



Kandidaatintutkielma

Bakteriofagiterapia antibioottiresistenttien bakteeri- infektioiden hoidossa

Iida Jääskeläinen

Oulun yliopisto
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta
2020

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

1. Virukset.....	5
2. Bakteriofagit.....	5
2.1. Bakteriofagien ja bakteriofagiterapian historiaa.....	6
2.2. Rakenne.....	7
2.3. Reseptorit ja adsorptio.....	8
2.4. Lisääntyminen.....	9
2.5. Bakteeri-isännän lyysi.....	10
2.5.1. Holiinit.....	11
2.5.2. Endolysiinit.....	12
2.5.3. Spaniinit.....	13
3. Bakteriofagiterapia.....	14
3.1. Antibioottiresistentit bakteerit.....	14
3.2. Faagien valmistelu terapiaa varten.....	15
3.3. Genomin karakterisointi.....	16
3.4. Erilaiset menetelmät faagien annosteluun.....	17
3.5. Endolysiinien käyttö antibakteriaalisina agentteina.....	19
3.6. Muokatut bakteriofagit.....	20
3.6.1. Bakteriofagit lääkeaineiden kantajina.....	21
4. Bakteriofagiterapian haasteet.....	22
4.1. Bakteriofagien aiheuttama immuunivaste.....	22
4.1.1. Endotoksiinit.....	24
4.2. Faagiresistenssi.....	25
4.2.1. Virusten evoluutio mukautuu resistenssiin.....	26
4.2.2. Faagien käyttö yhdessä antibioottien kanssa.....	26
4.3. Sääntely ja taloudellinen kannattavuus.....	27
5. Tulevaisuudennäkymät.....	28
6. Kirjallisuusviitteet.....	29

Käytetyt lyhenteet

BG	bacterial ghost – “bakteriaaave”, tyhjä bakteerin kuori ilman sytoplasmaa ja nukleoidia.
Cas	CRISPR associated protein – CRISPR:iin liittyvät proteiinit
CRISPR	clustered regularly-interspaced short palindromic repeats – bakteerin DNA jakso, jota se hyödyntää virustorjunnassa
CsCl	cesiumkloridi
CSLC	carrier state life cycle – bakteriofagien kantaja-tila replikaatiosykli
DNA	deoksiribonukleinihappo
dsDNA	kaksijuosteinen DNA
EM	elektronimikroskopia
faagi	bakteriofagi
FDA	U.S. Food and Drug Administration - Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
IFN- γ	interferoni γ
IgA	immunoglobuliini A
IgG	immunoglobuliini G
IL-6	interleukiini 6
LPS	lipopolysakkaridi
MDR	multi-drug resistant – monelle lääkkeelle vastustuskykyinen
MOI	multiplicity of infection - infektiokerroin
MRSA	metisilliinille vastuskykyinen <i>Staphylococcus aureus</i>
ORF	open reading frame – avoin lukukehys
PAMP	pathogen-associated molecular pattern – patogeenien tuottamia molekyyilejä, jotka luontainen immunitettijärjestelmä tunnistaa
PAS	phage-antibiotic synergy – faagi-antibiootti synergia, antibioottien aiheuttama faagituotannon lisääntyminen bakteereissa
PBMC	peripheral blood mononuclear cell – yksitumainen verisolu
PCR	polymeraasiketjureaktio
PEG	polyetyleeniglykoli
PMF	proton motive force - protonivoima
PRR	pattern recognition receptor – reseptori, joka tunnistaa PAMP:t

RBP	receptor-binding proteins – reseptoriin sitoutuva proteiini bakteriofagissa
RNA	ribonukleinihappo
ROS	reaktiiviset happiradikaalit
SAR	signal-arrest-release-signaalisekvenssi
ssDNA	yksijuosteinen DNA
Th1	T-auttajasolu (tyyppi 1)

1. Virukset

Virukset ovat loiskeenejä, joiden tarkoituksena on yksinomaan lisääntyminen, eli puhutaan ns. ”itsekkäistä geeneistä”. Viruksen genomi sisältää ohjeet uusien viruspartikkelien valmistamiseen ja perimän replikoimiseen, mutta viruspartikkeli ei kykene tähän itsenäisesti. Viruksien ei ajatella olevan varsinaisesti elossa, vaan ikään kuin elävän ja elottoman välimaastossa. Ne infektoivat soluja, joiden toimintoja, kuten proteiinisynteesikoneistoa, ne tarvitsevat lisääntyäkseen, ja infektioiden yhteydessä ne joskus aiheuttavat sairauksia. Ne ovat siis loisia, jotka valtaavat isäntäsolun, käyttävät sitä uusien viruspartikkelien valmistamiseen ja usein myös aiheuttavat isäntäsolun kuoleman, kun se on täyttänyt tehtävänsä. Viruspartikkelista käytetään nimeä virioni, ja usein ajatellaan, että solun ulkopuolella ajelehtiva virioni ei vielä ole virus, vaan viruksella tarkoitetaan nimenomaan infektiotilaa tai infektoitunutta solua (Wagner et al., 2008).

Virukset ovat monipuolinen joukko erilaisia partikkeleita ja niitä voidaan luokitella eri ominaisuuksien perusteella. Virukset ovat usein hyvin spesifisiä, eli ne infektoivat vain yhtä solutyyppeä ja mahdollisesti sitä läheisesti muistuttavia soluja. Viruksille yhteistä on se, että niillä on genomi, joka voi olla yksi- tai kaksijuosteista DNA:ta tai RNA:ta ja genomia suojaa ja ympäröi proteiineista muodostunut nukleokapsidi. Nukleokapsidi on yleensä rakenteeltaan helikaalinen tai ikosaedrinen. Jotkin virukset, kuten monet bakteriofagit, ovat kuitenkin kehittäneet oman, monimutkaisemman rakenteen. Osalla viruksista on vielä nukleokapsidin päällä lipideistä koostuva vaippa, jonka virioni on kuronut ympärilleen isäntäsolun solukalvosta (Wagner et al., 2008).

2. Bakteriofagit

Bakteriofagit eli faagit ovat viruksia, jotka infektoivat bakteereja ja joskus myös arkkeja, mutta jättävät muut solut rauhaan. Niitten määrä biosfäärissä on hyvin suuri, arviolta 10^{32} virionia, ja niitä esiintyy lähes kaikkialla missä niiden bakteeri-isännät elävät, niin maaperässä kuin meressäkin. Uusia bakteriofageja on löydetty ja löytyy jatkuvasti lisää. Faageja voidaan jakaa eri luokkiin riippuen niiden ominaisuuksista, kuten elinympäristöstä, nukleiinihappotyypistä, rakenteesta, isäntäsolutyypistä tai lisääntymistavasta. N. 96 % tunnetuista faageista on *Caudovirales*-suvun jäseniä eli kaksijuosteista DNA:ta sisältäviä, rakenteeltaan hännällisiä faageja. Tämä suku voidaan jakaa edelleen alaluokkiin häntärakenteen mukaan *Siphoviridae*, *Myoviridae* ja *Podoviridae* –perheisiin. Bakteriofageihin kuuluu siis hyvin sekalainen joukko viruksia, jotka eroavat toisistaan monin tavoin (Ackermann, 2003; Wittebole et al., 2014).

Bakteriofageilla on ollut ja on edelleen tärkeä merkitys geeni- ja biotekniikassa. Bakteriofagitutkimukset ovat auttaneet muun muassa restriktioentsyymien ja CRISPR/Cas –järjestelmän löytymisessä. Faageja tutkitaan edelleen uusien mekanismien varalta, ja niiden monimuotoiset genomit herättävät kiinnostusta. Bakteriofagiterapia on menetelmä, jolla on jo pitkät juuret, mutta on kiinnostava faageihin perustuva tutkimuskohde myös tulevaisuudessa (Hatfull, 2015).

2.1. Bakteriofagien ja bakteriofagiterapian historiaa

Vuonna 1915 Frederick William Twort löysi bakteriofagit (Twort, 1915). Tästä pari vuotta myöhemmin Félix d’Herelle teki samanlaisia havaintoja (d’Herelle, 1917). Hänen löydöksensä johtivat hänet teorioimaan, että faageja olisi mahdollista käyttää terapeuttisesti bakteerinfektioiden hoitoon. d’Herelle onkin saanut mainetta bakteriofagiterapian isänä (Wittebole et al., 2014). d’Herelle sekä muut tutkijat tekivät kokeita faageilla, mutta väärät käsitykset ja puutteellinen ymmärrys bakteriofageista sekä DNA:sta perimän säilytysmolekyylinä kuitenkin haittasi faagiterapian kehitystä. Frank Macfarlane Burnet vahvisti bakteriofagien olevan viruksia, ja että faageja on erityyppisiä (Burnet, 1929; Burnet, 1933). Kun elektronimikroskopia (EM) keksittiin, Helmut Ruska kuvasi ensi kertaa hännällisten faagien erikoisen rakenteen (Ruska, 1940). Myöhemmin Luria ja Anderson kuvasivat erilaisia faagien rakenteita ja esittelivät bakteriofagi-infektion vaiheita (Luria and Anderson, 1942; Luria et al., 1943).

Kaikista läpimurroista huolimatta, bakteriofagiterapia oli vuosikymmeniä lähes unohduksissa läntisessä maailmassa, jossa antibiootit hallitsivat. Neuvostoliitossa faagitutkimusta ei kuitenkaan hylätty. Tunnettuja bakteriofagitutkimuksen keskuksia entisessä itäblokkissa ovat mm. Eliava-instituutti Georgiassa sekä Hirsfeld-instituutti Puolassa. 1980-luvulla lännessä alettiin taas kiinnostua bakteriofagiterapiasta; ensin kokeita tehtiin eläimille ja myöhemmin 2000-luvulla myös ihmisille. Vuonna 2004 järjestettiin ns. Phage Summit – tapahtuma Floridassa, joka oli ensimmäinen kansainvälinen faageille omistettu tapahtuma. Innostus bakteriofagiteoriaa kohtaan on ollut voimakkaassa nousussa antibioottiresistenttien bakteerikantojen lisääntymisen takia (Wittebole et al., 2014).

Ensimmäinen faagiterapian plasebo-kontrolloitu kliininen kaksoissokkokeo julkaistiin vuonna 2009 (Wright et al., 2009). Koehenkilöt (yhteensä 24) kärsivät antibiooteille vastustuskykyisestä, biofilmirakenteita muodostavasta *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin aiheuttamasta kroonisesta korvatulehduksesta. Potilaille joko annettiin faageja (6 erilaista faagia) tai plaseboa. Faageilla hoidetun potilasryhmä infektio parani plaseboryhmään verrattuna merkittävästi. *P. aeruginosa*:n määrä oli madaltunut, ja kolme kahdestatoista

faageilla hoidetuista potilaista vaikutti parantuneen infektiosta täysin. Kokeessa ei myöskään havaittu faagien aiheuttaneen mitään negatiivisia sivuvaikutuksia (Wright et al., 2009).

