



UPPSALA
UNIVERSITET

Är typ VII sekretion vägen till ett vaccin
mot tuberkulos?

Andreas Juleshaug

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Är typ VII sekretion vägen till ett vaccin mot tuberkulos?

Andreas Juleshaug

Självständigt arbete i biologi 2016

Sammandrag

Typ VII sekretion (T7S) är en unik sekretionstyp som utvecklats hos bland annat mykobakterierna, för att möjliggöra utsöndringen genom deras annorlunda och komplexa cellmembran. *Mycobacterium tuberculosis*, som är en mykobakterie, är en av världens mest framgångsrika humana patogener och är den främsta orsaken till tuberkulos, bara 2014 infekterades 9,6 miljoner människor av bakterien. Den senaste tidens forskning har visat allt tydligare att T7S står för den större delen av proteinutsöndringen hos *M. tuberculosis*. Bakterien har fem olika typer av T7S, ESX-1 upp till ESX-5. Minst tre av dessa sekretionssystem är essentiella för virulensen och/eller överlevnaden för bakterien. Insikter i hur T7S fungerar är därför grundläggande för att kunna identifiera specifika mål i *M. tuberculosis* och därigenom kunna utveckla vaccin och mediciner mot tuberkulos. Denna översiktsartikel sammanfattar i stora drag hur långt forskningen har kommit och vad som vidare behöver undersökas i framtida forskning.

Inledning

Tuberkulos är en infektionssjukdom som orsakas av bakterien *Mycobacterium tuberculosis*. Sjukdomen har hittats i cirka 8500 år gamla skelettresten från människor, men är ännu idag en aktuell sjukdom då 9,6 miljoner människor blev infekterade bara 2014 (Hershkovitz *et al.* 2008, WHO 2015a). Tuberkulos smittar via luften och när bakterien väl är i lungorna fagocyteras bakterien av makrofager. Detta leder i sin tur till att bakterien dör, eller blir det första steget i en tuberkulosinfektion (Forrellad *et al.* 2013). En sådan tuberkulosinfektion leder oftast till en latent tuberkulosinfektion, vilket betyder att bakterien stannar i kroppen men inte ger några symptom. Mellan 5-10% av dem med en latent tuberkulosinfektion kommer utsättas för en aktiv infektion, där risken är störst för personer med ett nedsatt immunförsvar (WHO 2015b). Typ VII sekretion (T7S) är en unik sekretionstyp som har utvecklats hos bland annat mykobakterierna, för att möjliggöra utsöndringen genom deras annorlunda och komplexa cellmembran. Mykobakterierna ingår i *M. tuberculosis* komplexet (MTBC) som orsakar tuberkulos hos både människor och djur. Alla bakterier i MTBC är indelade i *Corynebacteriales*, som ingår i gruppen grampositiva bakterier. Detta arbete kommer framför allt handla om *M. tuberculosis*, men kommer även nämna övriga MTBC och flera av de bakterier som ingår i komplexet. Bakterierna som ingår i *Corynebacteriales* kännetecknas generellt sett av att ha en speciell fettsyra i sitt yttre cellmembran, kallad mykoliksyra (Busse *et al.* 2015). Denna fettsyra ingår därmed då också i MTBCs komplexa och närmast ogenomtränglig yttre cellmembran. Grampositiva bakterier har i regel en cellvägg, *Corynebacteriales* och därmed MTBC är dock ett undantag då de har ytterligare ett cellmembran som liknar de gramnegativa bakteriernas mycket (Hoffmann *et al.* 2008, Zuber *et al.* 2008). Bakteriernas förmåga att utsöndra virulensfaktorer är essentiellt för dess bakteriella patogenicitet (Finlay & Falkow 1997). Den senaste tidens forskning har visat allt tydligare att T7S utgör den större delen av proteinutsöndringen hos *M. tuberculosis*. Insikter i hur T7S fungerar är därför grundläggande för att kunna identifiera specifika mål i *M. tuberculosis* och därigenom kunna utveckla vaccin och mediciner mot tuberkulos. Denna översiktsartikel sammanfattar i stora drag hur långt forskningen har kommit och vad som vidare behöver undersökas i framtida forskning. Det finns flera virulensfaktorer i MTBC, men detta arbete inriktar sig dock på de T7S i *M. tuberculosis* som är involverade i bakteriens virulens. Bakterien har fem olika typer av T7S, ESX-1 upp till ESX-5.

Minst tre av dessa sekretionssystem är essentiella för virulensen och/eller överlevnaden för bakterien. Sekretionen av protein är viktig för att bakterier ska kunna anpassa sig och överleva i sin naturliga miljö. Dessa system är framför allt viktiga för att bakterien ska kunna interagera med värdcellen genom att utsöndra olika toxiner och signalprotein. Utsöndringen av protein från bakterien är därför essentiell för dess förmåga att sprida sig och orsaka sjukdomar (Forrellad *et al.* 2013).

Syfte

Denna översiktsartikel sammanfattar hur mycket vi i dagsläget vet om patogenen *M. tuberculosis* infektionsfrämjande sekretionssystem T7S, substrat och flera av dess protein. 2012 rapporterade WHO att tuberkulos är en enorm börda för världen (Williams 2012). Den bördan är desto tyngre i områden med utbredd HIV och uppkomsten av multiresistenta *M. tuberculosis* stammar gör den bördan desto tyngre (Corbett *et al.* 2003, Dheda *et al.* 2014). Det är av yttersta vikt att sekretionssystemen i *M. tuberculosis* undersöks ytterligare, då ämnen som på något sätt stör utsöndringen av proteiner exporterade av de virulenta T7S systemen skulle möjliggöra framtagningen av ett vaccin mot tuberkulos, men även andra patogener inom MTBC.

Modellorganismer

I texten kommer studier tas upp som har gjorts på bakterier utöver *M. tuberculosis*, de ingår dock alla i MTBC. Viktigt att påpeka är att MTBC indelas i långsamt växande bakterier och snabbt växande bakterier. *M. tuberculosis* är en långsamt växande bakterie som delar sig var 22:a timme i en flytande kultur, vilket betyder att kolonibildning kräver två till tre veckor väntan och leder därför till långa väntetider för att experiment ska utföras (Shiloh & DiGiuseppe Champion 2010). Därför använder man sig av andra bakterier för att undersöka sekretionsystemen i *M. tuberculosis*. Främst tre bakterier kommer tas upp i denna text; *M. marinum*, *M. bovis*, och *M. smegmatis*. *M. marinum* har etablerats som modellorganism för att undersöka ESX-1 i *M. tuberculosis* (Tobin & Ramakrishnan 2008, Stinear *et al.* 2008, Shiloh & DiGiuseppe Champion 2010).

