UPPSALA
UNIVERSITET

Nyupptäckta försvarssystem mot fager

mekanismer, funktioner och möjliga utvecklingar

Mårten Ljungberg

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

Nyupptäckta försvarssystem mot fager – mekanismer, funktioner och möjliga utvecklingar

Mårten Ljungberg

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Bakterier och arkéer blir ofta angripna av fager och således har det utvecklats en mängd försvarssystem hos prokaryoterna. Många utav dessa försvarssystem är väl utforskade och fungerar genom kända principer och mekanismer och kunskapen om dessa system har bidragit till att framsteg har gjorts inom vetenskapsområden som genetik, bioteknik och molekylärbiologi. Likväl så upptäcks ibland helt nya försvarssystem som är verksamma genom hittills okända mekanismer. Ett sådant system är Pgl-systemet, som verkar genom att metylera fagens DNA när den infekterar bakterien. Bakterien som blir infekterad lyserar dock och fager med metylerat DNA sprider sig till nya bakterier och infekterar dessa. I dessa bakterier aktiverar fagens metylerade DNA dock nedbrytningsprocesser och fagens DNA degraderas. Genom studier av generna bakom Pgl-systemet upptäcktes ett annat helt nytt försvarssystem mot fager: BREX-systemet. Det tycks finnas en del olika BREX-system men det som man studerat mest ingående, typ-1, tycks fungera genom en hittills okänd mekanism där fagernas DNA inte degraderas utan där fagernas livscykel avstannar. Fagerna förhindras att inkorporera sitt DNA i prokaryotens, att replikera sig och att sprida sig till omgivande prokaryoter. Vid närmare genetiska studier av BREX-systemen kunde man se starka kopplingar till Pgl-systemet och det finns därför argument för att göra BREX till en mer övergripande grupp av försvarssystem som även innefattar Pgl-systemet. Det finns en mängd olika utgångspunkter och taktiker som kan beaktas vid framtida studier av de olika BREX-systemen. Dessa olika forskningsmöjligheter kan alla ge en större inblick i detta nyupptäckta forskningsområde; ett område som uppvisar potential att bidra med värdefull information som kan appliceras även utanför det direkta forskningsområdet.

Inledning

Bakterier och arkéer har utvecklat en mängd olika strategier för att undvika och överleva angrepp av fager, vilket ligger till grund för en stor del av dessa organismers immunförsvar (Houte *et al.* 2016). Fager har en otroligt stor mångfald och spridning och på grund av detta har många prokaryoter behövt utveckla ett flertal olika strategier och mekanismer för att kunna bli resistenta mot fagangreppen. Många fager har i sin tur evolverat så att de kan undvika dessa försvar. Denna samevolution mellan fager, arkéer och bakterier har antagligen pågåtts ända sedan början av dessa organismers existens (Dy *et al.* 2014). Detta har bidragit till att vi nu kan finna en mycket stor mängd olika försvarssystem hos prokaryoter, samt en avsevärd stor variation hos dessa strategier och mekanismers uppbyggnad och funktion (Houte *et al.* 2016).

Mycket runt om dessa försvarssystem har utforskats och vår kunskapsbas om många av dessa system är relativt stor. Likväl blir vår kunskap om systemen mer omfattande genom att nya former och typer av försvarsmekanismer upptäcks (Makarova *et al.* 2013). Kunskapen om dessa mekanismer har bidragit till framtagningen av en mängd olika tekniker med användningsområden inom genetik, bioteknik och molekylärbiologi (Dy *et al.* 2014). I takt med upptäckter av överlevnadsmekanismer och överlevnadstaktiker i prokaryoter utvecklas även dessa tekniker. Exempel på detta är Restriktion-Modifikations system (R-M system),

vars enzym har utnyttjats i flera årtionden inom biotekniken (Dy *et al.* 2014) samt den nyliga upptäckten av CRIPR-Cas systemen, som har lett till utvecklingar inom bland annat sjukdomsbekämpning (Hille & Charpentier 2016).

Fagers uppbyggnad

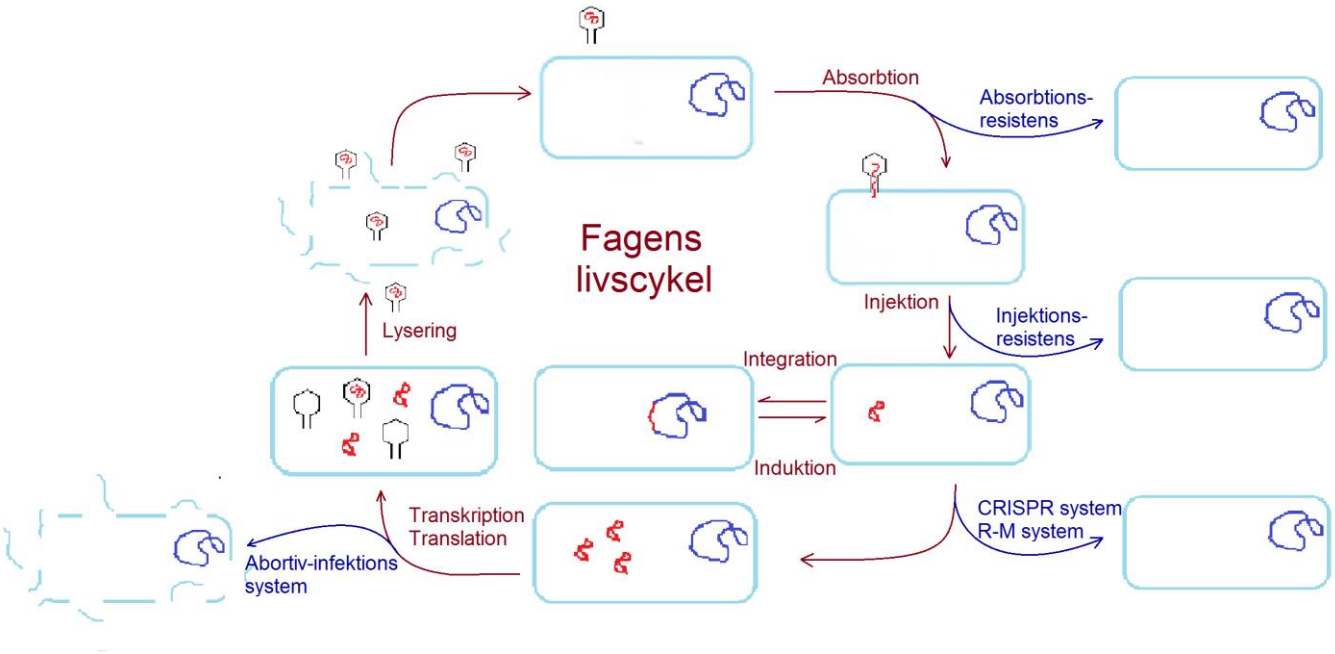
För att kunna förstå försvarssystemens mekanismer är det relevant att ha en viss förståelse för det som systemen försvarar mot: fager. Fager är generellt uppbyggda av ett proteinskal som omsluter genetiskt material, vanligtvis dubbelsträngat DNA, vilket kodar för generna som behövs för att bygga upp nya fager. Fagerna kan dock inte själva replikera sig utan behöver utnyttja andra organismers cellulära processer, såsom transkription och translation, för detta. Majoriteten av alla fager (95%) är uppbyggda på ett väldigt likartat sätt. Dessa fager består av ett ikosaederalt huvud, som omsluter deras genetiska material, och en svans, som är verksam vid infektionen av bakterier och arkéer (Martínez-Borra *et al.* 2012).

