií, ktoré budú mať stále vysokú špecifickosť a budú efektívne ničiť každý kmeň nesúci cieľnú sekvenciu.

Vytvorili tiež RGN cieľné na sekvenciu *gyrA* obsahujúcu jednonukleotidovú mutáciu, ktorá spôsobuje bakteriálnu rezistenciu voči chinolónovým antibiotikám. Takto vytvorená fágová  $\phi$ RGN $gyrA_{D87G}$  mala cytotoxickú aktivitu proti kmeňu *E. coli* nesúcemu génovú mutáciu *gyrA<sub>D87G</sub>*, proti kmeňu s génom *gyrA* bez mutácie neprejavovala žiadnu toxickú aktivitu. To dokazuje, že RGN dokážu špecificky rozpoznávať sekvencie líšiace sa v jednom nukleotide.

Na zníženie infekčnosti enterohemoragického kmeňa *E. coli* O157:H7 vytvorili fágovú RGN cieľnú na sekvenciu kódujúcu intimin ( $\phi$ RGN $neae$ ) (Citorik et al., 2014). Intimín je faktor

ovplyvňujúci virulenciu u *E. coli* O157:H7, tým že umožňuje kolonizáciu črevného epitelu. Je to adhezín, kódovaný chromozomálnym génom *eae*, zodpovedný za pripojenie baktérie k epitelu hostiteľa a prerušenie prepojení epiteliálnych buniek (tzv. tight junctions) (zhrnuté v Croxen & Finlay, 2010). Larvy *Galleria mellonella* infikovali enterohemoragickým *E. coli*. Na infikované larvy následne použili  $\phi$ RGNeae, čo zvýšilo počet lariev, ktoré prežili, v porovnaní s neliečenými larvami. Použitie  $\phi$ RGNeae bolo tiež viac účinné ako liečenie chloramfenikolom, voči ktorému je daný kmeň *E. coli* rezistentný. Použitie RGN je ďalšou z možných alternatív na liečbu bakteriálnych infekcií nesúcich vysokú rezistenciu voči antibiotikám. Najväčším limitom v tomto systéme je prenos RGN do cieľných baktérií (Citorik et al., 2014).

Park et al. vylepšili túto metódu vložením CRISPR/Cas9 systému do genómu bakteriofága a modifikáciou sekvencií kódujúcich koncové vlákna fága. Použili ju na liečbu meticilín-rezistentného kmeňa *Staphylococcus aureus* (MRSA). Klonovaním vytvorili vektor, ktorý obsahoval CRISPR sekvenciu nesúcu spacer cieľný na *nuc* gén prezentovaný v *S. aureus*. TracrRNA a Cas9 gény získali z CRISPR/Cas9 patriaceho *Streptococcus pyogenes*. Následne k týmto génom pridali aj CRISPR sekvenciu cieľnú na *nuc* gén a takto modifikovaný systém vložili do fága  $\phi$ SaBov pomocou výmeny aliel v modifikovanom kmeni *S. aureus* RF122. Výsledný fág nazvali  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc*.  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* použili proti kmeňu *S. aureus* CTH96 s rôznou multiplicitou infekcie (MOI). Po 6 hodinách pri MOI = 100 alebo vyššie došlo k úplnému zabitíu baktérií, pri MOI = 50 a MOI = 10 získali 0,08 % a 5,01 % životaschopných baktérií. Po 8 hodinách pri MOI = 50 už nenašli žiadne životaschopné baktérie. Modifikovaný kmeň STH96 nesúci deléciu génu *nuc* (CTH96 $\Delta$ *nuc*) infikovali fágom  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* s MOI = 50. Po 2 hodinách došlo k miernemu poklesu počtu životaschopných baktérií kmeňa CTH96 $\Delta$ *nuc* ale po dlhšom čase sa ich počet výrazne zvýšil. Prvotný pokles bol zapríčinený lytickým cyklom fága  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc*. Naopak pri infikovaní kmeňa CTH96pGFPuv, nesúceho plazmid produkujúci fluorescenčný proteín, fágom  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* došlo po 8 hodinách pri MOI = 50 k úplnému zničeniu životaschopných baktérií. Infikovaním kombinácie kolónií CTH96 $\Delta$ *nuc* a CTH96pGFPuv došlo k selekčnému zničeniu baktérií produkujúcich fluorescenčný proteín. To dokazuje špecifickú aktivitu *in vitro* voči kmeňom nesúcim *nuc* gén (Park et al., 2017).

Na dokázanie efektivity tejto metódy *in vivo* naočkovali intradermálne chrbtovú stranu myši kmeňom CTH96pGFP, produkujúcim fluorescenčný proteín. Po 6 hodinách priebehu infekcie boli injekčne vložené fágy  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* a  $\phi$ SaBov-Cas9-null (kontrolný fág

neobsahujúci spacer špecificky cielený na *nuc* sekvenciu) s MOI = 500. Po 24 hodinách bol počet životaschopných baktérií získaných z homogenizovaného tkaniva pokožky infikovaných myši výrazne nižší pri použití  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* ako pri použití  $\phi$ SaBov-Cas9-*null*. Následne boli myši infikované zmesou obsahujúcou kmene CTH96pGFP a CTH96 $\Delta$ *nuc* v pomere 1:1. Po 6 hodinách od začiatku infekcie boli opäť použité fágy  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* a  $\phi$ SaBov-Cas9-*null*, ktoré nechali pôsobiť 24 hodín. Pri použití fága  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* bolo životaschopných baktérií produkujúcich GFP  $2,8 \pm 2,6$  %. Použitím kontrolného fága ich bolo  $47,1 \pm 4,9$  %. Týmto dokázali, že špecifická aktivita fága  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* proti kmeňom nesúcim gén *nuc* má vysokú efektivitu aj *in vivo* (Park et al., 2017).

Fág  $\phi$ SaBov má úzky rozsah rozpoznávaných kmeňov hostiteľských *S. aureus*, s vysokou špecifitou k CC151 *S. aureus*. Použitie modifikovaného fága  $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc* proti kmeňom *S. aureus* spôsobujúcim infekcie u ľudí ako sú ST1, ST5, ST8 a ST36 má minimálnu alebo žiadnu efektivitu. Park *et al.* preto nahradili sekvencie kódujúce proteíny na koncových vláknach (Tif) fága  $\phi$ SaBov sekvenciami kódujúcimi analogický produkt u fága  $\phi$ 11, ktorý má viac rozsiahle spektrum rozpoznávaných hostiteľov, ktoré zahŕňa aj niektoré kmene *S. aureus* spôsobujúce infekcie u ľudí. Modifikované fágy  $\phi$ SaBov-pTF11, nesúce Tif fága  $\phi$ 11 mali vyššiu efektivitu pri napádaní kmeňov ST1, ST5, ST8 a ST36 ako pôvodný fág  $\phi$ SaBov.  $\phi$ SaBov fág nesúci CRISPR/Cas9 systém cielený na *nuc* gén a Tif fága  $\phi$ 11 ( $\phi$ SaBov-Cas9-*nuc*-pTF11) analogicky zvýšil efektivitu ničenia kmeňov ST1, ST5, ST8 a ST36 baktérií *S. aureus* o 1,51 až 3,15 rádu (Park et al., 2017).

