

37. OTDK Biológia Szekció

A bakteriofágok vér-agy gáton való átjutását elősegítő genetikai determinánsok azonosítása az antibiotikum-rezisztens patogének okozta agyi fertőzések kezelésére

Készítette:

Sala Dóra

Biológus MSc, Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatika Kar

Témavezetők:

Dr. Apjok Gábor, posztdoktor kutató

Dr. Kintses Bálint, tudományos főmunkatárs

Biokémia Intézet, Transzlációs Mikrobiológia Laboratórium, HUN-REN

Szegedi Biológia Kutatóközpont

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
1.1. Irodalmi áttekintés	5
1.2. Az antibiotikum- rezisztencia jelentősége, kihívásai	5
1.3. Fágterápia, mint alternatív terápiás eljárás az AMR kezelésére	5
1.4. Bakteriofágok kapcsolata az emberi szervezettel	9
1.5. A vér- agy gát, mint nagy szelektivitású barrier	10
1.5.1. Agyi endotél sejtek, szoros- és adherens kapcsolatok	10
1.5.2. Asztrociták, periciták	11
1.6. Bakteriofágok és a központi idegrendszer	12
1.7. Bakteriofágok terápiás alkalmazása a központi idegrendszerben	14
2. Célkitűzések	14
3. Anyagok és módszerek	16
3.1. Virális szűrletek előkészítése	16
3.2. A vér- agy gát modell sejtjeinek tenyésztése	16
3.3. Virális szűrletek tesztelése a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás	17
3.4. BASEL fágkollekció tesztelése a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás	19
3.5. A szekvenálási eredmények kiértékelése, bioinformatikai analízise az átjutás háttérben álló genetikai elemek azonosítására	19
3.6. Génmódosított fágok előállítása	20
3.6.1. Donor plazmidok előállítása Golden Gate klónozási technológiával	20
3.7. A doménekkel rendelkező plazmidokat tartalmazó <i>E. coli</i> BW25113 sejtek előállítása	21
3.8. Az <i>Escherichia coli</i> Ernst-Beyeler (EB) fág módosítása <i>in vivo</i> rekombinációval	21
3.9. A rekombináns fágok azonosítása, feldúsítása	21
3.10. A megfelelő doménekkel módosított fágok DNS izolálása, szekvenálása	22
4. Eredmények	23
4.1. A vér-agy gát modellen áthatoló fágok körében domináns genetikai elemek	23
4.1.1. Ig-szerű domén (IPR013783)	24
4.1.1.1. PKD-domén (IPR000601)	25
4.1.1.2. BACON (IPR024361)	25
4.1.2. Lizozim- szerű domén (IPR013783)	26
4.2. A BASEL fágkollekcióból származó, a genetikai módosítások alapjául szolgáló fág	26
5. Diskusszió	27

6. Köszönetnyilvánítás	30
7. Irodalomjegyzék	30

Rövidítések jegyzéke

AD- Alzheimer-kór

AJ- adherens kapcsolatok

AMR- antimikrobiális rezisztencia

BACON- *Bacteroidetes*- Asszociált Szénhidrát-kötő Gyakran N-terminális domén

BBB- vér-agy gát

cARLA- pCPT-cAMP + Ro-20-1724 + LiCl + A 83-01 kismolekula-kombináció

CNS- központi idegrendszer

CSF- agy-gerincvelői folyadék

DMSO- dimetil szulfoxid

EB- Ernst- Bayeler fág (*Escherichia* phage vB_EcoP_ErnstBeyeler, Bas67)

FBS- főtális borjúsérum

HGT- horizontális géntranszfer

NVU- neurovaszkuláris egység

PD- Parkinson-kór

PFU- plakk képző egység

PKD- Policisztás Vesebetegség Domén

TEER- transzendentáliális elektromos ellenállás

TJ- szoros kapcsolatok

WHO- Egészségügyi Világszervezet

1. Bevezetés

1.1. Irodalmi áttekintés

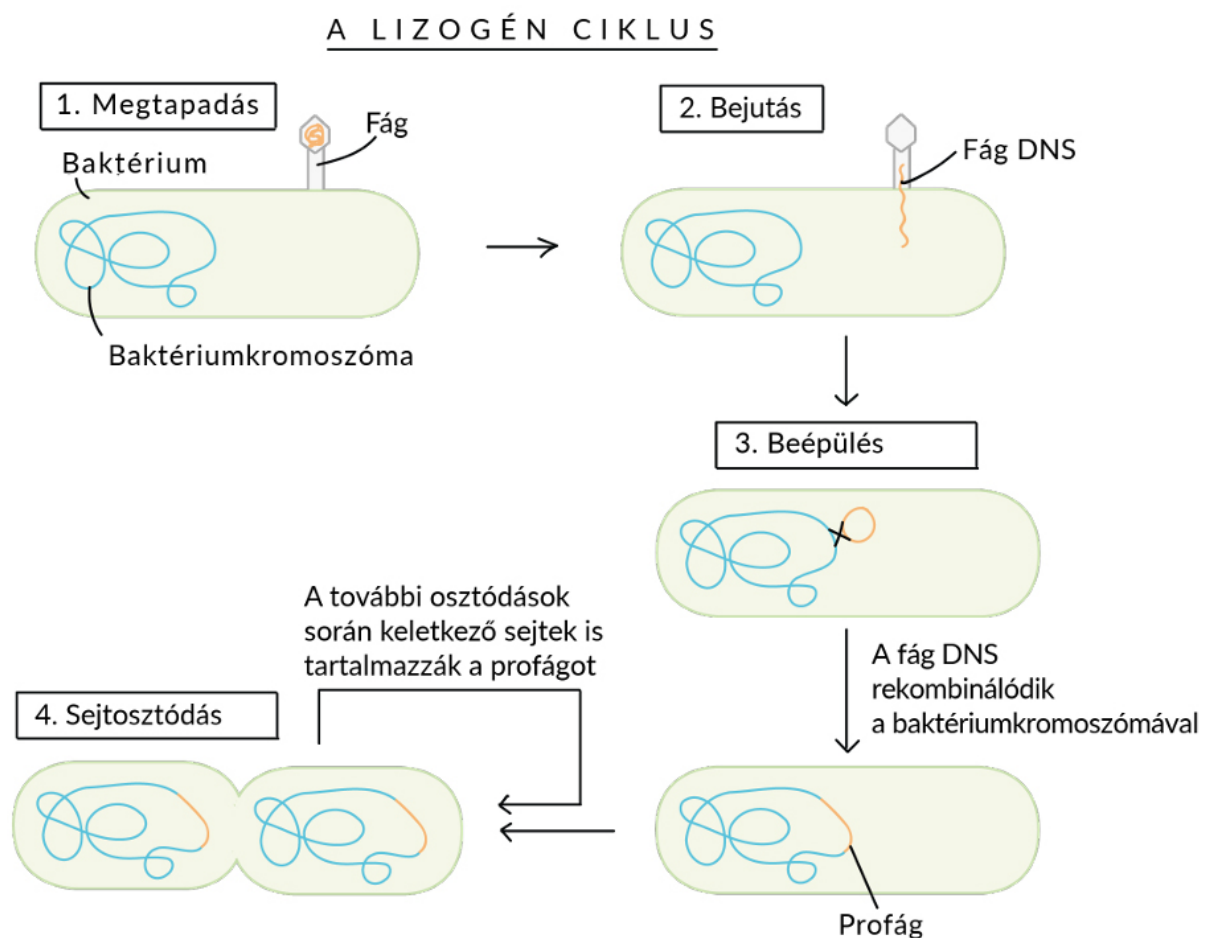
1.2. Az antibiotikum- rezisztencia jelentősége, kihívásai

A 21. század egyik legnagyobb egészségügyi kihívását az antimikrobiális rezisztencia (antimicrobial resistance, AMR) terjedésére való válaszadás jelenti. Az 1960-as és 1980-as évek között a gyógyszeriparban számos különböző antibiotikum került kifejlesztésre a rezisztencia problémájának megoldására, ezt azonban az újonnan piacra bocsátott antimikrobiális szerek számának visszaesése követte (Ventola, 2015). Az újfajta antibiotikumok előállításának lelassulása mellett, mára az Egészségügyi Világszervezet (WHO) hivatalosan is elismerte, hogy az AMR az antibiotikumok és más antimikrobiális szerek hatékonyságának jelentős csökkenéséhez vezetett, ami a fertőző betegségek kezelését rendkívül megnehezíti, bizonyos esetekben pedig szinte lehetetlenné teszi (Murugaiyan és mtsai., 2022). Az egyre nagyobb számban megjelenő és erősödő rezisztenciával rendelkező baktériumok egyre több emberéletet követelnek: vizsgálatok szerint 2050-re évente 10 millió ember haláláért felelhetnek majd (Neill, 2014). Mindemellett, az antibiotikum-rezisztens törzsek által okozott fertőzések 2019-ben több mint 1,2 millió halálesetért voltak felelősek, ezzel meghaladva az AIDS és a malária együttes halálozási mutatóit (Murray és mtsai., 2022). Alternatív megoldást jelenthetnek például az antimikrobiális szerekkel szemben ellenálló enzimek inhibitorokkal való megcélzása (Ramsay & Tipton, 2017), az RNS- csendesítés (AMR gének kiütése) (Good & Stach, 2011), nanorészecskék alkalmazása (a fém jellegű nanorészecske részt vesz a baktérium növekedés gátlásában és a biofilmek kialakulását is befolyásolja) (Wang és mtsai., 2017), valamint mindezek mellett az antibiotikumok felfedezését megelőzően kutatott fágterápia is újra az érdeklődés középpontjába került (Reuter & Kruger, 2020).

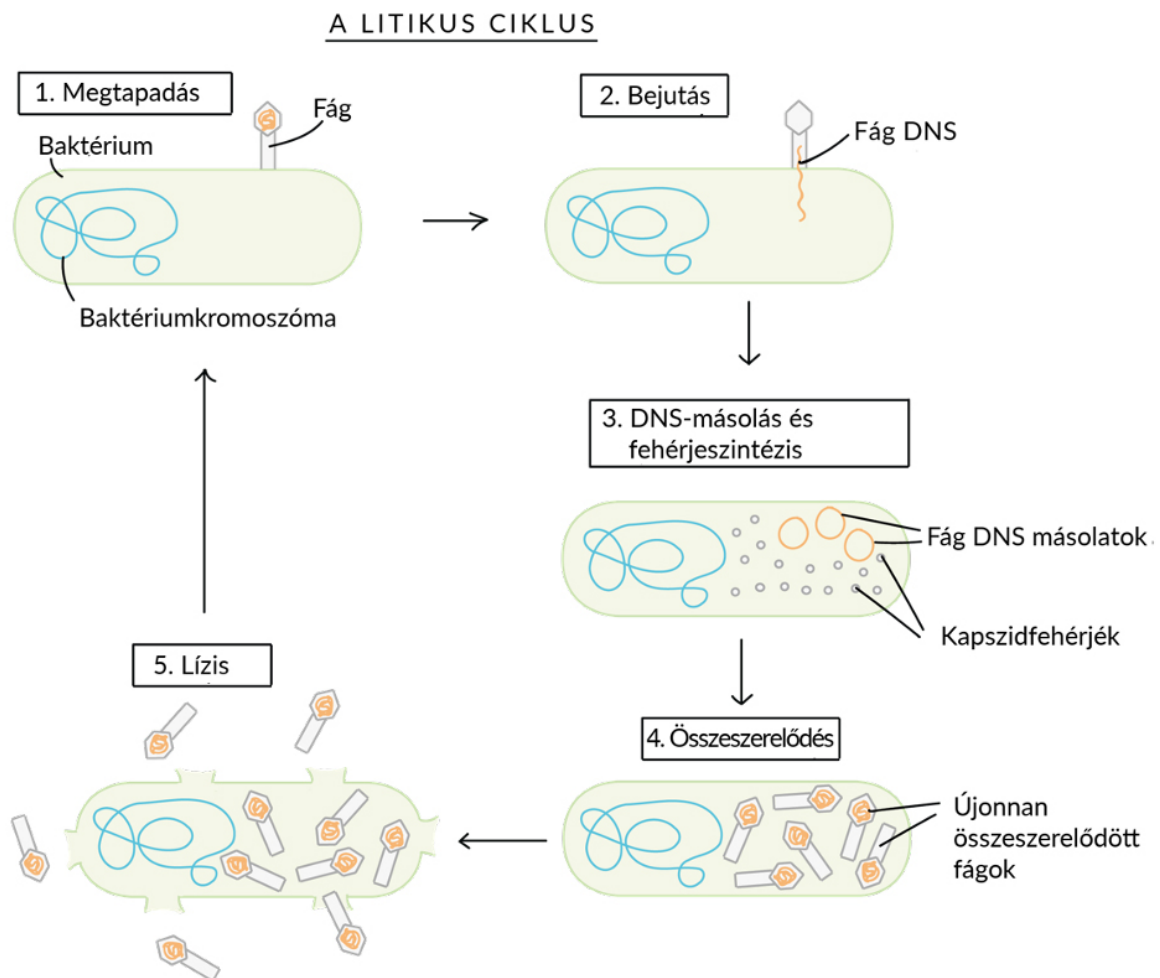
1.3. Fágterápia, mint alternatív terápiás eljárás az AMR kezelésére

A fágterápia során bakteriofágokat, avagy baktériumokat fertőző vírusokat alkalmaznak bakteriális fertőzések leküzdésére (Kasman & Porter, 2023). A fágok minden élettérben megtalálhatóak, a Földön legnagyobb számban előforduló, ugyanakkor a legváltozatosabb biológiai entitások (Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Taslem Mourosi és mtsai., 2022). Általában kétféle életciklussal rendelkezhetnek: lizogén (temperált), illetve litikus életciklus (Makky és mtsai., 2021). A temperált fágok a megcélzott baktériumsejt fertőzését követően

képesek beépíteni saját DNS-üket a gazdasejt genomjába, majd profágként nyugalmi állapotban maradva átadódhatnak az utódsejteknek (Makky és mtsai., 2021) (1. ábra). Ezzel szemben, ha egy fág litikus életciklust folytat, akkor a célsejt azonnali pusztulását tudja okozni (Makky és mtsai., 2021). A litikus ciklus során a fág hozzátapad a baktériumsejt felszínéhez (adszorpció) ezt követően bejuttatja örökítőanyagát (penetráció), átprogramozva a sejtet, hogy saját erőforrásait felhasználva új vírusrészecskék gyártásába kezdjen, ami végül a sejt halálát eredményezi (Clokic és mtsai., 2011) (2. ábra). Egyetlen fágfertőzés hatására akár 100 új vírus partikulum is felszabadulhat a lizált sejtéből (Orlova, 2009). Következtetésképp, ahhoz, hogy egy fág terapeutikumként alkalmazható legyen, litikus életciklussal kell rendelkeznie (Schooley és mtsai., 2017).