Fagers livscykler

Fager kan befinna sig i två olika livscykler. En lytisk, virulent livscykel och en lysogen livscykel då fagerna kan benämnas som inaktiva. Alla fager kan befinna sig i den lytiska livscykel, men bara en del fager kan gå in i den lysogena livscykeln. Då en fag är i lytisk fas befinner sig dess genetiska material i cytoplasman (Figur 1). Med hjälp av prokaryotens egna molekylära mekanismer och processer produceras de partiklar som krävs för att bygga upp nya fager. De nyproducerade fagerna sprider sig sedan till omgivningen genom att lysera cellen (Martínez-Borra *et al.* 2012). De fager som har möjlighet att gå in i en lysogen cykel brukar benämnas som temperata fager. De temperata fagerna har utvecklats till att kunna integrera sitt egna DNA i genomet hos den prokaryot som de infekterar eller till att etablerar sitt genom som en plasmid i värdcellen. Detta stadie är relativt harmlöst för värdcellen, då inga nya fager produceras. Dock har fagen möjlighet att lämna det lysogena stadiet och gå tillbaka till ett virulent, lyserande stadie. Om fagen lyckas etablera sig i värdcellens DNA blir det mycket mer komplicerat för prokaryotens försvarssystem att identifiera fagens DNA (Martínez-Borra *et al.* 2012).

Översikt över bakteriella försvarssystem

Bakteriers olika försvarsmekanismer riktar generellt in sig på olika stadier i fagens infektion och kan i första hand delas upp i två faser (Martínez-Borra *et al.* 2012). Den första fasen är inriktad på att förhindra att fagen tar sig in genom bakteriens cellvägg (Figur 1). Då fagen infekterar bakterien binder den till receptorer och proteiner på bakteriens cellvägg för att sedan injicera sitt DNA in i bakterien. Försvaret mot detta fungerar ofta genom sekretion av peptider eller proteiner som dels kan attackera fagerna eller ge upphov till ett fysiskt skydd mot att fagen får möjlighet att infektera cellen (Martínez-Borra *et al.* 2012). Det är också vanligt att de receptorerna på cellväggen som fagerna binder till muteras eller altereras, och på det sätter förhindrar fagens infektion (Dy *et al.* 2014). Den andra fasen är försvarssystemen som är aktiva då fagen har lyckats infektera bakteriecellen. De största kända grupperna av sådana system kan delas in i tre grupper: R-M system, CRISPR-Cas system och abortiva-infektion system (Figur 1) (Martínez-Borra *et al.* 2012).



Figur 1: Övergripande bild av de generella processerna i fagers livscykler samt de vanligaste försvarsmekanismerna mot dessa. Absorptions- och injektions-resistens hindrar fagen att infektera bakteriecellen. R-M system och CRISPR-Cas system bryter ner fagens genetiska material efter att det har kommit in i cellen. Dessa ovannämnda system leder till att bakterien överlever fagangreppet. Abortiva-infektions system leder till att den infekterade bakteriecellen dör men gör så att inga nya virus kan sprida sig till omgivande bakterier.

R-M systemen upptäcktes först under 1950-talet och är därmed ett av de första upptäckta försvarssystemen mot fager (Luria & Human 1952, Luria 1953, Bertani & Weigle 1953, Martínez-Borra *et al.* 2012). R-M systemens försvar bygger huvudsakligen på att modifiera och klyva fagens DNA efter att cellen blivit infekterad. R-M system består huvudsakligen av två separata enzym med varsin separat aktivitet: Ett restriktionsenzym och ett metyltransferas. Metyltransferaset metylerar bakteriens egna DNA, medan restriktionsenzymet klyver icke-metylerat, främmande DNA (Dy *et al.* 2014).

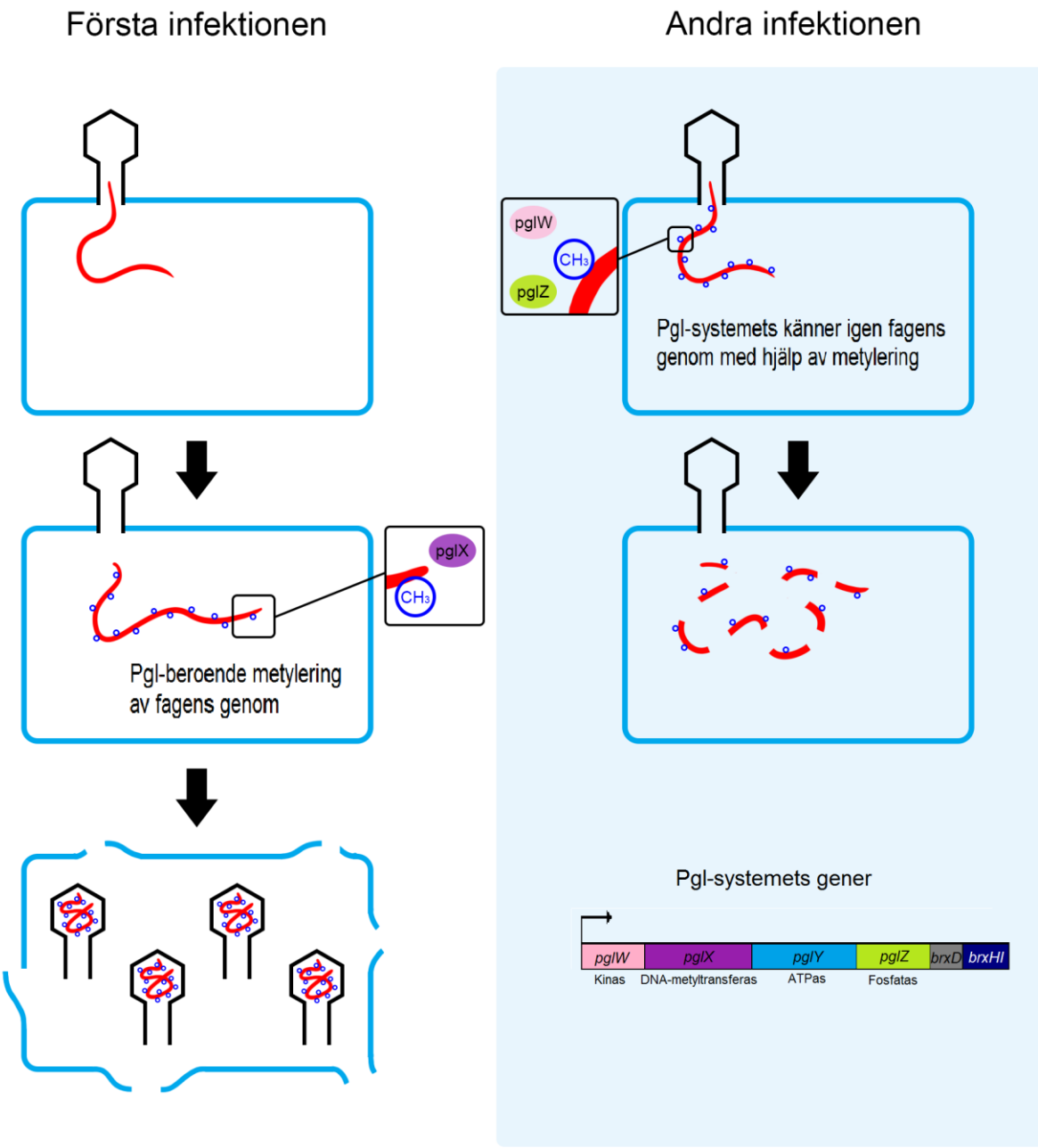
CRISPR-Cas systemen fungerar på ett helt annat sätt. CRISPR är uppbyggda av små repetitiva DNA-sekvenser, så kallade ”spacers”. Mellan dessa ligger icke-repetitiva DNA-sekvenser. Dessa sekvenser kan spåras till sekvenser i fag-genomen som bakterien är resistent mot (Martínez-Borra *et al.* 2012, Hille & Charpentier 2016). CRISPR kantas av gener för Cas-protein. När bakterien blir infekterat av en fag som den är resistent mot, känner Cas-proteiner igen fagens genom med hjälp av de korta, icke repetativa DNA-sekvenserna i CRISPR. Cas-proteinerna klyver sedan fagens DNA (Martínez-Borra *et al.* 2012, Houte *et al.* 2016, Hille & Charpentier 2016).

