Antibiotikaresistens og jakten på nye medisiner

Nansen Minneforelsning
Holdt på årsmøte på Grand Hotel 12. oktober 2020

av Professor Lise Øvreås, Institutt for Biovitenskap Universitetet i Bergen og Professor II ved UNIS

Kjære alle sammen,
Jeg vil starte med å takke for invitasjonen til å holde Fridtjof Nansens minneforelesning. Det er en stor ære. Nansen var en betydelig skikkelse i norsk vitenskap. Han var en arktisk pioner, og symbolet på utforskningen av det nordlige havområdet. Nansen var også unik i feltarbeid og utviklet grensesprengende måleteknologi. Sammen med Colin Archer konstruerte han polarskipet Fram med det formål å fryse skipet inn i isen. Fram-ekspedisjonen fra 1893–1896 avslørte derved havets sirkulasjon og isens drift i Barentshavet og Polhavet. Senere var Nansen med på å konstruere «Nansenflasken» som muliggjorde kontrollert prøvetaking fra dyphavet og revolusjonerte med det datainnsamlingen fra havet. Han var en fantastisk formidler og dokumenterte sine ekspedisjoner i både fag- og populærlitteratur, i stor grad illustrert med egne tegninger og litografier. Nansen ble med dette både en viktig nasjonsbygger og en grunnlegger av hav- og polarforskningen i Norge. Nansen utførte sitt doktorgradsarbeid ved Bergen Museum.

Tittelen på mitt foredrag er «Antibiotikaresistens og jakten på nye medisiner». Ganske langt fra det de fleste forbinder med Nansens forskningsaktiviteter – eller er det egentlig det? Som mikrobiolog jobber jeg stort sett med mikrober som finnes i naturlige miljø, og dermed lite med sykdomsfremkallende bakterier. Jeg er fascinert av den enorme diversiteten vi finner blant disse veldig primitive livsformene. Det er større genetisk variasjon mellom to mikroorganismer man må bruke mikroskop for å observere, enn mellom meg og et furutre. Dette kan være vanskelig å forstå. Forklaringen er den enorme evolusjonen i mikroorganismenes gener og prosesser som har funnet sted i cirka 3,5–3,8 milliarder år (1, 2, 3). Det er viktig å huske på at mikroorganismene stort sett har vært enerådende på vår planet. De har utviklet seg fra et redusert miljø uten oksygen, til et oksidert miljø slik vi kjenner det i dag (4). Tenker man seg livets utvikling på jorden som

en klokketime, fra tilblivelsen for 4,567 milliarder år siden og frem til i dag, dukker dinosaurene opp tre minutter på 12, og menneskene ett sekund på 12. På dette tidspunktet var mikroorganismene godt tilpasset livet på jorden og diversiteten mellom dem kan gjøre hvem som helst svimmel.

Den mikrobielle diversiteten viste seg å være vel så høy i Arktis og andre kalde områder som i varmere strøk. Dette er interessant, fordi den normale trenden for høyerestående organismer er avtagende diversitet og antall når man går fra ekvator mot polområdene. Ikke bare var det høy diversitet, men det var mange av dem og de var skikkelig aktive (5, 6, 7). I mer enn 20 år har jeg arbeidet i Arktis. Jeg husker første gang jeg var på Svalbard i 1999 og skulle jobbe sammen med en gruppe forskere innen arktisk teknologi. Jeg presenterte meg som Lise Øvreås – mikrobiolog. Da var det en som lente seg litt tilbake, så på meg og sa: «Det som ikkje e så stort at vi kan skyt det og et det – det drit vi i her på Svalbard!» Jaja, tenkte jeg – det skal vi nå se om vi kan gjøre noe med!

