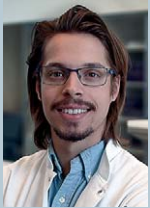


BAKTERIERNES USYNLIGHEDSKAPPE SKAL TRÆVLES OP

En ny forskningsgruppe ved Mikrobiologi på Syddansk Universitet har sat sig for at undersøge genetikken bag bakterien *Streptococcus pneumoniae*s kapsel - den bakterielle usynlighedskappe. Finder vi ud af, hvordan den reguleres, er der potentiale for nye behandlingsmetoder.

Forfatterne



Patrick Rosendahl Andreassen er ph.d-studerende i mikrobiologi ved Syddansk Universitet. Patrick modtog i 2016 et scholarstipendium fra Novo Nordisk og Novozymes til sit specialeprojekt. Artiklen er baseret på et foredrag, som han gav ved symposiet for dette års stipendiemodtagere. prandreassen@bmb.sdu.dk

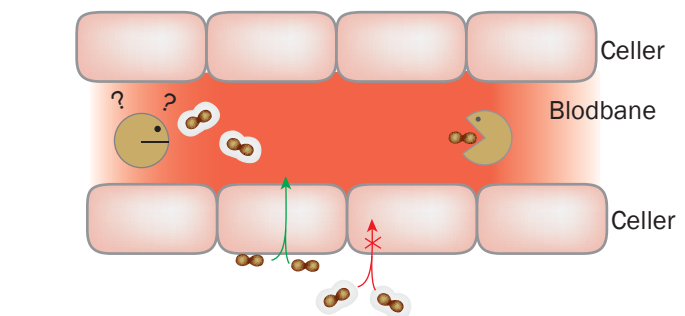


Mikkel Girke Jørgensen er adjunkt i mikrobiologi ved Syddansk Universitet. Han leder en nystartet gruppe, der arbejder med at undersøge den genetiske kontrol bag nogle af generne *Streptococcus pneumoniae* bruger til at forårsage sygdom i mennesker. mikkelj@bmb.sdu.dk

For omkring et århundrede siden gav den anerkendte Canadiske læge Sir William Osler bakterien *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) det meget sigende tilnavn "kaptajnen for alle dødens mænd". Den dag i dag er pneumonia (dvs. lungebetændelse) stadig den hyppigste årsag til dødsfald forårsaget af infektioner, og *Streptococcus pneumoniae* er den hyppigste årsag til disse infektioner. Nogle steder i verden er infektionerne så hyppige, at mere end 1 ud af 100 børn dør deraf. Det er anslået, at omkring 1 million børn på verdensplan dør årligt som følge af en infektion med *S. pneumoniae*. Det gør dermed *S. pneumoniae* til den bakterie, som slår flest mennesker ihjel. Sir William Osler's udtalelse er derfor sand selv den dag i dag.

Bakteriens usynlighedskappe

I det seneste århundrede har forskningen indenfor infektionsbiologi rykket sig meget. Ved at forstå de egenskaber, som gør bakterier i stand til at forårsage sygdomme (på fagsprog kaldes det deres virulensfaktorer), kan forskere



Streptokokker kan kun passere barrierer i kroppen ved at "smide" deres kapsel". Når de er kommet ind i blodbanen gendanner de kapslen og bliver dermed usynlige for immunsystemet. Streptokokker uden kapsel bliver derimod straks uskadeliggjort.

udvikle målrettede bekæmpelsesstrategier. Siden Sir William Osler's tid har forskere fundet ud af, at den vigtigste virulensfaktor for *S. pneumoniae* er en overfladestruktur kaldet "kapslen". Kapslen dækker hele bakteriens overflade, og den består af lange kæder af sukker (polysakkarider). Normalt genkender vores immunforsvar bakterier på bestemte overfladestrukturer, som er fremmede for kroppen. Men for bakterien fungerer kapslen som en usynlighedskappe, da vores immunforsvar ikke genkender polysakkaridkæderne i kapslen som noget fremmed. Derfor kan bakterien

bevæge sig frit i blodet og inficere forskellige organer, så længe den er dækket af sin kapsel. Til gengæld er en *S. pneumoniae*, som ikke er i stand til at danne kapsel, fuldstændig ufarlig for os - det har talrige undersøgelser vist.