Cellmembranet

Grampositiva bakterier ses generellt som enklare bakterier i relation till gramnegativa bakterier rent uppbyggnadsmässigt. Detta eftersom grampositiva bakterier saknar det andra membranet som gramnegativa bakterier har. Därför behöver de utsöndrade proteinerna utsöndras bara genom en cellvägg i grampositiva bakterier, på ett sätt som har antagits varit liknande den som hittas i gramnegativa bakterier. Detta eftersom genomsekvenser visat att båda bakterietyperna har samma huvudsakliga beståndsdelar som ingår vid proteinutsöndring (Wely *et al.* 2001). *M. tuberculosis* kategoriseras som en grampositiv bakterie inom det mykobakteriella släktet, detta släkte särskiljer sig dock från de andra grampositiva bakterierna då de likt de gramnegativa bakterierna också har ett yttre cellmembran (Hoffmann *et al.* 2008, Zuber *et al.* 2008). Det yttre cellmembranet ger skydd mot uttorkning, mekanisk stress, antimikrobiella enzymer och kemikalier och är en av huvudanledningarna till varför *M. tuberculosis* är en så pass motståndskraftig och uthållig bakterie (Houben *et al.* 2014). Till strukturen är det nästan omöjligt att se skillnaden mellan en gramnegativ bakteries yttre cellmembran och ett cellmembran från MTBC genom ett elektronmikroskop (Hoffmann *et al.* 2008, Zuber *et al.* 2008). Det yttre cellmembranet består, som tidigare nämnts, av de ovanliga fettsyrorerna mykolyksyror, dessa fettsyror utgör den större delen av det yttre cellmembranet (Hoffmann *et al.* 2008, Zuber *et al.* 2008, Goodfellow & Jones 2015).

Det yttre cellmembranet i MTBC särskiljer sig mycket från de gramnegativas yttre cellmembran till strukturen, då den till skillnad från de gramnegativa bakterierna består av mykoliksyror. Eftersom MTBC är så pass etablerade som grampositiva bakterier samt att deras yttre cellmembran skiljer sig så pass mycket från de gramnegativas bakterier, bör det yttre cellmembranet i MTBC vara ett exempel på konvergent evolution (Houben *et al.* 2014). Även om det yttre cellmembranet skyddar bakterien utgör den dock också ett problem för den, hur ska *M. tuberculosis* utsöndra protein till cellytan och till den intilliggande miljön?

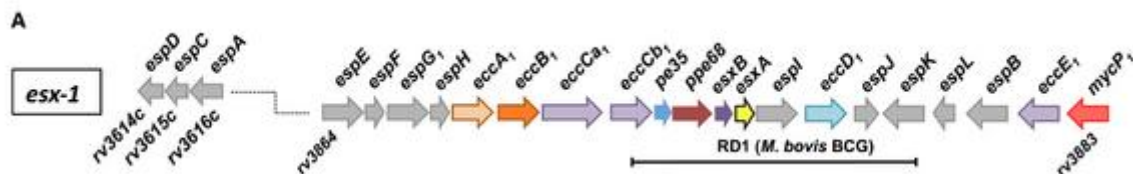
Sekretionssystem

Proteinsekretion är en essentiell del av en bakteries funktion, för att den ska kunna överleva och anpassa sig till sin miljö samt för utsöndringen av toxiner och signal protein till värdcellen. Flera olika sekretionssystem har evoluerats fram och vissa av dessa system är involverade vid spridningen av virulensfaktorer hos bakterier. Flera gener som kodar för vissa av dessa proteiner har hittats i MTBC och anses därför mycket viktiga för dessa bakteriers förmåga att orsaka patogenes. Man har hittills hittat sju generella sekretionstyper kallade sekretion system typ I upp till typ VII hos bakterier. Alla sju av dessa typer hittar man i både gramnegativa bakterier och grampositiva bakterier. Flera av dessa typer av sekretionssystem finns hos *M. tuberculosis*, i genomet på H37Rv, en vildtyp av *M. tuberculosis*, har man hittat minst fyra olika sekretionssystem, men enbart typ II och typ VII är involverade vid virulens (Forrellad *et al.* 2013). Det finns ytterligare studier som tycktes visa att MTBC har en säregen utsöndringstyp, alla dessa studier hittade denna utsöndringstyp hos *M. tuberculosis* (Hsu *et al.* 2003, Stanley *et al.* 2003, Guinn *et al.* 2004). De senaste årens forskning har visat att det är T7S som utgör den större delen av sekretionen av protein hos MTBC genom dess yttre cellmembran (Houben *et al.* 2014). Det första T7S systemet upptäcktes 2003 hos *M. tuberculosis* och var ESAT-6 system-1 (early secretory secretion antigenic target 6 system) (Stanley *et al.* 2003). ESX är alltså en typ av T7S. Totalt finns det fem stycken ESX genkluster i *M. tuberculosis*, ESX-1 upp till ESX-5. Dessa kodar för ett flertal substrat som ingår i T7S och som kommer tas upp i denna artikel, såsom Esx och PE/PPE protein, membranprotein, myosinproteaser samt andra protein som har kopplats samman med ESX (Gey van Pittius *et al.* 2001). Av dessa fem har ESX-1, ESX-3 och ESX-5 kunnat kopplas samman med virulens (Majlessi *et al.* 2015).

ESX-1 - Apoptos och förflyttning

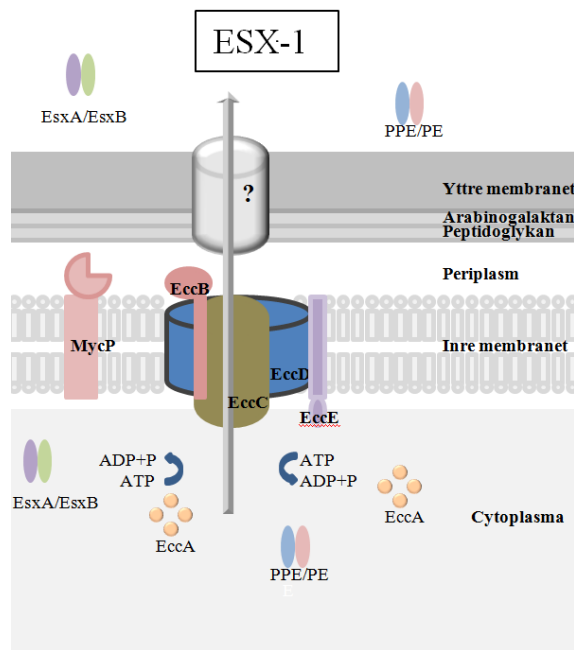
Det finns ett flertal proteiner som sekretas ut av ESX-1 systemet, men även flera proteiner som inte transporteras ut av ESX-1 systemet, men fortfarande är involverade i dess virulens. En något ovanlig egenskap hos ESX-1, jämförelsevis med andra sekretionstyper, är att utsöndrade proteiner tycks vara ömsesidigt beroende av varandra. Samma egenskap hittas i ESX-3 och ESX-5. Vid mutationer i ESX-1 gener som kodar för EsxA och EsxB ledde det till att utsöndringen av EspA blockerades och vice versa. EsxA, EsxB och EspA är alltså alla exempel på protein som utsöndras av ESX-1 (Fortune *et al.* 2005). ESX-1 hittas dock även i andra icke-patogena samt snabbt växande bakterier inom MTBC, vilket tyder på att ESX-1 är involverad i andra funktioner än bara virulens. ESX-1 primära funktion är därför troligen något annat och dess virulenta funktion är något som utvecklats hos de patogena bakterierna inom MTBC (Newton-Foot *et al.* 2016). I en studie från 1996 undersökte man de genetiska skillnaderna mellan *M. bovis*, *M. tuberculosis* och Bacillus Calmette-Guérin (Mahairas *et al.* 1996). BCG är ett vaccin mot tuberkulos som började användas på 1920-talet, det är verkbart för barn men inte effektivt för vuxna (WHO 2004). BCG är en muterad version av *M. bovis*. De såg att en s.k. region of difference (RD1), ett 9.5 kb stort DNA segment, saknades i alla bakteriestammarna i BCG, men var intakta i de virulenta bakterierna *M. tuberculosis* och *M. bovis* (Mahairas *et al.* 1996). I en annan studie såg man att EsxA inte utsöndrades av BCG-stammar (Harboe *et al.* 1996). Detta gav indikationer på att RD1 är en viktig del av ESX-1, dock är RD1 bara en del av ESX-1 (se figur 1). Dessa upptäckter har gett nya insikter i hur virulensen verkar hos *M. tuberculosis* och ledde till forskning med målet att identifiera de molekyler som är involverade i T7S, speciellt i hur virulensen är kopplad till T7S (Majlessi *et al.* 2015).

