

Bakteriers och arkéers unika immunsystem

- kan det hjälpa oss i vår hantering av dessa organismer?

Annica Löfling

Exekutiv sammanfattning av Självständigt arbete i biologi 2010

Inledning

I en mikrobiell miljö dominerar virus. De är störst i antal och på sätt och vis också starkast. Evolutionen av mikroorganismer i en miljö styrs av deras konkurrens sinsemellan, och framförallt är det virus som bestämmer detta. Virus styr överlevnadsförmågan hos sina värdar. Finner någon en ny väg runt konkurrensen, finner ytterligare en annan organism en väg runt det och så vidare. Det betyder alltså att bakterier och arkéer utvecklar system för att undkomma det stora hot som virus utgör, för att överleva. Samtidigt som denna utveckling sker, sker en utveckling och förändring hos viruset som gör att det kan fortsätta angripa sina värdar oberoende åt vilket håll deras evolution styrs. Virus och plasmider har ett annat stort övertag vad gäller att erövra sina värdar. Genetisk överföring är ett snabbt och smidigt sätt för virus eller plasmider att styra sina värdar som i sin tur inte har mycket att säga till om. Genetisk överföring är väldigt vanligt och det leder till en snabb evolutionär utveckling i ett mikrobiellt samhälle.

För oss människor är det kanske just den genetiska överföringen som skrämmer oss. Den är snabb, enkel och oerhört effektiv. Möjligheten att sprida gener på detta sätt skapar stora problem för oss. Spridning av antibiotikaresistans är ett av de värre exemplen vi har idag. Spridning av MRSA och VRSA (methicillin- och vancomycin-resistans) på sjukhus runt om i världen ger stora komplikationer för både patient och sjukvårdspersonalen.

Nyligen upptäcktes ett immunsystem i bakterier och arkéer som kan hindra både transduktion och konjugering, två viktiga vägar för genetisk överföring. Forskning pågår ännu då man inte vet särskilt mycket om den molekylära mekanismen, men man har förstått principen för hur det fungerar och hoppas stort på att kunna utnyttja detta system för att motverka HGT. Genom små manipulationer av systemet skulle man kunna motverka spridning av antibiotikaresistans, men framförallt skulle man kunna förbättra viktiga bakterier som vi använder oss av genom att göra dem immuna mot virus och plasmider.

Uppbyggnad och viktiga komponenter

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats, är namnet på ett immunsystem som upptäckts i bakterier. Det var av en slump som CRISPR upptäcktes 1987 när en grupp forskare gjorde försök med den vanliga tarmbakterien *Escherichia coli* och fann detta underliga område i dess DNA. En klunga med repeterade palindromiska sekvenser, åtskilda av sekvenser som var helt olika varandra. Inte förrän 2007 hade så mycket forskning lagts på CRISPR att man kunde förklara dess funktion. CRISPR består som sagt utav ett visst antal upprepade sekvenser åtskilda av bitar med unik sekvens med variationer från ett par stycken upp till hundratal, med ett medel på 66 stycken. Storleken på sekvenserna varierar runt 30 nukleotider. De repeterade sekvenserna skiljs åt av andra sekvenser som inte liknar varandra, de har nämligen sitt ursprung från olika virus och plasmider. När man upptäckte detta insåg man vikten av detta system och hur intressant det var. Förutom dessa sekvenser består systemet utav en ledarsekvens. Uppströms om klustret av repeterade sekvenser finner man den oftast, och dess huvudsakliga funktion är inte helt klar men den har en promotorliknande funktion och är nödvändig för att hela systemet skall fungera. Nedströms om klustret finner man ett antal *cas*-gener (CRISPR associerade gener). Dessa varierar mycket mellan olika arter och samma sak gäller här, deras funktion är lite oklar i vissa fall. Även

om *cas*-proteinerna varierar så återfinns något protein hos varje organism som har liknande funktion, dock är det kanske inte samma proteiner hos båda organismerna. Några utav *cas*-proteinerna verkar vara vanligare än andra då de återfinns i flera CRISPR-system. Förutom *cas*-proteinerna finns andra komponenter som kallas RAMP (Repeat-associated mysterious proteins). De bildar ofta stabila komplex med andra proteiner och har även de en betydande funktion för CRISPR-systemet.

