

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Innhold

Forord	5
Sammendrag	6
Abstract	7
1. Innledning	8
1.1 Slekten <i>Streptococcus</i>	8
1.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
1.2 Naturlig transformasjon.....	10
1.2.2 Naturlig transformasjon hos <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
1.3 Celleveggen hos bakterier.....	13
1.3.2 Syntese av peptidoglykan.....	16
1.3.3 FtsW.....	19
1.5 Mål for oppgaven.....	22
2. Materialer	23
2.1 Bakteriestammer.....	23
2.2 Liste over primere brukt i oppgaven.....	24
2.3 Vekstmedium.....	26
2.3.1 C-medium.....	26
2.3.2 Todd Hewitt Agar (THA).....	27
2.4 Løsninger og buffere.....	27
2.4.1 Løsninger til C-medium:.....	27
2.4.2 Løsninger og buffere til agarose gelelektroforese.....	29
2.4.3 Løsninger til bruk ved mikroskopering.....	30
2.5 Kit.....	30
2.6 Enzymer.....	30
2.7 Kjemikalieliste.....	31
2.8 Utstyrsliste.....	32
3. Metoder	34
3.1 Fremstilling av Δ ftsW og Δ rodA mutanter.....	34
3.1.1 Polymerase chain reaction.....	34
3.1.2 Agarose gelelektroforese.....	37
3.1.3 Isolering og rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel.....	38
3.1.4 Janus-kassett.....	38

3.1.5 Verifisering av transformanter	41
3.1.6 DNA-sekvensering	42
3.2 Studier av essensielle gener.....	45
3.2.1 Peptidregulert gen-depletion system for bruk i <i>S. pneumoniae</i>	45
3.2.2 Bruk av ComRS gendepletion systemet i <i>S. pneumoniae</i>	48
3.2.3 Fiksering av celler til mikroskopianalyser	49
3.2.4 Mikroskopering av fikserte celler	50
3.3 Test av antibiotika sensitivitet.....	51
3.4 Rensing av cellevegg.....	52
3.4.1 Dyrking av celler og rensing av cellevegg for analyse av celleveggstrukturen.....	52
3.4.2 Klargjøring av celleveggmateriale for High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	53
3.5 Bruk av et luciferase reporter-gen for å observere/overvåke genuttrykk.....	55
4. Resultater	57
4.1 FtsW	57
4.1.1 Konstruksjon av $\Delta ftsW$ mutanter.....	57
4.1.2 Knockout av <i>ftsW</i> i <i>S. pneumoniae</i>	60
4.1.5 Depletion av <i>ftsW</i> ekspresjon	60
4.1.6 Mikroskopering av <i>ftsW</i> -depletede celler	63
4.1.7 Lokalisering av lipid II ved fluorescens mikroskopi av celler depletet for FtsW	67
4.1.8 Reguleringen av uttrykket av <i>ftsW</i>	69
4.2 RodA	72
4.2.1 Konstruksjon av $\Delta rodA$ mutanter.....	72
4.2.2 Knockout av <i>rodA</i>	72
4.2.3 Fremstilling av $\Delta rodA$ mutant for gen-depletion studier	73
4.2.4 Depletion av <i>rodA</i> ekspresjon	74
4.2.5 Mikroskopering av $\Delta rodA$ mutanten.....	77
4.2.6 Knockout av <i>thiJ</i>	78
4.2.7 Antibiotikasensitivitet hos $\Delta rodA$ mutanten	79
4.2.8 Rensing av cellevegg og analyse av rensset cellevegg ved HPLC.....	84
5. Diskusjon.....	88
5.1 Genet <i>ftsW</i> er essensielt hos <i>S. pneumoniae</i>	88
5.2 FtsW deltar i celleveggsyntese i <i>S. pneumoniae</i>	89
5.3 Ekspresjonen av <i>ftsW</i> -genet påvirkes ikke av mangel på FtsW	90

5.4 <i>rodA</i> er ikke et essensielt gen i <i>S. pneumoniae</i>	91
5.5 Mangel på RodA påvirker sensitiviteten overfor forskjellige antibiotika	93
5.6 Depletion av <i>rodA</i> påvirker ikke peptidkomposisjonen i celleveggen til <i>S. pneumoniae</i>	94
5.7 Deltar RodA i celleveggsyntese?.....	95
5.8 Kan RodA og FtsW utføre den samme jobben i <i>S. pneumoniae</i> ?	96
6. Konklusjon og videre studier	97
7. Referanser	98

Forkortelser

aa	amino acid (aminosyre)
bp	basepar
CSP1	Competance Stimulating Peptid (kompetanse stimulerende peptid)
ComS*	Peptid Shp0316 – kompetanse stimulerende peptid i <i>S. thermophilus</i>
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dsDNA	double stranded DNA (dobbletrådet DNA)
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EtBr	Etidiumbromid
Km ^{S/R}	Kanamycin sensitiv/resistent
MQ	Milli-Q
OD	Optical Density
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potentia Hydrogenii
PG	PeptidoGlykan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sm ^{S/R}	Streptomycin sensitiv/resistent
ssDNA	single stranded DNA (enkeltrådet DNA)
Tm	smeltepunktet til et oligonukleotid

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved avdelingen for molekylær mikrobiologi ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB) på Ås. Laboratoriearbeidet ble utført i perioden fra august 2011 til april 2012.

Jeg må rette en stor takk til veilederne mine i arbeidet med denne oppgaven. Professor Leif Sigve Håvarstein som har kommet med gode innspill og forslag til mulige retninger for oppgaven underveis i arbeidet. Og forsker (post doc.) Daniel Straume som har vært til god hjelp underveis i hele prosessen med oppgaven, i alt fra det praktiske arbeidet på laboratoriet til skrivingen av oppgaven.

En stor takk også til de andre ansatte på avdelingen for hjelp på laboratoriet hele dette året.

Til slutt en stor takk til min kone Christine for å ha holdt ut med sene kvelder på laboratoriet og en krevende skrivprosess, og takk for all støtten du har gitt meg dette året.

Ås, 15. mai 2012

Christoffer Skjold Sørensen

Sammendrag

I denne oppgaven har funksjonen til proteinene FtsW og RodA hos bakterien *Streptococcus pneumoniae* blitt undersøkt. FtsW i *Escherichia coli* har nylig blitt identifisert som en flippase som transporter cellevegg precursore over cellemembranen (Mohammadi *et al.*, 2011). Genet *ftsW* er identifisert som et essensielt gen og lipid II er celleveggsprecursoren som FtsW transporterer over cellemembranen (Mohammadi *et al.*, 2011, Thanassi *et al.*, 2002). FtsW og RodA er homologe proteiner når det gjelder predikert proteinstruktur og proteinenes sekvens. Begge er integrert i cellemembranen og spiller en rolle i celledeling og cellevekst (Noirclerc-Savoie *et al.*, 2003). Målet med denne studien var å undersøke om de to proteinene utfører den samme jobben hos *Streptococcus pneumoniae* som i *Escherichia coli*. Kunnskap om bakteriers celleveggsyntese er et område av mikrobiologien hvor det arbeides mye, men som fremdeles er ganske lite utforsket. Med de stadig økende problemene rundt antibiotika resistens hos mange bakterietyper er celleveggsyntese et viktig forskningsområde for fremtiden og kunnskap om syntese av cellevegg hos bakterier og de mekanismer og proteiner som er involvert vil kunne åpne opp for utviklingen av nye antimikrobielle agenter.

I dette arbeidet ble *ftsW* identifisert som et essensielt gen i *S. pneumoniae*. Det ble observert en hemming av veksten til *S. pneumoniae* når cellene ble depletet enten for FtsW eller RodA. Denne effekten var kraftigst for det essensielle proteinet FtsW. Mikroskopering av de depletede cellene avslørte to karakteristiske fenotyper. Den første var avlange celler som var mer enn 3 μm i diameter og den andre var sitronlignende celler som var oppsvulmet ved cellenes septum.

Det ble ikke observert en karakteristisk fenotype for *S. pneumoniae* som vokste uten ekspresjon av *rodA*. Men veksten til cellene ble tydelig påvirket av mangel på dette proteinet. Resultater viste en tydelig effekt på sensitiviteten til *S. pneumoniae* overfor ulike antibiotika når uttrykket av RodA ble endret. Det var en gradvis økning i sensitiviteten for antibiotikaene desto lavere transkripsjonen av genet *rodA* var.

Proteinene som det essensielle genet *ftsW* koder for (FtsW) deltar i celleveggsyntesen i *S. pneumoniae*. Mangel på det homologe proteinet RodA påvirker også celleveksten til bakterien og fører til økt sensitivitet overfor ulike typer antibiotika. Antagelig deltar også RodA i celleveggsyntesen i *S. pneumoniae*.

Abstract

The purpose of this study has been to investigate the two membrane proteins FtsW and RodA in the Gram-positive bacteria *Streptococcus pneumoniae*. FtsW has recently been identified as a transporter of the cell wall precursor lipid II (Mohammadi *et al.*, 2011). The gen *ftsW* is an essential gene in *S. pneumoniae*. FtsW and RodA is homologous proteins in terms of amino acid sequence and protein structure and, are involved in the process of cell wall synthesis and plays an important role in cell growth and cell division (Thanassi *et al.*, 2002, Noireclerc-Savoie *et al.*, 2003). The aim of this study was to determine if the two proteins are capable of catalyzing the same reaction in *S. pneumoniae* as in *Escherichia coli*. Knowledge about cell wall synthesis in bacteria is an area where much is yet to be discovered and much work are being done at the moment. With the observed increase in resistance towards many different antibiotics, knowledge about cell wall synthesis and the mechanisms involved will probably be an important field of research in years to come. Information about the mechanisms and proteins involved in synthesis of cell wall will help discovery new antimicrobial agents.

In this study *ftsW* has been identified as an essential gen in *S. pneumoniae*. A growth reduction in *S. pneumoniae* was observed when cells were depleted either of FtsW or RodA. This effect was strongest for the protein FtsW. Microscopy of depleted cells revealed two distinct phenotypes; (I) cells longer than 3 μm and (II) a lemon like cell with an enlarged septum. No distinct phenotype was observed when cells were grown without expression of *rodA*. Results showed an increased sensitivity towards different antibiotics when the transcription of *rodA* was gradually reduced.

The protein FtsW is involved in cell wall synthesis in *S. pneumoniae*. Lack of the homologous protein RodA also showed an effect on cell growth and increased effect of different antibiotics. RodA is probably also involved in cell wall synthesis.

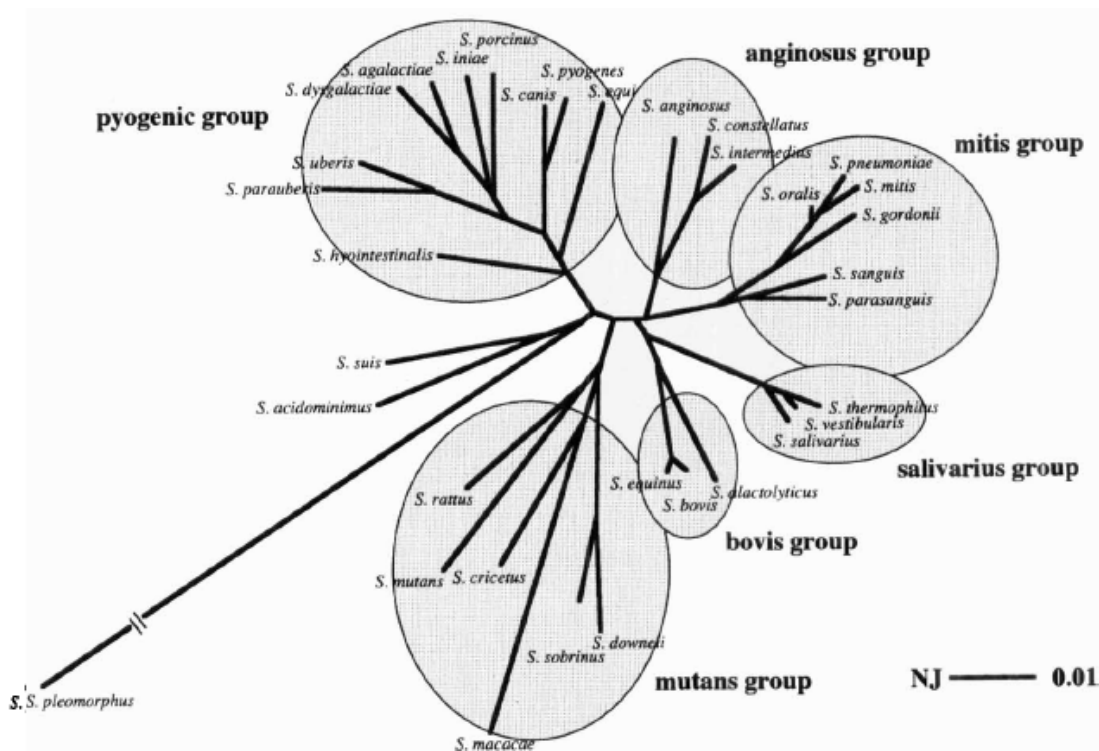
1. Innledning

1.1 Slekten *Streptococcus*

Bakterien *Streptococcus pneumoniae* er en viktig human patogen bakterie som til enhver tid koloniserer nesesvelg området hos 10 % av voksne og 20-40 % av barn hos den menneskelige populasjon. Den forårsaker ca. 100 millioner infeksjoner globalt per år hvorav 1-2 millioner har dødelig utfall (Poll and Opal, 2009)

Arten *Streptococcus* og dens medlemmer tilhører slekten *Streptococcaceae* som er en del av familien *Lactobacillales*. *Lactobacillales* tilhører klassen Bacilli som er en del av fylumet Firmicutes.

Organiseringen av *Streptococcus* har endret seg flere ganger opp igjennom tiden, men i dag er de rundt 40 artene i *Streptococcus* delt inn i seks forskjellige grupper vist i Figur 1.1. Denne organiseringen er basert på studier av 16S rRNA hos 34 forskjellige *Streptococcus* arter (Kawamura *et al.*, 1995). De seks gruppene er pyogenic, anginosus, mitis, salivarius, bovis og mutans.



Figur 1.1: Figuren viser det fylogenetiske treet til slekten *Streptococcus*. Vi kan se hvordan slekten er delt inn i seks forskjellige grupper. *S. pneumoniae* tilhører mitis gruppen. Figuren er hentet fra Kawamura *et al.* (1995).

Bakteriene i slekten *Streptococcus* er Gram-positive, cellene er ovale og er som regel organisert i par eller i korte kjeder med varierende lengde. Betegnelsen “kokker” brukes også

om den runde litt ovale strukturen på cellene. Streptokokker er ikke bevegelige og de er heller ikke sporedannende. Bakteriene er katalse negative og fakultativt anaerobe organismer (Hardie and Whiley, 1997).

1.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae tilhører mitis gruppen (Figur 1.1) hvor de fleste artene kan finnes i øvre del av respirasjonstrakten, munnhulen og tarmsystemet hos mennesker hvor de lever i samspill med verten uten å skade den. Selv om disse artene normalt ikke skader verten er flere av artene opportunistiske patogener og kan føre til infeksjoner spesielt hos personer med svekket immunforsvar (Hardie and Whiley, 1997). Blant annet står infeksjoner forårsaket av *S. pneumoniae* bak et stort antall dødsfall i verden hvert eneste år. I den industrialiserte verden er infeksjoner av *S. pneumoniae* den infeksjonssykdommen som årlig krever flest menneskeliv. Lungebetennelse og hjernehinnebetennelse er to av de alvorlige sykdommene som bakterien kan forårsake (Poll and Opal, 2009, Johnsborg *et al.*, 2008).

Behandling med antibiotikumet penicillin har vært den foretrukne måten å behandle en infeksjon av *S. pneumoniae* på siden 1940-tallet. De siste årene er det dessverre observert en kraftig økning i antallet tilfeller av antibiotika resistente Pneumokokker verden over. Dette er et stadig økende problem og tilfeller av såkalt multiresistens, det vil si resistens mot to eller flere antimikrobielle stoffer, har også blitt registrert. (Johnsborg *et al.*, 2008, Poll and Opal, 2009)

Årsaken til den økte forekomsten av antibiotikaresistente bakterier har sammenheng med økt bruk av antibiotika mot infeksjoner. Ofte foreskriver leger antibiotika mot infeksjoner som kroppens immunforsvar vil kurere på egenhånd. Denne overhyppigheten av antibiotikabruk påfører bakterier et seleksjonspress der stammer som har økt resistens mot antibiotika selekteres for. Dette kan i verste fall føre til at dødeligheten til sykdommer som lungebetennelse vil øke fordi behandling med antibiotika blir virkningsløst (Nordli and Torjusen, 2012)

Polysakkaridkapselen hos *S. pneumoniae* er den viktigste virulensfaktoren til bakterien og spiller en viktig rolle ved invaderingen og koloniseringen av luftveiene hos verten (Poll and Opal, 2009). Derfor er de fleste vaksiner mot *S. pneumoniae* rettet mot polysakkaridkapselen hos bakterien. Bruk av kapselbaserte vaksiner har vært relativt vellykket, men det har vist seg at serotyper som ikke er inkludert i vaksinene oftere og oftere dukker opp i kliniske isolater (Sham *et al.*, 2012).

Sett i lys av disse to eksemplene er utviklingen av nye mål/targets for antimikrobielle agenter et viktig område innenfor mikrobiell forskning. Forskning på essensielle proteiner involvert i celleveggsyntese og celledeling kan vise seg å være nye og gode kandidater med tanke på mål for nye antibiotika og/eller for nye vaksiner som kan gi immunitet mot et bredere spektrum av pneumokokkstammer enn den 9-valente konjugatvaksinen som brukes i dag (Sham *et al.*, 2012).

Økningen av antibiotika resistens som observeres for pneumokokker skyldes flere ting, men noe av det viktigste er evnen *S. pneumoniae* har til å overføre/ta opp gener fra beslektede pneumokokker. Eksempel på gener som bakteriene kan overføre er gener som gir økt antibiotika resistens, noe som bidrar til å øke problemet man har med antibiotika resistente stammer (Hakenbeck, 2000). Denne evnen til å overføre gener mellom bakterier kalles naturlig genetisk transformasjon og er en mekanisme som er studert i flere ulike bakterier, men spesielt godt i *S. pneumoniae* (Johnsborg *et al.*, 2008).

1.2 Naturlig transformasjon

Naturlig genetisk transformasjon ble først beskrevet av Fred Griffith i 1928. Griffiths arbeid gikk i utgangspunktet ut på å finne ut hva det var som lagret genetisk informasjon i organismer. Hans forsøk satte kursen for senere forskning som avslørte at DNA faktisk er arvematerialet som bærer informasjonen som gir bakterier (og andre organismer) sine ulike egenskaper.

I 1928 forsket Griffith på *S. pneumoniae* og det var i denne bakterien han observerte naturlig genetisk transformasjon første gang. Han arbeidet med to forskjellige stammer av *S. pneumoniae*, en virulent stamme kalt S-stamme og en ikke-virulent stamme kalt R-stamme. Når han injiserte den ikke-virulente R-stammen i mus så han at musene forble levende. Når han injiserte den virulente S-stammen i mus døde derimot musene. Den tredje observasjonen var at når han injiserte mus med bakterier fra S-stammen etter at de var drept med varme overlevde musene. Den interessante observasjonen var at når Griffith injiserte musene med varmedrepte bakterier fra S-stammen og levende bakterier fra R-stammen så døde også musene. I tillegg til at musene døde kunne han isolere levende virulente bakterier fra de døde musene. Denne overgangen fra ikke-virulente bakterier til virulente kalte han transformasjon (Willey *et al.*, 2008).

Seksten år senere (1944) publiserte Oswald Avery og hans kollegaer resultater fra studier hvor de hadde undersøkt hvilken bestanddel i de varmedrepte pneumokokkene som ble overført i Griffiths transformasjonsforsøk. I dette forsøket brukte også forskerne en virulent S-stamme og en ikke-virulent R-stamme. Bakterier fra S-stammen ble varmedrept slik som tidligere og DNA-ekstrakt fra disse cellene ble blandet med levende celler fra R-stammen og innkubert slik at bakteriene kunne bli transformert. Deretter ble prøvene tilsatt antistoffer som reagerte med R-celler som ikke hadde blitt transformert slik at disse felte ut ved sentrifugering ved lav hastighet. Til slutt ble prøvene sådd ut på plater for å dyrke opp R-celler som hadde blitt transformert til S-celler. Før hver transformering ble DNA-ekstraktet fra S-cellene tilsatt enten DNase, RNase eller protease. Det vil si at enten var DNAet, RNAet eller proteinene i DNA ekstraktet fra S-cellene ødelagt. Resultatet var at kun i de prøvene hvor DNAet var blitt ødelagt ble transformasjonen hindret. Dette var de første bevisene på at det var DNA som overførte den genetiske informasjonen i Griffiths transformasjonsforsøk (Willey *et al.*, 2008).

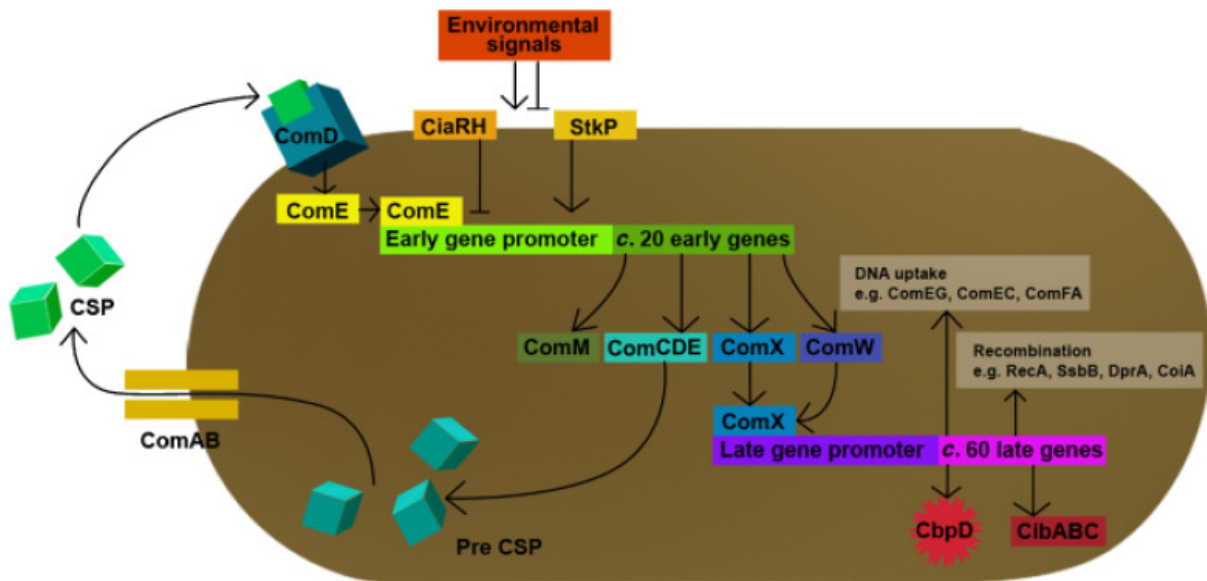
Siden den gang har naturlig genetisk transformasjon blitt nøye studert og i dag vet man veldig mye om hvilke mekanismer som står bak opptak og rekombinasjon av ekstracellulært DNA hos bakterier. Naturlig genetisk transformasjon er en av tre mekanismer som bidrar til såkalt horisontal genoverføring mellom bakterier.

1.2.2 Naturlig transformasjon hos *Streptococcus pneumoniae*

Naturlig transformasjon er godt studert hos bakterier fra slekten *Streptococcus* og spesielt hos arten *S. pneumoniae*. Hos *S. pneumoniae* er et essensielt steg for opptak, prosessering og rekombinasjon av DNA å uttrykke den alternative sigmafaktoren ComX. ComX vil aktivere transkripsjon av gener som er nødvendige for opptak og rekombinering av exogent DNA (Johnsborg and Håvarstein, 2009b, Johnsborg *et al.*, 2007). Figur 1.2 er hentet fra Johnsborg og Håvarstein (2009) og viser en skjematisk fremstilling av hvordan kompetanse reguleres i *S. pneumoniae*.

Hos genetisk transformerbare bakterier blir kompetanse indusert av cellulære og/eller miljømessige faktorer som for eksempel peptider cellene skiller ut. Hos *S. pneumoniae* blir kompetanse indusert av det sekreterte kompetansestimulerende peptidet CSP1. Reseptoren ComD gjenkjenner CSP1 i omgivelsene og når den ekstracellulære konsentrasjonen av CSP1 når ett visst nivå vil det trigge autofosforylering av ComD som da aktiverer responsregulatoren ComE. ComE aktiverer transkripsjonen av spesifikke gener som er ansvarlig for

induseringen av kompetanse hos *S. pneumoniae* (Johnsborg and Håvarstein, 2009b, Johnsborg et al., 2007).



Figur 1.2: En skjematisk fremstilling av kompetanseregulering hos *Streptococcus pneumoniae*. Figuren er hentet fra Johnsborg og Håvarstein (2009b).

ComE aktiverer transkripsjonen av rundt 20 såkalte early genes. Disse early genes inneholder blant annet promotorer som fremmer transkripsjonen av immunitetsfaktoren ComM (gir beskyttelse mot den kompetanseinduserte murein hydrolasen CbpD, se nedenfor) og regulatoren ComX. Transkripsjon av den alternative sigmafaktoren ComX fører til uttrykkningen av rundt 60 late genes. Produktene fra disse genene er nødvendige for opptak og rekombinasjon av DNA (Johnsborg and Håvarstein, 2009b).

Fratricide

Blant late genes finner vi genet som koder for CbpD, dette proteinet er en murein hydrolase. Sammen med de to proteinene LytA og LytC som også er murein hydrolaser og uttrykkes konstitutivt sørger disse proteinene for at beslektede bakterier lyses. Dette er kjent som en mekanisme som kalles fratricide (broderdrap). Kompetente *S. pneumoniae* celler er i stand til og lysere ikke-kompetente beslektede celler i omgivelsene. Når cellene blir kompetente produseres også immunitetsproteinene ComM som gjør at kompetente celler ikke lyses (Johnsborg and Håvarstein, 2009b).

Det tenkes at fratricide er en mekanisme for å øke mengden ekstracellulært DNA fra beslektede celler i omgivelsene. Kompetanse induseres når mengden CSP1 i omgivelsene når

et kritisk punkt. Ved å lysere beslektede bakterier sørger bakteriene for at det tilgjengelige ekstracellulære DNA stammer fra beslektede bakterier fremfor fra tilfeldige døde bakterier. Opptak av DNA fra fjernt beslektede bakterier med liten grad av homologi vil ofte være mer skadelig enn fordelaktig, derfor er det å øke mengden homologt DNA i omgivelsene en fordelaktig handling (Johnsborg *et al.*, 2007, Johnsborg and Håvarstein, 2009b).

Størrelsen på genomene hos pneumokokker ser ut til å ha en øvre begrensning ved 2,2 Mbp. Dette begrenser metabolske muligheter og tilpasningsdyktighet overfor omgivelsene, men reduserer kostnadene ved replikasjon og vedlikehold av et stort genom. Dette kompenseres for ved at pneumokokker har mekanismene fratricide og naturlig genetisk transformasjon. Ved å kunne ta DNA fra nært beslektede bakterier har pneumokokkene tilgang på et såkalt supragenom som inneholder varianter av gener bakterien ikke har i sitt kromosom (Johnsborg *et al.*, 2007).