Abortiva-infektions system fungerar genom att attackera bakteriens egna mekanismer; antingen transkriptionen, translationen eller replikeringen. Aktiveringen av abortiva-infektions system kommer i slutändan att resultera i bakteriens död, men kan ses som en vinst för populationen då fagens spridning till resterande bakterier minimeras. Abortiva-infektions system kan vara verksamma genom en mängd olika mekanismer och många utav dessa mekanismer är fortfarande inte fullständigt beskrivna. De har dock alla gemensamt att aktiveringen av systemen är letal för den individuella bakterien (Martínez-Borra *et al.* 2012, Dy *et al.* 2014).

Förutom dessa system finns det även mindre utforskade system vars mekanismer ännu inte har beskrivits fullständigt (Makarova *et al.* 2011). Det är möjligt att man genom att studera dessa system kan få nya kunskaper som kan driva fram utvecklingen inom områden så som bioteknik och medicin. Denna text kommer huvudsakligen fördjupa sig i två dessa system: ”Phage Growth Limitation-system” eller Pgl-system samt ”Bacterial Exclusion-system” eller BREX-system. Texten kommer att ge en beskrivning av deras grundläggande uppbyggnad och funktion samt försöka diskutera möjliga utvecklingar inom detta forskningsområde.

Pgl-systemets funktion och mekanism

Upptäckten av Pgl-systemet gjordes redan på 1980-talet, och kan således inte beskrivas som ett nyupptäckt system. Dock utforskades dess mekanismer inte djupare utan beskrevs som att system av typen R-M system (Chinenova *et al.* 1982). Pgl-systemet har på senare tid utforskats mer ingående och genom detta har en hel ny typ av försvarssystem upptäckts. Pgl-systemet kan beskrivas som en blandning mellan ett R-M system och ett abortivt-infektions system. När fagens genetiska material först kommer in i cellen märks det ut genom att metyleras (Figur 2). Detta förhindrar dock inte fagen från att replikera sig. Nya fager produceras alltså i bakterien, men med metylerade genom. Tillslut lyserar bakterien och fagerna sprider sig till omgivande bakterier i kolonin. Vid det andra infektionstillfället aktiveras dock en annan del av Pgl-systemet. Den metylerade fagens genom aktiverar Pgl-systemets degraderingskopplade processer och fagens genom bryts ner (Sumby & Smith 2002).



Figur 2: Övergripande bild på Pgl-systemet mekanism. Vid infektion märks fagens genom med metyl-grupper av enzymet pglX. Fagens genom replikeras och nya fager, med metylerade genom, bildas. Bakteriecellen lyseras och fagerna sprider sig till de omgivande bakterierna. Vid det andra infektionstillfället kan fagens genom identifieras med hjälp av metyl-grupperna, och fagens genom degraderas därefter. Figuren visar även en övergripande bild av Pgl-systemets gener och vad dessa gener troligtvis kodar för.

Genetiken bakom Pgl-systemet

Pgl-systemet upptäcktes först i bakterien *Streptomyces coelicolor* A3(2). Detta gjordes genom att man lyckades koppla en gen till försvarsprocesser mot bakteriofagen φC31 (Chinenova *et al.* 1982). Genen döptes till *pglZ* och genom att studera denna gen lyckades man hitta tre närliggande gener som var kopplade till samma försvarssystem. Dessa gener döptes till *pglW*, *pglX* och *pglY* (Figur 2) (Bedford *et al.* 1995, Sumby & Smith 2002). Denna kassett av gener

visade sig vara essentiell för Pgl-systemet funktion och då en plasmid med *pglWXYZ* integrerades i en *Streptomyces*, som tidigare inte hade uppvisat någon motståndskraft gentemot φC31-fagen, uppkom en resistens gentemot fagangreppen. Därav drogs slutsatsen att *pglWXYZ*-kassetten kodade för hela Pgl-systemet (Sumby & Smith 2002). Dessa fyra gener är placerade i genomet som två operon, *pglWX* och *pglYZ* med 6 kbp mellan sig. Transkriberingen av dessa operon är konstant aktiv, även då ingen faginfektion har skett (Bedford *et al.* 1995, Sumby & Smith 2002). Ur dessa studier kan de första ledtrådarna hittas om hur dessa geners protein samverkar med varandra (Hoskisson *et al.* 2015).

För att förstå Pgl-systemets mekanismer krävs dock en viss kunskap om de proteiner som generna kodar för: *pglZ* kodar för ett alkaliskt fosfatas, i fortsättningen benämnt pglZ, vilket är ett enzym som spjälkar fosfatgrupper. *pglX* kodar för ett N^6-adenine bindande DNA metyltransferas (pglX) (Hoskisson *et al.* 2015). Pgl-systemens gener transkriberas, som tidigare nämnts, även i frånvaro av fagangrepp (Bedford *et al.* 1995, Sumby & Smith 2002) och då borde pglXs aktivitet vara skadligt för bakterien. Så är dock inte fallet, förutom i celler med ickefungerande pglZ. Mellan pglX och pglZ tycks det alltså existera någon form av interaktion, där pglZ på något sätt inhiberar pglXs toxiska aktivitet (Hoskisson *et al.* 2015). *pglY* kodar för ett protein (pglY) med ett ATP-hydrolyserande motiv, och är med stor sannolikhet ett ATPas (Hoskisson *et al.* 2015). *pglW* kodar med stor sannolikhet för ett proteinkinas (pglW) och detta protein har ett DNA-bindande helix-turn-helix motiv och ett proteininteragerande helix-loop-helix motiv. Det är möjligt att pglW känner igen en viss DNA-sekvens och signalerar för fosforyleringen av andra Pgl-protein (Sumby & Smith 2002, Hoskisson *et al.* 2015).

