

Kurze Einführung ins Thema „Phagen“



Stefan Hertwig

Konsiliarlabor für Yersinien

Fachgruppe Diagnostik, Erregercharakterisierung, Parasiten in Lebensmitteln

Abteilung Biologische Sicherheit

Bundesinstitut für Risikobewertung

Teilnehmer am Forum Verbraucherschutz-Thema Phagen

**14 Forschungs-
einrichtungen**

14 Firmen

**8
Bundesbehörden**

**12
Landesbehörden**

5 Verbände

Phagen und ihre Anwendung sind nicht neu

24-26 April 2017
Institut Pasteur, France

100th
1917-2017
Centennial
Celebration of
Bacteriophage
Research

ORGANIZING AND SCIENTIFIC COMMITTEE
Dennis Bamford
Laurent Debarbieux
Patrick Forterre
Mart Krupovic
Mzia Kutateladze

SPEAKERS
Bruce Alberts
Dennis Bamford
Roger Hendrix
Rob Lavigne
Petr Leiman
Debby Lindell

Sylvain Moineau
Michel Morange
Margarita Salas
Matthew Sullivan
Paulo Tavares

www.bacteriophage100.org

ISVM ELIAYA île de France Institut Pasteur

pasteur.fr

Frühe Pioniere der Phagenforschung



en.wikipedia.org

1896

Ernest Hanbury Hankin



en.wikipedia.org

1915

Frederick Twort



de.wikipedia.org

1917

Felix d'Herelle

1896: "It is seen that the unboiled water of the Ganges kills the cholera germ in less than 3 hours. The same water, when boiled, does not have the same effect."

1915: An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet.

1917: Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. CR Acad. Sci. Paris.

Beginn der Phagentherapie



twitter.com



de.wikipedia.org

George Eliava



Eliava Institut



1919: Felix d'Herelle isoliert aus Hühnerkot Phagen und behandelt damit an Hühnerptyhus erkranktes Geflügel

1919: Erste Behandlung eines elfjährigen Jungen, der an Ruhr erkrankt war

1923: George Eliava gründet das Institut für Bakteriophagen, Mikrobiologie und Virologie in Tiflis, Georgien

Das Ende der Phagen-Therapie im Westen



en.wikipedia.org

Alexander Fleming 1928



gettyima ges.com



crtronline.com



de.wikipedia.org



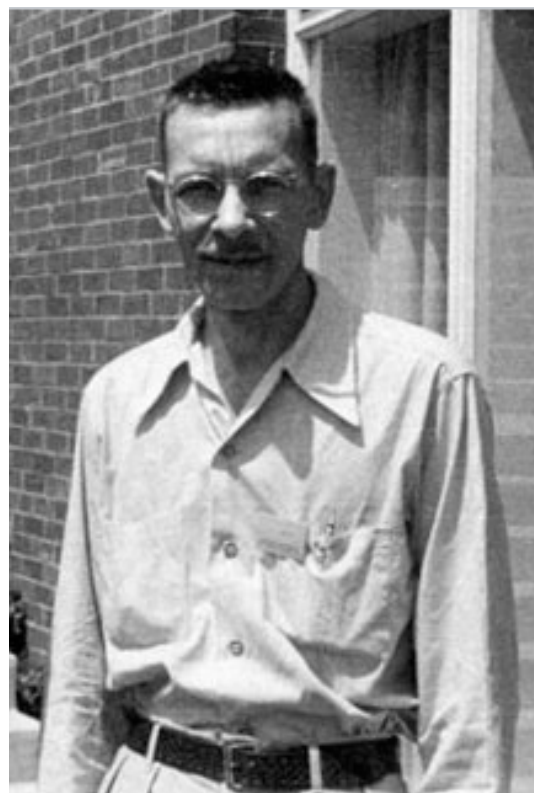


Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 1969



de.wikipedia.org

Max Delbrück



de.wikipedia.org

Alfred Day Hershey



de.wikipedia.org

Salvador Luria

für die Entdeckung des Replikationsmechanismus und der genetischen Struktur von Viren (Phagen)

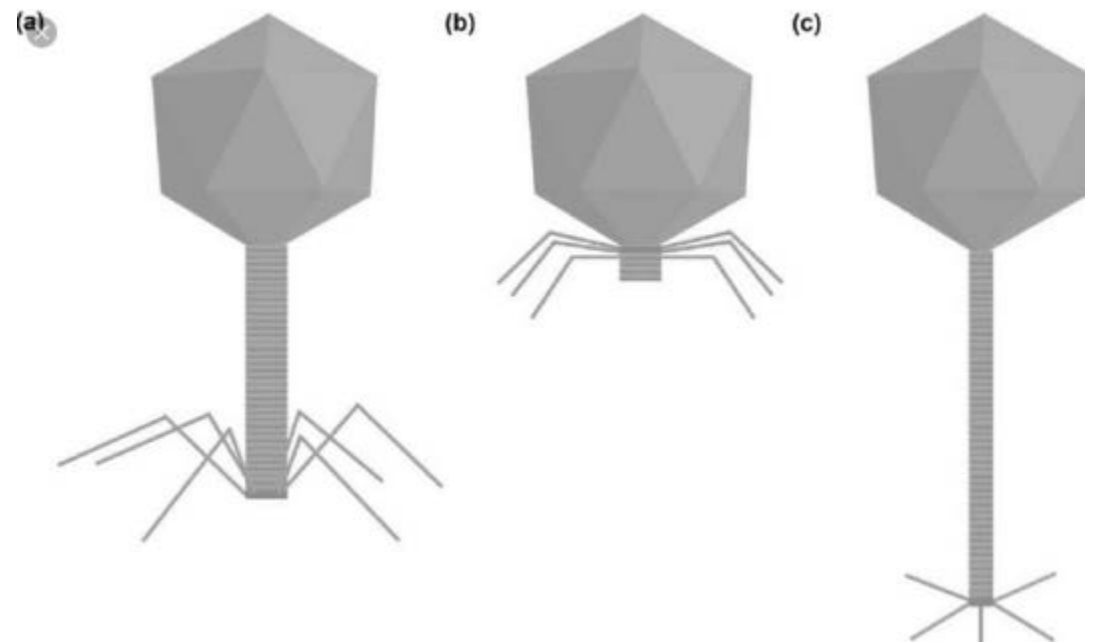
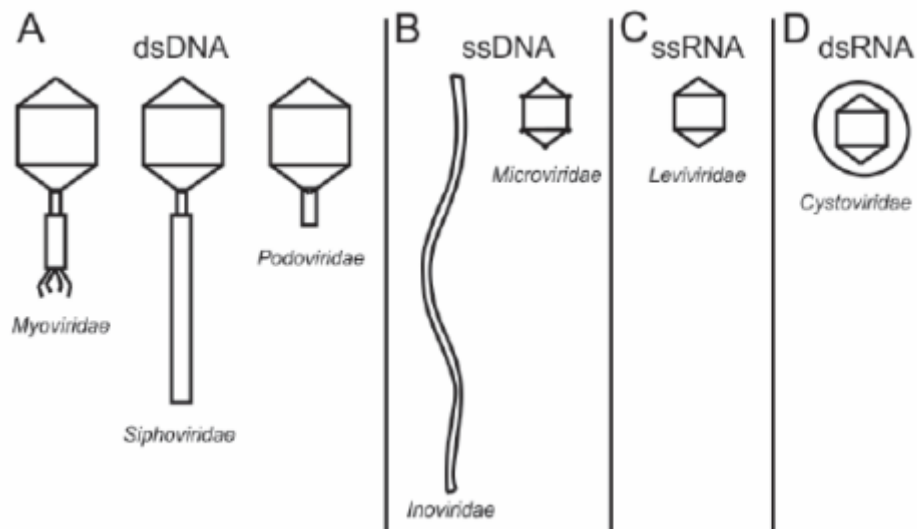
Wodurch zeichnen sich Phagen aus?

