

Lakselus

Lakselusens innerste hemmeligheter avsløres

I flere år har forskerne arbeidet med å kartlegge arvestoffet (genomet) til lakselus. Arvestoffet er nå ferdig sekvensert og analysene av arvestoffets innhold har begynt. Når disse analysene er ferdige, vil kunnskapen om arvestoffet bli et viktig verktøy i arbeidet med å finne nye behandlinger mot lakselus.

RASMUS SKERN-MAURITZEN | rasmus.skern@imr.no, KETIL MALDE og TOMASZ FURMANEC

Lakselus er små krepssdyr som lever på laksefisker, der de spiser slim, hud og blod. De finnes hovedsakelig på vertsfisker i sjøvann. Da lusen ikke er tilpasset ferskvann, faller de derfor gradvis av når vertene går opp i elvene for å gyte. Siden lusen manipulerer vertens immunforsvar, forstyrrer saltbalansen og lager sår som sykdomsfremkallende organismer og virus kan entre verten gjennom, kan lus utgjøre et alvorlig helseproblem for vertsfiskene.

I tillegg til å gjøre vertene mer sykdomsutsatte, er lus mistenkt for å fungere som spredningsvei for alvorlige helseplager som parasitter og virus. På grunn av problemene

lakselus kan medføre, er det fastsatt strenge grenser for mengden lus som tillates på laks i oppdrett, og oppdrettsnæringen bruker betydelige beløp på lusebegrensende tiltak. Imidlertid har effektiviteten av de eksisterende medikamentene i noen områder minket alarmerende de siste årene på grunn av resistens, og det er derfor viktig å utvikle nye behandlingsmetoder. Kartleggingen av lakselusens genom er viktig i dette utviklingsarbeidet fordi resultatene kan brukes til å finne ”lakselusens akilleshæl”, altså prosessene i lakselusen som best rammes med nye behandlingsmetoder.



Hunnlakselus.

Hva er et genom?

En organisme består av celler, som stort sett består av proteiner, fettstoff, mindre kjemiske forbindelser og vann. Inne i cellen skjer det mange biokjemiske prosesser, og disse styres og muliggjøres stort sett av proteiner. Litt forenklet kan man si at proteinene er livets verktøy som omformer stoffer og kjemiske forbindelser på en måte som passer til cellens og organismens behov. Beskrivelsen av disse proteinverktøyene og styresystemet som kontrollerer når de forskjellige verktøyene aktiveres, finnes i genomet. Ettersom genomer går i arv fra foreldre til avkom, kalles et genom på norsk for arvestoff. Arvestoffet består av en eller flere kjeder av fire forskjellige nukleotider som gjengis med bokstavene A, T, G og C. Når man sekvenserer et genom, kartlegger man rekkefølgen på disse nukleotidene.

Å sekvensere og rekonstruere lakselusens genom

Å kartlegge et genom høres i utgangspunktet ikke så vanskelig ut siden det bare består av fire forskjellige nukleotider. Problemet er at vi kun kan lese, eller sekvensere, 50–1000 nukleotider om gangen avhengig av hvilken teknologi vi bruker. Siden genomer som oftest er veldig lange (menneskets genom er for eksempel på 3 000 000 000 nukleotider mens lakselusen må nøye seg med 600 000 000), må man sekvensere millioner av biter som skal settes sammen. Ettersom ingen nære slektninger til lusa er sekvensert, fins ingen rettesnorer for hva vi kan forvente. Det er derfor særlig viktig å skaffe et godt datagrunnlag før vi prøver å sette sammen genomet. Dette datagrunnlaget skaffes gjerne ved å kombinere flere sekvenseringsstrategier (se faktaboks).