Økningen i resistens mot penicillin som er observert er et eksempel på hvordan pneumokokkene kan dra nytte av et slikt supragenom. På samme måte har det også blitt observert tilfeller av capsular switching som gjør pneumokokkene i stand til å unnsnippe de vaksinene som er utviklet mot *S. pneumoniae*.

1.3 Celleveggen hos bakterier

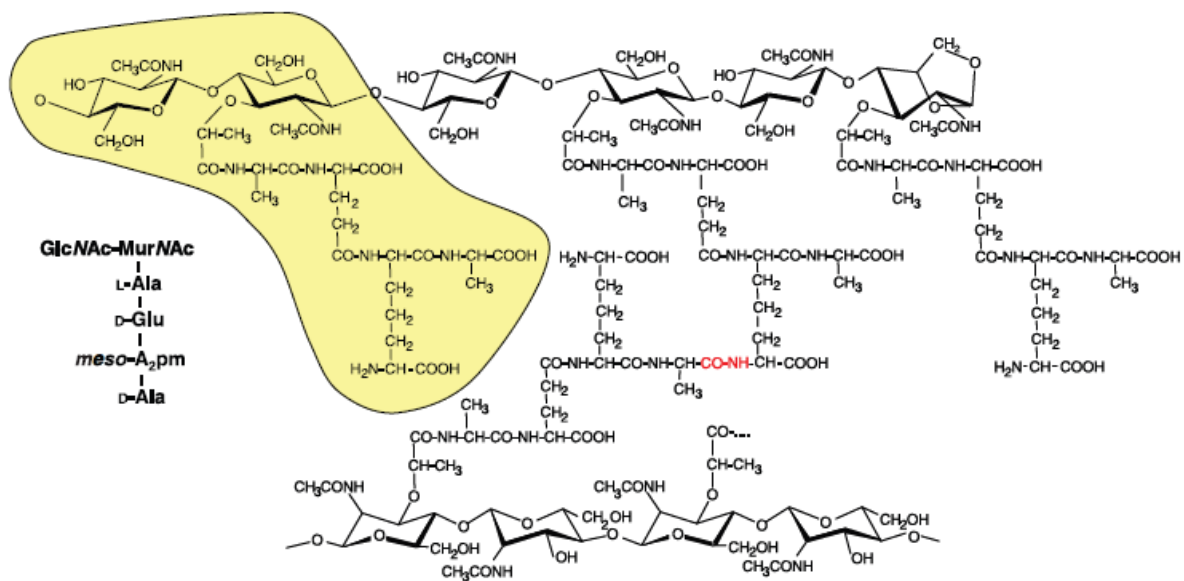
Celleveggen er essensiell for de fleste bakterier og den er med på å bestemme formen på cellen, gir bakteriene mekanisk styrke til å motstå det indre trykket fra cellene og det ytre trykket fra omgivelsene. En helhetlig cellevegg er viktig for cellenes levedyktighet. Celleveggen må i tillegg delta i et stort antall fysiologiske prosesser blant annet opptak av diverse substrater, cellevekst og celledeling, adhesjon til overflater, opptak av DNA under naturlig transformasjon og autolyse (Vollmer *et al.*, 2008, Scheffers and Pinho, 2005).

Celleveggen er den viktigste delen av en celle når det gjelder å motstå stress og opprettholde cellens form og inhibering av celleveggsyntese under cellevekst enten med antibiotika eller som følge av mutasjoner vil føre til lysis av cellen. Det samme vil være resultatet ved spesifikk degradering av celleveggen for eksempel av lysozymer under cellevekst (Vollmer *et al.*, 2008, Scheffers and Pinho, 2005).

Hovedbestanddelen i en bakteriell cellevegg er peptidoglykan (PG). Dette makromolekylet danner reisverket i celleveggen hos både Gram-positive og Gram-negative bakterier.

Peptidoglykan er en polymer bestående av lange glykankjeder som er krysslinket via fleksible peptidbroer, murein er en annen betegnelse som brukes på peptidoglykan (PG) (Scheffers and Pinho, 2005, Vollmer *et al.*, 2008). Sammen blir denne strukturen bestående av glykankjeder og peptidbroer sterk, men samtidig elastisk og kan beskytte det underliggende protoplast fra å lysere som følge av det osmotiske trykket. Glykankjedene er bygget opp av subenhetene *N-acetylglucosamine* (GlcNAc) og *N-acetylmuramic acid* (MurNAc), bundet sammen via β -1,4 bindinger (Figur 1.3) (Scheffers and Pinho, 2005, Vollmer *et al.*, 2008).

D-lactoyl gruppen på MurNAc er byttet ut med en peptidstamme som oftest er satt sammen av *L-Ala*- γ -*D-Glu*-*meso-A*₂*pm*-*D-Ala*-*D-Ala*. Den c-terminale *D-Ala* enheten er fjernet i det ferdige makromolekylet. Kryssbindingene av glykankjedene skjer som regel mellom karboksylgruppen til *D-Ala* i posisjon 4 og aminogruppen til diaminosyren i posisjon 3 (Vollmer *et al.*, 2008).



Figur 1.3: Figuren viser strukturen til peptidoglykan hos *E. coli*. Det gule området representerer en monomer i peptidoglykan strukturen. Figuren er hentet fra W. Vollmer *et al.* (2008)

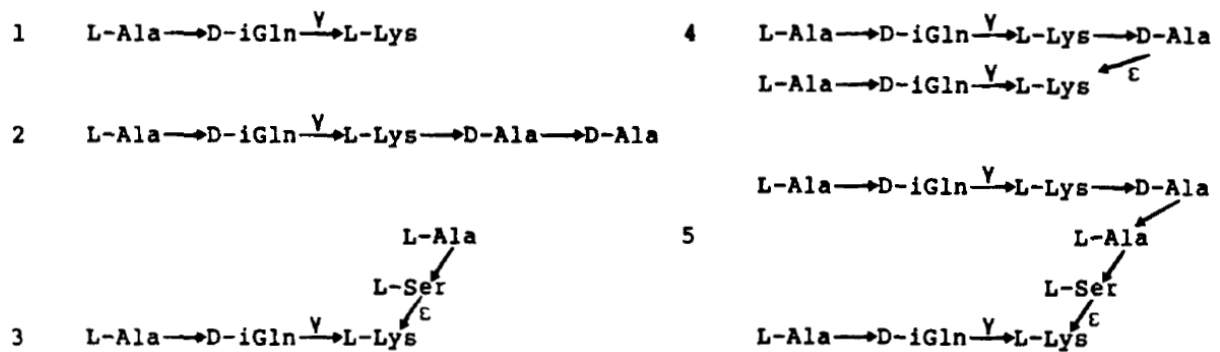
Figur 1.3 viser strukturen til peptidoglykan hos *E. coli*. Området som er markert med gult og er beskrevet over er monomeren som peptidoglykan er bygget opp av. Den strukturelle sammensetningen som er beskrevet i figuren og over er felles for alle bakterier hvor strukturen av peptidoglykan er kjent, men det finnes forskjellige grader av variasjon i

sammensetningen av peptidstammen, glykankjedene og peptidbroene som binder sammen glykankjedene (Vollmer *et al.*, 2008).

Oppbygningen av glykankjedene varierer forholdsvis lite mellom bakterier, men det er stor variasjon blant bakterier når det gjelder sammensetningen av peptidene som danner peptidbroene. Det er stor variasjon også når det gjelder lengden på glykankjedene, både innad i hver enkelt celle og ikke minst mellom forskjellige bakteriearter, for eksempel har *Staphylococcus aureus* maksimum 23 til 26 disakkaridenheter per glykantråd i sitt peptidoglykan, mens *Bacillus subtilis* har over 100 disakkaridenheter per glykantråd i sin cellevegg. Peptidoglykan strukturen er veldig lik hos Gram-positive og Gram-negative celler bortsett fra tykkelsen på PG laget. Celleveggen hos Gram-positive er minst 10-20 lag tykk, mens hos Gram-negative celler er den bare 1-3 lag tykk (Vollmer *et al.*, 2008).

Oppbygning av cellevegg i pneumokokker

Som for alle eubacteria består celleveggen til pneumokokker av murein som er bygget opp av glykankjeder bundet sammen av korte peptidkjeder. Peptidkjedene som danner kryssbindinger i murein-laget er bundet til lactyl-gruppen på MurNAc i glykankjeden. Peptidkjedene er syntetisert som lineære pentapeptider med sekvensen L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Forgreining av pentapeptidene skjer ved at et dipeptid av enten L-Ser-L-Ala eller L-Ala-L-Ala bindes til L-Lys enheten på posisjon 3 i pentapeptidet og D-Ala-D-Ala i posisjon 4 og 5 fjernes. Disse forgreinede enhetene deltar ikke i kryssbindinger i peptidoglykanlaget og kalles derfor monomerer. Peptidene som danner kryssbindinger kalles dimerer eller trimerer avhengig av om de har en eller to kryssbindinger. Kryssbindinger mellom to eller tre peptidkjeder skjer ved dannelse av peptidbindinger mellom alanin-enheten i posisjon 4 på et pentapeptid og lysin-enheten i posisjon 3 på det andre pentapeptidet. Kryssbindingen skjer som regel ved at et dipeptid av L-Ser-L-Ala settes inn mellom de to peptidkjedene, men kryssbindingen mellom to peptidkjeder skjer også uten at det settes inn et dipeptid (Hakenbeck and Chhatwal, 2007, Garcia-Bustos *et al.*, 1987).



Figur 1.4: Figuren viser fem av de forskjellige peptidkjedene man finner i celleveggen til *S. pneumoniae*. Peptidene 1-3 er monomerer som ikke er kryssbundet til andre peptider, mens peptidene 4 og 5 er eksempler på dimerer som har dannet en kryssbinding til en annen peptidkjede. Numrene på peptidene stammer fra et studie av cellevegg fra *S. pneumoniae* med HPLC og massespektroskopi. Nummereringen angir hvilken rekkefølge toppene til de ulike peptidene kommer på kromatogram etter HPLC. Figuren er hentet fra Garcia-Bustos *et al.* (1987).

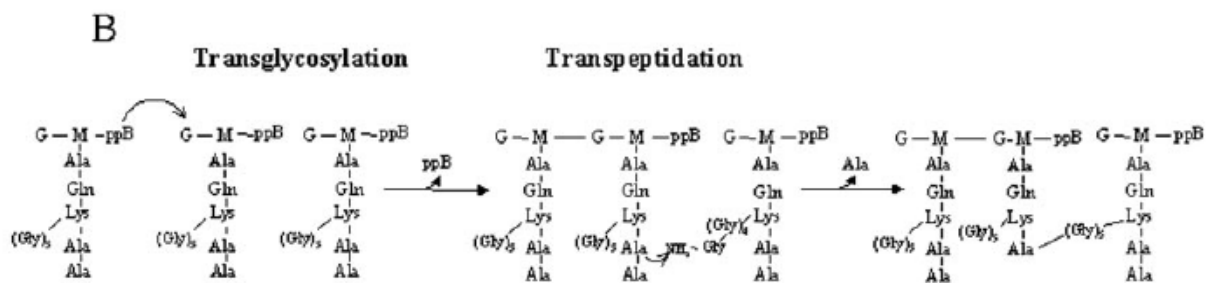
Variasjonen i oppbygningen av peptidene i peptidoglykanlaget er stor blant pneumokokker. Særlig er det observert variasjoner når det gjelder forholdet mellom forgreinede og lineære peptider. Noen stammer har veldig høy andel av forgreinede peptider, mens andre har en mer jevn fordeling mellom forgreinede og lineære peptider. Nå andelen forgreinede peptider er veldig høy anses det som unormalt og ofte er dette observert hos penicillin resistente stammer (Hakenbeck and Chhatwal, 2007).

1.3.2 Syntese av peptidoglykan

Syntese av bakteriell cellevegg er en komplisert prosess som ennå ikke er fullstendig forstått, men basert på den informasjon man har tilgjengelig deler man syntesen av peptidoglykan inn i tre forskjellige trinn. De tre trinnene skjer på forskjellige steder og involverer forskjellige substrat, eller byggesteiner, og forskjellige proteiner. Det første trinnet er det som fører til syntesen av de to precursorene UDP-N-acetylmuramyl-pentapeptide og UDP-N-acetylglucosamine. Dette trinnet skjer i cellens cytoplasma (Scheffers and Pinho, 2005). Det andre trinnet skjer i cytoplasmamembranen og fører til dannelse av precursor lipider som er mellomprodukter på veien mot GlcNAc og MurNAc. Phospho-MurNAc-pentapeptid delen av UDP-MurNAc-pentapeptid blir overført til bactoprenol som er en membranakseptor noe som gir lipid I [MurNAc-(pentapeptid)-pyrophosphoryl-undecaprenol]. Deretter blir GlcNAc fra UDP-GlcNAc satt til lipid I noe som gir lipid II [GlcNAc-β-(1,4)-MurNAc-(pentapeptide)-pyrophosphoryl-undecaprenol] som er substratet for polymeriseringsreaksjonen av celleveggen hos bakterier som har direkte krysslinket peptidoglykan (Scheffers and Pinho, 2005).

Cellene bruker et molekyl slik som bactoprenol for å transportere de hydrofile precursorene fra innsiden av cellen gjennom den hydrofobe membranen og til utsiden hvor de kan inkorporeres i det voksende peptidoglykanlaget skjer. Det er viktig for bakteriene at translokasjonen av lipid II til utsiden av cellemembranen skjer ved en hastighet som er høy nok til at syntesen av peptidoglykan ikke hemmes. FtsW er et av proteinene som er ansvarlig for denne translokasjonen, en såkalt flippase, RodA og andre homologe proteiner er også kandidater til denne jobben (Scheffers and Pinho, 2005, Mohammadi *et al.*, 2011).

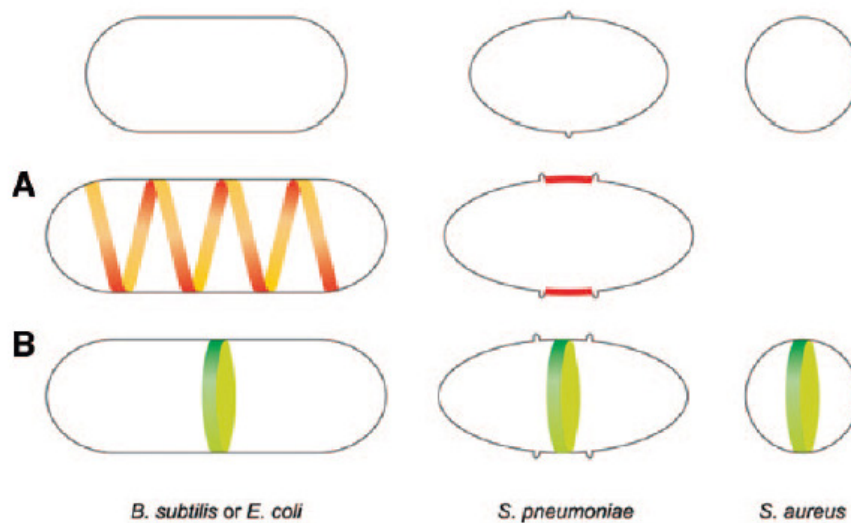
Det tredje trinnet i PG syntese består av polymeriseringen av disakkaridpeptid enhetene og inkorporering i det voksende PG. Dette trinnet skjer på utsiden av cellemembranen og utføres hovedsakelig av penicillinbindende proteiner (PBP) som katalyserer de to reaksjonene som danner glykosidbindinger og peptidbindinger i PG (Scheffers and Pinho, 2005). PBP hører til en familie av acyl serin transferaser, som deles i forskjellige grupper. Penicillin bindende proteiner klassifiseres basert på størrelse som høy molekylær masse (HMW PBPs) og penicillin bindende proteiner med lav molekylær masse (LMW PBPs). Enzymene som tilhører gruppen HMW PBPs lokaliseres på utsiden av cytoplasmamembranen. Den N-terminale enden er forankret i cytoplasmamembranen mens den C-terminale enden som katalyserer kryssbindingen av PG peptidene sitter på utsiden av cytoplasmamembranen (Scheffers and Pinho, 2005). HMW PBPs deles inn i to grupper; A og B avhengig av egenskapene til den N-terminale enden. Klasse A HMW PBPs har transglykosylase aktivitet (dannelse av glykosidbindingene i den voksende glykankjeden) som gjør de i stand til både å elongere glykankjeden og danne kryssbindinger mellom peptidene. PBP1a og PBP1b i *E. coli* er eksempler på HMW klasse A PBPs (Scheffers and Pinho, 2005).



Figur 1.5: Figuren viser de to prosessene som sørger for elongering av glykankjeden og kryssbinding i peptidoglykan. Transglykosylering er bindingen av en PG monomer til den voksende glykankjeden (til venstre i figuren). Transpeptidering er dannelsen av kryssbinding mellom to peptidstammer (til høyre i figuren over). Figuren er hentet fra Scheffers og Pinho (2005).

Lokalisering av peptidoglykan syntese

Bakterier som er stavformede antas å ha to typer cellevegg syntese, en som deltar i elongeringen av cellen og en som deltar i dannelsen av septum ved deling. Dette stemmer overens med observasjoner i *E. coli* og *B. subtilis* hvor elongerings spesifikke PBPs og delings spesifikke PBPs er identifisert. Noen kokker som for eksempel *S. aureus* ser ut til å ha PG syntese kun ved septum, mens *S. pneumoniae* som har en litt oval form ser ut til å ha PG syntese både ved septum og ved de såkalte ekvatoriale ringene, se Figur 1.6 (Scheffers and Pinho, 2005, Zapun *et al.*, 2008).



Figur 1.6: Figuren viser hvor inkorporeringen av ny PG skjer hos tre bakterier med forskjellig fasong. Figurene i linje A viser den perifere celleveggsyntese, markert i rødt som vi finner i stavformede bakterier og ovokokker, men ikke i ekte runde bakterier som for eksempel *S. aureus*. B viser celleveggsyntese ved dannelsen av septum, markert med grønn farge. Figuren er hentet fra Scheffers og Pinho (2005).

I en omfattende studie av lokaliseringen av HMW PBPs i *S. pneumoniae* ble det funnet tre forskjellige mønstre. PBP1a og PBP2x viste en lokalisering ved septum mens PBP2a og PBP2b viste begge en lokalisering ved de ekvatoriale ringene. Det tredje mønstret viste PBP1b med både septal (60 % av tilfellene) og ekvatorial (40 % av tilfellene) lokalisering, men samtidig septal og ekvatorial lokalisering ble ikke observert i noen celler. Dette indikerte at cellen har to sett med PBPs som er ansvarlig for to typer celleveggsyntese i *S. pneumoniae* noe som ligner mer på det man ser i stavformede bakterier enn det man ser i "ekte" kokker som *S. aureus* (Scheffers and Pinho, 2005).

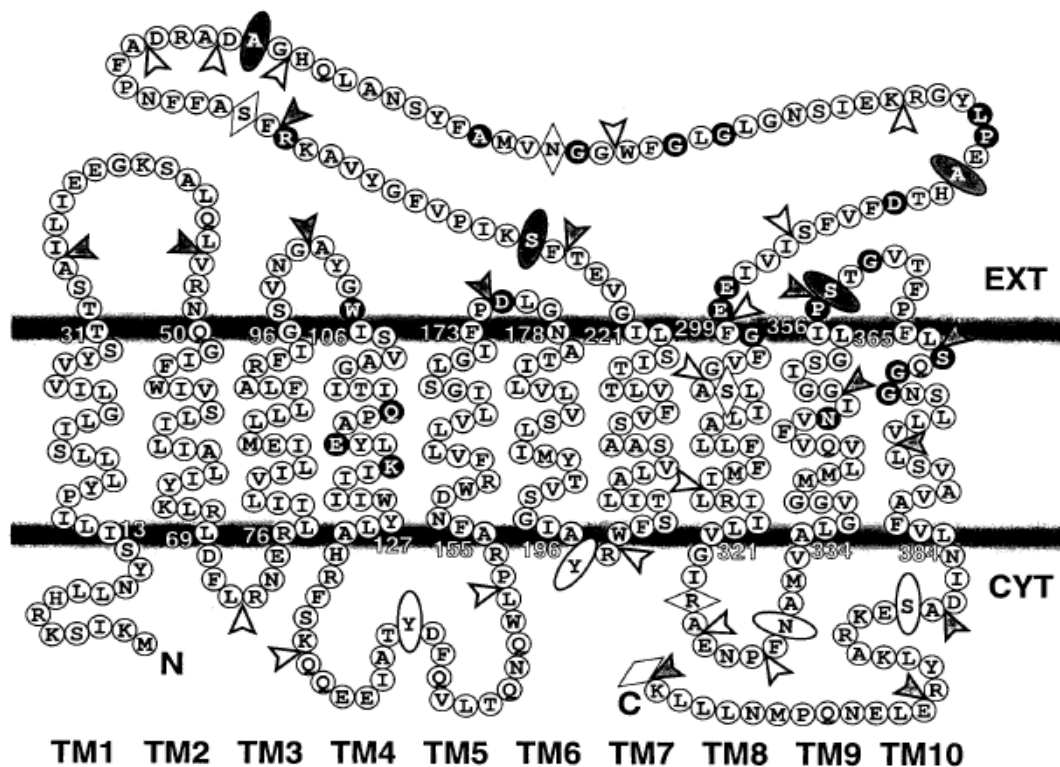
I tillegg til de penicillinbindende proteinene (PBPs) så krever PG syntese trolig også andre såkalte SEDS proteiner (shape, elongation, division og sporulation). SEDS proteiner er proteiner som er integrert i membranen og har segmenter som spenner gjennom membranen.

Det antas at disse proteinene deltar i PG syntese noe som også illustreres ved at de ofte er organisert i operon sammen med klasse B PBPs og at fjerning av enten SEDS proteinet eller dets beslektede klasse B PBP resulterer i lignende fenotyper. Fenotypene til FtsW og RodA mutanter indikerer at FtsW er SEDS proteinet involvert i celledeling mens RodA kreves for elongering av cellene (Zapun *et al.*, 2008).

1.3.3 FtsW

FtsW er nylig blitt identifisert som en transporter av lipid II, som bærer celleveggsprecursoren bestående av GlcNAc og MurNAc med en peptidkjede (Mohammadi *et al.*, 2011). Mohammadi *et al.* (2011) viste dette ved hjelp av membranvesikler fra *E. coli*. De viste også at rensset FtsW økte transporten av lipid II over en membran også for modellmembraner. Genet *ftsW* er identifisert som en del av et *dcw* (division og cell wall) cluster som inneholder gener nødvendige for syntese av peptidoglykan og celledeling (Gérard *et al.*, 2002, Mohammadi *et al.*, 2011). Gérard *et al.* (2002) predikerte topologien til FtsW hos *S. pneumoniae* (Figur 1.7) ved hjelp av beregningsmetoder, alkaline phosphatase fusion og cysteine tilgjengelighets teknikker.

Basert på sekvens alignment, hydrophaty profiles og de eksperimentelle metodene foreslår forskerne en struktur på FtsW (Figur 1.7) som innebærer 10 områder som spenner over membranen, en lang ekstracellulær sløyfe og med både den N-terminale og C-terminal enden lokalisert i cytoplasma (Figur 1.7) (Gérard *et al.*, 2002). De foreslåtte membranspennende områdene inneholder mellom 19 og 23 aminosyrer. Ladninger er organisert slik at de følger den positive innside regelen, som betyr at basiske aminosyrer i hovedsak er plassert i cytoplasma, mens de sure aminosyrene er mer jevnt fordelt (Gérard *et al.*, 2002).

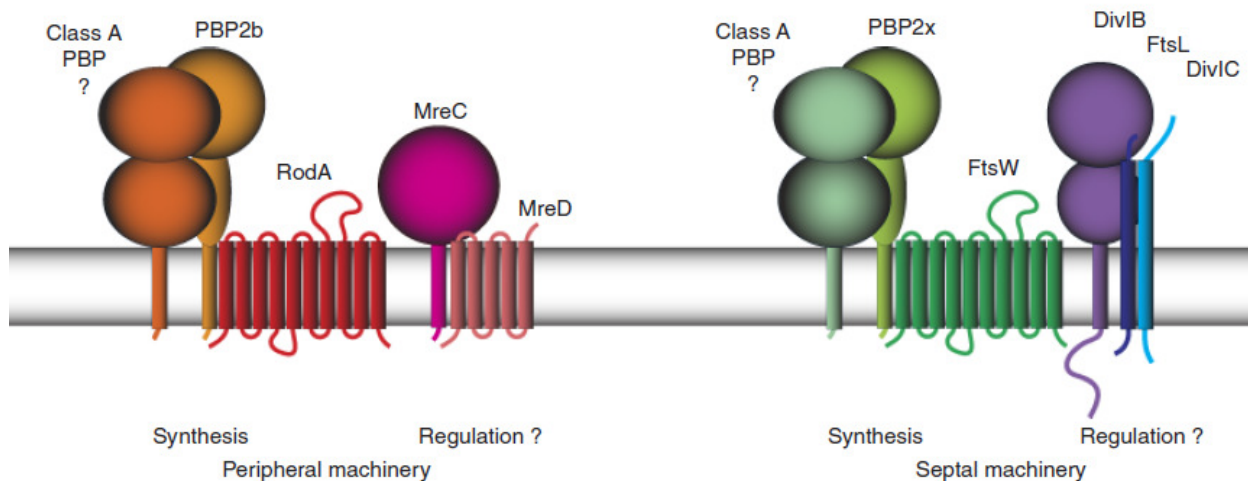


Figur 1.7: Figuren viser en foreslått modell for topologien til FtsW i *S. pneumoniae*. Proteiner har 10 membranspennende områder og både C- og N-terminal ende inne i cytoplasma. Figuren er hentet fra Gérard *et al.* (2002).

Det er nærliggende å tenke seg at den store ekstracellulære sløyfen spiller en viktig rolle for at proteinet skal kunne fungere som en flippase for lipid II. Den består av 77 aminosyrer mellom TM7 og TM8 (TM, transmembrane domain, som betyr membranspennende område) og det antas at dette område er involvert i interaksjonen med de stoffene FtsW er i kontakt med. Det at dette området spiller en viktig rolle støttes også av at halvparten av de best konserverte aminosyrene ligger i denne ekstracellulære sløyfen (Gérard *et al.*, 2002). Resten av de konserverte aminosyrene finner vi i de andre kortere ekstracellulære sløyfene eller i de membranspennende områdene. Det er ingen konserverte aminosyrer på cytoplasma siden av membranen. Det er også verdt å nevne at en av mutasjonene i *ftsW* hos *E. coli* som fører til en blokkering av celledeling finner vi i denne lengste ekstracellulære sløyfen mellom TM7 og TM8 (Gérard *et al.*, 2002).

Mohammadi *et al.* (2011) viste som nevnt at FtsW i *E. coli* transporterer lipid II over cytoplasmamembranen og at økende mengde FtsW øker transporten av lipid II over en membran. De foreslår også at RodA og SpoVE som er homologer til FtsW (og også medlemmer av familien av SEDS proteiner) antagelig deltar på samme måte som FtsW i translokeringen av lipid II ved henholdsvis celleelongering og PG syntese ved sporulering hos *B. subtilis* (Mohammadi *et al.*, 2011).