#### 5.4 Antimikrobiálne látky odvodené od bakteriofágov

Ďalšou z možností ničenia baktérií bez využitia antibiotík, alebo ničenia kmeňov nesúcich rezistenciu voči antibiotikám je využitie produktov prirodzene kódovaných niektorými druhmi bakteriofágov – endolyzínov. Endolyzíny sú proteínové štruktúry s enzymatickou aktivitou, určené na štiepenie konkrétnych väzieb v peptidoglykánovej (PG) vrstve baktérií. Pri bakteriofágovej infekcii baktérie slúžia na rozloženie PG vrstvy po prebehnutí replikačného cyklu fága, čím umožňujú únik vytvorených fágov z bunky do okolia. Štruktúrne sa líšia endolyzíny kódované fágmi Gram-pozitívnych a Gram-negatívnych baktérií. U fágov Gram-pozitívnych hostiteľov majú endolyzíny doménu viažucu sa na bunkovú stenu (CBD), ktorá rozpoznáva substrát a zabezpečuje naviazanie endolyzínu na daný substrát a enzymaticky aktívnu doménu (EAD) katalyzujúcu štiepenie konkrétnych väzieb v PG vrstve. Endolyzíny kódované fágmi Gram-negatívnych baktérií sú väčšinou menšie globulárne molekuly nesúce len jednu enzymaticky aktívnu doménu (zvyčajne nenesú CBD)



(zhrnuté v Schmelcher et al., 2012). Endolyzíny majú zvyčajne úzky rozsah rozpoznávaných baktérií, zhodný s fágom v ktorom sú kódované. Táto vysoká špecificita je spôsobená CBD nachádzajúcou sa na C-terminálnej doméne endolyzínov (Martin J. Loessner et al., 2002).

Endolyzíny je možné molekulárne modifikovať a vytvárať tak nové endolyzíny s vyššou enzymatickou aktivitou a schopnosťou viazať sa na PG vrstvu alebo s rozšíreným spektrom baktérií, na ktoré sa môžu viazať (Díez-Martínez et al., 2014; Dong et al., 2015). Dong *et al.* vytvorili chemickou syntézou chimerický lyzín Ply187N-V12C spojením lyzínu Ply187N s CBD lyzínu PlyV12, ktorý bol následne vo forme plazmidu vložený do buniek *E. coli*, v ktorých bol exprimovaný. Ply187N špecificky rozpoznáva *Staphylococcus aureus*, PlyV12 dokáže rozpoznať širšie spektrum baktérií ako sú streptokokálne, stafilokokálne aj enterokokálne kmene. Testovaním lytickej aktivity Ply187N, PlyV12 a Ply187N-V12C zistili, že chimerický lyzín Ply187N-V12C si zachoval lytickú aktivitu pôvodného Ply187N voči všetkým kmeňom *S. aureus* s rovnakou minimálnou inhibičnou koncentráciou (MIC) rovnou 2,0  $\mu\text{M}$  voči kmeňu *S. aureus* N315. PlyV12 má, na rozdiel od Ply187N, aktivitu voči širšiemu spektru zahrňujúcemu kmene *S. aureus* aj *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* s výnimkou *S. albus* 8799. Chimerický lyzín Ply187N-V12C mal lytickú aktivitu voči *S. albus* 8799 aj voči *E. faecium* a *E. faecalis*, aj keď bola nižšia v porovnaní s lyzínom PlyV12 (Tab. 2). Optimum pH Ply187N-V12C bolo okolo pH = 9, čo bolo vyššie ako optimum Ply187N (pH = 6 až 7) ale porovnateľné s PlyV12. Lyzín Ply187N-V12 bol tiež najviac stabilný voči zmenám iónovej sily (Dong et al., 2015). Dong *et al.* týmto dokázali možnosť vytvorenia modifikovaných endolyzínov odvodených od tých prirodzene kódovaných fágmi, ktoré majú širšie spektrum rozpoznávaných bakteriálnych kmeňov a zároveň si zachovávajú baktericídnu aktivitu.

Bakteriálny kmeň	Citlivosť voči				
	Ply187N	PlyV12	Ply187N-V12C		
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> N315 (MRSA)	+	++	++	
	<i>S. aureus</i> AM001 (MRSA)	+	++	++	
	<i>S. aureus</i> AM002 (MRSA)	++	+++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM005 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM006 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM008 (MRSA)	++	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM010 (MRSA)	+	+++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM014 (MRSA)	+	++	++	
	<i>S. aureus</i> AM016 (MRSA)	+	++	++	
	<i>S. aureus</i> AM027 (MRSA)	+	+++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM031 (MRSA)	++	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM032 (MRSA)	++	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM037 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM038 (MRSA)	+	+	+++	
	<i>S. aureus</i> AM043 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM045 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM046 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM048 (MRSA)	+	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM054 (MRSA)	+	++	++	
	<i>S. aureus</i> AM058 (MSSA)	++	++	+++	
	<i>S. aureus</i> AM061 (MSSA)	+	++	++	
	<i>S. aureus</i> AB9118 (MSSA)	++	++	+++	
	<i>S. aureus</i> M1	+	+++	+++	
	<i>S. aureus</i> 391	+	+++	+++	
	<i>S. aureus</i> 2080	+	+++	+++	
	<i>S. albus</i> 8799	+	-	++	
	<i>S. epidermidis</i> XJ9	+	++	+++	
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. dysgalactiae</i> 35666	-	+++	+++
		<i>S. agalactiae</i> WJ	-	+++	++
		<i>S. suis</i> W1	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> 12344		-	+++	+++	
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> 35667	-	+/- <sup>a</sup>	<sub>a</sub>	
	<i>E. faecalis</i> MMA1	-	+	<sub>a</sub>	
Iné	<i>L. monocytogenes</i> 19115	-	-	-	
	<i>B. cereus</i> 33018R	-	-	-	
	<i>E. coli</i> TG1	-	-	-	

**Tab. 2:** Rozpoznávané bakteriálne kmene endolyzínmi Ply187N, PlyV12 a Ply187N-V12C upravené podľa (Dong et al., 2015). (+): kmeň je rozpoznávaný endolyzínom, (-): kmeň nie je rozpoznávaný endolyzínom. a: lytická aktivita nebola pozorovaná na doštičkách ale na mikrodoštičkách bola pozorovaná.