Viktiga substrat i ESX-1 och dess komplex



Figur 1. Omritad från Majlessi *et al.* 2015. Den genetiska organisationen och dess genes namn i ESX-1 i *M. tuberculosis*.

De första viktiga substraten som identifierades i ESX-1 var som tidigare sagt EsxA och EsxB kodade av generna *esxB* och *esxA*, vilka är lokaliserade i Region of Difference (RD1). RD1 kan dock komplimenteras i BCG och gör då bakterien virulent och leder bland annat till att bakterien utsöndrar EsxA och EsxB (Pym *et al.* 2003, Bitter *et al.* 2009). Båda proteinerna beskrivs som antigener och känns igen av de vita blodcellerna, T-lymfocyter, i naturliga infektioner hos människor, oxdjur samt experimentellt infekterade djur (Ravn *et al.* 1999, Aagaard *et al.* 2010). De är båda associerade med virulens i MTBC och är båda nödvändiga för att en fullständig virulens ska ske i MTBC (Wards *et al.* 2000). Tillsammans bildar proteinerna en heterodimer genom hydrofoba interaktioner (Renshaw *et al.* 2002, Brodin *et al.* 2005). Därmed sker utsöndringen av EsxA tillsammans med sin proteinpartner EsxB i ESX-1 systemet (se figur 2).



Figur 2. Omritad från Majlessi *et al.* (2015). Nutida schematisk bild av ESX-1 komplexet och några av de exporterade/utsöndrade Esx och PPE/PE protein. EccB/C/D proteinet innehåller en transmembrandomän och är den membranbundna strukturen i alla ESX/T7S i det inre membranet. EccA är cykliska AAA ATPaser. MycP är en negativ regulator för utsöndringen av ESX-1 protein. EsxA och EsxB bildar en heterodimer och är de mest undersökta proteinerna i T7S. Frågetecknet representerar den okända mekanismen och lokaliseringen av proteiner ut ur cellen (Majlessi *et al.* 2015).

Generna *pe35* och *ppe68* är närliggande *esxA* och *esxB* och hittas alltså också i RD1. De kodar för flera av PE och PPE proteinerna i ESX-1 (Majlessi *et al.* 2015). Det finns ett flertal PE/PPE protein och de flesta av dessa utsöndras av T7S. H37Rv genomet består till hela 7 % av PE/PPE kodande baspar (Cole *et al.* 1998). De representerar två stora genfamiljer som finns i *M. tuberculosis*, deras namn kommer ifrån deras speciella uppbyggnad, PE (prolin-glutaminsyra) och PPE (prolin-prolin-glutaminsyra). *Ppe68* tycks inte vara involverad vid virulens, då en inaktivering av genen inte påverkar utsöndringen av EsxA och EsxB (Demangel *et al.* 2004). *Pe35* är dock involverad vid virulensen då en inaktiverad *pe35* gen leder till en minskad utsöndring av EsxA och EsxB och skulle kunna vara delaktig vid regleringen av dessa proteiner (Brodin *et al.* 2006, Chen *et al.* 2013).

Vid *pe35* och *ppe68* hittar man generna Ecc (ESX-konserverade komponenter) och ESX-1 sekretions-associerade protein (Esp). En större andel av Ecc-proteinen innehåller en eller flera transmembran domäner och tros ligga i det inre membranet (se figur 3) (Bitter *et al.* 2009). Den första biokemiska datan som visade på hur T7S-komplexet ser ut kommer från en studie från 2015. Den består av av fyra Ecc-protein (EccB/C/D/E) i ESX-5 systemet i *M. marinum* och tros vara den membranbundna kärnan i alla T7S-typer (se figur 3 och 4) (Houben *et al.* 2012). EccA protein har dock ingen transmembran-domän och anses vara cytosoliska AAA ATPaser som associeras med flera olika aktiviteter i cellen (Houben *et al.* 2014).

MycP1 är ett protein som är membran-associerat och som spelar en essentiell roll för en funktionell ESX-1 utsöndring. En bortagning av MycP1 leder till att ESX-1 utsöndringen stoppas, medan en inhibering leder till en ökad utsöndring av ESX-1 protein. Detta kan tyda på att MycP1 har en negativ reglering på ESX-1 systemet. Författarna spekulerar i att MycP1 är involverad i flera ESX-1 komponenter. EspB verkar också vara involverad i MycP1 och kan vara den komponent som avaktiverar sekretionen i med hjälp av MycP1 och därmed ESX-1 sekretionen (Ohol *et al.* 2010).

EspACD är protein som kodas utanför den genomiska regionen för ESX-1/RD1. EsxA/EsxB är beroende av åtminstone EspACD och vice versa, för att en utsöndring ska kunna gå till (Fortune *et al.* 2005, MacGurn *et al.* 2005). Anmärkningsvärt är att operonet *EspACD* enbart hittas i de långsamt växande och patogena mykobakterierna. Det finns inte heller någon ortolog till *EspACD* operonet i de snabbt växande mykobakterier, trots att dessa alltså också har ESX-1. Mer detaljerad information om EspACD saknas, men deras funktion verkar vara kopplad till hur ESX-1 utsöndringen regleras (Majlessi *et al.* 2015). Eftersom ingen ortolog finns i de snabbt växande mykobakterierna, är det mycket möjligt att *EspACD* är kopplad till virulens i de långsamt växande patogena mykobakterierna.

EspG och espF är ytterligare protein som förmodligen utsöndras av ESX-1. EspG roll i virulens är inte klarlagd, men skulle kunna interagera med andra protein i ESX-1, såsom PE/PPE (Brodin *et al.* 2006, Majlessi *et al.* 2015). Mutanter som saknar generna för *espG* verkar inte påverka ESX-1 i *M. tuberculosis*, dock har samma deletioner för den snabbt växande bakterien *M. smegmatis* en negativ påverkan på utsöndringen av EsxA/EsxB (Converse & Cox 2005).