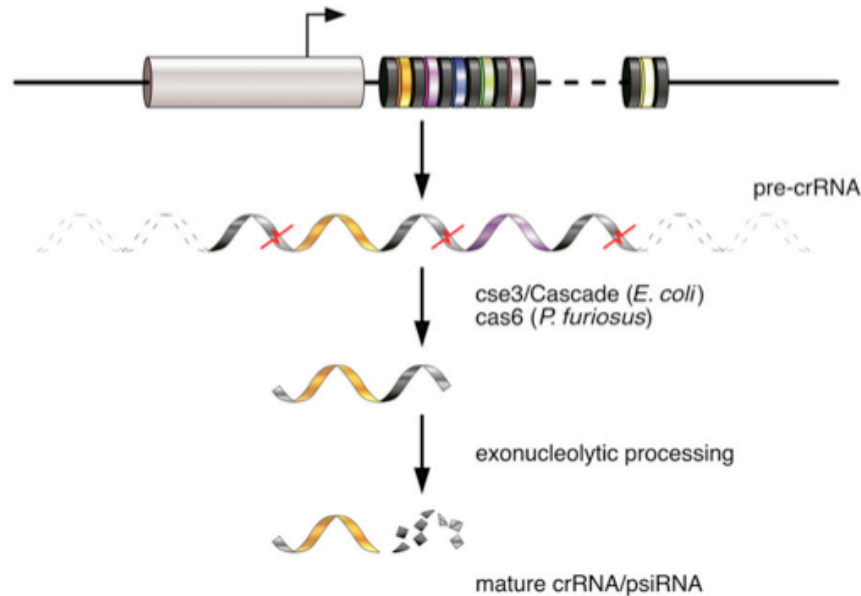
De repeterande sekvenserna är palindromiska, vilket innebär att de läses lika från båda hållen. Detta ger också en antydning om att de kan forma sekundära strukturer, vilket de också gör i ett visst stadium under CRISPRs ingripande. Det är dessa komponenter som ligger till grund för bakteriers och arkéers immunsystem. Tillsammans bildar de ett system som är effektivt och noggrant, kanske med oanade möjligheter.

Mekanism och biologisk funktion

Det mest häpnadsväckande med CRISPR var att det innehöll främmande DNA, DNA från andra organismer. Det innebär att CRISPR är väldigt specifikt och hållbart. Det inkorporerade DNAt placeras mellan de repeterade sekvenserna och behålls där så länge det är aktuellt. Det finns inte obegränsat med plats i dessa kluster, systemet har utvecklat ett sätt att sälla bort de sekvenser som inte längre är aktuella, de som de inte har behövt använda på länge, och på så sätt ge utrymme för nya sekvenser som ger försvar mot de virus eller plasmider som lever i samma miljö som bakterierna just nu.

Mekanismen kan delas upp i tre delar; inkorporeringen utav DNA, användning av sekvenserna och förberedelse för ingripande samt själva ingripandet och förhindrande av en infektion. Inkorporering av DNA sker vid ett angripande av ett virus eller plasmid, CRISPR klyver med hjälp av några *cas*-proteiner den inkommande DNA vid en specifik sekvens och placerar därefter denna emellan de repeterade sekvenserna. Vid en senare infektion kan CRISPR känna igen ett inkommande DNA och hindra en infektion. Hela repeats-spacer regionen (spacer är det inkorporerade DNAt) transkriberas och denna pre-crRNA klyvs därefter i mindre crRNA (CRISPR RNA) som har till uppgift att guida de inblandade proteinerna till rätt ställe att anfälla (Figur 1). Den lilla crRNA sekvensen väljer inte ett slumpmässigt ställe på den inkommande DNAt, utan valet är mycket precist. Med hjälp av korta sekvenser känner crRNA igen sekvensen som är identisk med en spacer. När sekvensen är igenkänd och utpekad kan *cas*-proteiner ingripa och blockera en fortsatt infektion.