Díez-Martínez *et al.* použili podobnú stratégiu na vytvorenie endolyzínov s vylepšenými vlastnosťami. Vytvorili chimerický endolyzín Cpl-711 spojením domén Cpl-1 a Cpl-7S. Obe pôvodné endolyzíny sú kódované bakteriofágmi napádajúcimi pneumokokálne baktérie. Cpl-

711 vytvorili vložení sekvencie kódujúcej daný endolyzín vo forme plazmidu do baktérie *E. coli*, v ktorej došlo k propagácii daného endolyzínu (Díez-Martínez et al., 2014). Cpl-7S je syntetická varianta Cpl-7 s vyššou bakteriocídnou aktivitou proti pneumokokom, ale aj proti *Streptococcus pyogenes* a *Enterococcus faecalis* (Díez-Martínez et al., 2013). Výsledný chimerický endolyzín Cpl-711 mal výrazne vyššiu lytickú aktivitu voči pneumokokálnym baktériám v porovnaní s pôvodnými endolyzínmi Cpl-1 a Cpl-7S. Cpl-711 tiež znížil počet životaschopných baktérií tvoriacich pneumokoálne biofilmy o 4 rády oproti pôvodným Cpl-1 a Cpl-7S, ktoré znížili počet životaschopných baktérií o 1,5 rádu. Pri testovaní *in vivo* použitia endolyzínov na liečbu intraperitoneálne infikovaných myší *Streptococcus pneumoniae*, použitie chimerického endolyzínu Cpl-711 docielilo o 50 % vyšší počet myší, ktoré prežili oproti použitiu pôvodného lyzínu Cpl-1 (Díez-Martínez et al., 2014). Díez-Martínez *et al.* takto dokázali možnosť molekulárnej modifikácie a vytvorenia chimerických endolyzínov s vyššou bakteriocídnou aktivitou v porovnaní s pôvodnými lyzínmi.

## 5.5 Modifikované bakteriofágy na diagnostiku patogénov

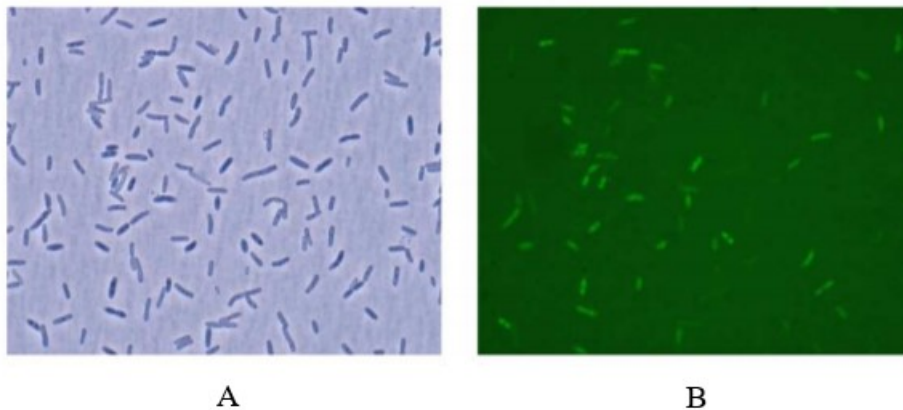
Existuje niekoľko metód používaných na diagnostiku patogenických baktérií ale každá z nich má nejaké limitácie alebo nedostatky, ktoré znižujú efektivitu alebo presnosť použitej metódy. Tradičné, dlhodobo používané metódy založené na kultivácii a vysádzaní na petriho misky sú prácne, časovo náročné a často neefektívne pri diagnostike vzoriek obsahujúcich malé koncentrácie hľadaných patogenických baktérií. Metódy používané protilátky vyžadujú selektívnu amplifikáciu hľadaného patogénu vo vzorke obsahujúcej zmes rôznych baktérií, čo je časovo náročné. Bez tohto kroku sú tieto metódy neúčinné v systéme obsahujúcom heterogenickú zmes rôznych baktérií (Timothy K. Lu et al., 2013). Metódy založené na hybridizácií alebo využívajúce PCR majú vysokú presnosť ale nedokážu rozpoznať živé a mŕtve bunky, tiež vyžadujú selektívnu amplifikáciu daného patogénu a presný návrh primerov aby nedochádzalo k identifikácii nesprávnych baktérií (zhrnuté v Lazcka et al., 2007). Molekulárnou modifikáciou je možné vytvoriť bakteriofágy schopné diagnostického rozpoznania konkrétnych baktérií (Martin J. Loessner et al., 1996; Sarkis et al., 1995) Použitie takto modifikovaných bakteriofágov je možné riešenie problémov vyskytujúcich sa pri bežne používaných diagnostických metódach.

Loessner *et al.* použili modifikovaný bakteriofág na vytvorenie diagnostického systému, založeného na detekcii bioluminescencie produkovanej v cielej bakteriálnej bunke enzýmom luciferáza (Martin J. Loessner et al., 1996). Tento systém bol zameraný na určenie prítomnosti živých Gram-pozitívnych baktérií *Listeria monocytogenes*, ktoré sú alimentárnym patogénom