1. Ábra | A fágok lizogén életciklusának vázlatos lépései (Az ábra forrása: Módosított ábra Alberts és mtsai., 2022 ábrája alapján)



2. Ábra | A fágok litikus életciklusának vázlatos lépései (Az ábra forrása: Módosított ábra Alberts és mtsai., 2022 ábrája alapján)

A fágokat a hagyományos antibiotikumok ígéretes alternatívájaként tartják számon, mivel az antibiotikum terápiákhoz képest számos előnyük van. Szűk gazdaspecifitással rendelkeznek, azaz egy adott fág egy baktériumfaj csak néhány törzsét képest fertőzni (Ross és mtsai., 2016). A terápiásan alkalmazott fágok tehát azon baktériumokat, amelyek a normál mikrobiom részét képezik, érintetlenül hagyják (Khan és mtsai., 2022). A fágok továbbá ‘önadagoló’ terápiás ágenseknek tekinthetők és mivel képtelenek gazdasejt nélkül szaporodni, így automatikus feldúsulásuk a bakteriális fertőzés helyén fog bekövetkezni (Reuter & Kruger, 2020). Emellett kevésbé immunogének, így az említett tulajdonságoknak köszönhetően nincs dokumentált mellékhatásuk (Khan és mtsai., 2022). Mivel a fágok az antibiotikumoktól eltérő mechanizmusok révén fertőznek és pusztítanak, a specifikus antibiotikum-rezisztencia mechanizmusok kisebb eséllyel vezetnek fág-rezisztencia mechanizmusokhoz, így hatékony alternatívák az antibiotikum-rezisztens fertőzésekkel szemben (Lin és mtsai., 2017). Mindezek

mellett könnyen izolálhatók elérhető környezetekből, legyen szó szennyvizekről vagy más, magas baktérium koncentrációt tartalmazó hulladékokról. A fágokat kombinálva ún. "fág-koktélok" állíthatók elő, amelyekben a több különböző fág együttes antibakteriális hatást eredményez és minimalizálja a rezisztencia kialakulásának esélyét (Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

Potenciális limitáló tényező lehet a fágfertőzés következtében megemelkedett bakteriális endotoxin szint, amely akár szeptikus (endotoxikus) sokk kialakulásához is vezethet (Reuter & Kruger, 2020). Ez abban az esetben jelenthet problémát, ha a fág készítmény nincs megfelelő mértékben kitisztítva, vagyis a fágok előállítása során keletkező endotoxinok nem kerültek eltávolításra. A beadást követő, a terápiás fágok általi antibakteriális hatás eredményeként ugyan megnövekedhet az endotoxin szint, de nincs dokumentált eset arról, hogy ez veszélyes mértéket tudna öltetni, mitöbb, az antibiotikumok használata esetén nagyobb mértékű endotoxin-felszabadulás figyelhető meg (Hietala és mtsai., 2019).

A fágterápiának azonban korlátai is vannak, amelyek limitálhatják a fágok alkalmazását. A korábban előnyként említett szűk gazdaspecifitás egyben a fágterápia hátránya is. Az, hogy a fágok a bakteriális kórokozók csak egy szűk körét képesek célba venni, a fertőző betegségeket okozó baktériumfajok magas fokú diverzitása miatt komoly problémát jelent, amely akadályozza a fágok széleskörű alkalmazhatóságát (Gordillo Altamirano & Barr, 2019). Továbbá, a fágok, mint biológiai entitások, nem minősülnek innovatív találmánynak, nem szabadalmaztathatóak (De Vos és mtsai., 2019). Ezen felül fontos feltétel, hogy a fágok ne hordozzanak antibiotikum-rezisztenciát-, virulenciát biztosító-, vagy egyéb nem kívánatos géneket, mivel a fágok vektorként jelentős szereppel bírnak a horizontális géntranszferben (HGT), vagyis a genetikai információ élőlények közötti áramlásában (Makky és mtsai., 2021). A fágterápia hatékonyságának szempontjából fontos, hogy az alkalmazott fágok képesek legyenek elviselni az emberi szervezet nyújtotta belső környezetet és el tudjanak jutni a fertőzés helyére. A fágok jelentős része azonban immunválaszt indukál, amely következtében hamar eliminálódhatnak a szervezetből, még mielőtt kifejthetnék baktériumölő hatásukat (Dąbrowska & Abedon, 2019). Ezzel szemben a fágok jelenlétét az emberi szervezet számos olyan területén kimutatták, amelyek korábban nem számítottak a fágterápia célpontjainak, gyakorlatilag minden szervben azonosíthatók. Egyebek mellett képesek lehetnek átjutni különféle szelektív barrieréken, így elérve olyan immunprivilegizált szerveket is, mint a méhlepény vagy a központi idegrendszer. Annak feltérképezésében és megértésében, hogy melyek azok a determinánsok, amelyek a fágok szervezettel való együttműködését segítik, óriási potenciál rejlik. A megfelelő determinánsok ismerete lehetővé tenné a fágok és az immunrendszer közötti

interakciók finomhangolását, biztosítva ezzel a fágok hosszú távú stabilitását a szervezetben, valamint elősegítene a fágterápia célzott és hatékony alkalmazását (Jędrusiak és mtsai., 2023; Stupak és mtsai., 2024). Kutatásunk ezen determinánsok felkutatására fókuszál.

1.4.Bakteriofágok kapcsolata az emberi szervezettel

Az elmúlt évtized kutatásai rámutattak, hogy a bakteriofágok jelenléte kimutatható az emberi test számos területén, köztük olyanokkal, amelyeket korábban sterilnek tartottak, például a véráramban, a nyirokrendszerben, valamint különböző belső szervekben (tüdő, húgyutak, máj, vese, lép, agy stb.) (Nguyen S és mtsai., 2017). Ezek közül a bél-, illetve a szájüregi mikrobiota a legjobban jellemezett, amely elsősorban ezen helyek hozzáférhetőségének, illetve a fágok magas koncentrációban való előfordulásának tulajdonítható (Clokier és mtsai., 2011).

Az emberi szervezetben a fágok legnagyobb mennyiségben a bélrendszerben vannak jelen (Minot és mtsai., 2013). Innen a fágok folyamatosan felszívódnak az epitél sejtrétegen keresztül, hozzáférve így a belső szervezethez, ami akár napi 31 milliárd fágreszecske is jelenthet. A fágok, belépve a keringési rendszerbe, az alábbi interakciókat valósíthatják meg: (1) közvetlenül kölcsönhatásba léphetnek a humán sejtekkel, szövetekkel vagy szervekkel; (2) specifikus emlőssejtekhez kötődhetnek és endocitózis révén bejuthatnak azokba; (3) a velük együtt keringő bakteriális gazdaszervezetekhez kapcsolódhatnak; (4) vagy a mononukleáris fagocita rendszer eltávolíthatja őket (Barr, 2017). A fágok napi szintű, jelentős mennyiségű áramlása az emberi szervezetben potenciális egészségügyi hatással bírhat, valamint az immunrendszer működését is befolyásolhatja (Nguyen S és mtsai., 2017).

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a bélmikrobiom összetétele kulcsszerepet tölt be a kognitív és neurodegeneratív folyamatokban a bél-agy tengelyen keresztül. Egészen a közelmúltig a legtöbb kutatás a bakteriális komponensre fókuszált, mára viszont nyilvánvalóvá vált, hogy a szervezetben található fágok is óriási hatással bírnak a humán szervezet fiziológiájára (Morais és mtsai., 2021). A fágok a gazdabaktériumaik révén közvetett mechanizmusok által képesek befolyásolni az emlősök viselkedését és neurológiai működését (Barr, 2017). Embereken végzett tanulmányok során összefüggésbe hozták egyes fágok szervezeten belüli megnövekedett szintjét olyan kognitív funkciók javulásával, mint az emlékezet (memória) (Mayneris-Perxachs és mtsai., 2022).

1.5.A vér- agy gát, mint nagy szelektivitású barrier

A neurovaszkuláris egység (neurovascular unit, NVU) a központi idegrendszer (central nervous system, CNS) morfológiai és funkcionális egysége, amely alapvető szerepet játszik az idegsejtek normális működésének fenntartásában. Az NVU egy komplex hálózat, amelyben szoros szerkezeti és funkcionális kapcsolat áll fenn a kapilláris endotélsejtek, asztrociták, periciták, mikrogliák és neuronok között (Erdo és mtsai., 2016). Főként a vér- agy gát kialakításában, valamint a neurovaszkuláris csatolásban (neurovascular coupling) tölt be fontos szerepet (a neuronális aktivitás és az agyi véráramlás közötti szoros időbeli és regionális kapcsolat) (Phillips és mtsai., 2015).

A vér-agy gát (Blood-Brain Barrier, BBB) egy nagy szelektivitású barrier, amely a vérerek és az agyszövet határán található, elválasztva a keringő vért a CNS-től (Jędrusiak és mtsai., 2023). Ezen alacsony permeabilitású struktúra felfedezése többek között Paul Ehrlich nevéhez kötődik. A német orvos kutató az 1880-as években megfigyelte, hogy intravénásan a keringésbe juttatott anilinfesték az agyban nem diffundál, ellenben más szövetekkel, ahol gyors elszíneződés figyelhető meg (Oldendorf, 1984). Ez a felfedezés rámutatott az agyszövet határán egy olyan szelektív védvonal létezésére, amely gátolja bizonyos anyagok bejutását az agyba, védelmet biztosítva ezáltal a CNS-nek (Erdo és mtsai., 2016).

A BBB fő feladata az agyi homeosztázis fenntartása, amelyet a rajta keresztül zajló transzportfolyamatok szabályozásán át valósít meg. Szerepének betöltését többféle sejtből álló morfológiája határozza meg (Alahmari, 2021). Anatómiai alapját az agyi kapillárisok falát alkotó endotélsejtek képezik, emellett asztrocita végtalpak (asztroglia), periciták, bazális membrán, szoros- illetve adherens kapcsolatok alkotják (Wu és mtsai., 2023) (3. ábra).

