

Uppdateringar och fördjupningar augusti 2014

Dessa uppdateringar och förslag till fördjupningsläsning är avsedda att förmedla dynamiken i dagens mikrobiologi, genom att fokusera på specifika delområden och där presentera en del pågående forskning. För att underlätta för studenter att fördjupa sig i dessa områden är texten försedd med källhänvisningar, såväl till sammanfattningsartiklar som till originalarbeten. Sidhänvisningarna avser andra upplagan av "Introduktion till mikrobiologi".

Kapitel 2 HACCP

HACCP (sid 21) är en riskanalys i samband med livsmedelstillverkning. Den beskrivs på svenska som "riskanalys och kritiska kontrollpunkter" eller "faroanalys och kritiska styrpunkter".

Wierup och Kristoffersen¹ har använt metoden för att visa hur man kunnat hindra *Salmonella*-kontaminering av sojabönor vid framställning av djurfoder, där 34 % av råvaran var *Salmonella*-kontaminerad. Sojabönorna importerades från Sydamerika till en fabrik i Norge. Ett HACCP-baserat kontrollprogram genomfördes 1994–2012, där fabriken först delades upp i "rena" och "mindre rena" områden. Härefter infördes strikta rutiner när det gällde personalens kunskaper, design av apparatur, byggnader, logistik, underhåll och städning. Personalen samlades också regelbundet för information. Därefter valdes de kritiska punkterna i tillverkningsproceduren ut, och årligen togs 4000 prover vid olika steg i framställningen av djurfodret. Dessa prover analyserades genom konventionell odling eller med PCR. *Salmonella* kunde isoleras från omgivningen runt fabriken i både i rena och mindre rena delar av själva fabriken. Däremot påträffades ingen *Salmonella* i det färdiga djurfodret, vilket visar att riskanalysen fungerade optimalt.

Kapitel 3 Endosporbildning hos *Clostridium difficile*

Alla endosporbildare som undersökts kodar för samma sporuleringsreglerande faktorer ("generalregulatorn" Spo0A och sigmafaktorerna σF , σE , σG och σK), och komplexiteten i endosporbildningen talar för att den inte överförts horisontellt.² Det är därför lätt att tänka sig att sporulering skulle fungera ungefär likadant hos alla endosporbildare, också hos *Clostridium* och *Bacillus* som skildes evolutionsmässigt för mycket länge sedan.² Regleringen av bildningen av endosporer hos *Bacillus* har varit känd sedan länge. Här fungerar de fyra sigmafaktorerna sekventiellt, så att nästkommande sigmafaktor styrs av den föregående. Flera undersökningar under senare år har dock visat på skillnader mellan *Clostridium* och *Bacillus*.

Pereira och medarbetare fann att sporuleringen hos *C. difficile* styrdes av de fyra ovannämnda sigmafaktorerna som är homologa till dem hos *B. subtilis*, men de fyra klostridiesigmafaktorerna var inte så strikt sekventiellt reglerade som i *B. subtilis*.³ En av sigmafaktorerna (σK) var inte ens nödvändig för bildandet av värmeresistenta

¹ Wierup och Kristoffersen (2014) *Acta Veterinaria Scandinavica* 56:41

² de Hoon m.fl. *Curr Biol* 20: R735–R745

³ Pereira m.fl. (2013) *PLOS Genetics* 9:e1003782

endosporer. Koordineringen av genuttrycket i klostridiemodercellen och den blivande sporen kan därför inte vara lika strikt som i *B. subtilis*.

Fimlaid och medarbetare fann också olikheter mellan *C. difficile* och *B. subtilis* i hur sigmafaktorerna verkade.⁴ Med hjälp av RNA-sekvensering och sigma-defekta mutanter fann de att totalt 224 gener hos *C. difficile* reglerades av sporuleringssigmafaktorerna (att jämföra med ca 300 hos *B. subtilis*²). Av dessa var 82 tidigare okända sporuleringsgener och 16 saknar ortologer (en ortolog gen är homolog till en gen hos en annan art) i *Bacillus subtilis*.

Clostridium har fått stor uppmärksamhet under de senaste åren eftersom *C. difficile* (se sid 179) numera är en mycket fruktad tarmpatogen som kan ge livshotande diarréer hos framför allt äldre och immunsvaga personer. USA:s smittskyddsinstitut, CDC (Center for Disease Control and Prevention) har ansett att denna bakterie är det största hotet när det gäller antibiotikaresistens i USA. Det är egenskapen hos *C. difficile* att bilda endosporer under strikt anaeroba förhållanden som är orsaken till dess höga patogenitet. Om inte bakterierna kan bilda sporer dör de snabbt i närvaro av luftens syre, men sporerna klarar sig i en syrerik miljö. Hos den som fått i sig sådana endosporer genom födan kommer sporerna att germinera till vegetativa bakterier när de kommer i kontakt med gallsalter. De bildar sedan två toxiner A och B som orsakar symtomen. Det behövs effektiva läkemedel för att bekämpa *C. difficile*-infektioner. Sporbildningen är en viktig angreppspunkt, men ovanstående visar att den kunskap om endosporbildning som erhållits genom studier av *B. subtilis* inte kan utnyttjas direkt eftersom sporbildningen uppenbart skiljer sig mellan dessa två endosporbildare.

Kapitel 4 Porer i biofilm

Biofilmbildande bakterier orsakar svårbehandlade infektionssjukdomar hos människa (sid 169). En viktig aspekt av biofilmer är de kanaler som genomtränger filmen (sid 92, figur 4.17) och tillåter en vätskegenomströmning som ökar biofilmbakteriernas tillväxtförmåga. Houry och medarbetare⁵ har visat på en helt okänd mekanism bakom bildningen av dessa kanaler, och öppnar för en ny möjlighet att behandla bakteriella biofilmer.

En subpopulation av planktoniska celler med flageller (simmarceller) visade sig kunna ta sig djupt in i bildad biofilm och därigenom orsaka temporära porer i biofilmen. Mellan 0,5 och 1 % av cellerna i biofilm av *Bacillus thuringiensis* utgjordes av simmarceller. Simmarcellerna var alltid flagellerade och mutanter som inte kunde bilda flageller kunde heller inte bilda simmarceller. Forskarna har på film visat hur dessa bakterier bildar porer (se länk i artikeln⁵ "Movie S1"). Där går det också att se att porerna är cirka 10 gånger större än bakterierna. Forskarna kunde konstatera att även biofilm bestående av *Yersinia enterocolitica* och *Pseudomonas aeruginosa* innehöll simmarceller som kunde bilda porer. Ju äldre biofilmen blev desto svårare var det för simmarcellerna att bilda porer, och de rörde sig långsammare. Biofilm av stammar av *Enterococcus faecalis*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* och *Listeria monocytogenes* som var defekta i bildningen av simmarceller kunde också angripas av *Bacillus thuringiensis*-simmarceller, vilka bildade porer i denna heterologa biofilm.

Biofilm bildad av *Staphylococcus aureus* kunde göras mera känslig för bensalkonklorid (ett kemiskt desinfektionsmedel) genom tillsats av två olika stammar

⁴ Fimlaid m.fl. (2013) *PLoS Genetics* 9:e1003360

⁵ Houry m.fl. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109:13088

av simmarceller från *Bacillus thuringiensis*. Biofilmen behandlades med ingen, en eller bägge *Bacillus*-stammarna i fyra timmar och därefter bensalkon i fem minuter, varefter stafylokockernas levande celltal bestämdes. Desinfektionsmedlet ensamt sänkte levandehalten åtta gånger, desinfektionsmedel plus förbehandling med en bakteriestam sänkte halten ca hundrafalt, och om biofilmen förbehandlats med bägge bakteriestammarna sänktes halten av *Bacillus*-stammen mer än 300 gånger. Genom att kлона genen för lysostafin (ett cellväggsendopeptidas från stafylokocker) i simmarceller från *Bacillus thuringiensis* och sedan infektera stafylokockbiofilmen med dessa kunde forskarna avdöda alla stafylokocker i biofilmen inom 24 timmar.