a príčinou vzniku listeriózy u ľudí (zhrnuté v Farber & Peterkin, 1991). Ako základný fág, ktorý následne modifikovali, použili fág A511, ktorý je rodovo špecifický a rozpoznáva serotyp 1/2 jeho prirodzeného hostiteľa *L. monocytogenes* (M. J. Loessner & Busse, 1990). Pomocou homologickej rekombinácie medzi DNA fága A511 a plazmidom nesúcim DNA fága A511 s pripojenou sekvenciou kódujúcou fúzovaný proteín luxAB vytvorili modifikovaný fág A511::*luxAB*. Gén *luxAB* vložili do modifikovaného fága downstream od génu *cps*, kódujúceho hlavný kapsidový proteín bez porušenia génov prirodzene kódovaných fágom A511. Gén *cps* nesie silný promotor, čo určuje silnú transkripciu danej sekvencie. Priebeh translácie je zabezpečený vložením synteticky pripraveného miesta viažuceho ribozómy. Modifikovaný fág A511::*luxAB* má stále zachovanú lytickú aktivitu, preto je detekcia bioluminescencie, vznikajúcej pôsobením luciferázy, viazaná na konkrétny časový interval a je nutné ju uskutočniť do 3 hodín od počiatku infekcie fágom A511::*luxAB*. Použitím tohto diagnostického systému bez predošlej amplifikácie hľadaných baktérií je možné jednoznačne detekovať vzorky obsahujúce 500 až 1000 buniek na ml. U vzoriek obsahujúcich 100 buniek na ml je možné detekovať bioluminescenciu, ale jej hodnota je nízka a nie je možné ju jednoznačne odlíšiť od pozadia. Po prebehnutí krátkej amplifikácie hľadaných baktérií pred použitím modifikovaného fága je možné detekovať vzorky, ktorých hodnota životaschopných buniek (CFU) na g je menšia ako 1. Pri použití modifikovaného fága proti iným druhom baktérií rodu *Listeria* Loessner *et al.* zistili, že fág A511::*luxAB* infikoval aj iné druhy ako sú *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* a *L. welshimeri*, ktoré po infekcii tiež produkovali bioluminescenciu. To bolo zapríčinené širokým rozsahom rozpoznávaných hostiteľských buniek fágom A511::*luxAB* a ďalšia molekulárna modifikácia na vytvorenie vyššej špecificity daného fága by mohla zlepšiť presnosť tohto systému. Okrem samotnej diagnostiky je možné túto metódu použiť aj na určovanie rezistencie baktérií voči antibiotikám alebo iným chemickým substanciam, pričom sa pozoruje nárast alebo pokles bioluminescencie vznikajúcej v bakteriálnych bunkách infikovaných modifikovanými fágmy po pridaní antibiotika alebo inej látky do prostredia (Martin J. Loessner *et al.*, 1996). Takto bol napríklad použitý luciferázový systém na detekciu citlivosti voči antibiotikám u *Mycobacterium tuberculosis* (Jacobs *et al.*, 1993). Ďalšou z možností využitia tohto systému je kvantitatívne určenie daných baktérií (Martin J. Loessner *et al.*, 1996).

Tanji *et al.* využili modifikované bakteriofágy schopné fluorescencie na detekciu *Escherichia coli*. Použili dve variácie bakteriofága T4, konkrétne prirodzený typ fága T4 (T4wt) a modifikovaný fág T4e<sup>-</sup>, nesúci mutáciu v géne *e*. Produkty génu *e* a génu *t* sú zodpovedné za

lýzu hostiteľskej bunky (Mukai et al., 1967). Mutantný fág T4e<sup>-</sup> teda nie je schopný lyzovať infikovanú bakteriálnu bunku. Modifikované fágy nesúce gén *gfp*, ktorého expresiou vzniká fluorescenčný proteín vytvorili homologickou rekombináciou medzi fágovou DNA a vytvoreným plazmidom nesúcim *gfp* gén a fágovú DNA, ktorý bol predtým vložený do baktérie *E. coli* CR63 elektroporáciou. Po infikovaní *E. coli* K12 modifikovaným fágom T4wt/GFP došlo k zníženiu hustoty bakteriálnej kultúry spôsobenému lýzou infikovaných buniek, čo znižuje možnosť detekcie baktérií. Infikovaním bakteriálnej kultúry *E. coli* K12 fágom T4e<sup>-</sup> došlo k vzniku slabšej fluorescence. Po prebehnutí určitého časového intervalu došlo k zvýšeniu intenzity vznikajúcej fluorescence kvôli replikácii fága v bunkách baktérií. Infikovaním zmesi bakteriálnych kultúr *E. coli* K12 a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fágom T4e<sup>-</sup>/GFP došlo k selektívnemu fluorescenčnému označeniu baktérií patriacich k *E. coli* (Obr. 2) (Tanji et al., 2004), čo dokazuje špecificitu modifikovaného fága a možnosť jeho využitia na detekciu konkrétnych bakteriálnych druhov v zmesi rôznych baktérií.



**Obr. 2:** Zmes baktérií *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa* pozorované svetelným mikroskopom (A) a fluorescenčným mikroskopom (B), upravené podľa (Tanji et al., 2004).

## 5.6 Modifikované bakteriofágy na transport liečiv

Použitím metód génového inžinierstva je možné vytvárať modifikované bakteriofágy využívané na vkladanie určitých sekvencií do hostiteľských buniek, expresiou ktorých dochádza k tvorbe rôznych produktov, ako sú napríklad produkty zvyšujúce efekt použitia antibiotík, produkty slúžiace na detekciu daného bakteriálneho druhu alebo na selektívne ničenie baktérií. Modifikované fágy je ale možné vytvoriť aj s cieľom vkladať do hostiteľských buniek konkrétne chemické substancie ako sú liečivá. Takéto fágy sú vytvárané pridávaním fragmentov DNA, kódujúcich proteínové ligandy do oblastí kódujúcich obalové proteíny, čím

vznikajú fágys nesúce špecifické ligandy na obalových proteínoch obalu (zhrnuté v Benhar, 2001).

### 5.6.1 Modifikované bakteriofágy na transport antibiotík

Yacoby *et al.* vytvorili systém na cieleý prenos antibiotika chloramfenikol použitím bakteriofága M13. Fág M13 je filamentárny bakteriofág, čo znamená, že kóduje veľké množstvo obalových proteínov a teda vo výsledku môže na povrchu niesť veľké množstvo vybraných ligandov. To je dôvod prečo Yacoby *et al.* použili tento fág (Yacoby *et al.*, 2006). Ako cieleú bakteriálnu kultúru použili *Staphylococcus aureus* SH1000, ktorý u ľudí spôsobuje niekoľko typov infekcií (zhrnuté v Farr, 2004). Chloramfenikol je širokospektrálne antibiotikum, ktoré už v terapeutickej praxi prestáva byť používané kvôli vysokej toxicite voči krvným bunkám (Turton *et al.*, 2002). Chloramfenikol je ako linker pripojený na obalový proteín pomocou nestabilnej esterovej väzby. Takto vytvorený komplex fág-chloramfenikol predstavuje neaktívnu formu liečiva, ktorá je aktivovaná až rozpoznaním hostiteľskej bakteriálnej bunky fágom a uvoľnením antibiotika z povrchu fága do okolia. Využitie modifikovaného bakteriofága na transport neaktívneho antibiotika predstavuje prenos liečiva do cielej oblasti nespôsobujúci toxicitu. Na rozpoznanie cielej bakteriálnej kultúry využili dva rozdielne prístupy. Jeden z nich bol vytvorenie fága A12C, ktorý na obalovom proteíne niesol špecifické peptidy rozpoznávajúce hostiteľskú bunku. Druhým prístupom bolo vytvorenie fága fUSE5-ZZ rozpoznávajúceho hostiteľa pomocou imunoglobulínu IgG. Použitím oboch typov modifikovaných fágov konjugovaných s chloramfenikolom proti bakteriálnej kultúre *S. aureus* došlo k spomaleniu rastu danej kultúry. Použitím fága A12C došlo k rovnakému spomaleniu rastu kultúry, ktoré by bolo docielené pridaním samotného chloramfenikolu s 20-krát vyššou koncentráciou, použitie fága fUSE5-ZZ docielilo spomalenie rastu kultúry ekvivalentné tomu, ku ktorému by došlo pri použití samotného chloramfenikolu s 10-krát vyššou koncentráciou. Použitie modifikovaných bakteriofágov na cieleý transport antibiotika je pri liečbe bakteriálnych infekcií výrazne efektívnejšie ako používanie samotného antibiotika (Yacoby *et al.*, 2006).

