

Uppdateringar och fördjupningar augusti 2016

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 Gasplasma för desinfektion

Kontaktlinser är kinkiga att hålla fria från mikroorganismer, eftersom både ögat och linserna är känsliga. Heaselgrave m.fl.¹ beskrev nyligen inaktivering av *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* och trofozoiter² och cystor av *Acanthamoeba polyphaga* och *Acanthamoeba castellanii* med kall atmosfärisk gasplasma (CAP)³. Plasma kan ha antimikrobiell effekt genom att orsaka bildandet av reaktiva syre- och kväveföreningar, och om den produceras exempelvis genom elektriska urladdningar vid rumstemperatur kan föremål behandlas med plasma vid låg temperatur och atmosfäriskt tryck, vilket utsätter dem för minimal påverkan.

Alla de ovan nämnda organismerna kan orsaka hornhinneinflammation (keratit), och amöborna är extra problematiska eftersom de bildar mycket motståndskraftiga cystor (sid 252). I USA uppges kostnaden för behandling av kontaktlinsförknippad keratit vara omkring 175 miljoner USD per år.¹ Vanliga desinfektionsmedel som används för kontaktlinser och hjälper mot växande bakterier och parasiter fungerar dåligt mot *Acanthamoeba*-cystor, med ofullständig inaktivering t.o.m. efter 24 timmars exponering.⁴ CAP-behandling av kontaktlinser med *A. castellanii*-cystor ledde till fullständig inaktivering (3,8 logaritmers reduktion, inga överlevande cystor) efter 12 minuter. Ingen påverkan på linserna kunde ses.¹ Metoden ger alltså väsentligt mycket bättre resultat än vanliga desinfektionsmedel för linsor.

Kapitel 3 MreB och cellväggssyntes

I uppdateringarna 2012 beskrevs nya rön om MreB, det protein som sedan länge är känt att styra cellväggssyntesen hos bakterier och är en väsentlig orsak till att stavformade bakterier är stavformade. Den tidigare rådande modellen var att MreB bildar helikala filament runt hela cellen innanför peptidoglykan(PG)lagret, och de nya rönen tydde på att de långa helikala filamenten var artefakter orsakade av den metodik som använts medan proteinet egentligen bildade mycket kortare filament.

¹ Heaselgrave m.fl. (2016) *Appl Environm Microbiol* 82:3143

² Trofozoiten är den växande cellen, i motsats till cystan som är ett vilstadium

³ Gasplasma kan definieras som en joniserad gas där elektronerna separerats från atomkärnorna (se 2013 års uppdatering).

⁴ exempelvis Kilvington och Lam (2013) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:4527

Samtidigt och strax efter detta kom nya undersökningar vilka undvek den metodik som kritiserats i de nämnda arbetena. Löwe och medarbetare⁵ visade att MreB från *Caulobacter* kunde bilda ganska långa filament tätt förbundna med cellmembranet *in vitro*, medan Rohrbach och medarbetare⁶ med hjälp av avancerad mikroskopi kunde visa att MreB bildade filament *in vivo* i *Bacillus subtilis* som huvudsakligen var lokaliserade vinkelrätt mot cellens längdaxel och upp till 1 µm långa (en *B. subtilis*-cell är vanligen mellan 2 och 6 µm lång), men en del filament var längre och därmed kunde de omsluta cellen mer än ett varv och då förbinda och organisera olika PG-syntetiserande komplex med varandra. En cell innehåller antagligen flera filamentsystem vilka kan röra sig åt olika håll, men inte korsar varandra.⁷ Nya PG-trådar sätts som regel in vinkelrätt mot cellens längdriktning i såväl grampositiva som gramnegativa cellväggar, även om detaljerna varierar. Dessa och andra observationer kan sammanfattas i följande modell: Filamenten varierar i längd delvis beroende på oregelbundenheter i cellväggen. PG-syntesen styrs till de ställen i cellen där filamenten finns. Där cellväggen av olika orsaker råkat bli konkav ligger filamenten tätare. Här bildas därför mer PG, vilket gör väggen jämnare.⁸ Eftersom MreB-filamenten huvudsakligen finns runt "långsidorna" av cellen och inte vid dess poler (där cellväggen är konvex) kommer cellen att växa till på längden på grund av nybildningen av PG.⁸

Filamentens exakta roll är dock ännu inte helt klarlagd. De roterar under pågående cellväggsyntes, men studier av Morgenstein m.fl.⁹ visade att stavformade bakterier kan upprätthålla stavformen utan MreB-rotation under goda tillväxtbetingelser, och att endast begränsad rotation krävdes för stavform vid osmotisk stress. MreB interagerar med flera andra proteiner. Utan funktionellt PBP2 (ett transglykosylas-transpeptidas, se sid 78) roterade inte MreB-filamenten, så Morgenstein m.fl.⁹ postulerar att transpeptidering är det som driver denna rotation, att membranprotein som RodZ förbinder MreB i cytoplasman med PBP2 i periplasman och att MreB-rotationen möjliggör jämnare fördelning av PG-syntesmaskineriet i cellväggen. Många stavformade bakterier som saknar MreB, som exempelvis aktinobakterier och alfa-proteobakterier som rhizobier och *Hyphomicrobium* verkar i stället tillväxa polärt.¹⁰

Kapitel 4 Nitrifikation i ett steg

Litotrofa mikroorganismers oxidation av ammoniak till nitrat har ansetts kräva två steg, och (minst) två separata organismer: nitrosofierare som oxiderar ammoniak (kvävevalens -III) till nitrit (kvävevalens +II), och nitrifierare som därefter oxiderar nitrit till nitrat (kvävevalens +III) (sid 160). Bland organismer som utför den första reaktionen återfinns såväl bakterier som arkéer, men de senare (taumarkéer, sid 235) förefaller vara talrikare och ekologiskt väsentligare. Den andra reaktionen har bara belagts hos bakterier. Detta har länge förvånat mikrobiologer, eftersom det borde kunna vara en fördel för en organism att kunna oxidera sin energikälla fullständigt, och motsvarande oxidation av metan till koldioxid sker hos en och samma organism. Nu har

⁵ van den Ent (2014) *eLife* doi:10.7554/eLife.02634

⁶ Olshausen (2013) *Biophys J* 105: 1171

⁷ Errington (2015) *Nature Rev Microbiol* 13:241

⁸ Ursell m.fl. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* doi: 10.1073/pnas.1317174111

⁹ Morgenstein m.fl. (2015) *Proc Natl Acad Sci USA* 112:12510

¹⁰ Randich och Brun (2015) *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2015.00580

två forskargrupper visat att en och samma bakterie faktiskt kan katalysera fullständig ammoniakoxidation.^{11,12}

Forskarna insåg att den fullständiga oxidationen av ammoniak till nitrat, kallad commamox, borde vara energetiskt fördelaktig när ammoniak tillgången var begränsande, och satte upp anrikningskulturer under sådana betingelser. van Kessel m.fl.¹² fann efter ett år att deras kultur huvudsakligen innehöll bakterier i släktena *Brocadia* och *Nitrospira*. *Brocadia* är ett släkte anammoxbakterier (sid 129) medan *Nitrospira* genetiskt räknas till eget fylum (Nitrospirae) som med dagens data¹³ har δ-proteobakterier bland sina närmaste släktingar. Anammoxbakterierna är kända för att oxidera ammoniak anaerobt med nitrit som elektronmottagare, medan bakterier i släktet *Nitrospira* är kända för aerob nitritoxidation. Genom att sekvensera allt DNA från anrikningskulturerna kunde van Kessel m.fl. sätta samman två hela *Nitrospira*-genom, och jämförelser med kända gensekvenser visade att där fanns samtliga gener som krävs inte bara för nitritoxidation, utan också för att oxidera ammoniak till nitrit. Eftersom genomen saknade gener som vanligen krävs för upptag av externt nitrit och litotrof tillväxt med nitrit som energikälla, drog forskarna den slutsatsen att dessa *Nitrospira*-bakterier använder ammoniak som energikälla och oxiderar denna hela vägen till nitrat. Bakterierna fick namnen Candidatus *Nitrospira nitrosa* respektive Candidatus *Nitrospira nitrificans*.

Daims m.fl.¹¹ anrikade sina kulturer i fyra år, och hade då praktiskt taget en renkultur av en *Nitrospira*-art samt några icke-nitrifierande bakterier. DNA-sekvensering och genomrekonstruktion gav också här ett genom med gener för fullständig ammoniakoxidation och avsaknad av kända gener inblandade i användandet av nitrit som extern energikälla. Forskarna gav sin bakterie namnet *Candidatus Nitrospira inopinata*.