Resultaten visar att här finns en helt ny angreppspunkt när det gäller patogena biofilmbildande bakterier. Den subpopulation som har den här förmågan att bilda porer är så liten att den tidigare aldrig noterats. Det finns nu nya möjligheter att använda genetiskt förändrade *Bacillus thuringiensis*-bakterier för att få in bakteriedödande ämnen i sjukdomsorsakad biofilm vid infektioner i t.ex. huden, näsan eller matsmältningskanalen. Genom porbildningen sänks också koncentrationen av läkemedel som behövs för att avdöda de biofilmbildande bakterierna drastiskt.

Kapitel 5 "Lagom" horisontell genöverföring

Bakterier är beroende av horisontell genöverföring för mycket av den variation som möjliggör anpassning till nya omständigheter. Samtidigt är bakteriernas överlevnad beroende av att komplexa enzymssystem förblir intakta och kan genomföra nödvändiga metaboliska reaktioner. Inaktivering eller ersättning av en gen som kodar för ett av enzymen i dessa komplexa system kommer sannolikt att omintetgöra systemets funktion, till skada för bakterien. Flera olika mekanismer säkerställer att mestparten av främmande DNA som kommer in i cellen omintetgörs eller reduceras i storlek så att ingen eller bara ett fåtal av dess gener kan tas upp horisontellt. Här beskrivs två av dessa mekanismer.

CRISPR-Cas (sid 259). Detta är det närmaste bakterier och arkéer kommer ett adaptivt immunförsvar. Efter en infektion som bakterien eller arkéen överlevt sparas kopior av DNA-sekvenser (mellansekvenser, "spacers") från invaderande genom (virus, plasmider) i kluster mellan korta upprepade palindromiska sekvenser på jämna avstånd från varandra (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats, CRISPR). Dessa sparade kopior kommer att utgöra minnen av tidigare infektioner; de äldsta minnena ligger först i ett kluster, och klustret byggs hela tiden ut allt eftersom cellen överlever nya infektioner. Detta kan ge ett skydd vid senare invasioner så som beskrivs nedan – adaptivt försvar! Men till skillnad från människans adaptiva immunförsvar är detta system ärftligt, eftersom sekvenserna befinner sig i kromosomalt DNA som överförs till dottercellerna vid celldelning. Olika CRISPR-regioner i samma bakteriegenom kan ligga på olika ställen i kromosomen och innehålla helt olika mellansekvenser. Ungefär hälften av alla studerade bakterier, och mer än 90 % av alla studerade arkéer, har CRISPR-system.

Fenomenet beskrevs för mer än tio år sedan, men förståelsen av systemet har dröjt.⁶ I bakteriecellen transkriberas och processas mellansekvenserna till små RNA-molekyler (crRNA) motsvarande hela eller delar av en mellansekvens samt en del av den upprepade palindromiska sekvensen. När samma eller närbesläktat DNA på nytt

⁶ Hynes och Moineau (2014) *Microbe* 9:204; se också Lundgren (2014) *Forskning och Framsteg* juli: 34-39

kommer in i cellen, vid en ny infektion eller DNA-överföring, kan crRNA:t känna igen och associeras med detta främmande DNA. För detta krävs proteiner från en region intill CRISPR (Cas-proteiner; Cas = CRISPR-associated sequence]. Efter ytterligare några mellansteg resulterar detta i att denna inkommande DNA-sekvens klyvs av ett endonukleas kodat från en Cas-gen.

Ett potentiellt problem här är att samma DNA-sekvens ju också finns i de kromosomala mellansekvenserna som integrerats efter den tidigare invasionen. Om dessa attackerades av crRNA-Cas-proteinkomplexen skulle ju organismens eget DNA brytas ned. Mellansekvenserna i det kromosomala DNA:t är dock skyddade mot nedbrytning via mekanismer som varierar mellan olika CRISPR-system. En ganska allmänt spridd skyddsmekanism verkar vara att en kort sekvens (protospacer adjacent motif, PAM) i närheten av genomkopiering krävs för igenkänning och nedbrytning.⁷ Denna saknas bredvid mellansekvensen, där i stället de upprepade palindromsekvenserna sitter. En punktmutation i eller nära PAM-sekvensen räcker för att hindra nedbrytning av det främmande DNA:t, men längre bort från denna kan mindre avvikelser från mellansekvensernas förekomma utan att nedbrytningen hindras.⁸

Det finns många exempel beskrivna på att systemet faktiskt fungerar och hindrar införsel av DNA homologt till det som finns i bakteriernas CRISPR-mellansekvenser. Exempelvis kunde en avirulent stam av *Streptococcus pneumoniae* (se sid 106) som försetts med CRISPR-mellansekvenser homologa till kapselgener inte transformeras med DNA kodande för kapselbiosyntes, och förblev därmed kapsellös och avirulent.⁹ Det finns också exempel på motsatsen – en bakteriofag som med hjälp av ett fagkodat CRISPR-system inaktiverar en genom-ö hos värden (*Vibrio cholerae* O1) vars expression interfererar med fagreplikationen.¹⁰

Nya data tyder på att CRISPR-system också kan vara inblandade i genreglering.¹¹ De inblandade mellansekvenserna är då homologa till egna gener och det handlar också här om RNA-medierad nedbrytning av nukleinsyror, men denna gång av RNA: en liten crRNA-molekyl binder till och orsakar nedbrytning av mRNA:t från en gen, och hindrar därmed denna från att translateras. I ett exempel beskrivet av Sampson m.fl.¹² kodar den reglerade genen för ett lipoprotein hos *Francisella novicida*, och nedregleringen dämpar den inflammatoriska responsen efter infektion av en människa, vilket ökar bakteriens virulens. CRISPR-Cas-reglering verkar också ingå i de processer som styr bildandet av fruktkroppar hos *Myxococcus xanthus*, liksom virulens hos *Campylobacter jejuni* och *Listeria monocytogenes*.¹³

Möjligheten att ändra specificiteten hos CRISPR-system genom att ändra mellansekvenserna ger nya gentekniska möjligheter. Om DNA kodande för ett specifikt crRNA och dess kognata endonukleas introduceras i en cell, också eukaryot, med hjälp av en plasmid, kommer uttryck av dessa gener att medföra att cellens genom klyvs exakt i den sekvens som är homolog till crRNA:t.¹⁴ Ett önskat DNA-fragment kan då infogas på denna plats med hjälp av cellens DNA-reparationssystem. Systemet har använts för att korrigera genetiska defekter i möss¹⁵ där de introducerade förändringarna var stabila

⁷ Mojica m.fl. (2009) *Microbiol* 155:733; Semenova m.fl. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10098

⁸ Sternberg m.fl. (2014) *Nature* 507:62

⁹ Bikard m.fl. (2012) *Cell Host & Microbe* 12:177

¹⁰ Seed m.fl. (2013) *Nature* 494:489

¹¹ Bikard (2013) *F1000 Prime Reports* 5:47; doi:10.12703/P5-47

¹² Sampson m.fl. (2013) *Nature* 497:254

¹³ Westra m.fl. (2014) *Nature Rev Microbiol* 12:317

¹⁴ Barrangou (2014) *Science* 344:707

¹⁵ Wu m.fl. (2013) *Cell Stem Cell* 13:659

och nedärvdes till nästa generation. Också hos krabbnakaker har genförändringar introducerats på liknande sätt; här finns ännu inga data angående nedärvning.¹⁶

Argonaut. Ett nyckelprotein i eukaryoternas RNA-interferens (sid 121) är Argonaut (Ago), som associerar till de små guidande RNA-molekylerna så att dessa når och kan binda till sina målmolekyler. Ago-lik proteiner har påträffats hos många bakterier där dock inga RNA-interferenssystem varit kända.¹⁷ Bakteriargonauterna verkar i stället ha främmande DNA som mål – DNA-interferens! Hos *Rhodobacter sphaeroides* binder Ago till små RNA-molekyler och till komplementära DNA-molekyler företrädesvis från plasmider och fager, och orsakar nedbrytning av de senare.¹⁸ Ago från *Thermus thermophilus* associeras också till korta sekvenser av såväl RNA som DNA. Forskarnas data tydde dock på att Ago-RNA-interaktionen var mindre betydelsefull, medan Ago-DNA-associationen kunde orsaka nedbrytning av DNA komplementärt till dessa korta DNA-sekvenser.¹⁹ Agosystemets biologiska relevans är dock oklar.