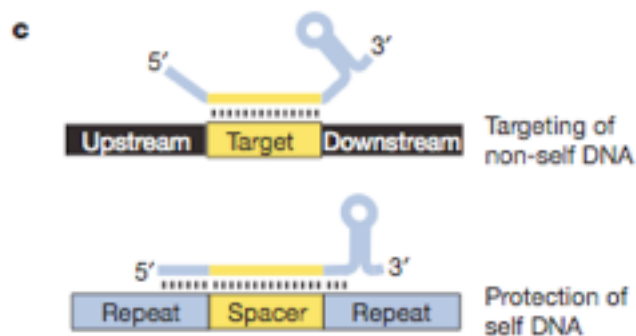
Att det är DNA som är måltavlan är man väldigt säker på, flera undersökningar har visat detta och det stämmer med den kunskap man har om hur CRISPR fungerar. Det finns dock undantag, *Pyrococcus furiosus* har visat sig ha RNA som måltavla.



Figur 1. Bearbetning av crRNA. Hela CRISPR regionen transkriberas och klyvs sedan i mindre crRNA. Den grå biten är ledarsekvensen, de svarta är repeats (upprepade sekvenser) och de färgglada är spacers (inkorporerat DNA). Rättigheter från Hannon & Kurginov 2010.

Autoimmunitet

Att inte angripa sig själv är en förutsättning för att systemet skall fungera säkert. CRISPR har ett ganska säkert sätt att undvika att angripa sitt eget DNA. När de små crRNA klyvs inkluderas förutom spacern också en liten del av repeaten på sekvensen. När crRNA skall matcha mot ett inkommande DNA kommer bara den del som är identisk med angriparens DNA att binda. Gäller det ett främmande DNA kommer alltså bara den del som består av en spacer att matcha den andra sekvensen. Skulle det vara eget DNA kommer repeaten också att binda och systemet kommer inte att fortskrida eftersom det inte är ett främmande DNA (Figur 2).



Figur 2. CRISPR undviker att angripa eget DNA genom att låta en del av repeaterna finnas med på crRNA och om denna matchar kommer försvaret att avbrytas.

Framtiden

Idag utnyttjar man CRISPR hos *Staphylococcus Thermophilus* inom mejeriindustrin. Då kan man smidigt undvika problem vid framställningen av framförallt ost och mjölk. Det man hoppas på är att

kunna utnyttja att CRISPR kan minska HGT inom sjukvården men också inom fler områden i industrin bland annat. Det som krävs innan detta kan bli verklighet är att forskare kommer underfund med exakt hur systemet fungerar, vilka proteiner som är involverade och vad deras uppgift är. Det skiljer sig en del mellan olika organismer, så vissa bakterier eller arkéer kan vara mer eller mindre intressanta att studera fullt ut i första hand. Förutom detta finns tankar om andra applikationer. Alla de *cas*-proteiner man funnit skulle mycket väl kunna utnyttjas i andra syften eftersom de har visat sig vara RNA-bindande proteiner, endo- och exonukleaser, helikaser och polymeraser.

Förhoppningsvis tar inte forskningen alltför lång tid innan man kan komma att applicera detta i ett syfte att förbättra vår relation till mikrober.

Mer information

Löfling A. 2010. Immunsystem hos bakterier och arkéer. Kandidatuppsats 15 hp. Uppsala universitet.

Marraffini A, Sontheimer Erik J. 2008. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science* **322**: 1843-1845.