Gener är förstås inget bevis för att en metabolisk reaktion faktiskt äger rum; de måste uttryckas också, och genprodukterna ska vara aktiva. van Kessel m.fl.¹² kunde visa med hjälp av FISH (sid 143) och ¹⁴C-märkta substrat att deras anrikade bakterier bildade aktivt ammoniakoxxygenas (AmoA, det första enzymet i litotrof ammoniakoxidation), och kunde fixera koldioxid samtidigt som de oxiderade ammoniak. Daims m.fl.¹¹ odlade sin anrikade kultur av *Cand. N. inopinata* med ammoniak och koldioxid som enda källor till kväve, energi och kol, och fann att bakteriernas tillväxt var kopplad till oxidation av ammoniak till nitrat. Analys av proteomet (samtliga proteiner) visade att enzym i såväl ammoniakoxidation som nitritoxidation fanns uttryckta. Bägge forskargrupperna kunde sedan visa att den variant av *amoA* som fanns hos dessa fullständiga ammoniakoxiderare skilde sig från motsvarande gen hos "vanliga" nitrosifierande bakterier, men däremot var vanlig i *Nitrospira*-sekvenser från olika miljöer, vilket talar för att fullständig ammoniakoxidation, commamox, faktiskt kan vara en ganska vanlig företeelse

Kapitel 5 Aktiv lysogeni

Temperata fager (sådana som kan etablera lysogeni, se sid 265) bidrar till sina värdars genetiska repertoar genom gener de bär, vilka uttrycks från den represserade profagen, s.k. fagkonversion. Hit hör många virulensfaktorer hos bakterier (sid 266). Uttrycket av dessa regleras av såväl värdbakteriens som fagens regleringsystem. Men temperata fager

¹¹ Daims m.fl. (2015) *Nature* 528:504

¹² van Kessel m.fl. (2015) *Nature* 528:555

¹³ Hug m.fl. (2016) *Nature Microbiol* DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2016.48

kan också delta aktivt i regleringen av värdbakteriens genuttryck. Fagreglering av bakteriegenuttryck (fag-RS, "regulatory switch") innebär kontrollerad och precis excision av en profag som är integrerad i en bakteriegen så att bakteriegensekvensen återställs och genen kan uttryckas, men utan att fagen initierar lytisk utveckling och utan bakterielys. Denna process har forskarna kallat "aktiv lysogeni", vilket kanske inte är en helt lyckad term – också "vanlig" lysogeni är "aktiv" såtillvida som fagkonversion ju innebär att bakterien bidrar med virulensfaktorer till sina värdar. Om profaggenomet återintegreras är den aktiva lysogenin reversibel; om så inte sker förloras faggenomet och den aktiva lysogenin är irreversibel. Tyvärr är föga känt ännu om de mekanismer som styr denna aktiva lysogeni. I det följande beskrivs några exempel.¹⁴

Listeria-bakterier fagocyteras efter att bakterien infekterat en människa, och bryter sedan ned fagosomen och replikeras i värdcellens cytoplasma (sid 171:3). För detta krävs uttryck av en del av de gener som annars är associerade med kompetens för transformation (sid 107). *Listeria*-bakterier är inte naturligt transformerande och saknar såväl det kforumregleringssystem som krävs för att inducera kompetens som flera av de gener som är inblandade i själva DNA-upptaget vid transformation. En *comK*-lik gen¹⁵ och gener som kodar för delar av DNA-upptagsapparaten finns, men hos många *Listeria*-bakterier är *comK*-genen inaktiverad genom insertion av en profag i den kodande sekvensen. Rabinovich m.fl.¹⁶ visade att *comK* liksom DNA-upptagsgenerna transkriberas aktivt efter infektion med bakterien, och att genprodukterna krävs för att bakterien ska kunna ta sig ur fagosomen efter fagocytos. En fungerande *comK*-gen återställdes genom precis excision av profagen, men ingen lytisk utveckling kom till, och cellerna lyserade inte. Hur detta regleras är ännu inte känt.

Hos en del *Streptococcus pyogenes*-stammar finns en kryptisk¹⁷ profag (SpyCIM1) integrerad i *mut*-operonet, vilket kodar för protein som reparerar felparningar i DNA. När SpyCIM1 är integrerad här är operonet inaktivt, vilket innebär att fler felparningar blir kvar i DNA:t och orsakar mutationer. När bakterierna växer exponentiellt under goda förhållanden skärs den kryptiska profagen ut och replikeras som en episom (plasmid). *mut*-operonet är då intakt och mutationsfrekvensen låg. Vid svält eller annan stress integreras SpyCIM1-DNA:t igen, *mut*-operonet inaktiveras och mutationsfrekvensen ökar, vilket rimligtvis är till fördel för bakterien som då kan ha chansen att erhålla en mutation som reducerar stressen.¹⁸ Senare undersökningar har visat att SpyCIM1 påverkar uttrycket av mer än hundra gener, dels medan den fortfarande är integrerad i *mut*-operonet, dels efter att den skurits ut.¹⁹ En bioinformatisk undersökning av streptokockgenom visade förekomst av faglika sekvenser (forskarna letade efter homologer till integrasgener) i flera andra kodande gensekvenser, som *rpsD* (kodar för ett ribosomalt protein) och *metE* (kodar för metioninsyntas). Huruvida dessa är inblandade i fag-RS är inte undersökt än.²⁰

Ovanstående är exempel på reversibel aktiv lysogeni. Irreversibel sådan skulle kunna vara ett led exempelvis i en differentieringsprocess. Exempel på detta är kända från *Bacillus* i samband med endosporbildningen. En kryptisk profag benämnd *skin* är

¹⁴ Feiner m.fl. (2015) *Nature Rev Microbiol* 13:641

¹⁵ Hos *Bacillus subtilis* kodar *comK* för den transkriptionsfaktor som styr uttrycket av andra gener inblandade i kompetens.

¹⁶ Rabinovitch m.fl. (2012) *Cell* 150:792

¹⁷ En kryptisk profag utgörs av DNA-sekvenser från en profag som förlorat gener som skulle möjliggöra lytisk utveckling.

¹⁸ Scott m.fl. (2012) *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmich.2012.00317

¹⁹ Hendrickson m.fl. (2015) *PLoS One* 10(12): e0145884; doi:10.1371/journal.pone.0145884

²⁰ Nguyen och McShan (2014) *Front Cell Infect Biol* doi: 10.3389/fcimb.2014.00109

integrerad i *sigK*, vilken kodar för en av de sigmafaktorer som aktiveras sekventiellt under endosporbildningen. Under sporuleringsprocessen sker en specifik rekombination, styrd av ett *skin*-kodat rekombinas, i spormodercellen mellan de repeterade sekvenser som flankerar *skin*, vilket leder till att denna skärs ut och en fungerande *sigK*-gen bildas. Excisionen styrs av sigma E, som bara uttrycks i spormodercellen, vilket betyder att motsvarande rekombination inte äger rum i den blivande endosporen.¹⁴ Liknande kryptiska profager har påträffats i genomen hos andra endosporbildare, och i andra gener förknippade med differentieringen av endosporer. För samtliga som kunnat studeras verkar mekanismen vara likartad: precis excision av profagesekvensen ur modercellens genom återställer den gen i vilken profagesekvensen varit integrerad så att den kan uttryckas.²¹ Också differentiering av heterocystor hos kvävefixerande cyanobakterier (fig 3.1, 6.4) verkar involvera irreversibel excision av profagelement.²² I flera andra exempel är excision av en profagesekvens som ett led i genreglering ännu inte visat, men en sannolik möjlighet, som exempelvis expression av *Staphylococcus aureus* β -toxin, växling mellan förstärkt och försvagad virulens hos *Legionella pneumophila* samt biofilmbildning hos *E. coli*.¹⁴

Kapitel 6 Hur såg de första bakterierna ut?

Hur har evolutionen inom bakteriedomänen lett fram till de former som finns idag, och hur är monoderma²³ bakterier relaterade till diderma bakterier?²⁴ Fylumet Firmicutes, dit bland annat de monoderma endosporbildande bacillerna och klostridierna hör, innehåller också några intressanta grupper där cellerna är diderma. Hit hör diverse anaeroba kocker som *Selenomonas*, *Veillonella*, *Acetonema* och *Negativicoccus* som antingen bildar en egen klass²⁵ eller hör till klassen klostridier²⁶. En del av dessa kan bilda endosporer.²⁷ Deras yttermembran innehåller lipopolysackarid (LPS) och yttermembranproteiner som är homologa till yttermembranproteiner hos vanliga gramnegativa bakterier men inte särskilt närbesläktade med dessa, vilket talar mot nylig horisontell överföring.