Både CRISPR- och Argonautsystemen, liksom de välkända restriktionssystemen, innebär endonukleolytisk attack mot främmande DNA, vilket fragmenterar detta till mindre bitar. De flesta av dessa småbitar genomgår vidare nedbrytning, men en del kan inkorporeras i värdens genom, och på så sätt bidra till dess evolution. Den horisontella genöverföringen begränsas härmed.

Kapitel 6 Systematik

För att en mikroorganism ska kunna få ett vetenskapligt artnamn måste den ha odlats i renkultur så att dess fysiologiska egenskaper kunnat karakteriseras (sid 127). Utvecklingen inom en-cellsgenomik (sekvensering av genomet från en enda cell) och metagenomik gör det idag möjligt att bestämma hela genomsekvenser för bakterier som inte odlats, och gör det också möjligt att studera populationers egenskaper utan odling. Detta har förstås både fördelar och nackdelar. Odling i renkultur innebär att organismen studeras under naturvidriga former – inga bakterier växer ensamma på definierade substrat i naturen – och kan leda till feluppfattningar om dess fysiologi. Genomanalys, å andra sidan, måste baseras på antaganden om vad för enzym genomet kan koda för, och hur dessa fungerar i naturen, vilka inte nödvändigtvis överensstämmer med verkligheten. Men det är bara genomanalys som kan ge upplysningar om mångfalden i naturen. Här beskrivs några nya studier baserade på genomanalys.

I början på 2014 hade åtminstone 60 fyla av bakterier och arkéer beskrivits baserat på sekvensanalys. I många av dessa saknas odlade medlemmar. Rinke och medarbetare²⁰ sekvenserade genomet i enstaka celler från 201 icke-odlade arkéer och bakterier från nio olika miljöer, vilka hörde till 29 olika tidigare dåligt kända fylogenetiska grenar. Även om inget helt komplett genom erhöles – det bästa, där i princip hela sekvensen var känd, förblev i 10 fragment vilkas inbördes ordning var oklar – gav analysen mycket ny spännande information. Deras analyser bekräftade förekomsten av "superfyla", grupperingar av sinsemellan närbesläktade fyla, exempelvis superfylumet Terrabacteria som omfattar firmikuter, aktinobakterier, cyanobakterier, kloroflexer och några grupper till. Dessa kallas också monodermer, eftersom de

¹⁶ Niu m.fl. (2014) *Cell* 156:836

¹⁷ Vogel (2014) *Science* 344:972

¹⁸ Olovnikov (2013) *Molecular Cell* 51:594

¹⁹ Swarts m.fl. (2014) *Nature* 507:258

²⁰ Rinke m.fl. (2013) *Nature* 499:431

antingen saknar yttermembran helt eller har speciella varianter av det. Hos bakterier fann forskarna avkodning av nonsenskodonet UGA med glycin²¹ (i fylumet Gracilibacteria [GN02] utan odlade representanter), och arkéliknande purinbiosyntes hos bakterier (i superfylumet Patescibacteria utan odlade representanter, dit Gracilibacteria hör). Hos arkéer fann de en komplett motsvarighet till bakteriernas sigmafaktor 70 hos Nanoarchaeota och ett annat arkéfylum i samma superfylum, DPANN. Inga arkéer i detta superfylum har odlats i renkultur. Eftersom dessa arkéer också hade de gener som är inblandade i den för arkéer vanliga transkriptionsregleringen handlar det rimligtvis om horisontell överföring från bakterier. Flera genom i detta arkésuperfylum innehöll gener som sannolikt överförts horisontellt från såväl bakterier som eukaryoter.

Arbeten som Rinke och medarbetares bidrar också till att förbättra "förankringen" av metagenomikdata till enskilda organismers genom. Ett allvarligt problem med metagenomik är felaktig hopsättning av kontiger (sid 145) från olika genom till en sekvens; finns det "facit" i databankerna från encellsgenomsekvensering minskas den risken. Eftersom metagenomik inte förutsätter att sekvenserna amplifieras före sekvensering (vilket encellsanalys gör) undviks med metagenomik den felkälla som utgörs av amplifieringsartefakter. Kombinationen av de två teknikerna har alla möjligheter att verkligen visa mångfalden bland de encelliga organismerna!

Ett exempel på vad metagenomiska studier kan leda till idag är Albertsen och medarbetares undersökning av aktivt slam.²² Med avancerade analystekniker erhöll de 31 populationers genom²³, däribland ett som bara motsvarade <1 % av alla genom. Fyra av de tolv enheter för vilka i det närmaste kompletta genomsekvenser erhöles hörde till fylumet TM7, utan odlade representanter och utan tidigare kompletta genomsekvenser. Representanter för detta fylum har påträffats i många olika miljöer, inklusive människokroppen, men alltid i relativt låg frekvens. Albertsen m.fl.²² bekräftade att TM7-bakterierna hade genom omfattande ca 1 Mb, vilket är nära den undre gränsen för frilevande bakterier. Forskarnas data gav TM7-bakterierna en fylogenetisk placering nära aktinobakterierna, d.v.s. i det superfylum som ovan benämndes Terrabacteria. Genomanalysen visade på en aerotolerans men obligat fermentativ (heterofermentativ) energiutvinning, och bekräftade monodermin såtillvida som gener för yttermembransyntes saknades. Med denna analys föreslår forskarna namnet *Candidatus Saccharibacteria* för TM7-fylumet.

Kapitel 7–8 Tarmbakterier, utveckling, fysiologi och kroniska sjukdomar

Förutom genom horisontell överföring av bakteriegenet kan bakterier bidra till eukaryoters egenskaper via signalering som påverkar organogenes. Många exempel på detta är kända från endosymbiotiska bakterier som påverkar värden så att vävnader omformas till bekväma bakteriebostäder, exempelvis ljusorganen hos *Euprymna scolopes* (sid 151) eller de bakteriefyllda knölnarna hos växter koloniserade av rhizobier och agrobakterier (sid 136). På senare år har det blivit uppenbart att en organisms

²¹ TGA-kodon återfanns i öppna läsramar motsvarande gener annoterade i genomdatabaser i positioner som vanligen motsvarade glycin; genomkodade för tRNA som avkodade TGA.

²² Albertsen m.fl. (2013) *Nature Biotechnol* 31:533

²³ Metagenomik i sig kan aldrig ge en enskild organisms genom, utan ett sammansatt genom från närbesläktade organismer, se sid 145. Ofta används begreppet OTU ("operational taxonomic unit", operativ taxonomisk enhet) om de populationsenheter som identifieras på detta sätt.

mikrobiota (de mikrober som lever i och på organismen) också påverkar dess fysiologi på olika sätt. Det finns mer än 10^{14} mikrober i en frisk människas mag-tarmkanal, och antalet unika gener hos dessa mikrober överstiger antalet människogener minst hundrafalt. Här finns alltså potential för många olika interaktioner!