Sie sind alt: ca. 3-3,5 Milliarden Jahre

Sie sind klein: Länge ca. 30-200 nm

Sie infizieren nur bestimmte Bakterien, vermehren sich nur in Anwesenheit ihres Wirtes

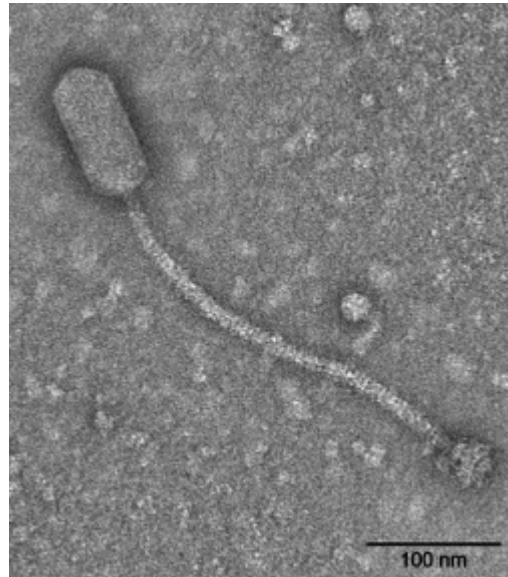
Sie bestehen aus einer Proteinhülle, die eine Nukleinsäure umschließt



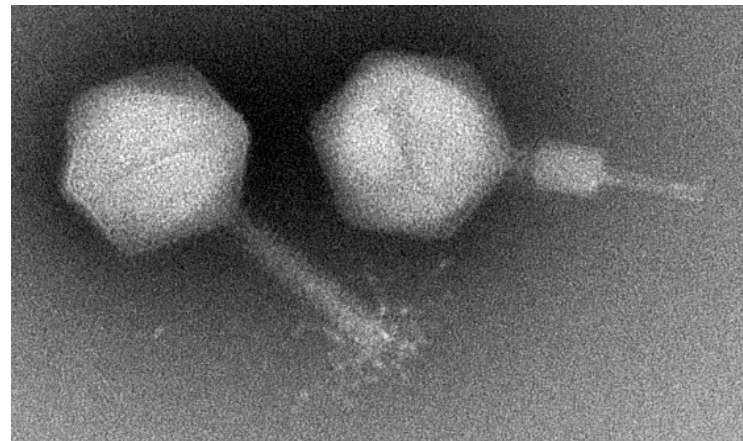
Quelle: researchgate.net

Die meisten bekannten Phagen (> 90 %) gehören zu Familien der Ordnung *Caudovirales*

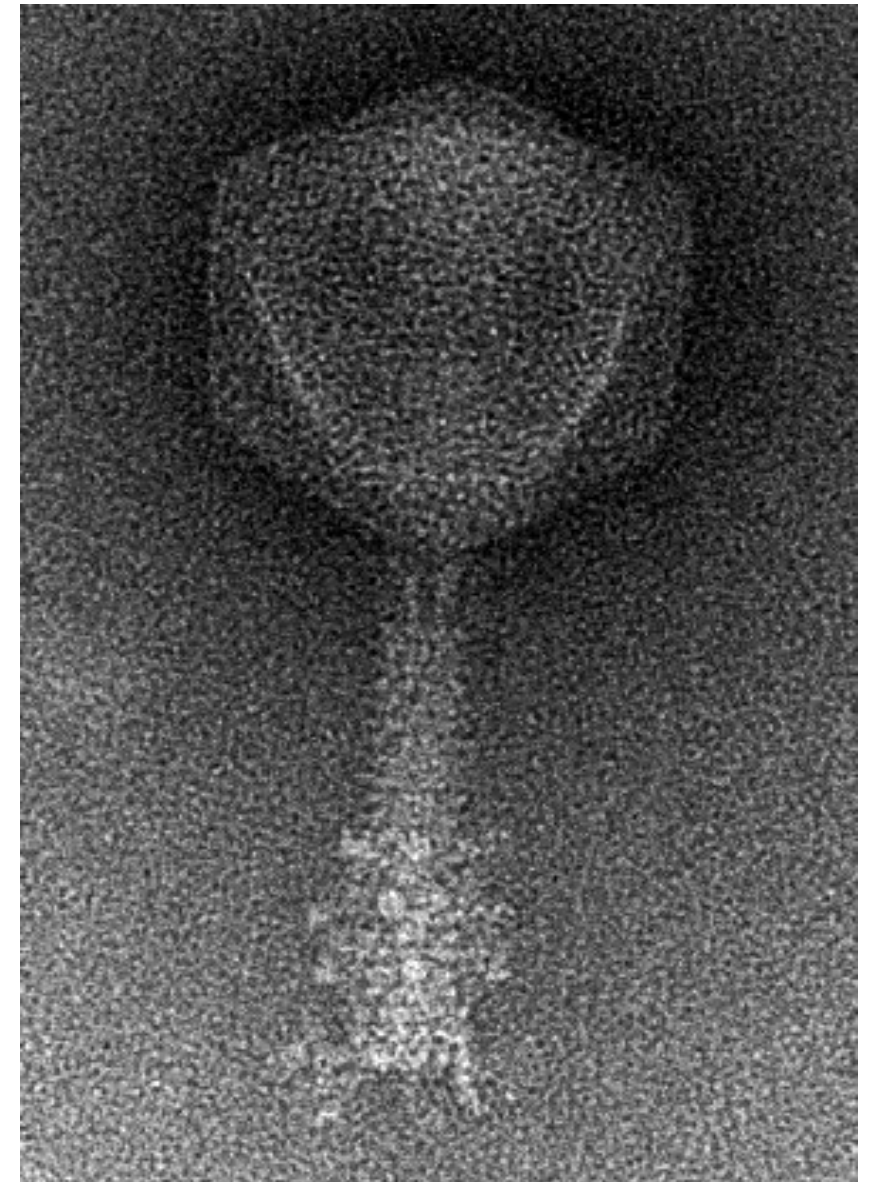
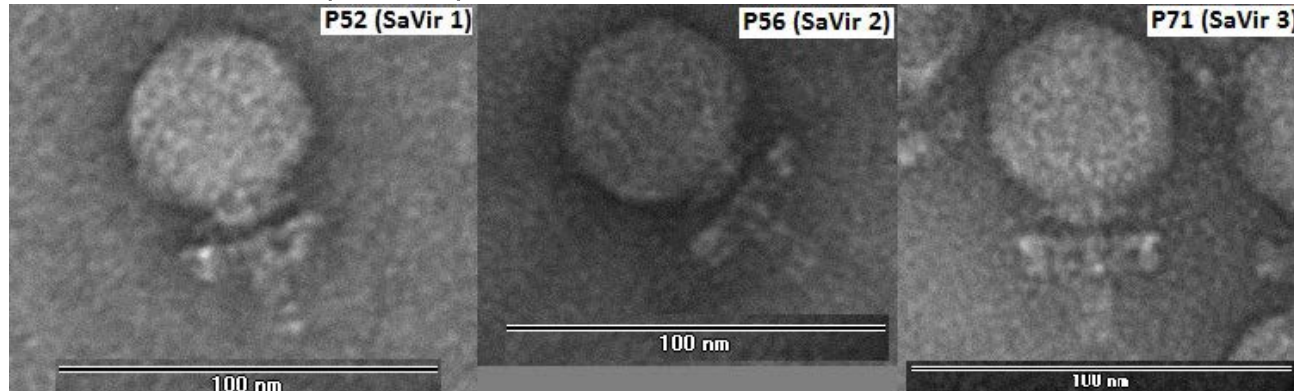
Siphoviridae (61 %)