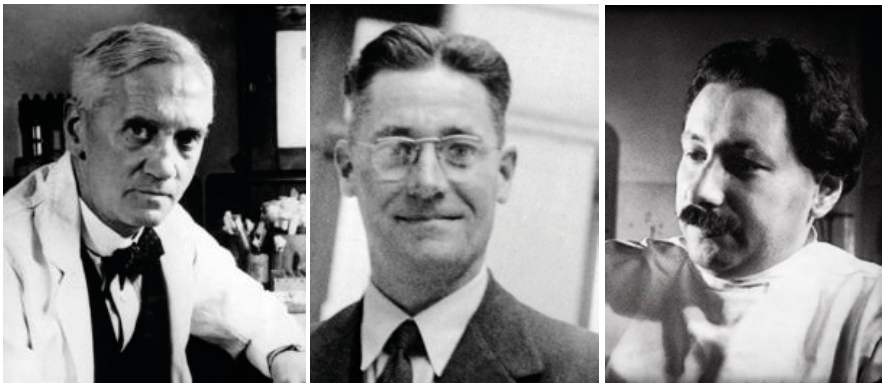
Første gang forskerne ble oppmerksomme på at det fantes biologisk liv på undersiden av isen i polområdene var rundt 1850, og i årene som fulgte ble en rekke ekspedisjoner sendt ut til arktiske områder for innsamling av både planter og dyr i isen. Nansen hadde selv samlet inn prøver fra isen ved Øst-Grønland og kjente derfor godt til isalgene som fantes der. Mindre kjent er det kanskje at han brukte nettopp denne kunnskapen til å planlegge Framferden over Polhavet (8). Vrakdeler fra skipet «Jeanette», ble funnet ved østkysten av Grønland tre år etter forliset ved de Ny-Sibirske øyer. Meterologen Henrik Mohn mente at vrakdelene var ført dit med en ukjent havstrøm. Denne teorien sammen med isalgeprøvene satte Nansen på sporet av havstrømmene i Polhavet. Nansen fant til sin overraskelse at prøvene tatt langt fra hverandre, altså på Øst-Grønland og Svalbard, var nærmest identiske og samtidig forskjellige fra prøver tatt i havområdene imellom. Han var sikker på at det måtte være en forbindelse mellom disse to delene av Arktis, og at denne forbindelsen gikk gjennom Polhavet. Nansen ga dermed sin fulle tilslutning til Henrik Mohns teorier (9) og var overbevist om at hvis alger kunne drive med isen over Polhavet, kunne også en båt gjøre det.

Nansen tok med seg ekspedisjonslege dr. Henrik Greve Blessing, som også var botaniker. Han finnes på en rekke fotografier fra Polhavet mens han vandrer omkring mellom isflakene med en håv for å samle isalger i råkene. Alt materialet som på denne måten ble samlet inn ble i etterkant bearbeidet av en av Norges mest kjente marine botanikere, Haaken Hasberg Gran, og publisert i 1904. Disse algeforekomstene indikerte at Polhavet var et temmelig produktivt hav med store algeoppblomstringer om våren. Til

Figur 1: Dr. H.G. Blessing på algefangst med Fram i bakgrunnen. Foto Fridtjof Nansen. https://no.wikisource.org/wiki/Fil:Nansen,Fridtjof-Fram_over_Polhavet_I-1942-p083.jpg

tross for dette mente man fremdeles at Polhavet var et dødt hav i vintersesongen, uten sollyset som forutsetning for fotosyntesen.

Jeg vil nå reflektere litt omkring dagens situasjon som vi står midt oppi, og de utfordringene som preger oss. Vi er nå utsatt for en pandemi som har snudd livet til alle sammen opp ned. Fra å være aktive forskere og globetrottere med få begrensninger på hvordan vi organiserer livene våre er vi nå fullstendig kontrollert av et lite, men svært effektivt, virus. Hele klodens populasjon er nå nærmest «på vent» for å finne nye virksomme medisiner og vaksiner. Det som vi mer eller mindre har tenkt på som science fiction er nå en uhyggelig virkelighet. Etterlevelse av smittevern, 1 meters regelen og spriting er blitt dagligtale. Infeksjoner har alltid vært viktig i menneskets sykdomspanorama. Selv om man ikke kjenner årsaken til sykdommene, har man alltid forsøkt å bekjempe dem. Jakten på kjemiske forbindelser for behandling av infeksjoner kan deles i tre perioder, framstilling av alkaloidekstrakter, utvikling av syntetiske midler og oppdagelsen av antibiotika. I 1928 oppdaget Alexander Fleming Penicillin, og i 1945 fikk han nobelprisen i medisin sammen med Howard Florey og Ernst Chain for denne oppdagelsen. Penicillin var et vidundermiddel som drepte bakterier og tok knekken på in-



Figur 2: De tre nobelprisvinnerne fra 1945 som fikk prisen for oppdagelsen av penicillinet a) Britiske Alexander Flemming b) Australske Howard Florey c) Russisk-tyske Ernst Chain. Foto: Wikipedia Commons.

feksjoner. I sin nobelpristale varslet Alexander Flemming selv om risikoen for overforbruk. Han mente at en lege som misbruker antibiotika kan bli moralsk ansvarlig for at et menneske senere dør av resistente bakterier.