Signalering och organutveckling. En del av vad som var känt om hur bakterier kan påverka organutveckling och beteenden hos djur sammanfattas av Ezenwa m.fl. och av Varaldi.²⁴ Här är dock mekanismerna dåligt kända; mestparten av kunskapen om mekanismerna för påverkan kommer från modellorganismer. Genom att jämföra bakteriefria (GF-) möss med normala (SPF-) möss, eller tillföra specifika bakterier till normala möss, har forskare kunnat visa att såväl mössens beteende som halten av vissa neurotransmittorer och deras receptorer i olika delar av hjärnan påverkas av tarmfloran.^{25,26} Effekterna reducerades om mössens vagusnerv, en kranialnerv som ingår i det autonoma nervsystemet, delvis skurits av, vilket implicerar den nerven i signaltransduktionen från tarmbakterierna till hjärnan.²⁶

Signalering verkar också kunna ske via bakteriemetaboliter som sprids via blodbanorna till olika delar av kroppen. Korta fettsyror som ättiksyra, smörsyra och propionsyra är vanliga slutprodukter vid tarmbakteriernas kolhydratfermentering och utgör viktiga energikällor för tarmepitelceller; de kan omvandlas till såväl glukos som fetter. Många fungerar också som signalsubstanser. GPR43 är en receptor för korta fettsyror i tarmepitelet. Kimura m.fl.²⁷ har visat att möss som saknar GPR43 blir feta, medan möss som överuttrycker GPR43 förblir magra också med en fettrik diet. När korta fettsyror binder till GPR43-receptorn hämmas insulinsignalering i fettväv, vilket i sin tur hämmar fettinlagring där och stimulerar metabolismen av fetter och glukos i andra vävnader. Tarmbakteriernas produktion av korta fettsyror påverkar på detta sätt värdens energimetabolism. Transplantation av mikrobiota från magra personer till patienter med metaboliskt syndrom (där bl.a. insulinresistens ingår) visade sig förbättra patienternas insulinkänslighet, parallellt med att halten smörsyraproducerande bakterier i tarmen ökade.²⁸ Orsakssambanden här är inte kända, men det är lätt att misstänka GP43 som delansvarig. En annan möjlig väg tarmbakterier skulle kunna påverka signalering i nervsystemet är via serotonin, en neurotransmittor som syntetiseras från kynurenin via tryptofan. Halten tryptofan och kynureninsyra har setts öka hos råttor som tillförts mjölksyrabakterien *Bifidobacteria infantis*.²⁹

Det är också väl känt numera att tarmbakterier kan modulera immunförsvaret, men mekanismerna är fortfarande dåligt kända.³⁰ GF-möss, liksom antibiotikabehandlade möss, har färre lymfocyter än SPF-möss. Hos dessa bakteriefria möss är det också andra T-celler som dominerar än hos SPF-möss. En specifik komponent från en specifik bakterie – polysackarid A (PSA) från *Bacteroides fragilis* – kunde återställa T-cellsbalansen i GF-möss. Glykosfingolipider från samma bakterie påverkar andra komponenter i det ospecifika immunförsvaret. PSA-effekten kräver antigen-presenterande celler, vilka troligen är de som aktiverar T-cellsproliferering. Korta fettsyror kan stimulera proliferering av regulatoriska T-celler, genom att hämma histondeacetylasen och därmed stimulera expression av regulatorn Foxp3.

²⁴ Ezenwa m.fl. (2012) *Science* 338:198; Varaldi (2013) *Microbe* 8:161

²⁵ Diaz Heijtz m.fl. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3047

²⁶ Bravo m.fl. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16050

²⁷ Kimura m.fl. (2013) *Nature Communications* 4:1829 doi: 10.1038/ncomms2852

²⁸ Vrieze m.fl. (2012) *Gastroenterology* 143:913

²⁹ Desbonnet m.fl. (2009) *Jf Psychiatri Res* 43:164

³⁰ Surana och Kasper (2014) *J Clin Invest* doi: 10.1172/JCI72332

Hur påverkar kosten tarmfloran? Det har varit känt länge att alla människor inte har samma sammansättning av tarmfloran, och att detta delvis är förknippat med olika kost (se exempelvis uppdateringen 2012). Exakta samband har dock varit svåra att fastlägga. Schnorr och medarbetare har studerat tarmfloran hos personer som tillhör ett av världens sista jägar- och samlarfolk, Hadzafolket.³¹ I dag finns bara omkring 300 personer kvar av detta samlarfolk. De lever bl.a. i västra Tanzania i små grupper om ett 30-tal personer. De personer som deltagit i studien lever av föda som de själva samlat in och deras livsstil anses vara mycket lik stenålderskulturens. Hadzagruppen har liten kontakt med vården och lider mindre av infektionssjukdomar och metaboliska sjukdomar än västerlänningar.

Hadzafolket har aldrig idkat jordbruk eller haft tamdjur, och de äter heller inte jordbruksprodukter. Sedan tidigare är det känt att tarmfloran hos personer från jordbruksområden jämfört med industriområden är mera varierad och innehåller mera bakteriodeter och aktinobakterier. Forskarna har genom sekvenseringsstudier jämfört tarmfloras sammansättning hos en grupp av Hadzafolket med den hos en västerländsk befolkning, den italienska. Hadzafolkets diet består av kött, honung, baobabfrukt, bär och rotknölar. Den italienska gruppen äter mest jordbruksprodukter och s.k. Medelhavskost.

I både Hadzagruppen och den italienska gruppen dominerade firmikuter och bakteriodeter. Firmikuter utgjorde en större andel av tarmfloran i den italienska gruppen medan mängden bakteriodeter var högre i Hadzagruppen. I Hadzagruppen utgjorde spiroketer cirka 3 % och proteobakterier 6 % medan de senare var mycket sällsynta i den italienska gruppen. *Bifidobacterium* saknas helt hos Hadzafolket. Detta är anmärkningsvärt eftersom det aldrig tidigare observerats avsaknad av sådana bakterier i tarmfloran hos någon folkgrupp. Forskarna observerade stora skillnader mellan tarmfloran beroende på kön i Hadzagruppen, vilket inte kunde observeras i den italienska gruppen. Detta menade de berodde på att kvinnor och män arbetar med olika saker och äter olika sorts mat. Förekomst av bl.a. olika sorters klostridier och högre andel bakteriodeter kan bero på Hadzafolkets höga konsumtion av växtfibrer.

Den här studien visar tydligt hur skillnader i levnadsförhållanden påverkar tarmfloras sammansättning. Kan Hadzafolkets tarmflora vara en orsak till deras genomgående goda hälsa och låga sjuklighet? Försök med tarmbakterietransplantationer skulle kunna adressera den frågan.

Kroniska sjukdomar. Störningar av interaktioner mellan mikrobiotan och kroppens vävnader och immunförsvaret kan leda till inflammationer och på sikt även kronisk sjukdom. Förutom gällande de tarmsjukdomar som behandlas nedan finns växande insikt om mikrobiotans betydelse för utveckling av fetma³² och autoimmuna³³ sjukdomar.