Endosporbildning inleds med en asymmetrisk celldelning följt av att modercellens cellmembran omsluter den blivande sporen (sid 51, fig 3.10). Tocheva m.fl.^{27,28} har jämfört endosporbildningen hos *Bacillus* och *Acetonema* med hjälp av kryoelektronmikroskopi, en teknik som gör det möjligt att studera snabbfrysta celler utan föregående fixering. De fann att sporuleringsprocessen hos bägge bakteriearterna resulterade i blivande endosporer omgivna av sporcellsmembran, ett tunt peptidoglykanlager och ett yttre membran härrörande från modercellens cellmembran efter att detta omslutit den blivande sporen. Mot slutet av sporuleringsprocessen förlorade *Bacillus*-sporererna sitt yttermembran medan *Acetonema*-sporerernas blev kvar,

²¹ exempelvis Abe m.fl. (2014) *PLoS Genetics* 10, doi:10.1371/journal.pgen.1004636

²² exempelvis Henson m.fl. (2011) *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2938

²³ En monoderm cell är omgiven av endast ett membran, cellmembranet. En diderm cell är omsluten av två membran, cellmembranet och ett yttre membran. En vanlig grampositiv bakterie är då monoderm, medan en vanlig gramnegativ bakterie är diderm.

²⁴ Här bortses från andra varianter av cellväggar som förekommer hos en del bakterier: yttre membran utan LPS, flerskiktade cellväggar innehållande protein och kolhydrater, m.m.

²⁵ Marchandin m.fl. (2011) *Int J Syst Evol Microbiol* 60:1271

²⁶ Yutin och Galperin (2013) *Environmental Microbiol* 15:2631

²⁷ Tocheva m.fl (2011) *Cell* 146:799

²⁸ Tocheva m.fl. (2013) *Molec Microbiol* 88:673

och bildade yttermembranet hos den germinerande cellen. Tocheva och medarbetare²⁹ diskuterar 2016 huruvida grampositiva endosporbildare kan vara ursprunget till diderma bakterier. Det råder enighet idag om att Firmicutes-fylumet är monofyletiskt och innehåller såväl monoderma som diderma bakterier. Det är då rimligt att tänka sig att i detta fylum har antingen monoderma bakterier utvecklats från ursprungliga diderma bakterier, eller tvärtom. Parsimoni³⁰ talar för det första alternativet, och kryoelektronmikroskopanalyser av endosporbildningen ger en plausibel bild av hur utvecklingen kan ha gått från ett till två membran. Den motsatta utvecklingen är förstås inte utesluten, och evolutionen är inte alltid parsimonisk.

I moderna fylogenetiska träd placeras fylum Firmicutes nära förgreningspunkten mot arkéer och eukaryoter³¹. Flera forskare har genom åren föreslagit att monoderma bakterier är de ursprungliga, ur vilka diderma bakterier utvecklats.³² Argumenten för detta har varierat, och en del av dem är motsagda idag, men Tochevas och hennes medarbetares analys visar att en sådan utveckling är fullt möjlig. Vad för evolutionära krafter kan ha drivit en utveckling från monodermi till didermi – det måste ju vara mycket mera kostsamt för organismen att syntetisera två membran, där komponenterna till det yttre dessutom måste transporteras ut utanför cellmembranet, än att bara tillverka ett? Samtidigt har det utan tvekan varit en framgångsrik utveckling – de diderma bakterierna är idag mycket talrikare och mer mångformiga än de monoderma. Gupta³³ har föreslagit att antibiotikaselektion ligger bakom. Monoderma bakterier som streptomyceter bildar de allra flesta kända antibiotika, vilket ger dem en evolutionär fördel vid tävlan om resurser gentemot bakterier som är känsliga för dessa antibiotika. Det är väl känt idag att gramnegativa bakterier generellt är mindre känsliga för antibiotika än grampositiva, eftersom yttermembranet utgör en permeabilitetsbarriär.

Det finns alltså ett plausibelt evolutionärt scenario där de ursprungliga bakterierna var monoderma. Evolutionen av antibiotikaproduktion hos några ledde till en stark selektion för retention av det yttre membran som omgav den nybildade endosporen, eftersom detta gav bakterien ett bättre skydd mot antibiotika. Denna selektion ledde så till uppkomst av diderma bakterier. Huruvida detta scenario är sant kommer framtiden säkert att kunna utvisa.

Kapitel 7 Bakterier i djuphav

Mer än 70 % av jordens yta täcks av vatten, och djuphavsområdena med högt hydrostatiskt tryck (djupare än 1 km, hydrostatiskt tryck mer än 100 atm [10 mPa]) erbjuder några av jordens största ekosystem – djuphaven har beräknats innehålla ca 75 % av havens volym och drygt 60 % av biosfären^{34, 35}. På grund av svårigheterna att

²⁹ Tocheva m.fl. (2016) *Nat Rev Microbiol* doi:10.1038/nrmicro.2016.85

³⁰ Parsimoni innebär att i första hand tänka sig den minst komplicerade lösningen när det finns flera alternativ.

³¹ se exempelvis Hug m.fl. (2016) *Nature Microbiol* DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2016.48, Raymann m.fl. (2015) *Proc Natl Acad Sci USA* 112:6670, Gouy m.fl. (2015) *Phil Trans R Soc B* 370 doi.org/10.1098/rstb.2014.0329

³² exempelvis Gupta (2000) *Crit Rev Microbiol* 26:111, Lake (2009) *Nature* 460:967, Sutcliffe (2010) *Trends Microbiol* 18:464, Cavalier-Smith (2014) *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a016006; Weiss m.fl. *Nature Microbiology* doi: 10.1038/NMICROBIOL.2016.116

³³ Gupta (2011) *Antonie van Leeuwenhoek* 100:171

³⁴ Den del av jorden där liv kan förekomma.

³⁵ Fang m.fl. (2010) *Trends Microbiol* 18:413

återskapa piezofilernas³⁶ levnadsmiljöer på laboratorier är kunskapen om deras anpassningar ännu rudimentär. Wannicke m.fl.³⁷ har nyligen utvecklat en metod att odla i tryckkammare som förhoppningsvis kan ge bättre kunskap i framtiden. Dessa forskare odlade den piezofila *Photobacterium profundum* och den piezotoleranta *Colwellia maris* (bägge γ -proteobakterier) i vatten från ett djup (3 044 m) i Medelhavet, i en apparat som möjliggjorde kontinuerlig odling och provtagning vid högt tryck (upp till 27 mPa). För bägge bakterierna ökade biomassan snabbare vid högt tryck än vid atmosfäriskt tryck, och snabbare än celldelningshastigheten, vilket ledde till större celler. Cellerna blev mer avlånga, och ofullständigt separerade celler var vanliga. Halterna omättade fettsyror var signifikant högre vid högre tryck, och fleromättade fettsyror ökade relativt enkelomättade med stigande tryck. Flera membrantransportörproteiner upp- eller nedregulerades vid odling vid högt tryck jämfört med atmosfäriskt tryck. Forskarna studerade också de bakterier som fanns i det djuphavsvatten de använde, och fann samma förändringar i tillväxthastighet och fettsyrasammansättning där.

Kända piezofila bakterier är huvudsakligen psykrofila, men också mesofiler och termofiler förekommer. De flesta är gramnegativa fakultativt anaeroba γ -proteobakterier, där släktet *Shewanella* dominerar. Alla kända piezofila arkéer är termofila.³⁸ Men metagenomiska undersökningar kommer sannolikt att visa att diversiteten bland piezofiler är mångdubbelt större än vad som är känt från odlingar. Genomen är genomgående större, med längre intergenetiska regioner och högre frekvens rRNA-operon än hos närbesläktade icke-piezofila organismer.³⁸ Analysen av organismernas energimetabolism och anpassningar utifrån metagenomik hämmas av att många gener saknar homologer i databankerna, vilket gör att deras funktion förblir okänd.³⁵ Metagenom från djuphav är rika på gener som kodar för CO-dehydrogenas, vilket tyder på att CO kan vara en vanlig energikälla där.³⁵ *In situ*-mätningar i djuphav tyder på att respiratoriska processer med metan eller organiska föreningar som energikälla och sulfat, nitrat, järn(III) eller mangan(IV) som elektronmottagare stimuleras av högt tryck, liksom metanogenes.³⁹ Vid ökat tryck respireras mer kolföreningar än vad som inkorporeras i biomassa, vilket skulle innebära att energigivande processer är mindre känsliga för tryck än tillväxtprocesser.³⁹

Högt hydrostatiskt tryck har samma effekt på membran som låg temperatur: membranen stelnar. Vanliga anpassningar till detta är ökad halt omättade fettsyror, vilket ju var vad Wannicke m.fl.³⁷ fann, kortare fettsyra kedjor och polära huvudgrupper⁴⁰ som fosfatidylkolin (PC) eller fosfatidylglycerol (PG) i stället för fosfatidyletanolamin (PE).⁴¹ Den membranbundna ATPasen inaktiveras vid högt hydrostatiskt tryck, och membrankanalers funktion förändras, det sistnämnda sannolikt p.g.a. att själva membranet komprimeras vid det höga trycket.⁴¹ Detta kan då kompenseras exempelvis genom de förändringar i transportörprotein som Wannicke m.fl. fann. Arkéernas annorlunda membranstruktur (sid 231) gör deras membran mindre känsliga för såväl tryck som temperaturförändringar. Inkorporering av cyklopentanringar och ökad förekomst av dietrar relativt monoetrar ökar arkémembranens funktionsduglighet vid högt tryck eller hög temperatur.⁴¹

³⁶ Piezofiler kallades tidigare barofiler; de kräver högt hydrostatiskt tryck för sin överlevnad.