FtsW hos *S. pneumoniae* har 27 % likhet med sin homologe motpart i *E. coli*, og det har blitt funnet at FtsW i *S. pneumoniae* har samme lokalisering som PBPs i midten av cellen. PBP2x er trolig den klasse B PBP som deltar i PG syntese maskineriet ved septum sammen med FtsW, mens PBP2b antagelig er en del av det perifere maskineriet (Figur 1.8) (Zapun *et al.*, 2008).



Figur 1.8: Figuren viser de to maskineriene som trolig deltar i PG syntese hos blant annet *S. pneumoniae*. Til venstre det perifere maskineriet som sørger for elongering av cellen. Og til høyre det septale maskineriet som sørger for PG syntese ved celledeling. Figuren er hentet fra Zapun *et al.* (2008).

FtsW er et essensielt gen hos *S. pneumoniae*, og det er et konserverte gen blant bakterier som syntetiserer cellevegg. I tillegg finnes det ikke noen kjente homologe proteiner til FtsW hos mennesker. Disse faktorene gjør at dette i fremtiden kan fungere som et nytt mål for antibiotika alternativt til penicillin (Thanassi *et al.*, 2002, Noirclerc-Savoie *et al.*, 2003, Gérard *et al.*, 2002).

I tillegg til FtsW uttrykker *S. pneumoniae* RodA som har 29 % likhet (BLAST: Protein Sequence) med FtsW i *S. pneumoniae* og henholdsvis 21 % og 26 % likhet med FtsW og RodA i *E. coli* (Gérard *et al.*, 2002). Man spekulerer derfor i om RodA kan utføre samme prosess som FtsW, eller ha en liknende rolle som FtsW i pneumokokker.

1.5 Mål for oppgaven

Målet for denne oppgaven var å undersøke rollene til de to proteinene FtsW og RodA. FtsW er nylig identifisert som en flippase som transporterer lipid II over cellemembranen i *E. coli*, mens oppgaven til RodA i *S. pneumoniae* ikke er bestemt. Basert på homologi tenker man at proteinet RodA kan utføre en lignende oppgave som FtsW. I denne oppgaven var et av målene å undersøke om RodA kan gjøre den samme jobben som FtsW gjør i celleveggsyntesen.

Et mål med oppgaven var å bruke et nytt system for gen-depletion i *S. pneumoniae* (Berg *et al.*, 2011) som gjør det mulig å studere hvordan celler reagerer ved mangel på et essensielt gen. Målet var at dette skulle gjøre det mulig å se hvordan veksten til cellene påvirkes når de vokser ved mangel på ekspresjon av et essensielt gen.

Studier av morfologien til celler som vokser uten uttrykk av essensielle gener kan være et viktig redskap for å finne ut av hva aktiviteten til proteinene er. Ved hjelp av gen-depletion systemet brukt i denne oppgaven var målet å undersøke eventuelle endringer i morfologien til *S. pneumoniae* når cellene vokste uten FtsW eller RodA.

Selv om mye tyder på at RodA er en flippase slik som FtsW vet man ikke nøyaktig hva aktiviteten til proteinet er eller hvilket substrat proteinet flipper over cellemembranen. I denne oppgaven ønsket vi derfor også å se om vi kunne finne tegn som tyder på at RodA deltar i celleveggsyntese hos *S. pneumoniae*.

2. Materialer

2.1 Bakteriestammer

Bakteriestamme	Beskrivelse av stammen	Referanse
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
RH1	R704, men <i>ebg::spc</i> , Ery ^R Spc ^R	(Johnsborg <i>et al.</i> , 2008)
RH425	R704, men Ery ^r , Sm ^f	(Johnsborg and Håvarstein, 2009a)
RH426	RH425, men Δ IS1167:: <i>Janus Ery^r Kan^r</i>	(Johnsborg and Håvarstein, 2009a)
SPH131	ComR i <i>Ami</i> -locus, <i>P_{comX}-Janus</i>	(Berg <i>et al.</i> , 2011)
G.S.11	SPH131, men <i>lytA</i>	Upublisert stamme
CSS3	RH 425, men <i>ftsW::janus</i>	Denne oppgaven
CSS4	RH 425, men <i>rodA::janus</i>	Denne oppgaven
CSS5	KHB24, men <i>janus::ftsW</i>	Denne oppgaven
CSS6	KHB24, men <i>janus::rodA</i>	Denne oppgaven
CSS7	G.S.11, men <i>janus::ftsW</i>	Denne oppgaven
CSS8	G.S.11, men <i>janus::rodA</i>	Denne oppgaven
CSS9	CSS5, men nativt <i>ftsW::janus</i>	Denne oppgaven
CSS10	CSS7, men nativt <i>ftsW::janus</i>	Denne oppgaven
CSS12	CSS10, men Δ <i>janus (P_{comX}-ftsW)</i>	Denne oppgaven
CSS13	CSS6, men nativt <i>rodA::janus</i>	Denne oppgaven
CSS14	CSS8, men nativt <i>rodA::janus</i>	Denne oppgaven
CSS15	CSS14, men Δ <i>janus (P_{comX}-rodA)</i>	Denne oppgaven
CSS16	CSS10, men <i>janus::luc</i>	Denne oppgaven

2.2 Liste over primere brukt i oppgaven

Primernavn	Bruksområde	Sekvens	Referanse
CSS1 (ops.ftsW.F)	Amplifisering av området 1000bp oppstrøms for <i>ftsW</i> for å lage <i>ftsW</i> -Janus fragment	TTCCTCAATTTTCATAGA GTGTG	
CSS2 (ops.ftsW.R.m / Janus overheng)	Rev primer for å lage oppstrøms for <i>ftsW</i> delen av <i>ftsW</i> -Janus fragment, har hale som overlapper Janus	CACATTATCCATTA TCAAACAGTATCACC CTACTAGG	
CSS3 (neds.ftsW.F.m/P1 overheng)	Amplifisering av området 1000bp nedstrøms for <i>ftsW</i> for å lage <i>ftsW</i> -Janus fragment, har hale som overlapper P1-promotoren	TTAAATGTGCTATA TAGAAAATACTTGATA GAAAGGATAGTTTATGTC	
CSS4 (neds.ftsW.R)	Amplifisering av området 1000bp nedstrøms for <i>ftsW</i> for å lage <i>ftsW</i> -Janus fragment	ACAAGGCACGACGGTAA AGC	
CSS5 (ops.rodA.F)	Amplifisering av området 1000bp oppstrøms for <i>rodA</i> for å lage <i>rodA</i> -Janus fragment	AGAAAGTATTCGCTTTGA GTGC	
CSS6 (ops.rodA.R.m / Janus overheng)	Rev primer for å lage oppstrøms for <i>rodA</i> delen av <i>rodA</i> -Janus fragment, har hale som overlapper Janus	CACATTATCCATTA TCAAACACTATTTATCA AAGTTCATTA AAAAAATC	
CSS7 (neds.rodA.F.m/P1 overheng)	Amplifisering av området 1000bp nedstrøms for <i>rodA</i> for å lage <i>rodA</i> -Janus fragment, har hale som overlapper P1-promotoren	TTAAATGTGCTATA TAGAAAATACTTGAGAA AATCATGGTAAAAGTAG	
CSS8 (neds.rodA.R)	Amplifisering av området 1000bp nedstrøms for <i>rodA</i> for å lage <i>rodA</i> -Janus fragment	TCCAAAACCTGATCATT CGATG	
CSS9 (ftsW.F.m/ P _{comx} overheng)	Innseting av <i>ftsW</i> bak ComX	TTTATATTTATTATTGGAG GTTCAATGAAGATTAGTA AGAGGCAC	
CSS10 (ftsW.R.m/ cpsN overheng)	Innseting av <i>ftsW</i> bak ComX	GGGAAGAGTTACATATTA GAAACTACTTCAACAGAA GGTTCATTG	
CSS11 (ops.ftsW.R.m / neds overheng)	Til fjerning av Janus innsatt for <i>ftsW</i>	GACATAAACTATCCTTTC TTTATCAGTATCACC CTACTAGG	
CSS12 (neds.ftsW.F.m/ ops overheng)	Til fjerning av Janus innsatt for <i>ftsW</i>	CCTAGTAGAGTGGTGATA CTGATAAAGAAAGGATA GTTTATGTC	

Primernavn	Bruksområde	Sekvens	Referanse
CSS13 (rodA.F.m/ P _{comx} overheng)	Innseting av <i>rodA</i> bak ComX	ATT TAT ATT TAT TAT TGG AGG TTC ATT GTA TGA AAG TAT AAG GTT AGT AC	
CSS14 (rodA.R.m/ cpsN overheng)	Innseting av <i>rodA</i> bak ComX	ATTGGGAAGAGTTACATA TTAGAAATTATTAAATTT GTTTTAATACAACC	
CSS15 (ops.rodA.R.m / neds overheng)	Til fjerning av Janus innsatt for <i>rodA</i>	CTACTTTTACCATGATTTT CTCCTACTATTTATCAAA GTTC	
CSS16 (neds.rodA.F. m/ ops overheng)	Til fjerning av Janus innsatt for <i>rodA</i>	TAATGAACTTTGATAAAT AGTAGGAGAAAATCATG GTAAAAGTAG	
CSS17 (ftsW.R.m/luc overheng)	Til innseting av <i>luc</i> for <i>ftsW</i>	TTATGTTTTTGGCGGATCT CATAGTATCACCCTCTA CTAGG	
CSS19 (ftsW.F. m/luc og P1 overheng)	Til innseting av <i>luc</i> for <i>ftsW</i>	GCGGAAAGCCCAAATTGT AATTAAATGTGCTATAAT ACTAGAAAATACTTGATA AAGAAAGGATAGTTTATG TC	
CSS20 (thiJ.F)	Amplifisering av region oppstrøms for <i>thiJ</i>	GTGTCATTGTCCAATTTA CAAAG	
CSS21 (thiJ.R.m/jan overheng)	Amplifisering av region oppstrøms for <i>thiJ</i> til overlapp ekstensjons PCR med Janus	CACATTATCCATTAATAAAA TCAAACGATTTTCTCCTT ATTTAATTTGTTTT	
CSS22 (thiJ.F.m/P1)	Amplifisering av region nedstrøms for <i>thiJ</i> m/P1 promoter	TTAAATGTGCTATAATAC TAGAAAATACTTAACGGG AGTTATTCTCTCG	
CSS23 (thiJ.R)	Amplifisering av region nedstrøms for <i>thiJ</i>	TCCTGCCAAGGCCTCG	
Kan484F	Fwd primer for amplifisering av Janus	GTT TGA TTT TTA ATG GAT AAT GTG	Johnsborg <i>et al.</i> (2008)
khb94	Rev primer med P1 promoter for amplifisering av Janus	AAGTATTTTCTAGTATTA TAGCACATTTAACTTTCC TTATGCTTTTGGAC	
khb39 (sekCpsO.F)	Sekvenseringsprimer Forward ca. 60 bp oppstrøms for P _{comx}	TAAATAGCGAAGTTCCGT TCC	
khb40 (sekCpsN.R)	Sekvenseringsprimer Revers CpsN ca. 60 bp nedstrøms for P _{comx}	ACAGTATAAAAAGCAGG AAATAG	
khb31 (cpsO.F)	Forward primer for amplifisering av ca. 800 bp stort fragment oppstrøms for insert	ATAACAAATCCAGTAGCT TTGG	Berg <i>et al.</i> (2011)

Primernavn	Bruksområde	Sekvens	Referanse
khh32 (cpsO.R)	Revers primer for amplifisering av ca. 800 bp stort fragment oppstrøms for insert	GGTCTAGAGATGATTTTA ATTAC	Berg <i>et al.</i> (2011)
khh33 (cpsN.F)	Forward primer for amplifisering av ca. 800 bp stort fragment nedstrøms for insert	TTTCTAATATGTAACCTCTT CCCAAT	Berg <i>et al.</i> (2011)
khh34 (cpsN.R)	Revers primer for amplifisering av ca. 800 bp stort fragment nedstrøms for insert	CATCGGAACCTATACTCT TTTAG	Berg <i>et al.</i> (2011)

2.3 Vekstmedium

2.3.1 C-medium

C-medium ble laget på følgende måte:

Pre C-medium

0,045 g L-cystein HCl

8 g Natrium Acetat

20 g Bacto™ Casitone

0,024 g L-tryptofan

34 g di-kaliumhydrogenfosfat (K₂HPO₄)

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum på 4 l. Løsningen ble autoklavert ved 121 °C i 15 min.

C-medium

Til 150 ml autoklavert **pre C-medium** tilsettes:

0,4 mM Manganklorid 150 µl

20 % Glukose 1,5 ml

ADAMS III 3,75 ml

3 % Glutamin 110 µl

2 % Natrium pyruvat 2,25 ml

1,5 M Sukrose 95 µl

2 mg/ml Uridin/ Adenosin 1,5 ml

Gjærekstrakt 3,75 ml

Ferdig C-medium ble sterilfiltrert gjennom et 0,2 µm filter etter at løsningene overfor var tilsatt.

2.3.2 Todd Hewitt Agar (THA)

TH-agar til støping i petriskåler ble laget på følgende måte:

15 g Todd Hewitt buljong (Becton Dickinson and Company)

7,5 g agar

MQ-vann ble tilsatt til et sluttvolum på 500 ml og mediet med agar ble sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 min. Etter autoklaving ble skåler med THA støpt og avkjølt til romtemperatur. Skålene ble oppbevart ved 4 °C i plastposer. Dersom skålene skulle tilsettes antibiotika ble dette gjort etter autoklavingen når temperaturen i mediumet var ca. 60 °C.

Todd Hewitt - soft agar ble laget på samme måte som THA, men med halvert mengde agar. Etter autoklaving ble agaren oppbevart på vannbad ved 47 °C frem til bruk. Ubrukt agar ble oppbevart ved 4 °C på kjølerom. Ubrukt agar ble kun varmet opp to ganger, ubrukt agar etter den andre oppvarmingen ble kastet.

Antibiotikakonsentrasjoner benyttet ved dyrking av *S. pneumoniae* transformanter

Antibiotikum	Stockløsning	Brukskonsentrasjon
Kanamycin (Kan)	100 mg/ml	400 µg/ml
Streptomycin (Sm)	100 mg/ml	200 µg/ml
Spectinomycin (Spc)	50 mg/ml	200 µg/ml

2.4 Løsninger og buffere

2.4.1 Løsninger til C-medium:

Gjærekstrakt

40 g gjærekstrakt

360 ml MQ-vann

6 ml 12 N/37 % HCl

16 g aktivt kull

Gjærekstrakt (40g) ble løst i 360 mL MQ-vann. pH ble justert til 3,0 med saltsyre. 16 g aktivt kull ble tilsatt og løsningen ble rørt i 10 min på magnetrører, og oppbevart uten røring ved 4 °C i 2 timer. Etter 2 timer ble en glasskolonne pakket med glassull i bunnen og fylt med celitt slik at hele glassullen ble dekket. Løsningen ble så filtrert over natt gjennom denne kolonnen ved 4 °C. Dagen etter ble pH justert til 7,8 med 5 M NaOH, og sluttvolumet ble justert til 400 ml med MQ-vann. Løsningen ble sterilfiltrert, og fordelt i rør som inneholder 4 ml (dette passer til 150 ml pre C-medium), og oppbevart ved -80 °C.

ADAMS I

0,15 ml 0,5 mg/ml Biotin

75 mg Nikotinsyre

87,5 mg Pyridoxine hydroklorid

300 mg Kalsium panthothenate

80 mg Thiamin hydroklorid

35 mg Riboflavin

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 500 ml og pH justert til 7,0. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

ADAMS II - 10X

500 mg Jernsulfat heptahydrat

500 mg Kobbersulfat pentahydrat

500 mg Sink sulfat heptahydrat

200 mg Mangan(II)- klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert Saltsyre

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 100 ml. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

ADAMS III

128 ml ADAMS I

3,2 ml ADAMS II - 10X

1,6 ml Aspargin monohydrate

0,160 g Cholin klorid

0,4 g Kalsium klorid dehydrert

16 g Magnesium klorid hexahydrat

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 800 ml og pH ble justert til 7,6. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

2.4.2 Løsninger og buffere til agarose gelelektroforese

50xTAE-buffer (Tris-Acetat-EDTA)

242 g Tris base

57,1 ml eddiksyre

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 l. Løsningen ble oppbevart ved romtemperatur. Til gelstøping og gelelektroforese brukes en 1xTAE buffer. Den bufferen lages fra denne 50xTAE bufferen (980ml MQ-vann + 20ml 50xTAE).

Etidiumbromid (10 mg/ml)

1 g EtBr

100 ml MQ-vann

EtBr blandes i 100 ml MQ-vann. Den ferdige løsningen oppbevares i en lystett beholder ved romtemperatur. Når arbeid med EtBr utføres brukes alltid hansker av nitrill. EtBr oppbevares i avtrekksskap.

Loadingbuffer 10x

2 ml 1 % bromfenolblått (0,13 % v/v)

5 ml 50 % glyserol (16,7 % v/v)

8 ml autoklavert MQ-vann.

Den ferdige løsningen ble oppbevart ved 4 °C.

1 kb DNA ladder (50 ng/ml)

50 µl 1 kb ladder (Invitrogen)

200 µl 10 x loadingbuffer

750 µl autoklavert MQ-vann

Den ferdige løsningen ble oppbevart ved 4 °C.

2.4.3 Løsninger til bruk ved mikroskopering

Fikseringsløsning for DIK

Paraformaldehyd løses i PBS (pH 7,4) til en sluttkonsentrasjon på 7,5 %. Når løst tilsettes glutardialdehyd til en sluttkonsentrasjon på 0,018 %. Til 1 ml bakteriekultur tilsettes 400 µl fikseringsløsning.

Fikseringsløsningen lages samme dag som den skal benyttes.

Phosphate-buffered Saline(PBS):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

I 400 ml MQ-vann ble 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ og 0,24 g KH₂PO₄ løst. pH ble justert til 7,4 med HCl. MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 liter. Løsningen ble oppbevart ved 4 °C.

2.5 Kit

Kit	Leverandør
NucleoSpin® Extract II	Machery-Nagel

2.6 Enzymer

Enzym	Buffer	Leverandør
Phusion Polymerase	5x Phusion Polymerase Buffer	Finnzymes
DyNAzyme Taq Polymerase	10x DyNAzyme Taq Polymerase	New England BioLabs
LytA		Fremstilt og rensset på lab (Daniel Straume)
RNase		
DNase		

2.7 Kjemikalieliste

Navn på kjemikalie	Kjemisk formel	Leverandør
Agarose		Invitrogen
Aktivt kull	C	Merck
Albumin fra bovint serum, min. 98 % %, elektroforese		Sigma
Bacto™ Casitone		BD Diagnostic Systems
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Sigma-Aldrich
Bromfenolblå (3',3'',5',5''- Tetrabromophenolsulfonephthalein)	C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa	Sigma
Cholineklorid		Sigma
D-Luciferin, Monosodium Salt, 25 mg		Thermo Scientific
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) dinatriumsalt dihydrat	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	VWR
Etidiumbromid	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	Sigma-Aldrich
Gjærekstrakt		Merck
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	VWR
Glutardialdehyd, 25 % løsnings	C ₅ H ₈ O ₂	Merck
Glyserol	C ₃ H ₅ (OH) ₃	Merck
Jern sulfat heptahydrat	FeSO ₄ · 7H ₂ O	Fluka
Kaliumklorid	KCl	Merck
Kaliumhydrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	
Kalsium panthothenat	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Sigma
Kalsiumklorid anhydrert	CaCl ₂	Fluka
Kobberklorid	CuCl ₂	Fluka
Kobbersulfat pentahydrat	CuSO ₄ · 5H ₂ O	Fluka
L-Cystein hydrogenklorid monohydrat	C ₃ H ₇ NO ₂ S · HCl · H ₂ O	Fluka
L-Tryptofan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Fluka
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	MnCl ₂ · 4H ₂ O	Riedel-de Haën
Metanol	CH ₂ OH	Merck
Natriumacetat	C ₂ H ₃ O ₂ Na	Sigma
Natriumborhydrid	NaBH ₄	
Natriumhydrogen fosfat	Na ₂ HPO ₄	
Natriumhydroksid	NaOH	Merck

Natriumklorid	NaCl	Merck
Natriumpyruvat	C ₃ H ₃ NaO ₃	Sigma
Nikotinsyre	C ₆ H ₅ NO ₂	Fluka
Orto fosforsyre	H ₃ PO ₄	
Pyridoxine hydroklorid	C ₈ H ₁₁ NO ₃ · HCl	Fluka
Riboflavin (vitamin B2)	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	Sigma-Aldrich
Saltsyre	HCl	Riedel-de Haën
SDS, Sodium dodecyl sulfate	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Fluka
Sinksulfat heptahydrat	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Fluka
Sukrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	BHD
Trypsin		
Uridin, minimum 99 %	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	Sigma
BODIPY [®] FL vancomycin		

2.8 Utstyrliste

Utstyr	Modell	Produsent
1 kb DNA ladder		Invitrogen
Antibiotika disketter		
BBL SD Ceftazidime 10		Puls AS
BBL SD Erythromycin 15		Puls AS
BBL SD Novobiocin 5		Puls AS
BBL SD Penicillin G 10		Puls AS
BBL SD Tetracyclin 30		Puls AS
BBL SD Vancomycin 30		Puls AS
Autoklav		Presto
Bordsentrifuge I (justerbar temp.)	5415R	Eppendorf
Bordsentrifuge II	5424	Eppendorf
C18 kolonne (til HPLC)	(Vydac 218TP C18 5u, 250 mm x 4,6 mm)	
Celleknuser	Fastprep [®] -24	M. P. Biomedicals
Elektroforesekar til gelelektroforese	agarose Mini-Sub Cell [®] GT	BioRad
Filter (0,2 µm)		Sarstedt
FluoStar Optima plate-leser		BMG Labtech

Glass Beads, acid washed	150-212 µm	Sigma
Inkubatorskap		Termaks
HPLC		Gilson
Magnetrører	MR 3003 K	Heidolph
Mikrobølgeovn		Whirlpool
PCR-maskin	PTC-100TM Programmable Thermal Controller	MJ Research Inc.
pH-meter	PHM210	Meterlab®
Pipetter	Finnpipetter (0,5-10 ul, 10-100 ul, 100-1000 ul, 1-5 ml, 2-10 ml)	Thermo Scientific
Ristebord	WS 10	Edmund Bühler
Sekvensator	ABI prism® 3100	Applied Biosystems
Sentrifuge I	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Sentrifuge II	Avanti™ J-25	Beckman coulter
Sentrifugeflasker		Nalgene
Spektrofotometer I	DU®800 UV/Vis	Beckman coulter
Sprøyter til filtrering		BD Plastipak
Vannbad I (max 60 °C)	7A	Julabo
Vannbad II (max 100 °C)	1002	GFL
Vekt 0,0001 g - 200 g		Sartorius
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA®

3. Metoder

3.1 Fremstilling av *ΔftsW* og *ΔrodA* mutanter

3.1.1 Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction, forkortet PCR, er en teknikk som gjør det mulig å syntetisere et stort antall kopier av et spesifikt DNA-fragment fra en sammensatt blanding som inneholder mange forskjellige DNA-fragmenter. Man kan dermed forholdsvis enkelt lage mange kopier av en spesifikk DNA-sekvens fra komplekse DNA-prøver. Metoden ble oppfunnet av den norske forskeren Kjell Kleppe på 60-tallet, og ble deretter videreutviklet på starten av 1980-tallet ved at man benyttet en varmostabil polymerase.

En PCR består av tre trinn i en bestemt rekkefølge som gjentas flere ganger. For å få en vellykket PCR trenger man en del komponenter som deltar i reaksjonen, disse er: templat DNA (det DNA som skal kopieres), primere, en DNA polymerase som er stabil ved høye temperaturer (termostabil) og de hver av de fire dNTPene (dATP, dTTP, dGTP og dCTP). I løpet av de tre trinnene en PCR består av vil disse komponentene produsere mange kopier av det spesifikke DNA-fragmentet vi ønsker.

De tre trinnene er:

1. Denaturering av DNA.

DNAet varmes opp til 94-98 °C slik at DNA-trådene skiller lag og blir til enkeltråder.

2. Annealing

Temperaturen senkes slik at primerne binder seg til komplementære sekvenser på det enkeltrådede DNAet.

3. Elongering

I dette trinnet holdes temperaturen optimal for DNA polymerasen slik at den kan bruke dNTPene til å syntetisere kopier av DNAet med utgangspunkt i primeren.

Disse tre trinnene blir så gjentatt 25-30 ganger slik at man får en stor mengde DNA. Teoretisk sett vil antall DNA-kopier som amplifiseres mellom primerne dobles for hver syklus i henhold til formelen 2^n der n er antall sykler. Etter 20 sykluser kan man teoretisk sett ha laget over en

million kopier fra bare én kopi av målsekvensen (templat). Sekvensene som syntetiseres kan variere i lengde fra så få som noen hundre til flere tusen nukleotider (Willey *et al.*, 2008).

I denne oppgaven ble PCR benyttet til å produsere DNA-fragmenter som skulle transformeres inn i ulike *S. pneumoniae* stammer for å slå ut, sette inn eller endre gener. Forskjellige primere (Tabell 2.2) ble brukt til å produsere DNA-sekvenser av for eksempel genet *ftsW* med overheng til regionene oppstrøms og nedstrøms for genet slik at denne sekvensen kunne benyttes til transformasjon av *S. pneumoniae* ved hjelp av homolog rekombinasjon under naturlig genetisk transformasjon.

Ved PCR var reaksjonsvolumet 50 µl og følgende komponenter ble blandet i PCR-rør på is:

Tabell 3.1: Oppskrift på PCR miks for tillaging av forskjellige DNA-fragmenter

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
x µl MQ-vann	til sluttvolum på 50 µl
10 µl 5x Phusion® HF-buffer	1x
1 µl dNTP (10 mM)	0,2 mM
2,5 µl primer A (10 pmol/µl)	0,5 µM
2,5 µl primer B (10 pmol/µl)	0,5 µM
x µl templat-DNA	10-200 ng per 50 µl-reaksjon (avhengig av type templat)
0,5 µl Phusion DNA polymerase (2 U/µl)	0,02 U/µl

PCR-reaksjonen ble inkubert i en PCR-maskin med temperaturer og tidsinnstillinger som var tilpasset templatet, smeltepunktet til primerne og lengden på sekvensen som skal amplifiseres.