Myoviridae (25 %)



Podoviridae (14 %)



Wo findet man Phagen?



Ackerboden: $<10^9/g$



See: $> 10^8/ml$



Meer: $10^7/ml$



Es gibt etwa zehnmal so viele Phagen wie Bakterien: 10^{31}
Alle 48 h werden etwa 50 % aller Bakterien durch Phagen lysiert



„Bacteria don't die, they just phage away“



Joghurt $<10^9/ml$

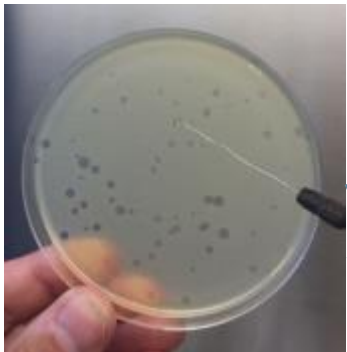
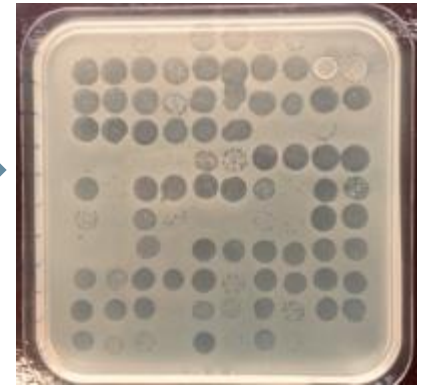
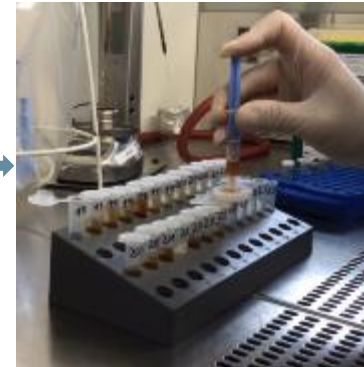


Fleisch $< 10^8/g$



Darm 10^{15} pfu

Wie kann man Phagen isolieren?

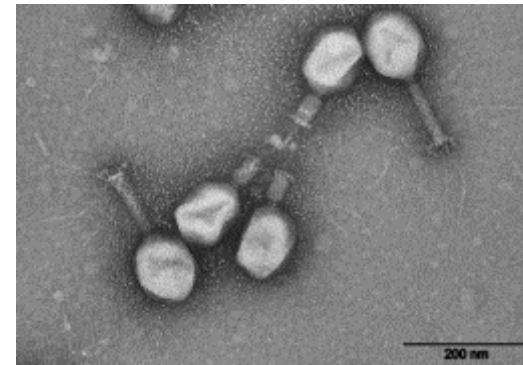
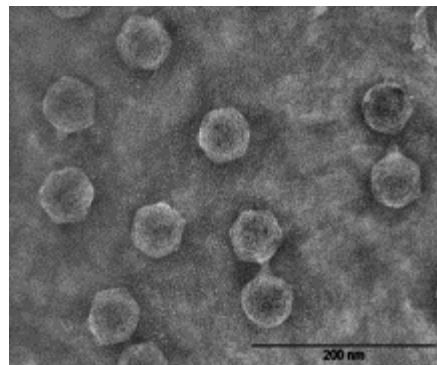


Phagen mit einem weiten Wirtsbereich

Table 1 | Examples of phages isolated from the environment capable of infecting across genera.

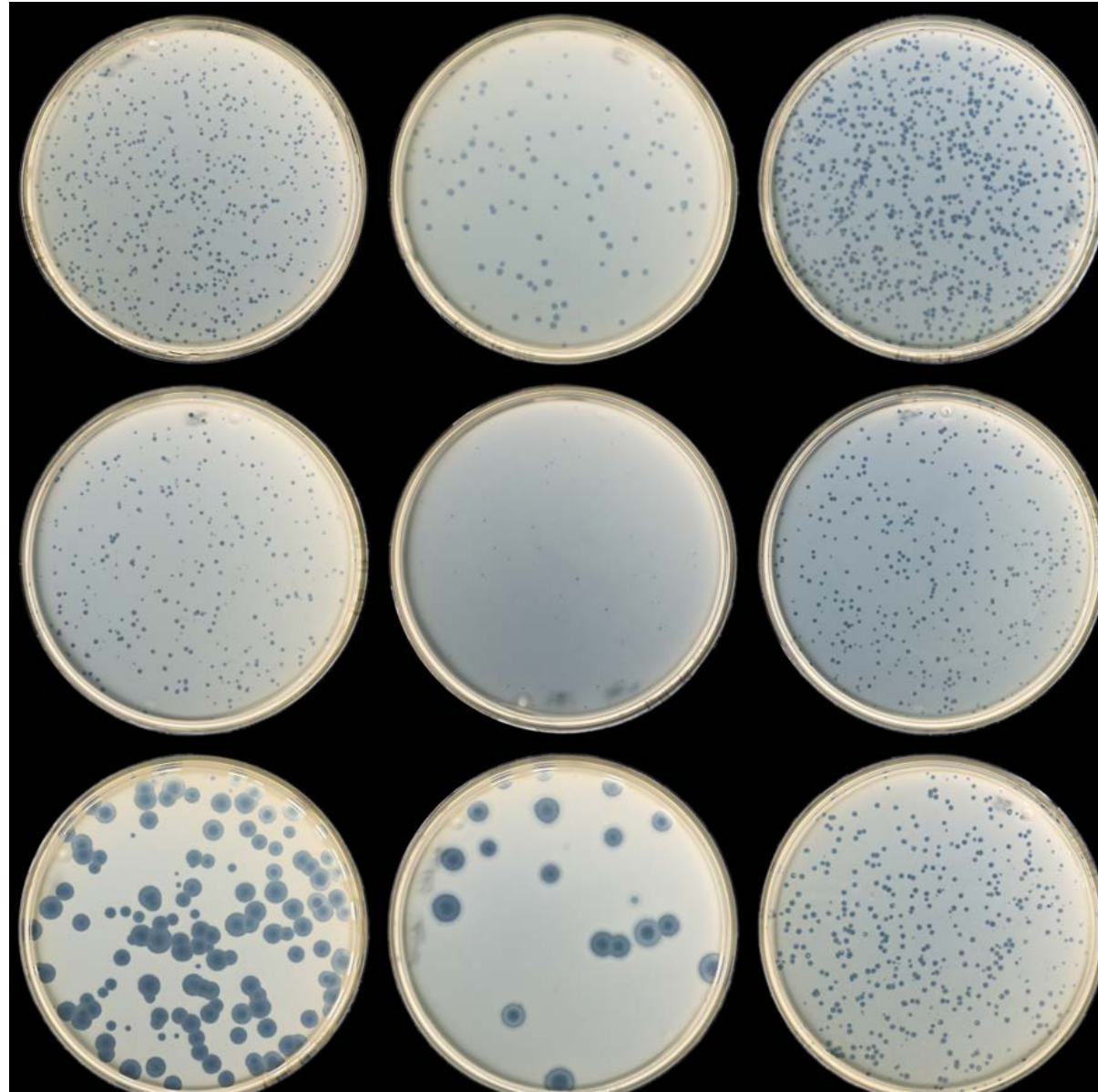
Author/s (year)	Genera infected	Number of genera	Pathogenicity
Koskella and Meaden (2013)	<i>Pseudomonas</i> and <i>Erwinia</i>	2	Crop pathogens
Lu et al. (2012)	<i>Lactobacillus</i> and <i>Weissella</i>	2	Endocarditis and bacteremia
Evans et al. (2010)	<i>Serratia</i> and <i>Pantoea</i>	2	NA
Bielke et al. (2007)	<i>Salmonella</i> and <i>Klebsiella</i> or <i>Escherichia</i>	2	Enterocolitis, pneumonia, urinary tract infections, and septicemia
Beumer and Robinson (2005)	<i>Sphaerotilus</i> and <i>Pseudomonas</i>	2	Pneumonia, urinary tract infections, septicemia, and wound infection
Thomas et al. (2002)	<i>Gordonia</i> , <i>Nocardia</i> , and <i>Rhodococcus</i>	3	Opportunistic pathogenesis
Jensen et al. (1998)	<i>Pseudomonas</i> and <i>Sphaerotilus</i> or <i>Escherichia</i>	2	Pneumonia, urinary tract infections, septicemia, wound infection, and enteric disease
Tilley et al. (1990)	Multiple genera within the <i>Micromonospora</i>	3	Respiratory infection