Najväčšou limitáciou tohto systému bol hydrofóbny charakter chloramfenikolu, ktorý zabraňoval naviazaniu veľkého množstva jeho molekúl na povrch modifikovaného fága, ktoré by spôsobilo problémy s rozpustnosťou komplexu fág-chloramfenikol. Z teoreticky možných 20 000 molekúl na fág došlo k naviazaniu iba menej ako 3 000 molekúl (Yacoby *et al.*, 2006). Toto obmedzenie obišli v ďalšej štúdií, v ktorej využili antibiotikum neomycín ako aminoglykozidový linker, pripojený stabilnou pevnou väzbou na povrch fága, na pripojenie

chloramfenikolu k fágovej častici. Táto modifikácia systému linkru zvýšila počet naviazaných molekúl na približne 10 000 molekúl na fág. Ďalej tiež zvýšili efektívnosť rozpoznávania cielených baktérií pridaním protilátok, ktoré slúžia na rozpoznávanie daných baktérií, získaných z ľudského séra rozpoznávajúcich stafylokoky a streptokoky a protilátku získanú zo séra kráľika rozpoznávajúcu *E. coli* O78. Použitím takto vytvorených fágových nanočastíc nesúcich antibiotikum chloramfenikol proti meticilín-rezistentnému kmeňu *Staphylococcus aureus* COL, klinickému izolátu *Streptococcus pyogenes* a patogénnemu kmeňu *Escherichia coli* O78 došlo k inhibícii rastu u všetkých troch bakteriálnych kmeňov. Testované baktérie boli senzitivne aj voči antibiotiku neomycín, použitému ako linker. Neomycín bol ale pevne viazaný na povrch fágovej častice a tým, že nedošlo k jeho uvoľneniu z častice zostal neomycín v neaktívnej forme a nepôsobil tak baktericídne (Yacoby et al., 2007).

Vaks *et al.* testovali toxicitu takto pripravených fágových nanočastíc nesúcich antibiotiká použitých *in vivo*. Použili pri tom fágové nanočastice nesúce chlorofemikol pripojený pomocou neomycínu použitého ako linker. Intravenózne a intraperitoneálne infikovali myši nízkou ( $10^9$  fágov na dávku), strednou ( $10^{10}$  fágov na dávku) a vysokou ( $10^{11}$  fágov na dávku) dávkou modifikovaných fágových nanočastíc aj prirodzených fágov. Po prebehnutí 8 dní pri nízkej a strednej dávke nedošlo k zmene hmotnosti ani správania myší, pri použití vysokej dávky došlo k poklesu hmotnosti o 2 až 6 % pri použití prirodzených aj modifikovaných fágov. Použitie systému antibiotika naviazaného na bakteriofágové nanočastice teda zbavuje chloramfenikol jeho charakteristickej toxicity aj *in vivo* (Vaks & Benhar, 2011).

### **5.6.2 Modifikované bakteriofágy na transport liečiv proti nádorom**

Použitím analogického postupu ako pri tvorbe bakteriofágov modifikovaných na cielený transport antibiotík je možné vytvoriť modifikované bakteriofágy špecificky rozpoznávajúce nádorové bunky a využiť ich na transport liečiv cielených na potlačanie rakovinových buniek. Molekulárne modifikovaný fág fUSE5-ZZ, ktorý nesie ZZ doménu zabezpečujúcu možnosť pripojenia protilátok špecificky rozpoznávajúcich konkrétne proteíny, je možné ďalej upraviť pridaním konkrétnych protilátok a pripojením cytotoxických látok a vytvoriť tak nástroj na špecifické rozpoznávanie a zabíjanie rakovinových buniek založený na fágových časticiach (Bar et al., 2008). Bar *et al.* takto vytvorili fágové častice nesúce tri protilátky, dva z nich rozpoznávajúce proteín ErbB2 a jedna rozpoznávajúca proteín EGFR. Modifikované fágy niesli tiež cytotoxické látky a to buď hygromycín kovalentne viazaný na obalový proteín fága alebo doxorubicín pripojený pomocou odštiepiteľného peptidu Cathepsin-B. Použitie fága fUSE5-ZZ nesúceho cytotoxikum hygromycín a protilátku viažucu sa na ErbB2 proti bunkám

SKBR3, ktoré exprimovali proteín ErbB2 spôsobilo zníženie rastu baktérií o 50 % a zvýšenie sily pôsobenia hygromycínu viac ako 1000-násobne v porovnaní s použitím samotného hygromycínu. Pri použití fága fUSE5-ZZ nesúceho doxorubicín, viazaný cez Cathepsin-B, a protilátky rozpoznávajúce ErbB2 alebo EGFR proti bunkám produkujúcim ErbB2 (SKBR3 bunky) alebo proti bunkám produkujúcim EGFR (A431 bunky) došlo k zabitiu buniek v závislosti na veľkosti dávky. Doxorubicín bol z fága odštiepený pôsobením lyzozomálnej hydrolázy v komplexe endozóm-lyzozóm (Bar et al., 2008).