Pgl-systemets mekanism

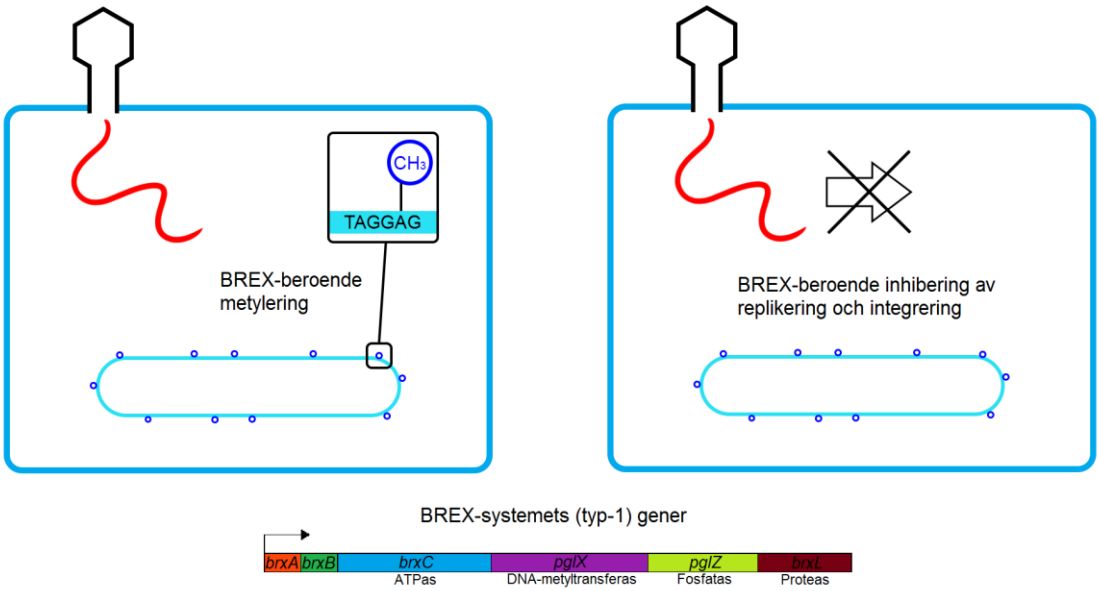
Som ovan beskrivits så förhindrar Pgl-systemet inte lyseringen av den första bakterien som fagerna infekterar. Resistensen manifesterar sig först då resterande bakterier med ett aktivt Pgl-system är kapabla att degradera den andra generationens fager (Sumby & Smith 2002). För att förklara hur detta sker har en modell lagts fram som föreslår att systemet kan befinna sig i tre olika stadier (Hoskisson *et al.* 2015). I det första stadiet, då cellen ännu inte blivit infekterad, blir systemet transkriberat men är vilande. Då interagerar pglZ med pglX så att cellen inte skadas av systemets produkter. Vid infektion aktiveras dock systemet, antagligen av någon form av fagspecifik signal. Systemet går då in i ett modifierande stadie där fagens DNA metyleras av pglX (eventuellt metyleras allt DNA i bakteriecellen, både fagens och bakteriens) (Hoskisson *et al.* 2015). Modifieringen är dock inte dödlig för fagen utan nya fager produceras och cellen lyserar (Figur 2). När dessa modifierade fager infekterar en annan cell med Pgl-systemet så aktiveras systemets restriktions-stadie. Mekanismen bakom denna aktivering är ännu helt känd, men en trolig möjlighet är att pglW har förmågan att identifiera det modifierade fagDNAet och kan sedan, med hjälp av pglZs fosfatasaktivitet, aktiverar restriktionsprocesser i cellen (Figur 2). Eftersom fagens genom är metylerat sedan innan, medan det bakteriella genomet inte är det, bör restriktionsprocesserna lätt kunna särskilja på vilket DNA som ska brytas ner. Detta leder till att fagens DNA degraderas och infektionen förhindras att spridas till resten av kolonin. Det har i denna modell föreslagits att Pgl-systemet inte kan gå över från sitt metylerande stadie till sitt restriktions-stadie, vilket i sin tur skulle förklara varför inte den första infekterade cellen degraderar fagens DNA (Hoskisson *et al.* 2015). En paralog till *pglX* har hittats, kallad *pglS*, som tycks kunna interagera med Pgl-systemet så att det får en annan aktivitet. Vilken funktion systemet har i detta fall har dock inte utforskats vidare (Sumby & Smith 2003). En viktig sak att poängtera är dock att bakteriofagen φC31 är en temperat fag men att Pgl-systemet inte förefaller bidra med något försvar mot att fagens DNA inkorporeras i bakteriens genom.

Pgl-system jämfört med R-M system
Då fager kan muteras är det möjligt att nya egenskaper kan utvecklas hos fagerna. Dessa egenskaper kan göra så att fagerna lyckas undgå R-M systemens metyleringsmekanismer för att särskilja mellan fag och bakteriellt DNA (då bakterien metylerar sitt eget DNA) (Sumby & Smith 2002). Lyckas fagerna undgå R-M systemens igenkänningsmekanismer och bli metylerade kommer inte R-M systemet att degradera fagens DNA. Fagerna kommer då att bli resistenta mot R-M systemen och kan därmed sprida sig fritt i kolonin. En sådan typ av reststens skulle aldrig kunna uppkomma mot Pgl-systemet, då det vid varje ny infektion uppstår en ny möjlighet för att fagens DNA blir modifierat. Då fagens DNA väl har blivit modifierat är det därmed dömt för degradering vid nästa infektionstillfälle (Sumby & Smith 2002).

Vidare studier av Pgl-systemets gener
Ytterligare studier har genomförts på generna som ingår Pgl-systemet. Bland annat har generna existens påvisats i andra genom än *Streptomyces coelicolor* A3(2). Systemet har sökts efter i sin helhet, för att undersöka inom vilka bakteriestammar som detta system är närvarande, men generna har också sökts efter separat (Sumby & Smith 2002, Makarova *et al.* 2011, Goldfarb *et al.* 2015, Hoskisson *et al.* 2015). Då närvaron av enstaka gener från Pgl-systemet i andra bakteriers genom undersöktes har fokus ofta lagts på *pglZ* (Makarova *et al.* 2011). *pglZ* har återfunnits i ett stort antal genom och är ofta positionerad i så kallade genetiska öar: icke-slumpmässigt kluster av gener, på specifika positioner i genomet. Generna i dessa genetiska öar har relativt ofta funnits utgöra olika typer av försvarssystem (Makarova *et al.* 2011). *pglZ* har dock inte alltid återfunnits tillsammans med varken *pglX*, *pglY* eller *pglW*. Dessa gener har emellertid även funnits separat i genetiska öar (Makarova *et al.* 2011). Det finns alltså ett övergripande nätverk av olika system som delar en del av sina gener med Pgl-systemet. Genom att studera *pglZ* och de olika system som dessa genetiska öar innehåller, finns det möjlighet att upptäcka tidigare okända försvarssystem (Makarova *et al.* 2011, Goldfarb *et al.* 2015). Dock så har *pglZ* upptäckts i genetiska öar som inte tycks ha någon opreron-liknande aktivitet (Makarova *et al.* 2011). Två ytterligare gener som möjligtvis kan vara associerade med Pgl-systemet har upptäckts genom genetiska studier. En gen för ett protein som antagligen binder till ATP, här framöver benämnd *brxD* och en gen för ett helikas, i fortsättningen benämnd *brxHI* (Figur 2). Vilka funktioner dessa gener har i Pgl-systemet är ännu inte utrett (Goldfarb *et al.* 2015).