Meaden & Koskella, 2013, *Frontiers Microbiol.*



Yersinia pseudotuberculosis-Phagen, die auch *E. coli*, *Salmonella* und *Shigella* lysieren

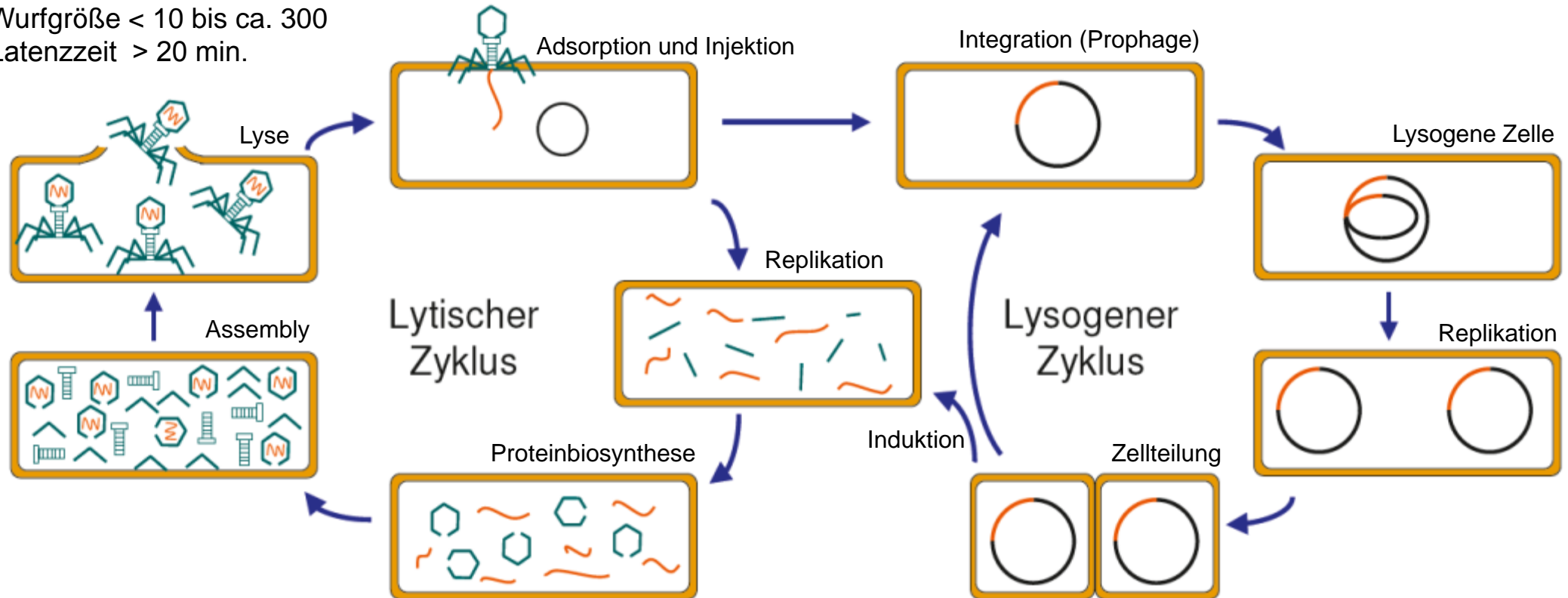
Phagen sind unterschiedlich lytisch



Plaques von *Yersinia pseudotuberculosis*-Phagen

Es gibt 2 Arten von Phagen, virulente und temperente

Wurfgröße < 10 bis ca. 300
 Latenzzeit > 20 min.



Umwandlung temperent → virulent erfordert **nur Mutation** im CI-Repressorgen

Umwandlung virulent → temperent erfordert: **genetischer Schalter, Integrasegen + attP site**

Virulenzgene auf Genomen temperenter Phagen

562 BRÜSSOW ET AL.

MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.