³⁷ Wannicke m.fl. (2015) *FEMS Microbiol Ecol* 91, doi: 10.1093/femsec/fiv036

³⁸ Zhang m.fl. (2015) *Curr Op Biotech* 33:157

³⁹ Picard och Daniel (2013) *Biophys Chem* 183:30

⁴⁰ Den ände av fettsyramolekylen till vilken en kolvätekedja är bunden.

⁴¹ Jebbar m.fl. (2015) *Extremophiles* 19:721

Monomera proteiner är, föga förvånande, mindre känsliga än multimerade proteinsystem, som translationsmaskineriet.⁴¹ Aminosyrasammansättningen hos homologa proteiner hos närbesläktade bakterier som lever vid atmosfäriskt tryck respektive högt hydrostatiskt tryck skiljer sig.³⁹ Hos såväl psykrofila som mesofila piezofiler förekommer högre frekvens av hydrofila och polära aminosyror jämfört med vad som förekommer hos icke-piezofiler. Hos termofila piezofiler ökar också frekvenserna icke-polära, alifatiska och hydrofoba aminosyror.⁴² Sådana förändringar kan möjliggöra högre kompression av proteinerna vid högt tryck.³⁷ Huruvida trycket också påverkar proteinernas aktivitet är oklart.⁴²

Eftersom membran och makromolekylära proteinkomplex visat sig känsligast för högt hydrostatiskt tryck, är det där större anpassningar till det ökade trycket skulle förväntas. En av de tidigast kända anpassningarna till högt hydrostatiskt tryck var just en anpassning av en membranfunktion: en ny kinoloxidas som ersätter cytokrom *bc1* och cytokrom *c*-oxidaset hos en *Shewanella*, vilket leder till en förkortad andningskedja.⁴³ Andra kända anpassningar till högt hydrostatiskt tryck är ett S-lager (proteinlager) ytterst i cellväggen, och förmåga att hantera oxidativ stress. Förekomsten av reaktiva syreformer (ROS) ökar signifikant med sjunkande temperaturer⁴⁴, vilket gör att förmåga att hantera oxidativ stress är viktig för psykropiezofiler.³⁸ Organismerna ackumulerar också föreningar som β -hydroxybutyrat och aminosyror för att kompensera det höga trycket.⁴¹

Kapitel 8 Mikrobiota-tarm-hjärnaxeln

Samspelet mellan tarm och hjärna har varit känt länge, men mikrobiotans fundamentala roll i sammanhanget har uppmärksammats först med de senaste årens metagenomiska undersökningar (se uppdateringen för 2014). Såväl det centrala nervsystemet (CNS) som det sympatiska och parasympatiska autonoma nervsystemet och det enteriska nervsystemet (ENS) deltar i denna tvåvägskommunikation, tillsammans med neuroendokrina och neuroimmuna system. Här spelar också metaboliska produkter från tarmbakterierna, framför allt fettsyror med korta kedjor (SCFA, vanliga fermentationsprodukter från bakterier) en viktig roll.⁴⁵

I de flesta av de nedan citerade studierna jämförs bakteriefria⁴⁶ (GF-)möss med möss med normal mikrobiota utan kända patogener (SPF-möss). Hos GF-möss liksom möss vars tarmmikrobiota reducerats genom behandling med bredspektrumantibiotika under en längre tid, aktiverades färre gener, vilket ledde till att makrofager i CNS (mikroglia) fungerade sämre. Funktionen kunde återställas genom att tarmmikrobiotan återställdes, eller genom tillförsel av SCFA.⁴⁷ Mikrobiotan påverkar också utvecklingen av ENS. Nyfödda GF-möss har lägre nervtäthet runt tunntarmen med färre nervceller per ganglie, och musklerna kontraherades mindre, och mer sällan, hos de bakteriefria mössen än hos SPF-möss.⁴⁸ Förändringarna kvarstod hos äldre möss, men efter tillförsel av vanliga tarmbakterier (genom att GF-mössen tillfördes strö från burar där SPF-möss

⁴² Nath och Subbiah (2016) *J Theor Biol* 390:117

⁴³ Kato och Qureshi (1999) *J Molec Microbiol Biotechnol* 1:87

⁴⁴ Xiao och Zhang (2014) *Science China: Earth Sciences* 57:869

⁴⁵ Burokas m.fl. (2015) *Adv Appl Microbiol* 91, doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.02.001

⁴⁶ Möss som fötts med kejsarsnitt och levt i helt bakteriefri miljö.

⁴⁷ Erny m.fl. (2015) *Nature Neurosci* 18:965

⁴⁸ Collins m.fl. (2014) *Neurogastroenterol Motil* 26:98

vistats) ökade antalet nervceller.⁴⁹

Hur mikrobiotan påverkar såväl nervsystemets mikroglia som ENS är ännu oklart. En möjlighet är interaktion mellan specifika receptorer (PPR) på tarmepitelcellytorna, i synnerhet de toll-liknande receptorerna (TLR), och cellväggskomponenter som lipoteikoinsyra (interagerar med TLR2⁵⁰) och LPS (interagerar med TLR4⁵¹) hos bakterier. Dessa receptorer är viktiga komponenter i det ospecifika immunförsvaret, och reagerar normalt på främmande bakterier som infekterar individen. Interaktionen leder till upp- och nedreglering av olika neurotransmittorer. En del bakterier kan också själva producera neurotransmittorer som tryptamin och fytoestrogen, vilka direkt påverkar värdmetabolismen.⁵⁰ Såväl enteriska nervceller som gliaceller uttrycker flera olika TLR:er, och kan därmed svara direkt på förekomst av olika bakterier. Flera forskargrupper har undersökt möss som saknade någon specifik TLR, och hos dessa kunnat se defekter i ENS liknande dem hos GF-möss.⁵⁰ Möss som t.ex. saknar TLR2⁵² eller TLR4⁵³ visar mindre tarmrörelser och också defekter i ENS.

Interaktionerna mellan mikrobiotan och tarmens nervsystem har också konsekvenser för individens beteende. En del data visar på mer ängsligt beteende hos GF-möss jämförda med SPF-möss, medan andra pekar på motsatsen.⁵⁰ Diskrepansen kan ha att göra med egenskaper hos de möss som använts (olika stammar i de olika arbetena), men mer undersökningar behövs uppenbart. Det finns få undersökningar som relaterar effekter på beteende till specifika bakteriearter. Nishino⁵⁴ (som funnit ökad ängslighet hos GF-möss) fann att kolonisering enbart med *Brautia coccoides* (en klostridie) ledde till mindre ängsligt beteende, medan kolonisering med *Bifidobacterium infantis* (en aktinobakterie) inte påverkade ängsligheten. Infektion med olika patogener, såsom *Trichuris muris* (en nematod), *Citrobacter rodentium* (en enterobakterie) och *Campylobacter jejuni* (ϵ -proteobakterie), har visats kunna ge ångestliknande beteenden hos möss.⁵⁰

Det har länge varit känt att mikrobiotan hos barn med autismspektrumsvandrom (ASD) innehåller fler laktobaciller och färre prevotellor (hör till bakteriodeterna) och bifidobakterier än mikrobiotan hos friska barn.⁵⁰ Hos Parkinsonpatienter är fekala prevotellor starkt reducerade medan enterobakterier är mer frekventa.⁵⁵ Patienter med allvarlig depression har ökad mängd fekala enterobakterier och *Alistipes*-bakterier (bakteriodeter) och färre bakterier tillhörande släktena *Faecalibacterium* (en klostridie) och *Ruminococcus* (också en klostridie) än friska personer.⁵⁰ Många rapporter tyder på att stress reducerar halten laktobaciller i tarmen.⁵⁰