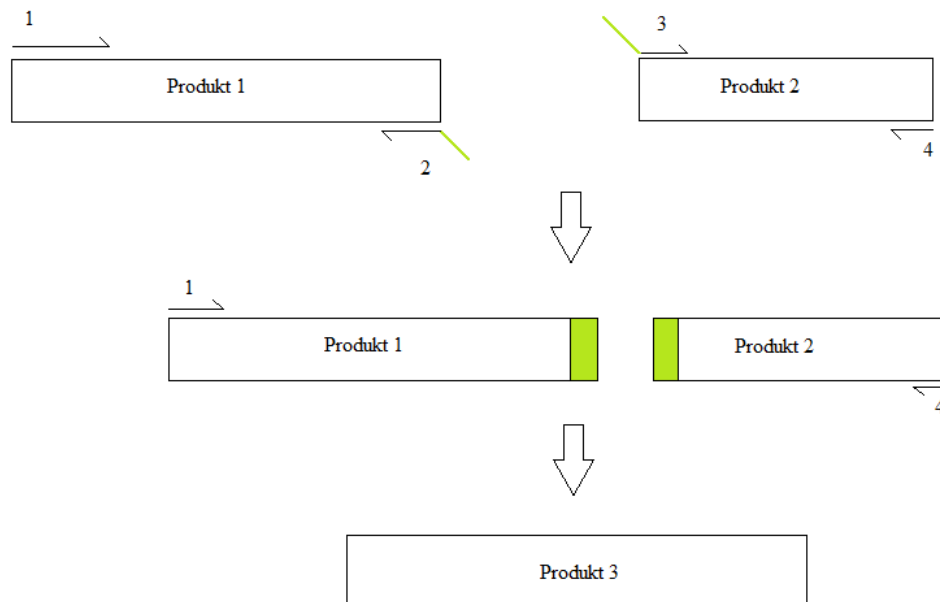
Tabell 3.2: PCR-program for tillaging av forskjellige DNA-fragmenter ved bruk av Phusion DNA polymerase.

Trinn	Temperatur og tid
1. Initiell denaturering	98 °C, 30 sek → 1,5 min
2. Denaturering	98 °C, 10 sek
3. Primerhybridisering*	x °C, 30 sek
4. Elongering	72 °C, x sek
5. Gå til trinn 2 x ganger	25-35 sykler totalt
6. Utfylling av ender	72 °C, 5 min
7. Midlertidig oppbevaring i PCR-maskin	4 °C, ∞

* Temperaturen i dette trinnet avhenger av smeltetemperaturen på primerne. Primere blir som regel designet slik at smeltepunktet ligger på 58-60 °C.

3.1.1.1 Overlapp ekstensjons PCR

Overlapp ekstensjons PCR er en metode som brukes for å spleise overlappende DNA-fragmenter. Denne metoden gjør det mulig å lage et sammenhengende gen fra to eller flere overlappende fragmenter relativt enkelt. Metoden er basert på prinsippene fra vanlig PCR som er beskrevet i avsnitt 3.1.1. Forskjellen på de to ligger i primerne som brukes i denne metoden. I overlapp ekstensjons PCR brukes to primerpar, et flankerende primerpar (1 og 4) og et internt primerpar (2 og 3) (Figur 3.1). De to interne primerne har i tillegg til den normale baserekkefølgen komplementært til DNA-templatet en “hale” som er komplementær med den andre interne primeren. Primer 2 har på sin 3'-ende en sekvens som er komplementær til sekvensen på 5'-enden til primer 3 (Figur 3.1) (Heckman and Pease, 2007).



Figur 3.1: Viser hvordan overlapp ekstensjons PCR brukes til å lage ett sammenhengende DNA-fragment fra to produkter. De grønne områdene markerer identiske områder på de to produktene. De identiske områdene er dannet som følge av de komplementære sekvensene på primer 2 og 3.

Prinsippet for overlapp ekstensjons PCR er illustrert i Figur 3.1. Figuren viser hvordan man ved å bruke fire primere får satt sammen to produkter til ett DNA produkt. to primere til amplifisering av produkt 1 og to til amplifisering av produkt 2. Revers primeren til produkt 1 har på sin 3'-ende en “hale” som er komplementær til 5'-enden på forward primeren til produkt 2. Etter at de to produktene er amplifisert settes det opp en PCR hvor templat er de to produktene og primere er forward primer til produkt 1 og revers primer til

produkt 2 (de to flankerende primerne) slik som Figur 3.1 viser. Etter at de to produktene er denaturert i PCR-reaksjonen vil de komplementære regionene anneale til hverandre og de flankerende primerne 1 og 4 vil sørge for at vi får dannet et sammenhengende ferdig produkt som består av produkt 1 og 2.

I denne oppgaven har overlapp ekstensjons PCR blitt brukt til å produsere ulike DNA-fragmenter som kan transformeres inn i *S. pneumoniae*. Blant annet DNA-fragment for å slå ut *ftsW* med Janus og DNA-fragment for å sette inn et luciferase-gen for *ftsW*.

3.1.2 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese brukes til å separere DNA-fragmenter med hensyn på deres lengde. I en agarosegel vil det dannes et nettverk av galaktose enheten i agarosen. Det tredimensjonale nettverket vil gjøre at store DNA-fragmenter vil bruke lenger tid på å vandre gjennom gelen enn det de mindre DNA-fragmentene vil gjøre. DNA er negativt ladet, noe som gjør at det vil vandre mot den positive polen når det settes elektrisitet til agarosegelen (Willey *et al.*, 2008).

Agarosegelen er tilsatt etidium bromid (EtBr), et stoff som binder til DNA og gjør at vi kan visualisere DNA-fragmentene under belysning med UV-lys. EtBr fluoriserer i UV-lys kun når det er bundet til DNA og derfor vil det kun fluorisere der det er DNA i gelen. En såkalt 1kb ladder (Invitrogen) som inneholder DNA-fragmenter med kjente størrelse ble brukt i hver gel slik at man kan sammenligne det tilsatte DNAet med denne og avgjøre størrelsen på fragmentene sine. Under agarose gelelektroforese i denne oppgaven har det blitt benyttet en 1 % (vekt/volum) –gel.

Gelen ble fremstilt på denne måten:

1. 0,5 g agarose ble tilsatt 50 ml 1 x TAE-buffer. Dette ble varmet opp i mikrobølgeovn til agarosen var løst.
2. EtBr ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,5 µg/ml etter at løsningen var avkjølt til ca. 60 °C.
3. Gelen ble støpt i støpekar med brønnkammer av ønsket størrelse. Etter at gelen var stivnet ble den lagt over i et elektroforesekar og dekket av 1 x TAE buffer.
4. 10 µl 1 kb DNA-ladder (Invitrogen) ble applisert i brønn 1 som en referanse. Prøver ble tilsatt 6x loadingbuffer (40% sukrose, 1 mM EDTA) før de ble applisert i de

resterende brønnene. Loadingbuffer har høyere tetthet enn 1xTAE buffer og gjør at prøvene vil synke ned i brønnene.

5. Elektroforesen ble utført ved 0,6 V/Cm² i 25-35 minutter. DNA ble visualisert ved å belyse gelen med UV-lys i en Gel Doc-1000 (BioRad).

3.1.3 Isolering og rensing av DNA-fragmenter fra agarosegel

Etter at PCR-produktene var separert ved hjelp av agarose gelelektroforese ble fragmentene isolert fra gelen og rensset ved hjelp av NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel).

Prosedyren er som følger:

1. De ønskede DNA-fragmenten ble skjært ut av gelen
2. Gelbiten ble veid og tilsatt 200 µl per 100 µg gel
3. Prøven ble inkubert ved 50 °C til gelen var fullstendig oppløst
4. Prøven ble overført til en NucleoSpin® Extract II kolonne og sentrifugert i 1 min ved 11000 x g. I denne sentrifugeringen vil DNA binde seg til kolonnen mens resten av løsningen vil gå gjennom kolonnen. Flow-through ble fjernet etter sentrifugeringen.
5. Membranen i kolonnen ble så vasket ved å tilsette 700 µl Buffer NT3 og sentrifugere i 1 min ved 11000 x g. Flow-through ble fjernet etter sentrifugeringen.
6. Denne bufferen inneholder etanol som ikke er bra for DNA og derfor sentrifugerte vi 2 min ved 11000 x g for å tørke membranen helt.
7. Etter dette trinnet ble DNAet eluert ved å tilsette 15-50 µl med Buffer NE til kolonnen og inkubert i 1 min ved romtemperatur. Kolonnen hadde blitt overført til et rent eppendorfrør og dette ble sentrifugert i 1 min ved 11000 x g.
8. Det rensede DNAet ble videre analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese for å se at fragmentet hadde riktig størrelse og estimere konsentrasjonen av DNAet.

Dette PCR-produktet var nå klart til å brukes enten i en transformasjon eller i en ny PCR (to-step PCR) for å sette det sammen med andre DNA-sekvenser.

3.1.4 Janus-kassett

I studier hvor man slår ut eller ødelegger et gen hos en bakterie har man tidligere brukt å sette inn et gen som gir resistens mot et antibiotikum som seleksjonsmarkør. Dersom denne seleksjonsmarkøren bli permanent inkorporert i genomet til bakterien vil det føre til at

resultatene fra påfølgende mutasjoner i samme stamme kan bli vanskelige å tolke som følge av oppsamlinger av resistensgener (Sung *et al.*, 2001).

Dersom et gen man innfører i en bakterie ikke fører til en tydelig selekterbar fenotype er det vanskelig å vite hvilke bakterier som har fått overført genet og hvilke som ikke har det. Sung *et al.* (2001) presenterte en 1,3 kb stor kassett som inneholder en kanamycin (Kn) resistens markør og en motvirkende *rpsL*⁺ markør. Systemet som ble presentert gjør det mulig å selektere både for opptak av kassetten og å selektere for fjerning/tap av kassetten. Dette systemet gjør det også mulig å erstatte målgenet uten at seleksjonsmarkøren inkorporeres permanent i genomet. Kassetten har fått navnet Janus-kassetten.

Den markøren som muliggjør en negativ seleksjon er basert på en spontan mutasjon i *rpsL*-genet hos bakterier som fører til streptomycin resistens. Med negativ seleksjon mener man den seleksjonen gjøres etter at man har fjernet kassetten. En spontan mutasjon i genet *rpsL* fører til en endring av en aminosyre i small ribosomal unit hos bakterien. Aminosyren lysin på plass 56 erstattes av aminosyren treonin, et bytte som fører til en høy grad av resistens mot streptomycin. At denne mutasjonen er recessiv utnyttes i Janus-kassetten hvor man har et *rpsL*⁺ allel som overstyrer den recessive mutasjonen hos bakterien og gir en streptomycin sensitiv fenotype (Sung *et al.*, 2001, Salles *et al.*, 1992).

Kassetten gjør at vi gjennom en tottrinns transformasjonsprosess kan bytte ut eller fjerne et gen på kromosomet med det genet eller den sekvensen vi måtte ønske. Bruk av denne kassetten krever at stammen som transformeres i utgangspunktet er streptomycin (Sm) resistent. Når Janus-kassetten transformeres inn i en streptomycin resistent (Sm^r) stamme vil transformantene bli kanamycin resistente (Km^r) samtidig som stammen blir Sm^s (Sm sensitiv) fordi *rpsL*⁺ allelet overstyrer den recessive mutasjonen i utgangsstammen. Ved å erstatte Janus-kassetten med et vilkårlig DNA fragment i en ny transformasjon vil vi gjenopprette Sm^r og Km^s fenotypen. Dette gjør det mulig å systematisk fjerne ett og ett gen, eller gjøre andre endringer på gener som ellers ikke gir oss en selekterbar fenotype (Sung *et al.*, 2001).

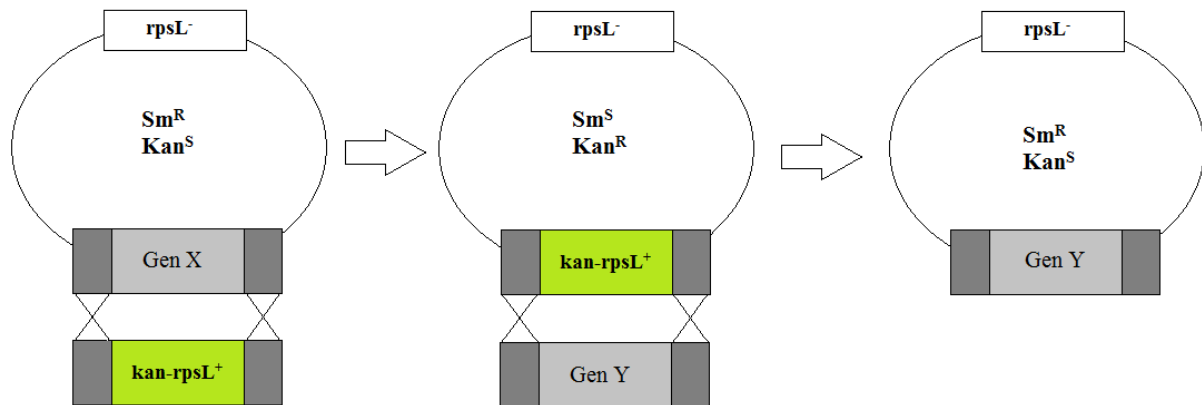
Etter de to transformasjonene dyrker man transformantene på agar som inneholder antibiotika. Etter en transformasjon hvor Janus-kassetten settes inn inneholder agaren kanamycin og etter en transformasjon hvor Janus-kassetten slås ut inneholder agaren streptomycin.

3.1.4.1 Transformasjon ved bruk av janus-kassetten

For å fjerne ("knocke ut") *ftsW* fra genomet til *S. pneumoniae* ble det konstruert et fragment som bestod av Janus-kassetten (kan-rpsL⁺) flankert av sekvenser som tilsvarer sekvensene oppstrøms og nedstrøms for det native *ftsW* genet hos *S. pneumoniae*. Figur 3.1 viser hvordan dette fragmentet ble satt inn i bakterien ved naturlig transformasjon og homolog rekombinasjon. Overhengene er typisk rundt 1000 basepar slik at vi kan være trygge på at vi får flere celler hvor det skjer en homolog rekombinasjon i områdene oppstrøms og nedstrøms for *ftsW*. Naturlig genetisk transformasjon og Janus-kassetten er beskrevet i avsnitt 1.2.2 og 3.1.4. For å fjerne eller sette inn gener eller andre DNA-sekvenser i genomet til *S. pneumoniae* kan vi utnytte bakteriens naturlig transformasjon. Ved å tilsette syntetisk CSP1 til en $\Delta comA$ (CSP1-transporter) mutant kan man kontrollere når cellene skal bli kompetente. Tilsettes homolog DNA samtidig som CSP1 vil dette bli transformert inn i genomet til bakterien ved hjelp av homolog rekombinasjon.

Protokollen for transformasjon av *S. pneumoniae* er som følger:

1. Bakteriekulturen (stammen som skal transformeres) fortynnes til OD₅₅₀ ~ 0,05 (eller lavere)
2. Kulturen innkuberes på vannbad 37 °C i 15 minutter (OD₅₅₀ bør være mellom 0,05 og 0,1)
3. 1 ml kultur overføres til eppendorfrør
 - a. Kulturen induseres med CSP-1 til en sluttkonsentrasjon på 250 ng/ml
 - b. 0,5-1,0 ng/ml med homologt DNA for transformasjon tilsettes
 - c. En negativ kontroll sett også opp, en kultur induseres med 250 ng/ml CSP-1, men uten tilsatt DNA
 - d. Kulturene innkuberes 2 timer på vannbad ved 37 °C
4. Transformanter selekteres for ved å så ut de transformerte cellene (20 µl kultur) på Todd Hewitt agarskåler med egnet antibiotikum for seleksjon. Skålene innkuberes anaerobt over natt ved 37 °C.
5. Dagen etter ble eventuelle transformanter plukket og dyrket opp i C-medium tilsatt antibiotika. Når cellene hadde vokst til OD₅₅₀ ~ 0,3 ble det laget frysestocks av kulturene.
6. Kontroll av transformantene ble gjort ved PCR og/eller sekvensering



Figur 3.2: Transformasjon i to trinn med bruk av Janus. Grå områder representerer homologt DNA oppstrøms og nedstrøms for målgenet. Kravet for innføring av Janus-kassetten er at stammen er Sm^R og Kan^S . Fenotypen til cellene ved hvert stadium er markert i figuren som Sm^R , Sm^S , Kan^R eller Kan^S .

3.1.5 Verifisering av transformanter

Etter transformasjon av *S. pneumoniae* ble eventuelle transformanter plukket med sterile tannpirkere. Celler fra en transformant (koloni) ble først overført til et PCR-rør som inneholdt sterilisert MQ-vann før tannpirkeren deretter ble overført til sterilt flytende C-medium tilsatt aktuelt antibiotika. Det er viktig å undersøke om koloniene vi plukker er reelle transformanter eller om det er det vi kaller bakgrunn, det vil si bakterier hvor resistensen stammer fra andre ting enn innsetting/fjerning av Janus-kassetten. Dette ble gjort ved å utføre såkalte kontroll-PCR reaksjoner.

I en kontroll-PCR brukes det et primerpar som enten:

- binder til oppstrøms- og nedstrømsregionen til det genet vi har slått ut, dersom det er den innsatte Janus-kassetten vi slår ut så vil allikevel områdene oppstrøms og nedstrøms for Janus være de samme
- eller som binder til regioner i selve genet vi har satt inn, eller Janus-kassetten dersom det er den vi har satt inn

Etter PCR med primere fra en av disse alternativene og templat som er fra koloniene som har blitt plukket sjekker man om størrelsen på PCR-produket stemmer med forventet størrelse ved hjelp av agarose gelelektroforese.

Det vanligste er å bruke det første alternativet med primerpar som binder oppstrøms og nedstrøms for målgenet, men dersom størrelsen på det opprinnelige genet er omtrent like stort

som Janus-kassetten (~1,3 kb) kan man ikke vite om det er det opprinnelige genet eller Janus-kassetten man har amplifisert. I slike tilfeller må man bruke primere som sitter i Janus-kassetten, eller et annet innsatt fragment. Dersom man får produkt etter PCR med disse primerne kan man konkludere med at det ønskede fragmentet er satt inn.

Oppsettet for kontroll PCR var som følger:

Tabell 3.3: Oppskrift på PCR miks for verifisering av transformanter

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
x µl MQ-vann	til sluttvolum på 20 µl
2 µl 10x Taq Polymerase Buffer	1x
0,5 µl dNTP (10 mM)	0,25 mM
1 µl primer A (10 pmol/µl)	0,5 µM
1 µl primer B (10 pmol/µl)	0,5 µM
x µl templat-DNA	100-200 ng per 50 µl-reaksjon
0,5 µl Taq Polymerase	

Tabell 3.4: PCR-program for verifisering av transformanter. Oppsettet gjelder ved bruk av Taq polymerase.

Trinn	Temperatur og tid
1. Initiell denaturering	94 °C, 5 min
2. Denaturering	94 °C, 30 sek
3. Primerhybridisering*	x °C, 30 sek
4. Elongering	68 °C, x sek
5. Gå til trinn 2 x ganger	25-35 sykler totalt
6. Utfylling av ender	68 °C, 5 min
7. Midlertidig oppbevaring i PCR-maskin	4 °C, ∞

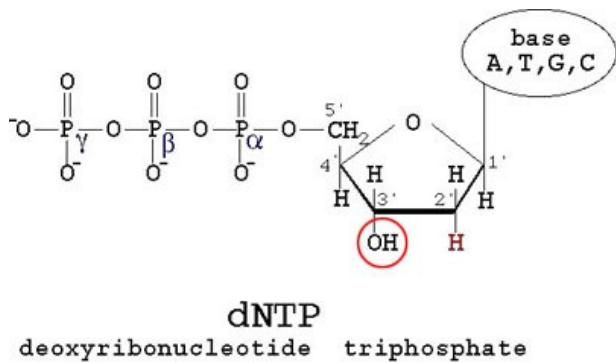
* Temperaturen i dette trinnet avhenger av smeltetemperaturen på primerne. Primere blir som regel konstruert slik at smeltepunktet ligger på 58-60 °C.

3.1.6 DNA-sekvensering

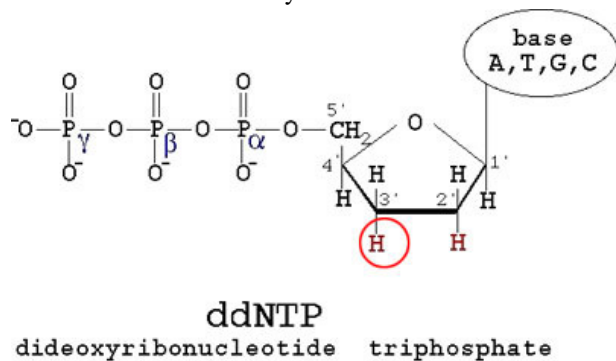
DNA-sekvensering er en metode som brukes for å bestemme baserekkefølgen i DNA. I dag finnes det mange metoder for å sekvensere DNA, f. eks. Maxam-Gilbert, Sanger-sekvensering, 454 pyrosekvensering og Illumina sekvensering. I denne oppgaven ble DNA

sekvensert med Sanger-metoden. Denne metoden går ut på at det syntetiseres en ny DNA-tråd hvor det DNA som skal sekvenseres er templat. Til en amplifiseringsreaksjon trengs det kun én primer som er komplementær til regionen oppstrøms for området som skal sekvenseres, DNA polymerase, de fire dNTPene (dATP, dTTP, dGTP og dCTP). I tillegg tilsettes det fire dideoxynukleotider (ddATP, ddTTP, ddGTP og ddCTP) til reaksjonen.

Det er forskjellen mellom dNTP og ddNTP som gjør at vi får dannet et produkt som vi kan bruke til å bestemme baserekkefølgen i DNA templatet. Forskjellen mellom ddNTPene og dNTPene er at ddNTPene ikke har en –OH gruppe på karbon 3' i sukkermolekylet, slik som Figur 3.3 og 3.4 viser.



Figur 3.3: dNTP med en OH-gruppe på karbon 3'.
Bildet er hentet fra berkely.edu.

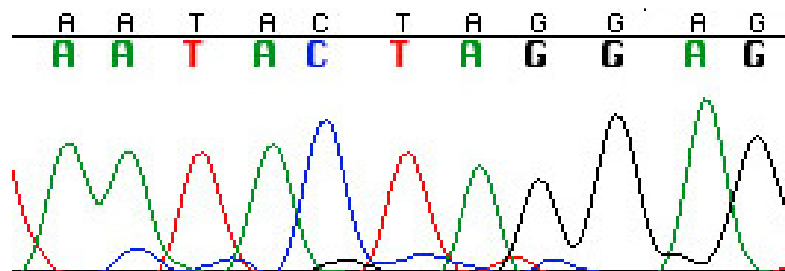


Figur 3.4: ddNTP uten OH-gruppen på karbon 3'.
Bildet er hentet fra berkely.edu.

I en sekvenseringsreaksjon vil syntesen av DNA fortsette frem til en ddNTP settes inn istedenfor en dNTP. Uten en 3'-OH gruppe som kan festes til fosfatgruppen til neste dNTP vil syntesen av den tråden stanse. Posisjonen en ddNTP inkorporeres i DNAet vil være tilfeldig og statistisk sett vil det settes inn en ddNTP i alle posisjoner i løpet av en

sekvenseringsreaksjon. For å kunne bestemme baserekkefølgen må ddNTPene være merket slik at de kan detekteres. Tidligere ble de merket med radioaktivitet, men da krevdes det at det ble utført fire sekvenseringsreaksjoner hvor hver reaksjon inneholdt den ene ddNTPen. Idag bruker man ddNTP der hver type ddNTP er merket med en spesifikk fluorofor. Dette gjør at man kan blande alle ddNTPene i en reaksjon og de fire ulike ddNTPene kan bli detektert med en laser under separasjon av sekvenseringsproduktene. Etter sekvenseringsreaksjonen har det blitt dannet mange DNA fragmenter med forskjellig lengde og alle har en 3' ddNTP med en fluorescerende farge som siste innsatte base.

Når produktet fra sekvenseringsreaksjonen separeres gjennom en polyakrylamidgel vil fragmentene separeres med hensyn på lengde. De korteste fragmentene vil vandre raskest gjennom gelen. En laser detekterer i hvilken rekkefølge fragmentene kommer ut av gelen. På den måten får vi et kromatogram bestående av forskjellige toppler hvor høyden indikerer styrken og fargen indikerer hvilken base fragmentet representerer slik som vi ser i Figur 3.5 (North.Dakota.University, 2012).



Figur 3.5: Et bilde av kromatogram fra DNA sekvensering. De forskjellige fargene representerer de forskjellige basene. Bildet er hentet fra nodak.edu.

Innholdet i amplifiseringsreaksjonen er presentert i Tabell 3.3. Tabell 3.4 viser programmet for denne reaksjonen.

Tabell 3.5: Innhold i sekvenseringreaksjoner

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
2 µl BigDye Sequencing Terminator	
3 µl 5x Sequencing Buffer	1 x
X µl primer	0,16 pmol/µl
X µl templat DNA	50-500 ng
µl MQ-vann	20 µl

Tabell 3.6: Oppsett for sekvenseringsreaksjonen

Trinn	Temperatur og tid
1. Denaturering	96 °C, 30 sek
2. Primerhybridisering	50 °C, 15 sek
3. Elongering	60 °C, 4 min
4. Gå til trinn 1) x ganger	~25 sykler totalt
5. Midlertidig oppbevaring i PCR-maskin	4 °C, ∞

Protokollen for klargjøring av det amplifiserte PCR-produktet til sekvensering var som følger:

1. De 20 µl med produkt fra amplifiseringsreaksjonen ble tilsatt 2 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M NaAc pH 5,2 og 52 µl 96 % EtOH.
2. Løsningen ble innkubert i 15 min ved romtemperatur og sentrifugert 30 min ved 13 200 rpm ved 4 °C.
3. Supernatanten ble fjernet og pelleten vaskes med 200-400 µl 70 % EtOH. Vaskingen gjøres ved å pipettere etanolen sakte ned langs kanten av røret på motsatt side av pelleten og deretter pipetere etanolen sakte av igjen.
4. Pelleten ble tørket og deretter lagret ved -20 °C frem til sekvensering.

3.2 Studier av essensielle gener

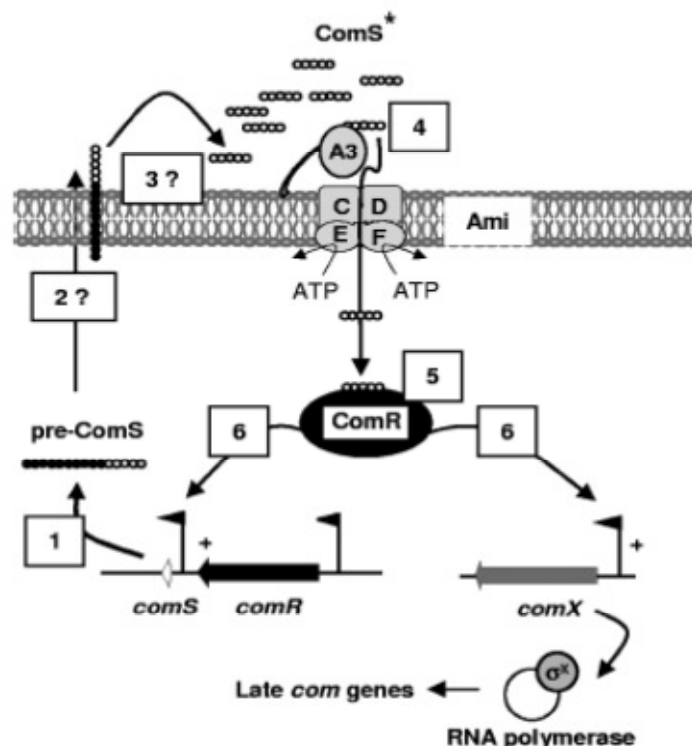
3.2.1 Peptidregulert gen-depletion system for bruk i *S. pneumoniae*

Funksjonelle studier av essensielle gener er en utfordring ettersom mangel på essensielle gener fører til at cellen ikke er levedyktig. En måte å løse dette på er å uttrykke det essensielle genet ektopisk og kunne regulere ekspresjonen av genet via en kontrollerbar promoter. Ved å uttrykke det essensielle genet ektopisk er det mulig å fjerne det native genet uten at det får dødelig utfall for cellen. Deretter kan uttrykket av det essensielle genet reduseres for å få informasjon om dets funksjon og hvordan det påvirker cellenes vekst. En viktig egenskap for et slikt gen-depletion system er at desto mindre systemet påvirker cellenes normale fysiologi desto bedre er det. Det har nylig blitt konstruert et slikt system (ComRS) som gjør det mulig å regulere genuttrykket uten at det ser ut til å påvirke cellenes normale fysiologi i *S. pneumoniae* (Berg *et al.*, 2011).