(i) Inflammatoriska tarmsjukdomar. Det finns en genetiskt betingad mottaglighet för inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD), men miljöfaktorer (diet) bidrar till risken att utveckla IBD; sjukdomarna är vanligast i västvärlden. Dessa miljöfaktorer tros även påverka balansen i mikrobiotan i tarmen. Data tyder på att IBD orsakas av störningar i immunsvaret mot normalfloran i tarmen hos individer med en ärftlig känslighet för

³¹ Schnorr m.fl. (2013) *Nature Communications* doi:10.1038/ncomms4654

³² Kotzampassi m.fl. (2014), *ISRN Obesity* doi.org/10.1155/2014/651895; Ridaura m.fl. (2013) *Science* 341:1079 och 1241214; Everard m.fl. (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* 110:9066,

³³ Proal m.fl. (2013) *Curr Op Rheumatol* 25:234; Markle m.fl. (2013) *Science* 339:1084

sådana störningar.³⁴ Det finns inga belägg för att inflammationen uppstår till följd av en infektion med någon patogen mikroorganism, inte heller att den skulle vara en följd av att immunförsvaret angriper den kroppsegna vävnaden (autoimmunitet). Ett antal studier har däremot påvisat att tarmmikrobiotan har en annan sammansättning hos patienter som lider av IBD jämfört med friska individer. Denna "störning" av mikrobiotan har betecknats dysbios. Normalfloran i tarmen består till övervägande del av obligat anaeroba bakteroideter och firmikuter (sid 164). En av dessa är *Faecalibacterium prausnitzii*, vars butyratproduktion har väldokumenterad antiinflammatorisk verkan.³⁴ Hos patienter med IBD är andelen bakteroideter och firmikuter lägre. I stället förekommer fler fakultativt respiratoriska bakterier, vilkas tillväxt stimuleras av att tarmepitelcellernas inflammatoriska respons resulterar i produktion av nitrat³⁵, som ju kan fungera som elektronmottagare vid anaerob respiration.

Det är ännu inte helt klarlagt om dysbiosen orsakar IBD eller snarare är en följd av IBD, men studier av möss tyder på att mikrobiotan är åtminstone en del av orsaken: Bakteriefria möss drabbas inte av kroniska tarminflammationer³⁴, och när normala möss tillförs tarmbakterier från möss med sådana inflammationer, eller vistas i samma burar som dessa, drabbas de också³⁶. Länken mellan genotyp, mikrobiota och kronisk tarminflammation har tydliggjorts av Bloom m.fl.³⁷, som visade att antibiotikabehandlade möss utvecklade kronisk tarminflammation efter tillförsel av tarmbakterier från möss med sådan inflammation bara om de hade defekter i två av immunförsvarets signalvägar (IL-10 och TGFβ).

Cancer. Tarmcancer (kolorektalt carcinom, CRC) är en vanlig cancerform i Sverige. Tarminflammation, IBD, är en känd riskfaktor för CRC, och det som sagts ovan om mikrobiotan och IBD kan alltså i förlängningen också gälla CRC. Såväl *Fusobacterium nucleatum*, som hör till normalfloran i munhålan och tidigare associerats med tandlossning, och en typ av invasiv *E. coli* (AIEC) är överrepresenterade i tarmkarcinomvävnad jämfört med frisk tarmvävnad; bägge bakterierna är också överrepresenterade vid IBD.^{38,39} Dessa bakterier är vanligare hos människor med en västerländsk diet, vilket tyder på att dieten kan vara en delfaktor vid uppkomsten av denna cancerform. Också i fråga om CRC är orsakssambanden oklara, men musförsök tyder på att bägge bakteriearterna faktiskt kan stimulera tumörtillväxt genom att rekrytera en viss typ av celler till tumören. AIEC visade sig kunna inducera utveckling av CRC i möss som saknade IL-10 (en immunsignalsubstans, se ovan).³⁹ Också för uppkomsten av andra cancerformer verkar mikrobiellt orsakad inflammation kunna vara en delfaktor. Här har framför allt *Helicobacters* roll studerats.⁴⁰

Mikrobiotan kan emellertid också ha effekter som är positiva för patienten! Två nya arbeten visar att cancerläkemedel som cyklofosamid⁴¹ och platinaföreningar⁴² inte får lika bra effekt i bakteriefria möss (antibiotikabehandlade eller uppfödda utan bakterier) som i möss med normal tarmmikrobiota. Hur detta påverkas av de

³⁴ Koboziev m.fl. (2014) *Free Rad Biol Med* 68:122

³⁵ Winter m.fl. (2013) *Science* 339:708

³⁶ Garrett m.fl. (2010) *Cell Host & Microbe* 8:292

³⁷ Bloom m.fl. (2011) *Cell Host & Microbe* 9:390

³⁸ Castellarin m.fl. (2012) *Genome Res* 22:299

³⁹ Allen-Vercoe m.fl. (2014) *Immunol Letters* doi: 10.1016/j.imlet.2014.05.014

⁴⁰ Kipanyula m.fl. (2013) *Cell Signal* 2:403

⁴¹ Viaud m.fl. (2013) *Science* 342:971

⁴² Iida m.fl. (2013) *Science* 342:967

förändringar i tarmmikrobiotan som är associerade till IBD och CRC är dock inte undersökt än.

Sambandet mellan bakterier och kroniska sjukdomar är uppenbart mycket komplext. En glädjande nyhet är att fekal transplantation, d.v.s. överföring av tarmmikrobiotan från en frisk donator till en patient, verkar kunna ge bra resultat i flera fall.⁴³ Metoden har haft störst framgång när det gäller att reducera mängden *Clostridium difficile* exempelvis efter antibiotikabehandling, men studier pågår också avseende andra sjukdomar där tarmfloran är störd.⁴⁴

Kapitel 9 Persisterande celler

Som nämns i uppdateringen till kapitel 4 är biofilm ett mycket stort problem inom vården och där är det de persisterande bakterierna (sid 191) som är det största problemet. För att kunna bekämpa persisterande bakterier måste det finnas kunskap om deras egenskaper och hur de bildas.

Persisterande celler finns i låg koncentration i exponentiellt växande bakteriekulturer men mest i stationära kulturer, däribland då i biofilm. Det är fortfarande delvis en öppen fråga huruvida persistens ska betraktas som ett specifikt stadium hos bakterier, eller om det är en variant av vila [dormancy] under tillväxtogynnsamma förhållanden, och också om persistens som uppkommer under exponentiell tillväxt skiljer sig från persistens som uppkommer i stationärfas. De flesta studier verkar dock nu konvergera mot att persistens kan induceras på olika sätt av faktorer som menligt påverkar cellernas möjligheter till tillväxt.

Goneau m.fl.⁴⁵ fann att frekvensen antibiotikaokänsliga (persisterande) celler ökade vid lågdosbehandling av såväl *E. coli* som *Staphylococcus saprophyticus* med antibiotika riktade mot såväl DNA-syntes (ciprofloxacin) som peptidoglykansyntes (ampicillin) och proteinsyntes (gentamicin). De persisterande cellerna var i olika utsträckning korstoleranta, d.v.s. okänsliga också för andra antibiotika än de som använts för att selektera persistens. Antibiotikatolerans hos persisterande celler krävde ett intakt SOS-system, vilket tyder på att persistensen här var ett vilstadium inducerat av stress.

Toxin/antitoxinsystem (TA-system) består av ett stabilt toxin som kan hämma en viktig cellulär funktion, exempelvis translation, och ett labilt antitoxin som motverkar toxiciteten. Överproduktion av nästan vilket toxin som helst resulterar i ökad förekomst av persisterande celler.⁴⁶ Det handlar då rimligtvis inte om specifika effekter av just det aktuella toxinet, utan att cellens centrala metabolism hindras. Många TA-system induceras via ppGpp (guanosintetrafosfat), ett alarmon bäst känt för sin roll i stringent respons (avstängning av translationen vid brist på aminosyror). Induktion av persistens kan då ses som en stressrespons från cellen som möjliggör överlevnad av en liten cellpopulation när betingelserna är skadliga för aktivt växande celler.⁴⁶

Också faktorer som direkt påverkar tillväxtmöjligheterna kan resultera i ökad persistens. Girgis m.fl.⁴⁷ utsatte kolibakterier för transposonmutagenes, behandlade dem med letala doser ampicillin och undersökte vad för gener som inaktiverats hos

⁴³ de Vrieze (2013) *Science* 342:954

⁴⁴ Merenstein m.fl. (2014) *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 59:157

⁴⁵ Goneau m.fl. (2014) *Antimicrob. Agents Chemother.* 58:2089

⁴⁶ Wood m.fl. (2013) *Applied and Environmental Microbiology* 79:7116

⁴⁷ Girgis m.fl. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 12:12740

överlevare som visade ökad frekvens av persistens. De fann ett 50-tal olika mutationer i olika gener. Bland annat upptäcktes att avsaknad av den C-terminala delen av ett metionyl-tRNA-syntetas ledde till en 10 000-faldig ökning av frekvensen persisterande bakterier. Mutationen leder till lägre affinitet för substratet tRNA^{Met}, vilket kan vara orsaken till en lägre tillväxthastighet och ökad frekvens persisterande celler. De påträffade också mutationer som påverkade glykolytiska enzym så att halten metylglyoxal ökade. Metylglyoxal är känt som hämmare av tillväxt hos bakterier. De mutationer som Girgis m.fl. studerade var irreversibla, vilket innebär att de celler i populationen som inte var persisterande växte långsammare än vildtypen.