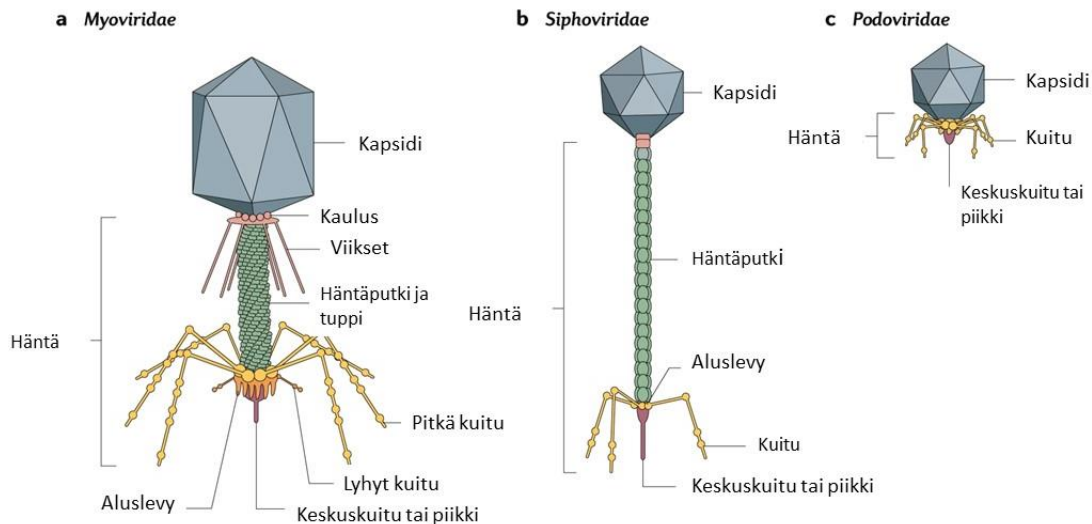
Itä-Euroopan pitkät perinteet bakteriofagiterapiassa ovat johtaneet siihen, että Venäjällä myydään nykyisin apteekeissa bakteriofagicocktaileja. Vuonna 2013 julkaistiin tutkimus venäläisen Microgen-lääkeyhtiön *Escherichia coli* sekä *Proteus*-bakteerikantoihin tarkoitettu faagicocktailista ja sen turvallisuudesta (McCallin et al., 2013). Tutkimuksissa selvisi, että cocktail koostui yhteensä 18 erilaisesta faagista, ja jokainen kolmesta hännällisten faagien perheestä (Podoviridae, Myoviridae, Siphoviridae) oli edustettuna. Enemmistö oli T7-faagin kaltaisia faageja, mutta joukossa oli myös mm. T4-faagien kaltaisia faageja. Turvallisuutta tutkittiin ensin vertaamalla genomeja haitallisiksi tiedettyihin geeneihin, jollaisia ei cocktailista löytynyt. Koska tietokannassa on vain geenejä, joiden toiminta tunnetaan, tämä ei vielä takaa turvallisuutta. Seuraavaksi faagicocktailia annettiin suun kautta vapaaehtoisille bangladeshilaisille koehenkilöille. Heillä ei ilmennyt haittavaikutuksia, mutta koska koehenkilöiden määrä oli pieni, harvinaisemmat haittavaikutukset ovat silti voineet jäädä piiloon. Joka tapauksessa faagicocktaililla ei kokeessa havaittu merkittäviä haittoja (McCallin et al., 2013).

2.2. Rakenne

Bakteriofagin rakenne voi olla hyvin monenlainen: filamenttinen, pleomorfinen tai ikosaedrinen. Yleisin faagityyppi on kuitenkin ikosaedrinen ”pää”, jossa geneettinen materiaali sijaitsee, ja päähän kaulusosan välityksellä liittynyt häntä. Hännän alaosassa on kiinni ns. reseptoriin sitoutuvia proteiineja (RBP), yleensä kuituja ja/tai piikkejä, joiden tehtävänä on sitoutua bakteerin pinnalla oleviin reseptoreihin ja siten aloittaa infektio (Nobrega et al., 2018; Wittebole et al., 2014). Kolmen hännällisen bakteriofagiperheen perusrakenteet on esitelty kuvassa 1.

Esimerkiksi T4 on *Escherichia coli* -bakteereja infektoiva, kaksijuosteista DNA:ta kantava faagi. Se on hyvin tunnettu jäsen rakenteeltaan kaikkein monimutkaisemmasta hännällisten faagien perheestä, *Myoviridae*:sta. Sillä on kuusi pitkää ja kuusi lyhyttä kuitua kiinni hännän pohjan aluslevyrakenteessa. Pitkien kuitujen kärjet tunnistavat ensin reseptorin bakteerin pinnalla ja sitoutuvat. Tämän jälkeen taittuneet lyhyet kuidut avautuvat ja sitoutuvat myös isäntään. Faagin kaulus sekä kauluksesta ulkonevat ”viikset” muodostuvat fibriniinista ja ne auttavat tunnistamaan sopivia olosuhteita viruksen infektiolle ja estämään sen jos ne eivät ole hyvät. Faagin sitouduttua reseptoriin aluslevy muuttaa muotoaan, häntäosaa ympäröivä ”tuppi” supistuu ja hännän putki pyörähtää ja läpäisee bakteerisolun kalvon kuin pora. Faagin

solun lävistävässä osassa on lysotsyyminen domeeni joka aiheuttaa peptidoglykaanisoluseinän paikallista lyysiä. Tämän jälkeen DNA voi liikkua häntäputkea pitkin soluun. (Yap and Rossmann, 2014)



Kuva 1. Hännällisten faagien tyypilliset rakenteet. a) *Myoviridae*. Supistuva pitkä häntäputki ja tupp ovat ominaisia *Myoviridae*-faageille. b) *Siphoviridae*. Häntä on pitkä, mutta se ei ole supistuskäkyinen. c) *Podoviridae*. Toisin kuin kahdella edellisellä faagityypillä, *Podoviridae*-faageilla ei ole aluslevyä, vaan kuidut ja muut reseptoriin sitoutuvat proteiinit (RBP) kiinnittyvät suoraan häntään. Teksti ja kuva muokattu lähteestä (Nobrega et al., 2018).

2.3. Reseptorit ja adsorptio

Bakteriofagi aloittaa infektiensa adsorptiolla isäntäänsä. Adsorptio voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: alkukontakti, reversiibeli sitoutuminen ja irreversiibeli sitoutuminen (Bertozzi Silva et al., 2016). Alkukontaktia seuraava, nopea reversiibeli vaihe ei vielä välttämättä johda infektiin; jos olosuhteet eivät ole otolliset, faagi irtoaa aiheuttamatta vahinkoa isäntäsolulle. Entsyymaattisia muutoksia aiheuttava, irreversiibeli vaihe johtaa infektiin ja virus pääsee vaikuttamaan isäntäbakteerin toimintoihin (Garen and Puck, 1951).

Bakteriofagin mahdollisten isäntäsolujen kirjoon vaikuttaa vahvasti se, millaisia bakteerisolun pinnan reseptorit ovat, ja ovatko ne yhteensopivia bakteriofagin kanssa. Myös reseptorien määrä ja sijainti solussa vaikuttaa vahvasti siihen, voiko bakteriofagi sitoutua niihin, mikä on välttämätöntä faagin genomien adsorption kannalta. Reseptorien sijainti riippuu paljolti bakteeri-isännän pintarakenteesta; gram-negatiivisilla bakteereilla reseptoreja löytyy uloimman

solukalvon pinnalta, kun taas gram-positiivilla bakteereilla ne löytyvät usein soluseinästä. Reseptoreja on myös bakteerin kapselissa, värekarvoissa ja siimassa (Rakhuba et al., 2010).

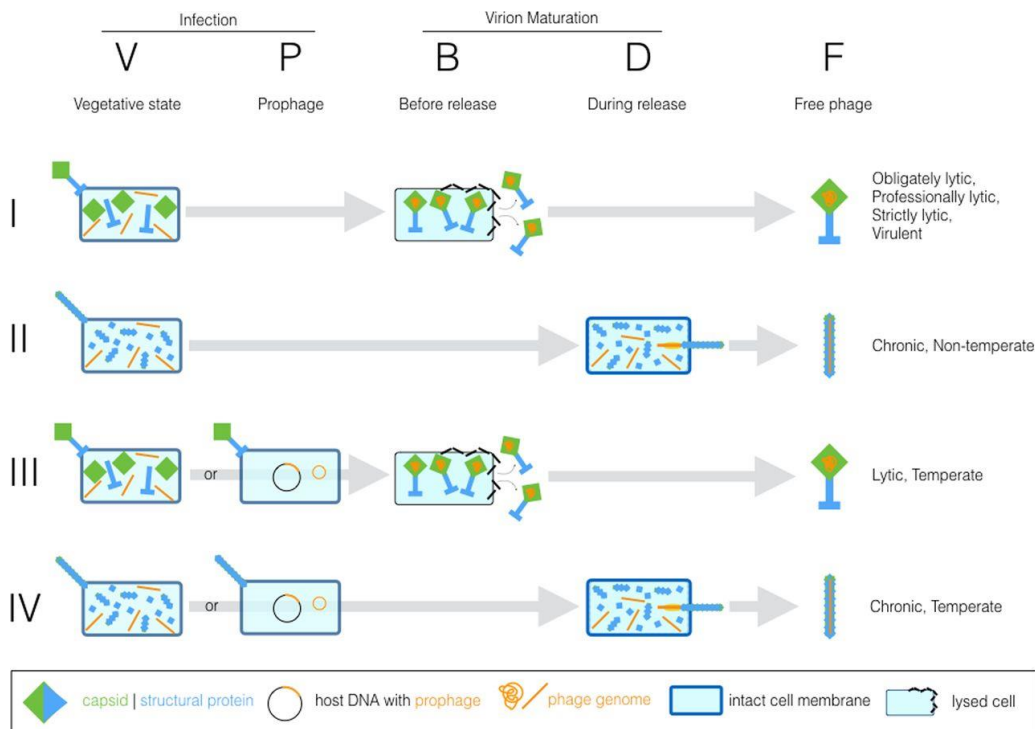
Faagireseptorit voivat olla rakenteeltaan proteiineja, peptidejä, polysakkarideja tai muita pintarakenteita, kuten värekarvoja. Faagi saattaa käyttää useampaa eri reseptorirakennetta sitoutuessaan isäntäänsä, ja adsorption reversiibeli vaihe saattaa vaatia erilaista reseptoria kuin irreversiibeli vaihe (Bertozzi Silva et al., 2016). Esimerkiksi T5 bakteriofagi sitoutuu ensin kuitujensa avulla reversiibelisti isännän lipopolysakkarideihin ja sitten häntäproteiini pb5:n avulla irreversiibelisti FhuA-proteiinireseptoriin (Heller, K. and Braun, 1982; Heller, K. J., 1984).

2.4. Lisääntyminen

Kun bakteriofagin nukleiinihapot on onnistuneesti siirretty bakteeri-isännän sisään, alkaa genomien replikoituminen, virusproteiinien tuotto ja uusien viruspartikkelien kokoaminen. Faageilla on useita lisääntymisstrategioita. Tyypillinen, vaikkakin vajavainen tapa jakaa faagit on lyyttinen vastaan lysogeeninen lisääntymiskierto. Toinen mahdollinen tapa jaotella faagi-infektioita on se, hajottavatko ne isäntäsolun vai onko infektio krooninen. Faagien luokittelu lisääntymistavan perusteella on esitetty kuvassa 2. Lysogeenista elämäntapaa noudattavista bakteriofaageista käytetään nimitystä temperaatti faagi. Lyyttisistä faageista taas käytetään joskus myös nimeä virulentti faagi, sillä niiden kyky tuhota isäntä on nopeampi ja tehokkaampi kuin temperaattien faagien, eli niiden virulenssi on korkeampi. Virulentti-nimitys on kuitenkin hieman ongelmallinen, sillä se ei ole kovin tarkka ilmaus eikä yksinomaan bakteriofageihin liittyvä termi (Hobbs and Abedon, 2016).

Lyyttisessä elämäntapassa bakteriofagi käyttää isäntäsolua uusien faagien tuottamiseen, minkä jälkeen isäntäsolu hajotetaan eli lyysataan, jolloin uudet bakteriofagit vapautuvat. Lysogeenisessä elämäntapassa faagin genomi jää elämään ja replikoitumaan yhdessä bakteerigenomin kanssa joko kiinnittymällä suoraan bakteerin genomiin tai erillisenä episomina. Se ei tuota uusia faageja ennen kuin jokin ärsyke saa sen siirtymään lysogeenisestä kierrosta lyyttiseen kiertoon. Lyyttisen ja lysogeenisen kierron lisäksi on kuitenkin olemassa myös epävakaita faagi-infektion tiloja, joihin kuuluvat mm. pseudo-lysogenia ja kantaja-tila (CSLC). Pseudo-lysogeenisessä tilassa bakteerin genomi ei aloita lyyttistä kiertoa, mutta se ei myöskään asetu osaksi bakteerin replikaatiosykliä. Genomi vain odottaa solussa epäaktiivisena. Pseudo-lysogenia on usein seurausta isäntäsolun ravinnonpuutteesta ja se päättyy, jos ravintoa on taas tarjolla. Pseudo-lysogenialla tarkoitetaan joskus myös tilaa, jossa faagin genomista muodostunut episomi on epävakaa. Kantaja-tilassa bakteerit ja bakteriofagit elävät

tasapainotilassa keskenään. CSLC-tilaa on havaittu muutoin täysin lyyttisten faagien parissa. Kantaja-tilassa osa bakteereista on faageille immuuneja, kun taas osa on uusia faageja tuottavia kantajia. On havaittu, että joissain biofilmeissä, jotka ovat bakteerien itsensä suojaksi tuottamia polymeerirakenteita, CSLC-tilasta on hyötyä sekä bakteereille että faageille (Siringan et al., 2014).