1.5.1. Agyi endotél sejtek, szoros- és adherens kapcsolatok

Az agyi kapillárisok falát alkotó endotélsejtek fontos szerepet játszanak a környező sejtek közötti kölcsönhatások kialakításában. Mind morfológiailag mind pedig funkciójukat tekintve különböznek a perifériásan elhelyezkedő endotélsejtektől (Anderson & Van Itallie, 2009). Szerkezetükben különböző transzporterek azonosíthatók, amelyek az anyagok be- és kiáramlását szabályozzák (Erdo és mtsai., 2016). Emellett felszínüket erős negatív töltés jellemzi, gátolva az ezzel megegyező töltéssel rendelkező vegyületek átjutását (Santa-Maria és mtsai., 2021). Ezenkívül megfigyelhető az endoteliális fenesztráció hiánya, vagyis felépítésüket tekintve nem rendelkeznek olyan apró nyílásokkal, amelyek elősegítenék a szabad diffúziót és

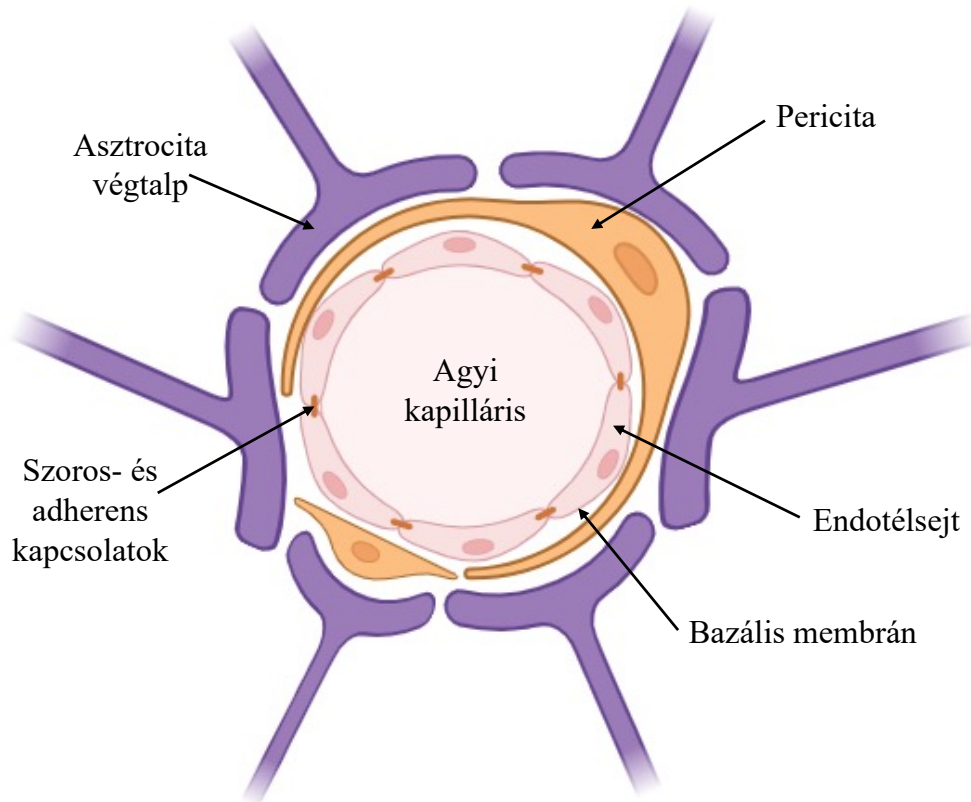
a molekulák gyors cseréjét a vér és az agyszövet között, ezzel jelentősen korlátozva az anyagok átjutását (Alhadidi és mtsai., 2017).

A BBB ő funkcionális összetevői közé tartoznak a szoros kapcsolatok (tight junctions, TJ) és az adherens kapcsolatok (adherens junction, AJ). Ezen funkcionális alkotóelemek biztosítják a BBB szerkezeti integritását és limitált áteresztőképességét (Wu és mtsai., 2023). A TJ-k korlátozzák a hidrofíl molekulák és a makromolekulák átjutását. Ezek az agyi endotélsejtekben 50-100-szor közelebb helyezkednek el egymáshoz, mint a perifériás kapillárisok esetében. Ez a jellegzetes morfológiai sajátosság korlátozza a molekulák passzív áthaladását, és magas transzendotéliális elektromos ellenállást (TEER) eredményez az érfalon (Alahmari, 2021), ami csökkenti a transzcelluláris úton áthaladó vezikulák számát (Tietz & Engelhardt, 2015).

1.5.2. Asztrociták, periciták

Az asztrociták a gerincesek CNS-ében legnagyobb mennyiségben előforduló, csillag alakú, polarizált gliasejtjei. Ezek a sejtek speciális végtalppal rendelkeznek, amelyek beborítják az agyi kapillárisok felületét (Alahmari, 2021). Az asztrociták pontos szerepe a BBB működésében még nem teljesen tisztázott, viszont bizonyított, hogy jelentős funkciót töltenek be a dinamikus jelátvitelben (Wu és mtsai., 2023).

A periciták az agyi kapilláris erek fala mentén helyezkednek el, az endotélsejtek és az asztrocita végtalpak között (Daneman és mtsai., 2010). Ezek befolyásolják az endotélsejtek működését olyan jelátviteli faktorok felszabadításával, amelyek meghatározzák a TJ-k számát. A periciták számának csökkenése magával vonja TJ-k mennyiségbeli csökkenését is (Daneman és mtsai., 2010). A BBB modulálásán és fenntartásán túl a pericitáknak szerepük van az agyi véráramlás szabályozásában, valamint a neuroinflammációs folyamatokban is, magas fagocitikus aktivitással rendelkezve (Daneman és mtsai., 2010).

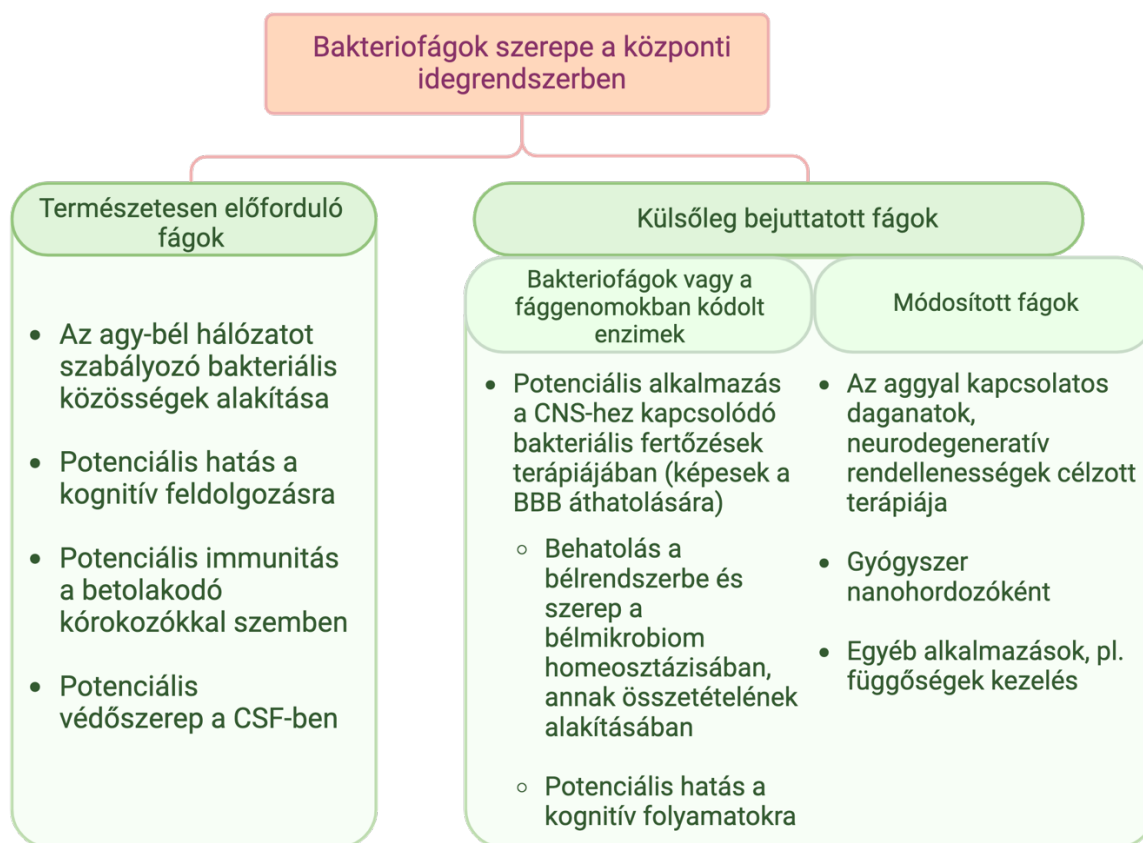


3. Ábra | A vér-agy gát morfológiai felépítése

1.6. Bakteriofágok és a központi idegrendszer

Az utóbbi évtizedben végzett kutatások egyik meglepő eredménye, hogy fágokat észleltek a humán szervezet olyan részein, ahol korábban nem feltételezték ezek jelenlétét. Egy ilyen területet képvisel az agy-gerincvelői folyadék (cerebrospinal fluid, liquor, CSF), amelyet mindaddig sterilnek tekintettek, mígnem 2019-ben felfedezést tettek vírus részecskék jelenlétéről a CSF-ben. Ezt követően, szekvenálás által elemezték a liquor összetételét bakteriális gazdaszervezetek után kutatva, amelyek a vírusok észlelésének lehetséges magyarázatául szolgálhattak volna. Meglepő módon az eredmények alapján a CSF baktériummentesnek bizonyult, amelyből arra lehet következtetni, hogy a fágok bakteriális gazdaszervezetek hiányában is megjelenhetnek ebben a közegben (Ghose és mtsai., 2019).

Több elmélet létezik annak magyarázatára, hogy a fágok miért vannak jelen a CNS-ben, amennyiben feltételezzük, hogy ott funkcionális szerepet töltenek be, és nem véletlenszerűen kerültek a CSF-be. A fágok lehetséges kölcsönhatásait az idegrendszerrel a 4. ábra foglalja össze (Jędrusiak és mtsai., 2023).



4.Ábra |A bakteriofágok lehetséges szerepe a központi idegrendszerben (Jędrusiak és mtsai. 2023 alapján)

Mint ahogy fentebb említésre került, a fágok a bélrendszerből a humán szervezet számos részébe eljuthatnak. Már a 20. század elején tettek megfigyeléseket arról, hogy bizonyos fágok átjuthatnak a vér-agy gáton, így elérve a CNS-t (Dubos és mtsai., 1943). A mechanizmusok, amelyek révén ezek a vírusok az epiteliális sejtrétegen áthatolnak, mai napig kutatások tárgyát képezik. Lehetséges útvonalként említhetjük a sejtréteg sérülése által biztosított belépési lehetőségeket, valamint a "Trójai faló" stratégiát. Ez utóbbi során a fágok baktériumsejtek által bekebelezve juthatnak át a sejtrétegen (Barr, 2017). Egy másik vizsgált mechanizmus az eukarióta sejtek általi endocitózis, amely a fágreszecskek szabad felvételét teszi lehetővé (Mařarik és mtsai., 2024). Továbbá, fonalas morfológiájú fágokkal végzett kísérletek kimutatták, hogy a CNS-be való bejutásukat követően a fágok az agyszövetben axonális transzport révén terjednek (Ksendzovsky és mtsai., 2012). Mostanáig a következő fágokról bizonyították, hogy képesek átjutni a BBB-en: T4, Ff és M13 fágok (Mařarik és mtsai., 2024).

1.7. Bakteriofágok terápiás alkalmazása a központi idegrendszerben

A BBB nagy szelektivitásának tulajdoníthatóan nem csak a potenciálisan káros anyagok bejutása, hanem az agyi betegségek kezelésére alkalmazott gyógyszerek 99,9% is gátolt (Gao és mtsai., 2024). A fágok CNS-be való behatolásának képessége, valamint az, hogy bejutva lokális antimikrobiális védőhatásokat közvetítenek, lehetővé teheti alkalmazásukat az agyat érintő különböző betegségek kezelésére (Barr, 2017).

A CNS-t érintő bakteriális fertőzéseket kiváltó leggyakoribb, ismert kórokozók lehetnek: *Mycobacterium spp.*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* és *Acinetobacter baumannii* fajok. A baktériumok különböző forrásokból származhatnak, terjedhetnek hematogén úton a szervezet más területeiről, illetve bejuthatnak a szervezetbe a felső légutakból, sérülések révén vagy sebészeti beavatkozások során is (Jędrusiak és mtsai., 2023). Az agyi területeken a baktériumok okozta fertőzések olyan súlyos betegségek kialakulásához vezethetnek, mint az agytályog, agyvelőgyulladás vagy akár bakteriális agyhártyagyulladás (Geyer és mtsai., 2019). Ez utóbbi számos különféle patogén baktérium fertőzése esetén bekövetkezhet. Ennek során a kórokozók bejutnak a szubarachnoidális térbe, ahol elsősorban az agyat és a gerincvelőt körülvevő három hártya közül az arachnoidea és a pia mater gyulladását idézik elő (Archibald & Quisling, 2013). Az eddigi gyakorlatban a betegség súlyosságának mérséklésére antibiotikus kezelést alkalmaztak. Azonban a multidrog-rezisztens baktériumtörzsek egyre szélesebb körű elterjedése következtében ennek hatékonysága folyamatosan csökken. Ez a helyzet új terápiás megközelítések kidolgozásának és alkalmazásának szükségességét veti fel (Nau és mtsai., 2015).

2. Célkitűzések

A bakteriofágok terápiás alkalmazásának lehetősége a CNS-t érintő fertőzések kezelésére ígéretes lehetőséget kínál, mivel ezek a bakteriális vírusok képesek hatékonyan pusztítani még a legerősebb antibiotikumokkal szemben ellenálló kórokozókat is. Ezen felül bizonyos fágok képesek áthatolni a BBB-en, hozzáférve ezáltal az agyi területekhez. Azonban a fágok BBB-en való átjutását biztosító genetikai determinánsok jelenleg nem ismertek. Kutatásunk elsődleges célja, hogy azonosítsuk a CNS-be jutó fágok azon genetikai jellemzőit,

amelyek hozzájárulhatnak e képességük megvalósulásához. Ezek feltárása hozzájárulhat a BBB-en történő áthatolás mechanizmusának mélyebb megértéséhez és alapul szolgálhat későbbi terápiás alkalmazások kidolgozásához.