Bakteriene er smartere enn oss

Antibiotika hjelper ikke bare mot den såre halsen når vinteren kommer, men redder millioner av menneskeliv på verdensbasis hvert år. Videre er èn av fem kreftpasienter avhengig av antibiotika som virker, og enkelte kreftformer kan ikke behandles uten. Tenk om det ikke fantes antibiotika. Det er dessverre ikke en virkelighetsfjern tanke. Det er viktig nå at vi i tiden som kommer arbeider målrettet med å begrense bruken av antibiotika, slik at vi ikke mister vår tids viktigste medisinske verktøy. Forskere og medisinske eksperter har varslet katastrofen i en årrekke. Allerede på slutten av femtitallet var Verdens helse-organisasjon (WHO) bekymret for overforbruk. Samtidig hadde industrien gylne tider og pushet vidundermiddelet villig. I dag dør årlig 700 000 mennesker på verdensbasis av resistente mikrober. I 2050 kan tallet være 10 millioner. Det betyr i praksis et menneske hvert tredje sekund, hvilket innebærer at vesentlig flere vil dø av antibiotikaresistens enn av kreft (10). Hoveddelen av disse dødsfallene vil forekomme i fattige land i Asia og Afrika. Det er derfor på tide å på tide å stoppe opp og sette seg inn i problemet (11).

Hva er antibiotikaresistens, og hvordan har problemet oppstått? Antibiotikaresistens innebærer at bakteriene ikke lenger slås i hjel av

Figur 3: Antibiotika var viktig medisin under 2 verdenskrig. Bildet viser en annonse for Penicillin produksjonen fra Life Magazine 14 august 1944. Foto: Science Museum, London. (CC BY 4.0)

antibiotika. Bakteriene er nemlig smartere enn oss. De er født til å beskytte seg. Overforbruk av antibiotika er hovedårsaken til at bakteriene blir resistente. De mest vanlige multiresistente bakteriene i Norge er Methilin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), bredspektrede beta-lactamase produserende *E.coli* (ESBL) og vancomycin resistente enterokokker (VRE). Disse bakteriene smitter på forskjellige måter. MRSA er en sårbakterie og smitter gjennom luft, mens ESBL og VRE er tarmbakterier som smitter ved kontakt. Én av fem kreftpasienter trenger antibiotika i forbindelse med behandling. Disse kommer til å være særlig utsatt hvis medikamentet slutter å virke. Resistente bakterier kan gjøre at dobbelt så mange kreftpasienter kommer til å dø. Dette er utvilsomt vår tids største trussel mot kreftbehandlingen og vil slå beina under mange tiår med fremskritt på området. Det hjelper så lite med revolusjonerende, livsforlengende immunterapi, hvis pasientene dør av en ukomplisert bakterieinfeksjon. Situasjonen er ikke uoverkommelig, men vi må ta grep nå. På lang sikt må det utvikles nye medisiner som kan erstatte antibiotika. Helse- og omsorgsdepartementet har satt som mål å redusere forbruket av antibiotika i Norge med 30 prosent i løpet av 2020. På kort sikt må vi sørge for at antibiotika som i dag er effektiv, ikke slutter å virke.

Bakterier er encellede organismer, som altså består av ett rom. Løst i bakterien finner vi DNA eller arvematerialet organisert i et kromosom. Noen av resistensgenene finner vi ofte på kromosomet. Men ofte finnes det i tillegg autonome sirkulære DNA fragmenter som kalles plasmider. Disse plasmidene er ofte «hotspots» for antibiotikaresistensgener. Slike plasmider kan også overføres mellom bakterier. Vi kan grovt sett dele resistensmekanismene i tre hovedtyper. De ene typen består av gen som koder for en aktiv pumpemekanisme som kaster antibiotikumet ut igjen av cellen før det begynner å virke. Den andre typen av gen koder for et enzym som kutter opp antibiotikumet og gjør det uvirksomt, mens den tredje typen gen koder for en annen type enzym som modifiserer antibiotikumet slik at det blir uvirksomt. Dette er en generell beskrivelse av noen mekanismer. Det er i virkeligheten et mye mer komplekst og intrikat system for hvordan forskjellige typer antibiotika virker og videre hvilken type forsvarsmekanismer som bakteriene har utviklet over tid. Det er altså flere resistensmekanismer som nødvendigvis krever forskjellige antibiotika. For eksempel vil quinoloner virke på DNA syntesen (kopiering av DNA), Rifampicin virker inn på RNA syntesen, Vancomycin, Penicillin og Cephalosporin på dannelesn av cellevegg, Erythromycin, Tetracyclin streptomycin på proteinsyntesen og Sulfonamider og Trimetoprim på folinsyresyntesen.