I studiet som presenterte systemet ble ComRS signalsystemet fra *Streptococcus thermophilus* utnyttet og satt inn i *S. pneumoniae*. Dette systemet gjorde det mulig å regulere gener ektopisk uten at det påvirket cellenes normale fysiologi, noe som ble vist gjennom depleksjon av de to genene *licD1* og *licD2* (Berg *et al.*, 2011).

ComRS systemet fra *Streptococcus thermophilus*

Fontaine *et al.* (2010) har vist at ComRS systemet fra *S. thermophilus*, er nødvendig for å indusere kompetanse hos *S. thermophilus*. ComS* (peptid Shp0316) er identifisert som signalmolekylet som induserer kompetanse hos *S. thermophilus*. Som nevnt tidligere for *S. pneumoniae* er et nødvendig trinn for induseringen av kompetanse hos stammer i slekten *Streptococcus* transkripsjonen av ComX. Transkripsjon av ComX fører til produksjon av den alternative sigma faktoren σ^x , som igjen fører til transkripsjon av de såkalte late genes som er nødvendige for utviklingen av kompetanse og DNA opptak (Fontaine *et al.*, 2010). Hos *S. pneumoniae* reguleres induseringen av comABCDE geneene gjennom en positiv feedback loop mekanisme som aktiveres når konsentrasjonen av CSP1 i omgivelsene når et kritisk punkt. Forskerne så for seg at et slikt system også fantes hos *S. thermophilus*.

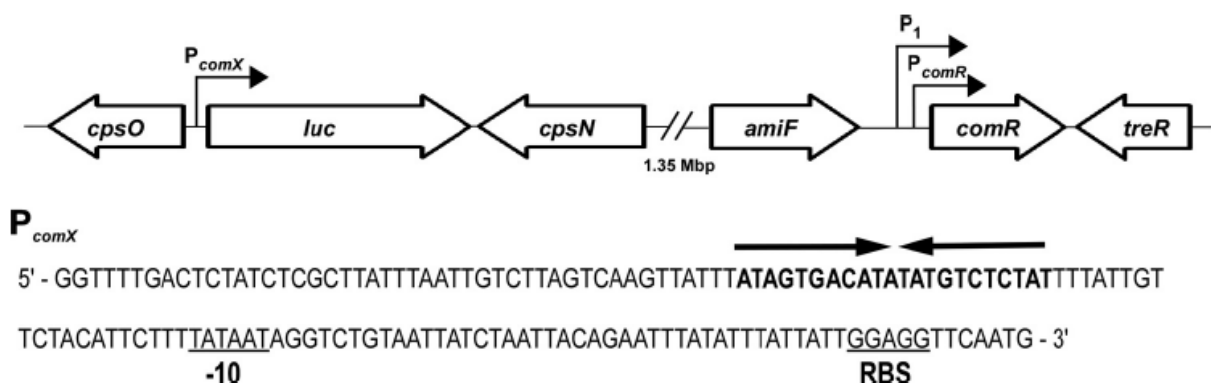


Figur 3.6: Viser ComRS systemet i *S. thermophilus*. Figuren er forklart i teksten. Figuren er hentet fra Fontaine *et al.* (2010).

Hypotesen til Fontaine *et al.* (2010) var at reguleringen av de tidlige/early kompetanse geneene er avhengig av opptak av et sekretert feromon via Ami systemet. Det er vist at oligopeptid ABC

transporteren Ami er absolutt nødvendig for transkripsjonen av ComX (Fontaine *et al.*, 2010). Forskerne kom frem til en modell som beskriver systemet som induserer kompetanse hos *S. thermophilus*, denne modellen er skisert i Figur 3.6.

Figur 3.6 er hentet fra Fontaine *et al.* (2010) og viser hvordan forskerne mener aktiveringen av early genes hos *S. thermophilus* foregår. Ved vekst i CDM (chemically defined medium) produseres ComS (peptid Shp0316) vist ved nummeret 1 i Figur 3.6. ComS blir fraktet/transportert/sekrettert ut av cellen (2) og gjennomgår et eller flere trinn som fører til at ferdig ComS* vil befinne seg i mediet rundt cellene (3). Mengden ComS* i mediet vil øke og etter hvert nå et punkt hvor proteinet AmiA3 gjenkjenner peptidet og Ami transporteren (AmiCDEF) vil frakte ComS* inn i cellene (4). Inne i cellen vil ComS* binde seg til og aktivere transkripsjonsregulatoren ComR (5). ComR binder til operator sekvenser, ECom boks, oppstrøms for *comS* og oppstrøms for *comX* (6). Bindingen av ComR til ECom boksen vil føre til at den positive feedback loopen aktiveres/opprettholdes, mens bindingen oppstrøms for *comX* vil føre til aktivering av late competence genes og gjøre cellen naturlig kompetent.



Figur 3.7: Viser hvordan ComRS systemet fra *S. thermophilus* er satt inn i lokuset for kapseldannelse i *S. pneumoniae* R6. Aktivering av P_{comX} vil føre til at *luc* genet (eller eventuelt annet innsatt gen) uttrykkes. Figuren er hentet fra Berg *et al.* (2011)

Berg *et al.* (2011) overførte ComRS systemet fra *S. thermophilus* inn i lokuset som koder for kapseldannelse i *S. pneumoniae* R6, slik som vist i Figur 3.7. *S. pneumoniae* R6 har ingen kapsel og innsetning av et fragment mellom genene *cpsO* og *cpsN* skulle ha minimal biologisk påvirkning på cellene. Systemet for opptak av ComS* ble ikke overført til *S. pneumoniae*, det ble vurdert slik at de native transportkanalene hos *S. pneumoniae* ville være i stand til å gjenkjenne og transportere ComS* over cellemembranen (Berg *et al.*, 2011).

Berg *et al.* (2010) viste at ComS* ble transportert inn i *S. pneumoniae* og at genekspressjonen fra P_{comX} var doseavhengig i forhold til konsentrasjon av ComS*. Eksperimenter basert på å måle mengde luciferase uttrykt fra P_{comX} viste at systemet også var godt egnet til gen-depletion studier. Maksimalt genekspressjon fra P_{comX} ble oppnådd ved peptidkonsentrasjoner mellom 1 og 2 μM i mediet.

Dette peptidregulerte systemet som Berg *et al.* (2011) har utviklet gjør det mulig å studere essensielle gener ved å uttrykke de ektopisk. Dette systemet har ble brukt i denne oppgaven for å undersøke de to genene *ftsW* og *rodA*. Det som ble gjort var å sette inn genet av interesse bak den induserbare P_{comX} samtidig som det native genet ble fjernet. Når det er ComS* til stede i vekstmediet vil cellene teoretisk vokse som normalt, og når vi reduserer konsentrasjonen av ComS* eller lar være å tilsette ComS* til mediet vil vi stresse cellene. Når cellene går fra vekst med ComS* tilgjengelig til vekst uten ComS* vil de gradvis bli tømt (depleted) for det aktuelle proteinet. I denne perioden vil det være meget interessant å se hvordan cellene reagerer når de gradvis tømmes for et essensielt gen.

Ved måling av OD_{492} i vekstmediet ved faste intervaller får vi ut en kurve over veksten til cellene som viser oss når veksten hemmes som følge av gen-depletion. Dersom man ønsker å se på cellene ved mikroskopering kan man ut ifra kurven bestemme når det beste tidspunktet for å fikserer celler er.

Det beste tidspunktet for å fikserer celler vil være når man ser på kurven at veksten til de depletede cellene begynner å avta sammenlignet med celler som har tilført ComS*. Det er viktig at cellene fortsatt er i vekst og ikke har nådd den stasjonære fasen når man ønsker å se hvordan fysiologien til cellene påvirkes av mangel på et essensielt gen.

3.2.2 Bruk av ComRS gendepletion systemet i *S. pneumoniae*

Systemet Berg *et al.* (2011) har utviklet for å studere depletion av essensielle gener er beskrevet i avsnitt 3.2.1. Dette systemet ble brukt i denne oppgaven. Eksperimentet blir utført på en FluoStar Optima plate-leser (BMG Labtech). Denne maskinen leser av OD ved bølglengde 492 nm i en 96-brønns plate (12 kolonner*8 rader) med gjennomsiktig bunn (mikrotiterplate). Maskinen holder temperaturen underveis i kjøringen på 37 °C (kan justeres dersom ønskelig). Hvor ofte maskinen skal måle OD i brønnene velges før man startereksperimentet. Maskinen har software som gir oss resultatene fra alle målingene

underveis og den lager også grafer som viser utviklingen i brønnene etter hvert som maskinen gjør målinger. Dette gjør at det er lett å følge veksten til forskjellige bakterier underveis og se når veksten til forskjellige mutanter påvirkes.

Gen-depletion eksperimentene ble satt opp på følgende måte:

1. Bakteriekulturen fortynnes til $OD_{550} \sim 0,05$ i C-medium med ComS* og inkuberes 1,5 timer på vannbad 37 °C
2. Bakteriekulturen spinnes ned og supernatanten fjernes.
3. Pelleten vaskes ved å resuspendere i 1 ml reint C-medium (uten ComS*) og spinne ned ved 3500 rpm i 2,5 min.
4. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes igjen i 1 ml reint C-medium.
5. OD_{492} justeres til $\sim 0,04$
6. Neste trinn er å sette opp en fortynningsrekke av bakteriekulturen. Tidligere ble 700 μ l reint C-medium tilsatt til 12 sterile eppendorfrør. 700 μ l av kulturen ($OD_{492} \sim 0,04$) blir overført til det første eppendorfrøret og blandes, deretter overføres 700 μ l fra dette røret til neste rør og blandes godt. Slik gjøres videre for alle de 12 rørene.
7. Fortynningsrekken tilsettes så til to rader i 96-brønnplaten. Det tas ut 300 μ l fra hver fortynning i fortynningsrekken og overføres til tilsvarende kolonner på platen. I en av radene har vi tilsatt ønsket mengde ComS* (slik at sluttkonsentrasjonen etter tilsetning av 300 μ l blir riktig) slik at vi får to paralleller en med og en uten tilsatt ComS*. En blank prøve med kun C-medium tilsette brønn A1. Maskinen vil automatisk trekke målingene av den blanke prøven fra de andre målingene slik at grafen som presenteres blir riktig.
8. Når platen er klar ble den satt inn i maskinen og eksperimentet startet. Et eksperiment varer som regel 18 timer eller mer (sjelden mer enn 22 timer) avhengig av hvordan bakterien en ser på oppfører seg og når det man ønsker å observere inntreffer.

3.2.3 Fiksering av celler til mikroskopianalyser

Når uttrykkningen av et essensielt gen reduseres i en celle vil det være interessant og observere om cellenes fysiologi endrer seg. En av måtene å gjøre det på er å mikroskopere celler som blir fiksert mens de blir depleted for det essensielle genet. For å få til dette økes skalaen på fortynningsrekken i depletion forsøkene til 5 ml + 5 ml (istedenfor 700 μ l + 700 μ l i punkt 6 i

avsnitt 3.2) i glassrør istedenfor eppendorfrør. Til platen ble fremdeles 2 * 300 µl tilsatt og dermed vil det være igjen 4,4 ml med bakteriekultur i et glassrør. Halvparten av dette volumet ble overført til et nytt rør og i et av disse ble ønsket mengde ComS* tilsatt. Disse cellekulturene ble innkubert ved 37 °C i varmeskap mens gen-depletion foregår. I varmeskapet har man nå to paralleller av den samme fortynningsrekken som er i FluoStar Optima plate-leseren, en med og en uten tilsatt ComS*.

Vekstkurvene til de uinduserte cellekulturene viste at vekstraten begynte å avta sammenlignet med den induserte kulturen. På dette tidspunktet ble 1 ml med kultur fra glassrørene ved hvert uttak fiksert, det vil si at jeg hadde nok materiale til 2 fikseringer. 1 ml med bakteriekultur blir tilsatt 400 µl med fikseringsløsning og innkubert på is. Prøvene ble oppbevart ved 4 °C.

3.2.4 Mikroskopering av fikserte celler

Fikserte celler ble undersøkt ved mikroskopering for å observere om *S. pneumoniae* fikk nye fenotyper ved gen-depletion av FtsW eller RodA. Mikroskoperingen ble utført på et Zeiss LM700 mikroskop. Mikroskopering var såkalt DIC-mikroskopering (Differential interference contrast). DIC-mikroskopering gir et inntrykk av en tre-dimensjonal struktur i prøven som mikroskoperes.

Lyset sendes gjennom to Nomarski eller Wollaston prismer som gir to parallelle lysstråler som er polarisert med 90° i forhold til hverandre. Etter å ha gått gjennom prøven samles lysstrålene i stråle polarisert ved 135°. Fordi lyset har gått gjennom prøven på ulike steder vil forskjellene i prøven før til en forandring i lengden på den “optiske vandringen” til noe av lyset. Denne optiske forskjellen (optical differentiation) danner det bildet vi ser.

3.2.3.1 Lokalisering av lipid II ved fluorescens mikroskopi av BODIPY[®] FL vancomycin

For å undersøke om lokaliseringen av lipid II i celleveggen til *S. pneumoniae* ble endret ved depletion av FtsW ble et fluorescerende fargestoff, BODIPY[®] FL bundet til vancomycin brukt. Vancomycin binder til de to D-Ala-D-Ala enhetene i posisjon 4 og 5 i peptidkjedene i celleveggen til *S. pneumoniae*. Dersom de to D-Ala-D-Ala enhetene er fjernet vil ikke vancomycin binde til peptidkjeden. Tanken bak forsøket var at BODIPY[®] FL vancomycin vil binde på de stedene hvor det skjer celleveggsyntese fordi det er her andelen peptidkjeder med D-Ala-D-Ala enhetene er størst ettersom disse enhetene fjernes i ferdig syntetisert cellevegg. I tillegg til behandlingen med BODIPY[®] FL vancomycin ble de fikserte cellene behandlet med

et tilsvarende volum med vancomycin for å senke fluorescens signalet og forhåpentligvis få et klarere bilde av hvor i celleveggen lipid II befinner seg.

Flere ulike fremgangsmåter ble brukt for å finne den måten som ga best resultat. Farging av både levende og fikserte celler ble forsøkt, forskjellige forhold mellom BODIPY[®] FL vancomycin og vanlig vancomycin ble forsøkt og innkubering på glass og i rør ble forsøkt. Fremgangsmåten som fungerte best var denne:

1. I et eppendorfrør ble 100 µl løsning med fikserte celler blandet med 3 µl vanlig vancomycin og 2 µl BODIPY[®] FL vancomycin.
2. Løsningen ble innkubert i 10 min ved romtemperatur.
3. Løsningen ble vasket 2 ganger i PBS ved å spinne ned og fjerne supernatanten mellom hver vask.
4. De fargede cellene ble løst i 100 µl PBS og 5 µl ble overført til objektglass for mikroskopering.

3.3 Test av antibiotika sensitivitet

For å teste sensitivitet mot ulike antibiotika ble det utført et såkalt ”softagar overlay assay”. Denne metoden er basert på å tilsette en bestemt mengde bakteriekultur til flytende soft-agar, blande dette og deretter helle blandingen over i en skål med ferdig støpt TH-agar. Når soft-agaren hadde stivnet ble antibiotikastrips eller -diskett plassert oppå agaren. Prosedyren for forsøket var som følger:

1. TH soft-agar oppbevares på vannbad 47 °C. Soft-agaren alikvoterer ut i glassrør, 10 ml i hvert rør.
2. Riktig antall TH-skåler som trengs i forsøket er temperert til romtemperatur. Når skålene er temperert strykes to tredjedeler av den totale mengden ComS* ut på skålene.
3. Bakteriekulturene som skal undersøkes dyrkes til OD₅₅₀ ~0,3 på vannbad 37 °C.
4. De ferdige TH-skålene tilsettes to tredjedeler av den totale ComS* mengden som trengs for riktig sluttkonsentrasjon. Skal slutt konsentrasjonen av ComS* for eksempel være 2,0 µM trengs 120 µl 500 µM ComS* (konsentrasjonen på stockløsningen). Det totale volumet av agar på TH-skålen (20 ml) og soft-agar (10 ml) er 30 ml.

$$30 \text{ ml} * 2,0 \mu\text{M} = 500 \mu\text{M} * X \text{ ml}$$

$$X = \frac{30 \text{ ml} * 2,0 \mu\text{M}}{500 \mu\text{M}} \quad X = 0,12 \text{ ml} = 120 \mu\text{l}$$

Dermed blir 80 μl ComS* strøket ut på TH-skålene før soft-agaren tilsettes, mens de resterende 40 μl (en tredjedel) tilsettes til soft-agaren. For andre ComS* konsentrasjoner lages fortynnede løsninger slik at mengden i μl som tilsettes er den samme for alle fortynningene.

5. Et volum 100 μl bakteriekultur og ComS* tilsettes soft-agaren som blandes med vortexer og helles ovenpå TH-agaren.
6. Da soft-agaren har blitt avkjølt og stivnet ble antibiotikastrips eller -diskett plassert oppå soft-agaren. Det er viktig å sørge for at hele stripsens overflate er i kontakt med agaren.
7. Skålene innkuberes over natt ved 37 °C ved anaerobe forhold.
8. Etter inkubering observeres bakterieveksten på skålen og størrelsen på inhiberingssonene (soner uten vekst) måles. På antibiotikastripsene er det en skala som kan leses av, mens for diskettene måles diameteren på den klare sonen rundt disketten.

3.4 Rensing av cellevegg

3.4.1 Dyrking av celler og rensing av cellevegg for analyse av celleveggstrukturen

Cellevegg ble rensed fra 1 liter cellekultur med en OD_{550} på 0,3-0,4. For celler utsatt for gen-depletion ble ikke alltid denne OD_{550} oppnådd grunnet redusert vekst. En løsning på dette er å dyrke de cellene som skal bli depleted i 2 liter C-medium for å få nok cellemateriale.

Cellevegg fra *S. pneumoniae* ble isolert som følger:

1. Cellene ble dyrket i til $OD_{550} \sim 0,3$ før de ble høstet ved hjelp av sentrifugering ved 10 000 x g i 10 min. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 40 ml kald 50 mM Tris/HCl pH 7,0.
2. Den resuspenderte pelleten ble tilsatt dråpevis til 120 ml kokende 5 % SDS løsning under omrøring. Løsningen ble kokt i 15 min og deretter avkjølt til romtemperatur.
3. Celleveggmaterialet ble samlet ved sentrifugering ved 12 000 x g i 10 min i romtemperatur. Pelleten ble vasket fri for SDS ved gjentatte resuspenderinger; først 2 ganger i 20 ml 1 M NaCl, og deretter minst 5 ganger i MQ-vann.
4. Den vaskede pelleten resuspenderes i 2 ml MQ-vann og tilsettes 2 ml med syrevaskede glasskuler (<106 μM , Sigma). Celleveggen knuses mekanisk i en FasPrep

maskin ved en hastighet på 6,5 m/s i 5 omganger. Prøvene holdes på is i 1 min mellom hver omgang. Volumet til prøvene justeres opp til 25 ml med MQ-vann, og cellevegg som ikke er knust og glasskuler fjernes ved sentrifugering ved 2000 x g i 5 min. Knust cellevegg og glasskuler vil da være løst i supernatanten mens uknuste celler vil sedimenteres. Supernatanten overføres til nye rør og celleveggmateriale sedimenteres ved sentrifugering ved 25 000 x g i 15 min i romtemperatur.

5. Pelleten resuspenderes i 2 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,5 med 20 mM MgSO₄. DNase (10 µg/ml) og RNase (50 µg/ml) tilsettes og prøven inkuberes i 2 timer ved 37 °C. Etter 2 timer tilsettes 10 mM CaCl₂ og 100 µg/ml trypsin og prøven inkuberes videre over natt ved 37 °C.
6. SDS fra en 8 % løsning tilsettes til en slutt konsentrasjon på 1 % og prøven inkuberes 15 min ved 80 °C. Volumet justeres til 20 ml og celleveggen sedimenteres ved sentrifugering ved 25 000 x g i 30 min ved romtemperatur.
7. Pelleten resuspenderes i 10 ml 8 M LiCl og inkuberes ved 37 °C i 15 min før celleveggen sedimenteres ved 25 000 x g i 30 min ved romtemperatur.
8. Pelleten resuspenderes i 10 ml 100 mM EDTA, pH 7,0, inkuberes ved 37 °C i 15 min og sedimenteres slik som tidligere, ved 25 000 x g i 30 min i romtemperatur
9. Pelleten vaskes så med 20 ml MQ-vann, deretter med 20 ml aceton og til slutt med 20 ml MQ-vann. Pelleten fra siste sentrifugering resuspenderes i et lite volum med MQ-vann (1-2 ml).
10. Celleveggen ble så tørket i en vakuumsentrifuge, og mengde tørrstoff ble bestemt.
11. Den tørkede celleveggen ble så løst i et volum MQ-vann som ga en sluttkonsentrasjon på 50 mg/ml cellevegg. Den rensede celleveggen ble oppbevart ved – 80 °C.

3.4.2 Klargjøring av celleveggmateriale for High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.4.2.1 Hydrolyse av cellevegg med LytA

Enzymet LytA er et autolysin i *S. pneumoniae* og dets aktivitet fører til hydrolyse av celleveggen i bakteriene. LytA fører til lysis av *S. pneumoniae* celler ved å bryte bindingene mellom den første aminosyren i peptidkjeden og MurNAc enheten i glykankjeden. Når bindingen mellom peptidkjeden og glykankjeden brytes fører dette til hydrolyse av celleveggen (Mellroth *et al.*, 2012). Hensikten med dette forsøket er å se på komposisjonen av muropeptider i celleveggen til *S. pneumoniae* og ved å behandle den rensede celleveggen med

LytA vil peptidbroene og glykankjedene bli skilt fra hverandre slik at peptidbroene i celleveggen kan analyseres.

Produktet fra rensing av cellevegg ble behandlet etter følgende protokoll før High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

1. To mg rensset cellevegg behandles med LytA i en reaksjon med et totalt volum på 100 μ l etter følgende reaksjonsblanding:

Reagens	
100 mM phosphate buffer, pH 7,0	10 μ l
2 mg cellevegg	40 μ l
MQ-vann	49,5 μ l
LytA (1mg/ml)	0,5 μ l
Totalt volum	100 μ l

2. Reaksjonsblandingen ble innkubert ved 37 °C over natt.
3. Prøven ble varmet opp til 95 °C på vannbad for å denaturere og felle ut LytA.
4. Prøven ble sentrifugert ved 20 000 g i 10 min. Pellet består av utygd cellevegg.
5. Supernatanten overføres til et nytt eppendorfrør. Denne ble tilsatt 100 μ l 0,5 M Na-borat, pH 9.0.
6. Peptidene i prøven ble redusert å tilsette 2-3 mg med NaBH₄ ble tilsatt til prøven og røret ble tappet for å blande prøven. Røret ble inkubert ved romtemperatur i 30 min.
7. 10 μ l 20% orto fosforsyre ble tilsatt prøven for å stoppe reaksjonen.
8. pH i løsningen ble justert til 3 ved å tilsette orto fosforsyre. pH ble bestemt ved å legge en liten dråpe mellom de to øverste fargene på et pH-papir.

3.4.2.2 HPLC

Etter at prøvene var behandlet som i avsnitt 3.4.2.1 var de klare for HPLC. Kromatografi er betegnelsen på separering av stoffer som skjer ved at et stoffe løses i forskjellige faser som beveger seg med ulike hastigheter. I de fleste kromatografi metoder er det en stasjonærfase og en mobilfase. I HPLC blir mobilfasen presset gjennom den tettpakkede stasjonærfasen ved bruk av høyt trykk. Metoden brukes til å analysere separasjonen av mer eller mindre komplekse løsninger. Stoffene i prøven som analyseres vil separeres med hensyn på stoffenes egenskaper. Hydrofobe molekyler vil bruke lenger tid gjennom stasjonærfasen enn stoffer

som er mer hydrofile (Neue, 1997). Når stoffene har vandret gjennom kolonnen detekteres de og mengden av stoffet og hvor lang tid stoffet brukte gjennom kolonnen danner grunnlaget for et kromatogram som viser sammensetningen av stoffer i prøven som er analysert.

Stoffene fra den behandlede celleveggen ble separert på en C18 kolonne (Vydac 218TP C18 5u, 250 mm x 4,6 mm) ved hjelp av HPLC (Gilson).

Protokoll for HPLC var som følger:

1. Mobilfasen i HPLC var 0,05 % TFA (triflouracetic acid) og løsemiddelet var 20 % acetonitril i en 0,035 % TFA løsning. Alle løsninger ble filtrert gjennom et 0,2 µm filter og begge mobilfasene ble avgasset den dagen de ble brukt.
2. Programmet på HPLC-maskinen var Chromleon. Følsomheten = AUFS var 0,1. Buffer A var 0,05 % TFA og buffer B var 20 % acetonitril i 0,035 % TFA. Programmet startet med 100 % buffer A og 0 % buffer B og gikk gradvis til 0 % buffer A og 100 % buffer B. Total mengde var 120 ml.
3. Oppsettet som ble brukt for å separerer peptidene på kolonnen var:

Flow = 0,5 ml/min og absorbanse = 206 nm

5 min vasking

100 min eluering fra 0-20 % acetonitril

15 min regenerering av kolonnen med mobilfase

4. Mengden prøve tilsatt kolonnen var 40 µl for G.S.11 og 50 µl for CSS15.

3.5 Bruk av et luciferase reportergen for å observere/overvåke genuttrykk

Luciferase genot koder for et protein som oksiderer luciferin. Luciferin oksideres til oxyluciferin og resultatet er en produksjon av lys. Når luciferin tilsettes vekstmediet vil stoffet vandre/diffundere inn i cytoplasmaet til bakteriene i mediet. Dersom disse bakteriene uttrykker luciferase genot vil lys produseres. Oksidasjonen av luciferin er veldig effektiv og skjer så lenge substratet er til stede i cellene.