Esx-1 sekretion ut ur det yttre membranet

Man vet fortfarande inte hur transporten ut i den intill liggande miljön ser ut i ESX-1, därav frågetecknet i figur 3. Antingen utsöndras substraten direkt ut genom det speciella yttre membranet hos bakterien eller stimulerar ESX-1 förflyttningen av det yttre membranet, det vill säga om bakterien aktivt flyttar på det yttre membranet. Man vet inte heller om substraten är äkta exoprotein som direkt släpps ut ur bakterien eller om substraten sitter i det yttre membranet, som med hjälp av ESX-1 skalas av vilket gör att substraten kommer ut ur bakterien (Pym *et al.* 2002, Chagnot *et al.* 2013). I en studie gjorde man en deletion på RD1 i *M. marinum*, vilket sedan komplementerades med RD1 regionen och man jämförde vildtypen med den komplementerade stammen. Det visade sig att exporten till cellväggen av EsxA och EsxB pågick, men att proteinerna inte utsöndrades ut ur mutantstammen, trots att en komplementering på RD1 skett. Trots att ingen utsöndring skedde av de två antigenerna EsxA och EsxB, var den komplementerade bakterien anmärkningsvärt nog fortfarande virulent, om än inte lika virulent som vildtypen. Författarna kom fram till att de lyckats identifiera en region utanför RD1 som påverkar utsöndringen av EsxA och EsxB (Kennedy *et al.* 2014). De såg även att EsxB i högre grad än EsxA fanns i bakteriens cellvägg, vilket också har visats i en tidigare studie (Kinhikar *et al.* 2010, Kennedy *et al.* 2014). De såg två förklaringar till att den komplementära bakterien inte utsöndrade de två proteinerna. Utsöndringen av EsxA och EsxB sker genom aktiv transport och det locus de identifierat är involverad i den aktiva transporten. Dock bör de då också observerat en åtminstone delvis återställning av transporten, vilket inte gjordes. Deras andra förklaring är att nivån av EsxA/EsxB i cellväggen är lägre för den komplementära bakterien jämförelsevis med vildtypen. Om substraten i ESX-1 passivt utsöndras ut ur bakterien, är det möjligt att nivåerna av EsxA och EsxB måste nå en viss nivå för en utsöndring (Kennedy *et al.* 2014). Allt är dock fortfarande bara spekulationer och inget definitivt svar har ännu getts. Det är dessutom inte säkert att komplementeringen var helt lyckad, vilket också kan förklara resultatet. I en studie spekulerade man i om EccE eller EccC är en del av det yttre cellmembranets komplex (Houben *et al.* 2012). EccE utsöndras inte av ESX-4, det äldsta T7S-systemet, vilket antyder att det snarare är EccC som är en del av komplexet (Gey van Pittius *et al.* 2001). Dock har väldigt få mykomembran protein identifierats hittills och deras egenskaper är därmed inte klarlagda och man kan därför inte heller dra någon generell slutsats (Houben *et al.* 2012).

ESX-1 systemet förflyttar bakterien och inducerar apoptos

Genetiska förändringar på ESX-1 systemet som leder till en oförmåga till substrat sekretion till supernatanten *in vitro* leder till att bakterien förlorar sin virulens (Hsu *et al.* 2003, Stanley *et al.* 2003, Guinn *et al.* 2004). ESX-1 inhiberar T-cellers responser samt den fagosomala mognaden (MacGurn & Cox 2007, Samten *et al.* 2009). ESX-1 hjälper även bakterien att undvika den makrofaga vakuolen (de Jonge *et al.* 2007, Smith *et al.* 2008). När de vita blodcellerna fagocyterar *M. tuberculosis* förs de till lysosomerna, med målet att döda bakterierna. I en studie förhindrade man syntetiseringen av EsxA och EsxB hos *M. tuberculosis*. Detta ledde till, som tidigare spekulerats i, till att bakterien inte tog sin ut till cytoplasman hos den vita blodcellen. Detta stärkte hypotesen att ESX-1 tillåter *M. tuberculosis* att förflytta sig till cytosolen hos värden, samtidigt som försöket visade att bakterien föredrar att replikera sig i cytosolen snarare än i lysosomen hos den vita blodcellen (van der Wel *et al.* 2007). De såg även att ESX-1 inducerar celldöd hos dendritceller, mer specifikt i det här fallet, EsxA (van der Wel *et al.* 2007). Ytterligare studier har också kunnat visa att EsxA inducerar celldöd hos värdcellen (Derrick & Morris 2007, Yang *et al.* 2015). De såg att apoptosen var högst hos de dendritceller som infekterats av vildtypen av *M. tuberculosis*, samt att betydligt fler celler hade dött som infekterats av vildtypen. Därmed tycks apoptosen också sammanfalla med förflyttningen till cytosolen i värdcellen (van der Wel *et al.* 2007).

I en nyligen utförd studie såg man att EsxA stimulerar apoptos i makrofager genom att sikta in sig på microRNA-155(miR-155)-Suppressor av cytokin signal(SOCS1) interaktionen. miR-155 har visats vara en viktig regulator av det medfödda och adaptiva immunförsvaret. SOCS1 är medlem av SOCS, vilka är en cytokinfamilj som är involverade i cytokininutsöndring i flera immunceller (Yang *et al.* 2015). Cytokiner är små proteiner som utsöndras av celler och har specifika effekter på interaktioner och kommunikationen mellan celler (Zhang & An 2007). Toll-like receptor 2 (TLR2) är även involverad när EsxA utsöndras ur bakterien (Yang *et al.* 2015). TLR2 är medlem av TLR, vilka spelar en viktig roll i igenkänningen av patogener och aktiveringen av det medfödda immunförsvaret. Vidare spekulerar Yang *et al.* att TLR2/miR-155/SOCS1 signaleringen, vilka alla har ett starkt samband med EsxA, skulle kunna användas för att utveckla ett immunoterapeutiskt försvar för kroppen mot EsxA. Om något är studien ett steg närmare för att vidare undersöka mekanismerna av EsxA värdcells-immunitet mot mykobakteriella infektioner (Yang *et al.* 2015).

ESX-3 - zink och järntransport.

I alla studerade bakterier i MTBC hittar man ESX-3, med undantaget *M. chubuense*, vilket tyder på att ESX-3 är den första T7S duplikationen i MTBC (Newton-Foot *et al.* 2016). Det kan dock också vara ESX-4 som är det äldsta T7S-systemet (Gey van Pittius *et al.* 2001).

Patogener har länge antagits tävla om näringsämnen med sin värdcell, där bland de viktigaste ämnena är metaller, som järn och zink (Beisel 1977, Maciąg *et al.* 2007). Många patogener som drabbar människan är beroende av järn och en strypt järntillförsel till patogenen är en viktig strategi för värdens immunförsvaret (Nairz *et al.* 2010). ESX-3 är med stor sannolikhet involverad i upptaget av zink (Maciąg *et al.* 2007). En studie från 2009 visade att ESX-3 är delaktig i upptaget av järn. (Siegrist *et al.* 2009). En annan studie också från 2009 tycktes visa att frånvaron av zink aktiverade genklustret ESX-3 hos *M. tuberculosis*, dock inte hos *M. smegmatis*. De såg även att generna associerade med ESX-3 inducerades vid sura förhållanden (pH 4.2), ett tecken på att ESX-3 är direkt involverad vid bakteriens överlevnad i makrofagen (Maciąg *et al.* 2009).