Det finns alltså många olika faktorer som kan orsaka persistens, och många involverade gener. I många fall verkar dock fenomenet vara en stressrespons som möjliggör överlevnad under ogynnsamma förhållanden. Detta innebär att hämning av stressresponsmekanismerna i biofilm, om det lät sig göras, borde kunna öka biofilmbakteriernas antibiotikakänslighet. Av ovanstående framgår också att behandling med antibiotika i låg koncentration är ett effektivt sätt att inducera persistens och antibiotikatolerans – att tänka på i samband med antibiotikabehandling av infektioner, och framför allt kanske vid den antibiotikaproylax som ofta ges till patienter med återkommande urinvägsinfektioner, vilket Goneau m.fl.⁴⁵ menar är olämpligt.

Kapitel 10 Bakterier i människans tjänst

Syntetisk biologi. Syntetisk biologi kan beskrivas som framställning av organismer med en serie önskade egenskaper via genteknik. Konstruktionerna förutsätter att de önskade egenskaperna kodas från lätt tillgängliga och lätt modifierbara "moduler", vilka kombineras för att uppnå varianter som inte existerar i naturen. Ett vanligt mål är effektiv bioteknisk produktion.

Förra årets uppdatering beskrev bioenergi från fototrofa organismer och försöksverksamhet med elektrisk ström som elektronkälla för koldioxidassimilering. Emellertid har få fototrofer väl utvecklade system för genetisk modifiering, ett stort antal gener är inblandade i fotosyntesen, och de bakterier som kan förmås assimilera koldioxid med elström som elektronkälla (acetogena bakterier⁴⁸) ger dåligt utbyte (se förra årets uppdatering till detta kapitel). För introduktion av protonpumpande rodopsiner (PPR, se bakterierodopsin sid 234) som alternativ ljusberoende energikälla krävs oftast bara en gen, kodande för det protonpumpande pigmentet: ibland krävs också en gen kodande för ett antennpigment.⁴⁹ Dessa system blir därför attraktivare i samband med syntetisk biologi. PPR beskrevs först hos haloarkéer, men har visat sig vanliga också hos marina bakterier; den rodopsinproducerande *Pelagibacter ubique* anses vara en av de talrikaste marina organismerna överhuvudtaget.

Det är alltså relativt lätt att flytta PPR-system till bakterier med välkänd genetik där gentekniska möjligheter är större. PPR-systemet har införts i *E. coli*, där det inte ger särskilt stort energitillskott till celler som växer aerobt med glukos som obegränsad näringskälla.⁴⁹ Situationen kan vara en annan i system med stort ATP-behov. Exempelvis har gener för koldioxidassimilering via RUBISCO (sid 75) också införts i *E. coli*. En kombination med PPR och RUBISCO i *E. coli* skulle möjliggöra ljusberoende autotrofi i en bakterie med synnerligen goda möjligheter för genteknisk modifiering. Om det sedan också lyckas att införa gener vars produkter möjliggör utnyttjandet av elektricitet från

⁴⁸ Lovley och Nevin (2013) *Curr Op Biotechnol* 24:385

⁴⁹ Claassens m.fl. (2013) *Trends Biotechnol* 31:633

en elektrod som elektrongivare, skulle ett effektivt system för produktion av biobränsle kunna utvecklas.⁴⁹

Medicinsk diagnostik. Traditionellt är det inom livsmedelsindustri, bioteknik och energiproduktion som människor har utnyttjat bakterier. I ett nytt arbete föreslår Kotula m.fl. att bakterier ska kunna användas för att mäta halten av specifika ämnen *in situ* i tarmen.⁵⁰ Författarna använde en modul från fag lambda (sid 265) som i sin naturliga miljö reglerar valet mellan lysogent eller lytiskt förlopp efter faginfektionen. Denna "redigerades" med hjälp av genteknik så att mängden tetracyclin i tarmen styrde huruvida modulen uttryckte *ci*-proteinet eller *Cro*-proteinet. Detta uttryck var sedan stabilt över många generationer. Modulen testades i möss, vilka tillfördes en känd mängd tetracyclin. Bakterierna isolerades sedan från mössen, och förhållandet mellan *ci* och *Cro* utgjorde ett stabilt mått på mängden tetracyclin mössen erhållit. Systemet fungerade, och kan i princip modifieras för att svara på andra kemikalier och metaboliter än tetracyclin. Det skulle därmed kunna användas som diagnostiskt hjälpmedel, för att mäta koncentrationen av kritiska metaboliter direkt i tarmen. Det återstår förstås att se om det enkelt låter sig anpassas så att detta blir praktiskt möjligt inom medicinen.

Ytterligare exempel på "bakterier i människans tjänst" ges av CRISPR-Cas (uppdateringen till kapitel 5): ett nytt verktyg för genmodifiering.

Kapitel 11 Vilstadium hos arkéer

Halofila arkéer uppvisar extrem förmåga att överleva vid låg vattenaktivitet (a_w , sid 67). Flera forskargrupper har isolerat haloarkéer från mycket gamla saltlager runtom i världen.⁵¹ Här förekommer stavar och också sfäriska celler, vilka förmåtts växa ut och proliferera till stavar.

Det ursprungliga fyndet av sfäriska haloarkéer gjordes i 22 000–34 000 år gamla saltlager. Själva arkéerna kan inte åldersbestämmas, men omgivande bergsalt kan åldersbestämmas genom radioaktivitetsmätning, stratigrafiska studier (man undersöker lagerföljden i berget) eller pollenanalys. Ett problem är förstås att vid isolering av arkéerna finns risk för kontaminering så att de isolerade cellerna inte kommer från bergsaltets inlagringar. Schubert m.fl. redogör för denna diskussion, och beskriver hur de observerat arkéceller *in situ* (på plats) i dessa gamla saltkristaller⁵², men diskussionen tystas säkert inte av detta. De sfäriska cellerna är dock intressanta oberoende av om de är antika eller moderna.

Samma forskargrupp har undersökt egenskaperna hos de sfäriska partiklarna och betingelserna för deras bildande.⁵³ Forskarna färgade arkéerna *in situ* (i de gamla saltkristallerna) med ett grönt färgämne (SYTO 9) som bara tas upp av celler med intakt membranpotential och ett rött färgämne (propidiumjodid) som binder till alla celler⁵⁴. Levande celler färgas då gröna medan döda celler, som saknar membranpotential, färgas röda.⁵⁵ Fendrihan m.fl. fann att saltkristallerna, närmare bestämt sfäriska partiklar inne i dem, då färgades gröna, vilket innebär att de hade en intakt membranpotential.⁵³ Sfrärer

⁵⁰ Kotula m.fl. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111:4838

⁵¹ Manzella (2014) *Microbe* 9:180

⁵² Schubert m.fl. (2010) *Environm Microbiol* 12:440

⁵³ Fendrihan m.fl. (2012) *Geobiology* 10:424

⁵⁴ Blandningen kallas LIVE/DEAD BacLight och är kommersiellt tillgänglig.