Kísérleteink során a BBB átjárhatóságának vizsgálatára humán endotélsejtekből és borjú agyi pericitákból készült ko-kultúra BBB modellt alkalmaztunk. Első lépésben székletmintákból előállított virális szűrletet teszteltük a modellen a BBB-en való átjutás megfigyelésére. A modell vér- illetve agy felőli kompartmentet képviselő részeiből is fág DNS-t izoláltunk, majd a kapott mintákat újgenerációs szekvenálásnak vetettük alá. A szekvenálás eredményei alapján molekuláris analízisek segítségével összehasonlítottuk az áthatásra képtelen fágok genomját a BBB-en áthaladó fágok génállományával. Az összehasonlítás célja azoknak a genetikai determinánsoknak az azonosítása volt, amelyek a BBB-en átjutó fágokra voltak jellemzők. Ennek eredményeképpen nyolc domént azonosítottunk, amelyek többségükben Ig-szerű PKD és BACON domének voltak. Fágok esetében ezen doméneknek a fág- humán interakciók kialakításában feltételeznek szerepet (Barr és mtsai., 2013). Következő lépésben a BASEL fágkollekciót helyeztük a BBB modellre, majd kiválasztottunk egy olyan fágot, amely nem képes áthatolni a modellen, annak érdekében, hogy ez a fág (*Escherichia* phage vB_EcoP_ErnstBeyeler, MZ501064.1) genetikai módosításaink alapjául szolgáljon a továbbiakban. A meghatározott domének mindegyikét pSBC3 donor plazmidba illesztettük, majd elektroporálás által *Escherichia coli* BW25113 sejtekbe juttattuk. A sejtekbe juttatást követően fágfertőzés során homológ rekombináció által az Ernst-Beyeler fágot (EB) felruháztuk a jelölt doménekkal, vizsgálva, hogy mely szekvencia/szekvenciák birtokában kapja meg a barrieren való áthatolás képességét.

Kutatásunk fő motivációja a jövőre nézve, hogy a BBB átjutásában szerepet játszó genetikai determinánsok azonosításával lehetőséget biztosítsunk a fágok olyasfajta módosítására, amely által képesek lehetnek bejutni a CNS-be, átlépve a BBB-et. Ennek révén olyan rekombináns fágokat hozhatunk létre, amelyek képesek célba venni az agyi fertőzéseket okozó baktériumokat, hatékony agyi terapeutikumná alakítva így az egyébként natív formájukban a BBB áthatolására képtelen fágokat. Mindez lehetővé tenné az agyi bakteriális fertőzések szélesebb spektrumú targetálását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Virális szűrletek előkészítése

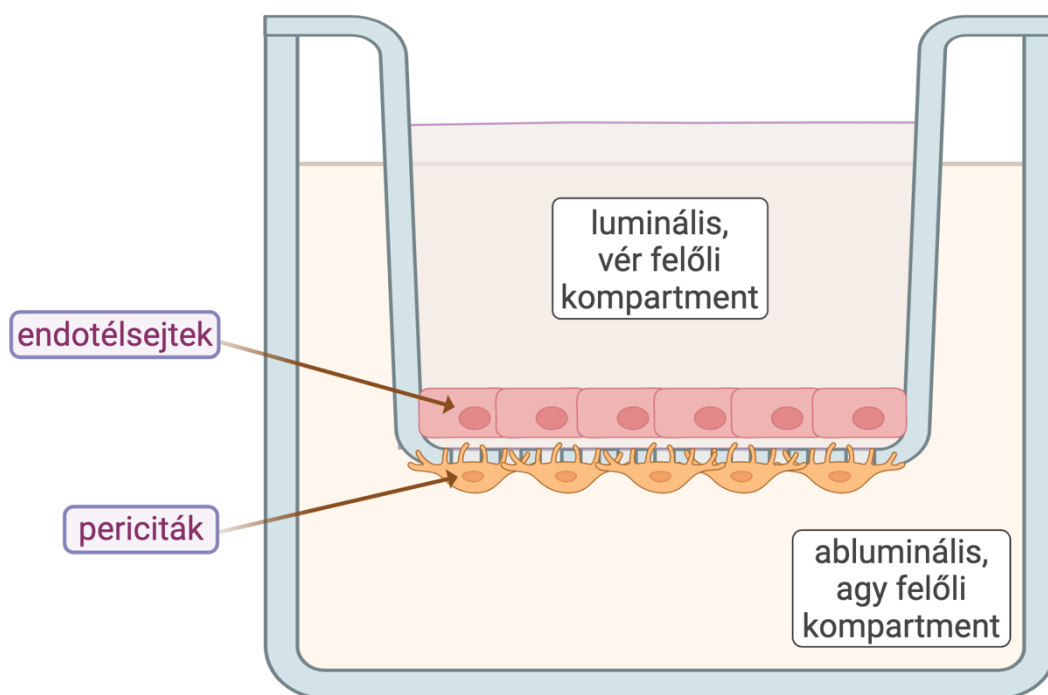
A vér- agy gáton való átjutás tesztelésére felhasznált fágokat 11 különböző forrásból származó humán székletmintából izoláltuk. A szűrletek előállítása korábban leírtak alapján történt (Shkoporov és mtsai., 2018), amelynek során 0,5 g székletmintát 10 ml SM pufferbe (50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 8,5 mM MgSO₄; pH 7,5) felszuszpendáltuk, majd 5 percig vortexeltük. Ezt követően a mintákat 5 percre jégre helyeztük, majd 5000 rpm-en, 10 percig, 4 °C-on centrifugáltuk, hogy eltávolítsuk a sejtes komponenseket. Következő lépésként a felülúszót steril 50 ml-es centrifugacsövekbe mértük át és a centrifugálást az előző paraméterek szerint megismételtük. Végül a fágokat tartalmazó felülúszót 0,45 µm pórusú PES szűrőn átszűrtük és a kapott filtrátumokat 4 °C-on tároltuk.

3.2. A vér- agy gát modell sejtjeinek tenyésztése

A BBB modellt Dr. Deli Mária Kutatócsoportja, a Biológiai Barrierek Kutatócsoport biztosította számunkra (5. ábra). A BBB modell humán köldökzsinórból izolált őssejtekből differenciált endotélsejteket és borjú agyi pericitákból épült fel, amelyeket Prof. Fabien Gosselet (Université d'Artois, Franciaország) biztosított. Az endotélsejtek tenyésztéséhez olyan tápfolyadékot használtak, amely 5% borjú szérumot (FBS, Sigma-Aldrich), 1% endotélsejt-növekedést serkentő oldatot (ECGS, ScienCell) és 50 µg/ml gentamicint (Sigma-Aldrich) tartalmazott. A BBB modell létrehozásához az endotélsejteket, amelyeket korábban 6-7 alkalommal passzáltak, borjú agyi pericitákkal ko-kultúrában kerültek tenyésztésre. A kultúrákat CO₂ inkubátorban, 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett növesztették. A pericitákat első lépésben 0,2%-os zselatinnal bevont 100 mm-es Petri-csészékben tenyésztették, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) tápfolyadékban, amelyhez 20% FBS-t (Sigma-Aldrich), 1% GlutaMAX-ot (Gibco) és 50 µg/ml gentamicint (Sigma-Aldrich) adtak. A pericitákat IV. típusú kollagénnel (Sigma-Aldrich, 100 µg/mL) bevont Transwell tenyésztőbetétek (Corning, 12 mm átmérő, polikarbonát membrán) alsó oldalára passzálták 1,8×10⁴ sejt/cm² sűrűségben. Ezt követően a sejteket 3 órán át 37 °C-on inkubálták, hogy megfelelően kitapadjanak a membrán alsó oldalára. A kitapadást követően a tenyésztőbetéteket 12-lyukú tenyésztőlemezbe helyezték, amely mindegyik lyukban 1,5 ml endotélsejt-tápfolyadékot tartalmazott. Az endotélsejteket ezután 7×10⁴ sejt/cm² sűrűségben, 0,5 ml

endotélsejt-tápfolyadékban a membrán felső oldalára passzálták, amely IV. típusú kollagénnel és fibronektinnel (Sigma-Aldrich, 25 µg/ml) volt bevonva.

A tenyésztőbetétek transwell tenyésztőedényekbe helyezésével két elkülönült térrész jött létre: egy felső (luminális, vér felőli) és egy alsó (abluminális, agy felőli) kompartment, ami lehetővé tette a permeabilitási kísérletek kivitelezését. Mindkét kompartmentben a tápfolyadékot 48 óránként frissítették. A ko-kultúra összeállítását követő negyedik napon az alsó kompartment tápfolyadékát lecserélték, míg a felső részben a sejteket 48 órán keresztül cARLA-val (pCPT-cAMP + Ro-20-1724 + LiCl + A 83-01 kismolekula-kombináció) kezelték. A kísérleteket a ko-kultúra létrehozását követő hatodik napon és 48 órával a kezelést követően végeztük el.

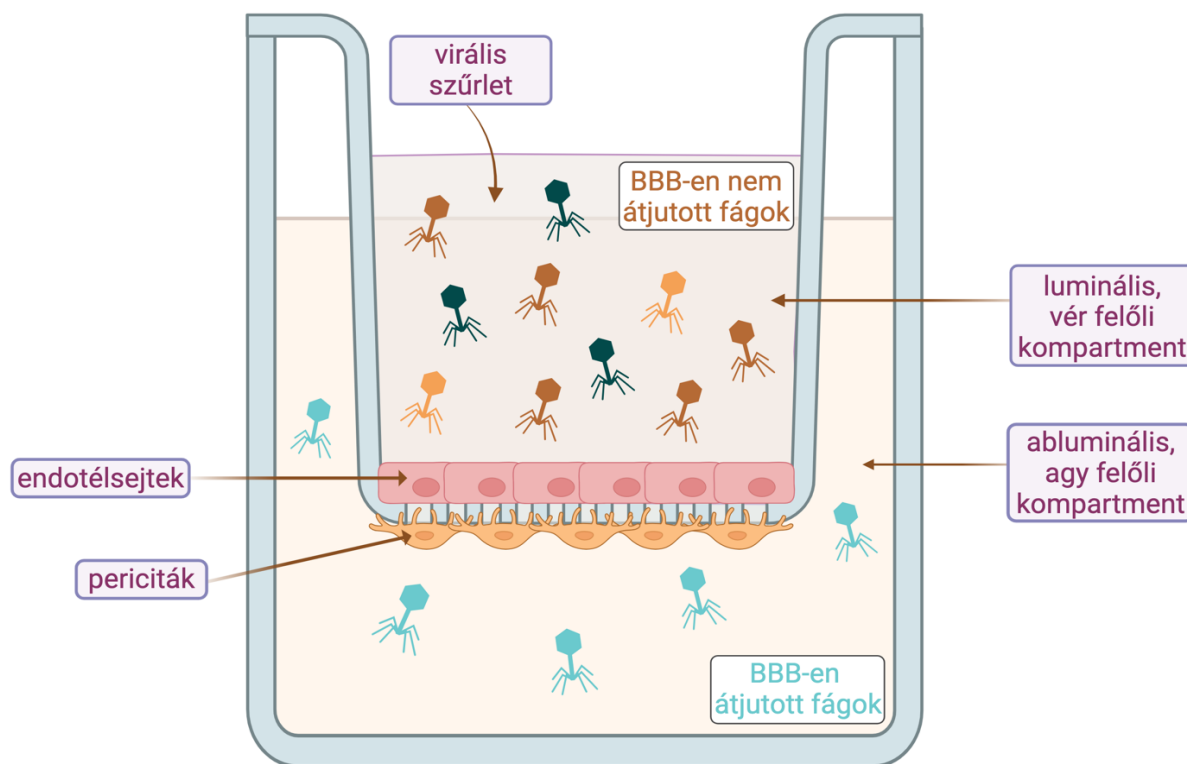


5. Ábra | A BBB modell sematikus ábrázolása

3.3. Virális szűrletek tesztelése a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás

Az előkészített fág szűrleteket a BBB modell luminális kompartmentjébe helyeztük (6. ábra), amelyet 2-3 óra várakozási idő követett. Az idő leteltével a modell rendszer felső- és alsó térfél médiumából kiszűrtük 0,45 µm pórusú PES szűrő segítségével a fág partikulumokat, majd fág DNS-t izoláltunk a két kompartment fág elegyéből, valamint az eredeti, a BBB modellre helyezett virális szűrletből is. A fág DNS izolálást a “Norgen Phage DNA Isolation Kit” felhasználásával végeztük, a gyártó protokollját követve. Kezdetben 5 ml-es mikrocentrifuga csőbe 1 ml-t helyeztünk a fág lizátumból. Ehhez 7,5 µl DNáz és 50 µl rDNáz puffert adtunk,