Patogener i MTBC tar upp järn (Fe^{3+}) med hjälp av sideroforer, men även flera andra bakterier, svampar och växter tar upp järn på samma sätt. Sideroforer är kelatkomplex som binder till sig järn (Chu *et al.* 2010). I studien från 2009 kunde de dra slutsatsen att ESX-3 med stor sannolikhet interagerar med sideroforer. De såg även att ESX-3 är ett sekretionssystem som svarar på borttagandet av järn hos *M. smegmatis* samt i BCG. När ESX-3 saknades hos BCG var tillväxten betydligt lägre i makrofager, än hos vildtypen av *M. bovis*. Detta tyder på att på att ESX-3 troligtvis även är viktig för tillväxten i både *in vitro* och *in vivo* (Siegrist *et al.* 2009).

Substrat i ESX-3



Figur 3. Den genetiska organisationen i ESX-3 och dess gener.

ESX-3 innehåller alla av de ESX konserverade komponenterna, som eccA, mycP, esx och pe/pe och även espG vilka alla hittas i både ESX-1 och ESX-5 (Newton-Foot *et al.* 2016).

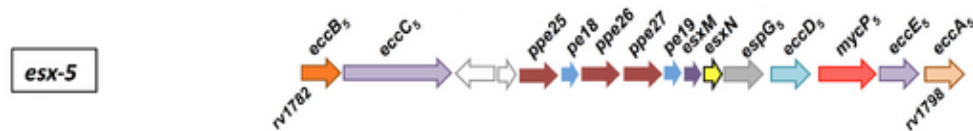
ESX-3 kodar proteinerna EsxG och EsxH, vilka är paraloga till EsxB och EsxA som kodas utav ESX-1. Likt EsxB och EsxA bildar EsxG och EsxH också en heterodimer tillsammans (Wards *et al.* 2000, Siegrist *et al.* 2009). ESX-3 har visat sig vara nödvändig för att EsxH skulle sekretas ut ur *M. smegmatis* i Siegrist *et al.* studie. Utsöndringen av EsxH och EsxG ökar vid brist på järn (Siegrist *et al.* 2009). I *M. smegmatis* visade en studie att EccC, EspG och EccD alla är nödvändiga komponenter för järnupptag och EsxG och EsxH export (Siegrist *et al.* 2014). I *M. tuberculosis* verkar också EsxH/EsxG störa den fagosamala mognaden, genom att störa den endosamala sorterings komplexet (ESCRT) (Mehra *et al.* 2013). Därmed verkar både ESX-1 och ESX-3 påverka *M. tuberculosis* förflyttning till cytosolen i fagocyten.

ESX-5 - infektion och apoptos.

ESX-5 är det enda ESX genklustret som man hittar i alla långsamt växande bakterier i MTBC, men som saknas i de snabbt växande bakterierna i MTBC. Det är också den senast evolverade T7S-typen. Det skulle därför kunna vara den typ av T7S som är mest involverad i patogenitet och i de långsamt växande bakteriernas fenotyp. ESX-5 innehåller flera gener för PE/PPE-protein samt espG (Gey van Pittius *et al.* 2001, Newton-Foot *et al.* 2016)

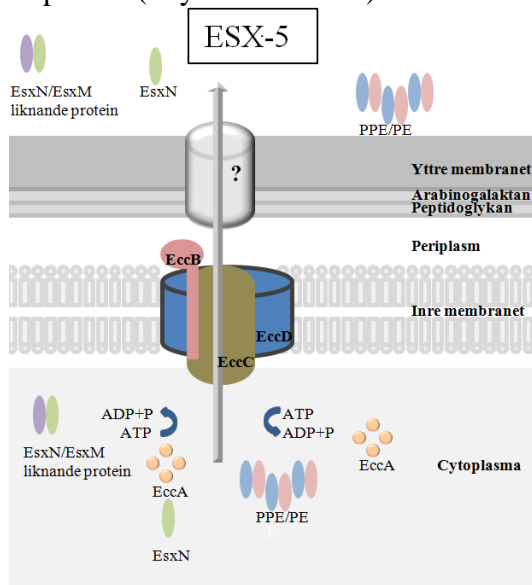
ESX-5 styr hur värdcellen reagerar på en infektion, bibehåller en infektion och påverkar celldöden hos värdcellen (Abdallah *et al.* 2011, Weerdenburg *et al.* 2012). Intressant nog visade Abdallah *et al.* studie att när *M. marinum* saknade vissa ESX-5 associerade gener, ökade virulensen betydligt i zebrafisk och således celldöden (Weerdenburg *et al.* 2012). I en annan studie som undersökte ESX-5 i *M. tuberculosis* såg man dock inte denna ökning (Bottai *et al.* 2012). Möjligtvis för att ESX-5 har en annan roll i *M. tuberculosis*. En deletion på ESX-5 regionen på *M. marinum* komplementerades av en ESX-5 region från *M. tuberculosis*. Det ledde till att en viss del av ESX-5 utsöndringen återställdes. Dock inte helt och hållet, vilket visar att ESX-5 skiljer sig mellan de två bakterierna (Bottai *et al.* 2012). Detta sekretionssystem möjliggör upptaget av fettsyror hos bakterien, antingen genom ett av dess substrat eller genom det direkta intaget av fettsyror. (Ates *et al.* 2015). ESX-5 påverkar också celldöden hos makrofager i människor. Samma studie visade även att celldöden minskade med upp till 70 % i makrofager infekterade med *M. marinum* som saknade ESX-5 eller ESX-1 jämfört med vildtypen (Abdallah *et al.* 2011).

Substrat i ESX-5 och dess komplex



Figur 4. Generna i ESX-5 och dess organisation.

ESX-5 kodar för de två proteinerna PPE41 och PPE25, vilka liksom EsxG och EsxH samt EsxA och EsxB också bildar heterodimerer (Abdallah *et al.* 2006, Siegrist *et al.* 2009, Bottai *et al.* 2012). Det är dock EsxN som är EsxA homolog i ESX-5 och det är i nuläget oklart om EsxN har en proteinpartner liksom EsxA och EsxG har, då genen *EsxM* finns precis bredvid *EsxN* men har en frameshift codon som därför antas gör den trunckerad. Det finns dock fyra stycken homologer till *esxM/esxB* genpar utanför ESX-5 lokuset, och det är troligt att det är ett av dessa alternativa EsxM-protein som bildar en heterodimer med EsxN (Bottai *et al.* 2012). Den förmodligen viktigaste observationen av ESX-5 hos *M. tuberculosis* är att den utsöndrar flera PE/PPE proteiner. En stor del av genomet hos vildtypen H37Rv *M. tuberculosis* består av gener i pe/ppe familjer. En sekvensering från 1998 visade att 10 % av genomet bestod av dessa gener (Cole *et al.* 1998). Identifieringen av virulensfaktorer som interagerar med värdens immunsystem är mycket viktigt för att förstå mekanismerna bakom patogenes och immunogeniteten hos *M. tuberculosis* för att kunna utveckla nya vacciner. Flera PE/PPE proteiners immunogenitet är troligen beroende av ESX-5, oavsett om de kodas av ESX-5 eller inte, då EccD, en transmembrankanäle, troligen möjliggör utsöndringen av PE/PPE protein. Detta eftersom en icke uttryckt *EccD* gen inte uttryckte några PE/PPE-mediterade immun responser (Sayes *et al.* 2012).