TABLE 1. Common themes among phage-encoded virulence factors^a

Protein	Gene	Phage	Bacterial host
Extracellular toxins			
Diphtheria toxin	<i>tox</i>	β-Phage	<i>C. diphtheriae</i>
Neurotoxin	C1	Phage C1	<i>C. botulinum</i>
Shiga toxins	<i>stx1, stx2</i>	H-19B	<i>E. coli</i>
Enterohaemolysin	<i>hly2</i>	φFC3208	<i>E. coli</i>
Cytotoxin	<i>ctx</i>	φCTX	<i>P. aeruginosa</i>
Enterotoxin	<i>see, sel</i>	NA	<i>S. aureus</i>
Enterotoxin P	<i>sep</i>	φN315	<i>S. aureus</i>
Enterotoxin A	<i>entA</i>	φ13	<i>S. aureus</i>
Enterotoxin A	<i>sea</i>	φM150A	<i>S. aureus</i>
Exfoliative toxin A	<i>eta</i>	φETA	<i>S. aureus</i>
Toxin type A	<i>speA</i>	T12	<i>S. pyogenes</i>
Toxin type C	<i>speC</i>	CS112	<i>S. pyogenes</i>
Cholera toxin	<i>ctxAB</i>	CTXφ	<i>V. cholerae</i>
Leukocidin	<i>pvl</i>	φPVL	<i>S. aureus</i>
Superantigens	<i>speA1, speA3, speC, speI, speH, speM, speL, speK, ssa</i>	8232.1	<i>S. pyogenes</i>
Cytolethal distending toxin	<i>cdt</i>	Unnamed	<i>E. coli</i>
Proteins altering antigenicity			
Membrane proteins	Mu-like	Pnm1	<i>N. meningitidis</i>
Glucosylation	<i>rfb</i>	ε ⁷⁴	<i>S. enterica</i>
Glucosylation	<i>gr</i>	P22	<i>S. enterica</i>
O-antigen acetylase	<i>oac</i>	Sf6	<i>S. flexneri</i>
Glucosyl transferase	<i>grII</i>	SfII, SfV, SfX	<i>S. flexneri</i>
Effector proteins involved in invasion			
Type III effector	<i>sopE</i>	SopEφ	<i>S. enterica</i>
Type III effector	<i>ssp1 (ggB)</i>	GIFSY-2	<i>S. enterica</i>
Type III effector	<i>sspH1</i>	GIFSY-3	<i>S. enterica</i>
Enzymes			
Superoxide dismutase	<i>sodC</i>	Sp4, 10	<i>E. coli</i> O157
Superoxide dismutase	<i>sodC-I</i>	GIFSY-2	<i>S. enterica</i>
Superoxide dismutase	<i>sodC-III</i>	Fels-1	<i>S. enterica</i>
Neuraminidase	<i>nanH</i>	Fels-1	<i>S. enterica</i>
Hyaluronidase	<i>hylP</i>	H4489A	<i>S. pyogenes</i>
Leukocidin	<i>pvl</i>	φPVL	<i>S. aureus</i>
Staphylokinase	<i>sak</i>	φ13	<i>S. aureus</i>
Phospholipase	<i>sla</i>	315.4	<i>S. pyogenes</i>
DNase/streptodornase	<i>sdn, sda</i>	315.6, 8232.5	<i>S. pyogenes</i>
Serum resistance			
OMP ^b	<i>bor</i>	λ	<i>E. coli</i>
OMP	<i>eib</i>	λ-like	<i>E. coli</i>

Welche Rolle spielen Phagen für den horizontalen Gentransfer? (Tansduktion)

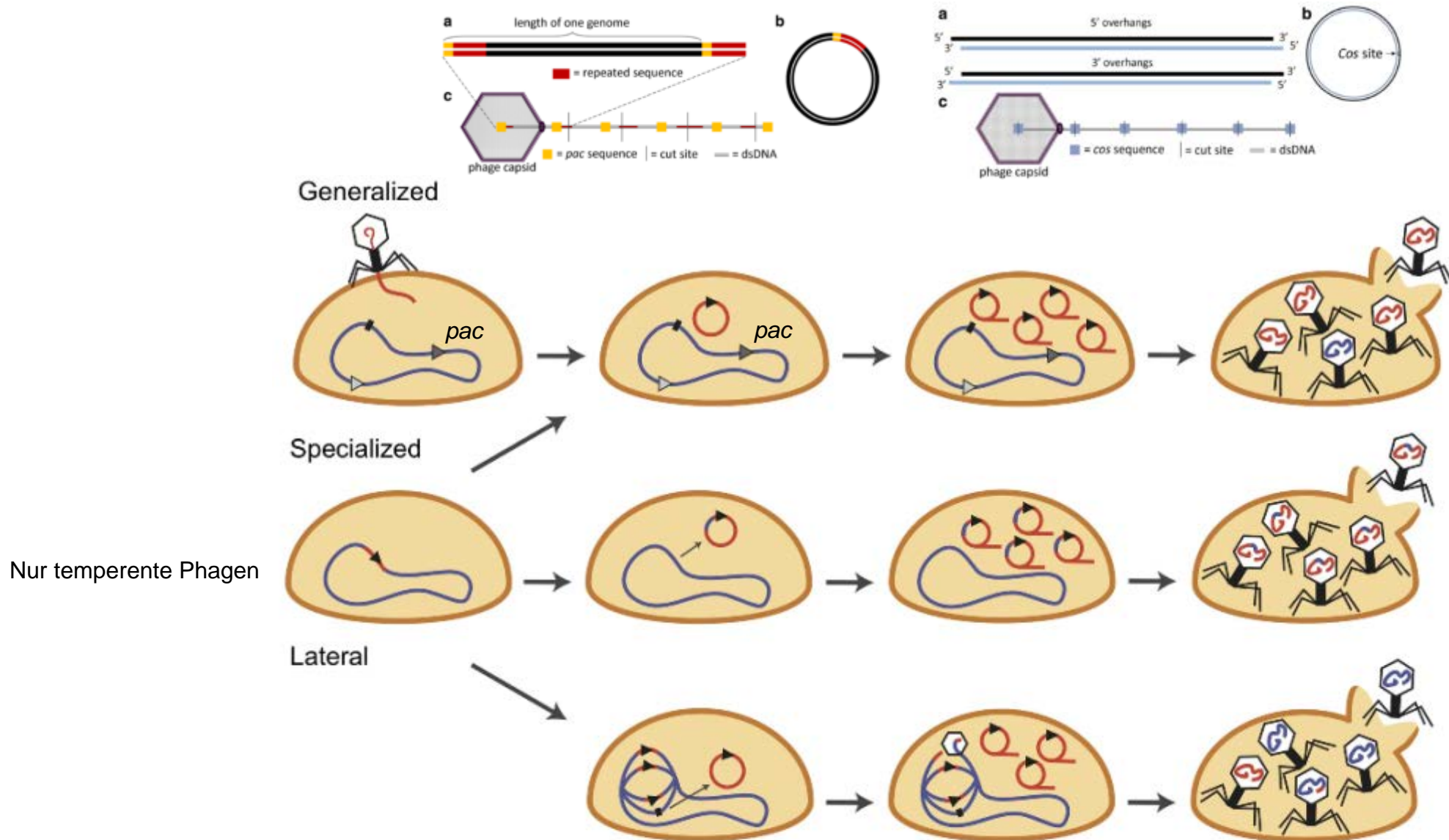


Fig 2. Mechanisms of genetic transduction. Generalized (top), specialized (middle), and lateral transduction (bottom). The viral genome (in red) first undergoes theta replication, followed by rolling circle replication. In lateral transduction, theta replication occurs prior to prophage excision. Phage terminase initiates DNA packaging from phage *pac* sites (black triangles) or pseudo-*pac* sites (gray triangles).

Chiang et al., 2019 PLOS Pathogens doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878.g002>

Wie stabil sind Phagen?

