

6. Czynniki antybakteryjne zainspirowane fagami

6.2 Fagi w zwalczaniu biofilmów

Numer slajdu i zawartość:

- 1) Jak fagi mogą być pomocne w zwalczaniu biofilmów? Zanim spróbujemy odpowiedzieć na to pytanie wprowadzimy was w świat biofilmów. Następnie odkryjemy jak fagi i ich enzymy mogą być wykorzystywane w zwalczaniu zagrożeń związanych biofilmem.
- 2) Czym jest biofilm? Biofilm jest zorganizowaną strukturą zbudowaną z grup komórek bakteryjnych, złożoną z jednej grupy bakterii lub z różnych gatunków bakteryjnych. Bakterie są zanurzone w matrix zbudowanym z wyprodukowanej przez bakterie zewnątrzkomórkowej substancji polimerycznej, zwanej EPS. EPS matrix jest często zbudowana z polisacharydów, ale może również zawierać białka a nawet DNA.

Aby zilustrować strukturę i skład biofilmu, przejdźmy szybko przez proces jego formowania. Najpierw komórki bakteryjne przytwierdzają się do powierzchni. Następnie rozpoczyna się produkcja EPS, prowadząc do nieodwracalnego przyłączenia komórek do powierzchni. W trzeciej fazie komórki przemieszczają się i tworzą grupy, formując dojrzały biofilm. Na tym etapie EPS matrix jest skomplikowaną strukturą tworzącą kanały, zapewniające transport składników odżywczych i tlenu. Skutkuje to zróżnicowaniem typów komórek w obrębie biofilmu. W końcu, komórki mogą się odłączać i migrować celem założenia nowej struktury biofilmu.

Jak widać, EPS matrix jest jedną z głównych cech charakterystycznych biofilmu, odpowiedzialną również za problemy związane ze zwalczaniem biofilmu. EPS nie tylko chroni komórki przed stresem środowiskowym jak utlenianie, ale stanowi również barierę dla antybiotyków czy odpowiedzi immunologicznej gospodarza, sprawiając że biofilm jest strukturą trudniejszą do zwalczenia niż bakterie wolnożyjące.

- 3) W jaki zatem sposób fagi mogą być pomocne w procesie zwalczania biofilmu? Koktajle fagowe są w stanie zredukować strukturę biofilmu. Eksperymenty wykazały, że koktajl złożony z trzech różnych fagów był w stanie zlikwidować biofilm zawierający jeden gatunek bakterii. Większość biofilmów jest jednak zbudowana z wielu gatunków bakterii. W takim przypadku koktajl fagowy nie był w stanie wyeliminować nawet jednego gatunku z biofilmu, nie mówiąc już o usunięciu całej struktury.

Są pewne ograniczenia wynikające z użycia fagów czy koktajlów fagowych. Jak pokazano na rysunku, do zredukowania wielogatunkowego biofilmu potrzebny jest bardzo złożony i różnorodny koktajl fagowy. W biofilmach tego typu, komórki bakteryjne otoczone są przez inne niewrażliwe na danego faga bakterie, przez co bakterie wrażliwe zyskują ochronę przed danym fagiem. Do tego dochodzi jeszcze biologiczna przeszkoda jaką jest wytwarzanie oporności na faga przez bakterie.

Zastosowanie samych fagów nie jest wystarczające do zwalczania struktury biofilmu, ale fagi znalazły sposób by infekować komórki bakteryjne znajdujące się w biofilmie przez wykorzystanie specyficznych enzymów. Skupimy się teraz na enzymach jednego typu nazywanych depolimerazami EPS/ depolimerazami polisacharydów.

- 4) Różne grupy fagów produkują depolimerazy polisacharydów. Depolimerazy te mogą być związane z wirionem fagowym, dokładnie z ogonkiem lub kapsydem, lub mogą być wydzielane do środowiska. Enzymy te degradują wiązania pomiędzy polisacharydami. Depolimerazy mogą rozkładać lipopolisacharydy, nazywane również LPS, aby umożliwić fagowi przyłączenie do powierzchni komórki bakteryjnej, ale mogą również degradować złożoną strukturę EPS matrix.

To pokazuje, jak enzymy te mogą pomóc w zwalczaniu biofilmu. Depolimerazy degradujące EPS matrix biofilmu, przez co niszczące powłokę ochronną otaczającą komórki bakteryjne, sprawiają że bakterie stają się dostępne dla antybiotykoterapii. Połączenie depolimeraz z antybiotykami może doprowadzić do całkowitego usunięcia biofilmu.

- 5) Następnie, zapoznamy się z eksperymentalnymi przykładami, aby przybliżyć potencjał depolimeraz.

Pierwszy przykład: „Depolimerazy a mukowiscydoza”. Pacjenci z mukowiscydozą borykają się z problemem bardzo gęstego i lepkiego śluzu w płucach, powodującego trudności z oddychaniem, a jednocześnie śluz ten jest świetnym środowiskiem dla rozwoju biofilmu patogenów takich jak *Pseudomonas aeruginosa*. By zwalczyć takie biofilmy *P. aeruginosa*, rozpoczęły się poszukiwania fagów, które są w stanie degradować EPS matrix. Znalaziono cztery fagi, zdolne do degradacji polisacharydów pochodzących z EPS matrix *P. aeruginosa* (Rysunek: czym wyższa absorbancja tym więcej polisacharydów zostało zdegradowanych). To demonstruje możliwości identyfikacji fagów produkujących depolimerazy do zwalczania chorób wywołanych przez bakterie formujące biofilm.

Inni badacze posunęli się krok dalej, badając depolimerazę fagową przeciwko *Staphylococcus aureus*, bakterii będącej częstą przyczyną infekcji szpitalnych. Depolimeraza EPS była w stanie usnąć do 90% komórek biofilmu. Jednak największym osiągnięciem było to, że białko miało zdolność do działania niezależnie od cząstki fagowej. Daje to możliwość skojarzonego leczenia z użyciem depolimeraz i antybiotyków do zwalczania biofilmów.

Podsumowując, podpowiem jak dokonać selekcji depolimeraz. Ponieważ właściwa kompozycja EPS zależy od bakterii występujących wewnątrz biofilmu, najbardziej użyteczną z terapeutycznego punktu widzenia depolimerazę można znaleźć w fagach, które koewoluowały z bakteriami, przeciwko którym depolimerazy poszukujemy.

- 6) Podsumowując, pokażemy przykład jak inżynieria fagów może zostać wykorzystana do połączenia bakteriobójczych właściwości fagów litycznych ze zdolnościami enzymów do degradacji EPS.

Jeśli chcesz zastosować tę strategię wybierz faga specyficznego względem powszechnie występującej bakterii w biofilmie. Następnie pozwól bakterii wytworzyć depolimerazę o szerokim spektrum aktywności, która może być wydzielana do środowiska. W tych badaniach użyto Dyspersyny B, enzymu specyficznego względem wielu gatunków.

Zmodyfikowany fag infekuje biofilm. Po zainfekowaniu, fag ulega replikacji w bakteriach, podczas gdy Dyspersyna B jest ekspresjonowana. Po lizie komórek zarówno fagi jak i enzymy

zostają uwolnione, prowadząc do dalszej infekcji fagowej, a co za tym idzie, do śmierci komórek bakteryjnych, podczas gdy enzym degradujący EPS pozwala fagom na docieranie do kolejnych komórek bakteryjnych. Ta strategia skutkowałą 99% redukcją komórek w biofilmie.