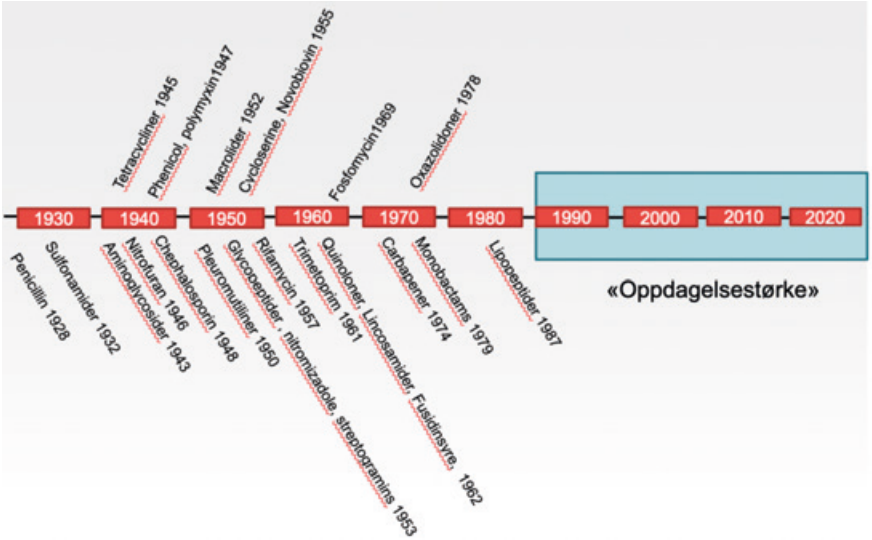


Figure 4: Tidslinje for oppdagelser av forskjellige antibiotika for klinisk bruk. Foto: Lise Øvreås

Figur 4 viser en grov tidslinje over oppdagelsene av antibiotika for klinisk bruk. Oppdagelsen av Penicillin i 1928 og sulfonamider i 1932 var starten på en meget aktiv og vellykket periode. Det ble funnet mye antibiotika som ble fremstilt for klinisk bruk. Storhetstiden var på 1940, 1950, 1960 og 1970 tallet. Stor sett ble nye antibiotika funnet fra forskjellige jordtyper og hovedsakelig innen den samme bakterietypen, nemlig Actinomycetes. Dette er en helt vanlig jordbakterie som faktisk er årsaken til at jord lukter jord. Det er et tankekors at det siste antibiotikumet ble oppdaget i 1987. Siden den gang har det ikke kommet noen nye virksomme antibiotika. Det er altså mangel på nye oppdagelser fra 1987 og frem til dags dato. Dette refereres til som «oppdagelsestørken». Hva er det som begrenser oss i å finne nye medisiner? Først og fremst det faktum at bakterier er små og mangler morfologiske karakteristika. Videre har bakteriene begrenset dyrkbarhet. Det har vist seg at mindre enn 1% av de bakterier som finnes i naturlige miljøer kan dyrkes i laboratoriet ved bruk av tradisjonelle metoder. I tillegg er det forholdsvis få studier innen mikrobiell økologi, så det er mange økosystemer som er relativt nyoppdagete og derfor sparsommelig studert.

Hva skal vi lete etter?

Actinomycetes er en bakterie som finnes naturlig i vann og jord. Dette er en organisme som tidligere har bidratt til utvikling av mange antibiotika. Bakterien inneholder mange gener og kan produsere mange forskjellige typer av sekundærmetabolitter. Store deler av jakten har nettopp vært rettet mot denne typen organisme. De siste årene har man dessverre bare klart å isolere samme organismer på nytt, noe som ikke har ført til nye stoffer for videre studier og analyser. Ved å gå fra jord til marine systemer er det funnet noen nye bakterier med lovende utsikter, men fremdeles ingen nye antibiotika. I likhet med alle andre bakterier, vokser Actinomycetes ved at DNA kopieres, cellen forstørres og deles på midten. En slik todeling på midten av cellen kalles en binær fisjon. Det som styrer denne celledelingsprosessen er et gen som kalles FtsZ.

Som nevnt må vi nå utvide våre søk, og lete blant andre organismer og i andre miljøer som er unike og relativt uutforskede. I vårt laboratorium har vi lenge hatt et fokus på en relativt understudert bakteriegruppe kalt Planctomycetes. Planctomycetes ble oppdaget i 1924 og ble først antatt å være sopp, derav navnet «mycetes» (12). Rundt 1970 ble det bekreftet at Planctomycetes var bakterier, men at de var forskjellig fra alle andre typer av bakterier (13). De mangler den typiske bakteriecelleveggen som er bygget opp av peptidoglycan. De har flere stadier av livssyklusen sin, og når de vokser deler de seg ved knoppskyting i likhet med gjærceller, som er eukaryote, altså mer avanserte celler med cellekjerne. Planctomycetes mangler også FtsZ genet. En annen atypisk egenskap hos planctomycetes er at de kan folde membranen innover i cellen og på den måten danne lukkete rom inni cellen. Inni disse lukkede rommene kan det forekomme helt spesielle prosesser og dannes helt spesielle mellomprodukt (14). Et eksempel er anammoxosomer hos en gruppe planctomycetes. Anammoksosomet er et lukket rom omgitt av en membran bestående av en spesiell type lipider kalt ladderaner (15). Inni anammoxosomet foregår det en prosess som er viktig i nitrogensyklusen, hvor ammonium (NH_4^+) og nitritt (NO_2^-) blir omdannet til dinitrogen (N_2) og vann (H_2O). Hydrazin (N_2H_4) er et mellomprodukt i reaksjonen (16). Hydrazin er både giftig og kreftfremkallende, lukter ammoniakk, og blir brukt innen kjemisk industri og som rakettdrivstoff. Denne kjemiske prosessen er en viktig global prosess og brukes i de fleste vannrensesystemer over hele verden. Dette er en snedig innretning som kan indikere et evolusjonistisk stadium mellom bakterier og høyerestående organismer.