BREX
”Bacterial Exclusion” eller BREX-systemet är ett annat nyupptäckt försvarssystem mot fager, som upptäcktes genom genetiska studier av de genetiska öar som innehåller *pglZ* (Goldfarb *et al.* 2015). *pglZ* tycks vara en relativt vanlig förekommande gen i bakteriella genom och i *pglZ*-innehållande genom tycks det vanligt att *pglZ* är associerat med genetiska öar med fyra till åtta gener i sig. Dessa genetiska öar tycks vara kopplade till olika försvarsmekanismer i de olika bakteriestammarna. Därmed gavs dessa olika system samlingsnamnet BREX-system (Barrangou & Oost 2015, Goldfarb *et al.* 2015). På grund av homologi mellan genetiska öarna som kodar för Pgl-systemet och de som kodar för BREX, tycks dessa kluster på något sätt vara besläktat med varandra. Dock uppkommer deras resistensgivande förmågor genom helt olika mekanismer (Goldfarb *et al.* 2015, Hoskisson *et al.* 2015). Till skillnad från Pgl-systemet så förhindrar BREX-systemet att fagerna går igenom en livscykel då de infekterar cellen. Likt ett R-M system skiljer BREX-systemet mellan det egna och fagens DNA genom att metylera det egna genomet (Figur 3). Dock sätter denna process inte igång några

degraderande processer av fagDNA. Istället så avstannar fagernas reproduktion helt, men fagens genetiska arvsmassa förblir komplett. Mekanismen bakom detta är inte helt utredd men sannolikt är att proteiner som BREX kodar för interagerar med fagens proteiner eller genetiska material och förhindrar dessa att fortgå i fagens reproduktionsprocesser (Goldfarb *et al.* 2015).



Figur 3: Övergripande bild över BREX-systemets mekanism. Vid infektion märks bakteriens genom ut med metyl-grupper på det sista adeninet i sekvensen TAGGAG. Denna metylering används sedan av bakterien för att särskilja det egna genomet från fagens DNA, då BREX-systemet inhiberar fagen att gå vidare i sin livscykel.

Genetiken bakom BREX-systemet

I majoriteten av de undersökta genomen återfinns *pglZ* i en genetisk ö med totalt sex gener (Figur 3). Systemet kopplat till denna genetiska ö har döpts till typ-1 BREX-system. Förutom *pglZ*, som kodar för ett fosfatas, så hittades även genen *pglX*, som kodar för ett metyltransferas. Förutom detta har fyra gener till upptäckts. Dessa gener kodar troligen för:

- Ett proteas, denna gen kommer hädanefter att benämnas som *brxL*.
- Ett RNA-bindande protein vars gensekvens är väldigt lik genen för det RNA-bindande antitermineringskopplade proteinet NusB. Denna gen kommer att benämnas som *brxA*.
- Ett protein med en ATP-hydrolyserande region (*brxC*) som delvis uppvisar homologi med *pglY* från Pgl-systemet.
- En gen vars funktion ännu inte är känd (*brxB*)

(Barrangou & Oost 2015, Goldfarb *et al.* 2015).

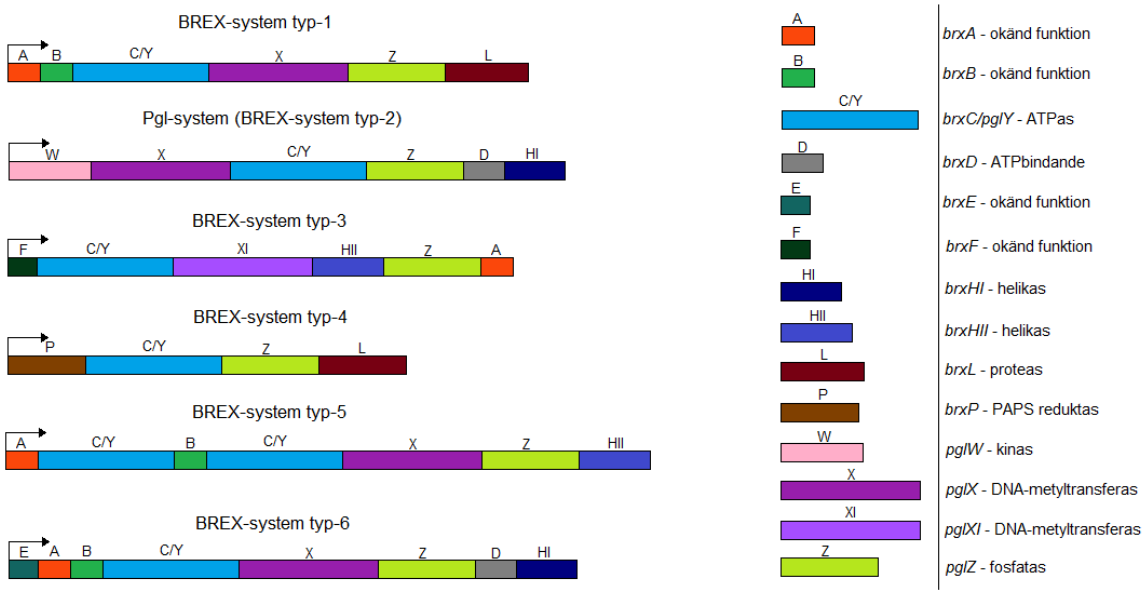
Dessa sex gener transkriberas som två operon: ett med fyra gener (*brxA-brxB-brxC-pglX*) och ett med två gener (*pglZ-brxL*). Den transkriberade enheten med fyra gener innehåller alltså generna för: ett RNA-bindande protein, ett protein med en ATP-hydrolyserande region, ett protein med okänd funktion och ett metyltransferas. Den andra transkriberade enheten innehåller genen för ett proteas och genen för ett alkaliskt fosfatas (Figur 3). Hur dessa olika proteiner är verksamma under ett fagangrepp har ännu inte undersökts (Goldfarb *et al.* 2015).

BREX-systemets funktion
Vad man dock har kunnat konstatera är att BREX-systemet inte är verksamt på samma sätt som Pgl-systemet, trots att de delar ett par gener. BREX-systemet förhindrar fagerna att genomgå en hel generationscykel. Därmed sker ingen produktion av nya fager och någon lysering av celler kan inte heller uppvisas. Pgl-systemet har inte heller visat någon aktivitet som förhindrat fagerna att inkorporera fagDNA i bakteriens genom. Denna fas i fagernas livscykel förefaller dock BREX kunna inhibera. BREX-systemet förefaller inte heller fungera som ett abortivt-infektions system då ingen störning i bakteriekoloniers tillväxt kan uppmätas efter ett fagangrepp (Goldfarb *et al.* 2015, Hoskisson *et al.* 2015). BREX-systemet fungerar dock inte genom att fager förhindras att ta sig igenom bakteriernas cellmembran eftersom fagDNA kan återfinnas inuti celler med BREX-systemet. Detta tyder också på att BREX-systemet inte verkar genom att bryta ner fagens DNA så som R-M system och CRISPR-Cas system. BREX-systemet förefaller alltså fungera genom att störa fagernas livscykel eller replikeringen av fagens genom. Det är troligt att denna påverkan förmedlas genom pglZ och/eller brxL, eftersom båda proteinerna är involverade i aktiviteter som kan modifiera andra proteiner. *pglZ* och *brxL* transkriberas dessutom samtidigt i ett operon (Goldfarb *et al.* 2015). Möjligt är också att *brxA*, det RNA-bindande proteinet som liknar NusB, kan ha någon inverkan på de transkription- och translationsprocesser som fagen använder sig av i bakterien. BREX-systemet har även uppvisat en viss tendens att förhindra replikeringen av främmande DNA i form av plasmider, men detta försvar är inte alls aktivt i samma utsträckning som det mot fager (Goldfarb *et al.* 2015).