20 percig 37 °C-on inkubáltuk a mintát, majd 75 °C-on melegítéssel inaktiváltuk a DNÁzt. Hozzáadtunk 500 µl-t a Lízis B Pufferből (Lysis Buffer B), az elegyet 10 másodpercen keresztül összekevertük a mikrocentrifuga cső enyhe rázogatóásával. Ezt követte egy 15 perces, 65 °C-on történő inkubálás, amely alatt 2-3 alkalommal a lizátumot homogenizáltuk a fentebb említett módszerrel. Az inkubálást követően 320 µl izopropanolt adagoltunk az elegyhez, majd a vortexelés után, megkezdtuk a minta hozzákötését az anion cserélő oszlophoz. Ehhez gyűjtőcsőbe helyezve az oszlopot, 650 µl-t mértünk rá a lizátumból és ezt 1 percig 8.000 rpm-en centrifugáltuk. Ezt követően átmostuk az oszlopokat 400 µl mosóoldat (Wash Solution A) használatával, háromszori ismétléssel. A mosások után, egy végső alapos szárítást végeztünk 2 perces 14.000 rpm-en való centrifugálással. Az utolsó lépés a DNS elúciója volt, amely lépésnél eltérünk a gyártó által megadott protokolltól, a 75 µl elúciós B puffer (Elution Buffer B) helyett Milli-Q, ultratiszta vizet használtunk, majd 1 percig 8.000 rpm-en centrifugáltunk. Ezt követően a minta DNS koncentrációját NanoDrop segítségével mértük. A fágyszűrleteket újgenerációs szekvenálásra az Accel-NGS™ 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences; 10096) felhasználásával, a gyártó utasításait követve készítettük elő. A minták indexeléséhez xGen™ CDI Primers (Swift Biosciences; 10009794) primer-csomagot használtunk



6. Ábra | A BBB modell és a kísérleti elrendezés sematikus ábrázolása

3.4. BASEL fágkollekció tesztelése a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás

A BASEL fágkollekciót az előző „*Virális szűrletek tesztelése a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás*” fejezetben részletesen leírt eljárásnak megfelelően ráhelyeztük a BBB modellre. Szintén az előző fejezetben ismertetett módon a modell felső kompartmentjéből mintát véve, fág DNS-t izoláltunk majd újgenerációs szekvenálásra küldtük a mintát. Mindez azért volt fontos, hogy azonosítsunk egy olyan fágot, amely nem képes áthatolni a BBB által képviselt barrieren, ezáltal pedig a génmódosítási eljárásaink alapjául tud szolgálni.

3.5. A szekvenálási eredmények kiértékelése, bioinformatikai analízise az átjutás hátterében álló genetikai elemek azonosítására

A virális szűrlet BBB modellen végzett teszteléséből származó minták szekvenálási eredményei alapján, különböző statisztikai módszerek alkalmazásával meghatároztuk azokat a doméneket, amelyek szignifikáns jelenlétet mutatnak a BBB modellen keresztül átjutó fágok körében.

Az olvasatok trimmelését és minőség-ellenőrzését a Trimmomatic szoftverrel (v0.39) végeztük a következő parancssor használatával:

```
TrimmomaticPE      -threads      X      [reads_Fw].fastq.gz      [reads_R].fastq.gz
[Fw]_paired_output.fastq.gz      [Rev]_unpaired_output.fastq.gz      [Fw].fastq.gz
[R]_unpaired_output.fastq.gz      ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10      LEADING:3
TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:32
```

A szűrt olvasatok összeszereléséhez a metaSPAdes szoftvert alkalmaztuk a következő parancssor használatával (Nurk és mtsai., 2017):

```
spades --meta -t X -1 [paired]_R1_output.fastq.gz -2 [paired]_R2_output.fastq.gz -o
[]_metaspades_output
```

Az összeszerelt kontigok további analízise a MetaPhage szoftver segítségével történt (Pandolfo és mtsai., 2022).

A magas minőségű fág kontigokat a CheckV szoftver alkalmazásával azonosítottuk (Nayfach és mtsai., 2021).

A génpredikció saját szkript futtatásával történt.

A domének predikcióját az InterPro bioinformatikai online eszköz segítségével végeztük el (Blum és mtsai., 2021).

A mintákban található fág szekvenciák alapján domén-repertoár feltérképezést végeztünk, és amely domén kapcsán a Fisher-teszt alkalmazása szignifikáns jelenlétre utalt, azt a domént jelölként soroltuk be.

Arra, hogy az azonosított doménszekvenciák mely fehérjeszekvenciákkal mutatnak a legnagyobb hasonlóságot, az NCBI BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool for Proteins) adatbázist használtuk fel.

A jelölt doméneket tartalmazó leolvasási kereteket kiválasztva, a továbbiakban klónozásra használtuk fel ezeket.

A BASEL fágkollekcióval végzett kísérlet mintáiból származó szekvenálási eredmények összeszerelését a metaSPAdes szoftvert segítségével hajtottuk végre, a fent említett parancssort használva.

3.6. Génmódosított fágok előállítása

A továbbiakban a jelölt domén szekvenciákat Phusion PCR által felamplifikáltuk a gyártó által javasolt protokoll és reakciókeverékek összeállítása alapján (<https://www.fishersci.at/shop/products/phusion-high-fidelity-pcr-kit/p-9026018>), a virális szűrleteket használva templátként. A PCR program a következő paraméterekből állt: elő denaturáció 98 °C, 30 másodperc; denaturáció 98 °C, 10 másodperc; primerek megtapadása (annealing) kisebb primer $T_m + 3^{\circ}\text{C}$; 30 másodperc; polimerizáció (elongáció) 72 °C, 30 másodperc/kb, mindez 35 cikluson keresztül ismételve.

Ezt követte a felamplifikált domének vektorba inszertálása, amelyhez első lépésként fel kellett sokszoroznunk a vektorként szolgáló pSBC3 plazmidot. Ezt szintén Phusion PCR által valósítottuk meg, a korábban említett protokollnak megfelelően.

3.6.1. Donor plazmidok előállítása Golden Gate klónozási technológiával

Azt követően, hogy a jelölt doméneket, illetve a kiválasztott vektort felsokszoroztuk, Golden Gate klónozási technológiát alkalmaztunk GOI-t tartalmazó donor plazmidok előállítására. A protokollnak megfelelően első lépésben elkészítettük a reakcióelegyet, amely 0,5 µl T4 DNS ligázt, 2 µl 10X T4 DNS ligáz puffert, 0,5 µl AarI restrikciós enzimet, 100 ng donor plazmidot és ekvimoláris mennyiségű inszerteket (GOI, jobb- és bal homológ karok) tartalmazott, mindezt Milli-Q vízzel kiegészítve 20 µl végtérfogatra. A mintát PCR készülékbe helyezve a protokollnak megfelelő beállítások mellett

(<https://benchling.com/protocols/y1aCD7Q8/golden-gate-assembly-protocol-dueber>)

megvalósult az elegybe mért fragmensek összekapcsolása.

3.7. A doménekkal rendelkező plazmidokat tartalmazó *E. coli* BW25113 sejtek előállítása

Az összeszerelt, 8 különböző doménnel rendelkező plazmidokat *Escherichia coli* BW25113 sejtekbe juttattunk elektroporálás által. Ehhez 40 μ l elektrokompetens *E. coli* BW25113 sejtet összekeverve 10 ng plazmiddal elvégeztük az elektroporációt. Következő lépésként a kapott elegyet 1 ml előre felmelegített LB-hez mértünk és 1 órára inkubátorba helyeztük. Az idő leteltével a sejteket megfelelő antibiotikumokkal (ampicillin) ellátott agar lemezekre kentük ki, különböző hígításokban (1x, 10x, 100x), majd a lemezeket O/N 37 °C-on inkubátorba helyezve hagytuk a sejteket felnőni. A lemezekre ki nem öntött sejteket további 1 ml LB tápfolyadékkal és 2 μ l ampicillinnel láttuk el, majd O/N inkubáltuk. Következő nap ezeket a sejteket is szélesztettük ampicillines agar lemezekre, 1x, 10.000x, 100.000x hígításokban és O/N inkubáltuk.

3.8. Az *Escherichia coli* Ernst-Beyeler (EB) fág módosítása *in vivo* rekombinációval

A rekombináció kivitelezéséhez az előzőekben leírt, az O/N felnőtt sejt- kolóniákból pipettahegygel mintát vettünk és a mintákat 2 ml LB médiumba helyezve O/N inkubáltuk 37 °C-on. A sejteket másnap 1:50 arányban felhígítottuk LB-ben, majd rázó inkubátorban 37 °C-on, ~220 rpm-en növesztettük, amíg el nem érte az OD600 ~ 0,7 értéket. Ezt követően a baktérium sejteket összekevertük 10^6 plakk képző egység (PFU) mennyiségű EB fággal. 2-3 óra elteltével, amint a kultúra feltisztult, 10 perces centrifugálásnak vetjük alá (4 °C, 4500 rpm). A felülúszót 0,45 μ m-es PES szűrőn átszűrjük ahhoz, hogy sejt- és törmelékmentes lizátumot kapjunk. Végül, a nyert lizátumban lévő rekombináns fágok jelenlétét a lizátum 1000-szeres hígításából végzett Phusion PCR által igazoltuk (lásd: „Génmódosított fágok előállítása” rész).

3.9. A rekombináns fágok azonosítása, feldúsítása

Első lépésként meghatároztuk plakk esszék segítségével a fágokat tartalmazó lizátumokra jellemző plakk képző egységet 1 ml (PFU/ml) mennyiségre nézve. A plakk esszék elkészítéséhez a lizátumokat 96- lyukú mikrolemezben 10^{-7} mennyiségre hígítottuk. Ezután

kémcsövekbe 400 µl O/N növesztett *E. coli* BW25113 sejtet mértünk ki, majd ezekhez felolvasztott és kézmelegre visszahűtött 4 ml Top agart (0,7 agar feloldva 100 ml LB médiumban) adtunk. Az agar keveréket steril lemezekre kiöntöttük, majd hagytuk megszilárdulni (1-2 perc). Ezt követően a lizátum hígításokból 10 µl-t cseppentettünk a lemezekre, minden hígításból 2 cseppet téve. Az így elkészült lemezeket 37°C-on inkubáltuk addig, amíg plakkok megjelenését észleltük. A kapott plakk esszék alapján kiszámoltuk a fágok koncentrációját, melynek meghatározásával egyedi plakkok megjelenését tudtuk elérni a következő lépésekben.

A lizátumokban található rekombináns fágok azonosításához plakk esszéket készítettünk, a fentebb leírt folyamat alapján. A lemezek öntéséhez az optimális hígítás elérése érdekében felhasználtuk információként a lizátumok meghatározott fág koncentrációját. Az elkészült plakk esszékből 15-20 plakkból pipettahegy segítségével mintát vettünk, majd ezeket 40 µl 10x steril IDTE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA) pufferbe oldottuk. Ezek a minták szolgáltak a kolónia Phusion PCR reakció (lásd: „*Génmódosított fágok előállítása*” fejezetben) során templátként, ahol a rekombináció megtörténtét ellenőrizzük, egy specifikus primert használva a fág genomra és egyet a kívánt génre (gene of interest, GOI).

Azokból a plakkokból, amelyek a PCR reakció során megfelelő amplikont eredményeztek, pipettaheggyel mintát vettünk és a rekombináció folyamata során leírt dúsítási módszerrel szaporítottuk *E. coli* BW25113 sejteken. A kapott dúsítási elegyet 5 percre jégre helyeztük, majd átmérve steril 50 ml-es centrifugacsövekbe, 5000 rpm-en, 10 percig, 4 °C-on centrifugáltuk. Az így nyert felülúszót új, steril 50 ml-es centrifugacsövekbe mértük át, és a centrifugálást az előző paraméterek szerint megismételtük. Végül a fágokat tartalmazó felülúszót 0,45 µm pórusú PES szűrőn szűrtük át majd a kapott filtrátumokat 4 °C-os hűtőben tároltuk.