Figur 5. Omritad från Majlessi *et al.* (2015). Schematisk bild över komplexet för ESX-5 som den ser ut idag. EccB/C/D är den kärnstruktur som finns i alla T7S/ESX-system och innehåller en transmembrandomän. EccA är cykliska AAA ATPaser. Alla de PPE/PE protein på figuren exporteras/utsöndras av ESX-5, dock kodas flera av proteinerna utanför ESX-5 locus. EsxN/EsxM, som kodas utanför ESX-5 regionen, utsöndras också av ESX-5. Den okända mekanismen och lokaliseringen av proteiner ut ur cellen representeras av frågetecknet i figuren (Majlessi *et al.* 2015).

Diskussion

ESX-1

De beskrivna proteiner i ESX-1 tros vara bundna eller/och interagera med det inre mykobakteriella membranet, de proteiner som är associerade med det yttre cellmembranet har man dock inte lyckats identifiera, se figur 3 för ESX-1 och figur 4 för ESX-3. RD1 är utan tvekan en viktig del i hur man ska förstå ESX-1 systemet, då flera studier har visat att deletioner i detta område leder till att *M. tuberculosis* inte är lika virulent. Därför skulle det kunna vara intressant med en medicin som på något sätt blockerar dessa gener för att därigenom stoppa spridning av tuberkulos, även innan den har brutit ut i kroppen. Att utveckla vaccin som efterliknar bakteriestammar som förflyttar sig in i cytosolen är troligtvis ett viktigt och kritiskt steg för att komma närmare ett effektivt vaccin för tuberkulos (van der Wel *et al.* 2007).

ESX-3

ESX-3 påverkar järntransport och zinktransporten in i mykobakterier (Siegrist *et al.* 2009). Att värdceller och patogener tävlar om näringsämnen är sedan länge känt, där värdcellen försöker förhindra upptaget av näringsämnen av patogenen. Detta är ett område som bör vara väl lämpat för framtagningen av vaccin, eftersom förhindrandet av framför allt järnupptag (Fe^{3+}) till *M. tuberculosis* säkerligen skulle leda till bakteriens död. Exakt hur detta ska gå till är självklart svårt att svara på, men att på något sätt påverka sideroforererna känns som en logisk början. Eftersom sideroforer inte är unika för *M. tuberculosis* utan är vanligt förekommande bland många andra patogener, skulle man kunna dra lärdom av eventuella mediciner som framtagits för de många andra patogenerna.

ESX-5

En komplimentering för ESX-5 visade att regionen i *M. tuberculosis* och *M. marinum* skiljer sig. Det tyder troligtvis också på att vissa av substraten är arts specifika, då flera av substraten bör ha bildats, men alltså inte utsöndrades (Bottai *et al.* 2012). EccD möjliggör troligtvis utsöndringen av PE/PPE proteiner (Sayes *et al.* 2012). En större förståelse för detta skulle kunna lära oss hur man stoppar utsöndringen av PE/PPE proteiner. Då det är själva utsöndringen som är essentiell för *M. tuberculosis* överlevnad och något som stoppar sekretionen bör leda till bakteriens död.

Slutsats och framtid

Eftersom *M. tuberculosis* är en så pass svår bakterie att undersöka av tidsmässiga och hälsovådliga skäl används även *M. smegmatis*, *M. Bovis* och *M. smegmatis* som modellorganismer för *M. tuberculosis*. Detta dock inte utan problem, exempelvis upptäckte en studie från 2009 att ESX-3 inte är involverad vid zinktransporten hos *M. smegmatis* (Maciąg *et al.* 2009). Därför bör man vara försiktig med att dra slutsatser om T7S, då något som är applicerbart för en viss bakterie inte nödvändigtvis är det för alla andra bakterier. Det kan dock ge indikationer på vad man bör undersöka. Ett verksamt vaccin mot tuberkulos ligger troligtvis i någon av tre typer av T7S som inverkar på virulensen: ESX-1, ESX-3 och ESX-5. Möjligtvis alla tre typer. Det som behöver göras i framtiden är helt enkelt mer forskning på T7S. Exempelvis vidare undersöka exakt hur ESX-1 utsöndrar substrat till den intilliggande miljön, då utsöndringen kan ha vissa likheter med ESX-3 och ESX-5 utsöndring. På ESX-3 vidare undersöka EsxH/EsxG påverkan på den fagosamala mognadsprocessen och på ESX-5 se hur PPE/PE proteinerna, även de som inte direkt kodas av ESX-5, påverkar värdcellen. Tuberkulos fortsätter vara ett stort problem i tredje världen, där sjukvården ofta är bristfällig. Ett effektivt vaccin mot tuberkulos skulle öka levnadsstandarden betydligt i dessa länder och är om något ett argument för att fortsätta forskningen på T7S i *M. tuberculosis*.

Tack

Tack till Alexander Sokyazian, Klara Granlöf och Patrick Nylund för en god återkoppling. Vill även tacka Leif Kirsebom som tipsat om ett flertal artiklar som har hjälpt mig skriva denna översiktsartikel. Slutligen vill jag tacka Lage Cerenius för handledningen i min skrivprocess.

Referenser

- Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Gutiérrez-Pabello JA, McNair J, Andersen P, Suárez-Güemes F, Pollock J, Espitia C, Cataldi A. 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive Veterinary Medicine* **96**: 161–169.
- Abdallah AM, Bestebroer J, Savage NDL, Punder K de, Zon M van, Wilson L, Korbee CJ, Sar AM van der, Ottenhoff THM, Wel NN van der, Bitter W, Peters PJ. 2011. Mycobacterial Secretion Systems ESX-1 and ESX-5 Play Distinct Roles in Host Cell Death and Inflammasome Activation. *The Journal of Immunology* **187**: 4744–4753.
- Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, Eisenberg D, Musters RJP, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmelk BJ, Luirink J, Bitter W. 2006. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Molecular Microbiology* **62**: 667–679.
- Ates LS, Ummels R, Commandeur S, van der Weerd R, Sparrius M, Weerdenburg E, Alber M, Kalscheuer R, Piersma SR, Abdallah AM, Abd El Ghany M, Abdel-Haleem AM, Pain A, Jiménez CR, Bitter W, Houben ENG. 2015. Essential Role of the ESX-5 Secretion System in Outer Membrane Permeability of Pathogenic Mycobacteria. *PLoS Genetics*, doi 10.1371/journal.pgen.1005190.
- Beisel WR. 1977. Magnitude of the host nutritional responses to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition* **30**: 1236–1247.
- Bitter W, Houben ENG, Bottai D, Brodin P, Brown EJ, Cox JS, Derbyshire K, Fortune SM, Gao L-Y, Liu J, Pittius NCG van, Pym AS, Rubin EJ, Sherman DR, Cole ST, Brosch R. 2009. Systematic Genetic Nomenclature for Type VII Secretion Systems. *PLOS Pathog* **5**: e1000507.
- Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, Sayes F, Bitter W, Brennan MJ, Leclerc C, Batoni G, Campa M, Brosch R, Esin S. 2012. Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Molecular Microbiology* **83**: 1195–1209.
- Brodin P, Jonge MI de, Majlessi L, Leclerc C, Nilges M, Cole ST, Brosch R. 2005. Functional Analysis of Early Secreted Antigenic Target-6, the Dominant T-cell Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, Reveals Key Residues Involved in Secretion, Complex Formation, Virulence, and Immunogenicity. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 33953–33959.
- Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, Jonge MI de, Bottai D, Demangel C, Hinds J, Neyrolles