Då BREX-systemet är aktivt metyleras det bakteriella DNAt. Detta sker genom att pglX metylerar det andra adeninet i TAGG**A**G-sekvenser i det bakteriella genomet. Förekomsten av denna bakteriespecifika metylering tyder på att BREX-systemet fungerar genom någon typ av mekanism liknande den i R-M system. Då bör metyleringen av TAGGAG-sekvenserna hjälpa bakterien att skilja på bakteriellt- och fag-DNA (Goldfarb *et al.* 2015). Men samma sekvens i fagens DNA metyleras aldrig under infektion och därav kan man dra slutsatsen att bakteriens mekanism till att skilja på bakteriellt DNA och fagDNA inte är fullständigt sekvensbaserad. Detta antyder att det finns ytterligare någon form av mekanism som skiljer mellan bakteriellt och icke-bakteriellt DNA. I denna särskiljning bör pglX vara involverad, då den är metylerande proteinet i BREX-systemet (Goldfarb *et al.* 2015) men troligt är dock att ett annat protein i BREX-systemet även är medverkande i denna särskiljningsmekanism. Experiment har genomförts där man inkorporerade ett BREX-system utan pglX-genen i en stam av *B. subtilis*, utan någon form av BREX-system. I samma experiment inkorporerades även ett fullständigt BREX-system i samma stam (Goldfarb *et al.* 2015). Detta verkade inte påverka bakteriernas eget genom men bakterier med detta muterade system uppvisade ingen märkbar resistens mot fagangrepp, vilket de med ett fullständigt system gjorde. Därav kan slutsatsen dras att pglX är en essentiell gen för BREX-systemets funktion.

Studier av andra typer av BREX-system
Som nämnts tidigare är genklustret som innehåller typ-1 BREX-systemet det som påträffats i flest bakteriella genom, men det är långt ifrån den enda genetiska ön som innehåller *pglZ*. Även Pgl-systemet har en liknande genetisk uppbyggnad (Sumby & Smith 2002), men förutom detta så har även fyra till grupper av *pglZ*-innehållande genkluster hittats och grupperats (Makarova *et al.* 2011, Goldfarb *et al.* 2015). Dessa fyra ytterligare grupper är väldigt lika typ-1 BREX-systemet och Pgl-systemet i sin uppbyggnad och delar många gener med dessa (Figur 4) (Goldfarb *et al.* 2015). Trots att dessa systems funktioner ännu inte har undersökts i någon större utsträckning är det troligt att även dessa genetiska öar utgörs av generna för försvarssystem mot fager (Makarova *et al.* 2011, Goldfarb *et al.* 2015). Detta har

bidragit till att en modell har tagits fram där genkluster som innehåller pglZ har delats in i 6 undergrupper (däribland inräknad Pgl-systemet) av system som tycks vara relativt genetiskt konserverade. Var och en av dessa BREX-typer innehåller mellan fyra till åtta gener (Figur 4). Denna indelning grundar sig i systemens sekvenslikhet och inte deras funktion. Detta beror på att då större delen av dessa systems mekanismer inte är utforskade är det svårt att dra slutsatser om hur mycket typ-1 BREX-systemet och Pgl-systemet mekanismer skiljer sig från varandra.



Figur 4: Strukturerna av de olika BREX-systemen (därmed inräknad Pgl-systemet). Bilden visar de hitintills upptäckta generna i de olika BREX-systemen, deras position och deras enzymatiska aktivitet.

De olika BREX-systemen: en jämförelse

Genom att jämföra systemens genetiska uppbyggnad kan man dock spekulera kring hur dessa olika systemens försvarsmekanismer är uppbyggda, beroende på hur mycket de liknar varandra. Genom denna jämförelse kan man se att typ-1 och typ-3 är relativt lika i avseende på genuppsättning (Figur 4). Båda innehåller gener för ATPaser (*pglY*), fosfatas (*pglZ*) och adeninspecifika metylaser (*pglX*/*pglXI*) (Goldfarb *et al.* 2015). Även placeringen av dessa gener i genklustret är avsevärt överensstämmande. BREX typ-3 innehåller dock inte en gen för ett proteas (ett enzym som bryter ner bindningarna mellan aminosyror i proteiner) som typ-1 gör (*brxL*). Istället innehåller den en gen (*brxHII*) för ett helikas (ett enzym som separerar två strängar av DNA eller RNA). Typ-3 systemet innehåller dessutom två gener med okänd funktion, *brxB* och *brxF* (Goldfarb *et al.* 2015). Typ-5 BREX-system är likt både typ-1 och typ-3 i sin genetiska uppbyggnad (Figur 4), då typ-5 innehåller nästintill samma gener som typ-1, men saknar genen för ett proteas (*brxL*). Istället har typ-5 precis som typ-3 en gen för ett helikas (*brxHII*) (Goldfarb *et al.* 2015). Det är därför troligt att typ-1, typ-3 och typ-5 systemen är verksamma på ett liknande sätt: Bakteriellt och ickebakteriellt DNA skiljs åt genom metylering av pglX och pglXI och sedan påverkas fagens livscykelkopplade processer på ett sätt som gör att fagens replikering avstannar. Det är däremot troligt att systemen påverkar olika faser eller processer hos fagerna, då deras genetiska sammansättning dock skiljer sig en del. Vilka processer dessa system påverkar återstår att se vid framtida studier av dessa genkluster.

BREX-systemet typ-6 är relativt likt både typ-1 och typ-2 (Pgl-systemet) (Goldfarb *et al.* 2015). Eftersom BREX typ-1 och Pgl-systemet dock skiljer sig väldigt mycket åt är det svårt att dra några egentliga slutsatser om vad BREX-systemet typ-6 kan ha för funktion. Om hypotesen att pglW, tillsammans med pglZ, aktiverar de degraderande processerna i cellen vid en faginfektion är korrekt (Hoskisson *et al.* 2015), kan man tänka sig att detta inte kommer ske via ett BREX-system typ-6. Detta på grund av att *pglW* inte verkar existera i typ-6 systemet, då det inte är närvarande i genklustret. BREX-systemet typ-4 saknar helt genen för det DNA-metylerande proteinet som alla de andra BREX-systemen uppvisar (*pglX*/*pglXI*) (Figur 4). Istället har typ-4 en gen för ett fosforadenylyl-sulfat-reduktas (Goldfarb *et al.* 2015). Detta enzym har dock nyligen upptäckts i ett annat försvarssystem mot fager där bakteriellt DNA skiljs från ickebakteriellt DNA genom att bakteriens DNA märks ut med svavelföreningar istället för metylering (You *et al.* 2007, Wang *et al.* 2007, Wang *et al.* 2011). Därför kan man resonera att BREX typ-4 systemet kan ha en liknande funktion som BREX typ-1 men att det icke bakteriella DNAt möjligtvis skiljs från det bakteriella med hjälp av svavelinnehållande föreningar och inte med hjälp av metylering.

Diskussion

De nyupptäckta försvarssystemen är i fråga om genetisk uppbyggnad relativt lika, men ändå har typ-1 BREX-systemet och Pgl-systemet uppvisat helt olika mekanismer. Man kan fråga sig om det verkligen är rimligt att dela in försvarssystemen efter deras genetiska komposition. Då man ännu inte undersökt mekanismen bakom alla de föreslagna BREX-systemen så kan detta vara det enda indelningsupplägget som vi just nu kan ta till bruk. Viktigt är dock att inse att den genetiska likheten mellan BREX-systemen inte överhuvudtaget korrelerar med den genetiska likheten mellan genomen som BREX-systemen finns i. De genetiska öarna som BREX finns i tycks ofta gå igenom horisontell genöverföring och finns spridda över en mängd olika bakteriestammar (Goldfarb *et al.* 2015). Även om det finns en möjlighet att systemens mekanismer skiljer sig åt, är det ändå troligt att deras funktioner är relativt lika varandra. Detta på grund av deras lika genetiska komposition (Goldfarb *et al.* 2015). Även andra försvarssystem fungerar genom helt olika mekanismer, men har samma slutresultat och har därigenom delats in under samma namn, till exempel abortiva-infektions system. Därför är den ovan beskrivna indelningen av dessa system inte helt ologisk och kan vara passade att använda tills en djupare förståelse av dessa systems mekanismer har uppnåtts.