Når sekvensbitene skal settes sammen brukes dataprogrammer som i forskjellig grad er tilpasset forskjellige sekvenseringsteknologier. Siden det ble brukt flere teknologier i sekvenseringen av lakselusens genom, måtte vi teste forskjellige programmer for å se hvilke som best klarte å rekonstruere genomet. Dette ble gjort ved å sammenlikne verdier som beskrev forskjellige rekonstruksjonskvaliteter som for eksempel hvor komplette rekonstruksjonene var, hvor oppdelte de var, hvor mye som var støy, hvor mye som



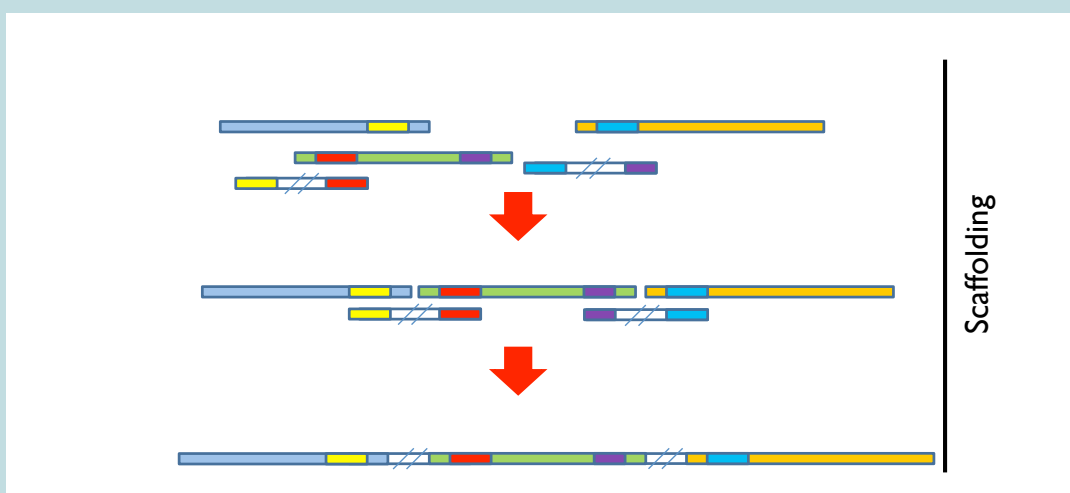
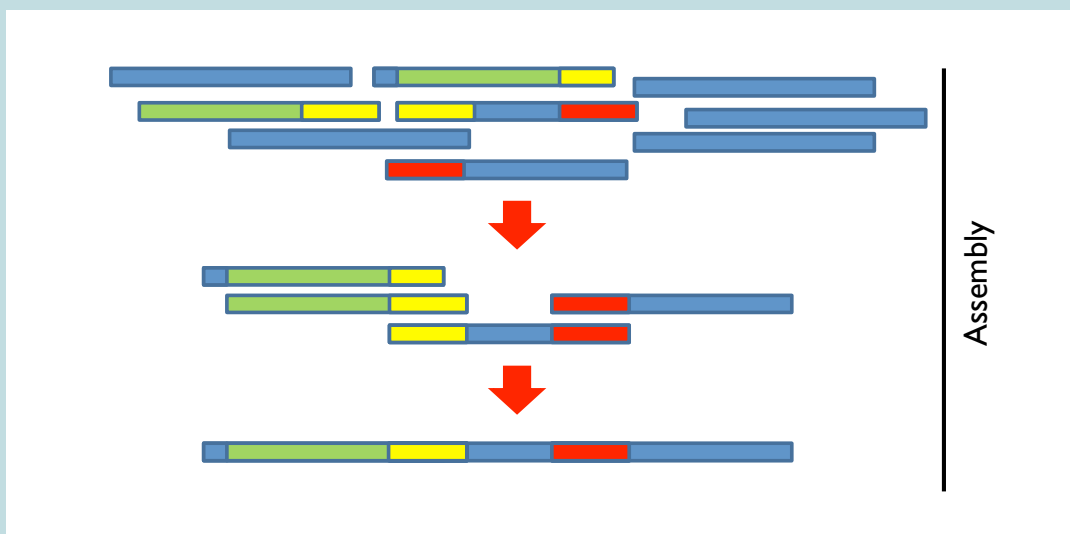
Lakselus på laksesmolt.