Hvor skal vi lete?

På mange måter kan dagens leting etter nye antibiotika og medisiner sammenlignes med en science-safari eller en Indiana Jones film, og forskere innser at de må spre seg utover og utforske nye, unike territorier hvis leteaksjonen skal lykkes. Hvor skal vi så jakte på nye antibiotika? Det beste stedet å lete hvis du vil finne uoppdagede mikrober med antibiotika-egenskaper, er steder med unike eller uvanlige omgivelser, gjerne med spesifikke forhold som er veldig forskjellige fra andre deler av verden. Dette kan være områder med ekstremt høye eller lave temperaturer, steder dypt inne i jordskorpen, eller andre steder der miljøet har ført til at organismer utvikler seg på svært spesifikke måter. Uansett hvor bakterier lever, er det konkurranse mellom individuelle arter som tilpasser seg for å kunne bekjempe andre og bli de dominerende bakteriene. Hvis en bakterie produserer et kjemikalium som dreper naboene, kan vi også bruke det kjemikaliumet til å drepe bakteriene som gjør oss uvel eller syke. I disse spesielle geografiske områdene er det mer sannsynlig at vi finner mikrober som produserer kjemikalier vi ikke ville finne andre steder. Unike og relativt uutforskede områder der bakterier overlates til sine egne enheter for å utvikle disse mekanismene uten påvirkning fra mennesker, er derfor de beste stedene å søke etter potensielle nye medisiner.

De fleste antibiotika som brukes i dag, og som stammer fra naturlige miljø, kommer fra jord. Det er mer der de kommer fra, men kanskje ikke i de mest tilgjengelige områdene. Hemmelighetene, og det store potensialet, ligger skjult i ugjestmilde miljøer hvor livsbetingelsene ikke er særlig godt tilpasset oss mennesker. Internasjonalt leter forskere over hele verden for å samle prøver fra de dypeste, kaldeste og varmeste stedene på planeten og undersøke deres bakteriedrepende egenskaper. En gruppe fra Universitetet i Tromsø (Center for New Antibacterial Strategies, CANS, UiT) drar ut til Arktishavet og samler prøver av vann, havbunnen eller organismer som for eksempel havsvamper. Dette bringes tilbake til laboratoriet for å jakte på antibiotiske egenskaper. Teamet i Tromsø har allerede oppdaget flere unike marine sopper som har antibakterielle egenskaper, og de undersøker dem nå videre for å se om de kan danne grunnlaget for fremtidige antibiotika. Vi vet mer om Mars og Månen, enn vi vet om våre egne hav. Dette gjør havet til et flott sted å begynne å jakte på uoppdagede bakterier. De dypeste områdene i havet, spesielt i det kalde Arktis, kan virke tomme og ubeboelige, men et overraskende antall skapninger gjør disse iskalde områdene til sitt hjem.

Arven etter Nansen, som er et nyskapende og helhetlig arktisk forskningsprosjekt som skal gi integrert kunnskap om et havklima og økosystem

i rask endring, ble startet i 2018. I over 6 år skal prosjektet kartlegge endringer i klimaet og økosystemer i det nordlige Barentshavet. Det var faktisk Det Norske Videnskaps-Akademi som tok initiativet til dette gigantiske nasjonale samarbeidsprosjektet mellom 10 forskningsinstitusjoner. En viktig del av prosjektet er det nye isbrytende forskningsfartøyet Kronprins Håkon, som nettopp gir oss mulighet til å gjennomføre vitenskapelige tokt hele året. På denne måten kan også de prosessene som foregår inni isen i den mørke polarnatten studeres. Skipet kan gå langt inn i isen og prøver kan tas fra isflakene i vannkolonnen og dypt nedi sedimentene. Is dekker 10 % av jordens kontinent (16, 000 000, km^2) og er i ferd med å smelte bort. Overflatesmelting foregår årlig opp til ~5 % (800,000 km^2 og øker). All is på jorden tilsvarer 33 millioner km^3 ferskvann. Hvis dette smelter vil sjønivået øke

Figur 5: Forskningsskipet Kronprins Haakon under en ekspedisjon med Arven etter Nansen prosjektet i November 2019. Foto: Lise Øvreås

med 70 m. Inni isen finner vi isolerte og lysfattige kalde miljøer som sikrer konservering av arter. Det er gjort veldig få studier av innefrosne mikrobiomer i denne typen økosystem. Is representerer derfor en konservert nisje for mikrobielle samfunn og det kan fungere som et arkiv for tidligere klimaendringer. Det er derfor mange grunner til å undersøke disse issystemene litt grundigere med tanke på å oppdage nye mikroorganismer og nye livsformer.