- O, Butcher PD, Leclerc C, Cole ST, Brosch R. 2006. Dissection of ESAT-6 System 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and Impact on Immunogenicity and Virulence. *Infection and Immunity* **74**: 88–98.
- Busse HJ, E.Trujillo M, Goodfellow M, Kämpfer P, Ludwig W, Suzuki KI, Whitman WB. 2015. Family III. Mycobacteriaceae. Busse HJ, E.Trujillo M, Goodfellow M, Kämpfer P, Ludwig W, Suzuki KI, Whitman WB (red). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, volume five. The actinobacteria, Part A and B, ss 312-375. Springer Science+Business Media LLC, London.
- Chagnot C, Zorgani MA, Astruc T, Desvaux M. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology*, doi 10.3389/fmicb.2013.00303.
- Chen JM, Zhang M, Rybniker J, Boy-Röttger S, Dhar N, Pojer F, Cole ST. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* EspB binds phospholipids and mediates EsxA-independent virulence. *Molecular Microbiology* **89**: 1154–1166.
- Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock RS, Slavinskaya Z, Vogel HJ. 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *BioMetals* **23**: 601–611.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537–544.
- Converse SE, Cox JS. 2005. A Protein Secretion Pathway Critical for *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Is Conserved and Functional in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* **187**: 1238–1245.
- Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. 2003. The growing burden of tuberculosis: Global trends and interactions with the hiv epidemic. *Archives of Internal Medicine* **163**: 1009–1021.
- de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, Honoré N, Marchal G, Jiskoot W, England P, Cole ST, Brosch R. 2007. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* Dissociates from Its Putative Chaperone CFP-10 under Acidic Conditions and Exhibits Membrane-Lysing Activity. *Journal of Bacteriology* **189**: 6028–6034.
- Demangel C, Brodin P, Cockle PJ, Brosch R, Majlessi L, Leclerc C, Cole ST. 2004. Cell Envelope Protein PPE68 Contributes to *Mycobacterium tuberculosis* RD1 Immunogenicity Independently of a 10-Kilodalton Culture Filtrate Protein and ESAT-6. *Infection and Immunity* **72**: 2170–2176.
- Derrick SC, Morris SL. 2007. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology* **9**: 1547–1555.

- Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, Murray M, Theron G, Udwadia Z, Migliori GB, Warren R. 2014. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *The Lancet Respiratory Medicine* **2**: 321–338.
- Finlay BB, Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 136–169.
- Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo M de la P, Cataldi AA, Bigi F. 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **4**: 3–66.
- Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sassetti CM, Sherman DR, Bloom BR, Rubin EJ. 2005. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10676–10681.
- Gey van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD. 2001. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biology* **2**: research0044.1-research0044.18.
- Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR. 2004. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **51**: 359–370.
- Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. 1996. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* **64**: 16.
- Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY-C, Gernaey AM, Galili E, Eshed V, Greenblatt CL, Lemma E, Bar-Gal GK, Spigelman M. 2008. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE*, doi 10.1371/journal.pone.0003426.
- Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 3963–3967.
- Houben ENG, Bestebroer J, Ummels R, Wilson L, Piersma SR, Jiménez CR, Ottenhoff THM, Luirink J, Bitter W. 2012. Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Molecular Microbiology* **86**: 472–484.
- Houben ENG, Korotkov KV, Bitter W. 2014. Take five — Type VII secretion systems of *Mycobacteria*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**: 1707–1716.
- Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, Marks CB, Padiyar J, Goulding C, Gingery M, Eisenberg D, Russell RG, Derrick SC, Collins FM, Morris SL, King CH, Jacobs WR. 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 12420–12425.
- Kennedy GM, Hooley GC, Champion MM, Mba Medie F, Champion PAD. 2014. A Novel ESX-1 Locus Reveals that Surface-Associated ESX-1 Substrates Mediate Virulence in *Mycobacterium marinum*. *Journal of Bacteriology* **196**: 1877–1888.
- Kinhikar AG, Verma I, Chandra D, Singh KK, Weldingh K, Andersen P, Hsu T, Jacobs WR, Laal S. 2010. Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells. *Molecular microbiology* **75**: 92–106.
- MacGurn JA, Cox JS. 2007. A Genetic Screen for *Mycobacterium tuberculosis* Mutants Defective for Phagosome Maturation Arrest Identifies Components of the ESX-1 Secretion System. *Infection and Immunity* **75**: 2668–2678.
- MacGurn JA, Raghavan S, Stanley SA, Cox JS. 2005. A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **57**: 1653–1663.
- Maciąg A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G, Manganelli R. 2007. Global Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) Regulon. *Journal of Bacteriology* **189**: 730–740.
- Maciąg A, Piazza A, Riccardi G, Milano A. 2009. Transcriptional analysis of ESAT-6 cluster 3 in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiology* **9**: 48.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Journal of Bacteriology* **178**: 1274.
- Majlessi L, Prados-Rosales R, Casadevall A, Brosch R. 2015. Release of mycobacterial antigens. *Immunological Reviews* **264**: 25–45.
- Mehra A, Zahra A, Thompson V, Sirisaengtaksin N, Wells A, Porto M, Köster S, Penberthy K, Kubota Y, Dricot A, Rogan D, Vidal M, Hill DE, Bean AJ, Philips JA. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* Type VII Secreted Effector EsxH Targets Host ESCRT to Impair Trafficking. *PLOS Pathog* **9**: e1003734.
- Nairz M, Schroll A, Sonnweber T, Weiss G. 2010. The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface. *Cellular Microbiology* **12**: 1691–1702.
- Newton-Foot M, Warren RM, Sampson SL, van Helden PD, Gey van Pittius NC. 2016. The plasmid-mediated evolution of the mycobacterial ESX (Type VII) secretion systems. *BMC Evolutionary Biology*, doi 10.1186/s12862-016-0631-2.
- Ohol YM, Goetz DH, Chan K, Shiloh MU, Craik CS, Cox JS. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 Protease Plays a Dual Role in Regulation of ESX-1 Secretion and Virulence. *Cell Host & Microbe* **7**: 210–220.
- Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology* **46**: 709–717.

- Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, Griffiths KE, Marchal G, Leclerc C, Cole ST. 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nature Medicine* **9**: 533–539.
- Ravn P, Demissie A, Eguale T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA, Mustafa AS, Jensen AK, Holm A, Rosenkrands I, Oftung F, Olobo J, Reyn F von, Andersen P. 1999. Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases* **179**: 637–645.
- Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, Williamson RA, Carr MD. 2002. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6·CFP-10 complex implications for pathogenesis and virulence. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 21598–21603.
- Samten B, Wang X, Barnes PF. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses. *Tuberculosis* **89**: S74–S76.
- Sayes F, Sun L, Di Luca M, Simeone R, Degaiffier N, Fiette L, Esin S, Brosch R, Bottai D, Leclerc C, Majlessi L. 2012. Strong Immunogenicity and Cross-Reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 Type VII Secretion -Encoded PE-PPE Proteins Predicts Vaccine Potential. *Cell Host & Microbe* **11**: 352–363.
- Shiloh MU, DiGiuseppe Champion PA. 2010. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Current opinion in microbiology* **13**: 86–92.
- Siegrist MS, Steigedal M, Ahmad R, Mehra A, Dragset MS, Schuster BM, Philips JA, Carr SA, Rubin EJ. 2014. Mycobacterial Esx-3 Requires Multiple Components for Iron Acquisition. *mBio*, doi 10.1128/mBio.01073-14.
- Siegrist MS, Unnikrishnan M, McConnell MJ, Borowsky M, Cheng T-Y, Siddiqi N, Fortune SM, Moody DB, Rubin EJ. 2009. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 18792–18797.
- Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu J, Liu J, McDonald KL, Szyk A, LaRonde-LeBlanc N, Gao L-Y. 2008. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-Secreted ESAT-6 and its role in *mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infection and Immunity* **76**: 5478–5487.
- Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JS. 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13001–13006.
- Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PDR, Abdellah Z, Arrowsmith C, Chillingworth T, Churcher C, Clarke K, Cronin A, Davis P, Goodhead I, Holroyd N, Jagels K, Lord A, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Quail MA, Rabinowitsch E, Walker D, White B, Whitehead S, Small PLC, Brosch R, Ramakrishnan

- L, Fischbach MA, Parkhill J, Cole ST. 2008. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research* **18**: 729–741.
- Tobin DM, Ramakrishnan L. 2008. Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cellular Microbiology* **10**: 1027–1039.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. 2007. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* **129**: 1287–1298.
- Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM. 2000. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tubercle and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* **80**: 185–189.
- Weerdenburg EM, Abdallah AM, Mitra S, de Punder K, van der Wel NN, Bird S, Appelmek BJ, Bitter W, van der Sar AM. 2012. ESX-5-deficient *Mycobacterium marinum* is hypervirulent in adult zebrafish. *Cellular Microbiology* **14**: 728–739
- Wely KHM van, Swaving J, Freudl R, Driessen AJM. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 437–454.
- WHO. 2015a. Global tuberculosis report 2015. WWW-dokument 2015-: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Hämtad 2015-11-25.
- WHO. 2015b. <http://www.who.int/tb/challenges/ltbi/en/>. Hämtad 2016-06-14
- WHO. 2004. Weekly epidemiological record. <http://www.who.int/wer/2004/en/wer7904.pdf>. Hämtad 2016-06-14
- Williams, C. 2012. Global tuberculosis control: WHO report 2011. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* **36**: 497–498.
- Yang S, Li F, Jia S, Zhang K, Jiang W, Shang Y, Chang K, Deng S, Chen M. 2015. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium Tuberculosis* promotes apoptosis of macrophages via targeting the microRNA155-SOCS1 interaction. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **35**: 1276–1288.
- Zhang J-M, An J. 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics* **45**: 27–37.
- Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. 2008. Direct Visualization of the Outer Membrane of *Mycobacteria* and *Corynebacteria* in Their Native State. *Journal of Bacteriology* **190**: 5672–5680.

Etikbilaga

Är typ VII sekretion vägen till ett vaccin mot tuberkulos?

Andreas Juleshaug

Självständigt arbete biologi 2016

Frågeställning och argument

Mycobacterium tuberculosis orsakar tuberkulos hos människor. Bara 2014 blev 9,6 miljoner infekterade av *M.tuberculosis* (WHO 2015a). Tillsammans med HIV och uppkomsten av multiresistenta bakterier blir spridningen ännu värre och drabbar människor i särskilt socialt utsatta områden i världen (Corbett *et al.* 2003, Williams 2012, Dheda *et al.* 2014). Studier som ligger till grund för forskningen inom detta område grundar sig i mångt och mycket på deletioner i bakterien. Dessa infekterar sedan värdjuren. Vanligtvis används gnagare och fiskar som försöksdjur i studierna. Likt hos människor känner även djur smärta och vi har ett etiskt ansvar för dessa. De studier jag läst har djuren blivit infekterade i 3 dagar till upp till 50 dagar. Frågan är ju dock om detta verkligen är nödvändigt, då många ekonomiskt starka länder bevisligen inte behöver ett vaccin mot tuberkulos för att hålla sjukdomsfallen nere. Är det ett onödigt lidande forskare utsätter försöksdjuren för?

Samhällets hantering

Vanligast är att människor med en tuberkulosinfektion enbart får en latent infektion. Mellan 5-10 % av de med en latent tuberkulosinfektion kommer utsättas för en aktiv infektion. Risken är större för personer med ett nedsatt immunförsvar, exempelvis HIV (WHO 2015b). Anledningen till den stora spridningen av tuberkulos är inte avsaknaden av ett effektivt vaccin, det är avsaknaden av ett effektivt sjukvårdssystem i många av dessa länder. Ett vaccin mot tuberkulos skulle troligen bara vara en lösning på ett problem bland många andra, utbyggnad av exempelvis sjukvård och spridningen av allmän sjukdomskunskap ger mer långsiktiga lösningar på mer än bara en sjukdom.

Framtida fördjupning

Ur en viss synvinkel skulle man kunna argumentera att dessa djurs lidande är acceptabelt, då nyttan att framställa ett vaccin kan tyckas vara ett ändamål som helgar medlen. Man bör dock fortfarande beakta vad det innebär för försöksdjuren och det gäller både fortsatt forskningen inom detta ämne, men även i alla studier som bedriver något slags djurförsök.

Forskningsetik

I en studie infekterade forskarna zebrafiskars embryon samt vuxna individer med patogenen *M.marinum*. När dessa individer visade allvarliga symptom avlivades dessa, det är den enda studien jag lyckats hitta som har berättat om någonting om hur man gått tillväga för att på någorlunda sätt lindra djurens lidande (Weerdenburg *et al.* 2012). Olika perspektiv har getts i min uppsats anser jag, exempelvis har jämförelser getts mellan samma sekretionssystem i olika bakteriearter i uppsatsen. Jag anser mig ha använt tillförlitliga källor. Flera av källorna jag använt mig av har jag hittat genom översiktsartiklar publicerade mellan 2013-2015 och bör därför vara skrivna av personer med stor insikt inom mitt valda ämne. Flera gånger har jag dock behövt djupdyka mer i referenser och det jag hittat har känts tillförlitligt. Jag tycker jag har varit väldigt noggrann med att ange källor till mina stycken, men även mina egna tankar i texten, de få som finns där.

Referenser

- Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**: 1009–1021.
- Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, Murray M, Theron G, Udwadia Z, Migliori GB, Warren R. 2014. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *Lancet Respir Med* **2**: 321–338.
- Weerdenburg EM, Abdallah AM, Mitra S, de Punder K, van der Wel NN, Bird S, Appelmek B, Bitter W, van der Sar AM. 2012. ESX-5-deficient *Mycobacterium marinum* is hypervirulent in adult zebrafish. *Cell Microbiol* **14**: 728–739.
- WHO. 2015a. WHO | Global tuberculosis report 2015. WWW-dokument 2015-: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. Hämtad 2015-11-25.
- WHO. 2015b. <http://www.who.int/tb/challenges/tbi/en/>. Hämtad 2016-06-14.
- Williams, C. 2012. Global tuberculosis control: WHO report 2011. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* **36**: 497–498.