V inej štúdii sa Du *et al.* zamerali na vytvorenie systému využiteľného na transport liečiv proti karcinómu pečene. Rakovina pečene je jedným z najťažšie liečiteľných typov rakoviny s vysokou úmrtnosťou (Bray et al., 2018). Jednou z možných ciest v boji proti karcinómu pečene môže byť použitie modifikovaných bakteriofágov na špecifické rozpoznanie nádorových buniek a transport konkrétneho liečiva. Bakteriofágy rozpoznávajúce konkrétne proteíny exprimované v bunkách karcinómu pečene získali infikovaním myši nesúcich rakovinové bunky množstvom fágov a následne selektívnym výberom bakteriofágov nesúcich protilátky rozpoznávajúce produkty buniek karcinómu. Získaný fág A54 najlepšie rozpoznával nádorové bunky. K fágom A54 pripojili doxorubicín a fágom A54 konjugovaným s doxorubicinom (A54-DOX) infikovali myši nesúce nádorové bunky odvodené od ľudských buniek karcinómu pečene BEL-7402. To docielilo zastavenie rastu nádorov. Sledovaním hmotnosti myši počas liečby nezistili žiadnu toxicitu pri použití tohto systému. Používaním fága A54-DOX prežilo 100 % myši viac ako 25 týždňov, pri použití samostatného doxorubicínu prežilo len 40 % myši (Du et al., 2010). Tieto testy dokazujú, že systém vytvorený konjugáciou fága a cytotoxika je efektívny aj *in vivo* a je možné ho použiť na liečbu karcinómu pečene.

## 5.7 Modifikované bakteriofágy na prípravu vakcín

Na boj s niektorými ochoreniami, hlavne vírusového pôvodu je najúčinnjším nástrojom vakcinácia. Veľká pozornosť sa venuje vývinu vakcíny proti vírusu ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV). V predošlých štúdiách bolo zistené, že bakteriofágy môžu po modifikácii niesť rôzne antigény. Sathaliyawala *et al.* využili bakteriofág T4, nesúci antigény na prípravu vakcíny proti HIV. Fág T4 nesie na vonkajšom obale malý proteín vonkajšieho obalu (Soc) a vysoko antigénny proteín vonkajšieho obalu (Hoc) na ktoré je možno pridať rôzne peptidy alebo proteínové produkty. Takto modifikovaný fág T4 po aplikovaní do myši vykazuje vysokú imunogénnu aktivitu a vyvoláva tvorbu protilátok (Jiang et al., 1997). Na antigénny proteín vonkajšieho obalu (Hoc) fága T4 pridali HIV antigény p24-gag, Nef a gp41 jednotlivo alebo v ich kombinácii. Toto pridanie docielili fúzovaním génov kódujúcich HIV antigény s 5'



alebo 3' koncami génov kódujúcich Hoc proteín. Fágy T4 nesúce antigény získali *in vitro* expresiou v *E. coli*. Použitie 10 ng fága T4 prezentujúceho antigén p24 v myšiach docielilo dlhotrvajúcu produkciu veľkého množstva imunoglobulínov (IgG) proti p24 antigénu, v porovnaní s použitím 10 µg čistého rozpustného antigénu, ktoré vyvolalo slabú protilátkovú odpoveď. Použitím fágov prezentujúcich p24 antigén docielili tiež trikrát väčšiu produkciu T-lymfocytov ako použitím samotného p24 antigénu a vyvolali Th1 a Th2 imunitnú odpoveď (Sathaliyawala et al., 2006).

Tao *et al.* použili bakterifág T4 na prípravu duálnej vakcíny cielenej proti bakteriálnym ochoreniam antrax, spôsobený infekciou baktérie *Bacillus anthracis*, a mor, spôsobený infekciou baktérie *Yersinia pestis*. Vytvorili modifikovaný fág T4 nesúci na malom proteíne vonkajšieho obalu (Soc) antrax-ochranný antigén (PA) a mutovaný kapsulový antigén F1. Na prípravu modifikovaných fágov T4 použili tiež *in vitro* systém zahrňujúci expresiu výsledných fágov v *E. coli*. Použitím modifikovaných fágov T4 nesúcich antigény proti antraxu a moru v myšiach, potkanoch a králikoch docielili takmer úplnú ochranu pred antraxom aj morom u myší a úplnú ochranu pred antraxom a morom u potkanov a králikov (Tao et al., 2018). Pozitívne výsledky oboch štúdií ukazujú možnosť použitia modifikovaných bakteriofágov ako nástroja na tvorbu vakcín proti vírusovým aj bakteriálnym ochoreniam.

## 6 Záver

Bakteriofágy boli krátko po ich objavení používané na liečbu bakteriálnych infekcií. Objavom antibiotík sa ich používanie dostalo do úzadia ale v súčasnej dobe, kedy je potrebné hľadať alternatívy k antibiotickej liečbe bakteriálnych infekcií sa opäť začína venovať pozornosť používaniu bakteriofágov. Objavom možnosti molekulárnej modifikácie genómu a vývojom metód použiteľných na takéto modifikácie vznikajú cesty na úpravy bakteriofágov na rôzne možnosti ich využitia.

Táto práca zhrňa metódy použiteľné pri vytváraní modifikovaných bakteriofágov. Ďalej popisuje vytváranie a použitie modifikovaných fágov nesúcich konkrétne úpravy zamerané na ich možné terapeutické využitie vo veterinárnej a humánnej medicíne s možnosťou ich aplikácie aj v poľnohospodárskom alebo potravinárskom priemysle a efektívnosť ich použitia testovaním *in vitro* alebo *in vivo* v animálnych modeloch. Použitím modifikovaných bakteriofágov došlo vždy buď k zvýšeniu efektivity doposiaľ používaných metód a postupov alebo k vytvoreniu novej metódy použiteľnej na dosiahnutie chceného výsledku s vyššou efektívnosťou v porovnaní s doteraz využívanými metódami, preto má používanie modifikovaných bakteriofágov do budúcnosti vysoký potenciál. Najväčšou prekážkou ich využívania je považovanie použitia modifikovaných organizmov za riskantné, čo sťažuje aj klinické testovanie ich možného použitia.