Svarthammarhola

Her er et eksempel på hvordan denne jakten foregår. Dere er nå invitert inn i et helt unikt modellsystem, nemlig Svarthammerhola i Fauske utenfor Bodø, cirka N 67°12'; E1° 30'. Det er en relativt liten inngang til grotten. Først må vi krype inn åpningen og så er det en ganske bratt bakke nedover med stein, grus og jord. Når vi kommer ned møter vi en nydelig isbro, som nå dessverre har kollapset (Figur 6). Når vi har kommet forbi isbroen

Figur 6: Inngangen til svarthammerhola i Fauske i september 2018. Foto: Lise Øvreås

kommer vi til et nytt stort grotterom, hvor vi finner en nydelig isbre (Figur 7). Dette er den største naturlige grotten med iboende isbre i Skandinavia. Den ligger på 275 meter over havet. Radiokarbondateringer av planterester ved enden av isbreene indikerer at isen akkumulerte etter år 1200 (17), altså rundt den lille istid. Ismassen krymper for hvert år på grunn av klimaendringer. Retningen på pilen går fra snuten på isbreen, som er den eldste delen, til de nyeste avsatte ismassene som vi finner på toppen. Det som er unikt er at man kan stå på siden av breen og se de fine avsatte lagene som representerer en kronosekvens fra år 1200 fram til i dag. Fra hvert av disse lagene ble det tatt ut prøver for geokjemiske analyser. I tillegg valgte vi oss syv regioner hvor vi tok prøver for biologiske analyser og dyrking av mikroorganismer. Vi kunne ta prøver fra de fleste valgte regioner mens vi stod på bakken, men noen av de yngste prøvene måtte tas fra toppen av isen. Da måtte det klatres og vi måtte repellere ned ved bruk av klatretau (Figur 8). Prøvene ble tatt med steril iskjernebor. For å få nok biologisk

Figur 7: Bildet viser den flotte isbroen i grotterommet mens isbroen fremdeles var intakt i september 2018. Feltarbeidet var et samarbeid med forskere fra Romania gjennom CaveIce prosjektet. I forgrunnen ser vi professor Cristina Purcarea fra Universitetet i Bucurest, Romania.

Figur 8: Bilde viser isbreen som finnes inni Svarthammarhola. Vi ser de tydelige lagene med isavsetting som indikerer en klar kronosekvens langs isen. Foto: Lise Øvreås

Figur 9: Slik så et typisk prøvetakingsområde ut etter at vi hadde drillet mellom 80 – 100 små kjerner fra området. Foto: Lise Øvreås

materiale måtte vi drille mellom 80 – 100 slike små iskjerner fra hver prøve (Figur 9).

Det er viktig at vi ikke forurenser prøvene med bakterier som vi tar med oss inn i grotten utenfra. Dette kan være bakterier vi har på hendene våre, på klærne eller på utstyret. I tillegg er det viktig at vi ikke tar prøver av bakterier som kan ha blitt tilført grotten med luft eller på annen måte. Derfor ble ytterlaget av isen hugget bort med en steril isøks. Videre ble overflaten brent av før sterile isbor ble benyttet. Iskjernene ble så overført til sterile flasker og lukket umiddelbart. På figur nummer 9 ser dere «åstedet» etter at vi har hentet ut prøvene vi trengte for videre arbeid. Arbeidet var intenst, i komplett mørke og med mye spriting og avbrenning (Figur 10). Etter en slik lang arbeidsøkt var det godt å komme ut i dagslyset og solen (Figur 11). Prøvene ble tatt tilbake på laboratoriet for videre analyser. Iskjernene ble smeltet og fordelt til forskjellige analyser. Vi hadde designet medier spesifikt for stimulering av planctomycetes, men justert slik at det mediet skulle være mest mulig lik de naturlige forholdene i isgrotten, som for eksempel pH, saltkonsentrasjoner, temperatur og så videre. Vi satte opp flytende anrikninger, og podet på agarskål for isolering av enkeltkolonier. Vi mikroskoperte for å se på form og størrelse, og utførte pollenanalyser for å kunne si noe om vegetasjonen rundt grotten under denne perioden. Vi brukte spesielle fargemetoder for å se om bakteriene som var tilstede var levende eller døde.