Möjliga utgångspunkter för framtida forskning

För att få en djupare förståelse för dessa mekanismer krävs fortsatt forskning inom detta område. Den mest logiska metoden för att få detta är att undersöka systemen med utökade och övergripande biokemiska, genetiska och strukturella studier (Goldfarb *et al.* 2015). Dessa studier skulle säkerligen vara mycket givande, men även tidskrävande och antagligen även ganska resurskrävande. Detta är dock inte de enda möjliga utgångspunkterna för att fortsätta studera dessa system.

En möjlig utgångspunkt för framtida forskning är att fortsätta genomföra genetiska studier av prokaryota genom och jämföra de system man hittar med varandra. Eftersom de gener man hittills funnit har hittats klustrade i genetiska öar, och eftersom det är troligt att återfinna försvarssystem i just sådana genetiska öar (Makarova *et al.* 2011), bör fokus under framtida genetiska studier ligga på dessa genetiska öar. Man bör av samma skäl inte heller lägga stor fokus på släktskapen hos de organismer man letar efter dessa system hos. Detta då genetiska öar ofta genomgår horisontell genöverföring (Goldfarb *et al.* 2015). Enligt de senaste

forskningsrapporterna, där data om BREX-systemen är tagen ifrån, har relativt få archéiska genom undersökts (Makarova *et al.* 2011, Goldfarb *et al.* 2015). Det vore intressant att i framtida studier även lägga fokus på archéer och deras genom, då många bakteriella försvarssystem även återfinns hos archéer (Makarova *et al.* 2013). Då CRISPR-Cas systemet tycks vara ett relativt viktigt prokaryot försvarssystem som ger ett potent skydd mot många fager (Hille & Charpentier 2016) kan det tyckas udda att en stor mängd bakteriers genom inte innehåller ett CRISPR-Cas system. Många av dessa stammar tycks dock innehålla ett antal R-M system för att väga upp för denna avsaknad (Burstein *et al.* 2016). Det skulle vara intressant att i högre grad undersöka vilka andra försvarssystem som dessa stammar har för att väga uppför bristan av ett CRISPR-Cas system, och undersöka om deras genom möjligtvis innehåller någon form av BREX-system.

Att undersöka de olika systemen i relation till de fager de eventuellt ger resistens mot kan även ge oss ledtrådar om hur dessa system fungerar. Genom sekvensering av fagernas genom och studier av vilka mekanismer som fagerna använder sig av i sin livscykel, kan värdefull information införskaffas. Denna information kan sedan jämföras med likande information från fager som systemen inte ger resistens mot. Eventuella skillnader i hur systemen oskadliggör fagerna och var i fagernas livscykel som dessa system är aktiva kan vara till hjälp för framtida förståelse inom ämnet.

Vissa av de undersökta fagerna uppvisar resistens gentemot BREX, vilket tyder på att det har evolverat fram försvar mot BREX-systemens mekanismer hos vissa fager. Hos vissa fager tycktes detta försvar vara fullständigt, medan hos andra fager gav det ett avsevärt, men inte fullständigt försvar. (Goldfarb *et al.* 2015). Detta har observerats hos andra försvarssystem mot fager (Bondy-Denomy *et al.* 2013), och är nästan förväntat då detta skulle vara en logisk konsekvens av samevolution mellan fager och mikrober (Stern & Sorek 2011). Genom att undersöka vad som skiljer dessa resistenta fager gentemot icke-resistenta fager kan ledtrådar fås om vilka processer som BREX-systemen attackerar, och hur de attackerar dess processer.

Möjliga användningsområden för denna kunskap

Då vår kunskap om BREX-systemen till största del är bristande i nuläget, är det svårt att dra några slutsatser rörande vilka användningsområden denna kunskap kommer att ge gagn i. Dock har en del viktiga upptäckter gjorts som kan vara värda att resonera kring. BREX sprid till betydande del med hjälp av horisontell genöverföring, över en mängd olika bakteriella- och arkéstammar (Goldfarb *et al.* 2015). Detta tyder på att systemen fungerar i isolerade, tydligt avgränsade och autonoma genkassetter som kan integreras i en mängd olika genomiska komplex. BREX-system Typ-4 har dessutom visats kunna överföras och inkorporeras i en stam tidigare utan detta system, från en annan art av samma släkte (Goldfarb *et al.* 2015). Det inkorporerade BREX-systemet gav då ett aktivt försvar mot samma fager som i den art som systemet togs från. Dessa resultat tyder på att det med stor sannolikhet överförs olika BREX-system mellan olika släkten och stammar, vilket också betyder att det överförs resistens mot fager. Möjligheten att öka en bakteriestams resistenskraft gentemot vissa fager skulle kunna vara en användbar möjlighet inom områden där det är av vikt att behålla en icke infekterad grundkultur av bakterier. Ett exempel på ett sådant område kan finnas inom matproduktionen. Faginfektioner hos bakteriefamiljen Lactobacillaceae skapar ofta stora problem inom produktionen av mjölkprodukter (Allison & Klaenhammer 1998). Om någon utav BREX-systemen vid framtida studier visar sig ge ett effektivt skydd mot fager som attackerar Lactobacillaceae kan kunskapen om detta system vara till stor användning.

En möjlig användning av BREX-systemen inom forskningen är som en selektionsmarkör. Om

ett BREX-system kopplas till en annan gen och sedan inkorporeras i ett genom bör man kunna selektera fram de bakterier som tagit upp generna. Detta genom att sedan behandla bakterierna med en fag som BREX-systemet är verksam mot (och som bakteriestammen saknar ett annat typ av försvar mot). De bakteriekolonier som överlever fagbehandlingen borde vara de som lyckats ta upp BREX-systemet och därmed också den gen som kopplades till detta system. Likande selekteringsmetoder används redan inom mikrobiell forskning men då används ofta till exempel antibiotikaresistens eller metabolisk kolkälla som selektionsmarkör.

BREX-system typ-1 degraderar inte fagens DNA utan förhindrar fagen att fullfölja sin livscykel genom någon annan mekanism (Goldfarb *et al.* 2015). Studier av denna typ av försvarstaktik kan komma att öka vår förståelse för olika fagers livscykler. Vid vidare studier av denna typ av avbrytning av processer, kan möjligheter uppkomma till att manipulera vilka och hur dessa processer avstannar. Om detta skulle vara möjligt kanske detta försvarssystem kan manipuleras så att dess resistens antingen breddas eller minskas. Ett anpassningsbart försvarssystem mot fager skulle kunna komma att bli ett mycket användningsbart verktyg inom biotekniken. Som tidigare nämnt så är vår kunskap om dessa system dock alldeles för begränsad för att kunna dra några säkra förutsägelser om hur kunskapen om dessa system kommer att kunna påverka framtida forskning. Likväl har området potential att bidra med värdefull information som kan vara till användning även utanför det direkta forskningsområdet.

Tack

Jag vill tacka Magnus Eklund för den hjälp han bidragit med under arbetet med denna uppsats. Jag vill även tacka Karin Vickberg och Ida Isolehto för konstruktiv kritik, återkoppling och allmänna råd. Jag vill även tacka Freja Sörenby och Björn Greijer för råd och hjälp. Speciellt tack ska ges till Marcel Markov för hjälp med utformning av bilderna i denna text.