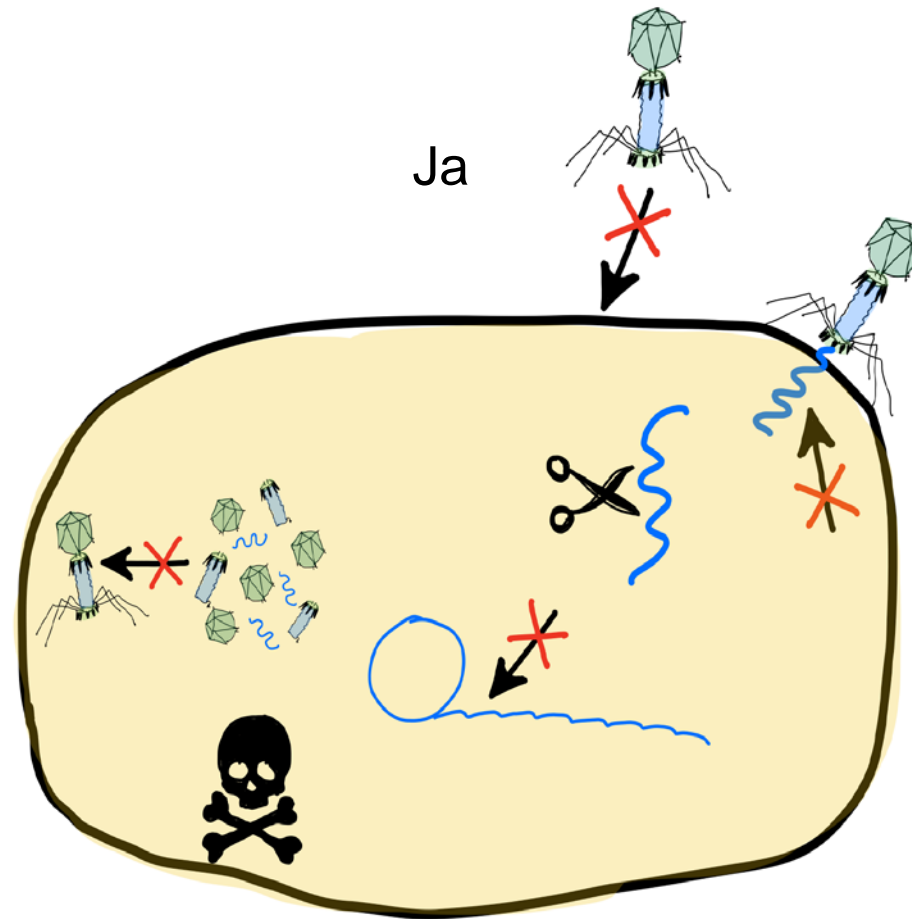
Family ^a	Members ^a	Nucleic acid and structure ^a	Characteristics of phage sensitivity to some external factors
<i>Myoviridae</i>	T2 T4 ΦgspC PFpW-3 CP-51 ...	Linear dsDNA Non-enveloped, contractile tail, consisting of a Sheath and a central tube	Phages from this family may be <u>extremely resistant to a dry environment</u> (desert sands) and may <u>survive large temperature fluctuations</u> (Prigent et al. 2005) Some of them (e.g., T4, C16) proved to be <u>very resistant to long-term (for years) storage</u> (Ackermann et al. 2004) Freeze-drying may be harmful for this family (Clark 1962) T2— <u>stable in pH range 5–9</u> , with maximum at pH 5–6 (Sharp et al. 1946)
<i>Siphoviridae</i>	λ T1 T5 PFpW-8 TSP4 P001	Linear dsDNA Non-enveloped, long non-contractile tail	In the opinion of some authors, the members of this family are <u>generally the most resistant to adverse conditions</u> (Lasobras et al. 1997) Phages from this family may be <u>extremely resistant to a dry environment</u> (desert sands) and may <u>survive large temperature fluctuations</u> (Prigent et al. 2005) Some of them (e.g., T5) proved to be <u>very resistant to long-term (for years) storage</u> (Ackermann et al. 2004)
<i>Podoviridae</i>	T3 T7 PFpW-6 28B	Linear dsDNA Non-enveloped, short non-contractile tail	Phages from this family may be <u>extremely resistant to a dry environment</u> (desert sands) and may <u>survive large temperature fluctuations</u> (Prigent et al. 2005) T3—at 37°C, <u>stable at pH 5–9.2</u> (Międzybrodzki et al., unpublished data); its survival after freezing at –196°C was 98% (Tsutsacva et al. 1981)

Jonczyk et al., 2011, Folia Microbiol.

aber:

große Unterschiede zwischen Phagen; Inaktivierung multifaktoriell (z. B. auch durch UV)

Gibt es Resistenzen gegenüber Phagen?



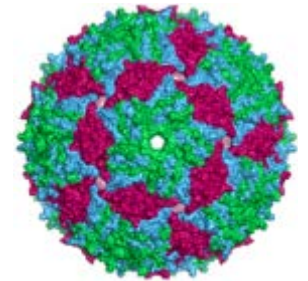
aber:

Phagen-Resistenzen:

- (i) sind seltener als AB-Resistenzen (1/10 bis 1/100)
 - (ii) werden häufig „erkauft“ mit einer Reduktion der Fitness oder Virulenz der Bakterien
 - (iii) sind meist nicht übertragbar
 - (iv) beeinflussen in der Regel nicht die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika
- Es gibt eine Co-Evolution („arms race“) zwischen Bakterien und Phagen
Entgegenwirken durch Rotation von Phagen oder Verwendung von Phagen-Cocktails möglich

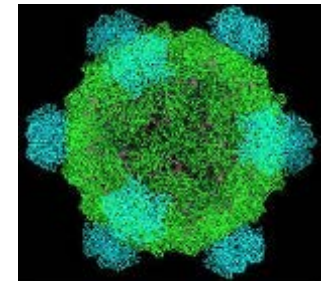
Was weiss man über die Genetik von Phagen?

1976: Sequenzierung des ersten Virus, RNA-Phage MS2 (3.569 Nukleotide)
Fiers et al., Nature



Kapsid des Bakteriophagen MS2

1977: Sequenzierung des ersten DNA-Phagen ØX174 (5.386 Nukleotide)
Sanger et al., Nature



Struktur des Kapsids von ØX174

1982: Sequenzierung des Phagen Lambda (48.502 bp)
Sanger et al., J. Mol. Biol.



Bis jetzt über 8.000 Phagengenome sequenziert

Genomgrößen 4 bis ca. 500 kb

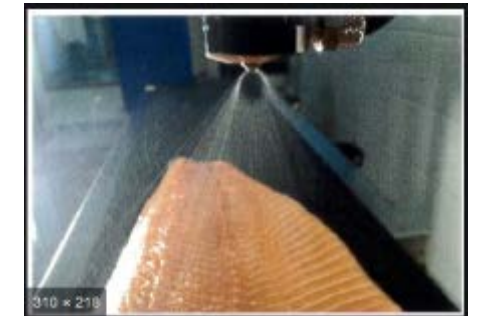
Es gibt nicht eine DNA-Sequenz, die in allen Genomen vorkommt

Wie können Phagen verwendet werden?