Slik dyrking tar tid og krever tålmodighet. Etter flere måneder i laboratoriet klarte vi å isolere flere nye planctomycetes fra isen. Flere av de isolatene som vi har fått til å vokse i laboratoriet, danner helt nye arter innen denne gruppen. Noen isolater er ganske nært beslektet med det som har blitt

Figur 10: En mikrobiologisk arbeidsstasjon inni grotten. Prøvetakingsutstyr ble sterilisert ved etanol og avbrenning. Iskjernene ble drillet med en isbor og overført til sterile plastflasker. Foto: Lise Øvreås.

Figur 11: Noen av forskerne i CaveIce-prosjektet. Etter en lang arbeidsdag inni den mørke grotten var det godt å komme ut. Forskerteamet var sammensatt av forskere fra Universitetet i Bucurest, Romania og Universitetet i Bergen. På bildet ser vi Professor Christina Purcarea (Romania), Dr. Aurel Persoiu (Romania), Professor Stein Erik Lauritzen (UiB), Sverre Aksnes (UiB) og Dr. Christos Pennos (UiB). Foto: Lise Øvreås

beskrevet tidligere, men mange er også helt nye og tidligere ubeskrevete arter. Samtidig som vi hadde suksess med dyrkingen av våre isolater fra ekstreme områder, stort sett Arktis og fra dyphavet, var det tre andre forskergrupper (Portugal, Tyskland og Russland) som også hadde knekket koden for å dyrke disse vanskelige bakteriene. Vi ble da enige om å samle alle disse dataene i en analyse. Vi valgte ut de mest interessante isolatene og utførte helgenomsekvensering av disse. Det resulterte i 79 nye planctomycetes. Av disse var det 31 nye slekter og hele 65 nye arter. Vi fant også flere lovende isolater som produserte nye typer av antibiotika. Et eksempel er *Stielaria majorica* som produserer Stielarin som er et N-acetyl tyrosin derivat. Dette er fremdeles under uttesting. Vi har også et isolat fra en lagdelt sjø utenfor Bergen som har fått navnet *Stielaria bergensis* (18).

Da vi hadde studert de 79 nye isolatene nøye ved mikroskopi og genetiske analyser, fant vi at de hadde en svært variert form for celledeling, både hva gjelder mekanismer og gener. Noen hadde en helt typisk knoppskyting som det vi finner hos gjær, andre var mer avlange med spisse knopper. Noen delte seg på siden. Det er et stort maskineri av gener som virker ved celledeling og ofte er disse genene et viktig angrepspunkt for antibiotikumet. Mange av de klassiske delingsgenene som er vanlige hos bakterier, mangler i flere av isolatene. Alle isolatene manglet FtsZ genene. Kanskje dette kan være en pekepinn for mulige virkemåter for nye antibiotika. Noe som kjennetegner Planctomycetesene og Actinobakteriene er at de har svært store genomer sammenlignet med en typisk tarmbakterie som *E.coli*. Dette betyr at de har mange gener som ikke er nødvendige for at en celle skal kunne leve, vokse og reprodusere seg. Disse bakteriene har også en stor andel av gener som koder for sekundærmetabolitter, som er kjemiske stoffer som cellene kan benytte til cellekommunikasjon og konkurranse mellom organismer.

Ved hjelp av DNA-analyser sjekket vi hvilke gentyper bakteriene inneholdt. Vi fant da flere gen som koder for produksjon av terpener, som ligner plantehormoner og steroider. Vi fant også særdeles bioaktive polyketidsyntaser og en stor andel proteiner som er sekundærmetabolitter. Disse ligner imidlertid ikke på tidligere beskrevne sekundærmetabolitter og representerer derfor mulige nye virkestoffer. Resultatene var spennende, og sammen med Professor Lars Herfindal fra Haukeland Universitetssykehus bestemte vi oss for å sjekke om de komponentene som planctomycetene skiller ut også kunne være aktive mot kreftceller. Vi dyrket opp store mengder celler og ekstraherte den organiske fraksjonen av stoffer i tillegg til vannfasen. Ekstraktene ble screenet mot tre forskjellige cellelinjer. Cellelinjene var og humane akutt myelogen leukemi (AML) celler (Molm13), og humane prostatakreftceller (PC3). I tillegg ble normale nyreceller (epitelceller) fra rotter (NRK) benyttet som kontrollceller. Noen av de nye bakterieisolatene våre viste ingen tegn til produksjon av krefthemmende stoffer, men andre produserte stoffer som hadde en moderat til sterk effekt på kreftcellene. Noen isolater var spesifikke mot leukemicellelinjene, mens andre var spesifikke mot PC3 cellelinjene. Noen var spesifikke mot begge og atter andre mot samtlige, herunder også de normale nyrecellene. Vi fant virksomme stoffer både i den organiske fasen og i vannfasen. De fleste stoffene var virksomme mot Molm13 cellene (leukemi), men også mot PC3 cellene (19, 20). Dette er svært lovende resultater, og vi holder nå på å isolere disse stoffene med tanke på videre analyser. Selv om vi ennå ikke har resultatene klare, er vi optimistiske. Det ser ut som om planctomycetes er en

viktig gruppe bakterier som bør studeres mer detaljert. Studiene våre i arktiske havområder og i is har vist at disse svært ekstreme økosystemene er skattkister, hvor vi kanskje finner alt vi trenger for å bekjempe antibiotikaresistens og for å utvikle nye medisiner.