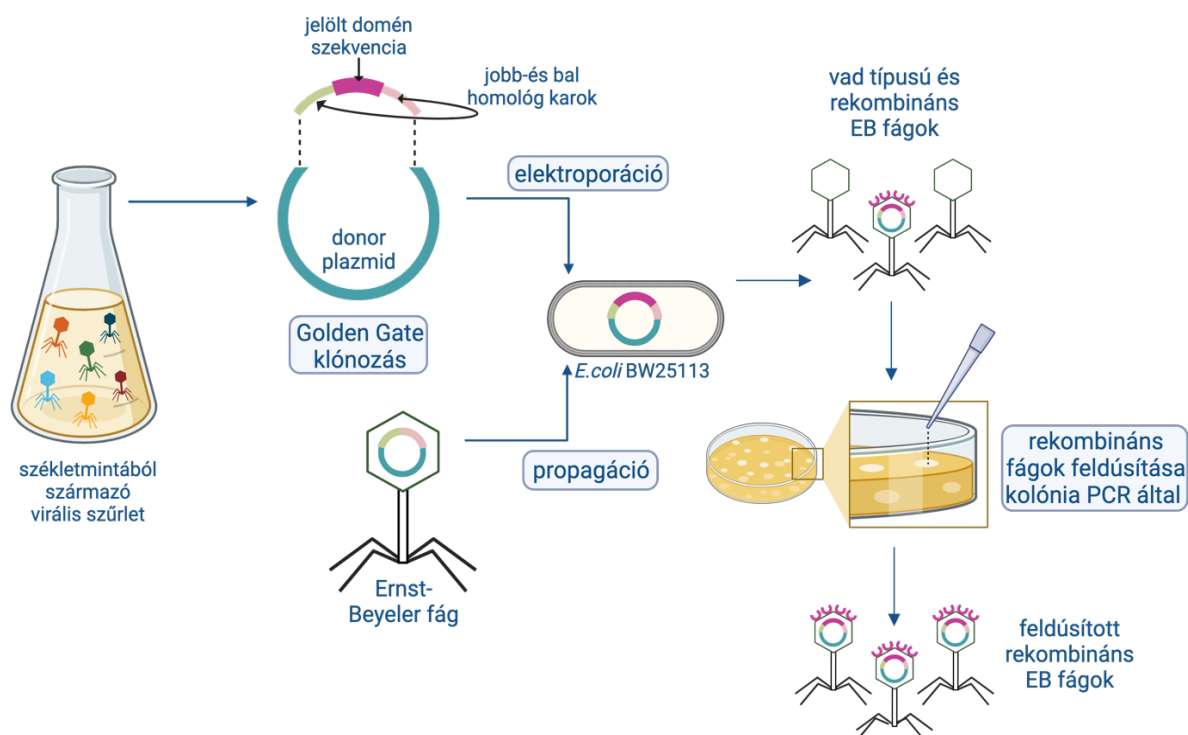
Az előállított lizátumok felhasználásával újabb plakk esszéket készítettünk, a képződött plakkokból újabb mintákat vettünk és a kolónia Phusion PCR (lásd: „*Génmódosított fágok előállítása*” című részt) eredménye alapján a megfelelő plakkokkal újabb dúsítást végeztünk. Mindezt azért, hogy a virális szűrletek végeredményként megfelelően nagy koncentrációban tartalmazzanak rekombináns fágokat.

3.10. A megfelelő doménekkel módosított fágok DNS izolálása, szekvenálása

Az előállított rekombináns fágokból DNS-t izoláltunk a Norgen Phage DNA Isolation Kit felhasználásával, követve a gyártó által megadott utasításokat (lásd: „*Virális szűrletek tesztelése*

a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás” részt). A bakteriofág DNS izolálását követően a DNS-koncentráció meghatározása NanoDrop segítségével történt. Az izolált fág-DNS mintákat ezt követően Újgenerációs szekvenálásra továbbítottuk, a GOI beillesztésének igazolása céljából, a „Virális szűrletek tesztelése a BBB modellen, fág DNS izolálás, szekvenálás” fejezetben ismertetett előkészítést követően.

A részletezett munkafolyamat egyes lépéseit a 7. ábra illusztrálja.



7. Ábra | A rekombináns Ernst-Beyeler fágok létrehozásának folyamata

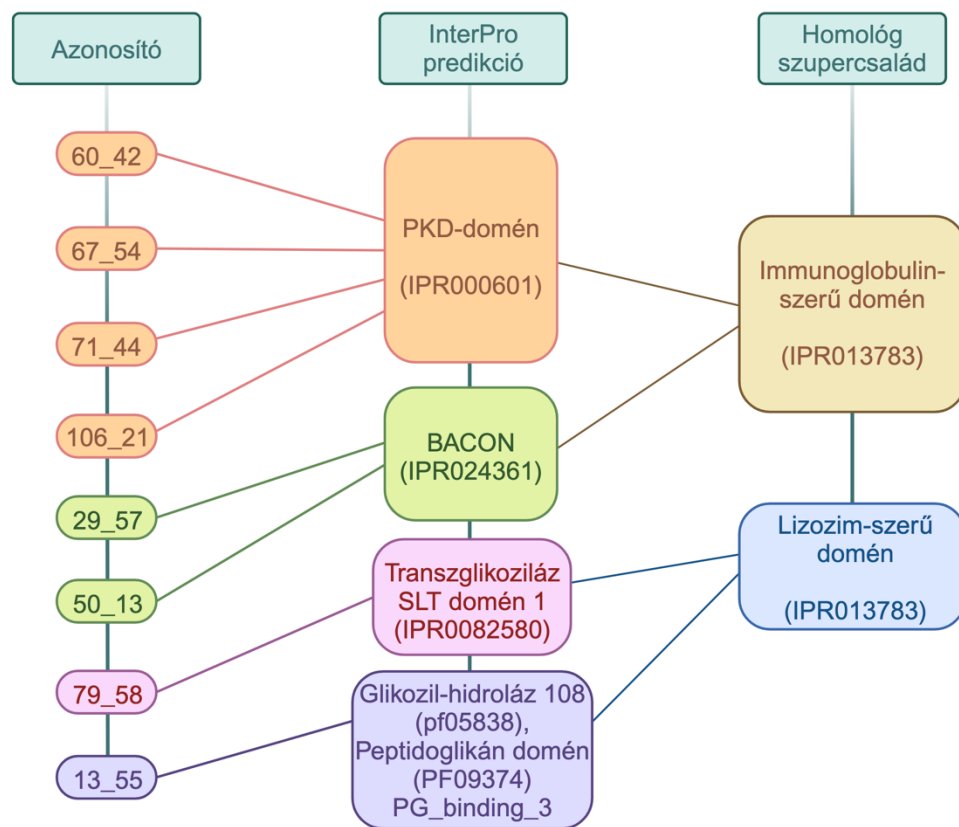
4. Eredmények

4.1. A vér-agy gát modellen áthatoló fágok körében domináns genetikai elemek

A vér-agy gáton átjutni képes és arra nem képes fágok genomjának elemzése rámutatott, hogy az átjutott fágok jelentős hányada immunglobulin (Ig)-szerű domént tartalmazó strukturális fehérjével rendelkezik, szemben azokkal a fágokkal, amelyek a kapillárisok, avagy a felső kompartment szintjén maradtak.

Szignifikánsan magas számban jelent meg az ún. Policisztás Vesebetegség Domén (Polycystic Kidney Disease, PKD) és a *Bacteroidetes*- Asszociált Szénhidrát-kötő Gyakran N-terminális

domén (*Bacteroidetes*-Associates Carbohydrate-binding Often N-terminal domain, BACON). Továbbá, megfigyelhető volt bizonyos fágok esetében a transzglykoziláz SLT domén 1, valamint peptidoglikán lizozim-szerű domének. A szignifikánsan feldúsult doméneket a 8. ábra foglalja össze.



8. Ábra | Az InterPro által prediktált domének a vér-agy gáton áthatoló fágok genomjában

4.1.1. Ig-szerű domének (IPR013783)

Az Ig-szerű domének jelenlétét a fágokban először 1996-ban írták le, amikor is ezeket a T4 fág Hoc fehérjéjében azonosították (Bateman és mtsai., 1997). Nagy gyakorisággal figyelhetők meg a farokkal rendelkező dsDNS fágok (*Caudovirales*) felszínén, amely esetben az osztály tagjainak mintegy 25%-ánál kimutatható a jelenlétük. Ezzel szemben más fág osztályoknál eddig nem azonosították őket (Almeida és mtsai., 2019). Funkciójuk még nem bizonyított, számos bizonyíték viszont arra utal, hogy ezek a domének kölcsönhatásba lépnek a célsejt felszínén lévő szénhidrátokkal és ezáltal szerepet játszanak a fágfertőzésben. Ez a fágfertőzésben betöltött szerep valószínűleg kiegészítő jelleggel bír és úgy nyilvánulhat meg, hogy segítenek a fágot a sejtfelszín közelében tartani azáltal, hogy nem specifikus kölcsönhatásokat közvetítenek a sejtfelszínen lévő szénhidrátokkal, amíg a fág kapcsolatban

nem lép a megfelelő receptorrall. Egyes hipotézisek szerint ezek a domének horizontálisan kerülnek át egyik vírusból a másikba. Ezt alátámasztja az a tény, hogy hasonló Ig-szerű domének találhatók olyan fehérjékben, amelyek az Ig-szerű doméneken kívül nem rokonok és amelyek egymástól teljesen független fágokból származnak. Ebből kifolyólag ezen domének megjelenési mintázatát csak a horizontális géntranszfer általi terjedéssel lehet megmagyarázni (Fraser és mtsai., 2007). Az Ig-szerű domének további feltételezett és részben bizonyított funkciója az emberi sejtekkel való kapcsolat biztosítása. Az epiteliális bélsejtek mukuszának kiemelkedő szerepe van a patogénekkel szembeni védelemben. A fágok képesek a mukuszhoz kapcsolódni a fágkapszid Ig-szerű doménjei és a mukuszt alkotó mucin glikoproteinek közötti kölcsönhatás révén (Barr és mtsai., 2013).

4.1.1.1. PKD-domén (IPR000601)

A PKD domént először egy policisztás vesebetegség fehérjében (polycystic kidney disease protein), a humán PKD1 gén által kódolt policisztin-1-ben (polycystin-1, PC-1) azonosították. Szerkezetét tekintve rendelkezik immunoglobulin (Ig)- szerű foldinggal, amely strukturális motívumról kimutatták, hogy szerepet játszik a sejtfelszíni fehérjék ligandkötő helyeinek kialakításában, így feltételezhető, hogy maga a PKD domén fontos szerepet tölt be intercelluláris adhézis folyamatokban (Bycroft és mtsai., 1999). Továbbá, kísérletek során rámutattak, hogy a PKD doménekkal szembeni antitestek megzavarják a sejt- sejt kapcsolatokat (Zhang és mtsai., 2020). Mindezek mellett feltételezik, hogy a PKD doménnek szerepe van egy epitélisejtekben megtalálható transzmembrán proteáz, a matriptáz stabilizálásában, aktiválásában, illetve lokalizációjában is (Yamashita és mtsai., 2022).

4.1.1.2. BACON (IPR024361)

Korábbi tanulmányok metagenomikai elemzések segítségével azonosították a BACON domént, amelyről feltételezik, hogy szerepet játszik a bélbaktériumok mucin glikoproteinekhez történő kötődésében (Mello és mtsai., 2010). Hasonló szerepet feltételeznek neki a fágok esetében is, vagyis segíti a fág- nyálkaréteg interakció létrejöttét (Rothschild-Rodriguez és mtsai., 2023). Fontos kiemelni, hogy feltehetőleg nem minden BACON domén vesz részt a mucinréteghez való kötődés közvetítésében (Rothschild-Rodriguez és mtsai., 2023). Ezt a BoGH5a endo-xiloglukanázzal végzett kísérletek is alátámasztják, mivel ebben az enzimben jelen lévő BACON domén egyetlen vizsgált szubsztrátot sem volt képes megkötni (Larsbrink és mtsai., 2014).

A BACON leggyakrabban a *Bacteroidetes* baktériumok szénhidrát-kötő fehérjében fordul elő. Ellenben az elnevezésével, direkt szerepe a szénhidrát-kötésben nem bizonyított (Larsbrink és mtsai., 2014). Az eddigi publikációk azt feltételezik, hogy segíti a különböző szénhidrát-kötő domének közötti kapcsolat kialakulását, viszont magának a doménnek nincsen szénhidrát-kötő funkciója (De Jonge és mtsai., 2019). Mindemellett, a crAss-fágok evolúciójának megértésében is szerepet játszhat. A crAss-fágok számos élőhelyen előfordulnak, de különösen nagy arányban vannak jelen az emberi és főemlősök mikrobiomjában, ahol a teljes virális DNS-tartalom akár 99%-át, illetve a székletben található összes DNS-tartalom mintegy 20%-át is alkothatják (Dutilh és mtsai., 2014a). Evolúciós kapcsolat mutatható ki a crAss-fágok és a BACON domén között azáltal, hogy egy jellegzetes crAss-fág fehérje a BACON domén tandem ismétlődését kódolja, és tudjuk azt, hogy a fehérjedomének tandem ismétlődési gyakran az evolúció fókuszpontjai (Dutilh és mtsai., 2014b).

4.1.2.Lizozim- szerű domén (IPR013783)

Korábban *Mycobacterium* gazdasejttel rendelkező fágokkal (D29) végeztek kísérleteket, amelyek során főként a gazdasejt lízise mögött álló mechanizmusokat vizsgálták. A kísérletek rámutattak arra, hogy a célsejtek lízisét a fágok által kódolt LysA endolizin katalizálja, amely a peptidkoglikán gyors hidrolízisét biztosítja. A LysA szerkezetében azonosított domének közül kiemelt figyelmet kapott a lizozim-szerű domén (lysozyme-like domain, LD), amelyet magas katalitikus aktivitású, peptidoglikán hidrolitikus képességgel rendelkező szerkezeti egységként azonosítottak (Joshi és mtsai., 2019).