Kuva 2. Bakteriofagien infektiotavat jaettuna neljään luokkaan. Luokassa I täysin lyyttiset (virulentit) faagit, jotka hajottavat isäntäbakteerin jälkeläisten vapautuessa. Luokassa II kroonista infektiota aiheuttavat faagit (filamenttinen rakenne), joilla ei ole profaagivaihetta eli ne eivät ole temperaatteja. Luokassa III lysogeenista kiertoa noudattavat temperaatit faagit, jotka hajottavat isäntäbakteerin jälkeläisten vapautuessa. Luokassa IV kroonista infektiota aiheuttavat faagit (filamenttinen rakenne), joilla lysogeeninen elämäntyyppi on mahdollinen. Teksti ja kuva ovat peräisin lähteestä (Hobbs and Abedon, 2016).

2.5. Bakteri-isännän lyysi

Rakenteeltaan filamenttiset faagit kykenevät krooniseen infektiin, jolloin isäntä selviää infektiosta hengissä, mutta muut faagit pääsääntöisesti tappavat isännän. Tämä tapahtuu kun lyyttinen replikaatiosykli on vaiheessa, jossa isäntäbakteerissa on tuotettu mahdollisimman paljon uusia faageja. Isännän lyyssiin avulla ne voidaan vapauttaa ympäristöön. Lyyssi vaatii mureiinista eli peptidoglykaanista muodostuvan bakteerin soluseinän hajotusta. Tämä saadaan aikaan yleensä endolysiinien ja holiinien avulla. Endolysiinit ovat muralyyttisiä entsyymejä, jotka hajottavat peptidoglykaania, kun taas holiinit säätelevät tätä hajotusprosessia. Holiini-endolysiinipohjainen järjestelmä on lähinnä dsDNA bakteriofagien tapa hajottaa isäntäsolu. ssDNA ja RNA-faageilla ei ole endolysiinin kaltaista muralyyttistä entsyymia; niillä on vain

yksi lyyttistä proteiinia koodaava geeni. Esimerkiksi Φ X174, MS2 ja QB –faageista on kustakin löytynyt erilainen lyyttistä entsyymiä koodaava geeni (Young et al., 2000). Φ X174-faagin on tiedetty hajottavan isäntäsolun E-geenin avulla (Witte and Lubitz, 1989). E-geenin koodaama lyyttinen entsyymi, E-proteiini, hajottaa isännän muodostamalla reiän sen kalvorakenteisiin. Se jättää isäntäsolusta jäljelle ”aaveen”. Bakteriaaave (BG) on kuollut bakteerisolun ilman sytoplasmaa, mutta joka on säilyttänyt muotonsa ja pintarakenteensa (Langemann et al., 2010).

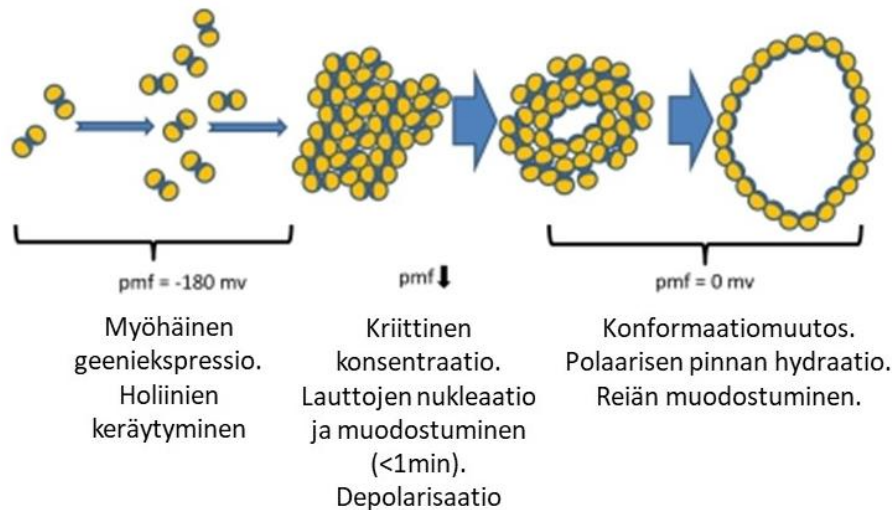
2.5.1. Holiinit

Holiinit säätelevät ja ajastavat isäntäbakteerin lyysiä. Niillä on kaksi pääasiallista tehtävää: ne tekevät aukon bakteerin sisäkalvoon, jotta endolysiinit pääsevät käsiksi mureiiniin ja ne ajastavat lyysin niin, että tarpeeksi uusia viruksia on valmiina kun bakteeri hajoaa. Holiinit ovat pieniä kalvoproteiineja, jotka toimivat osana proteiinikompleksia. Sopiva aika aloittaa lyysi on määrätty holiinien geneissä, ja ne joko avaavat reitin aktiivisille endolysiineille tai niiden toiminta voi myös aktivoida endolysiinin, joka on jo inaktiivisena periplasmisessa tilassa (Young et al., 2000).

Yleensä antiholiinimolekyyli pitää holiinin epäaktiivisessa muodossa, jossa sitä kasaantuu bakteerin sisäkalvoon. Kun holiinin määrä on tarpeeksi suuri, se ensin homodimerisoituu ja sitten kerääntyy nopeasti aggregaateista muodostuviksi liikkumattomiksi lautoiksi, jotka syrjäyttävät kalvolipidit. Lauttarakenne estää protonivoiman (PMF) normaalin toiminnan, mikä johtaa kalvon paikalliseen depolarisaatioon. Tämä puolestaan muuttaa holiinien ja antiholiinien rakennetta. Protonivoiman katoaminen johtaa holiinien kalvonsisäisten domeinien osissa muutoksiin, ja antiholiinit muuttuvat aktiivisiksi holiineiksi. Holiinien jotkin, vähemmän hydrofobiset, osat hydratoituvat ja näin ollen pystyvät asettumaan muodostuvan reiän sisäpinnalle kosketuksiin soluliman kanssa, kun taas hydrofobiset osat jäävät kalvon sisään. Näin endolysiinit pääsevät virtaamaan aukosta periplasmiseen tilaan. Holiinien tekemän aukon muodostuminen on esitetty kuvassa 3. Kalvon reikiintyminen ja protonivoiman katoaminen aiheuttaa bakteerisolun energiatuotannon loppumisen ja solun kuoleman (White et al., 2011).

Pinholiineiksi kutsutaan holiineita, jotka toiminnallaan aktivoivat endolysiineitä, jotka on jo valmiiksi kuljetettu epäaktiivisessa muodossaan periplasmiseen tilaan. Nämä ns. SAR-endolysiinit aktivoituvat, kun holiinit aiheuttavat protonivoiman häviämisen. Pinholiinit, toisin kuin ns. kanoniset holiinit, muodostavat aukon vain yhden kalvonsisäisen domeinin avulla, ja niiden muodostama aukko on huomattavasti pienempi. Tämä johtuu siitä, että

pinholiiniin tarvitsee vain mahdollistaa ionien kulku, ei kokonaisten proteiinien (Pang et al., 2009).



Kuva 3. Kanonisten holiinien toimintamalli. Kuvassa holiinien toiminta ja protonivoiman (PMF) muutokset. Oranssit pallot kuvaavat holiineja, ja niiden hydrofilisempi pinta on merkitty sinisellä. Holiinit kerääntyvät, kunnes ne saavuttavat kriittisen konsentraation. Silloin ne aggregoituvat lautoiksi, mikä aiheuttaa paikallista kalvon depolarisaatiota. Tämä saa aikaan konformaatiomuutoksia, ja holiinien hydrofobisemmat osat asettuvat kohti muodostuvan aukon sisäpintaa ja hydratoituvat. Teksti ja kuva muokattu lähteestä (White et al., 2011).

2.5.2. Endolysiinit

Endolysiinit ovat muralyyttisiä entsyymejä, joita bakteriofagit tuottavat isäntäsolun peptidoglykaanikerroksen hajottamiseksi. Mureiini eli peptidoglykaani muodostaa bakteerin soluseinän, joka sijaitsee bakteerin solukalvon päällä. Lähes jokaisella bakteerilla on peptidoglykaanikerros. Mureiini mm. suojaa bakteeria, ylläpitää osmoottista painetta ja osallistuu solun jakautumiseen. Sen tuhoutuminen on tärkeää, jotta isäntäsolu hajoaa. Mureiinin perusrakenteessa peptidit yhdistävät lineaarisia glykaaniketjuja. Glykaaniketjussa vuorottelevat N-asetyyliglukosamiini- ja N-asetyylimuramihappotähteet. Mureiinin hienorakenteessa on eroja eri bakteerilajien välillä, ja sillä on vaikutusta mureiinin ominaisuuksiin kuten paksuuteen ja läpäisevyyteen. Endolysiineitä voidaankin luokitella sen mukaan, mihin sidokseen ne vaikuttavat, ja ainakin neljä eri endolysiinityyppiä tunnetaan. Ne ovat lysotsyymit, transglykosidaasit, amidaasit ja endopeptidaasit. Lysotsyymit ja transglykosidaasit muokkaavat ja katkovat glykosididoksia glykaaniketjun sokereiden välillä, amidaasit katkovat peptidien amididoksia ja endopeptidaasit katkovat peptididoksia (Oliveira et al., 2013; Vollmer et al., 2008).

Kanonisessa holiini-endolysiinijärjestelmässä endolysiinit kerääntyvät bakteerin solulimaan, kunnes holiinit avaavat niille reitin ja ne pääsevät kosketuksiin mureiinin kanssa. SAR-endolysiinit eli signal-arrest-release (SAR) signaalisekvenssillä varustetut endolysiinit taas kuljetetaan epäaktiivisessa muodossa solukalvon läpi. Ne eivät kuitenkaan hajota peptidoglykaania, sillä SAR-sekvenssi pitää ne ankkuroituna solukalvoon, kunnes pinholiinit depolarisoivat kalvon ja vaputtavat endolysiinit. Uskotaan, että tämä yksinkertaisempi pinholiini-SAR endolysiini –järjestelmä on evoluutiossa ajallisesti edeltänyt edistyneempää kanonista holiini-endolysiinijärjestelmää. Yleensäkin, järjestelmä, jossa on sekä holiini että lyttinen entsyymi on virukselle edullinen, sillä se mahdollistaa soluseinän nopean hajottamisen (Oliveira et al., 2013).