Jakten på nye medisiner haster. Jeg tror at Arktis og Polhavene, hvor Nansen gjorde sin banebrytende forskning om havstrømmene, har et stort potensiale som skattkammer for nye medisiner. Det er sannsynlig at forskningen i tiden som kommer vil frembringe nye og virksomme antibiotika. Det evige dilemmaet er at også de nye antibiotikaene vil kunne utvikle resistens, med mindre verdenssamfunnet justerer kursen kraftig. Det kan høres både kjedelig og banalt ut, men det er bare sunn fornuft og måtehold som kan forhindre at vi gang på gang havner i resistensfellen. Vi må altså redusere den totale mengden antibiotika som brukes, samtidig som selve bruken må være ansvarlig, basert på et godt medisinsk skjønn og reseptbelagt.

Referanser

1. M. Dodd *et al*. Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. *Nature,* 543 (7643). pp. 60–64. (2017) doi.org/10.1038/nature21377
2. M. A. van Zuilen, A. Lepland, G. Arrhenius, Reassessing the evidence for the earliest traces of life. *Nature* 418, 627–630 (2002).
3. Y. Ohtomo *et al.* Evidence for biogenic graphite in early Archaean Isua metasedimentary rocks. *Nat. Geosci.* 7, 25–28 (2013).
4. J. Goksøyr. Archebakterier – et gløtt tilbake til jordas urtid? *Naturen,* 3 97– 103 (1983).
5. O. Mueller *et al.* Disentangling the complexity of permafrost soil by using high resolution profiling of microbial community composition, key functions and respiration rates. *Env. Microbiol* 20, 12. 4328–4342 (2018).
6. Y. Xue, I. Jonassen, L. Øvreås, N. Tas. Bacterial and Archaeal Metagenome-Assembled Genome Sequences from Svalbard Permafrost. *Microbiol Resour Announc* 8 (27):e00516-19. (2019) doi: 10.1128/MRA.00516-19.
7. Y. Xue, I. Jonassen, L. Øvreås, N Taş. Metagenome-assembled genome distribution and key functionality highlight importance of aerobic metabolism in Svalbard permafrost *FEMS Microbiology Ecology* 96 (5) (2020). fiaa057

8. E. N. Hegseth, Isalgene det ukjente livet under isen i Arktis. *Ottar*, 254 Tromsø museum, Universitetsmuseet (2004).
9. V. Bjørnsor, Fram I (Nansen) Polarhistorie.no/ekspedisjoner/Fram
10. J. O`Neill, Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. (2014).
11. D. I. Andersson *et al.* Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS microbiology Reviews*, fuaa001,1-18.(2010) Doi: 10.1093/femsre/fuaa001.
12. N. Gimesi. Planctomyces Bekefii Gim. *nov. gen*. et sp. Budapest, Hungary: Hydrobiologische Studien, (1924).
13. Hirsch P. Two identical genera of budding and stalked bacteria: Planctomyces Gimesi 1924 and Blastocaulis Henrici and John-son 1935. *Int J Syst Evol Microbiol* 22:107–11. (1972).
14. M. Strous, *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400(6743): 446–449 (1999).
15. L. A van Niftrik *et al.* The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 233(1):7–13. (2004). doi: 10.1016/j.femsle.2004.01.044.
16. M. Strous, J. G. Kuenen, M. S. Jetten, Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *App. Environ. Microb* 3248–3250 (1999).
17. S. E. Lauritzen, L. Baastad, J. Engelien, Ice Caves, Chap. 23 Norway Fennoscandia and the arctic. *In: Persoiu, A., Lauritzen, S. E. (Eds.)* Ice Caves. Elsiever, pp. 479–472. (2018)
18. S. Wiegan *et al* Cultivation and functional Characterisation of 79 planctomycetes uncovers their unique biology. *Nature microbiology* (2020). doi.org/10.1038/s41564-019-0588-1
19. E.F. Sæbø. Isolation and characterisationof Novel Planctomycetes from Svarthammarhola Ice Cave with potential Production of Bioactive Molecules. Masteroppgave Universitetet i Bergen. (2018).
20. R. Calisto *et al*. Anticancer activity in Planctomycetes. *Frontiers in Marine Sciences*. (2019). DOI: 10.3389/fmars.2018.00499