Om den ändrade mikrobiotan är orsak till eller konsekvens av de neurologiska förändringarna är sällan klart, och självfallet går det inte att extrapolera observationer på möss och råttor direkt till människor. Det går heller inte att säga att grampositiva bakterier generellt har bättre hälsoeffekter än gramnegativa, även om flera undersökningar de senaste åren har visat att probiotika – olika mjölksyrabakterier samt arter av *Bifidobacterium* och *Streptococcus* – reducerat ångslan hos såväl möss som människor.⁴⁶ Forskare som undersöker probiotikaeffekter är nog med att ange vilka

⁴⁹ McVey Neufeld m.fl. (2015) *Neurogastroenterol Motil* 27:627

⁵⁰ Mu m.fl. (2016) *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2016.00345

⁵¹ Kabouridis och Pachnis (2015) *J Clin Invest* 125:956

⁵² Brun m.fl. (2013) *Gastroenterol* 145:1323

⁵³ Anitha m.fl. (2012) *Gastroenterol* 143:1006

⁵⁴ Nishino m.fl. (2013) *Neurogastroenterol Motil* 25:521

⁵⁵ Scheperjans m.fl. (2015) *Movement Disorders* 30:350

stammar de använt, och poängterar ofta att andra stammar har andra effekter.⁵⁶ Också gramnegativa bakterier kan förknippas med positiva hälsoeffekter: tillförsel i födan av humana stammar av *Bacteroides fragilis* förbättrade gastrointestinala besvär hos möss, och gjorde mössens beteende mindre stereotyp och ängsligt.^{50,51} I detta sammanhang påvisade forskarna också förändringar i halter av olika metaboliter i serum som kunde kopplas till såväl de autistiska beteendena som de förbättringar som observerades efter att mössen fått *B. fragilis*.

Kapitel 9 Antibiotikatolerans

Att bakteriers förmåga att motstå antibiotika är ett av de största problemen inom infektionsmedicin idag är knappast någon omedveten om, heller inte hur viktigt det är att använda antibiotika klokt för att minimera dessa problem (sid 207ff). Resistens har studerats ingående genom åren, och det finns mycket kunskap om inblandade mekanismer. Tolerans är mindre väl känt, men kan vara ett underskattat problem i sammanhanget.^{57,58}

Resistens, som innebär en genetiskt betingad förmåga att kunna växa vid en antibiotikakoncentration som annars skulle döda bakterien, kvantifieras vanligen genom att bestämma minsta hämmande antibiotikakoncentration (MIC, sid 188). Men bakterier kan överleva antibiotikabehandling också på andra sätt, vilka kräver andra förhållningssätt. Tolerans innebär förmågan hos en bakteriepopulation att överleva en viss tids exponering för höga antibiotikakoncentrationer utan att vara resistent, och därmed med oförändrat MIC-värde. Toleransen beror på långsam eller obefintlig tillväxt.

Persistens, som induceras aktivt i en subpopulation av växande celler och ofta orsakas av ett toxin-antitoxinsystem (se 2014 års uppdatering), innebär en tolerans hos denna subpopulation av bakterierna, vilka då kan överleva en hög antibiotikados.⁵⁸ Acetyltransferaset TacT hos *Salmonella* är en komponent i ett sådant toxin-antitoxinsystem. Cheverton m.fl.⁵⁹ visade att TacT inducerar persistens genom att blockera den primära aminogruppen⁶⁰ på aminosyraacylerade tRNA-molekyler, vilket förstås leder till att proteinsyntesen stoppades. Samma forskare⁵⁹ rapporterade också kristallstrukturen hos TacT och positionen för de aktiva ytorna, vilket borde underlätta att ta fram något som hindrar dess aktivitet. Förutom av det kognata⁶¹ antitoxinet reverserades toxineffekten också av peptidaser som spjälkar bindningen mellan tRNA och aminosyra och möjliggjorde för tRNA-molekylen att acyleras med en oblockerad aminosyra. Persistenta *E. coli*-cellers tolerans orsakas förutom av den långsamma växten också av ökat utflöde (efflux), vilket gör att mindre mängder antibiotika stannar kvar i cellerna. Pu m.fl.⁶² visade att en hög produktion av TolC, ett yttermembranporin som orsakar utflöde, var nödvändig för etablering av persistens.

⁵⁶ exempelvis Petra m.fl. (2015) *Clin Therap* 37:984; Rominj och Rucklidge 2015, *Nutr Rev* 73:675; Thakur m fl 2016, *Internat Immunopharmacol* 36:39

⁵⁷ Van den Bergh m.fl. (2016) *Exp Rev Anti-Inf Therapy* 14:613

⁵⁸ Brauner m.fl. (2016) *Nature Rev Microbiol* 14:320

⁵⁹ Cheverton m.fl. (2016) *Molecular Cell* 63:1

⁶⁰ Den primära aminogruppen är den som skulle bilda en peptidbindning till nästa aminosyra vid proteinsyntesen.

⁶¹ Kognat innebär ungefär "naturlig partner", dvs. de två "hör ihop" och bildas och fungerar i förhållande till varandra i naturen.

⁶² Pu m.fl. (2016) *Molecular Cell* 62:284

En annan toleransmekanism undersöktes av Dörr m.fl.⁶³, nämligen hur *Vibrio cholerae*-celler utvecklar tolerans mot β -laktamantibiotika. De identifierade ett tvåkomponentsystem (fig 4.7), WigK/WigR, som krävdes för sådan tolerans. Forskarna postulerade att WigKR patrullerade cellväggen och stimulerade produktionen av ny cellvägg där den var försvagad på grund av att β -laktamantibiotika hämmade peptidoglykansyntesen. Överuttryck av WigK/WigR ledde till ökat uttryck av gener inblandade i cellväggssyntes, och smalare celler.

Ytterligare en toleransmekanism undersöktes av Fridman m.fl.⁶⁴: Vad händer när *E. coli* utsätts för en koncentration av ampicillin som är $15 \times \text{MIC}$ under varierande tid från tre till åtta timmar? Efter åtta till tio cyklers behandling överlevde bakterierna ampicillinbehandlingen tio gånger bättre än tidigare. Deras MIC var dock oförändrat, vilket visar att den förbättrade överlevnaden orsakades av tolerans, inte resistens. När forskarna mätte MDK₉₉, den behandlingstid som erfordrades för att döda 99 % av bakterierna vid en antibiotikakoncentration långt över MIC, fann de upp till $15 \times$ högre värden hos de toleranta populationerna. Det var dock inte tillväxthastigheten som minskat i dessa stammar, utan laggtiden innan de återupptog tillväxt efter utspädning hade ökat. Förändringen hade orsakats av mutationer i någon av tre olika gener, vilkas funktion dock är okänd. Eftersom toleranta bakterier har samma MIC som helt känsliga bakterier, ger MIC-mätning falska resultat angående möjligheter att bekämpa en sådan infektion med antibiotika. Mätning av MDK kan då ge behandlande läkare ett bättre mått på huruvida antibiotikumet i fråga är lämpat att effektivt bekämpa infektionen.^{58, 64}

Kunskap om toleransmekanismer kan förhoppningsvis leda till utveckling av antibiotika specifikt riktade mot sådana mekanismer. En del lovande sådana har identifierats i screeningtester men ännu inte utvärderats kliniskt.^{58 65}

Kapitel 10 Syntetisk biologi och en bakterie med ett 500 kb genom

Syntetisk biologi syftar till att optimera syntes av önskade produkter genom design och konstruktion av biologiska system som tillverkar dem (se uppdateringen 2014). Idag innebär detta ofta att de kodande sekvenserna analyseras bioinformatiskt för att sedan "rensas" från alla reglerande funktioner samtidigt som kodonen randomiseras för att motverka oönskad translationskontroll. Efter detta kan en kodonoptimering (val av frekvent utnyttjade kodon för olika aminosyror) göras, så att genen kan uttryckas effektivt i den tilltänkta värden. Därefter syntetiseras sekvenserna, förses med önskade promotorer och reglerande funktioner och transformeras in i önskade celler. Det är dock fortfarande långt ifrån okomplicerat att (åter)skapa system som krävs för expression av komplicerade produkter som exempelvis antibiotika. Såväl problem som hur deras lösningar ser ut idag sammanfattas av Smanski m.fl.⁶⁶

Craig Venters forskningsgrupp kan sägas ha börjat i andra ändan. De har länge varit intresserade av "den minimala cellen", med endast essentiella gener, som ett verktyg för att förstå genernas molekylära och biologiska funktion. År 2010 beskrev de hur de syntetiserat ett 1 kb mykoplasma genom och via en jästvärd transformerat detta in i tomma mykoplasmaceller och därmed åstadkommit en fungerande mykoplasmacell, *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, fortsättningsvis kallad syn1.0, helt styrd av det