Phagentherapie



Lebensmittel-Produktion



Pre-harvest

Post-harvest

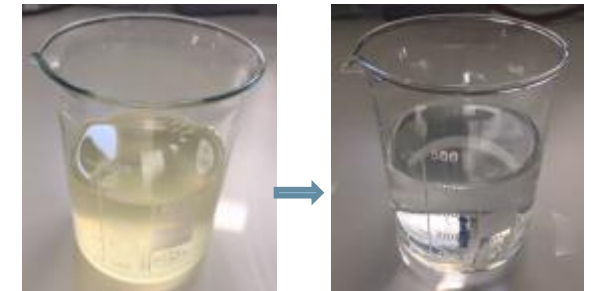
Probiotikum



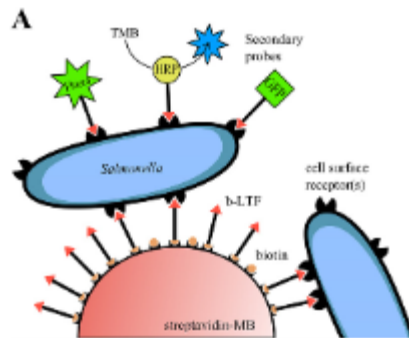
Dekontamination



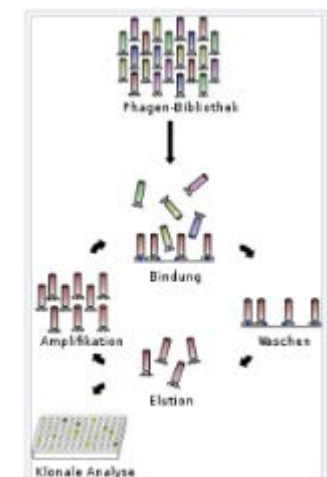
Wasser-Reinigung



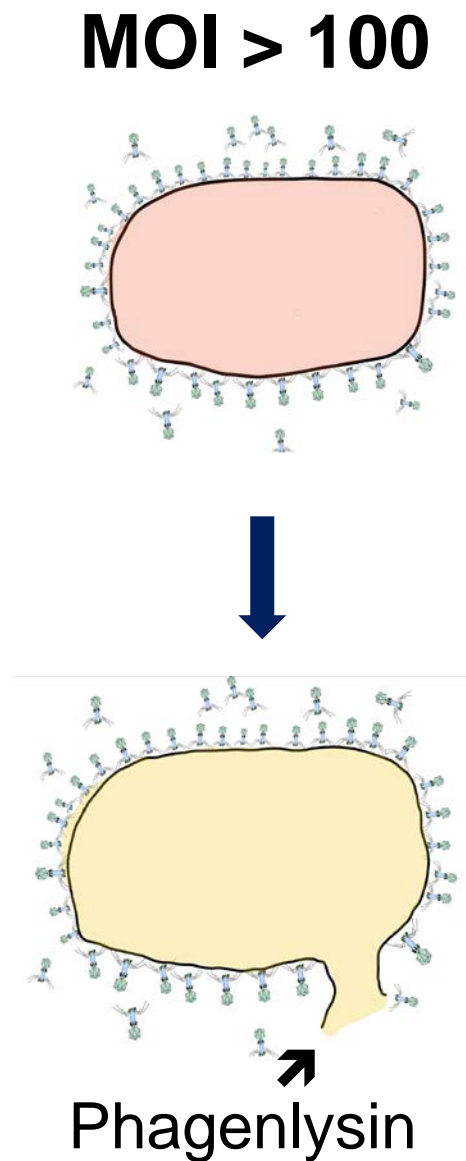
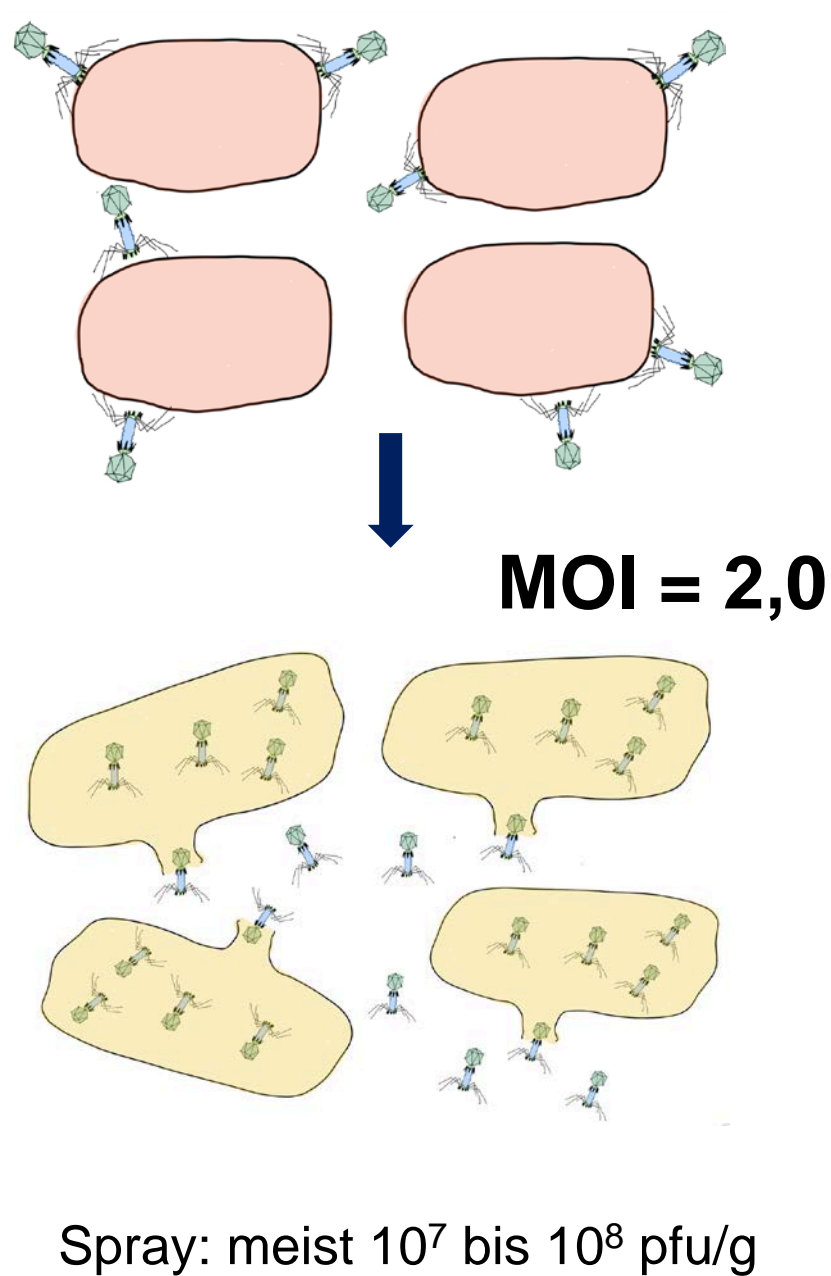
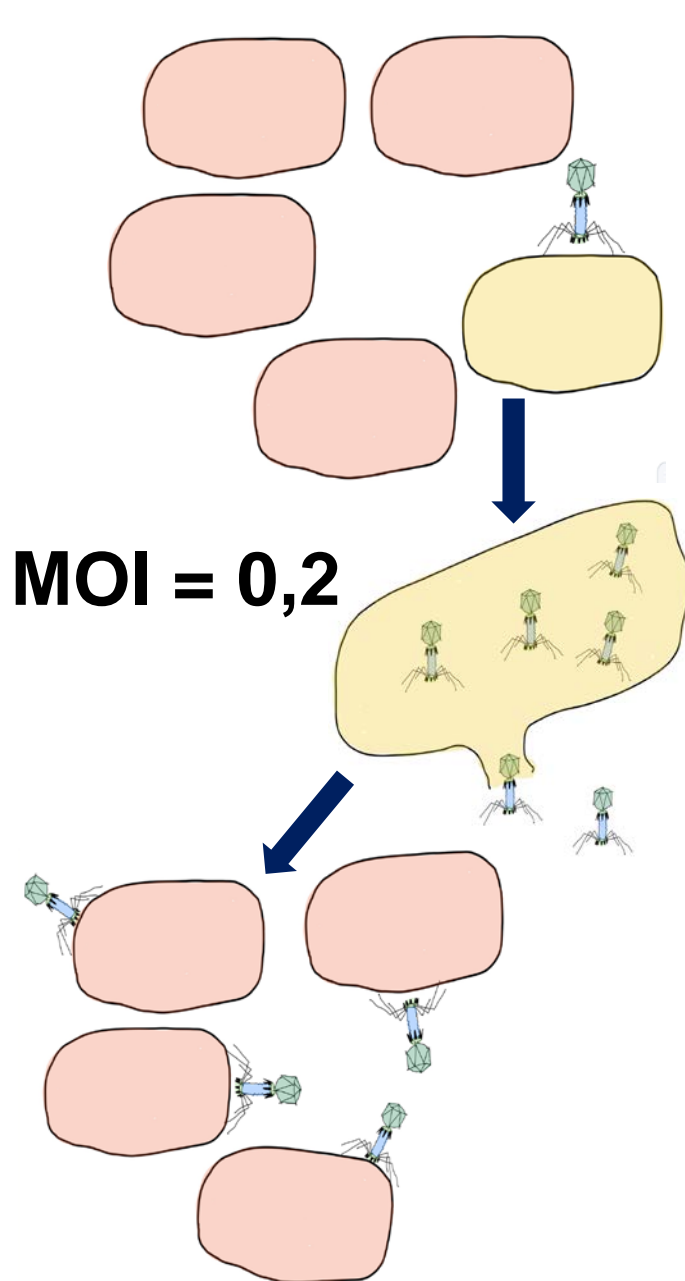
Detektion und Isolierung von Erregern