4.2.A BASEL fágkollekción szarmazó, a genetikai módosítások alapjául szolgáló fág

Kutatásunk során, annak céljából, hogy az azonosított doméneknek a BBB-en keresztüli átjutásban betöltött feltételezett szerepét tesztelhesük, szükségünk volt egy olyan fág jelöltre, amely nem képes átjutni a gátrendszeren. Ennek kiválasztására a BBB modellen a BASEL fágkollekció áthatolási képességét vizsgáltuk. Ez a fággyűjtemény 68 különböző, *E. coli* baktériumok széles körét fertőzni képes fágot foglal magába (Maffei és mtsai., 2021). Eredményként az EB fágot azonosítottuk, mint podovírus morfológiával rendelkező, a BBB-en átjutni nem képes fágot.

5. Diszkusszió

Az AMR terjedése napjainkban jelentősen megnehezíti a fertőző betegségek kezelését, bizonyos esetekben akár teljesen ellehetetleníti azt. Az AMR krízishelyzete a humán szervezet számos részét érintő betegség tekintetében problémát jelent. Egy kritikus pontot képvisel az idegrendszer, melynek megközelítése a gyógyszermolekulák fejlesztésében is alapvető nehézséget jelent a vérerek és az agyszövet között elhelyezkedő nagy szelektivitású barriernek, a BBB-nek tulajdoníthatóan (Gao és mtsai., 2024).

Erre a problémára megoldást jelenthetnek a bakteriofágok (fágok), azaz a baktériumokat fertőző vírusok, amelyek képesek célzottan megtámadni és elpusztítani a baktériumsejteket. A fágok alkalmazása mellett számos érv szól, fő előnyük más terápiás módszerekkel szemben, hogy szűk gazdaspecifitással rendelkeznek és kimondottan a fertőzés helyén dúsulnak fel, mivel szaporodásukhoz nélkülözhetetlen a gazdasejt jelenléte (Gao és mtsai., 2024). Továbbá, a fágok könnyen izolálhatók környezeti forrásokból, például szennyvizekből, és kombinált, ún. "fág-koktélok" formájában széles antibakteriális hatásspektrum érhető el általuk, csökkentve a rezisztencia kialakulásának esélyét is (Loc-Carrillo & Abedon, 2011). A számos előny ellenére a fágterápia bizonyos korlátokkal is rendelkezik, amelyek limitálhatják a fágok terápiás alkalmazásának hatékonyságát. A legnagyobb előnyként említhető szűk gazdaspecifitás valójában kétélű kard, hiszen az, hogy a bakteriális kórokozók csak egy szűk körét tudják megcélózni, korlátozza alkalmazhatóságukat a patogén baktériumok nagyfokú diverzitásával szemben (Gordillo Altamirano & Barr, 2019). Emellett bizonyos fágok jelenléte nem tolerált a humán szervezetben, ami immunválasz kialakulásához vezethet (Dąbrowska & Abedon, 2019). Szabályozásbeli korlátként említhetjük a szabadalmazthatóságuk kapcsán felmerülő problémákat, mivel biológiai entitásokról beszélünk (De Vos és mtsai., 2019).

A fágok részét képezik a normál humán mikrobiomnak, jelenlétük a szervezet számos részén kimutatható. Legnagyobb gyakorisággal a bélrendszerben fordulnak elő, viszont jelenlétük olyan immunprivilegizált területeken is megfigyelhető, mint a központi idegrendszer (Gao és mtsai., 2024). Megjelenésük a fokozott védelemmel rendelkező központi idegrendszerben arra enged következtetni, hogy a fágok némelyike képes átjutni a nagy szelektivitású BBB-en. Ezen képességük feltérképezése új lehetőségeket kínálhat a terápiás alkalmazásukban, hiszen a BBB jelenleg jelentős akadályt képez a gyógyszermolekulák 99,9%-nak a központi idegrendszerbe való bejutásban (Gao és mtsai., 2024). Bár e terület ezidáig kevésbé kutatott, nagy potenciál rejlik a CSF-ben detektálható fágok részletes

tanulmányozásában. Kihasználva a fágok baktériumölő tulajdonságát és a BBB-en történő átjutási képességüket, ígéretes alternatívát jelenthetnek a jövőben az agyat érintő fertőzések kezelésére (Gao és mtsai., 2024).

Kutatásunk fő célja az volt, hogy azonosítsuk azokat a genetikai determinánsokat, amelyek szerepet játszhatnak a fágok szelektív barrieren keresztüli penetrálásában. Ahhoz, hogy a genetikai hátteret azonosíthassuk, humán endotélsejt és borjú agyi periciták ko-kultúrából felépülő vér-agy gát modellen *in vitro* teszteltük, hogy a székletmintákból előállított virális szűrletekből melyek azok a fágok, amelyek képesek átjutni a barrierrendszeren. Ezt követően, molekuláris analízisek során összehasonlítottuk a vér- agy gáton áthatolni képes fágok genomját a vérerek szintjén maradó fágok génállományával. Eredményeink azt mutatják, hogy a legnagyobb különbség az átjutott fágokra jellemző Ig-szerű PKD- és BACON doménekben rejlik. Szakirodalom alapján feltételezhető, hogy ezek a domének a sejtek közötti kapcsolatok, adhézíós folyamatok kialakulását segíthetik. A penetráló fágok körében nagy prevalenciát mutató domének azonosítását követően, azokat homológ rekombináció által az EB fág kapszid fehérjét kódoló régiójában ültettük be. Választásunk azért esett az EB fágra, mivel kísérleteink során kimutattuk, hogy ez a fág képtelen átjutni a BBB-en.

További célkitűzéseink közé tartozik, hogy a nagy gyakoriságot mutató domének mindegyikével sikeres rekombináns EB fágokat hozzunk létre, majd BBB modell segítségével leteszteljük, hogy az inszertált domének valóban hozzájárulnak-e az átjutási mechanizmushoz. Ezen túlmenően célunk a fágok széles körének olyan szintű genetikai módosítása az azonosított doménekkel, amely alkalmassá teszi őket a BBB átlépésére, lehetővé téve ezáltal széles spektrumú bakteriális fertőzések kezelését a központi idegrendszerben. Viszont a fágok nemcsak bakteriális eredetű agyi megbetegedések kezelésére lehetnek alkalmasak, hanem módosított formáik nanohordozóként is (fág-alapú vektorok) szolgálva ígéretesnek bizonyulnak, lehetővé téve a BBB által korlátozott hatóanyagok célzott szállítását, például agydaganatok kezelésében (Jędrusiak és mtsai., 2023).

A glioblasztómát, mint a leggyakoribb és legagresszívebb agydaganatot tartják számon. Egy ilyen betegség mellett a várható élettartam igencsak csekély, mindössze 14-15 hónap, csak a betegek 5%-a éli túl a diagnózist követő 5 évet (Lai és mtsai., 2014). A glioblasztóma jelenlegi standard kezelési protokollja a sebészi beavatkozást követően kemoterápiával kiegészített sugárkezelés. Az elmúlt években végzett kísérletek ezen daganat gyógyszeres kezelésére korlátozottak voltak a daganat komplexitása, a glióma őssejtek kemoterápiával és sugárkezeléssel szembeni rezisztenciája, valamint a BBB jelentette akadályok miatt (Le Rhun és mtsai., 2019). Mindez innovatív terápiás megoldások szükségességét veti fel, amelyek

képesek áthidalni a BBB nyújtotta korlátokat és hatékony gyógyszeres kezelést tudnak biztosítani. Ilyen innovatív terápiás eljárást jelenthetnek a genetikailag úgy módosított fágok, amelyek képesek specifikus hatóanyagok vagy terápiás ágensek szállítására (Jędrusiak és mtsai., 2023). Ezen felül a fágmegjelenítési (phage display) technika alkalmazásával olyan módosítások végezhetők rajtuk, amelyek lehetővé teszik, hogy a kapszidjaik felszínén specifikus receptorokat mutassanak be, amelyek nagy affinitással kötődnek a célmolekulákhoz (jelen esetben glioblasztóma sejtekhez) (Petrov és mtsai., 2022).

A gyakori neurodegeneratív betegségek közé tartozik az Alzheimer-kór (AD), valamint a Parkinson-kór (PD). A többek között demencia kialakulásához vezető AD betegség hátterében az agy bizonyos területein felhalmozódó fehérje-, ún. amiloid plakkok állnak (Messing, 2016). A PD esetén is megfigyelhetők aggregált fehérje felhalmozódások, amelyeket Lewy-testeknek neveznek. A Lewy-testek legnagyobb részét alfa-szinuklein alkotja. A PD elsősorban a motoros funkciókat befolyásolja és a tünetek akkor jelentkeznek, amikor az agy mozgást szabályozó területén, a bazális ganglionokban található idegsejtek károsodnak vagy elhalnak (Poewe és mtsai., 2017). Jelenleg az említett neurodegeneratív betegségekre nincs hatékony gyógyszeres kezelés, azonban a fágokkal végzett kísérletek ígéretes eredményeket mutatnak. Az M13 fággal kapcsolatos kutatások alapján feltételezhető, hogy a G3P fehérje (kis burokfehérje) képes előidézni az amiloid plakkok és az alfa-szinuklein lebomlását. (Messing, 2016).

Következtetésképpen, a BBB és a humán szervezetben előforduló fágok közötti kapcsolat egy új, feltáratlan kutatási területet képvisel. A fágok potenciális alkalmazásai közül ígéretesnek bizonyul az agyi bakteriális fertőzések kezelése. Ez különösen olyan esetekre nézve biztató, amikor az antibiotikumok nem hatékonyak, feltéve, hogy a fágok természetüktől fogva képesek áthatolni a BBB-en vagy ha genetikai módosítással ezen képességgel felruházzuk őket. Ezenkívül a fágok nanotechnológiai eszközként is alkalmazhatók, például fág-alapú vektorok kifejlesztésére, amelyek lehetővé teszik gyógyszerek szállítását az agyba. A fágok módosítása révén olyan szállítórendszerek alakíthatók ki, amelyek képesek átlépni a BBB-t és célzottan támadni a specifikus agyi célpontokat, lehetővé téve ezzel olyan betegségek, mint például a glioblasztóma- vagy akár neurodegeneratív betegségek (AD, PD) kezelését (Jędrusiak és mtsai., 2023).

6. Köszönetnyilvánítás

Mélyszéges hálával tartozom Dr. Apjok Gábornak a végtelen türelméért, a felém tanúsított állandó pozitív hozzáállásáért, valamint a mindig rendelkezésre álló segítségéért és útmutatásaiért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Kintses Bálintnak, aki szakmabeli fejlődési lehetőséget biztosított azáltal, hogy a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémia Intézetének Transzlációs Mikrobiológia Laboratóriumának csapatát erősíthetem.

Köszönöm a Kutatócsoport valamennyi tagjának a felmerülő kérdéseimben nyújtott állandó segítségét, valamint, hogy barátságos környezetet teremtenek a mindennapi munkavégzéshez.

Végezetül pedig, hálával tartozom a Páromnak és a Családomnak a mindenkori támogatásukért és a választott szakmán iránt mutatott érdeklődésükért.

7. Irodalomjegyzék

Alahmari, A. (2021). Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plasticity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6564585>

Alhadidi, Q., Shahdaat Bin Sayeed, M., & A. Shah, Z. (2017). The Interplay between Cofilin and Phospho-Cofilin: Its Role in Maintaining Blood Brain Barrier Integrity. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 16(3), 279–290. <https://doi.org/10.2174/1871527316666170117115040>

Almeida, G. M. F., Laanto, E., Ashrafi, R., & Sundberg, L. R. (2019). Bacteriophage adherence to mucus mediates preventive protection against pathogenic bacteria. *mBio*, 10(6), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01984-19>

Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>

- Archibald, L. K., & Quisling, R. G. (2013). Central Nervous System Infections. In A. J. Layon, A. Gabrielli, & W. A. Friedman (Szerk.), *Textbook of Neurointensive Care* (o. 427–517). Springer London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5226-2_22
- Barr, J. J. (2017). A bacteriophages journey through the human body. *Immunological Reviews*, 279(1), 106–122. <https://doi.org/10.1111/imr.12565>
- Barr, J. J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K. L., Erb, M. L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A. S., Doran, K. S., Salamon, P., Youle, M., & Rohwer, F. (2013). Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), 10771–10776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>
- Bateman, A., Eddy, S. R., & Mesyanzhinov, V. V. (1997). A member of the immunoglobulin superfamily in bacteriophage T4. *Virus Genes*, 14(2), 163–165. <https://doi.org/10.1023/A:1007977503658>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>
- Borodovich, T., Shkoporov, A. N., Ross, R. P., & Hill, C. (2022). Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. *Gastroenterology Report*, 10(March), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goac012>
- Bycroft, M., Bateman, A., Clarke, J., Jhamill, S., Sandford, R., Lthomas, R., & Chothia, C. (1999). The structure of a PKD domain from polycystin-1: Implications for polycystic kidney disease. *EMBO Journal*, 18(2), 297–305. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.297>
- Clokier, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>