⁶³ Dörr m.fl. (2016) *Proc Natl Acad Sci USA* 113:404

⁶⁴ Fridman m.fl. (2014) *Nature* 513:418

⁶⁵ Fleck m.fl. (2014) *Antimicrob Ag Chemother* 58:1410

⁶⁶ Smanski (2016) *Nature Rev Microbiol* 14:135

intransformerade DNA:t.⁶⁷ I år har samma forskargrupp åstadkommit ett minimalt mykoplasma genom med hjälp av fullskalig DNA-syntes och transposonmutagenes, vilket reducerat antalet gener till hälften, och också organiserat om genomet delvis efter funktion, så att gener involverade i samma biologiska process är lokaliserade nära varandra. Förutom ovannämnda syfte, och förstås ren nyfikenhet ("är detta möjligt?") var ett syfte att underlätta framtida konstruktion av syntetiska organismer för bioteknisk produktion.⁶⁸

Resultatet blev *M. mycoides* JCVI-syn3.0, fortsättningsvis kallad syn3.0, med ett genom på 531 kb och 473 gener kodande för 438 proteiner och 35 ej translaterade RNA-molekyler. Detta är betydligt färre gener än de 525 hos den frilevande bakterien med det minsta kända genomet, *Mycoplasma genitalium*. Men de 473 syn3.0-generna var flera än de 375 essentiella gener forskarnas tidigare arbeten lett dem att postulera. Flera gener visade sig vara "nästan nödvändiga" ("i-gener"), dvs. cellerna överlevde utan dem, men växte mycket långsammare. Cellerna odlades på ett standardmedium för mykoplasma, vilket bl.a. innehåller hydrolyserat kasein och gelatin, jästextrakt och serum; p.g.a. sin begränsade syntetiska förmåga kräver mykoplasma rika medier. Med dessa nästan-nödvändiga gener intakta växte syn3.0 då med en generationstid på 178 min, att jämföra med 63 min för syn1.0 vilken också växer något snabbare än vildtyp *M. mucooides*. Jämförda med syn1.0 är syn3.0-cellerna något mindre och oregelbundnare i storlek, och växer oregelbundnare på en agaryta där såväl filament som stora vesiklar uppkommer.⁶⁸ Här ska kanske noteras att mykoplasma generellt bildar oregelbundna kolonier på agarytor, bland annat eftersom de saknar hårda cellväggar.

Jämförelser med annoterade gener i databanker visade att 195 av de 473 generna i syn3.0 rimligtvis var involverade i expression av den genetiska informationen, hälften av dessa i translation. Cellmembranet och cytosolen involverade 84 respektive 81 gener, och 34 föreföll ha funktioner associerade med upprätthållande av genomets information. Det stora antalet gener med implicerad membranfunktion är inte så förvånande med tanke på mykoplasmas levnadssätt – många biosyntetiska vägar saknas hos dessa bakterier, vilka därmed blir beroende av att transportera makromolekyler genom cellmembranet. Det mest intressanta är kanske att för 149 av syn3.0:s 473 gener – nästan en tredjedel – kan ingen biologisk funktion härledas genom jämförelser med annoterade genom i databankerna. Av dessa har 65 ingenting som kan antyda någon känd funktion.⁶⁸

Även om enklare hypoteser kanske är rimligare finns det en möjlighet att någon eller några av dessa okända essentiella gener deltar på ett okänt sätt i någon kanske ännu okänd metabolisk process, vilket är en fascinerande tanke – och den mycket omfattande karakteriseringen av syn3.0 bör underlätta sökandet efter deras funktion. Framtiden får sedan utvisa om syntetiska genom är vägen till förbättrad bioteknisk produktion, eller om den betydligt enklare CRISPR-tekniken (se 2014 års uppdatering till kap. 5) blir effektivare.

Kapitel 11 Diversitet bland arkéer

Metagenomik och fylogenomik (analys av gener och proteiner som är konserverade i de studerade grupperna) har revolutionerat synen på arkédomänen.^{69 70} Domänen är

⁶⁷ Gibson m.fl. (2010) *Science* 329:52

⁶⁸ Hutchinson III (2016) *Science* 351:1414 och aad6253-1

⁶⁹ Erne och Doolittle (2015) *Curr Biol* 25, R845–R875

fortfarande uppdelad i två huvudgrenar, där euryarkégrenen fortfarande huvudsakligen omfattar metanogener och haloarkéer, men hit hör också ett nyligen beskrivet fylum Hadesarchaea (tidigare kallade SAGMED, South African Gold Mine Miscellaneous Euryarchaeal Group) vilket Baker m.fl.⁷¹ placerar närmast stamträdets grenpunkt mot övriga arkéer. I den andra huvudgrenen, krenarkéer m.fl., är diversiteten mycket större än forskarna tidigare trott. I det som idag kallas TACK-superfylumet återfinns förutom själva krenarkéerna också fylumen Thaumarchaeota, Korarchaeota och det i förra årets uppdatering beskrivna Lokiarchaeota. Dessutom ingår två nyligen beskrivna fyla, Aigarchaeota (HWCG I, Hot Water Crenarchaeotal Group I)^{72, 73} och Bathyarchaeota (tidigare kallade MCG, Miscellaneous Crenarchaeotal Group)⁷⁴. Vid sidan av dessa placerar den fylogenomiska analysen en rad fyla karakteriserade av mycket små organismer (~400–500 nm, ~550–1 200 gener). Förutom det tidigare kända fylumet Nanoarchaeota återfinns här Pavarchaeota, Nanohaloarchaeota, Aenigmarchaeota, Diapherotrites, Microarchaeota och Woesearchaeota, alla sammanfattade med beteckningen DPANN.⁶⁹ Huruvida DPANN-organismerna representerar tidiga utvecklingsgrenar, eller om deras avskilda position i det fylogenetiska trädet orsakas av artefakter som små genom och snabb evolution, är oklart.⁶⁹

Många fyla saknar odlade representanter, men genomanalyser kan ändå antyda vad för metaboliska vägar arkéerna använder. Föga förvånande antyder sådan analys en större metabolisk bredd än odlingar av "vanliga" krenarkéer och euryarkéer visat. Bland arkéer är idag påvisat anaerob och aerob respiration, fermentation, kemoautotrofi, heterotrofi och fotoheterotrofi. Det sistnämnda involverar baktrierodopsin (sid 234); även om gener kodande för bakterioklorofyll a-syntas påträffats hos batyarkéer⁷⁵ är det oklart vad detta innebär. De flesta av dessa nyupptäckta fyla omfattar mesofila organismer, vilka dock har termofila släktingar. Lopéz-Garcia m.fl.⁷⁶ postulerar, baserat på fylogenomiska studier, att anpassning till mesofilt levnadssätt skett oberoende i flera utvecklingslinjer, baserat på horisontell genöverföring från bakterier, i samma anda som den mer generellt accepterade hypotesen att termofila bakterier som *Aquifex* och *Thermotoga* utvecklat termofili efter horisontell överföring från arkéer.

Hadesarkéer. Baker m.fl.⁷¹ undersökte fyra hadesarkémetagenom från sediment på olika platser i USA. Genomen innehöll vardera ungefär 1,5 Mb DNA, och visade störst likhet med genom från anaeroba euryarkéer. De hade gener som skulle möjliggöra oxidation av CO och H₂ eventuellt kopplat till reduktion av nitrit till ammoniak (anaerob respiration med andra ord), och verkar kunna assimilera koldioxid via acetyl-CoA-vägen (sid 75).