Phage Display, z. B. zur Entwicklung von Impfstoffen



Aktive Infektion, passive Infektion und „Lysis from without“



Zusammenfassung

Bakteriophagen:

sind sehr klein

infizieren nur bestimmte Bakterien

vermehren sich als Viren nur in Anwesenheit ihres Wirtes

sind die am häufigsten vorkommenden „biologischen Einheiten“ auf der Erde

spielen eine wichtige Rolle für das mikrobielle Gleichgewicht in der Natur

unterscheiden sich bezüglich ihrer:

Morphologie

Wirtsspezifität

lytischen Aktivität

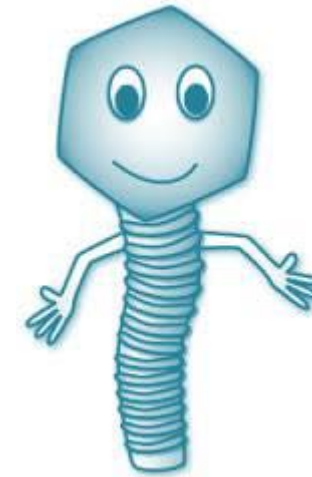
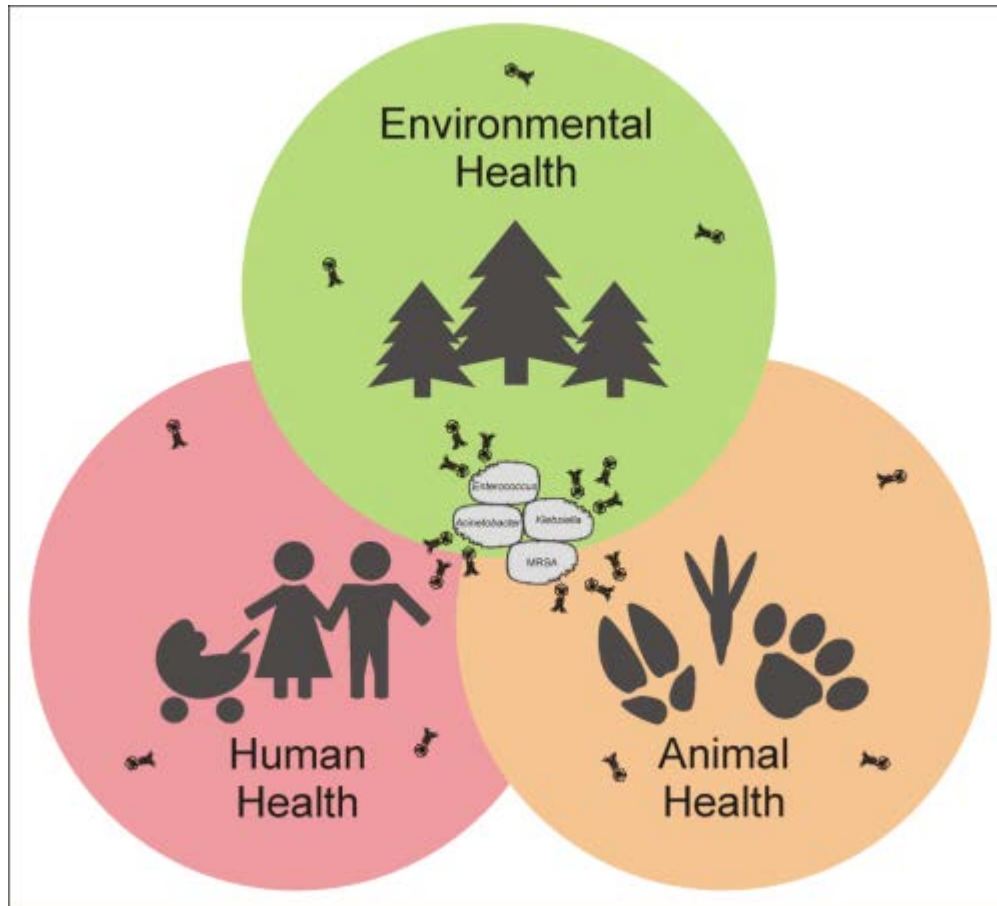
Lebensweise

Stabilität

Fähigkeit zum Gentransfer

Genome

Resistenzausprägung ihrer Wirte



Danke für Ihre Aufmerksamkeit

Bundesinstitut für Risikobewertung

Max-Dohrn-Str. 8-10 • 10589 Berlin

Tel. 030 - 184 12 - 0 • Fax 030 - 184 12 - 99099

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de