## 7 Zoznam použitej literatúry

- Amor, K., Heinrichs, D. E., Frirdich, E., Ziebell, K., Johnson, R. P., & Whitfield, C. (2000). Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *68*(3), 1116–1124. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1116-1124.2000>
- Ando, H., Lemire, S., Pires, D. P., & Lu, T. K. (2015). Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing. *Cell Systems*, *1*(3), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.08.013>
- Banatvala, N., Griffin, P. M., Greene, K. D., Barrett, T. J., Bibb, W. F., Green, J. H., & Wells, J. G. (2001). The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: Microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *Journal of Infectious Diseases*, *183*(7), 1063–1070. <https://doi.org/10.1086/319269>
- Bar, H., Yacoby, I., & Benhar, I. (2008). Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC Biotechnology*, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-37>
- Bartual, S. G., Otero, J. M., Garcia-Doval, C., Llamas-Saiz, A. L., Kahn, R., Fox, G. C., & Van Raaij, M. J. (2010). Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(47), 20287–20292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011218107>
- \*Benhar, I. (2001). Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, *19*(1), 1–33. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00054-9)
- Blasco, L., Ambroa, A., Trastoy, R., Bleriot, I., Moscoso, M., Fernández-García, L., Perez-Nadales, E., Fernández-Cuenca, F., Torre-Cisneros, J., Oteo-Iglesias, J., Oliver, A., Canton, R., Kidd, T., Navarro, F., Miró, E., Pascual, A., Bou, G., Martínez-Martínez, L., & Tomas, M. (2020). In vitro and in vivo efficacy of combinations of colistin and different endolysins against clinical strains of multi-drug resistant pathogens. *Scientific Reports*, *10*(1), 7163. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64145-7>
- \*Blaser, M. J., & Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature Reviews Microbiology*, *7*(12), 887–894. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2245>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- \*Cenens, W., Makumi, A., Mebrhatu, M. T., Lavigne, R., & Aertsen, A. (2013). Phage–host interactions during pseudolysogeny. *Bacteriophage*, *3*(1), e25029. <https://doi.org/10.4161/bact.25029>
- Chan, L. Y., Kosuri, S., & Endy, D. (2005). Refactoring bacteriophage T7. *Molecular Systems Biology*, *1*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/msb4100025>
- Citorik, R. J., Mimee, M., & Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*, *32*(11), 1141–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>
- \*Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(1), 26–38.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Díez-Martínez, R., De Paz, H., Bustamante, N., García, E., Menéndez, M., & García, P. (2013). Improving the lethal effect of Cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(11), 5355–5365. <https://doi.org/10.1128/AAC.01372-13>
- Díez-Martínez, R., De Paz, H. D., García-Fernández, E., Bustamante, N., Euler, C. W., Fischetti, V. A., Menendez, M., & García, P. (2014). A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(6), 1763–1773. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv038>
- Dong, Q., Wang, J., Yang, H., Wei, C., Yu, J., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, X. E., & Wei, H. (2015). Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against staphylococci and streptococci. *Microbial Biotechnology*, *8*(2), 210–220. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12166>
- Du, B., Han, H., Wang, Z., Kuang, L., Wang, L., Yu, L., Wu, M., Zhou, Z., & Qian, M. (2010). Targeted drug delivery to hepatocarcinoma in vivo by phage-displayed specific binding peptide. *Molecular Cancer Research*, *8*(2), 135–144. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0339>
- Edgar, R., Friedman, N., Shahar, M. M., & Qimron, U. (2012). Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(3), 744–751. <https://doi.org/10.1128/AEM.05741-11>
- \*Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, *55*(3), 476–511. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161547>
- \*Farr, B. M. (2004). Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *17*(4), 317–322. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000136926.52673.cd>
- Fehér, T., Karcagi, I., Blattner, F. R., & Pósfai, G. (2012). Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases. *Microbial Biotechnology*, *5*, 466–476. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00292.x>
- Hall, A. R., De Vos, D., Friman, V. P., Pirnay, J. P., & Buckling, A. (2012). Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(16), 5646–5652. <https://doi.org/10.1128/AEM.00757-12>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. In *Advances in applied microbiology* (1st ed., Vol. 70, Issue 10). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*,

169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

- Jacobs, W. R., Barletta, R. G., Udani, R., Chan, J., Kalkut, G., Sosne, G., Kieser, T., Sarkis, G. J., Hatfull, G. F., & Bloom, B. R. (1993). Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, *260*(5109), 819–822. <https://doi.org/10.1126/science.8484123>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, J., Abu-Shilbayeh, L., & Rao, V. B. (1997). Display of a PorA peptide from *Neisseria meningitidis* on the bacteriophage T4 capsid surface. *Infection and Immunity*, *65*(11), 4770–4777. <https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4770-4777.1997>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kebriaei, R., Lev, K., Morrisette, T., Stamper, K. C., Abdul-Mutakabbir, J. C., Lehman, S. M., Morales, S., & Rybaka, M. J. (2020). Bacteriophage-antibiotic combination strategy: An alternative against methicillin-resistant phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.00461-20>
- Kiro, R., Shitrit, D., & Qimron, U. (2014). Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system. *RNA Biology*, *11*(1), 42–44. <https://doi.org/10.4161/rna.27766>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A., & Collins, J. J. (2007). A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*, *130*(5), 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049>
- \*Lazcka, O., Campo, F. J. Del, & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(7), 1205–1217. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>
- Le, S., He, X., Tan, Y., Huang, G., Zhang, L., Lux, R., Shi, W., & Hu, F. (2013). Mapping the Tail Fiber as the Receptor Binding Protein Responsible for Differential Host Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068562>
- LEDERBERG, J. (1951). Streptomycin resistance; a genetically recessive mutation. *Journal of Bacteriology*, *61*(5), 549–550. <https://doi.org/10.1128/JB.61.5.549-550.1951>
- Lemon, D. J., Kay, M. K., Titus, J. K., Ford, A. A., Chen, W., Hamlin, N. J., & Hwang, Y. Y. (2019). Construction of a genetically modified T7Select phage system to express the antimicrobial peptide 1018. *Journal of Microbiology*, *57*(6), 532–538. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8686-6>
- Lin, T. Y., Lo, Y. H., Tseng, P. W., Chang, S. F., Lin, Y. T., & Chen, T. S. (2012). A T3 and T7 recombinant phage acquires efficient adsorption and a broader host range. *PLoS ONE*, *7*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030954>
- Loessner, M. J., & Busse, M. (1990). Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1912–1918. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1912->

1918.1990

- Loessner, Martin J., Kramer, K., Ebel, F., & Scherer, S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology*, *44*(2), 335–349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x>
- Loessner, Martin J., Rees, C. E. D., Stewart, G. S. A. B., & Scherer, S. (1996). Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(4), 1133–1140. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1133-1140.1996>
- Lu, T. K., & Collins, J. J. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(12), 4629–4634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>
- Lu, Timothy K., Bowers, J., & Koeris, M. S. (2013). Advancing bacteriophage-based microbial diagnostics with synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, *31*(6), 325–327. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.009>
- Mahichi, F., Synnott, A. J., Yamamichi, K., Osada, T., & Tanji, Y. (2009). Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS Microbiology Letters*, *295*(2), 211–217. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01588.x>
- \*Makarova, K. S., Brouns, S. J. J., Horvath, P., Sas, D. F., & Wolf, Y. I. (2012). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 467–477. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577.Evolution>
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, *1*, 1–26. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- Marinelli, L. J., Piuri, M., Swigoňová, Z., Balachandran, A., Oldfield, L. M., van Kessel, J. C., & Hatfull, G. F. (2008). BRED: A simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS ONE*, *3*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003957>
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, *322*(5909), 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
- Morita, M., Tanji, Y., Mizoguchi, K., Akitsu, T., Kijima, N., & Unno, H. (2002). Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes. *FEMS Microbiology Letters*, *211*(1), 77–83. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00656-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00656-0)
- Mukai, F., Streisinger, G., & Miller, B. (1967). The mechanism of lysis in phage T4-infected cells. *Virology*, *33*(3), 398–404. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90115-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90115-8)
- \*Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E., & Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(12), 760–773. <https://doi.org/10.1038/s41579-018->