- Dąbrowska, K., & Abedon, S. T. (2019). Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(4), 1–25. <https://doi.org/10.1128/membr.00012-19>
- Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St. John, J. A., Ekberg, J. A. K., Batzloff, M., Ulett, G. C., & Beacham, I. R. (2014). Pathogens penetrating the central nervous system: Infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 691–726. <https://doi.org/10.1128/CMR.00118-13>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- De Jonge, P. A., Von Meijenfeldt, F. A. B., Van Rooijen, L. E., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019). Evolution of BACON domain tandem repeats in crassphage and novel gut bacteriophage lineages. *Viruses*, 11(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/v11121085>
- De Vos, D., Verbeken, G., Quintens, J., & Pirnay, J.-P. (2019). Phage Therapy in Europe: Regulatory and Intellectual Property Protection Issues. In *Phage Therapy: A Practical Approach* (o. 363–377). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26736-0_15
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Dubos, R. J., Straus, J. H., & Pierce, C. (1943). THE MULTIPLICATION OF BACTERIOPHAGE IN VIVO AND ITS PROTECTIVE EFFECT AGAINST AN EXPERIMENTAL INFECTION WITH SHIGELLA DYSENTERIAE. *The Journal of experimental medicine*, 78(3), 161–168. <https://doi.org/10.1084/jem.78.3.161>
- Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G. Z., Boling, L., Barr, J. J., Speth, D. R., Seguritan, V., Aziz, R. K., Felts, B., Dinsdale, E. A., Mokili, J. L., &

- Edwards, R. A. (2014a). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>
- Dutilh, B. E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S. E., Silva, G. G. Z., Boling, L., Barr, J. J., Speth, D. R., Seguritan, V., Aziz, R. K., Felts, B., Dinsdale, E. A., Mokili, J. L., & Edwards, R. A. (2014b). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>
- Erdo, F., Hutka, B., & Dénes, L. (2016). A vér-agy gát működése, öregedése és diszfunkciója. Átjutás a barrieren. *Orvosi Hetilap*, 157(51), 2019–2027. <https://doi.org/10.1556/650.2016.30633>
- Fraser, J. S., Maxwell, K. L., & Davidson, A. R. (2007). Immunoglobulin-like domains on bacteriophage: weapons of modest damage? *Current Opinion in Microbiology*, 10(4), 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.018>
- Gao, J., Xia, Z., Gunasekar, S., Jiang, C., Karp, J. M., & Joshi, N. (2024). Precision drug delivery to the central nervous system using engineered nanoparticles. *Nature Reviews Materials*, 9(8), 567–588. <https://doi.org/10.1038/s41578-024-00695-w>
- Geyer, S., Jacobs, M., & Hsu, N. J. (2019). Immunity against bacterial infection of the central nervous system: An astrocyte perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00057>
- Ghose, C., Ly, M., Schwanemann, L. K., Shin, J. H., Atab, K., Barr, J. J., Little, M., Schooley, R. T., Chopyk, J., & Pride, D. T. (2019). The Virome of Cerebrospinal Fluid: Viruses Where We Once Thought There Were None. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02061>
- Ghosh, N., & Maxfield, R. (1997). Vol. 77, No. 3, July 1997 Printed in U.S.A. *Physiol Rev*, 77(3), 759–803.

- Good, L., & Stach, J. E. M. (2011). Synthetic RNA silencing in bacteria - antimicrobial discovery and resistance breaking. *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00185>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 1–25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Hietala, V., Horsma-Heikkinen, J., Carron, A., Skurnik, M., & Kiljunen, S. (2019). The Removal of Endo- and Enterotoxins From Bacteriophage Preparations. *Frontiers in Microbiology*, 10(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01674>
- Jędrusiak, A., Fortuna, W., Majewska, J., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2023). Phage Interactions with the Nervous System in Health and Disease. *Cells*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/cells12131720>
- Joshi, H., Nair, G., Gangakhedkar, R., & Jain, V. (2019). Understanding the role of the lysozyme-like domain of D29 mycobacteriophage-encoded endolysin in host cell lysis and phage propagation. *Microbiology (United Kingdom)*, 165(9), 1013–1023. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000831>
- Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2023). *Bacteriophages*.
- Khan, A., Rao, T. S., & Joshi, H. M. (2022). Phage therapy in the Covid-19 era: Advantages over antibiotics. *Current Research in Microbial Sciences*, 3(February), 100115. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100115>
- Ksendzovsky, A., Walbridge, S., Saunders, R. C., Asthagiri, A. R., Heiss, J. D., & Lonser, R. R. (2012). Convection-enhanced delivery of M13 bacteriophage to the brain. *Journal of neurosurgery*, 117(2), 197–203. <https://doi.org/10.3171/2012.4.JNS111528>
- Lai, R. K., Chen, Y., Guan, X., Noursome, D., Sharma, C., Canoll, P., Bruce, J., Sloan, A. E., Cortes, E., Vonsattel, J. P., Su, T., Delgado-Cruzata, L., Gurvich, I., Santella, R. M., Ostrom, Q., Lee, A., Gregersen, P., & Barnholtz-Sloan, J. (2014). Genome-wide methylation analyses in glioblastoma multiforme. *PLoS ONE*, 9(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089376>

- Larsbrink, J., Rogers, T. E., Hemsworth, G. R., McKee, L. S., Tauzin, A. S., Spadiut, O., Klintner, S., Pudlo, N. A., Urs, K., Koropatkin, N. M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., Kelly, A. G., Cederholm, S. N., Davies, G. J., Martens, E. C., & Brumer, H. (2014). A discrete genetic locus confers xyloglucan metabolism in select human gut Bacteroidetes. *Nature*, 506(7489), 498–502. <https://doi.org/10.1038/nature12907>
- Le Govic, Y., Demey, B., Cassereau, J., Bahn, Y. S., & Papon, N. (2022). Pathogens infecting the central nervous system. *PLoS Pathogens*, 18(2), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010234>
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 80(6976), 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- Liu, D., Van Belleghem, J. D., de Vries, C. R., Burgener, E., Chen, Q., Manasherob, R., Aronson, J. R., Amanatullah, D. F., Tamma, P. D., & Suh, G. A. (2021). The safety and toxicity of phage therapy: A review of animal and clinical studies. *Viruses*, 13(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v13071268>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- Maffei, E., Shaidullina, A., Burkolter, M., Heyer, Y., Estermann, F., Druelle, V., Sauer, P., Willi, L., Michaelis, S., Hilbi, H., Thaler, D. S., & Harms, A. (2021). Systematic exploration of Escherichia coli phage-host interactions with the BASEL phage collection. In *PLoS Biology* (Köt. 19, Szám 11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001424>
- Makky, S., Dawoud, A., Safwat, A., Abdelsattar, A. S., Rezk, N., & El-Shibiny, A. (2021). The

- bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100050. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100050>
- Maľarik, T., Bhide, K., Talpašová, L. & Bhide, M. Mphages and the Blood-Brain Barrier: A Review. *Folia Veterinaria*, 2024, Sciendo, vol. 68 no. 1, pp. 15-21. <https://doi.org/10.2478/fv-2024-0002>
- Mayneris-Perxachs, J., Castells-Nobau, A., Arnoriaga-Rodríguez, M., Garre-Olmo, J., Puig, J., Ramos, R., Martínez-Hernández, F., Burokas, A., Coll, C., Moreno-Navarrete, J. M., Zapata-Tona, C., Pedraza, S., Pérez-Brocal, V., Ramió-Torrentà, L., Ricart, W., Moya, A., Martínez-García, M., Maldonado, R., & Fernández-Real, J. M. (2022). Caudovirales bacteriophages are associated with improved executive function and memory in flies, mice, and humans. *Cell host & microbe*, 30(3), 340–356.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.01.013>
- Mello, L. V., Chen, X., & Rigden, D. J. (2010). Mining metagenomic data for novel domains: BACON, a new carbohydrate-binding module. *FEBS Letters*, 584(11), 2421–2426. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.045>
- Messing, J. (2016). Phage M13 for the treatment of Alzheimer and Parkinson disease. *Gene*, 583(2), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.005>
- Minot, S., Bryson, A., Chehoud, C., Wu, G. D., Lewis, J. D., & Bushman, F. D. (2013). Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12450–12455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300833110>
- Morais, L. H., Schreiber, H. L., 4th, & Mazmanian, S. K. (2021). The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature reviews. Microbiology*, 19(4), 241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P.,

- McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Murugaiyan, J., Anand Kumar, P., Rao, G. S., Iskandar, K., Hawser, S., Hays, J. P., Mohsen, Y., Adukkadukkam, S., Awuah, W. A., Jose, R. A. M., Sylvia, N., Nansubuga, E. P., Tilocca, B., Roncada, P., Roson-Calero, N., Moreno-Morales, J., Amin, R., Krishna Kumar, B., Kumar, A., ... van Dongen, M. B. M. (2022). Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics*, 11(2), 1–37. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020200>
- Nau, R., Djukic, M., Spreer, A., Ribes, S., & Eiffert, H. (2015). Bacterial meningitis: an update of new treatment options. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(11), 1401–1423. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1077700>
- Nayfach, S., Camargo, A. P., Schulz, F., Elie-Fadrosh, E., Roux, S., & Kyrpides, N. C. (2021). CheckV assesses the quality and completeness of metagenome-assembled viral genomes. *Nature Biotechnology*, 39(5), 578–585. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-00774-7>
- Neill, J. O. '. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired. December.*
- Nguyen S, Baker K, Padman BS, P., R, Dunstan RA, Weston TA, Schlosser K, B. B., Lithgow T, Lazarou M, Luque A, R. F., & RS, B. (2017). Bacteriophage Transcytosis Provides a. *American society for microbiology*, 8(6), 1–14.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). MetaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 27(5), 824–834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–1596. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>

- Oldendorf, W. H. (1984). The Blood-Brain Barrier. In *Structural Elements of the Nervous System* (Köt. 7, o. 485–499). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4586-2_17
- Orlova, E. V. (2009). How viruses infect bacteria. *EMBO Journal*, 28(7), 797–798. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.71>
- Pandolfo, M., Telatin, A., Lazzari, G., Adriaenssens, E. M., & Vitulo, N. (2022). *MetaPhage : an Automated Pipeline for Analyzing , Annotating ,*. 7(5), 1–13.
- Petrov, G., Dymova, M., & Richter, V. (2022). Bacteriophage-Mediated Cancer Gene Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14245. <https://doi.org/10.3390/ijms232214245>
- Phillips, A. A., Chan, F. H., Zheng, M. M. Z., Krassioukov, A. V., & Ainslie, P. N. (2015). Neurovascular coupling in humans: Physiology, methodological advances and clinical implications. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(4), 647–664. <https://doi.org/10.1177/0271678X15617954>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Ramsay, R. R., & Tipton, K. F. (2017). Assessment of enzyme inhibition: A review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. In *Molecules* (Köt. 22, Szám 7). <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>
- Reuter, M., & Kruger, D. H. (2020). Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections. *Virus Genes*, 56(2), 136–149. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01735-7>
- Ross, A., Ward, S., & Hyman, P. (2016). More is better: Selecting for broad host range bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352>

- Rothschild-Rodriguez, D., Hedges, M., Kaplan, M., Karav, S., & Nobrega, F. L. (2023). Phage-encoded carbohydrate-interacting proteins in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 13(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1083208>
- Santa-Maria, A. R., Walter, F. R., Figueiredo, R., Kincses, A., Vigh, J. P., Heymans, M., Culot, M., Winter, P., Gosselet, F., Dér, A., & Deli, M. A. (2021). Flow induces barrier and glycocalyx-related genes and negative surface charge in a lab-on-a-chip human blood-brain barrier model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(9), 2201–2215. <https://doi.org/10.1177/0271678X21992638>
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M. D., Strathdee, S. A., ... Hamilton, T. (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). <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
- Shkoporov, A. N., Ryan, F. J., Draper, L. A., Forde, A., Stockdale, S. R., Daly, K. M., McDonnell, S. A., Nolan, J. A., Sutton, T. D. S., Dalmasso, M., McCann, A., Ross, R. P., & Hill, C. (2018). Reproducible protocols for metagenomic analysis of human faecal phageomes. *Microbiome*, 6(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0446-z>
- Stupak, A., Kwiatek, M., Tomasz, G., Kwa, A., Mlak, R., & Go, A. (2024). *A Virome and Proteomic Analysis of Placental Microbiota in Pregnancies with and without Fetal Growth Restriction*.
- Taslem Mourosi, J., Awe, A., Guo, W., Batra, H., Ganesh, H., Wu, X., & Zhu, J. (2022). Understanding Bacteriophage Tail Fiber Interaction with Host Surface Receptor: The Key “Blueprint” for Reprogramming Phage Host Range. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12146. <https://doi.org/10.3390/ijms232012146>
- Tietz, S., & Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4), 493–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147>

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>
- Yamashita, F., Kaieda, T., Shimomura, T., Kawaguchi, M., Lin, C. Y., Johnson, M. D., Tanaka, H., Kiwaki, T., Fukushima, T., & Kataoka, H. (2022). Role of the polycystic kidney disease domain in matriptase chaperone activity and localization of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. *FEBS Journal*, 289(12), 3422–3439. <https://doi.org/10.1111/febs.16348>
- Zhang, Y., Reif, G., & Wallace, D. P. (2020). Extracellular matrix, integrins, and focal adhesion signaling in polycystic kidney disease. *Cellular Signalling*, 72(1), 109646. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109646>