Aigarkéer. Aigarkéer är termofila.⁷³ Metagenomiska⁷³ och metatranskriptomiska (dvs. all RNA som kunde extraheras ur miljön)⁷⁷ analyser visar på möjligheter för såväl kemotrofi (vätgas och kolmonoxid)⁷³ som organotrofi (fettsyror, aminosyror, kolhydrater och aromatiska föreningar)^{73, 77}, och såväl aerob^{73, 77} som anaerob⁷³ respiration, den senare med nitrit eller nitrat som elektronmottagare. Analysen tyder

⁷⁰ Petijean m.fl. (2015) *Mol Biol Evol* 32:1242

⁷¹ Baker m.fl. (2016) *Nature Microbiol* DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2016.2

⁷² Nunuora m.fl. (2010) *Nucl Ac Res* doi:10.1093/nar/gkq1228

⁷³ Hedlund m.fl. (2015) *Curr Op Microbiol* 25:136

⁷⁴ Meng m.fl. (2014) *ISME J* 8:650

⁷⁵ Fillol m.fl. (2016) *Isme J* 10:665

⁷⁶ Lopéz-Garcia m.fl. (2016) *Nature Rev Microbiol* 13:447

⁷⁷ Beam m.fl. (2016) *ISME J* 10:210

vidare på möjligheter till autotrofi via hydroxybutyratvägen, samma väg som utnyttjas av autotrofa krenarkéer och taumarkéer.^{73,77}

Batyarkéer. Batyarkéer är mycket vanliga i såväl marina som limniska⁷⁸ anoxiska sediment och jämförelser mellan batyarkésekvenser från olika habitat visar att gruppen är mycket heterogen^{74,75}. Isotopförsök med bottenlam har visat att de kan använda organiska energikällor⁷⁵, eventuellt inkluderande aromatiska föreningar⁷⁴. Fyra undersökta batyarkémetagenom gav data som tydde på att arkéer i ett av dem kunde bryta ned växtpolysackarider, och alla fyra kunde bryta ned proteiner i detritus⁷⁹. Förekomst av gener tillhörande acetyl-CoA-vägen liksom gener involverade i bildande av ättiksyra från vätgas och koldioxid (acetogenes) visade att arkéerna troligen också kan assimilera koldioxid. De kan därmed beskrivas som organoheterotrofa eller autotrofa acetogener. Samtliga hade gener för nitritreduktion, och kan därmed eventuellt också respirera anaerobt med nitrit.⁸⁰ Inte nog med detta, en annan forskargrupp som undersökte två batyarkémetagenom fann homologer till gener vilkas produkter är inblandade i metanmetabolism, inkluderande gener som kodar för proteinerna i metylcoenzym M-reduktaskomplexet, vilket tyder på att metanogenes förekommer också utanför euryarkégrenen.⁸¹

DPANN. Metagenomanalys av arkéer i DPANN-superfylumet indikerar att de flesta är termofila. Deras genom visar tecken på omfattande horisontell genöverföring, huvudsakligen från bakterier men inkluderande också gener som verkar ha eukaryot ursprung.⁸² Eftersom de små genomen saknar kända gener för många centrala metaboliska funktioner är hypotesen att dessa organismer är symbiotiska eller parasitiska, liksom tidigare känt för *Nanoarchaeum* (sid 236), men avsaknaden av homologer och ortologer till deras gener i databankerna försvårar förståelsen av deras levnadssätt.⁸³

Kapitel 12 Malaria

Malaria är en av jordens mest frekventa infektionssjukdomar. Ungefär halva jordens befolkning i 85 länder och territorier riskerar att drabbas. De flesta (88 % av alla fall och 90 % av alla dödsfall 2015) drabbas i Afrika söder om Sahara. Mellan 2000 och 2015 minskade dock antalet nya fall i världen per år med 37 %, och antalet döda per år med 60 %, bland barn under 5 år med 65 %.⁸⁴ Både sjukdomsincidens och antalet dödsfall är dock fortfarande mycket höga; under 2015 inträffade ca 214 miljoner nya fall, och ca 430 000 människor avled i sjukdomen⁸⁵. I maj 2015 antog Världshälsoorganisationen (WHO) en ny global strategi som syftar till att reducera malariaincidensen till 10 % av 2015 års nivå till 2030, att eliminera den helt från minst 35 länder och hindra återetablering av malaria i länder som var fria från sjukdomen 2015.⁸⁶ Huvuddelen av forskning och förebyggande aktiviteter har riktats mot *Plasmodium falciparum*, som

⁷⁸ Limniska system utgörs av färskvattenmiljöer som sjöar, åar etc.

⁷⁹ Detritus är rester av organismer som faller till botten i vattendrag, sjöar och hav.

⁸⁰ Lazar m.fl. (2016) *Environm Microbiol* doi:10.1111/1462-2920.13142

⁸¹ Evans m.fl. (2015) *Science* 350:434

⁸² Rinke m.fl. (2013) *Nature* 499:

⁸³ Ortiz-Alvarez m.fl. (2016) *Environm Microbiol Rep* 8:210

⁸⁴ Världshälsoorganisationen (WHO) (2016) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>; 2016-07-22

⁸⁵ WHO (2015) http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf

⁸⁶ WHO (2016) http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_R2-en.pdf?ua=1

dominerar i Afrika söder om Sahara. *P. vivax* har ett vidare spridningsområde in i svalare områden eftersom den kan överleva i ett vilstadium i levern under kallare perioder när inga myggor kan sprida den vidare⁸⁷; att den stort sett saknas i Afrika beror på en mutation som är vida spridd hos människor i Afrika. Mutationen eliminerar en specifik kemokinreceptor på röda blodkroppar och ger nästan fullständigt skydd mot *P. vivax*.⁸⁸ *P. vivax* ansågs länge ge en mildare sjukdom, ibland asymptomatisk, men är också förknippad med allvarlig malaria inklusive dödsfall.⁸⁷ Antalet fall av vivaxmalaria 2014 var ungefär 14 miljoner, vilket utgjorde hälften av alla fall utanför Afrika, huvudsakligen i Indien, Pakistan och Indonesien.⁸⁵

WHO anger användandet av myggnät med insekticider som den viktigaste orsaken till nedgången av malariafall, följt av användning av kombinationsbehandling med artemisin och något mer långsamverkande preparat samt användandet av insekticider inomhus. Resistensproblematiken är uppenbar, såväl mot insekticider som mot de preparat som används för behandling. Här följer en uppsummering av dagens situation.

Förebyggande. Som nämnt ovan är myggnät med insekticider en väsentlig orsak till nedgången i antalet malariafall på senare år. Ett alternativ till insekticider, mot vilka myggorna givetvis börjat utveckla resistens, för att förebygga myggangrepp härrör ur observationen att en av de myggor som mest frekvent sprider malaria i Afrika, *Anopheles arabiensis*, inte angriper höns. Jaleta m.fl.⁸⁹ undersökte detta närmare och fann att isobutylbutyrat, naftalen, hexadekan och trans-limonen i doften från höns verkade avskräckande på myggen. Här finns alltså potential att utveckla nya, mer smalspektriga insekticider. En annan variant som föreslagits för att bekämpa myggorna är genmodifiering av dem med hjälp av CRISPR-Cas9 (se 2014 års uppdatering)⁹⁰, men eftersom detta skulle innebära storskaliga ingrepp i myggens biologi kräver det åtskillig eftertanke⁹¹.

Malariaparasiten genomgår ett antal olika stadier i sin mänskliga värd (fig 12.9), och varje stadium karakteriseras av hundratals olika proteiner som kan utgöra antigener för immunförsvaret. Beroende på utvecklingsstadiet är det huvudsakligen antingen det ospecifika eller det specifika immunförsvaret som attackerar parasiten. Ett vaccin som utvecklats mot parasiter i ett stadium kan därför sakna effekt mot parasiter i andra stadier.^{92, 93} Flera angreppsvägar är aktuella, av vilka ett rekombinant vaccin, RTS,S/AS01, riktat mot cirkumsporozoitproteinet i ett pre-erytrocytstadium av parasiten⁹⁴, godkändes i juli 2015 av European Medicines Agency för vaccinering av barn⁹⁵. Vaccinet ger dock ganska kortvarig effekt⁹⁶ och ingår inte i WHO:s vaccinationsprogram⁸⁶. Också vaccin riktade mot hela sporozoiten har testats, delvis med lyckade resultat⁹².

⁸⁷ Howes m.fl. (2016) *Am J Trop Med Hyg* doi: 10.4269/ajtmh.16-0141

⁸⁸ Loy m.fl. (2016) *Int J Parasitol* doi: 10.1016/j.ijpara.2016.05.008

⁸⁹ Jaleta m.fl. (2016) *Malar J* 15, doi: 10.1186/s12936-016-1386-3

⁹⁰ Gantz m.fl. (2015) *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6736–E6743,

⁹¹ exempelvis Bohannon (2015) *Science* 347:1300

⁹² Hoffman m.fl. (2015) *Am J Prev Med* 49:S319

⁹³ Renar m.fl. (2016) *Toxicon* 119:319

⁹⁴ Sporozoiten är det parasitstadium som följer med myggans saliv in i människans blod.

Cirkumsporozoitproteinet är lokaliserat på sporozoitens utsida.