2.5.3. Spaniinit

Viime vuosina on ilmennyt, että holiinin ja endolysiinin lisäksi gram-negatiivisen isäntäbakteerin lyysiin tarvitaan yleensä vielä kolmas proteiini, spaniini (Kongari et al., 2018). Gram-negatiivisella bakteerilla on toinen solukalvo mureinikerroksen päällä ja spaniinit rikkovat sen isäntäsolun lyysin yhteydessä. Spaniinien toiminnan merkityksellisyyttä ei aluksi huomattu, sillä holiini- ja endolysiinikäsitellyt solut hajosivat ravistelun seurauksena laboratoriossa, vaikka normaalisti spaniinin puutteessa ehjä, vaikkakin heikko, ulkokalvo pitää λ -faagin kasassa (Berry et al., 2012). Spaniinit ovat siis lyysin kolmas askel holiinien ja endolysiinien toiminnan jälkeen. Mallina spaniinien toiminnalle on käytetty λ -faagin (lambda-faagi) Rz ja Rz1 geenejä, jotka koodaavat i-spaniinia ja o-spaniinia (Kongari et al., 2018). Muut lyysiin vaikuttavat geenit eli holiinia ja antiholiinia koodaava S-geeni ja endolysiiniä koodavan R-geeni ovat spaniinigeenien naapureita. Rz ja Rz1 ovat kuitenkin siitä uniikkeja, että λ -faagissa Rz1:n lukukehys on Rz lukukehyyksen sisällä (Berry et al., 2008; Kongari et al., 2018).

I-spaniinit ovat kalvoproteiineja, jotka sijoittuvat isäntäsolun sisemmän kalvon sisään, ja o-spaniinit ovat lipoproteiineja, jotka sijoittuvat ulkokalvolle. I- ja o-spaniinit muodostavat kompleksirakenteen, ikään kuin sillan, joka yhdistää sisä- ja ulkokalvon läpi peptidoglykaanirakenteiden (Kongari et al., 2018). Joillakin faageilla on vain yksi spaniinimolekyyli: u-spaniini, joka on kiinni toisesta päästä sisäkalvossa ja toisesta ulkokalvossa, muodostaen siis sillan yksinään (Kongari et al., 2018). Peptidoglykaanin hajoaminen johtaa spaniinien liikeeseen ja konformaatiomuutoksiin. Spaniinit tuovat kalvot lähelle toisiaan ja ulkokalvo sulautuu sisäkalvoon, vapauttaen uudet bakteriofagit ympäristöön (Rajaure et al., 2015). Ulkokalvo ei siis varsinaisesti hajoa, vaan muuttaa muotoaan. Spaniinit ovat hyvin vaihteleva joukko erilaisia proteiineja, ja niiden avulla voidaan saada tietoa

kalvofuusioprosessista tulevaisuudessa (Rajaure et al., 2015). Spaniineja ei tosin ole löydetty aivan kaikilta faageilta, minkä vuoksi on mahdollista, että on olemassa jokin toinen, toistaiseksi vielä tuntematon tapa, jolla faagit hävittävät bakteerin ulkokalvon (Kongari et al., 2018).

3. Bakteriofagiterapia

Bakteriofagiterapialla eli faagiterapialla tarkoitetaan bakteriofagien käyttöä lääkkeenä bakteerinfektiota vastaan. Faagien on ajateltu olevan mahdollinen korvike antibiooteille tulevaisuudessa. Faagiterapiasta onkin jo saatu lupaavia tuloksia, vaikkakin lisätutkimusta ja menetelmien standardointia tarvitaan vielä ennen kuin faageja voidaan ottaa yleiseen käyttöön. Bakteriofagiterapialla on antibiootteihin nähden monia etuja. Bakteriofagien kyky hävittää myös antibioottiresistenttejä bakteereja on yksi suurimmista syistä, miksi kiinnostus niitä kohtaan kasvaa jatkuvasti. Bakteriofagit, kuten virukset yleensäkin, ovat hyvin spesifisiä, eli ne hävittävät vain kohteena olevan bakteerin ja jättävät mm. hyödylliset suolistobakteerit rauhaan. Bakteriofagit kykenevät kulkemaan veri-aivoesteen läpi ja siten vaikuttamaan myös keskushermostossa, ja ne sopivat myös antibiooteille allergisille potilaille. Faagien on havaittu hävittävän myös bakteerien muodostamia biofilmi-rakenteita. Lisäksi faagiterapia ja bakteriofagien tuotto voi olla hinnaltaan edullisempaa kuin uusien antibioottien kehitys, ja koska faagit lisääntyvät faagi-infektion edetessä, jo yksi annos voisi potentiaalisesti riittää infektion hävittämiseen. Faagien ei ole havaittu aiheuttavan vakavia sivuvaikutuksia, rajuja immuunijärjestelmän reaktioita tai sekundaarisia infektiota, mutta näitä turvallisuusnäkökohtia ei voi täysin vahvistaa, ennen kuin tutkimusta on tehty enemmän (Romero-Calle et al., 2019).

Tyypillisesti faagiterapiassa on käytetty vain täysin virulenteja eli vain lyyttistä replikaatiosykliä noudattavia faageja. Temperaatteja faageja on pidetty huonoina valintoina, sillä paitsi että ne eivät välttämättä hajota isäntäsolua heti, ne kykenevät siirtämään geenejä isännälle. Ne saattaisivat siis siirtää bakteereille geenejä, jotka lisäävät bakteerin infektoimiskykyä ja siten haitallisuutta. Yhden tilanteeseen sopivan faagin sijaan on kokeiltu myös ns. faagicockaileja, joissa on useita erilaisia faageja, mikä mahdollistaa laajemman joukon mahdollisia isäntäbakteereja. On myös kehitetty sellaisia menetelmiä, joissa potilaalle ei anneta kokonaista faagia, vain pelkkiä lyyttisiä entsyymejä, lähinnä endolysiinia. Faageja voidaan myös keinotekoisesti muokata paremmin terapiaan sopiviksi tai käyttää yhdessä antibioottien kanssa (Viertel et al., 2014).

3.1. Antibioottiresistentit bakteerit

Antibioottiresistentit bakteerit, joita joskus kutsutaan myös sairaalabakteereiksi, ovat bakteereita, jotka ovat kehittäneet vastustuskyvyn yhdelle tai useammalle antibioottityypille. MDR (multi-drug resistant) bakteerit ovat vastuskykyisiä monille antibiooteille, ja aiheuttavat siksi kuolemia sekä pitkiä sairaalajaksoja. ESKAPE lyhenteellä viitataan kuuteen merkittävään bakteerikantaan, joissa esiintyy resistenssiä monille lääkaineille: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Enterobacter*. MDR:t ovat lisääntyneet paitsi sen vuoksi, että resistenssi-geeni on bakteerien evoluutiossa kilpailuetu, mutta myös antibioottien tuhlailevan ja turhan käytön vuoksi. Uusia antibiootteja ei myöskään kehitellä kovin innokkaasti taloudellisten syiden vuoksi. Tämä on johtanut tilanteeseen, jossa yritetään löytää perinteisten antibioottien käytölle muita vaihtoehtoja, kuten faagiterapia (Wittebole et al., 2014).

Bakteerin rakenne tai toiminta voi olla sellainen, että jokin tietty antibiootti ei pysty vaikuttamaan siihen. Tällöin puhutaan luontaisesta antibioottiresistanssista (Blair et al., 2015). Esimerkiksi jotkin antibiootit läpäisevät heikommin gram-negatiivisen bakteerin ulomman solukalvon, antaen gram-negatiivisille bakteereille luontaisen immuniteetin näitä antibiootteja vastaan (Kojima and Nikaido, 2013; Vargiu and Nikaido, 2012). Luontaisen resistenssin lisäksi bakteeri voi myös mutatoitua ja siten saada itsellensä resistenssin, tai se voi saada sen muilta bakteereilta horisontaalisen geeninsiirron avulla. Tätä kutsutaan hankituksi antibioottiresistanssiksi ja sitä on kolmea tyyppiä: antibioottikonsentraation laskeminen, kohdemolekyylin muokkaus ja antibiootin muokkaus (Blair et al., 2015). Yksi antibioottiresistenssin muoto on pumppu, joka poistaa antibiootteja bakteerisolusta, kuten LmrS-pumppu *S.aureus*-bakteereissa (Floyd et al., 2010). *S. aureus*- ja *E.coli*-bakteereissa on taas havaittu metyyli transferaasi, joka metyloi ribosomaalista RNA:ta niin, että se on suojassa antibiooteilta, jotka normaalisti inhiboivat bakteerin proteiinisynteesiä (Long et al., 2006). Joskus taas resistenssi mahdollistuu, kun antibiootit hajotetaan entsyymien avulla, joista yleisenä esimerkkinä ovat mm. β -laktameja hajottavat *E.coli*-bakteerien CTX-M-tyyppiset beetalaktamaasit (Dhanji et al., 2011).

3.2. Faagien valmistelu terapiaa varten

Jotta faagiterapia voidaan toteuttaa, faagi(t) täytyy löytää, eristää ja puhdistaa ja säilöä asianmukaisesti. Sopivien faagien valinta on ensisijaisen tärkeää; faagit eivät saa aiheuttaa muita vaikutuksia kuin kohdebakteerien hävittämisen. Siksi valitut faagit ovatkin yleensä

tiukasti lyyttisiä. Ne täytyy myös testata mahdollisen pseudo-lysogenian ja haitallisten geenituotteiden varalta. Jos käytetään useita faageja eli faagicoocktailia, täytyy myös varmistaa faagien yhteensopivuus. Tutkimusta ja faagien käyttöä vaikeuttaa se, että läheskään kaikkia faagien tuottamia proteiineja ei tunneta kunnolla. Kun tietämys faageista ja proteiineista karttuu, voidaan siirtyä ns. ensimmäisen sukupolven faageista, jotka on saatu satunnaisen rikastamisen ja karakterisoinnin seurauksena, toisen sukupolven faagituotteisiin, jotka on tehty pelkästään jo ennestään tunnetuista faageista. Tiedon lisääntyessä turvallisuushuolet vähenevät (Krylov et al., 2015).

Faagien valmisteluun käytettävissä menetelmissä on paljon vaihtelua. Faageja löytyy sieltä, missä isäntäbakteerijakin elää. Yksinkertainen tapa eristää faagit luonnosta kerätyistä vesipohjaisesta näytteestä on sentrifugointi ja steriili suodatus. Faagien määrää kasvatetaan viljelemällä niitä isäntäbakteereissa. Kun faagit ovat kasvaneet, seuraa karakterisointi, jossa määritellään terapiaan sopivat faagit sen mukaan, kuinka tehokkaasti ne toimivat haluttua bakteeria vastaa, millainen niiden replikaatiosykli on ja sisältävätkö ne haitallisia geenejä. Puhdistus tulee tehdä huolellisesti, jos faageja halutaan käyttää terapiassa. Endotoksiineista (lipopolysakkaridit) eroon pääsy on ensiarvoisen tärkeää, sillä ne aiheuttavat tulehdusta elimistössä. Faagien puhdistus aloitetaan solujen lyysillä, joka on hyvä tehdä lysosyyymilla tai endolysiineillä, sillä ihmisille tulevaan tuotteeseen ei kannata käyttää orgaanisia liuottimia. Seuraava vaihe puhdistuksessa on matalan nopeuden sentrifugointi, jossa faagit jäävät supernatanttiin. Polyetyleeniglykolia (PEG) käytetään yleisesti faagien saostamiseen, ja ultrasentrifugoidessa gradientteja muodostavan CsCl:n avulla faagit saadaan erilleen muusta lysaatista. Ultrasentrifugointia voidaan yrittää välttää mm. dialyysin tai kromatografian avulla. Vaihtoehtona saostamiselle taas voi olla flokkulaatio, jossa faagit aggregoituvat yhteen, ja ne voidaan kerätä suodattamalla, sedimentoimalla tai matalan nopeuden sentrifugoinnilla. Perinteinen faagien puhdistusmenetelmä on kuitenkin hidaskäyttöinen, eikä se sovi kuin vain pienelle, tutkimuksissa käytettävälle faagimäärälle. Tarvitaan uusia menetelmiä, jos halutaan tuottaa suuria määriä faageja nopeasti (Gill and Hyman, 2010).