Referenser

Allison GE, Klaenhammer TR. 1998. Phage Resistance Mechanisms in Lactic Acid Bacteria. International Dairy Journal **8**: 207–226.

Barrangou R, Oost J van der. 2015. Bacteriophage exclusion, a new defense system. The EMBO Journal **34**: 134–135.

Bedford DJ, Laity C, Buttner MJ. 1995. Two genes involved in the phase-variable phi C31 resistance mechanism of Streptomyces coelicolor A3(2). Journal of Bacteriology **177**: 4681–4689.

Bertani G, Weigle JJ. 1953. Host Controlled Variation in Bacterial Viruses. Journal of Bacteriology **65**: 113–121.

Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature **493**: 429–432.

Burstein D, Sun CL, Brown CT, Sharon I, Anantharaman K, Probst AJ, Thomas BC, Banfield JF. 2016. Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. Nature Communications **7**: 10613.

Dy RL, Richter C, Salmond GPC, Fineran PC. 2014. Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. Annual Review of Virology **1**: 307–331.

Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, Cohen O, Doron S, Charpak-Amikam Y, Afik S, Ofir G,

Sorek R. 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. The EMBO Journal **34**: 169–183.
Hille F, Charpentier E. 2016. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. Phil Trans R Soc B **371**: 20150496.
Hoskisson PA, Sumby P, Smith MCM. 2015. The phage growth limitation system in Streptomyces coelicolor A(3)2 is a toxin/antitoxin system, comprising enzymes with DNA methyltransferase, protein kinase and ATPase activity. Virology **477**: 100–109.
Houte S van, Buckling A, Westra ER. 2016. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews **80**: 745–763.
Luria SE. 1953. Host-Induced Modifications of Viruses. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **18**: 237–244.
Luria SE, Human ML. 1952. A Nonhereditary, Host-Induced Variation of Bacterial Viruses. Journal of Bacteriology **64**: 557–569.
Makarova KS, Wolf YI, Snir S, Koonin EV. 2011. Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems. Journal of Bacteriology **193**: 6039–6056.
Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2013. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. Nucleic acids research **41**: 4360, 4360–4377.
Martínez-Borra J, González S, López-Larrea C. 2012. The Origin of the Bacterial Immune Response. I: López-Larrea C (red.). Self and Nonself, s. 1–13. Springer US,
Stern A, Sorek R. 2011. The phage-host arms race: Shaping the evolution of microbes. BioEssays **33**: 43–51.
Sumby P, Smith MCM. 2002. Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of Streptomyces coelicolor A3(2). Molecular Microbiology 44: 489–500.
Sumby P, Smith MCM. 2003. Phase Variation in the Phage Growth Limitation System of Streptomyces coelicolor A3(2). Journal of Bacteriology **185**: 4558–4563.
Wang L, Chen S, Vergin KL, Giovannoni SJ, Chan SW, DeMott MS, Taghizadeh K, Cordero OX, Cutler M, Timberlake S, Alm EJ, Polz MF, Pinhassi J, Deng Z, Dedon PC. 2011. DNA phosphorothioation is widespread and quantized in bacterial genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences **108**: 2963–2968.
Wang L, Chen S, Xu T, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou X, You D, Deng Z, Dedon PC. 2007. Phosphorothioation of DNA in bacteria by dnd genes. Nature Chemical Biology **3**: 709–710.
You D, Wang L, Yao F, Zhou X, Deng Z. 2007. A Novel DNA Modification by Sulfur: DndA Is a NifS-like Cysteine Desulfurase Capable of Assembling DndC as an Iron−Sulfur Cluster Protein in Streptomyces lividans. Biochemistry **46**: 6126–6133.
Chinenova TA, Mkrtumian NM, Lomovskaia ND. 1982. Genetic characteristics of a new phage resistance trait in Streptomyces coelicolor A3(2). Genetika **18**:1945–52

[Nyupptäckta försvarssystem mot fager – mekanismer, funktioner och möjliga utvecklingar]

Mårten Ljungberg
Självständigt arbete i biologi 2015

Etikbilaga

När det kommer till genetiska analyser och experiment finns det en mängd olika aspekter att diskutera. I den här texten kommer jag att fokusera på frågan om man borde lägga resurser på ett så relativt outforskat område inom forskningen om försvarsmekanismen.

Områdets relevans

Försvarssystemen mot fager hos bakterier och arkéer har utforskats ganska djupgående och många upptäckter har gjorts som har lett till stora forskningsframsteg. Ett exempel är CRISPR-Cas som har bidragit och fortsätter att bidra med nya utvecklingar inom biotekniken sen dess att systemet upptäcktes. När det finns sådana lovande forskningsområden, kan man ställa sig frågan varför vi då ska lägga resurser på att famna i blindo kring system som kanske bara visar sig fungera på liknande sätt som vi utforskat förut? För att bemöta detta argument mot en fortsatt forskning kan det poängteras att det inte finns någon som vet vilka forskningsområden som kommer leda till vilka utvecklingar. För att kunnat upptäcka och utveckla nya tekniker måste man ibland lägga lite energi på att utveckla grundkunskaperna och lägga grunden för fortsatta studier.

Forskningen om försvarssystem mot fager har tidigare lett till viktiga upptäckter och utvecklingar. På grund av det är det kan man tycka att det är rimligt att lägga resurser inom området, då liknande forskning har visat sig led till utvecklingar utanför det egna forskningsområdet. Det som motsätter detta argument är att vi har en större inblick i exempelvis CRISPR-Cas systemet och möjligheterna som detta kan leda till. Dessa möjligheter är mer lovande än något som vi hittills sett inom Pgl och BREX. Vi kan inte förutsätta att utvecklingarna kommer att dyka upp bara för att det gjorde vid studier av andra system.
Detta är långt ifrån den kostsammaste av forskning och en lovande möjlighet till ökad förståelse som kan appliceras på mer än bara detta forskningsområdet är mer än tillräckligt skäl till att försöka utöka vår kunskap inom detta område. Dock är den mest direkta utgångspunkten för denna forskning övergripande biokemiska, genetiska och strukturella studier. Dessa studier är dock några av de mest kostsamma alternativen och därav föreslår jag att andra typer av forskningsmetoder och utgångspunkter bör övervägas.

Forskningsetik

Jag tycker mig ha använt mig av tillförlitliga källor. Jag har till större delen använt mig av forskningsartiklar, vilka jag har läst igenom noggrant och kollat upp författarna och tidskriften som den publicerades i. Jag har förutom primärarticklar använt mig av reviewartiklar och en källa från ett större litterärt verk. När jag använt mig av dessa källor har jag ofta dessutom använt mig av ett flertal källor för samma information för att säkerställa att informationen var korrekt. En utav mina referensartiklar har jag dock inte läst, då jag tyvärr inte kunde få tag på denna artikel utan att betala en större summa pengar samt då denna artikel är skriven på ryska skulle jag ändå inte kunna läsa denna. Jag var dock tvungen att referera till denna artikel då den innehöll en stor del av originaldata om ett av de huvudsakliga ämnena som jag skrev om. Jag fick därför förlita mig om att de slutsatser som drogs i

artiklarna som refererade till denna ryska artikel var korrekta. Jag har försökt att ange källor överallt där åsikterna, slutsatserna och argumenten som nämns inte är mina egna.