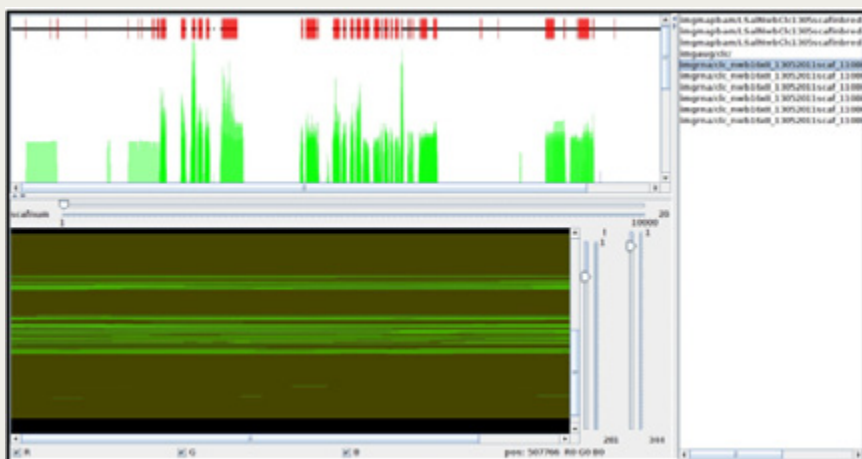
Hvordan sekvenseres et genom?

I sekvenseringsprosjekter brukes gjerne to strategier: sekvensering av tilfeldige nukleotidfragmenter og sekvensering av nukleotidfragment-par. Ved sekvensering av tilfeldige fragmenter får vi kartlagt en tilfeldig nukleotidkjede av en viss lengde. Ved sekvensering av nukleotidfragment-par får vi kartlagt endene – men ikke midten – av en kjede med kjent lengde. Fordi sekvensbitene er små må man sette dem sammen for å rekonstruere genomet. Når genomet skal rekonstrueres fra sekvensbitene tar man gjerne først alle sekvensfragmenter – uten hensyn til om de kommer fra par – og setter dem sammen så godt det er mulig. Denne prosessen kalles "assembly" og er illustrert i den øvre delen av figuren der sekvensfragmentene er illustrert med fargete rektangler. Sekvenser som bare finnes i ett fragment er illustrert med blått, mens områder som har identisk sekvens i flere fragmenter er illustrert med gult, rødt og grønt. I assembly-prosessen (1. pil) organiseres alle sekvensbitene slik at de identiske bitene sammenfaller. Fra sammenstillingen av alle sekvensbitene utleder man sammenhengende rekonstruerte fragmenter (2. pil). I et assembly er det

gjærne flere ti- eller hundretusener rekonstruerte fragmenter.

Siden det i mange analyser er ønskelig å vite om forskjellige gener finnes på samme nukleotidkjede, ønsker vi å kjede sammen så mange av de rekonstruerte fragmentene som mulig. Til dette nyttes de parvise sekvensene i en prosess som kalles scaffolding. I denne prosessen begynner man med å finne områder i nukleotidfragment-parene som er identisk med områder i de rekonstruerte sekvensbitene, som er illustrert i figurens nederste del. De parvise sekvensene er i figuren illustrert med hvite rektangler. Disse har fargete ender som representerer de sekvenserte områdene (skråstrekene indikerer at lengden på den hvite, ukjente sekvensen kan være lenger enn figuren indikerer). De rekonstruerte sekvensfragmentene er illustrert med blå, grønne og gule rektangler, der områder som er identiske er illustrert med lik farge. Man kan da sammenstille de rekonstruerte sekvensfragmentene og de parvise sekvensene som illustrert med den 1. pilen. Når denne sammenstillingen er komplett kan man utlede det rekonstruerte genomet (2. pil).