3.3. Genomin karakterisointi

Jotta faagien turvallisuudesta voidaan varmistua, faagit tulee tunnistaa ja karakterisoida. Faagiterapiaa varten genomin täytyy olla 100 % sekvensoitu ja kaikkien avoimien lukukehysten (ORF) selvitetty. Ennen karakterisointia faagien pitää olla tarkasti puhdistettu, jotta tulokset ovat luotettavia. Faagien genomeista etsitään myrkköjä, antibioottiresistanssia tai integraasia koodaavia geenejä, ja jos niitä löydetään, faagia ei käytetä faagiterapiassa. Integraasin

löytyminen viittaa yleensä siihen, että faagi on temperaatti. Philipson *et al.* julkaisivat vuonna 2018 artikkelin, jossa nimettiin viisi vaihetta faagien karakterisointiin: korkealaatuinen sekvensointi, ORF:ien löytäminen, tunnettujen geenien identifiointi, haitallisten geenimarkkerien identifiointi, varmistaminen, että sekvenssi edustaa kohdepopulaatiota ja mahdollisten kontaminaatioiden analyysi (Philipson *et al.*, 2018).

3.4.Erilaiset metodit faagien annosteluun

Faageja tarvitaan yleensä vähemmän per bakteeri kuin antibiootteja, sillä yksi faagi riittää yhden isännän tuhoamiseen, vaikka kerran infektoinut faagi ei enää voikaan tuhota muita bakteereja. Useampi faagi voi kuitenkin yhtäaikaaisesti infektoida yhden isännän, minkä vuoksi usein lasketaan MOI-arvo, joka kertoo, kuinka monta faagia infektoi yhden isäntäsolu. MOI_{input} -arvo taas kertoo, montako faagia terapiassa annosteltiin per isäntäsolu (Romero-Calle *et al.*, 2019).

Faagien annostelun voi olla ns. aktiivista tai passiivista. Aktiivisessa menetelmässä faageja annetaan aluksi pieni määrä, ja niiden määrä kasvaa sitä mukaa kun faagit lisääntyvät bakteeri-isännissä. Passiivisessa menetelmässä annetaan heti niin suuri määrä faageja, että ne riittävät itsenään tuhoamaan bakteerisolut. Aktiivisen menetelmän etuna pidetään sitä, että siinä on kyse ikään kuin lääkkeen jatkuvasta, automaattisesta annostelusta, joka tapahtuu suoraan infektioalueella. Täten kehon luonnollista toimintaa ja homeostaasia ei häiritä yhtä merkittävästi. Faagien annosteluun elimistöön voidaan tehdä monella tavalla, ja se riippuu yleensä bakteeri-infektion luonteesta ja sijainnista. Taulukossa I esitellään erilaisia tapoja annostella faageja (Romero-Calle *et al.*, 2019).

Taulukko I. Bakteriofagiterapiassa käytettäviä tapoja annostella faageja potilaalle, sekä kunkin menetelmän etuja, haittoja ja suositeltavia toimenpiteitä ongelmien välttämiseksi. Taulukko on muokattu lähteestä Romero-Calle *et al.* (2019).

Annostelureitti	Edut	Haitat	Haittojen minimointi
Intraperitoneaalinen (vatsaonteloon injektio)	Mahdollistaa suuremmat annokset. Diffuusio muihin kehon osiin.	Diffuusio ihmisillä saattaa olla vähäisempää kuin koe-eläimillä, joilla suuri osa tutkimuksesta on tehty	Annostelu useampaan kohtaan.
Intramuskulaarinen (lihaksensisäinen injektio)	Faagit suoraan infektioalueelle.	Mahdollisesti hitaampi diffuusio. Pienemmät annokset.	Monta annosta.
Subkutaaninen (ihonalainen injektio)	Paikallinen sekä systeeminen diffuusio.	Pienemmät annokset.	Monta annosta.
Intravenoosinen (suonensisäinen injektio)	Nopea koko kehon diffuusio.	Immuunijärjestelmä hävittää faagit nopeasti.	Heikompaa immuunivastetta aiheuttavien faagien valinta
Topikaalinen	Suuri annos suoraan infektioalueelle.	Veteen suspensoitujen faagien valuminen pois kohdealueelta	Faagit geeleihin tai siteisiin.
Suppo	Hidas ja tasainen annostelu pitkän ajan kuluessa.	Rajoitetut käyttömahdollisuudet ja -alue. Riskinä väärä annostelumäärä. Vaikea valmistaa.	Vaaditaan huolellista tutustumista faagien kinetiikkaan.
Oraalinen (suun kautta)	Helppo antaa potilaalle. Mahdollistaa suuret annokset.	Vatsahapot vähentävät faagien määrää. Faagien ei-spesifinen sitoutuminen vatsan sisältöön ja mikrobistoon.	Kalsiumkarbonaatin lisäys pH:n puskuroimiseksi. Faagien mikrokapsulointi.
Aerosoli	Suhteellisen helppo annostelu. Voi saavuttaa myös huonosti läpäistävät, infektoituneet keuhkojen osat.	Paljon faageja hukkaan. Lima ja biofilmit voivat estää faagien kuljetusta.	Depolymeraasien käyttö liman vähentämiseksi.

3.5. Endolysiinien käyttö antibakteriaalisina agentteina

Joissain tutkimuslinjauksissa kokonaisen bakteriofagin käyttö terapiassa on hylätty, ja sen sijaan huomio on kiinnitetty isäntäbakteeria hajottaviin entsyymeihin, lähinnä endolysiineihin, sekä joskus myös bakteerin sisäkalvoa hajottaviin holiineihin. Niiden toimintamekanismeja on käsitelty kohdissa 2.5.1. ja 2.5.2. Pelkkiä lyyttisiä entsyymejä käyttämällä voidaan välttää joitain faagiterapiaan liittyviä ongelmia, kuten yksittäisen faagin suppeaa isäntäkirjoa (spesifisyys) ja faagiresistenssin kehittymistä. Entsyymit toimivat antibioottimaisesti lääkeaineina, koska niiltä puuttuu faagin kyky jälkeläisten tuottamiseen. Lu *et al.* julkaisivat vuonna 2020 tutkimuksen, jossa phiSASD1-faagin endolysiiniä (LytSD) ja holiinia (HolSD) koodaavat geenit identifioitiin, kloonattiin ja proteiineja tuotettiin antibakteeristen ominaisuuksien testausta varten. (Lu et al., 2020) LytSD:n avulla pystyttiin hävittämään 7/18 testatuista bakteerikannoista ja HolSD hävitti yhden bakteerikannoista ja esti monen muun kasvua merkittävästi.

Endolysiinien kohdebakteerit ovat gram-positiivisia, sillä ulkoinen solukalvo suojaa gram-negatiivisia bakteereja niiden vaikutukselta. Endolysiinien etuna moniin antibiootteihin on kuitenkin se, että niiden ei tarvitse päästä bakteerisolun sisään, vaan riittää, että ne pääsevät käsiksi soluseinään. Tällöin bakteerin on vaikeampaa kehittää vastuskykyä sen toiminnalle. Gilmer *et al.* esittelivät vuonna 2013 *Streptococcus suis* –bakteereja infektoivasta faagista eristetyn PlySs2-endolysiinin, jolla on poikkeuksellisen laaja aktiivisuus eri bakteerilajeja vastaan (Gilmer et al., 2013). Se kykeni hajottamaan sekä *Bacillales* että *Lactobacillales* luokkiin kuuluvia bakteereita. Nämä bakteeriryhmät ovat peptidoglykaanirakenteeltaan melko samankaltaisia, mikä selittää endolysiinin laajaa tehoa. Poikkeuksellista oli, että PlySs2 oli itse asiassa tehokkaampi *S.aureus* bakteereita vastaan kuin faagin alkuperäisistä *S.suis* bakteereja. PlySs2 oli tehokas myös antibioottiresistenttejä bakteerikantoja, kuten pahamaineista metisilliinille vastustuskykyistä *Staphylococcus aureus*:ta (MRSA), vastaan. Se toimi hyvin jopa sellaista infektiota vastaan, jossa osallisena oli MRSA:n lisäksi *Streptococcus pyogenes* –bakteereja (Gilmer et al., 2013).

3.6. Muokatut bakteriofagit

Aiemmin mainittujen ensimmäisen ja toisen sukupolven faagiterapian jälkeen aletaan todennäköisesti siirtyä ns. kolmannen sukupolven faagiterapiaan. Sillä tarkoitetaan sellaisten faagien käyttöä, joista on esimerkiksi keinotekoisesti poistettu haitallinen geeni (Krylov et al., 2015). Tällainen genomien muokkaus mahdollistuu mm. λ -faagin Red-rekombinaatiosysteemin avulla (Caldwell and Bell, 2019). Se koostuu 5'-3' eksonukleasista ja liittäjäproteiinista, sekä avustavasta Gam-proteiinista joka estää isäntäsolua hajottamasta faagin kromosomia. Red-rekombinaatio on ideaali faagien geenimuokkausta varten, koska se kykenee tehokkaaseen toimintaan myös hyvin lyhyiden homologien kanssa. Tämä mahdollistaa synteettisten PCR primereiden käytön (Caldwell and Bell, 2019; Krylov et al., 2015).

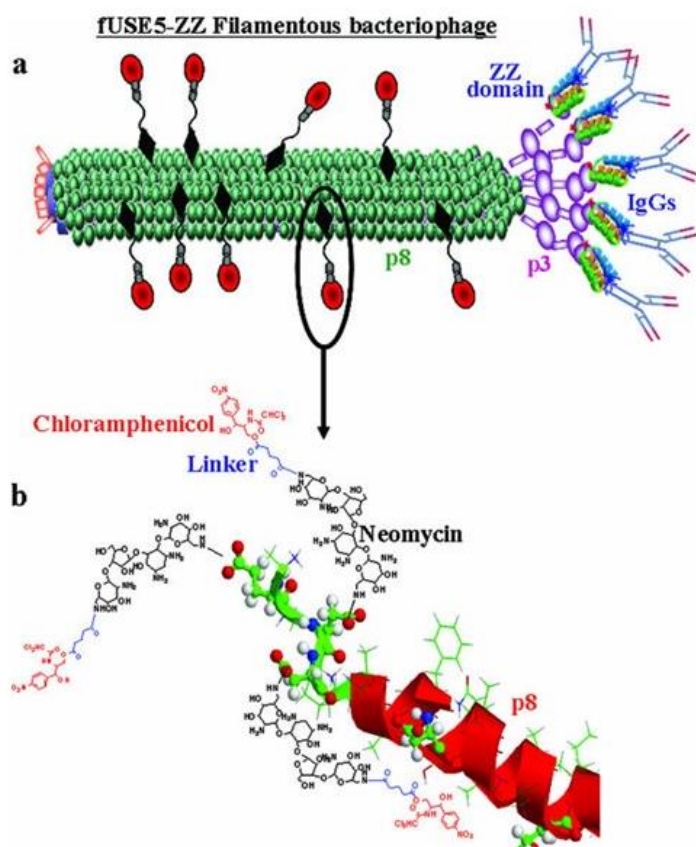
Haitallisen geenin poistamisen tai hiljentämisen lisäksi on mahdollista parannella faagin ominaisuuksia lisäämällä tekijä, joka parantaa faagiterapian tehoa. Tästä esimerkkinä toimii faagin PEGylaatio (Kim, K. et al., 2008). PEGylaatio on prosessi, jossa proteiinien aminohappoketjujen aminoryhmiin liitetään kovalenttisesti PEG-molekyylejä. PEG-ryhmien tiedetään parantavan proteiinien stabiilisuutta ja vähentävän niiden aiheuttamaa immuunivastetta. PEG-ryhmä on kemiallisesti inerti. Bakteriofagivirionien PEGylaatiolla on onnistuttu vähentämään tyypin 1 T-auttajasolujen (Th1) aiheuttamaa immuunivastetta (sytokiinit IFN- γ ja IL-6). PEGylaatio on lisännyt aikaa, jonka faagit ovat pysyneet verenkierrossa ennen kuin immuunijärjestelmä hajottaa ne. PEGylaatio voi siis parantaa faagiterapian tehoa. Haittapuolena on se, että PEGylaatio myös heikentää faagin infektoimiskykyä, mutta tähän voidaan vaikuttaa muuttamalla käytetyn PEG:n konsentraatiota (Kim, K. et al., 2008). Faagien selviytymiskykyä verenkierrossa on paranneltu myös mm. korvaamalla aminohappo faagin kapsidiproteiineissa. γ -faagin kapsidin E-proteiinin glutamiinihappo158 korvattiin lysiinillä (Vitiello et al., 2005). Tämä on nimetty argo1 mutaatioksi. Argo1 mutaatio yksinään johti faagin yli tuhatkertaisesti parempaan selviytymiskykyyn verenkierrossa (Vitiello et al., 2005).