- Olszak, T., Zarnowiec, P., Kaca, W., Danis-Włodarczyk, K., Augustyniak, D., Drevinek, P., de Soyza, A., McClean, S., & Drulis-Kawa, Z. (2015). In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), 6021–6033. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6492-6>
- Oppenheim, A. B., Rattray, A. J., Bubunenko, M., Thomason, L. C., & Court, D. L. (2004). In vivo recombineering of bacteriophage  $\lambda$  by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology*, 319(2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.11.007>
- Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., & Seo, K. S. (2017). Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 7(August 2016), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep44929>
- Riede, I., Drexler, K., Schwarz, H., & Henning, U. (1987). T-even-type bacteriophages use an adhesin for recognition of cellular receptors. *Journal of Molecular Biology*, 194(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90712-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90712-1)
- Robillard, N. J. (1990). Broad-host-range gyrase A gene probe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10), 1889–1894. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.10.1889>
- Rothenberg, E., Sepúlveda, L. A., Skinner, S. O., Zeng, L., Selvin, P. R., & Golding, I. (2011). Single-virus tracking reveals a spatial receptor-dependent search mechanism. *Biophysical Journal*, 100(12), 2875–2882. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.014>
- Sarkis, G. J., Jacobs, W. R., & Hatfull, G. F. (1995). L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. *Molecular Microbiology*, 15(6), 1055–1067. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02281.x>
- Sathaliyawala, T., Rao, M., Maclean, D. M., Birx, D. L., Alving, C. R., & Rao, V. B. (2006). Assembly of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antigens on Bacteriophage T4: a Novel In Vitro Approach To Construct Multicomponent HIV Vaccines. *Journal of Virology*, 80(15), 7688–7698. <https://doi.org/10.1128/jvi.00235-06>
- \*Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147–1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>
- \*Secor, P. R., Burgener, E. B., Kinnersley, M., Jennings, L. K., Roman-Cruz, V., Popescu, M., Van Belleghem, J. D., Haddock, N., Copeland, C., Michaels, L. A., de Vries, C. R., Chen, Q., Pourtois, J., Wheeler, T. J., Milla, C. E., & Bollyky, P. L. (2020). Pf Bacteriophage and Their Impact on *Pseudomonas* Virulence, Mammalian Immunity, and Chronic Infections. *Frontiers in Immunology*, 11(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00244>
- Sinsheimer, R. L. (1959). A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage  $\phi$ X174. *Journal of Molecular Biology*, 1(1), 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(59\)80006-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(59)80006-1)
- Smith, H. O., Hutchison, C. A., Pfannkoch, C., & Venter, J. C. (2003). Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic

- oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15440–15445. <https://doi.org/10.1073/pnas.2237126100>
- Stemmer, W. P. C., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M., & Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164(1), 49–53. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00511-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00511-4)
- \*Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, G. J. (2001). MINIREVIEW Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649>
- Tanji, Y., Furukawa, C., Na, S. H., Hijikata, T., Miyanaga, K., & Unno, H. (2004). Escherichia coli detection by GFP-labeled lysozyme-inactivated T4 bacteriophage. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.011>
- Tao, P., Mahalingam, M., Zhu, J., Moayeri, M., Sha, J., Lawrence, W. S., Leppla, S. H., Chopra, A. K., & Rao, V. B. (2018). A Bacteriophage T4 Nanoparticle-Based Dual Vaccine against Anthrax and Plague. *MBio*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.01926-18>
- Timothy, I., Ta, K., Koeris, M. S., Us, M. A., Chevalier, B. S., Us, M. A., Holder, J. W., Us, M. A., John, G., & Us, M. A. (2012). (12) *United States Patent*. 91(12).
- Turton, J. A., Andrews, C. M., Havard, A. C., & Williams, T. C. (2002). Studies on the haemotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. *International Journal of Experimental Pathology*, 83(5), 225–238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2003.00232.x>
- Twort, F. W. (1915). an Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. *The Lancet*, 186(4814), 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)
- Vaks, L., & Benhar, I. (2011). In vivo characteristics of targeted drug-carrying filamentous bacteriophage nanomedicines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-58>
- Veesler, D., Spinelli, S., Mahony, J., Lichière, J., Blangy, S., Bricogne, G., Legrand, P., Ortiz-Lombardia, M., Campanacci, V., Van Sinderen, D., & Cambillau, C. (2012). Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 8954–8958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200966109>
- Walker, G. C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli. *Microbiological Reviews*, 48(1), 60–93. <https://doi.org/10.1128/membr.48.1.60-93.1984>
- Wei, Y., Kirby, A., & Levin, B. R. (2011). The population and evolutionary dynamics of vibrio cholerae and its bacteriophage: Conditions for maintaining phage-limited communities. *American Naturalist*, 178(6), 715–725. <https://doi.org/10.1086/662677>
- Yacoby, I., Bar, H., & Benhar, I. (2007). Targeted drug-carrying bacteriophages as antibacterial nanomedicines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2156–2163. <https://doi.org/10.1128/AAC.00163-07>
- Yacoby, I., Shamis, M., Bar, H., Shabat, D., & Benhar, I. (2006). Targeting antibacterial agents by using drug-carrying filamentous bacteriophages. *Antimicrobial Agents and*



*Chemotherapy*, 50(6), 2087–2097. <https://doi.org/10.1128/AAC.00169-06>

Yoichi, M., Abe, M., Miyanaga, K., Unno, H., & Tanji, Y. (2005). Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Biotechnology*, 115(1), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.003>

Yosef, I., Goren, M. G., Globus, R., Molshanski-Mor, S., & Qimron, U. (2017). Extending the Host Range of Bacteriophage Particles for DNA Transduction. *Molecular Cell*, 66(5), 721-728.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.025>

\*Zhang, Y., & Yew, W. (2015). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis*, 19(June), 1276–1289. <https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>