Disse egenskapene åpner for å bruke luciferase genot som en reporter av genuttrykk. Ved å sette inn luciferase genot direkte nedstrøms for et gen av interesse kan man måle genuttrykket som lysproduksjonen som oppstår. Når dette genot slås på starter lysproduksjonen øyeblikkelig og når uttrykket av genot går ned avtar lysproduksjonen umiddelbart. Ved bruk av PCR og overlapp ekstenjions som er beskrevet i avsnitt 3.1.1 og 3.1.1.1 kan man produsere

et DNA fragment som gjør det mulig å slå ut genet *ftsW* med luciferase genet. Ved naturlig transformasjon kan et slikt fragment overføres til genomet til *S. pneumoniae*.

Forsøket ble utført i en FluoStar Optima (BMG Labtech) plate-leser som måler både luminescens og OD₄₉₂. Bakteriene dyrkes i mikrotiterbrett hvor hver enkelt brønn totalt tar 300 µl. Forholdet mellom bakteriekultur og luciferin i brønnene var 280:20. Luciferinet ble tilsatt fra starten av forsøket.

4. Resultater

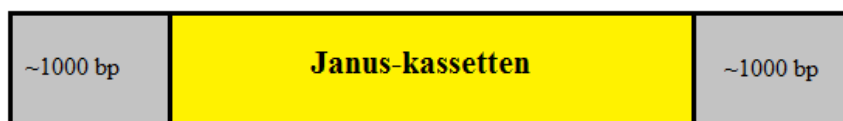
4.1 FtsW

Genet *ftsW* er tidligere blitt identifisert som et essensielt gen i *S. pneumoniae*. Og nylig har proteinet dette genet koder for, FtsW, blitt identifisert som en flippase som deltar i celleveggsyntesen ved å transportere celleveggsprecursoren lipid II gjennom cellemembranen. Det har blitt foreslått at FtsW deltar i celleveggsyntesen ved dannelsen av septum, blant annet ut fra lokaliseringen av proteinet i midten av cellen sammen med PBPs og lokaliseringen av genet *ftsW* i forhold til andre gener som deltar i dannelsen av septum i *S. pneumoniae*.

Vi ønsket å undersøke om FtsW og det homologe proteinet RodA gjør en lignende oppgave i *S. pneumoniae* og om de to proteinene er i stand til å vikariere for hverandre ved mangel på det andre proteinet. Et mål var også å studere morfologien til celler hvor nivået av FtsW gradvis ble senket. For å kunne undersøke disse tingene startet vi med å lage en Δ *ftsW*-mutant av *S. pneumoniae*.

4.1.1 Konstruksjon av Δ *ftsW* mutanter

Det første som ble gjort var å lage en *ftsW* mutant hvor *ftsW* er slått ut ved hjelp av Janus-kassetten (beskrevet i avsnitt 3.1.4). Dette var første trinn mot å lage en mutant hvor det native *ftsW* er fjernet og genet samtidig er satt inn i ComRS systemet slik at uttrykket av *ftsW* kan reguleres ved hjelp av ComS*. Først ble et DNA fragment som bestod av Janus-kassetten flankert av regionene ~1000 bp oppstrøms og nedstrøms for *ftsW*, slik som Figur 4.1 viser, laget ved bruk av overlapp ekstensjons PCR som er beskrevet i avsnitt 3.1.1.1.



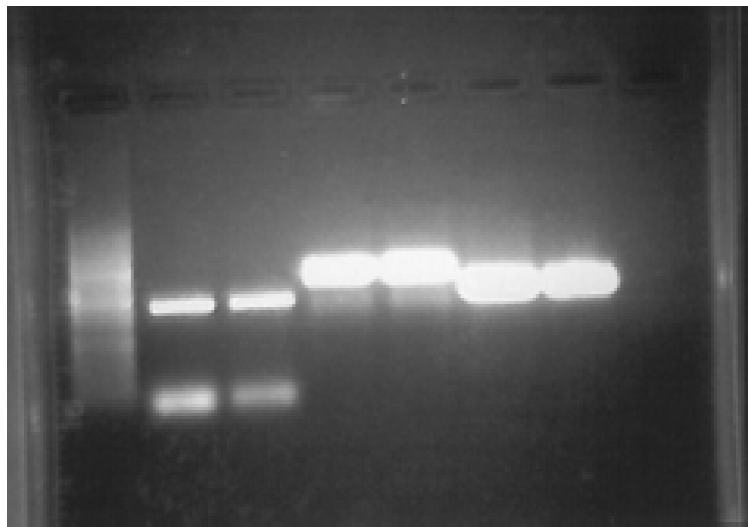
Figur 4.1: Fragmentet som ble brukt for å slå ut *ftsW* i *S. pneumoniae*. De grå områdene er identiske med områdene oppstrøms og nedstrøms for *ftsW* hos *S. pneumoniae*.

Veien til å lage dette ferdige fragmentet gikk gjennom flere trinn. Det første trinnet var å lage de to regionene oppstrøms og nedstrøms for *ftsW* og Janus-kassetten som hadde den konstitutive promoteren P_1 ved 3' ende. P_1 ble introdusert nedstrøms for Janus for å forsikre at genet *ppc* (phosphoenolpyruvat carboxylase) nedstrøms for *ftsW* fortsatt ble uttrykt etter transformasjon med Janus::*ftsW* fragmentet. Det ble gjort ved å bruke spesifikke primere og templat DNA fra stammer som har de aktuelle regionene slik som listet i Tabell 4.1.

Tabell 4.1: PCR for å amplifisere de to regionene oppstrøms og nedstrøms for *ftsW* og Janus-kassetten

Primere	Templat DNA	Produkt
CSS1 og CSS2	RH 1	~1000 bp oppstrøms <i>ftsW</i>
CSS3 og CSS4	RH1	~1000 bp nedstrøms <i>ftsW</i>
Kan484F og khb94	RH 425 (#235)	Janus-kassetten med P1 nedstrøms

PCR-produktene ble analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese og renset som beskrevet i avsnitt 3.1.3. På dette tidspunktet var de tre delene i Figur 4.1 produsert, men var enkeltfragmenter og ikke satt sammen til ett DNA fragment.



Figur 4.2: Figuren viser resultatet fra agarose gelelektroforese av tre produktene fra PCR-reaksjonene i Tabell 4.1. Brønn 1 inneholder 1 kb ladder (Invitrogen), brønn 2 og 3 inneholder fragmentet oppstrøms for *ftsW* med overheng til Janus-kassetten i 3' ende. Brønn 4 og 5 inneholder Janus-kassetten med den konstitutive promoteren P₁ i 3' ende. Produktene i brønn 6 og 7 er regionen nedstrøms for *ftsW* og har overheng til Janus-kassetten og den konstitutive promoteren P₁ i 5' ende.

Neste trinn var å koble regionen oppstrøms for *ftsW* sammen med Janus-kassetten for å danne et fragment som bestod av de to første delene i Figur 4.1. PCR med primerne CSS1 + khb94 og de to rensede PCR-produktene fra reaksjon 1 og 3 i Tabell 4.1 som templat ble utført. Produktet ble analysert ved agarose gelelektroforese og renset slik som tidligere beskrevet.

Tabell 4.2: PCR for å danne og amplifisere et fragment bestående av regionen oppstrøms for *ftsW* og Janus-kassetten ved overlapp ekstensjons PCR.

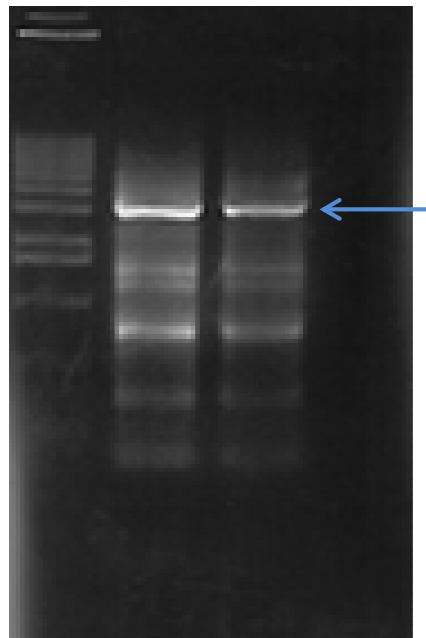
Primere	Templat DNA	Produkt
CSS1 og khb94	~1000 bp ops. <i>ftsW</i> + Janus-kassetten	~1000bp ops <i>ftsW</i> – Janus-kassetten

Siste trinn i produksjonen av DNA-fragmentet i Figur 4.1 ble fullført ved å fusjonere produktet fra PCR i Tabell 4.2 (~1000bp ops *ftsW* – Janus) med produktet fra reaksjon 2 (~1000bp neds *ftsW*) i Tabell 4.1 ved hjelp av overlapp ekstensjons PCR. Primere i denne reaksjonen var CSS1 og CSS4 som flankerer hele fragmentet.

Tabell 4.3: PCR for å sette sammen og amplifisere det ferdige fragmentet bestående av Janus-kassetten flankert av regionene oppstrøms og nedstrøms for *ftsW*.

Primere	Templat DNA	Produkt
CSS1 og CSS4	~1000 bp ops – Janus + ~1000 bp neds	1000bp ops – Janus – 1000bp neds (Figur 4.1)

Det ferdige produktet ble analysert ved gelelektroforese og renset slik som tidligere. Figur 4.3 viser bilde av produktet fra den siste PCR før rensingen.



Figur 4.3: Bildet viser produktet etter amplifiseringen av fragmentet som er satt sammen av oppstrøms *ftsW* regionen, Janus-Kassetten og nedstrøms *ftsW* regionen (Tabell 4.3). Brønn 1 inneholder 1 kb ladder (Invitrogen). Produktene i brønn 2 og 3 de samme.

4.1.2 Knockout av *ftsW* i *S. pneumoniae*

For å verifisere at *ftsW* er et essensielt gen i *S. pneumoniae* valgte vi å knocke ut dette genet ved å transformere *S. pneumoniae* med Janus-kassetten som hadde *ftsW* flankerende sekvenser. Dette ble gjort seks uavhengige ganger. Antall synlige kolonier etter innkubering over natt ved 37 °C er presentert i Tabell 4.1.

Tabell 4.4: Tabellen viser antall kolonier på skåler etter transformasjon for å slå ut *ftsW*. Skålene hadde en Km konsentrasjon på 400 µg/ml.

	Transformasjon 1	Transf. 2	Transf. 3	Transf. 4	Transf. 5	Transf. 6
+ DNA 10 µl	20	23				
+DNA 20 µl	60	41		31	51	62
+DNA 100 µl	262	188	17	186		
-DNA 100 µl	≈20	22	0	46	0	0

Resultatet viste at transformasjon av *S. pneumoniae* med *Janus::ftsW* kassetten produserte transformanter. Disse transformantene ble verifisert ved hjelp av PCR til å være Δ *ftsW* mutanter noe som viste at *ftsW* kunne deleteres, men det er hvert å merke seg at transformasjonseffektiviteten var markant lavere enn det som er forventet ved transformasjon med Janus-kassetten. Selv om *ftsW* lot seg deletere var det lave antall transformanter en indikasjon på at *S. pneumoniae* normalt er avhengig av *ftsW* for å være levedyktig. Δ *ftsW*-mutantene vokste veldig sakte i det flytende C-mediumet sammenliknet med villtype. Og det var helt tydelig at Δ *ftsW* mutantene hadde problemer med å vokse.

Ut ifra den lange tiden cellene brukte på å vokse virker det som om *ftsW* er et veldig viktig gen hos *S. pneumoniae* slik som teorien sier (Thanassi *et al.*, 2002). Andre forsøk med denne Δ *ftsW* mutanten som blir presentert videre i oppgaven tyder på at *ftsW* er et essensielt gen hos *S. pneumoniae*.

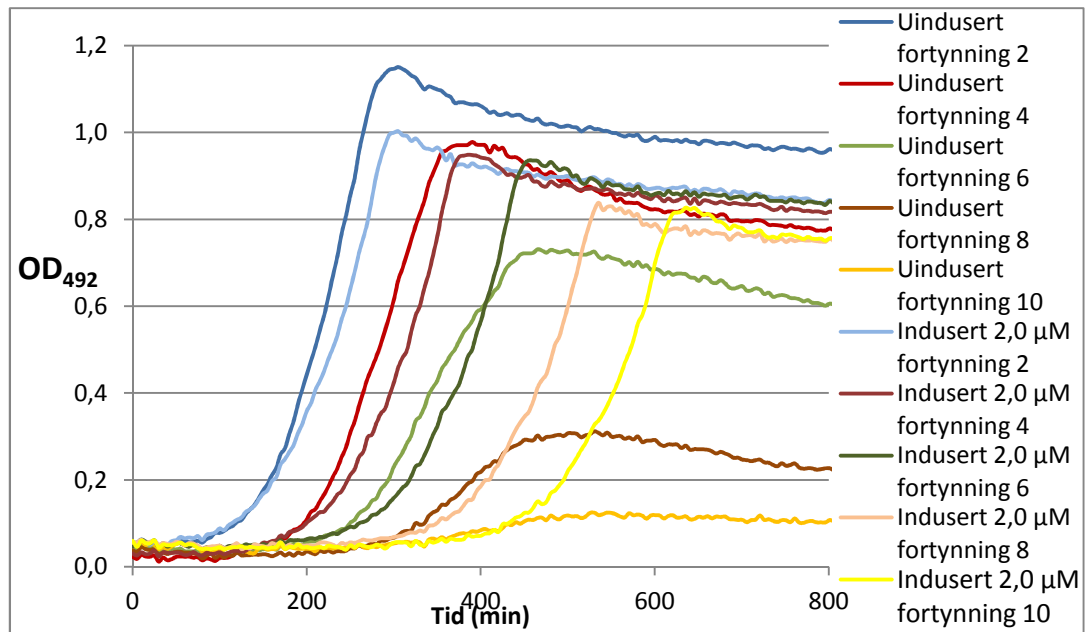
4.1.5 Depletion av *ftsW* ekspresjon

Siden Δ *ftsW*-mutanten hadde lav vekstrate, og vi var usikre på om denne mutanten var levedyktig på grunn av andre uspesifikke suppressormutasjoner som hadde oppstått som følge av et seleksjonspress om å overleve uten *ftsW* ønsket vi å ha mer kontroll på uttrykket av *ftsW*. Vi ønsket å kunne skru av *ftsW* ekspresjonen i friske celler i eksponentiell vekst, for å kunne

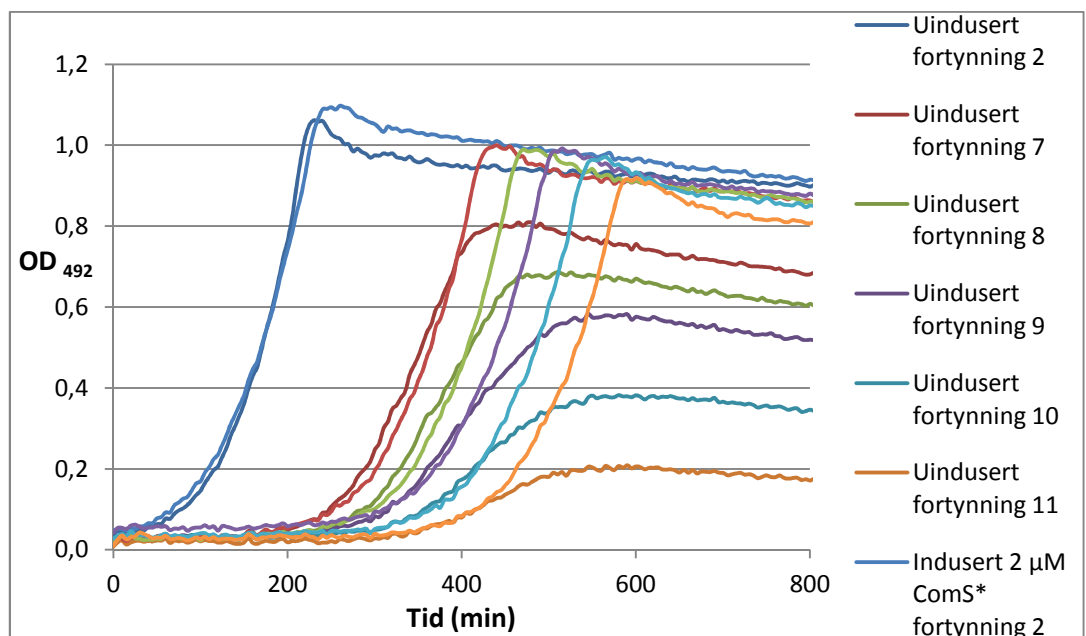
se på effekten av mangel på FtsW uten påvirkning fra eventuelle supressormutasjoner som kunne ha oppstått under konstruksjonen av $\Delta ftsW$ -mutanten. For å kunne gjøre dette valgte vi å uttrykke *ftsW* ektopisk ved hjelp av ComRS systemet som er beskrevet i avsnitt 3.2.1 og 3.2.2. Ved bruk av prinsippene presentert i avsnitt 3.1 og 4.1.1 ble det konstruert en *ftsW* mutant hvor det native *ftsW* er slått ut med Janus og *ftsW* er satt inn i ComRS systemet bak P_{comX} (Figur 3.7) slik at *ftsW* kunne uttrykkes ektopisk ved å indukere med ComS*. Denne stammen var CSS10 (Tabell 2.1).

Stammen CSS10 ble transformert med et fragment hvor de to regionene ~1000bp oppstrøms for *ftsW* og ~1000bp nedstrøms for *ftsW* var satt sammen uten genet eller Janus-kassetten mellom regionene. Etter denne transformasjonen var Janus-kassetten ved native *ftsW*'s loci fjernet fra CSS10 og stammen CSS12 var dannet. Området mellom *cpsO* og *cpsN* (Figur 3.7) hvor *ftsW* var satt inn bak P_{comX} ble sekvensert for å sjekke at innsetingen av genet *ftsW* hadde blitt riktig.

Gen-depletion av *ftsW*-mutanten CSS12 (P_{comX} -*ftsW*, $\Delta ftsW$) ble gjentatt fire ganger slik det er beskrevet i avsnitt 2.2.6.2. Resultatene fra to av eksperimentene er presentert i Figurene 4.4 og 4.5. Figurene viser veksten til noen utvalgte fortyninger i fortynningsrekken. Både de induerte og de uinduserte prøvene er representert i figurene.



Figur 4.4: Figuren viser hvordan *S. pneumoniae* responderte på depleksjon av *ftsW*. Som kontroll ble *ftsW* uttrykt ved å tilsette 2 μ M-ComS* til mediumet. Fra grafene ser vi at cellene responderer på depleksjon av *ftsW* med redusert vekstrate. For forytning 2 og 4 ser vi at veksten til *S. pneumoniae* i de kulturene som depletes for *ftsW* fremdeles er veldig lik den normale veksten. For forytningene fra nr. 6 og høyere ser vi at veksten til de depletede CSS12 cellene er kraftig redusert. Veksten til de depletede cellene avtar mye tidligere enn den gjør for cellene hvor *ftsW* uttrykkes med 2,0 μ M ComS*. De depletede cellene i forytning nr. 10 vokste ikke mer enn en maks OD₄₉₂ på rundt 0,12. I en kort periode av den eksponentielle veksten til kulturene ser vi at cellene som blir depletet for *FtsW* vokser litt raskere enn de cellene som uttrykker *ftsW* med en ComS*-konsentrasjon på 2,0 μ M.



Figur 4.5: Figuren viser hvordan *S. pneumoniae* responderte på depleksjon av *ftsW*. Som kontroll ble *ftsW* uttrykt ved å tilsette 2 μ M-ComS* til mediumet. Fra grafene ser vi at cellene responderer på depleksjon av *ftsW* med redusert vekstrate. For forytning 2 ser vi at veksten til *S. pneumoniae* i de kulturene som depletes for *ftsW* fremdeles er lik den normale veksten. For forytningene fra nr. 7 og høyere ser vi at veksten til de depletede CSS12 cellene er redusert. Veksten til de depletede cellene avtar tidligere enn den gjør for cellene hvor *ftsW* uttrykkes med 2,0 μ M ComS*. De depletede cellene i forytning nr. 11 vokste ikke mer enn opptil maks OD₄₉₂ på rundt 0,2. I en kort periode av den eksponentielle veksten til kulturene ser vi at cellene som blir depletet for *ftsW* vokser litt raskere enn de cellene som uttrykker *ftsW* med en ComS*-konsentrasjon på 2,0 μ M.

Som forsøkene med depletion av *ftsW* viser (Figur 4.4 og 4.5) er det tydelig at bakteriene reagerer på mangel av dette proteinet. Bakteriene i den høyeste fortynningen (fortynning 11) har store problemer med å vokse og oppnår kun en OD₄₉₂ på 0,1-0,2 før veksten stagnerer og cellene går inn i stasjonærfase. Dette støtter oppunder tanken om at *ftsW* er et essensielt gen hos *S. pneumoniae*. Grunnen til at cellene klarer å vokse litt til å begynne med kan være at cellene inneholder nok ComS* fra da de vokste i medium med ComS* før fortynning i ComS*-fritt medium til å vokse en kort periode før veksten stanser.

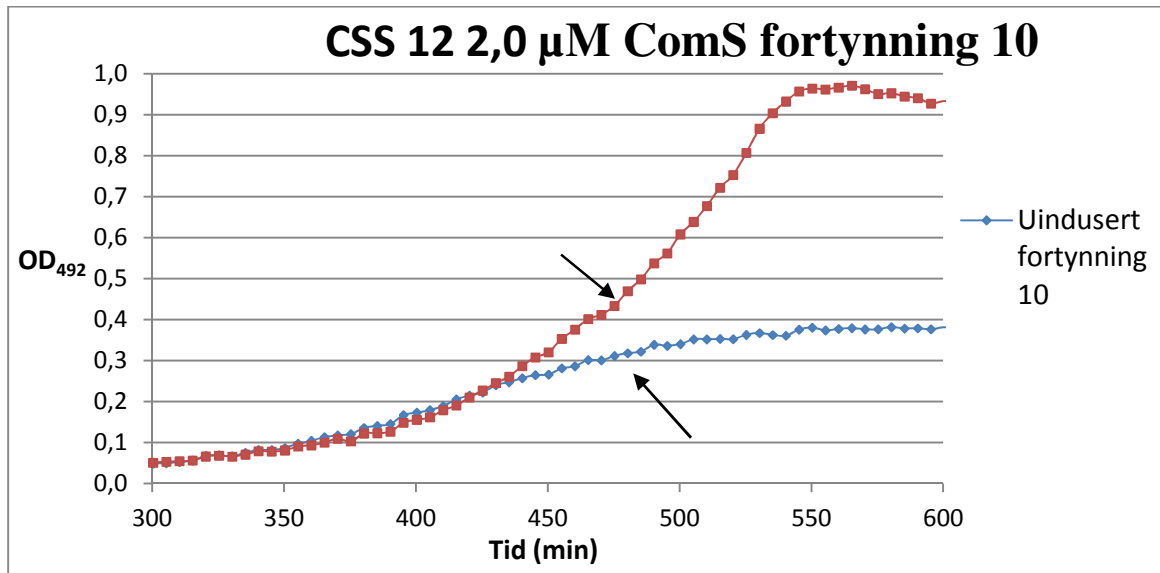
Vi ser også i lavere fortynninger enn fortynning 11 (blant annet fortynning 8, 9 og 10) at celleveksten hos de depletede cellene avtar før de induerte cellene, men det er en gradvis økning i hvor høy OD de depletede cellene når ettersom fortynningene blir lavere. Ved de aller laveste fortynningene er det ikke mulig å observere noen effekt på de uinduserte bakteriene. I de aller fleste gen-depletion forsøkene med *ftsW* var det ikke før i fortynning 5 eller 6 at en effekt på veksten hos de uinduserte cellene ble observert.

For lignende forsøk med andre gener har man sett eksempler hvor man allerede i fortynning 2 og 3 ser tydelig nedgang i veksten til de uinduserte cellene. Det at en slik effekt ikke ble observert før fortynning 6 i de fleste tilfeller indikerer at transkripsjonen av *ftsW* i *S. pneumoniae* er relativt lav i forhold til andre gener der effekten av gen-depletion sees ved høyere fortynning.

4.1.6 Mikroskopering av *ftsW*-depletede celler

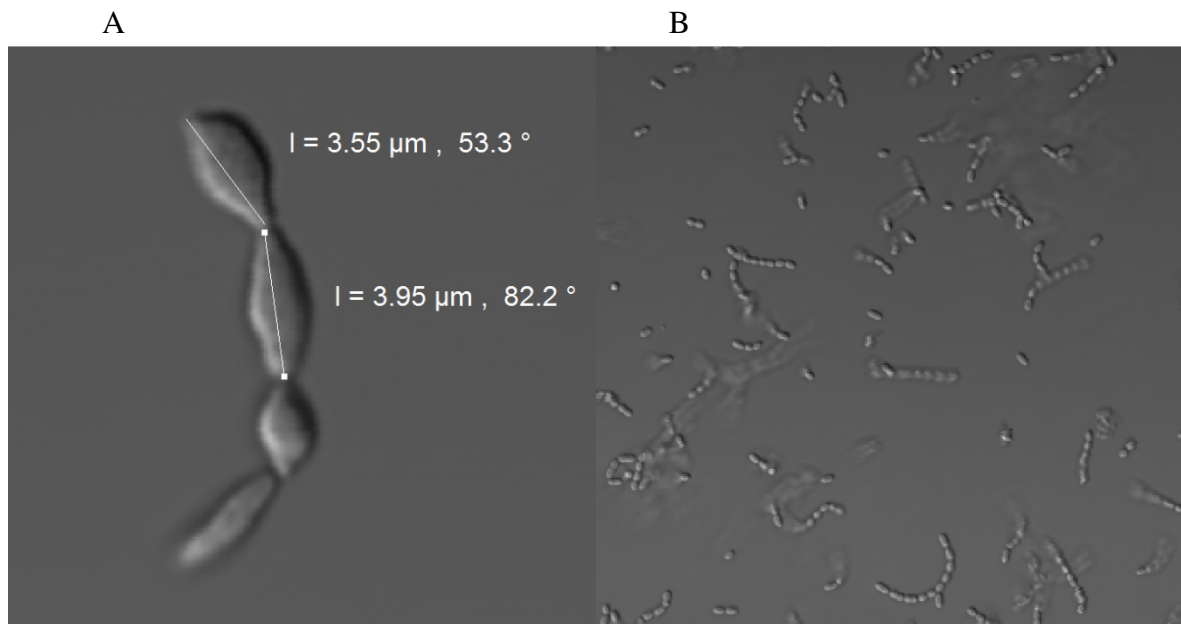
FtsW er vist å fungere som en flippase for lipid-II i celleveggsyntesen, og fravær av FtsW vil hemme normal celleveggsyntese. Vekstforsøkene der ekspresjonen av *ftsW* ble depletet viste tydelig at dette genet er helt essensielt for at *S. pneumoniae* skal være levedyktig. Siden *ftsW* er et essensielt gen i *S. pneumoniae* har man hittil ikke kunnet studere morfologien til en Δ *ftsW*-mutant, men ved å benytte et gen-depletion system som ComRS for gradvis å senke nivået av FtsW i cellene hadde vi muligheten til å oppdage morfologiske forandringer forårsaket av mangel på FtsW. Det ble tatt ut prøver med *ftsW*-depletede celler og ComS*-induserte celler fra fortynning 10 og disse ble fiksert og studert ved hjelp av DIC-mikroskopi. Tidspunkt for prøveuttak er indikert i Figur 4.3. På figuren ser vi en tydelig hemming av veksten hos de uinduserte bakteriene slik som også ble observert i tidligere forsøk med deplektion.