Muokkauksilla on pyritty myös lisäämään faagin mahdollisten isäntäbakteerien määrää. Chen *et al.* julkaisussa vuodelta 2017 T4-faagin kaltaisen WG01-faagin genomia muokattiin niin, että isäntäsolun tunnustusalueelle sijoitettiin QL01-faagin käyttämä isännän tunnustusgeeni (Chen et al., 2017). Tämä johti siihen, että muokattu WG01 pystyi nyt infektoimaan alkuperäisen isäntänsä lisäksi myös QL01:n isännän. Tästä uudesta kimeeristä faagista syntyi mutatoitumalla vielä uusia faageja, joista kaikkein laajimman isäntämäärän

omaavalla oli WG01:n ja QL01:n alkuperäisten isäntien lisäksi kahdeksan täysin uutta mahdollista isäntää (Chen et al., 2017).

3.6.1. Bakteriofagit lääkeaineiden kantajina

Bakteriofageja on myös pidetty mahdollisena kuljettajina lääkeaineille, jotka eivät ole tarpeeksi spesifisiä jotta niitä voitaisiin annostella suoraan elimistöön. Esimerkiksi kloramfenikoli-antibiootti, jonka käyttöä vältetään sen myrkyllisyyden takia, voitaisiin kuljettaa suoraan kohdebakteereihin faagin avulla (Yacoby et al., 2007). Filamenttisia bakteriofageja on pidetty hyvin sopivina tähän tarkoitukseen. Kloramfenikolia liitettiin filamenttisen faagin vaipan proteiineihin neomysiinin avulla. Hydrofobinen neomysiinilinkki faagin ja kloramfenikolin välillä lisää liukoisuutta, ja auttaa faagia sitomaan enemmän kloramfenikolia. Kuvassa 4 esitetään filamenttinen faagi ja siihen kiinnitetyt lääkeaineet (Yacoby et al., 2007).



Kuva 4. a) Muokatun filamenttisen fUSE5-ZZ-bakteriofagin pintarakenne. Violetilla on merkitty p3-proteiinit, joissa on kiinni ZZ-domaini, jonka tarkoitus on sitoa IgG:tä. IgG:n on tarkoitus kohdentaa faagi infektiotalueelle. b) Punainen kierre kuvaa osaa p8-pintaproteiinin rakenteesta. Siinä on kiinni neomysiini (mustalla värillä), jossa on välittäjäosan kautta kiinni kloramfenikoli (punaisella värillä). Teksti ja kuva ovat peräisin lähteestä (Yacoby et al., 2007).

4. Bakteriofagiterapian haasteet

Faagiterapiaan liittyy monia haasteita, joita on jo sivuttu aiemmissä kappaleissa. Terapian teknisessä toteutuksessa, kuten faagien tuotossa ja annostelussa, on paljon vaihtelua. Sopivan faagin valinta on monimutkainen ja tarkkuutta vaativa prosessi. Infektiota aiheuttava bakteeri on tunnettava hyvin, eikä faagi saa sisältää haitallisia geenejä tai kyetä horisontaaliseen geeninsiirtoon. Lisäksi immuunijärjestelmä haittaa faagiterapian toimintaa, ja bakteereilla on omia puolustusmekanismeja faageja vastaan. Spesifisyys, mikä on yksi faagiterapian eduista, on myös yksi suurimmista haasteista, sillä yksittäisen faagin mahdollisten isäntien joukko on yleensä hyvin rajallinen. Tätä ongelmaa on pyritty ratkaisemaan mm. geeninmuokkauksella (ks. kohta 3.6.), käyttämällä pelkkiä lyyttisiä entsyymejä (ks. kohta 3.5.) tai useita erilaisia faageja sisältävien faagicoctailien avulla. (Romero-Calle et al., 2019; Wittebole et al., 2014)

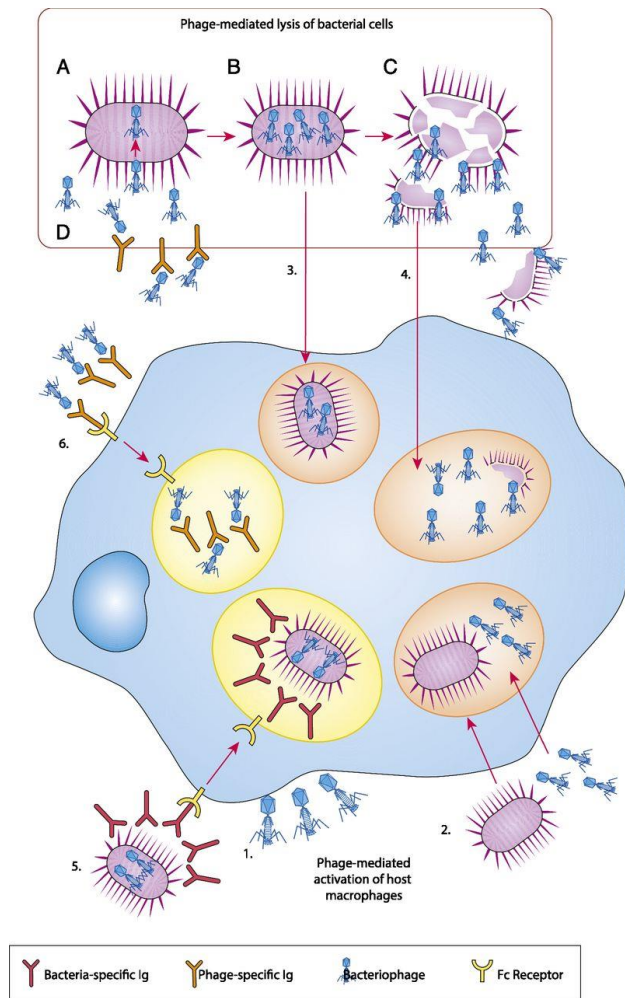
4.1. Bakteriofagien aiheuttama immuunivaste

Faagiterapian ei ole todettu aiheuttavan terveydelle vaarallista immuunijärjestelmän ylireagointia, mutta immuunijärjestelmä häiritsee faagiterapiaa poistamalla faageja elimistöstä. Sekä luontainen että hankittu (adaptiivinen) immuniteetti toimivat faageja vastaan. Immuunivasteen asettamaan haasteeseen on pyritty vastaan mm. valitsemaan faageja, joiden genomista ei löydy vahvaa immuunivastetta aiheuttavia geenejä sekä tekemällä faagin rakenteeseen muokkauksia, jotka vähentävät faagin immunogeenisyyttä (Romero-Calle et al., 2019).

Faagit eivät ole elimistölle tuntemattomia partikkeleja. Faageja esiintyy luonnostaan niissä elimistön osissa, jotka eivät ole steriilejä, ja joissa faagien isäntäbakteerit elävät – siis etenkin limakalvoilla ja ruuansulatuselimistössä. Tästä huolimatta immuunijärjestelmä hävittää faageja aktiivisesti (Krut and Bekeredjian-Ding, 2018). Uskotaan, että PAMP-molekyylejä tunnistavat pattern recognition receptor (PRR) –reseptorit ovat oleellinen osa solujen kykyä tunnistaa bakteriofageja (Roach et al., 2017). Fagosyytit kykenevät sitoutumaan faageihin, ottamaan ne sisäänsä ja hävittämään ne (Kurzępa et al., 2009). Faagien hävitys johtaa myös adaptiivisen immuniteetin aktivoitumiseen. Faagien vastaiset vasta-aineet vuorovaikuttavat ilmeisesti faagien pintaproteiinien kanssa, jotka ovat eri faageilla erilaisia. Tämä selittää sen, että jotkin faagit ovat immunogeenisempiä kuin toiset (Krut and Bekeredjian-Ding, 2018). IgG ja IgA –immunoglobuliinit voivat lisäksi hillitä faagien lisääntymistehoa (Hodyra-Stefaniak et al., 2015; Majewska et al., 2015). Kuvassa 5 on eritelty faagien

aiheuttaman immuunivasteen reittejä. Faagien ja immuunijärjestelmän yhteistoiminnasta ei tiedetä kuitenkaan vielä läheskään kaikkea (Krut and Bekeredjian-Ding, 2018).

Immuunivasteen aiheuttamisen lisäksi bakteriofagit voivat myös hillitä sitä. Vuoden 2017 tutkimuksessa havaittiin, että faageilla on sekä tulehdusta stimuloivia että tukahduttavia ominaisuuksia perifeerisen verenkierron mononukleaarisisissa soluissa (PBMC) (Belleghem et al., 2017). Tulehdusta lieventävä vaikutus todennäköisesti auttaa faagia selviytymään kehossa, mutta myös suojelee bakteeri-isäntiä, mikä parantaa faagien lisääntymismahdollisuuksia. Faagiterapian tehokkuuden kannalta immuunivasteen aleneminen on usein edullista, sillä terapeuttiset faagit selviytyvät elimistössä kauemmin. Tutkimuksessa vuodelta 2006 selvitettiin, että faagit aiheuttavat vain vähäistä reaktiivisten happilajien (ROS) vapautusta immuunisoluista, ja joissain olosuhteissa ne voivat jopa vähentää bakteerien aiheuttamaa ROS:n vapautusta (Przerwa et al., 2006). Neutrofiilit ja monosyytit käyttävät ROS-yhdisteitä bakteerien hävittämiseen, mutta liiallinen ROS aiheuttaa oksidatiivista stressiä. Tämä voi johtaa kudosaivourioihin, joten suuri ROS:n määrä ei ole faagiterapiassa tavoiteltavaa (Przerwa et al., 2006).



Kuva 5. Faagien ja isännän immuunisolujen välisiä erilaisia vuorovaikutuksia. Bakterit on kuvattu violetteina ja makrofagi sinisenä. A) Bakteriofagit infektoivat bakteerin. B) Bakteriofagit lisääntyvät bakteerissa. C) Bakterisolu hajoaa ja bakteriofagin jälkeläiset vapautuvat. D) Faageja tunnistavat immunoglobuliinit estävät faagi-infektion. 1) Makrofagi tunnistaa faagien proteiineja, mikä aktivoi makrofagin. 2) Makrofagi hävittää solunulkoiset bakteerit solunsyönnillä ja ottaa faagit sisäänsä hävitettäväksi endosytoosin avulla. 3) Makrofagi syö faagien infektoiman bakteerin, jolloin sekä bakteerin että faagien PAMP:t aktivoivat makrofagia. 4) Bakterisolun lyysin jälkeen makrofagi syö sekä bakteerien jäänteitä että faageja. Bakteerien ja faagien PAMP:t aktivoivat makrofagia. 5) Makrofagi syö opsonoidun bakteerin sen jälkeen, kun Fc-reseptorit tunnistavat bakteerille spesifiset immunoglobuliinit. 6) Kompleksi, jossa faagit ovat sitoneet immunoglobuliineja, tunnistetaan Fc-reseptorien avulla, ja makrofagi endosytosoi faagit. Kuva ja teksti peräisin lähteestä (Krut and Bekeredjian-Ding, 2018).

4.1.1. Endotoksiinit

Endotoksiineiksi kutsutaan lipopolysakkarideja (LPS), joita on gram-negatiivisten bakteerien ulkokalvolla. Ne koostuvat hydrofobisesta osasta eli lipidi A:sta, sekä hydrofiilisesta polysakkaridiosasta. Hienorakenteessa on kuitenkin eroja eri bakteerilajien välillä. LPS:n tehtävät liittyvät bakteerin infektoimiskyvyn parantamiseen. Bakteerin hajoaminen johtaa

LPS:n vapautumiseen, mikä puolestaan aktivoi immuunijärjestelmää tyypin 4 toll-like reseptorien välityksellä (Wang and Quinn, 2010).