Usynlighedskappen tages af og på efter behov

Nyere forskning har vist en interessant detalje omkring kapslen: Nemlig, at bakterien ikke kan krydse barrierer i vores krop (fx fra næsen til blodet) uden kortvarigt at smide kapslen. Bakterien skal altså både være i stand til at opbygge og smide



Mikkel Girke Jørgensen (ved mikroskopet) og Patrick Rosendahl Andreassen arbejder på at afdække, hvilke gener streptokokbakterier bruger til at regulere deres kapsel.

sin usynlighedskappe under bestemte betingelser. Man ved, at kapslen dannes af en række enzymer og proteiner, som samlet set er indkodet i en gruppe gener kaldet *cps-generne* (hvor *cps* er en forkortelse af det engelske *CaPSule*). Men på trods af, at kapslen er så vigtig for, at bakterien kan forårsage sygdom, ved man kun meget lidt om de mekanismer, som bestemmer, hvordan disse gener reguleres. Hvis man kan kortlægge reguleringen, kan man arbejde på metoder, som forstyrrer eller ødelægger reguleringen af kapselstrukturen og derved potentielt forhindre bakterien i at gøre os syge.

I en nystartet forskningsgruppe ved Syddansk Universitet har vi derfor sat os for at kortlægge denne regulering. En række af vores projekter tager udgangspunkt i en ny metode, vi har designet, som gør os i stand til at bestemme, hvilke gener bakterien bruger til at regulere kapslen.

En ny metode til at kortlægge reguleringen

Ved at kombinere metoder, der allerede er veletablerede indenfor molekylærbiologi, er vi i stand til

at ansue problemstillingen fra en endnu uafprøvet vinkel – og indtil videre har vi opnået særdeles lovende resultater. Vores design indebærer overordnet fire elementer:

1. En metode til hurtigt at måle mængden af *cps*-proteiner i mange tusinde bakterieceller hver for sig.
2. Etablering af et bibliotek af bakterieceller, som hver især har fået "deaktiveret" et enkelt gen i arvemassen. Det vil sige, at én bakteriecelle mangler gen A, mens en anden celle mangler gen B og så fremdeles for samtlige gener i arvemassen. Eller rettere: Samtlige gener, som ikke er essentielle for, at bakterien kan overleve.
3. En metode til at isolere celler, som har et ændret udtryk af *Cps*-proteinerne i forhold til normale celler.
4. Identifikation af hvilke gener de isolerede celler mangler.

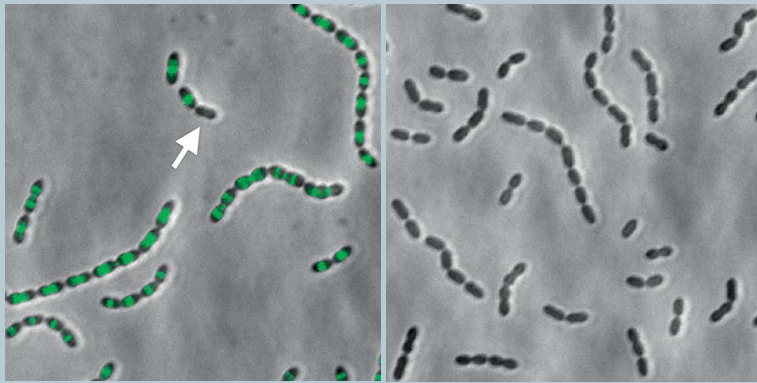
Med disse trin håber vi at kunne finde ud af, hvilke gener der er vigti-

ge for, at *cps*-generne bliver udtrykt korrekt.

Det første, vi undersøgte, var, hvordan udtrykket af *cps*-proteiner ser ud i en population af normale bakterieceller. Det viste sig, at alle bakteriecellerne udtrykker høje mængder af *cps*-proteiner under den vækstbetingelse, vi udsatte dem for i vores forsøg. Da vi undersøgte biblioteket af celler, som hver især manglede et gen, under den samme betingelse, viste det sig, at 0,5 % af populationen ikke udtrykte *cps*-generne. Det er efterfølgende lykkedes os at isolere disse celler og finde ud af, hvilke gener de isolerede celler mangler. Dermed har fået en liste af gener, som potentielt er involveret i at udtrykke *cps*-generne korrekt. Nu arbejder vi derfor med at undersøge denne liste med gen-kandidater.