Ved å mikroskopere fikserte celler får man et inntrykk av om cellene får en karakteristisk fenotype ved depletion av FtsW, om det er en heterogen sammensetning av forskjellige fenotyper eller om fenotypen til cellene ikke endrer seg.



Figur 4.6: Figuren viser veksten til cellene i fortykning nr. 10 i et gen-depletion forsøk med stammen CSS12 (P_{comX} -ftsW, Δ ftsW) induisert med 2 μ M eller 0 μ M ComS*. Pilene markerer tidspunktet for når prøver ble tatt ut til DIC-mikroskopering.

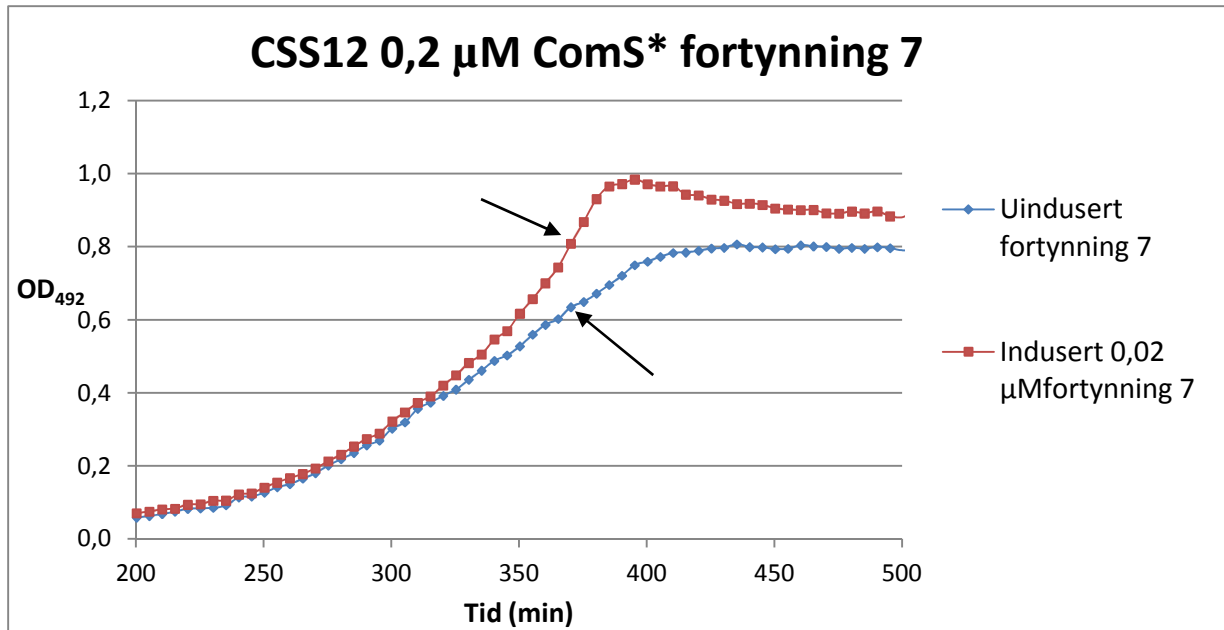
Prøver til mikroskopering ble tatt ut når veksthastigheten til de depletede cellene avtok. De to pilene på Figur 4.3 viser hvor prøvene på Figur 4.4 er tatt ut. Som man ser av de to pilene er prøvene tatt ut på et tidspunkt hvor de cellene som vokser med 2,0 μ M ComS* tilstede fortsatt vokser bra, mens veksthastigheten til de depletede cellene har avtatt. Cellene ble tatt ut etter 470 minutter.



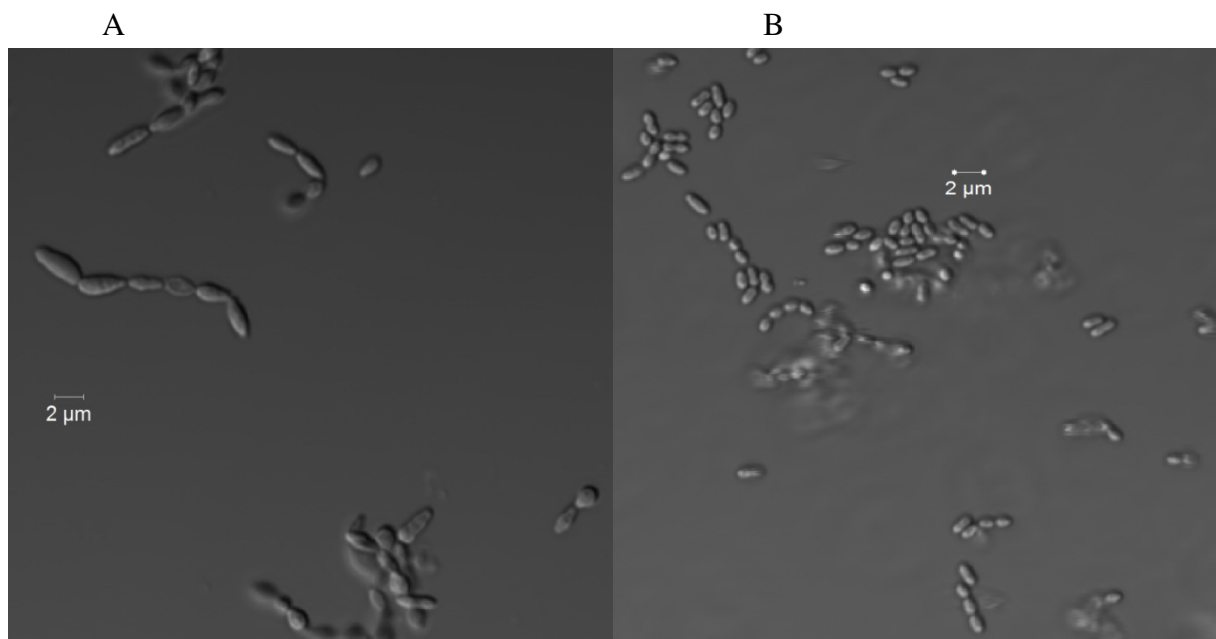
Figur 4.7: Bildet viser fikserte celler av stammen CSS12 (P_{comx} -ftsW, Δ ftsW) fra fortynning 10 i et gen-depletion forsøk. Cellene ble fiksert etter 470 min (se Figur 4.3). Bilde A viser celler som har vokst uten tilsatt ComS* i mediet slik at ekspresjonen av *ftsW* er sterkt redusert. Cellene viser en tydelig unormal morfologi. De er større enn villtypen, og har en mer avlang form. Bilde B viser celler som har vokst med 2 μ M ComS* i mediet. Cellenes morfologi ligner den normale ovokokke formen til *S. pneumoniae*, men med litt større grad av kjededannelse.

Kort oppsummert viser mikroskoperingen at de depletede cellene var større enn de induerte cellene. Mange av cellene fra den depletede prøven var godt over 2 μ m i diameter og flere var også så lange som 3,5 μ m slik som Figur 4.4 viser.

Celler fra de lavere fortynningene ble også mikroskopert for å se om den endringen i morfologi som ble observert for de høyeste fortynningene når veksten ble hemmet av mangel på FtsW også forekom i de lavere fortynningene. Som Figur 4.6 viser er veksten til de depletede cellene fra fortynning 7 ikke like kraftig redusert som det som ble observert for de depletede cellene i fortynning 10 (Figur 4.3). Spørsmålet var om morfologien til de depletede cellene også i denne fortynningen fikk endret sin morfologi.



Figur 4.8: Figuren viser veksten til cellene i fortynning nr. 7 i et gen-depletion forsøk med stammen CSS12 (P_{comx} -ftsW, Δ ftsW) induisert med 0,2 μ M eller 0 μ M ComS*. Pilene markerer tidspunktet for når prøver ble tatt ut til DIC-mikroskopering.



Figur 4.9: Bildet viser fikserte celler av stammen CSS12 (P_{comx} -ftsW, Δ ftsW) fra fortynning 7 i et gen-depletion forsøk. Cellene ble fiksert etter 370 min (se Figur 4.8). Bilde A viser celler som har vokst uten tilsatt ComS* i mediet slik at ekspresjonen av ftsW er sterkt redusert. Cellene viser en tydelig unormal morfologi. De er større enn villtypen, og har en mer avlang form. Bilde B viser celler som har vokst med 0,2 μ M ComS* i mediet. Cellenes morfologi ligner mer på den normale ovokokke formen til *S. pneumoniae*.

Mikroskopibildene viser at cellene endrer fenotype når de vokser uten ComS* og dermed tømmes for FtsW. Mikroskoperingen viste at de depletede cellene var avlange og større enn cellene som hadde vokst med ComS* til stede. Denne fenotypen ble observert for de fleste av cellene som hadde fått endret fenotype. Mange celler var 3 μm i diameter, og de største cellene som ble observert hadde en diameteren på nesten 4 μm .

Mikroskoperingen viste at det var to karakteristiske fenotyper som gjentok seg hos de depletede cellene. Det var de to fenotypene som vises på Figur 4.7 og 4.9, den veldig avlange celleformen som vi ser spesielt i Figur 4.7 og den mer "sitronlignende" fasongen som i Figur 4.4. Felles for disse fenotypene er at cellene hadde fått en mer avlang form enn normalt. Noen av cellene hadde fått en stavformet fasong hvor tykkelsen på bakterien er lik for hele cellen. Andre celler hadde fått en sitronlignende form hvor cellen hadde svulmet opp på midten, mens polene ikke har svulmet opp (Figur 4.7).

Observasjonene av fenotypen til de depletede cellene tyder på at bakteriene har problemer med å dele seg normalt. Det kan virke som om cellene klarer å vokse, men at de ikke får dannet ny cellevegg i septum der hvor celledelingen skjer. Det kan se ut som flere av cellene fortsetter å vokse selv om de ikke er i stand til å dele seg.

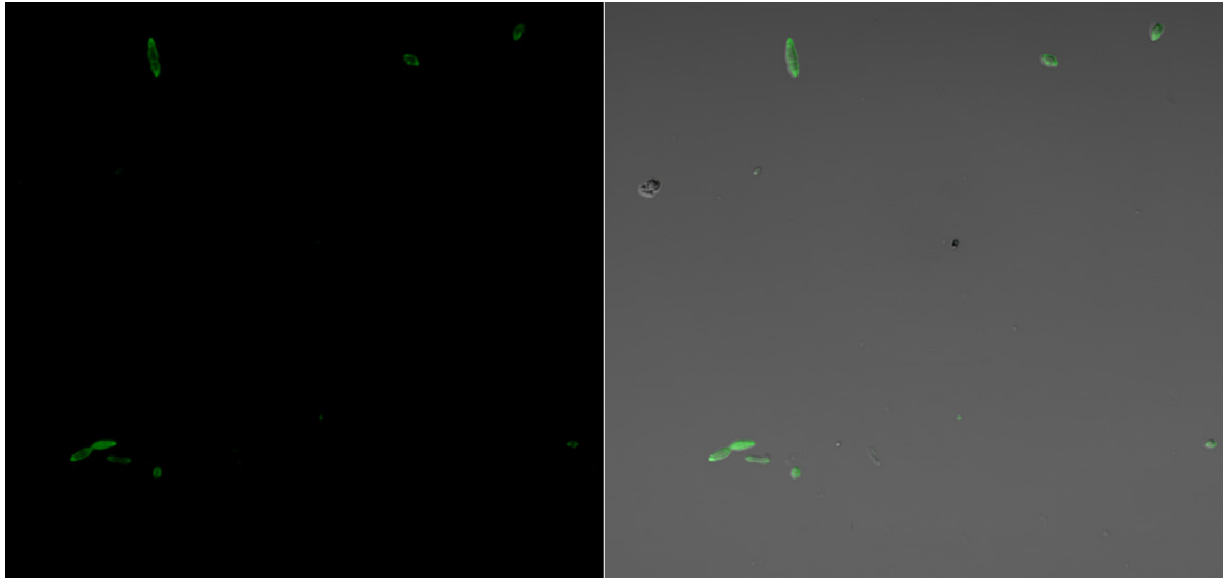
4.1.7 Lokalisering av lipid II ved fluorescens mikroskopi av celler depletet for FtsW

Dette forsøket ble gjort for å se om det skjer en endring i lokaliseringen av lipid II i *S. pneumoniae* når cellene blir depletet for FtsW. FtsW i *E. coli* er en flippase for lipid II (Mohammadi *et al.*, 2011) og spørsmålet var om mangel på FtsW i *S. pneumoniae* ville føre til at lokaliseringen av lipid II ved septum under celledeling ble hemmet.

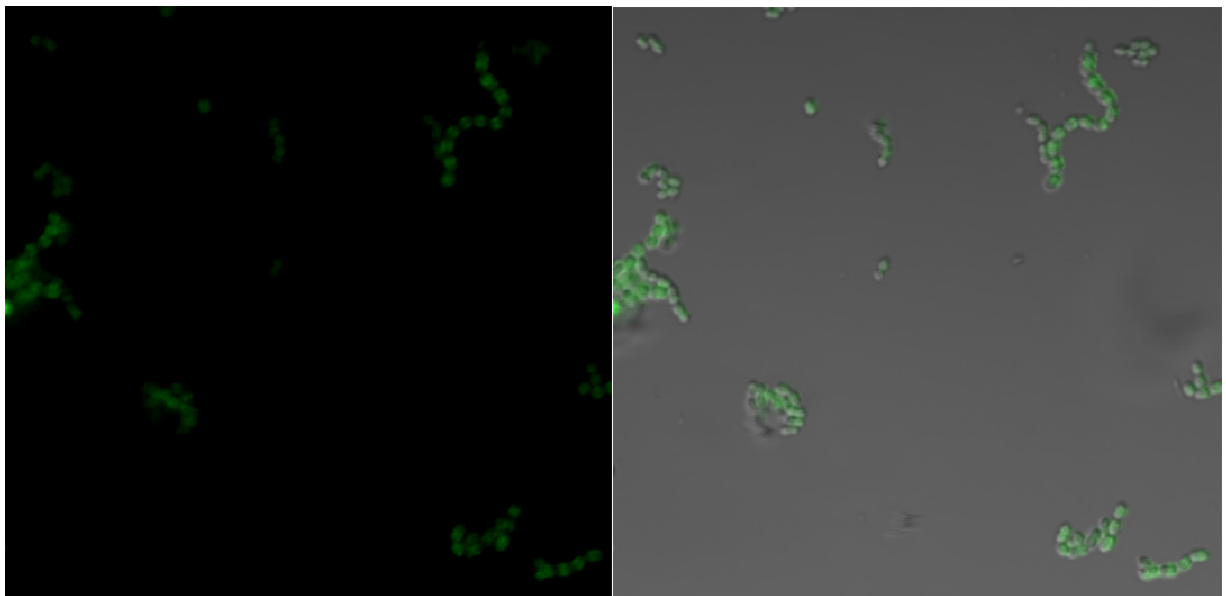
De fikserte cellene (CSS12) fra avsnitt 4.1.6 ble behandlet med BODIPY[®] FL vancomycin og mikroskopert ved hjelp av fluorescens mikroskopi. Vancomycin binder til D-Ala-D-Ala enhetene i posisjon 4 og 5 i pentapeptidene i celleveggen. Vancomycin binder ikke til peptidkjeder hvor D-Ala-D-Ala enhetene er fjernet, dette betyr at bindingen av vancomycin i celleveggen er størst i de områdene hvor det foregår syntese av cellevegg ettersom en veldig stor andel av peptidkjedene i dette området fremdeles vil ha D-Ala-D-Ala enhetene i posisjon 4 og 5. I ferdig syntetisert cellevegg derimot vil en del av D-Ala-D-Ala enhetene være fjernet som følge av kryssbindinger mellom peptidkjeder eller forgreininger av de ugreinede peptidkjedene.

Fargestoffet BODIPY[®] FL som er bundet til vancomycinet gjør at vi ved hjelp av fluorescens mikroskopi kan detektere hvor syntese av cellevegg skjer ettersom andelen peptidkjeder med _D-Ala-_D-Ala enhet i enden er størst ved stedene ny cellevegg syntetiseres. Kontrollstamme i dette forsøket var stammen *S. pneumoniae* RH1, fiksert ved OD₅₅₀ ~0,3.

A



B



Figur 4.10: Bildene viser resultatene av behandlingen med BODIPY[®] FL vancomycin på *S. pneumoniae* celler som har (A) vokst uten uttrykk av FtsW og (B) celler fra stammen RH1. Vi ser at cellene som er depletet for FtsW har en lokalisering av lipid II som er spredt over hele celleveggen, mens kontrollstammen RH1 har en lokalisering av lipid II som er mer konsentrert rundt septum av cellene.

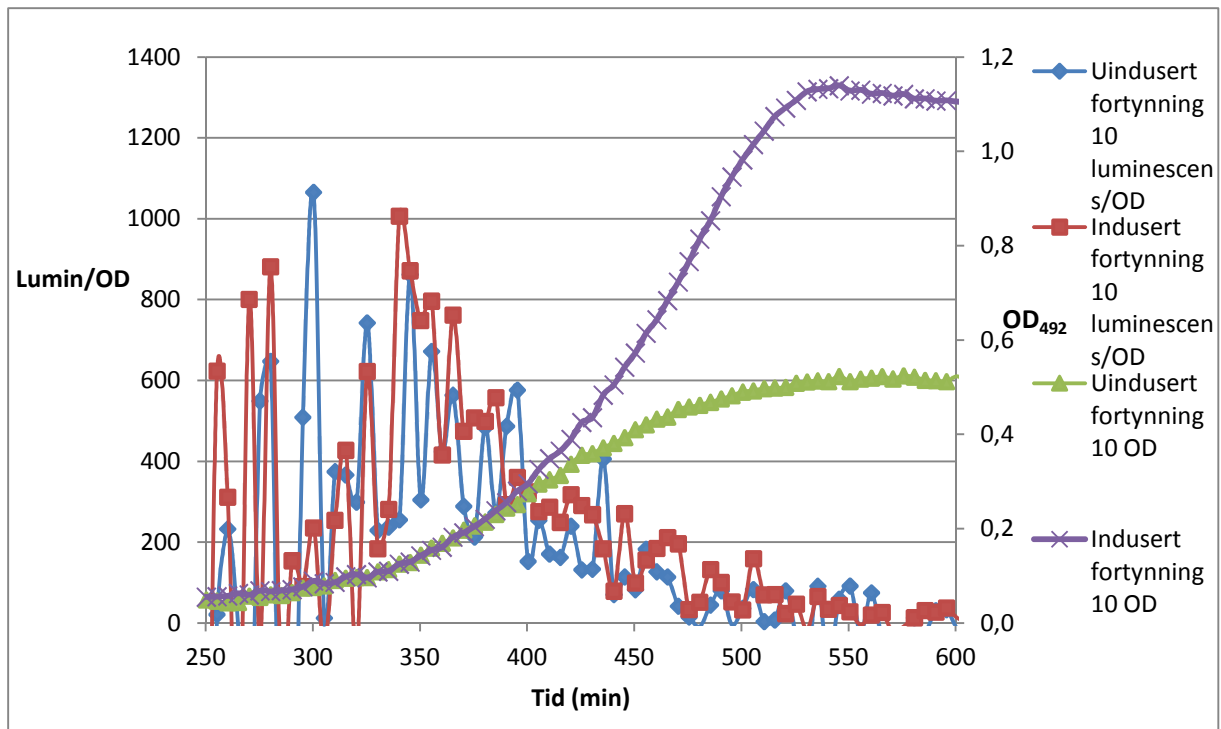
Resultatene fra fargingen av lipid II i celleveggen til *S. pneumoniae* i vekst viste at i de cellene som vokste uten uttrykk av FtsW var lipid II jevnt fordelt i hele celleveggen. For kontrollstammen RH1 ser det ut som om lokaliseringen av lipid II er sterkest rundt septum i cellene. Resultatene fra fargingen av kontrollstammen ble ikke så bra som vi hadde håpet på selv etter gjentatte forsøk, men bildene tyder på at lokaliseringen av lipid II i RH1 stammen er størst rundt septum når cellene er i eksponentiell vekst.

4.1.8 Reguleringen av uttrykket av *ftsW*

Uttrykket av et så viktig gen som *ftsW* reguleres antagelig nøye i *S. pneumoniae*. En mulighet er at genuttrykket reguleres av mengden av proteinet FtsW i cellen eller av aktiviteten til proteinet. Dersom det er slik at cellene oppfatter en mangel på FtsW eller proteinets aktivitet vil det føre til en oppregulering av transkripsjonen av *ftsW* når cellene utsettes for depletion av FtsW.

For å undersøke om transkripsjonen av *ftsW* blir endret når cellene har problemer med å vokse normalt på grunn av mangel på FtsW ble et luciferase reporter-gen (*luc*) transformert inn umiddelbart nedstrøms for den native promoteren til *ftsW* (P_{ftsW}) i stammen CSS12 (P_{comX} -*ftsW*, Δ *ftsW*). Økt uttrykk av P_{ftsW} vil dermed resultere i økt produksjon av lys i bakteriekulturen.

I stammen CSS 16 har luciferase-genet (*luc*) blitt satt inn i lokuset til det native *ftsW* gen et samtidig som *ftsW* er plassert bak P_{comX} i ComRS systemet. Resultatene fra dette forsøket viste at mengden lys produsert når CSS 16 ble depletet for FtsW ikke økte signifikant sammenlignet med den induerte parallellen. Grafene på primæraksen (den røde og blå grafen) i Figur 4.11 viser mengden lys avgitt dividert på OD_{492} etter hvert som cellene ble depletet. Grafene på sekundæraksen (grønn og lilla) viser målingene av OD_{492} i de samme brønnene som lysmengden er målt.



Figur 4.11: Figuren viser vekstkurvene til en indusert $0,2\mu\text{M ComS}^*$ og en *ftsW*-depletet kultur av stammen CSS16 ($P_{\text{comX}}\text{-ftsW}$, *ftsW::luc*) (grønn og lilla). Figuren viser også produksjonen av lys i de to kulturene dividert på OD_{492} i kulturene (rød og blå). Figuren viser at produksjonen av lys ikke går opp som følge av at celleveksten i kulturen avtar når *ftsW* ekspresjonen skrur av. Mengden lys produsert ser ut til å gå opp mens OD_{492} i kulturene går fra 0,1-0,2, før lysproduksjonen avtar igjen selv om cellene fortsatt er i vekst.

I Figur 4.11 er verdiene som viser produksjonen av lys (primær y-akse) den målte mengden lys fra bakteriekulturene dividert på OD_{492} målingene. Dette ble gjort for å unngå at forholdet mellom de to kulturene blir påvirket av OD_{492} i kulturene. I den prøven hvor veksten til bakteriene er normal vil produksjonen av lys bli større fordi det er flere bakterier i prøven, ved å dividere på OD_{492} i prøvene får vi korrigert lysproduksjonen mot antallet bakterier og får et riktigere bilde av den relative produksjonen av lys i prøvene.

Veksten til cellene som ikke var tilsatt ComS^* startet å avta etter ca. 360 minutter. Fra grafen som viser produksjon av lys på dette tidspunktet så ser vi at den er i ferd med å avta etter at den gikk litt opp rundt 340 minutter. Det mest interessante med grafene for avgitt lysmengde er at det ikke er noen tydelig forskjell mellom den stammen som er indusert og den stammen som er uindusert.

Det er en tydelig forskjell i vekst avhengig av om cellene uttrykker *FtsW* eller ikke, men basert på luciferaseeksperimentet virker det ikke som om aktiviteten til P_{ftsW} oppreguleres selv om nivået av *FtsW* synker og bakterien får problemer med å vokse normalt.

Dette resultatet tyder på at uttrykket av *ftsW* ikke reguleres av mengden FtsW til stede eller dens aktivitet, men av andre mekanismer. Vi ser også at uttrykket av *ftsW* øker i både den ComS*-induserte og den depletede kulturen omtrent samtidig som den eksponentielle veksten starter, ved OD₄₉₂ rundt 0,1. Uttrykket av *ftsW* starter å avta forholdsvis raskt etter at det hadde økt, rundt OD₄₉₂ 0,2-0,3 også for de induserte cellene.

Resultatene tyder på at FtsW er aktivt i tidlig eksponentiell fase både hos de induserte og uinduserte cellene, Celleveksten fortsetter å øke frem til OD₄₉₂ rundt 0,5 selv om uttrykket av *ftsW* avtar allerede ved OD₄₉₂ 0,2.

4.2 RodA

Basert på aminosyresekvensen er proteinet RodA en homolog til FtsW i *S. pneumoniae*. Funksjonen til RodA er fremdeles ukjent, men man lurer på om proteinet utfører en lignende oppgave som flippasen FtsW. Genet *rodA* er ikke et essensielt gen i *S. thermophilus*, men hos *E. coli* er det essensielt. Vi ønsket å undersøke om RodA har en lignende rolle som FtsW i *S. pneumoniae* og hvordan cellene responderer på depleksjon av RodA. Ved å studere morfologien til celler hvor nivået av RodA stadig senkes vil man kanskje få en pekepinn på hvilken rolle proteinet spiller i *S. pneumoniae*. For å kunne studere disse tingene startet vi med å lage en $\Delta rodA$ -mutant.

4.2.1 Konstruksjon av $\Delta rodA$ mutanter

I denne oppgaven ble ulike *rodA* mutanter laget på tilsvarende måte som beskrevet i avsnitt 4.1.1 for *ftsW* mutanter. Metodene som ble benyttet er beskrevet under avsnittene om PCR (3.1.1), overlapp ekstensjons PCR (3.1.1.1) og Janus-kassetten (3.1.4).

4.2.2 Knockout av *rodA*

Vi ønsket å undersøke om *rodA* var et essensielt gen i *S. pneumoniae*. Dette var et skritt på veien mot å forstå funksjonen til proteinet RodA. Transformasjoner for å slå ut *rodA* ved hjelp av Janus ble gjort tre ganger, resultatene fra disse transformasjonene er listet opp i Tabell 4.5.

Tabell 4.5: Antall kolonier på skåler innkubert over natt ved 37 °C etter transformasjon for å slå ut *rodA*.

	Transformasjon 1	Transformasjon 3	Transformasjon 4
+DNA 20 μ l	56	78	166
+DNA 100 μ l	263		
-DNA 20 μ l	0	0	0

Denne transformanten ($\Delta rodA$) klarte å vokse i C-mediet, men vekstraten var betydelig tregere enn for villtypen. Fra resultatene virker det som om genet *rodA* kan knockes ut med Janus-kassetten i *S. pneumoniae* uten at det er letalt for cellene selv om veksthastigheten til cellene ble påvirket av at *rodA* ble slått ut.

4.2.3 Fremstilling av *ΔrodA* mutant for gen-depletion studier

Ved bruk av prinsippene presentert i avsnitt 3.1 og 4.1.1 ble en *ΔrodA* mutant hvor det native *rodA* er slått ut med Janus og *rodA* er satt inn bak P_{comX} i ComRS (Figur 3.7) systemet laget. I denne mutanten (CSS15) vil konsentrasjonen av ComS* regulerer uttrykket av *rodA*. Genet *rodA* ble satt inn i ComRS systemet før det native genet ble fjernet med Janus.