Jos faagiterapian yhteydessä bakteerisoluja hajoaa nopeasti suuria määriä, endotoksiinit voisivat ainakin teoriassa aiheuttaa voimakkaan reaktion, joka voi pahimmillaan johtaa septiseen shokkiin (Romero-Calle et al., 2019). Endotoksiinit eivät kuitenkaan ole yksin bakteriofagiterapiaan liittyvä ongelma, sillä myös perinteisten antibioottien aiheuttama bakteerisolujen lyysi vapauttaa endotoksiineja. Vuoden 2017 tutkimuksessa vertailtiin antibioottien ja faagiterapian aiheuttamia endotoksiinimääriä (Dufour et al., 2017). Tutkimuksessa käytetyt antibiootit olivat beetalaktaameja sekä amikasiinia, ja käytetyt faagit olivat *E.coli*. bakteereja infektoivat 536_P1 ja LM33_P1. Faagien ja amikasiinin vapauttamat endotoksiinimäärät olivat samalla tasolla, kun taas beetalaktaamit vapauttivat enemmän endotoksiineja kuin faagit. Faagit olivat lisäksi nopeampia tuhoamaan bakteereja kuin beetalaktaamit. Faagien antibiootteihin verrattavissa oleva endotoksiinien vapautus on faagiterapian turvallisuuden kannalta rohkaiseva tulos (Dufour et al., 2017).

4.2. Faagiresistenssi

Bakteerit ja bakteriofagit ovat luontaisia vihollisia, mikä on vuosien varrella johtanut bakteerit kehittämään puolustuskeinoja faagi-infektiota vastaan. Bakteerien menetelmät faagien neutraloimiseen ovat usein sellaisia, jotka joko ”piilottavat” bakteerin faageilta solunulkoisen matriisin avulla, häiritsevät jotain faagien elämänsyklin vaiheista (reseptoriin sitoutuminen, adsorptio, genomien replikaatio, uusien faagien kokoaminen yms.) tai ns. abortoivat infektion tappaen samalla myös itsensä. Esimerkiksi CRISPR/Cas-järjestelmä on viime vuosina paljon huomiota saanut bakteerien faagienvastainen puolustusmenetelmä, sillä sitä voidaan hyödyntää tarkkaan geenieditointiin. CRISPR/Cas on ainoa tunnettu adaptiivinen immuunijärjestelmä bakteereissa. Bakteerin CRISPR geenialueelle sijoitetuista virus-DNA-jaksoista tuotettu CRISPR-RNA tunnistaa komplementaarisen virus-DNA:n, jonka kanssa se pariutuu. Tämän jälkeen Cas-nukleaasi pystyy katkaisemaan vieraan DNA:n. Näin viruksen DNA tuhoutuu ja virusinfektio pysähtyy (Azam and Tanji, 2019).

Kuten antibioottiresistenssinkin kohdalla, resistenssi jotain tiettyä faagia kohtaan voi olla joko luontaista tai esimerkiksi plasmidien välityksellä hankittua (Romero-Calle et al., 2019). Faagiresistenssi on kuitenkin usein vaihtokauppa: faageille vastustuskykyisen bakteerin taudinaiheuttamiskyky usein heikentyy. Esimerkiksi vuoden 2019 tutkimuksessa *Listeria monocytogenes* -bakteerilla faagiresistenssi aiheutti merkittävästi heikentynyttä infektioimiskykyä (Sumrall et al., 2019). *L. monocytogenes*:in aiheuttama solunsisäinen infektio

vaatii yleensä bakteerin pinnan glykolysoitujen molekyylien, kuten galaktosyloitujen teikkohappojen, toimintaa. Nämä glykolysoidut ryhmät ovat myös välttämättömiä bakteriofagi A500:n adsorptiolle. Kun galaktoosit poistetaan, bakteerista tulee faagille immuuni, mutta se myös menettää suuren osan taudinaiheuttamiskyvystään (Sumrall et al., 2019).

4.2.1. Virusten evoluutio mukautuu resistenssiin

Bakteriofagien ja bakteerien välinen peto-saalissuhde johtaa luonnollisesti siihen, että faagit kehittävät aina uusia tapoja kiertää bakteerien puolustusmekanismeja. Joillain faageilla, kuten esimerkiksi erällä *Streptococcus thermophilus* -bakteerien faageilla, on käytössään anti-CRISPR proteiineja eli Acr-proteiineja (Hynes et al., 2018). Niiden avulla faagit häiritsevät bakteerien CRISPR/Cas-puolustusjärjestelmää, kuten Cas9-endonukleasin toimintaa. Tutkimuksessa identifioitu AcrIIA6-proteiini oli merkittävä löydös, sillä se on peräisin virulentista faagista, kun suurin osa löydettyistä Arc:eista on peräisin temperaateista faageista (Hynes et al., 2018). *Vibrio cholerae* -kantoja infektoivalla ICP1-tyyppisellä faagilla taas on oma CRISPR/Cas-järjestelmänsä, jota se käyttää isäntäbakteerin puolustusjärjestelmän ohittamiseen (Seed et al., 2013). Faagi käyttää CRISPR/Cas-menetelmää niin, että se leikkaa 18 kb:n DNA-jakson, jota kutsutaan PLE:ksi, *V. cholerae*:n genomista. Normaalisti PLE-jakso estää ICP1-faagin toiminnan toistaiseksi tuntemattomalla mekanismilla, mutta CRISPR/Cas välitteinen PLE:n poisto mahdollistaa faagin lisääntymisen solussa (Seed et al., 2013).Fku

4.2.2. Faagien käyttö yhdessä antibioottien kanssa

Faagiterapian yhdistämisellä antibioottien käyttöön on havaittu olevan muutamia merkittäviä etuja: bakteeri-infektion hävitys tehostuu, ja bakteerien resistenssi ei aiheuta yhtä merkittävää haittaa kuin tilanteessa, jossa käytettäisiin vain jompaakumpaa menetelmää (Viertel et al., 2014). Esimerkiksi vuonna 2004 julkaistussa tutkimuksessa käytettiin sekä antibiootti enrofloksasiinia että faageja - yhdessä ja erikseen - kolibasilloosin hoitoon broilereissa (Huff et al., 2004). Kolibasilloosin kuolleisuus ilman hoitoa oli 68 %, pelkän enrofloksaanin avulla 3 % ja bakteriofagien avulla 15 %. Yksikään koe-eläin ei kuollut kolibasilloosiin, kun enrofloksaania ja bakteriofageja käytettiin yhdessä, mikä osoittaa faagien ja antibioottien yhteiskäytön tehokkuuden (Huff et al., 2004).

Erityinen faagien ja antibioottien yhteistoiminnan muoto on ns. faagi-antibiootti synergia (PAS), mikä perustuu siihen, että joissain tilanteissa matala, ei-tappava antibioottiannos lisää virulenttien faagien tuottoa bakteerisoluisissa (Viertel et al., 2014). Vuoden 2018 tutkimuksessa testattiin useampaa antibioottia PAS:n muodostumisen kannalta (Kim, M.

et al., 2018). β -laktaamit ja muutamat muut PAS:ia aiheuttavat antibiootit turvottivat ja/tai filamentoivat bakteereja. PAS johtui ilmeisesti siitä, että suurempi bakteerin pinta-ala vaati enemmän holiinien keräytymistä ennen kuin lyysi oli mahdollinen. Tällöin lyysin viivästyessä isäntäsolussa ehdittiin koota enemmän uusia faageja. Kaikki antibiootit eivät kuitenkaan toimineet tutkimuksessa; kanamysiini ja sulfametoksatsoli eivät aiheuttaneet huomattavaa PAS-vastetta (Kim, M. et al., 2018).

Vuonna 2017 valmistettiin yksilölliset bakteriofagicoctailit 68-vuotiaalle diabeetikopotilaille, joka kärsi nekrosoivasta pankreatiitista, jota pahensi MDR *Acinetobacter baumannii* -infektio (Schooley et al., 2017). Bakteeri-infektio kehitti vastustuskyvyn kahdelle ensiksi käytetylle faagicoctailille, mutta niiden jälkeen valmistettu kolmas faagicoctail oli tehokkaampi. Havaittiin, että viimeisin bakteerikanta, joka oli vastustuskykyinen kahdelle ensimmäiselle faagicoctailille, ei ollut vastustuskykyinen minosykliini-antibiootille. Minosykliini otettiin mukaan hoitokeinoksi faagiterapian ohella. Potilaan tila kohentui, hän kotiutui sairaalasta ja palasi työelämään (Schooley et al., 2017).

4.3. Sääntely ja taloudellinen kannattavuus

Taloudelliset ja sääntelyyn liittyvät syyt ovat merkittäviä esteitä faagiterapian yleistymisen tiellä. Vaikka uuden bakteriofagituotteen kehittäminen onkin yleisesti ottaen edullisempaa kuin uuden antibiootin kehittäminen, rahoitus faagiterapialle on silti usein tiukassa. Faagiterapian pitkät perinteet ja toisaalta historia, jossa se oli länsimaissa pitkään unohduksissa, tekevät faagiterapiaan liittyvistä omistussuhteista ja patenttiasioista monimutkaisia. Lisäksi lääkeyhtiöillä on taipumus rahoittaa voimakkaammin kroonisten sairauksien hoitoon tähtäävää tutkimusta kuin lyhyen aikaa käytettäviä akuutteja hoitomuotoja kuten uusia antibiootteja tai faagiterapiaa. Tämä johtuu siitä, että lääkkeet, joita potilas käyttää pitkiä aikoja, tuovat yritykselle enemmän taloudellista hyötyä (Skurnik et al., 2007).

Ihmisille tarkoitettujen lääketuotteiden sääntely on luonnollisesti äärimmäisen tiukkaa. Faagit ovat lääketuotteina uniikkeja ja niiden laajamittainen käyttö vaatii muutoksia lainsäädäntöön. Lait on pitkälti suunniteltu standardoituja tuotteita silmälläpitäen, mutta faagituotteet ovat usein yksilöllisesti potilaalle suunniteltuja. Lisäksi faagit ovat ns. aktiivinen hoitomuoto, sillä ne lisääntyvät kehossa. Tämä tekee faagiterapiaan liittyvästä farmakologiasta hyvin erilaista kuin vaikkapa antibioottien vastaavasta. Faagit poikkeavat perinteisistä lääkkeistä myös siten, että ne ovat evoluution kohteita, ja niissä tapahtuu siis ajan myötä muutoksia. Tavallisesti lääketutkimuksissa käytetyt kliiniset satunnaistetut kaksoissokkokokeet eivät usein sovi faagiterapialle sen poikkeavien ominaisuuksien vuoksi (Fauconnier, 2019).

Itä-Euroopan maissa, joissa on pitkät perinteet faagiterapialle, säätely on usein vapaampaa. Faagiterapian uranuurtajamaassa Georgiassa laki tulkitsee faagituotteet lääkkeiksi. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA mahdollistaa faagiterapian käytön kokeellisena lääkkeenä hätätilanteessa. Euroopan unionissa oli pyrkimys vuonna 2015 muuttaa lainsäädäntöä faagiterapialle edullisempaan suuntaan, mutta konservatiiviset näkökannat voittivat ja laki jäi ennalleen. Sittemmin asia on jäänyt enemmän jäsenmaiden vastuulle. Esimerkiksi Belgiassa onkin otettu askelia kohti faagiterapiaa. Belgiassa faagituotteen vaikuttavan raaka-aineen tulee olla laadultaan standardiohjeen mukainen, ja se täytyy testata hyväksytyissä laboratorio-oloissa. Kun nämä ehdot täyttyvät, farmaseutti voi valmistaa potilaalle yksilöllisen faagituotteen lääkärin määräyksen mukaisesti. Tämä on kuitenkin vielä siirtymävaiheen menetelmä, joka todennäköisesti muuttuu, sillä se asettaa vastuun lähinnä lääkärin ja farmaseutin harteille valmistajan ja viranomaisten sijaan (Fauconnier, 2019).