⁹⁵ European Medicines Agency (2015) London.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2015/07/WC500190447.pdf
f 2016-07-23

⁹⁶ Long och Zavala (2016) *Curr Op Microbiol* 32:96

Försök att utveckla vaccin riktade mot andra antigen och också andra stadier av parasiten har inte varit framgångsrika hittills. På grund av den komplexa livscykel och de många olika ytproteiner som parasiten exponerar i olika stadier, behöver forskarna antagligen rikta in sig mot multivalenta vacciner riktade mot flera olika antigener från flera stadier av parasiten.⁹⁶

Behandling. Malariasymptomen, feber, frossa, huvudvärk, svettningar och illamående, är alla en konsekvens av inflammatorisk respons på ämnen som frisatts i patientens blod, främst hemozoin (en nedbrytningsprodukt från hem i de blodkroppar parasiten infekterat) och glykosylfosfatidylinositol (GPI).⁹³ Bägge bildas av trofozoiter⁹⁷ och orsakar kraftig stimulering av det ospecifika immunsvaret.⁹³ Det intensifierade arbetet med att utrota malaria har lett till omfattande forskning efter nya läkemedel, och då gärna medel som är aktiva mot flera olika stadier, hindrar överföring av parasiten till nya värdar och hindrar återfall.⁹⁸ Standardbehandlingen idag är kombinationspreparat med artemisin; resistensen mot tidigare använda kinoliner är utbredd idag. Både kinoliner och artemisin motverkar hemozoinbildningen. Inga kända läkemedel antagoniserar plasmodie-GPI, men flera kandidater har identifierats.⁹³ Kunskapen om hemozoin och GPI erbjuder nya angreppsvägar mot malaria, exempelvis läkemedel som hämmar den proteolys som skulle leda till hemozoinbildning; flera sådana har testats eller är under utveckling.⁹³

Upptäckten av artemisins verkan på malariaparasiter belönades med 2015 års Nobelpris i medicin. Artemisin hämmar flera olika proteiner i sena stadier av *Plasmodium falciparum*-infektion. Tidigt i infektionen verkar dock bara ett enda protein interagera med läkemedlet, fosfatidylinositol-3-kinas (PI3K).⁹⁹ En artemisinresistent klinisk stam hade en mutation i den kodande genen vilken resulterade i ökad halt av enzymet. PI3K är inblandat i transport av proteiner från parasitens endoplasmatiska retikulum till humana erythrocyter i ett tidigare stadium av infektionen. Det faktum att ett enda protein drabbas väcker hopp om att kunna utveckla ytterligare läkemedel riktade mot detta protein. K13 är ett annat protein där artemisinresistent mutant påträffas.¹⁰⁰ Resistensen kan orsakas av att K13 styr nedbrytningen av PI3K. Med kunskap om resistensmekanismerna har forskarna bättre redskap att motverka resistensen.

Malariaparasiter kan också bekämpas via deras apikoplast, en cellorganell som utvecklats ur ursprungligen fotosyntetiska kloroplaster och liksom mitokondrier och kloroplaster har en del eget DNA.¹⁰¹ Varje cell innehåller endast en apikoplast. Förlust av apikoplasten leder till ett fenomen kallat "långsam död" hos parasiten – dotterceller som inte erhållit någon apikoplast vid celldelningen är visserligen viabla, men kan i sin tur inte dela sig. Apikoplastens förhistoria som cyanobakterie innebär att den är känslig för en del bakterieantibiotika. Flera sådana har visat sig verksamma, och används också tillsammans med konventionella antimalariamedel för att öka effektiviteten. Också fettsyrsyntesen och syntesen av isoprena kolväten i apikoplasten är av bakterietyp, och kan därför hämmas med hjälp av exempelvis triklosan (hämmar fettsyrsyntesen) respektive fosmidomycin (hämmar syntesen av isoprener).¹⁰¹ Fettsyrsyntesen har varit

⁹⁷ Trofozoiten ("ringstadiet") är det stadium som förekommer i röda blodkroppar, dit det tar parasiterna en knapp vecka att ta sig efter myggbettet.

⁹⁸ Raphemot m fl (2016) *J Clin Invest* 126:2013

⁹⁹ Mbengue m fl (2015) *Nature* 520:683

¹⁰⁰ Tiley m fl (2016) *Trends Parasitol* doi: 10.1016/j.pt.2016.05.010

¹⁰¹ Chakraborty (2016) *Life Sciences* 158:104

mål för utveckling av flera nya hämmare, eftersom den är essentiell i leverstadiet av malaria, och hämmare av denna syntes därför skulle kunna användas mot malaria i detta stadium.¹⁰¹

Kapitel 13 Zikavirus

Zikaviruset upptäcktes 1947 i Zikaskogen i Uganda, och spred sig långsamt därifrån genom Afrika och Sydostasien med hjälp av myggor som *Aedes aegyptii*, *A. albopictus* och *Culex quinquefasciatus*.¹⁰² Så sent som 1981 var bara 18 fall av infektion av människor kända, och infektionen gav inga eller milda symptom (feber, huvudvärk, utslag, sjukdomskänsla). Den nuvarande epidemin anses ha startat 2007 i Polynesien och spreds därifrån, så att 2013 ca 28 000 människor i en total population av 270 000 i Franska Polynesien var infekterade. Detta och följande år gjordes de första observationerna av mikrocefali (underutvecklad hjärna och litet huvud) och andra fostermisbildningar hos kvinnor som varit gravida vid smittillfället. År 2015 hade Zikaviruset spritts till Brasilien och fortsatt därifrån till resten av Amerika.¹⁰³

Zikavirus sprids förutom via myggor också vid sexuella kontakter mellan människor, och fosterskadorna uppstår efter att virus passerat placentan från mor till barn. En del tidigare infekterade människor kan vara bärare av viruset och därmed smitta andra också efter att de själva är symptomfria. I februari 2016 deklarerade världshälsoorganisationen (WHO) att en nödsituation för folkhälsan uppstått.¹⁰³

Zikavirus är ett flavivirus, samma virusgrupp som bland andra de virus som ger upphov till fästingburen hjärninflammation (TBE) och denguefeber hör till. Inga andra virus i denna familj än zikavirus har dock förknippats med fosterutvecklingsstörningar. I samband med det kraftigt ökande antalet fall av zikavirusinfektioner i Sydamerika noterade läkarna en kraftig ökning av den annars sällsynta fosterutvecklingsskadan mikrocefali, liksom en kraftig ökning av fallen av Guillain-Barrés syndrom (GBS, en sällsynt, troligtvis autoimmun sjukdom hos vuxna som leder till minskad nervfunktion och så småningom förlamningar). Medan de flesta patienter med zikavirusinducerad GBS tillfrisknar är mikrocefali obehandlingsbar och irreversibel. Bägge syndromen kan uppkomma också av andra orsaker, inklusive infektion med andra virus.

Det var i början oklart om det verkligen var zikavirusinfektionen som låg bakom den ökade förekomsten av mikrocefali i Sydamerika. I maj 2016 kunde flera forskargrupper dock dokumentera genom musförsök att zikavirus kan infektera och skada placentan – 1000 gånger fler virus påträffades i placentan jämfört med i blodet hos den infekterade musen – och också infektera fostren. Viruset påträffades huvudsakligen i fostrens huvud, och kunde genom kontrollerade försök knytas till tunnare hjärnbark och mindre hjärna hos fostren.^{104 105} *In vitro*-försök har visat att zikavirus kan infektera neurala föregångsceller och hämma deras tillväxt såväl när cellerna kommer från människa¹⁰⁶ som från möss¹⁰⁴. Genom att injicera mycket höga virusdoser i mössen (möss är naturligt motståndskraftiga mot zikavirus) kunde andra forskare direkt påvisa mikrocefali hos musfoster efter infektion av modern.¹⁰⁷ Dessa observationer väcker hoppet om att behandlingsmetoder ska kunna tas fram, och också

¹⁰² Franca m.fl. (2016) *PLoS Negl Trop Dis* doi:10.1371/journal.pntd.0004760

¹⁰³ Imperato (2016) *J Community Health* doi: 10.1007/s10900-016-0177-7

¹⁰⁴ Miner m.fl. (2016), *Cell* 165:1081

¹⁰⁵ Li m.fl. (2016) *Cell Stem Cell* 19:1

¹⁰⁶ Garcez m.fl. (2016) *Science* 352:816

¹⁰⁷ Cugola m.fl. (2016) *Nature* 534:267; Li m fl (2016), *Cell Stem Cell* 19:1

skyddande vaccin. Ett potentiellt sådant beskrev av Larocca m.fl.¹⁰⁸, som immuniserat möss med ett DNA-vaccin bestående av klonade gener för zikavirusets höljesprotein eller med inaktiverat zikavirus. Bägge vaccinen resulterade i fullständigt skydd mot zikavirus av den stam som orsakat den pågående epidemin i Brasilien.

¹⁰⁸ Larocca m.fl. (2016) *Nature* doi:10.1038/nature18952