Kortlægningen er kun lige begyndt

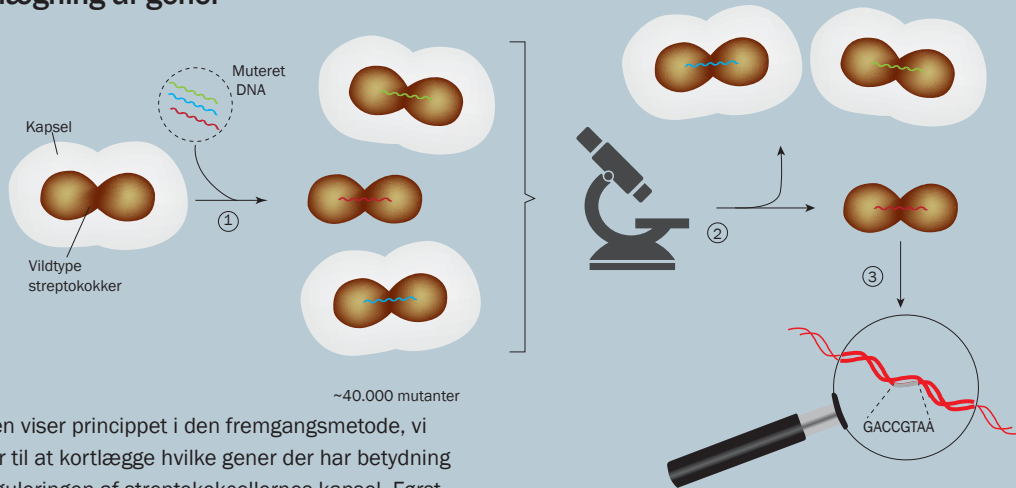
Det er vigtigt at understrege, at selv med en sådan liste over gener, er der stadig lang vej endnu, før man kan sige noget biologisk relevant



Under normale omstændigheder udtrykker *Streptococcus pneumoniae* cps-generne, der er involveret i dannelsen af bakteriens kapsel (dens "usynlighedskappe"). Det ses på billedet ved, at bakteriecellerne lyser grønt. Ca. 0,5% af populationen i vores bibliotek af celler, der hver især mangler et gen, udtrykker ikke cps-generne og lyser derfor ikke grønt.

Disse celler har vi isoleret (det andet billede), og vi kan nu prøve at afsløre præcis hvilken biologisk funktion de gener, som de "ikke-lysende" bakterier mangler, har.

Kortlægning af gener



Figuren viser princippet i den fremgangsmetode, vi bruger til at kortlægge hvilke gener der har betydning for reguleringen af streptokokcellernes kapsel. Først indsætter vi tilfældige mutationer i DNA, som oprindeligt kommer fra streptokokker selv (1). Umutteret DNA erstattes herefter med forskellige variationer af muteret DNA i individuelle streptokokceller, hvorved vi opnår et bibliotek med mange tusinde forskellige mutanter. Vi analyserer derefter mutanterne og isole-

rer dem, der ikke er i stand til at udtrykke cps-generne og derfor mangler deres kapsel (2). Ved at sekventere det muterede DNA kan vi undersøge præcis hvilke gener de isolerede mutanter mangler (3).

om genernes funktion i forhold til, hvordan de udtrykker cps-proteiner. Det første trin bliver at validere genernes effekt på udtrykket af proteinerne – altså at tjekke, om det er en reel effekt, vi observerer, eller om det evt. er en bieffekt, som er opstået under etableringen af biblioteket. Det kan vi gøre ved at lave et målrettet design af bakterierne, hvor netop de mistænkte gener er gjort inaktive (det er i modsætning til den tilfældige inaktivering af gener, som er foretaget i forbindelse med etablering af biblioteket).

Hvis genernes effekt på cps-udtrykket kan valideres, skal vi undersøge, hvordan generernes funktion passer ind i det regulatoriske netværk. Er det fx et gen, som står for

produktionen af et specifikt molekyle – og hvordan påvirker molekylet i givet fald så cps-udtrykket? Er det et gen, der koder for et protein, som direkte kan binde cps-generne og ændre gen-udtrykket?

De forsøg, der skal laves fremadrettet, er derfor svære at spå om, for det afhænger meget af, hvilke resultater vi får. Vi kan dog være sikre på, at vi skal komme op med mange hypoteser, som skal testes, når vi har valideret de gener, vi vil undersøge.

Det ultimative mål

Når man arbejder med noget så komplekst og udforsket som kapselreguleringen, forventer vi også at det bliver en stor udfordring at

kortlægge den. Vi har dog et rigtig godt udgangspunkt at starte med, når vi ved, hvilke gener der er en del af kortet, og vi "blot" skal findes deres plads heri.

Den store interesse i at forstå, hvordan *Streptococcus pneumoniae* regulerer sin kapsel bunder selvfølgelig i, at vi med denne viden også kan undersøge, hvordan vi forstyrrer denne regulering. Hvis vi kan forstyrre eller ligefrem ødelægge kapslen, vil bakterien i praksis være uskadeliggjort.

Vi har i vores forskning taget de første skridt på vejen mod dette ultimative mål allerede, og vi glæder os til at se, hvor de næste trin bringer os hen. ■