5. Tulevaisuudennäkymät

Kiinnostus faagiterapiaa kohtaan tuskin tulee laskemaan, ennemminkin päinvastoin. Antibioottiresistentit bakteerikannat ovat alati kasvava ongelma. Burnham *et al.* arvioivat, että vuonna 2010 Yhdysvalloissa kuoli jopa 153 113 ihmistä MDR-organismien aiheuttamiin infektioihin (Burnham et al., 2019). Faagiterapiaa pidetäänkin yhtenä kaikkein varteenotettavimmista vaihtoehdoista antibioottien korvikkeeksi mm. sen spesifisyyden, turvallisuuden ja toteutuksen matalien kustannusten ansiosta (Wittebole et al., 2014).

Faagiterapia ei kuitenkaan ole mikään ihmelääke, vaan sen käytön tiellä on faagituotteiden ominaisuuksiin, tuotantoon ja lainsäädäntöön liittyviä haasteita. Faagiterapia vaatii työtä, sillä sekä infektoiva bakteeri että terapeuttinen faagi täytyy tuntea hyvin. Immuunijärjestelmä saattaa häiritä terapian onnistumista, tai kohdebakteeri saattaa kehittyä faagille vastustuskykyiseksi (Wittebole et al., 2014). Faagien puhdistusmenetelmät ja endotoksiinien poisto ovat yleensä aikaa vieviä prosesseja, jotka eivät välttämättä nykyisellään sovellu laajamittaiseen tuotantoon (Gill and Hyman, 2010). Kaiken kaikkiaan, faagiterapia vaatii edelleen lisää tutkimustyötä ja testausta.

Bakteriofageihin ja faagiterapiaan liittyvää tutkimusta on meneillään ympäri maailmaa, myös Suomessa. Helsingin yliopiston Yersinia ja bakteriofagi tutkimuslaboratoriossa mm. sekvensoidaan ja karakterisoidaan faageja. Lisäksi siellä on tavoitteena pystyttää faagiterapialaboratorio sekä ylläpitää terapeuttisten faagien kokoelmaa. Pyrkimyksenä on vakuuttaa viranomaistahot faagiterapian hyödyistä ja lopulta saada

faagiterapia osaksi Suomen julkisen terveydenhuollon arsenaalia (University of Helsinki, 2017).

6. Kirjallisuusviitteet

Ackermann H- (2003) Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology* 154(4): 245-251.

Azam AH and Tanji Y (2019) Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(5): 2121-2131.

Belleghem JDV, Clement F, Merabishvili M, Lavigne R and Vaneechoutte M (2017) Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages. *Scientific Reports* 7.

Berry J, Rajaure M, Pang T and Young R (2012) The Spanin Complex Is Essential for Lambda Lysis. *Journal of Bacteriology* 194(20): 5667.

Berry J, Summer EJ, Struck DK and Young R (2008) The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Molecular Microbiology* 70(2): 341-351.

Bertozzi Silva J, Storms Z and Sauvageau D (2016) Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters* 363(4).

Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO and Piddock LJV (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13(1): 42-51.

Burnet FM (1933) The Classification of Dysentery-Coli Bacteriophages. II. The Serological Classification of Coli-Dysentery Phages. *Journal of Pathology and Bacteriology* 36: 307-18.

Burnet FM (1929) A Method for the Study of Bacteriophage Multiplication in Broth. *British Journal of Experimental Pathology* 10(2): 109-115.

Burnham JP, Olsen MA and Kollef MH (2019) Re-estimating annual deaths due to multidrug-resistant organism infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 40(1): 112.

Caldwell BJ and Bell CE (2019) Structure and mechanism of the Red recombination system of bacteriophage λ . *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 147: 33-46.

Chen M, Zhang L, Abdelgader SA, Yu L, Xu J, Yao H, et al. (2017) Alterations in gp37 Expand the Host Range of a T4-Like Phage. *Applied and Environmental Microbiology* 83(23).

Dhanji H, Doumith M, Rooney PJ, O'Leary MC, Loughrey AC, Hope R, et al. (2011) Molecular epidemiology of fluoroquinolone-resistant ST131 *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in nursing homes in Belfast, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(2): 297-303.

d'Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques (An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus). *Comptes rendus Academie des Sciences* 165:373-375.

Dufour N, Delattre R, Ricard J and Debarbieux L (2017) The Lysis of Pathogenic *Escherichia coli* by Bacteriophages Releases Less Endotoxin Than by β -Lactams. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 64(11): 1582.

Fauconnier A (2019) Phage Therapy Regulation: From Night to Dawn. *Viruses* 11(4).

Floyd JL, Smith KP, Kumar SH, Floyd JT and Varela MF (2010) LmrS Is a Multidrug Efflux Pump of the Major Facilitator Superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(12): 5406-5412.

Garen A and Puck TT (1951) THE FIRST TWO STEPS OF THE INVASION OF HOST CELLS BY BACTERIAL VIRUSES. II. *The Journal of Experimental Medicine* 94(3): 177-189.

Gill JJ and Hyman P (2010) Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11(1): 2-14.

Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW and Fischetti VA (2013) Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by *Streptococcus pyogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(6): 2743.

Hatfull GF (2015) Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. *Journal of Virology* 89(16): 8107-8110.

Heller K and Braun V (1982) Polymannose O-antigens of *Escherichia coli*, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. *Journal of Virology* 41(1): 222-227.

Heller KJ (1984) Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23. *Virology* 139(1): 11-21.

Hobbs Z and Abedon ST (2016) Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with 'Lytic or lysogenic'. *FEMS Microbiology Letters* 363(7).

Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, Drab M, Jończyk-Matysiak E, Lecion D, et al. (2015) Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Scientific Reports* 5.

Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM and Donoghue AM (2004) Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry Science* 83(12): 1944-1947.

Hynes AP, Rousseau GM, Agudelo D, Goulet A, Amigues B, Loehr J, et al. (2018) Widespread anti-CRISPR proteins in virulent bacteriophages inhibit a range of Cas9 proteins. *Nature Communications* 9.

Kim K, Cha J, Jang E, Klumpp J, Hagens S, Hardt W, et al. (2008) PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response. *Microbial Biotechnology* 1(3): 247-257.

Kim M, Jo Y, Hwang YJ, Hong HW, Hong SS, Park K, et al. (2018) Phage-Antibiotic Synergy via Delayed Lysis. *Applied and Environmental Microbiology* 84(22).

Kojima S and Nikaido H (2013) Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(28): E2629-E2634.

Kongari R, Rajaure M, Cahill J, Rasche E, Mijalis E, Berry J, et al. (2018) Phage spanins: diversity, topological dynamics and gene convergence. *BMC Bioinformatics* 19(1): 326.

Krut O and Bekeredjian-Ding I (2018) Contribution of the Immune Response to Phage Therapy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 200(9): 3037-3044.

Krylov V, Shaburova O, Pleteneva E, Krylov S, Kaplan A, Burkaltseva M, et al. (2015) Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Virologica Sinica* 30(1): 33-44.

Kurzępa A, Dąbrowska K, Skaradziński G and Górski A (2009) Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. *Clinical and Experimental Medicine* 9(2).

- Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB and Lubitz W (2010) The bacterial ghost platform system: Production and applications. *Bioengineered Bugs* 1(5): 326.
- Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S and Vester B (2006) The Cfr rRNA Methyltransferase Confers Resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(7): 2500-2505.
- Lu N, Sun Y, Wang Q, Qiu Y, Chen Z, Wen Y, et al. (2020) Cloning and characterization of endolysin and holin from *Streptomyces avermitilis* bacteriophage phiSASD1 as potential novel antibiotic candidates. *International Journal of Biological Macromolecules* 147: 980-989.
- Luria SE and Anderson TF (1942) The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 28(4): 127-130.1.
- Luria SE, Delbrück M and Anderson TF (1943) Electron Microscope Studies of Bacterial Viruses. *Journal of Bacteriology* 46(1): 57-77.
- Majewska J, Beta W, Lecion D, Hodyra-Stefaniak K, Kłopot A, Kaźmierczak Z, et al. (2015) Oral Application of T4 Phage Induces Weak Antibody Production in the Gut and in the Blood. *Viruses* 7(8): 4783.
- McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S, et al. (2013) Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology* 443(2): 187-196.
- Nobrega FL, Vlot M, Jonge PAd, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, et al. (2018) Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology* 16(12): 760-773.
- Oliveira H, Melo LDR, Santos SB, Nóbrega FL, Ferreira EC, Cerca N, et al. (2013) Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *Journal of Virology* 87(8): 4558.
- Pang T, Savva CG, Fleming KG, Struck DK and Young R (2009) Structure of the lethal phage pinhole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(45): 18966.
- Philipson CW, Voegtly LJ, Lueder MR, Long KA, Rice GK, Frey KG, et al. (2018) Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses* 10(4).
- Przerwa A, Zimecki M, Światała-Jeleń K, Dąbrowska K, Krawczyk E, Łuczak M, et al. (2006) Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. *Medical Microbiology and Immunology* 195(3): 143-150.
- Rajaure M, Berry J, Kongari R, Cahill J and Young R (2015) Membrane fusion during phage lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(17): 5497-5502.
- Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES and Novik GI (2010) Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology* 59(3): 145-155
- Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, et al. (2017) Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host & Microbe* 22(1): 38-47.e4.
- Romero-Calle D, Guimarães Benevides R, Góes-Neto A and Billington C (2019) Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics* 8(3).
- Ruska H (1940) Die Sichtbarmachung der bakterio-phagen lyse im übermikroskop. *Naturwissenschaften* 28(3): 45-46.

- Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. (2017) Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(10).
- Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB and Camilli A (2013) A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 494(7438): 489.
- Siringan P, Connerton PL, Cummings NJ and Connerton IF (2014) Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biology* 4(3).
- Skurnik M, Pajunen M and Kiljunen S (2007) Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnology Letters* 29(7): 995-1003.
- Sumrall ET, Shen Y, Keller AP, Rismondo J, Pavlou M, Eugster MR, et al. (2019) Phage resistance at the cost of virulence: *Listeria monocytogenes* serovar 4b requires galactosylated teichoic acids for InIB-mediated invasion. *PLoS Pathogens* 15(10).
- Twort FW (1915) AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet* 186(4814): 1241-1243.
- Vargiu AV and Nikaido H (2012) Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(50): 20637-20642.
- Viertel TM, Ritter K and Horz H (2014) Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(9): 2326-2336.
- Vitiello CL, Merril CR and Adhya S (2005) An amino acid substitution in a capsid protein enhances phage survival in mouse circulatory system more than a 1000-fold. *Virus Research* 114(1-2): 101-103.
- Vollmer W, Blanot D and De Pedro MA (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32(2): 149-167.
- Wagner EK, Hewlett Martinez, Bloom David and Camerini David (2008) *Basic Virology*. Malden, Mass. [u.a.]: Blackwell Publ.
- Wang X and Quinn PJ (2010) Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*: 3-25.
- White R, Chiba S, Pang T, Dewey JS, Savva CG, Holzenburg A, et al. (2011) Holin triggering in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(2): 798-803.
- Witte A and Lubitz W (1989) Biochemical characterization of phi X174-protein-E-mediated lysis of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* 180(2): 393-398.
- Wittebole X, De Roock S and Opal SM (2014) A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5(1): 226-235.
- Wright A, Hawkins CH, Anggård EE and Harper DR (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK ; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* 34(4): 349-357.
- Yacoby I, Bar H and Benhar I (2007) Targeted Drug-Carrying Bacteriophages as Antibacterial Nanomedicines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(6): 2156-2163.
- Yap ML and Rossmann MG (2014) Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiology* 9: 1319.

Yersinia and Bacteriophage research laboratory (2007). University of Helsinki.
<https://www.helsinki.fi/en/researchgroups/yersinia-and-bacteriophage-research-laboratory>

Young I, Wang I and Roof WD (2000) Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiology* 8(3): 120-128.