Figur 1. Skjermbilde fra et dataprogram som brukes til å bekrefte at identifiserte gener finnes. Den sorte linjen med røde felt representerer det rekonstruerte genomet med de identifiserte genene. De grønne feltene under indikerer om, og hvor sterkt, området i genomet brukes. Dette bildet viser at de identifiserte genene (røde felt) i store trekk er reelle, men at noen områder analysene identifiserer som gener antakelig ikke er det.

var satt sammen feil og så videre. Den enkleste av disse verdiene kalles N50. I våre rekonstruerte genomer er N50 større enn 45 000; det vil si at når vi leter etter et spesifikt gen, er det 50 % sannsynlighet for å finne genet på en nukleotidkjede som er minst 45 000 nukleotider lang. Dette er en viktig parameter fordi arbeidet med å finne genene i det rekonstruerte genomet er helt avhengig av at kjedene er ganske lange for å gi et pålitelig resultat. I så måte er sekvenseringen av lakselusens genom en suksesshistorie: Våre rekonstruksjoner er bedre enn vi turde forvente da prosjektet startet, og bedre enn rekonstruksjonene av mange andre sekvenserte genomer.

Hva finner man i genomet?

Et kartlagt genom er lange strenger av bokstavene A, T, G og C i en tilsynelatende tilfeldig rekkefølge. Kjedelig lesing for det utrente øyet, vil mange mene, men med hjelp fra avanserte dataprogram og erfarne operatører er det mulig å finne noe interessant i det tilsynelatende meningsløse virvaret av bokstaver: områdene i genomet som koder for proteinene (disse områdene kalles gener) og elementene som styrer når genene slås av og på. Arbeidet med å identifisere genene i lakselusens genom har akkurat begynt og foretas i samarbeid med Det europeiske bioinformatikk-institutt.

Hvordan bruker vi genomet?

I ”gamle” dager (for to–tre år siden) måtte en lakselusforsker som ønsket å jobbe med et spesielt lakselusgen prøve å finne genet med mer eller mindre målrettede metoder. Dette innebar mange timers arbeid på laboratoriet, dager med venting på analyseresultater – og mange mislykkede forsøk der en lurte på om det en søkte etter faktisk fantes. I dag er resultatet et par tastetrykk unna; man finner sekvensen for det aktuelle genet i et genom fra et annet dyr – for eksempel mennesket – og søker i lusens genom med dette. Så venter man et par sekunder og får en liste over områder i genomet som inneholder liknende gener. Siden disse genene er identifisert av dataprogrammer, hender det at de ikke er korrekte, og det er derfor viktig å kunne bekrefte at de faktisk finnes. Det gjøres ved å se på om genene som er identifisert i genomet faktisk brukes (figur 1). I påvente av den endelige analysen av genomet med hensyn på genidentifisering er det hovedsakelig på denne måten det rekonstruerte genomet, med stor suksess, benyttes i dag. Det er et sterkt verktøy som allerede har spart flere års arbeid i laboratoriet.

Hvordan kan genomet brukes i fremtiden?

Når analysene av genomets innhold er ferdig i løpet av året, har vi oversikt over hva det inneholder. Oversikten vil være ufullstendig siden en del elementer ikke kan gjenkjennes fordi de er nye og fordi en del av elementene som gjenkjennes vil ha ukjent funksjon. Likevel vil mye være kjent, og det er da den egentlige moroa starter! Da er det mulig å sammenlikne innholdet i lakselusens genom med innholdet i andre genomer for å få svar på grunnleggende spørsmål som: Har lakselusen gener som er viktige for å fordøye blod som ikke finnes i andre krepsdyr? Mangler lakselusen gener som finnes i frittlevende nærbeslektede organismer? Hvilke gener finnes det ekstra mange eller få av i lusens genom i forhold til andre genomer, og kan disse genene forklare hvordan lus klarer å manipulere laksens immunforsvar? Svarene på disse spørsmålene kan hjelpe oss å identifisere de genene som er essensielle for lakselusens suksess, og kan derfor gi en viktig pekepinn på hvilke prosesser vi bør prøve å påvirke når vi utvikler nye behandlingsmetoder.

Hvem sekvenserer lakselusens genom?

Sekvenseringen og analysene av lakselusens genom gjennomføres av Havforskningsinstituttet, Universitetet i Bergen, Senter for lakselusforskning, UniResearch, Max Planck Institute (Tyskland) og Universitetet i Victoria (Canada). Arbeidet finansieres av Havforskningsinstituttet, Senter for lakselusforskning, Marine Harvest og Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond.