⁵⁵ Leuko m.fl. (2004) *Applied and Environmental Microbiology* 70:6884

som isolerats efter att saltkristallerna lösts upp låg ofta i grupper om tre, och hade en diameter på 0,4 μm , medan stavar av *Halobacterium salinarum* hade en diameter på 0,65 μm . De utsatte sedan en laboratoriestam av *Halobacterium salinarum*, som är en stavformad arké, för mycket låg vattenaktivitet, $a_w \leq 0,75$. Härvid bildades sfäriska partiklar. Sfärbildningen skedde långsamt i 4M NaCl ($a_w \leq 0,75$), men i 4 M LiCl ($a_w \leq 0,73$) bildas 3–4 sfärer från varje stav på bara några sekunder. Forskarna kunde också se att förutom de stavformade *Halobacterium salinarum* (två olika stammar) och *H. noricense* kunde också den pleiomorfa arkén *Haloferax mediterranei* bilda sfärer i 4M LiCl.⁵³

Förutom att stavar och sfärer av *Halobacterium salinarum* skilde sig i form, skilde de sig också genom att mängden ATP (ng ATP/mg protein) var 50 gånger lägre i sfäerna än i stavarna. Låg mängd ATP karakteriserar också bakteriers endosporer. Sfäerna innehöll också mindre mängd proteiner från S-lagret (sid 231) än stavarna och deras cellväggar totalt mindre mängd protein än stavarnas cellväggar. Både sfärer och stavar lyserade i destillerat vatten. Dessa egenskaper skiljer dem från såväl endosporer som exosporer hos bakterier. När forskarna odlade sfärer i näringslösning omvandlades dessa till stavar efter en lagfas som var längre (10–12 dagar) än när kulturen startades med stavar (1–2 dagar). För övrigt hade stavar och sfärer lika egenskaper. Eftersom sfäerna kunde ge upphov till växande stavar innehåller de uppenbart fullständiga genom.⁵³ I växande *Halobacterium salinarum*-celler finns 15–25 genomkopior⁵⁶ så troligtvis innehåller varje sfär flera genomkopior.

Det förefaller troligt att sfäerna är ett vilstadium av arkéerna och kan återaktiveras när levnadsbetingelserna förbättras. Dessa resultat visar på en helt ny överlevnadsform som inte liknar bakteriers exosporer eller endosporer.

Kapitel 12 Svampsymbios

Svampar etablerar många olika sorters symbioser framför allt med fototrofa partner. Här beskrivs några nya rön om hur mutualistiska symbioser kan uppkomma, och hur ett och samma växthormon har motsatt effekt på olika mykorrhizabildning.

Utveckling av mutualistisk symbios. Mutualistiska symbioser har skapat dagens eukaryota organismer; utan sina energigivande mitokondrier (och för en del kloroplaster) skulle de rätt och slätt inte kunna existera. Kunskapen om hur sådana symbioser etableras är dock ofullständig. Ofta verkar det vara ett ursprungligt parasitiskt förhållande som utvecklats till ömsesidig nytta; några sådana symbioser beskrivs i läroboken (sid 153–154). I andra fall kan det handla om tilltänkt föda som undslipper en födovakuol och kan etablera sig i värdcellens cytoplasma. Den allmänna uppfattningen har varit att det krävs en hel del anpassningar för att två ursprungligen frilevande organismer ska etablera en obligat mutualistisk symbios. Ett nytt arbete av Hom m.fl. visar att så inte behöver vara fallet.⁵⁷

Författarna använde jästen *Saccharomyces cerevisiae* och grönalgen *Chlamydomonas reinhardtii*, vilka bägge har välkända genetiska system som gjorde det lätt att genomföra genetiska undersökningar. Organismerna odlades tillsammans i ett belyst medium med glukos som enda kolkälla, nitrit som enda kvävekälla, och ingen koldioxid tillgänglig. Algen är obligat autotrof, och kan inte växa utan tillgång till

⁵⁶ Breuert m.fl. (2006) *PLoS One* 1:e92 doi:10.1371/journal.pone.0000092

⁵⁷ Hom m.fl. (2014) *Science* 345:94

koldioxid, och jästsvampen kan inte utnyttja nitrit som kvävekälla, så ingen av dem kunde växa ensam i detta medium. När de sammanfördes etablerade de inom en dag en symbios där algen reducerade nitrit till ammoniak som jästen kunde utnyttja som kvävekälla, och jästen oxiderade glukos till koldioxid som algen kunde utnyttja. Denna etablering krävde ingen genetisk modifiering av de ursprungliga stammarna, och heller inte någon specifik ratio mellan organismer av varje slag vid starten eller någon specifik koncentration av näringsämnen så länge nitrithalten översteg 0,3 mM och glukoshalten 1,7 mM. Symbiosen etablerades snabbare om kulturerna skakades, vilket tyder på att cell-cell-kontakt var nödvändig. Författarna upprepade sina försök med flera andra askomyceter oförmögna att utnyttja nitrit och andra arter av *Chlamydomonas*, med samma resultat. Med en filamenterande svampsymbiont (*Aspergillus nidulans*) observerades intim kontakt mellan svamphyfer och algceller liknande den i lavar, och algens cellväggar var tunnare än hos frilevande algceller troligen beroende på cellväggspåverkande ämnen utsöndrade av svampen.

Under dessa betingelser kunde vare sig svamp eller alg prolifera ensam, så symbiosen var både mutualistisk och obligat. Resultaten visar att etablerandet av sådan symbios kan ske snabbt och lätt, utan omfattande genetisk anpassning eller samevolution, och också snabbt resultera i morfologiska förändringar.

Mykorrhiza. Ektomykorrhiza (sid 252) mellan basidiomyceter och olika växter är inte obligat, men mutualistisk. Plett och medarbetare har nyligen studerat hur svamphyferna kan omkransa rottrådar utan att stötas bort av växtens försvarsmekanismer.⁵⁸ Svampen *Laccaria bicolor* (tvåfärgad laxskivling) etablerar ektomykorrhiza med popplar (*Populus* sp.). Ett protein kallat MiSSP7 utsöndrat av svampen togs upp av rotcellkärnor, där det interagerade med ett växtprotein PtJAZ6 som represserar jasmonsyrasignalering. Jasmonsyra är ett växthormon som är inblandat såväl i reglering av växtens utveckling som dess stressförsvar.⁵⁹ Plett m.fl.⁵⁸ kunde visa att MiSSP7 hindrade nedbrytning av PtJAZ6 i rotcellkärnan, vilket ledde till nedreglering av jasmonsyrasignaleringen. De flesta gener som då nedreglerades via MiSSP7-PtJAZ6-interaktionen verkade dock påverka rotcellväggarnas uppbyggnad snarare än försvarsmekanismer. Cellväggsmodifieringarna skulle kunna underlätta bildandet av mycelnät runt rottrådarna.

Svampar som bildar vesikulär-arbuskulär endomykorrhiza (sid 251) orsakar i stället högre produktion av jasmonsyra och därmed uppreglering av jasmonsyrasignaleringen⁶⁰. Detta verkar leda till ökad transport av kolhydrater (näringsskälla för svampen) i rötterna⁵⁸.

Det är fascinerande att ett och samma hormon kan ha diametralt motsatt effekt på två så lika symbiosförhållanden som här, vilka huvudsakligen skiljer sig i om symbionten lever intracellulärt eller extracellulärt!

Kapitel 13 Jättevirus

Megavirus (sid 258) har en arvsmassa på upp till 1,2 Mb. Dessa virus infekterar amöbor.

⁵⁸ Plett m.fl. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111:8299

⁵⁹ Wasternack (2014) *Biotechnol Adv* 3:31

⁶⁰ López-Ráez m.fl. (2010) *J Exp Bot* 61:2589

Under de senaste åren har ännu fler jättevirus upptäckts.⁶¹ Philippe och medarbetare⁶² har studerat två jättevirus, *Pandoravirus dulcis* från kusten i centrala Chile och *Pandoravirus salinus* från Melbourne i Australien. Namnet kommer av de amforaliknande virionerna och de överraskningar som forskarna väntade sig att finna när de studerades närmare, eftersom de verkar vara så olika andra virus. Båda dessa virus infekterar frilevande amöbor av släktet *Acanthamoeba*. *P. salinus* har en genomstorlek på 2,5 Mb och *P. salinus* på 1,9 Mb. Bägge genomen är alltså större än de tidigare upptäckta megavirusens och de minsta frilevande bakteriernas (sid 19), och t.o.m. större än de minsta parasitiska eukaryoternas. Vid sekvensering av DNA från dessa pandoravirus fann Philippe och medarbetare 2556 sekvenser som de tror är proteinkodande hos *P. salinus* och 1502 hos *P. dulcis*.

Pandoravirionerna är också så stora (omkring 1 µm) att de syns bra i ljusmikroskop. Genom studier av hur de replikerade kunde Philippe m.fl.⁶² visa att de är virus och inte cellulära organismer. Replikationscykeln varar 10–15 timmar i amöban och startar genom att partiklar tas upp i en vakuol. Det membran som omger viruspartikeln sammansmälter med vakuolens membran och innehållet i viruskapsiden överförs till cytoplasman via en por som bildas i de sammansmälta membranerna. Här bildas så småningom nya viruspartiklar i en process som involverar cellkärnan. Infektionsförloppet avslutas med att amöban lyseras och släpper ut omkring 100 nya viruspartiklar.

DNA-sekvenserna från de två pandoravirusen är mycket lika varandra förutom att det större viruset innehåller stora gensegment som saknas i det mindre viruset. En jämförelse med kända sekvenser från bakterier och andra virus visade dock att 93 % av pandoravirusgenerna inte liknar någonting som tidigare sekvenserats. Dessa virus verkar alltså inte vara särskilt nära släkt med vare sig cellulära organismer eller andra virus. Analys av några gener som förekommer också annorstädes gav olika resultat. Sekvenser som kodar för DNA-polymeras i B-familjen⁶³ grupperade alla jättevirus (pandoravirus, mimivirus, megavirus) tillsammans, skilda från alla tre domänerna, medan två andra gensekvenser grupperade pandoravirus närmast tillsammans med *Acanthamoeba*. Pandoravirusgenomen innehåller inga (kända) gener som har med translation att göra, inga som har med bildning av ATP och heller inga gener som kodar för ribosomkomponenter.⁶²

Ett annat jättevirus är *Pithovirus sibericum* som isolerats från 30 000 år gammal permafrost i Sibirien.⁶⁴ Det isolerade materialet kunde sedan förökas i amöbor. Viruspartiklarna hade samma amfora-form som pandoraviruspartiklar och var 1,5 µm i diameter. Genomet omfattade dock "bara" 0,6 Mb. Om författarna lyckats återuppliva ett permafrostvirus leder detta givetvis till en oro att smältande permafrost, eventuellt beroende på växthuseffekten, kan leda till att "nya" infektiösa virus, som också skulle kunna tänkas smitta människor, reaktiveras vid upptäckningen. Tyvärr diskuteras inte möjligheten att viruset är en kontaminering av materialet eller att det kontaminerats vid odlingen i amöbor. Om viruset verkligen kommer från inlagringen är detta troligen det äldsta virus som någonsin kunnat reaktiveras. Av sekvenseringsanalysen framgår att *Pithovirus sibericum* inte är släkt med *Pandoravirus*; alla analyser inklusive en av dess B-

⁶¹ Pennisi (2013) *Science* 341:226

⁶² Philippe m.fl. (2013) *Science* 341:281

⁶³ Hos bakterier hör DNA-polymeras II, ett enzym inblandat i DNA-reparation, hit; hos eukaryoter bl.a. DNA-polymeras α som är inblandat i DNA-replikation i kärnan.

⁶⁴ Legendre m.fl. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111:4274

familj-DNA-polymeras placerade *Pithovirus* tillsammans med stora ikosahedrala DNA-virus.

Olika jättevirus är alltså inte nödvändigtvis släkt med varandra utan kan ha olika evolutionär utvecklingshistoria. Huruvida de forskare som hävdar att jättevirusen utgör en egen, fjärde livsdomän har rätt, som antyds av Philippe och hans kollegors analys ovan⁶², återstår att se.

Kapitel 13 Prioner och cancer

Det först beskrivna prionproteinet, som också fått namnet "prionprotein" (PrP, sid 288-289) bildas genom att ett normalt nervprotein får förändrad struktur och ackumuleras i nervcellerna som så småningom dödas. Den här egenskapen, att ett protein omlagrar normala proteiner till samma konformation som det själv har, finns också hos proteiner som orsakar neurologiska sjukdomar som Parkinsons sjukdom, Alzheimers sjukdom, Huntingtons sjukdom och amyotrofisk lateralskleros (ALS). Mutanta varianter av tumörsuppressornprotein p53 kan uppvisa liknande egenskaper.^{65 66} Detta skulle betyda att prionbildning också kan ha samband med cancersjukdom.

p53, som kodas från genen *TP53*, är ett regulatoriskt protein som deltar i en mängd cellulära processer som apoptos, DNA-reparation och cellcykelkontroll. Det normala p53 spelar en mycket viktig roll i att skydda celler från cancer (det är som sagt en tumörsuppressor). *TP53* är den gen som oftast är muterad i cancerceller; mutationer i *TP53* finns i mer än 50 % av alla maligna tumörer och innebär ofta att canceren kan utvecklas snabbare och dottertumörer (metastaser) bildas.

Normalt är p53 en tetramer av fyra likadana peptider. Mutationer i *TP53* kan leda till en förändrad struktur i proteinet, och till att p53 binder till andra proteiner än vad det normala proteinet gör. Mutant p53 kan aggregera och bilda amyloida aggregat liknande dem vid Alzheimers sjukdom, och också propagera sådan aggregering till normala p53-proteiner. Detta gäller i synnerhet mutanter med defekter i den C-terminala, DNA-bindande delen av proteinet, där också de flesta mutationer som påträffats i cancertumörer finns. Mutanta p53 kan alltså uppträda som prioner. Hur detta är relaterat till själva tumörens uppkomst och propagering är oklart. Med tanke på att en viktig funktion hos normalt p53 är att undertrycka och hindra uppkomst av tumörer genom att hindra cellproliferering är det dock uppenbart att en mutant som saknar denna funktion, och dessutom kan sprida dysfunktionaliteten till normala kopior av proteinet, kan bidra till uppkomst och spridning av tumörer. Silva m.fl.⁶⁵ diskuterar några olika modeller för hur detta skulle kunna gå till.

De här beskrivna egenskaperna visar på att det finns en likhet i mekanismen för uppkomst av neurologiska sjukdomar och cancer. Möjligheter att förhindra p53-prionbildning skulle kunna vara en väg för att bekämpa vissa typer av cancer. Nyare studier av jästprioner (sid 288) visar att det också finns patogena sådana. Eftersom jästprionerna har samma typ av struktur som mänskliga prioner skulle de kunna utgöra ett bra modellsystem för studier av prionbildning och hur sådan skulle kunna hämmas⁶⁷,

⁶⁵ Silva m.fl. (2014) *Trends Biochem Sci* 39:260

⁶⁶ Stone (2012) *Microbe* 7:551

⁶⁷ Chernova (2014) *FEMS Microbiol Rev* 38:326

även om jäst och flercelliga eukaryoter verkar ha delvis olika system för disaggregering av amyloida proteinkomplex⁶⁸.

⁶⁸ Torrente och Shorter (2014) *Prion* 7:457