Primerne CSS5-CSS8, CSS13-CSS16, khb31 og khb34 ble brukt for å komme frem til mutanten CSS15. For genet *rodA* var templat-DNA RH1, for Janus-kassetten var templat-DNA stammen RH425. Templat-DNA for ComRS systemet i *S. pneumoniae* var RH426. Stammene KHB24 og G.S.11 ble begge brukt som utgangsstamme i hver sin transformasjon med det ferdige DNA-fragmentet for innseting av *rodA* bak P_{comX} .

Resultatene fra disse transformasjonene er vist i Tabell 4.6.

Tabell 4.6: Resultater fra transformasjon av *rodA* inn bak P_{comX} i stammene KHB24 og G.S.11.

Utgangsstamme		Antall kolonier etter innkubering	Navn på den nye stammen
KHB24	+DNA <i>rodA</i>	~708	CSS6
	÷DNA	80	
G.S.11	+DNA <i>rodA</i>	~896	CSS8
	÷DNA	152	

Etter disse transformasjonene ble det native *rodA* slått ut med Janus slik som i avsnitt 4.1.1. Resultatene fra denne transformasjonen er presentert i Tabell 4.7.

Tabell 4.7: Resultater fra transformasjon for å slå ut nativt *rodA* med Janus i stammene CSS6 og CSS8.

Utgangsstamme		Antall kolonier etter innkubering	Navn på den nye stammen
CSS6	+DNA ops <i>rodA</i> – Janus – <i>ned's rodA</i>	70	CSS13
	÷DNA	0	
CSS8	+DNA ops <i>rodA</i> – Janus – <i>ned's rodA</i>	48	CSS14
	÷DNA	0	

De to stammene CSS13 og CSS14 var på dette tidspunktet klare til å brukes i gen-depletion studier av *rodA*.

Stammen CSS14 ble transformert med et fragment hvor de to regionene ~1000bp oppstrøms for *rodA* og ~1000bp nedstrøms for *rodA* var satt sammen uten genet eller Janus-kassetten mellom regionene. Etter denne transformasjonen var Janus-kassetten satt inn i lokuset til det native *rodA* fjernet fra CSS14 og stammen CSS15 var dannet.

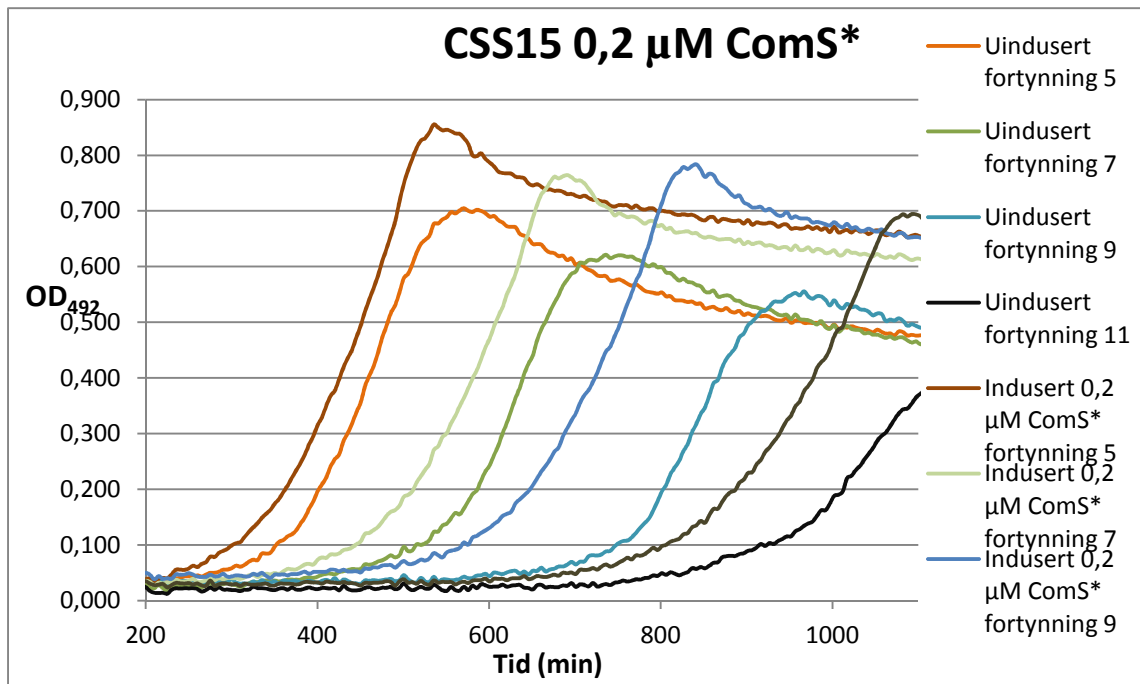
Alle transformanter benyttet i denne studien ble verifisert ved hjelp av DNA-sekvensering.

4.2.4 Depletion av *rodA* ekspresjon

Ettersom $\Delta rodA$ -mutanten hadde lavere vekstrate enn villtypen var vi usikre på om denne mutanten var levedyktig selv uten *rodA* eller om andre uspesifikke supressormutasjoner som oppstår når *S. pneumoniae* forsøker å overleve slik det ble mistenkt for \DeltaftsW -mutanten under et sterkt seleksjonspress gjorde at cellene var i stand til å overleve. For å ha bedre kontroll på uttrykket av *rodA* valgte vi å uttrykke *rodA* ektopisk ved hjelp av ComRS systemet beskrevet i avsnitt 3.2.1 og 3.2.2. Dermed kunne vi skru av ekspresjonen av *rodA* i friske celler i eksponentiell vekst for å se på effekten av mangel på RodA uten påvirkning fra eventuelle supressormutasjoner.

Ved bruk av prinsippene presentert i avsnitt 3.1 og 4.1.1 ble en mutant hvor *rodA* er satt inn bak P_{comX} i ComRS systemet (Figur 3.7) og det native *rodA* er slått ut med Janus laget. Dermed kunne *rodA* uttrykkes ektopisk ved å indusere cellene med ComS*

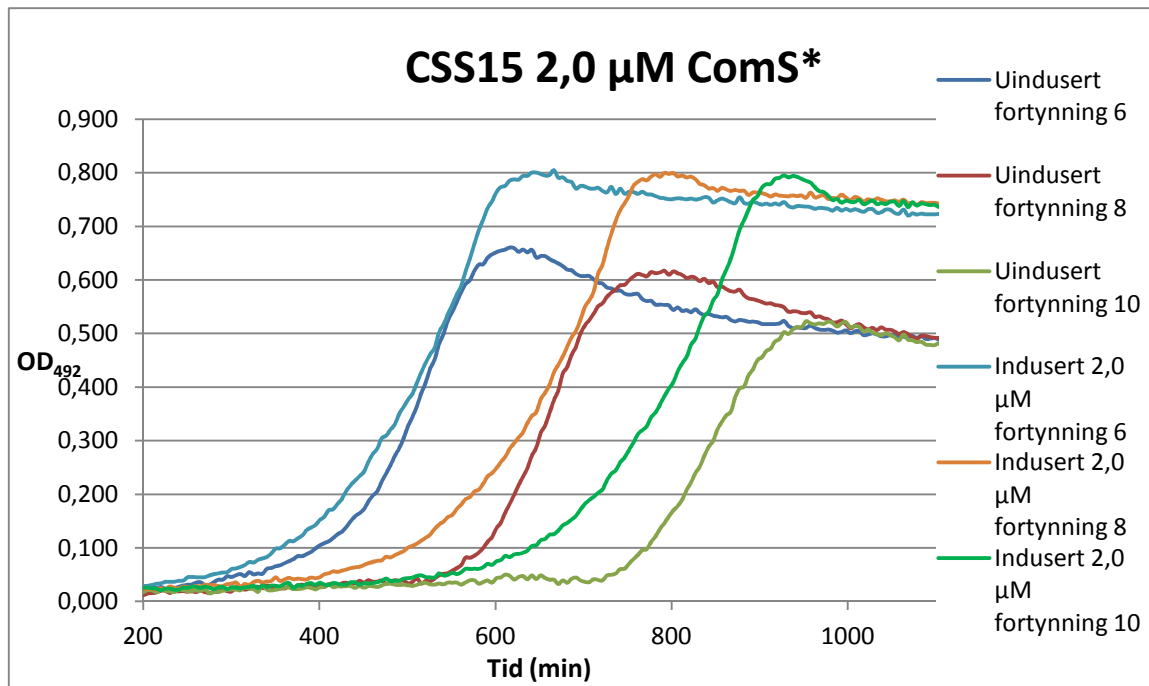
Resultatene fra to gen-depletion forsøk av *rodA* mutanten CSS15 (nativt *rodA* er slått ut med Janus og *rodA* sitter bak P_{comX}) er presentert i Figurene 4.12 og 4.13. Forsøk med bruk av forskjellige ComS*-konsentrasjoner for å se hvordan det påvirket veksten til CSS15 hadde vist at det ikke ga noen forskjell på veksten til cellene om ComS*-konsentrasjonen var 2,0 μ M eller 0,2 μ M (resultater ikke vist). Derfor ble gen-depletion forsøk gjort både med en konsentrasjon av ComS* på 2,0 μ M og 0,2 μ M i kontrollen.



Figur 4.12: Figuren viser hvordan *S. pneumoniae* responderte på deplektion av *rodA*. Som kontroll ble *rodA* uttrykt ved å tilsette 0,2µM-ComS* til mediumet. Fra grafene ser vi at cellene responderer på deplektion av *rodA* med redusert vekstrater. For fortynning 5 og 7 ser vi at veksten til *S. pneumoniae* hvor uttrykket av *rodA* er fjernet fremdeles er relativt normal, men med litt tregere vekst og lavere maks OD₄₉₂. For fortynningene fra nr. 9 og videre ser vi at veksten til de depletede cellene fra stammen CSS15 er mer redusert. Veksten til de depletede cellene er en god del tregere enn det den er for cellene hvor *rodA* uttrykkes med 0,2µM ComS* og den maksimale OD₄₉₂ cellene oppnår avtar desto høyere fortynningene blir.

Veksten til $\Delta rodA$ -mutanten blir påvirket av om cellene er induisert med ComS* eller om de er uindusert. Cellene som blir depletet for *rodA* vokser tydelig saktere enn de cellene som er induisert. Desto lenger ut i fortynningsrekken man kommer desto større blir forskjellen mellom de induserte og uinduserte cellene. Til forskjell fra deplektion av *ftsW* (Figur 4.4 og 4.5) ser vi at selv de høyeste fortynningene av depletet CSS15 er i stand til å vokse opp til en OD på rundt 0,4-0,5.

Figur 4.13 viser en gjentakelse av gen-deplektion forsøket i Figur 4.12 hvor konsentrasjonen av ComS* i kontrollen er redusert til 0,2 µM.



Figur 4.13: Figuren viser hvordan *S. pneumoniae* responderte på depleksjon av *rodA*. Som kontroll ble *rodA* uttrykt ved å tilsette 2,0 μM-ComS* til mediumet. Fra grafene ser vi at cellene responderer på depleksjon av *rodA* med redusert vekststrater. For fortykning 6 og 8 ser vi at veksten til *S. pneumoniae* hvor uttrykket av *rodA* er fjernet fremdeles er relativt normal, men med litt tregere vekst i starten og lavere maks OD₄₉₂. I en periode i den eksponentielle veksten til de depletede cellene er veksten raskere enn det den er for cellene hvor *rodA* uttrykkes med 2,0 μM-ComS*. For fortykningen 10 ser vi at veksten til de depletede cellene fra stammen CSS15 er mer redusert. Veksten til de depletede cellene er en god del tregere enn det den er for cellene hvor *rodA* uttrykkes med 2,0 μM ComS* og den maksimale OD₄₉₂ cellene oppnår avtar desto høyere fortykningene blir.

Resultatene fra gen-depleksjon eksperimentene viser at *rodA* mest sannsynlig ikke er et essensielt gen hos *S. pneumoniae*. Det forholdsvis høye antallet kolonier etter transformasjon (Tabell 4.5) er også en indikasjon på dette. Resultatene fra gen-depleksjon forsøkene viser at selv de høyeste fortykningene i eksperimentet er stand til å vokse uten tilsatt ComS*. Dette er en sterk indikasjon på at genet ikke er essensielt for bakteriene. Samtidig viser resultatene at veksten til bakteriene påvirkes av mangel på RodA. Veksthastigheten er lavere hos de cellene som er depletet for *rodA* og den maksimale OD₄₉₂ de uinduserte cellene oppnår er lavere enn for de induserte cellene.

Et problem som ble observert for $\Delta rodA$ -mutantene var at resultatene fra gen-depleksjon forsøkene var vanskelige å reprodusere. I de første forsøkene med stammen CSS15 ble resultatene slik som vist i Figur 4.12 og 4.13, men når forsøkene ble gjentatt observerte vi at veksthastigheten til cellene som ble depletet etter hvert begynte å øke og tilnærme seg veksten til de cellene som ble indusert med 2,0 μM ComS*. Nye transformasjoner for å gjenta konstruksjonen av stammen CSS15 ble utført, men nye gen-depleksjon forsøk viste de samme

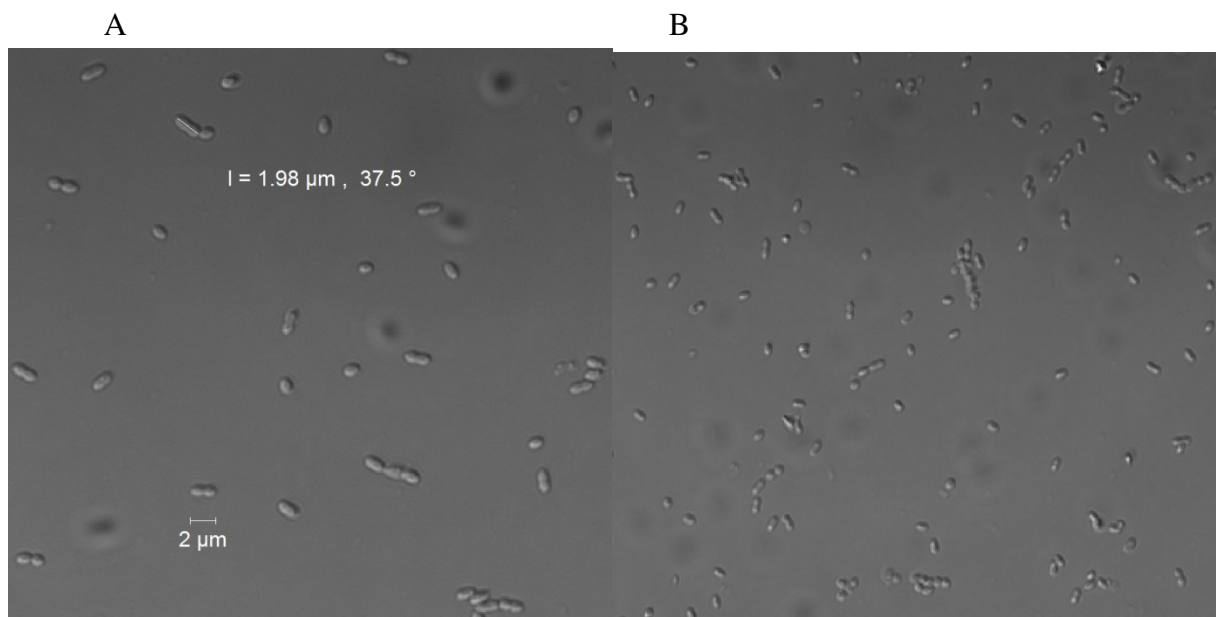
resultatene. En tydelig effekt på veksten til celler depletet for RodA til å begynne med, men etter hvert som kulturene ble dyrket forsvant denne effekten og cellene fikk gjenopprettet de samme vekstrate som cellene som uttrykte *rodA* ved hjelp av ComRS systemet.

Johan Bjørnstad (avdelingen for molekylær mikrobiologi) forsøkte også å reproducere resultatene ved å gjenta alle transformasjonene fra utgangstammen og frem til $\Delta rodA$ -mutanten CSS15. Resultatet ble det samme som var observert tidligere.

En forklaring på det som ble observert kan være såkalte supressormutasjoner eller spontane mutasjoner andre steder i genomet til *S. pneumoniae* som oppstår når bakteriene utsettes for et seleksjonspress. *S. pneumoniae* har evnen til å mutere raskt når cellene utsettes for en form for seleksjonspress og det oppstår gjerne flere mutasjoner som følge av dette (L. S. Håvasrstein personlig kommunikasjon). Når bakteriene utsettes for et seleksjonspress som følge av at genet *rodA* er slått ut vil spontane mutasjoner som kan kompensere for mangelen på RodA kunne oppstå og ved videre dyrking vil vi selektere for de mutasjonene som best overkommer mangelen på RodA.

4.2.5 Mikroskopering av $\Delta rodA$ mutanten

Celler som var depletet for RodA ble i likhet med celler depletet for FtsW også fiksert. Hensikten med dette forsøket var å se etter eventuelle fenotyper hos de depletede cellene.



Figur 4.14: Bildet viser fikserte celler fra stammen CSS15. Bilde A viser celler depletet for RodA ved gen-depletion forsøk. Bilde B viser kontrollen hvor *rodA* er uttrykt ved 2,0 μM ComS*. Fra disse resultatene er det lite som tyder på at *S. pneumoniae* får endret morfologien ved deplektion av RodA.

Resultatene fra mikroskoperingen av celler fra stammen CSS15 som ble depletet for RodA viste at det ikke skjedde en endring i morfologien til cellene som følge av mangel på RodA. I Figur 4.14 ser vi at størrelsen på de depletede cellene er som normalt og at fasongen er den normale fasongen til ovokokker. Vi ser også at det samme ble observert for kontrollstammen som hadde uttrykt *rodA* ved 2,0 μM .

4.2.6 Knockout av *thiJ*

Selv om den konstitutive promoteren P1 ble satt inn nedstrøms for Janus-kassetten slik at genene som ligger nedstrøms for *rodA* skal uttrykkes tilnærmet som normalt etter at *rodA* er fjernet så er det ikke sikkert at effekten vi ser når *rodA* er slått ut med Janus faktisk skyldes at *rodA* er slått ut. En mulighet er at genene nedstrøms for *rodA* påvirkes ved at transkripsjonen hemmes eller øker. Det første genet nedstrøms for *rodA* heter *thiJ*. Dette genet ble slått ut med Janus for å se om det påvirket cellene i lignende grad som *rodA*-mutanten.

Janus-kassetten ble transformert inn for *thiJ* og transformanter selektert på skåler med kanamycin. Resultatet fra denne transformasjonen er presentert i Tabell 4.8. Det var ingen bakgrunn på skåler uten tilsatt DNA.

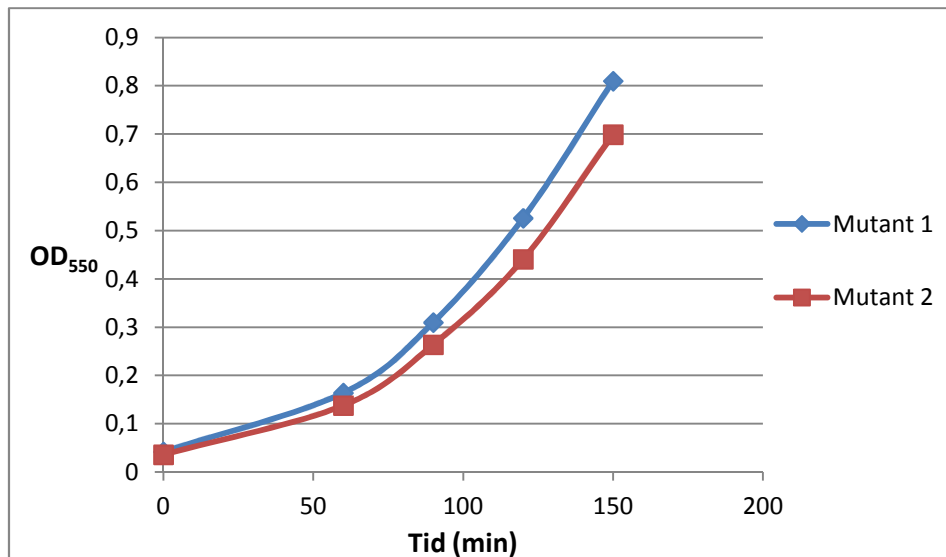
Tabell 4.8: Viser antall transformanter etter at *thiJ* var slått ut med Janus.

Prøve	Transformasjon 1	Transformasjon 2
+ DNA	204	~968
+ DNA	270	~682
÷ DNA	0	0

Veksthastigheten til *ΔthiJ* mutantene ble beregnet ved måling av OD₅₅₀ over en tidsperiode på 2,5 timer. OD₅₅₀ ble målt etter 60, 90, 120 og 150 minutter for to parallelle kulturer. Resultatet er vist i Tabell 4.9 og Figur 4.15.

Tabell 4.9: Måling av OD₅₅₀ i to forskjellige rør, begge med den samme *ΔthiJ* mutanten.

Tid	OD ₅₅₀ kultur 1	OD ₅₅₀ kultur 2
0	0,042	0,036
60	0,164	0,138
90	0,310	0,264
120	0,526	0,441
150	0,810	0,699



Figur 4.15: Grafene viser veksten til $\Delta thiJ$ mutantene. Målingene er presentert i Tabell 4.9. Vi ser at begge kulturene har en veksthastighet som er tilnærmet lik normal (generasjonstid ≈ 30 min).

Den første timen har bakteriene i begge rørene en generasjonstid som ligger rundt 30 min. etter hvert som OD i rørene øket avtar veksthastigheten noe og generasjonstiden øker til et sted mellom 35-40 min.

Det virker som om denne stammen i liten grad påvirkes av at genet *thiJ* er slått ut av bakterien. Både antall kolonier og veksthastighet i flytende C-medium samsvarer i stor grad med det som er vanlig for *S. pneumoniae*. Disse resultatene tyder på at de effektene som ble observert hos $\Delta rodA$ mutanten skyldes mangel på RodA og ikke at genene nedstrøms for *rodA* påvirkes.

4.2.7 Antibiotikasensitivitet hos $\Delta rodA$ mutanten

Funksjonen til RodA er trolig forbundet med syntese av cellevegg og det ville derfor være interessant å se om $\Delta rodA$ mutanten var mer sensitiv overfor ulike antibiotika rettet mot celleveggsyntese når den vokser uten at RodA uttrykkes eller uttrykkes ved et lavere nivå enn normalt. Det finnes mange forskjellige antibiotika med ulike virkningsmekanismer på cellene. Noen typer antibiotika påvirker for eksempel celleveggsyntesen hos bakterier (penicillin), mens andre hindrer proteinsyntesen (erytromycin). Sensitiviteten til $\Delta rodA$ mutanten ble testet mot antibiotika som påvirker forskjellige mekanismer i cellene for å se om cellene kun ble mer sensitive overfor antibiotika som påvirker celleveggsyntese.

Dette ble gjort ved å dyrke *ΔrodA*-mutantene og en kontrollstamme på skåler sammen med såkalte strips eller disketter som inneholder antibiotika. Bruk av antibiotikastrips og disketter er beskrevet i avsnitt 3.3. Eventuelle forskjeller i sensitivitet overfor spesifikke antibiotika leses av etter innkubering ved 37 °C over natt. Resultatene fra det første forsøket er listet opp i Tabell 4.10.

Tabell 4.10: Avleste verdier fra dyrking av CSS15 med “soft overlay assay” på TH-agar med penicillin-strips

Stamme	Verdi avlest på E-strips (μg/ml)
G.S.11 (kontroll)	0,008
CSS15 + ComS* 0,2 μM	0,004
CSS15 – ComS*	0,002

Resultatene viste at skålen med den uinduserte stammen (*rodA*-depletede) hadde størst inhiberingssone rundt stripsen, altså var bakteriene mer sensitive overfor penicillinet på stripsen. Bakteriene som vokste ved en ComS* konsentrasjon på 0,2 μM (uttrykte *rodA*) hadde en mindre inhiberingssone som betyr at cellene er mindre sensitive overfor antibiotikumet. Kontrollen var mindre sensitiv enn de induserte cellene. Dette kan skyldes at mengden ComS* var for liten til å uttrykke tilstrekkelig mengde RodA for å oppnå villtype fenotype og kanskje burde konsentrasjonen vært 2,0 μM ComS*.

Ulike antibiotika og varierende ComS* konsentrasjoner (2,0 μM, 0,2 μM, 0,02 μM og ingen ComS* tilsatt) ble testet for å se om dette hadde effekt på sensitiviteten til bakteriestammene CSS8, CSS13, CSS14, CSS15 og de to kontrollene KHB24 og G.S.11. Tabell 4.11 viser en samlet oversikt over resultatene for de ulike typene antibiotika og ComS* konsentrasjonene.

Tabell 4.11: Resultater fra forskjellige undersøkelser av antibiotika sensitivitet hos *rodA* mutanter. Stammene som er testet er som følger: CSS8 (P_{comX} -*rodA*, Δ *lytA*, nativt *rodA* er fortsatt til stede), CSS13 (P_{comX} -*rodA*, Δ *rodA*), CSS14 (P_{comX} -*rodA*, Δ *lytA*, Δ *rodA*), CSS15 (P_{comX} -*rodA*, Δ *lytA*, Δ *Janus* (for *rodA*)) KHB24 (P_{comX} -*Janus*) og G.S.11 (P_{comX} -*Janus*, Δ *lytA*). Avleste verdier er μ g/ml.

Antibiotikum	0 μ M ComS*	0,02 μ M ComS*	0,2 μ M ComS*	2,0 μ M ComS*
Penicillin				
G.S.11	0,012	0,012		0,012
	0,012	0,012		0,012
KHB 24	0,006			
CSS 8	0,012	0,012		0,012
	0,012	0,012		0,012
CSS13	0,008	0,008	0,008	0,008
CSS14	<0,002	0,002		0,006
	0,002	0,002		0,008
CSS15	<0,002	0,002	0,006	0,012
	<0,002	0,002		0,012
Erytromycin				
G.S.11	0,125			
KHB 24	0,094			
CSS 8				
CSS13	0,064	0,094	0,094	0,125
CSS14	0,125	0,125		0,125
CSS15	Ikke målbart	<0,016	0,064	0,094
	0,047	0,064		0,125
Tetracyclin				
G.S.11	2,6 cm			
KHB 24	2,6 cm			
CSS 8				
CSS13	2,6 cm	2,6 cm	2,6 cm	2,6 cm
CSS14				
CSS15	Ikke målbart	Ikke målbart	3,1 cm	2,6 cm

Tabell 4.11 viser resultatene fra undersøkelse av sensitivitet for forskjellige typer antibiotika mot stammene CSS8, CSS13, CSS14, CSS15, KHB24 og G.S.11. I kontrollstammen G.S.11 er genet som reguleres av ComS* *Janus*-kassetten. Hos CSS8 er *rodA* satt inn bak P_{comX} , men det native *rodA* sitter fortsatt i sitt opprinnelige lokus. G.S.11 og CSS8 reagerer ikke på endringer i ComS* konsentrasjonen med økt sensitivitet mot antibiotika. Det at CSS8 vokste likt ved alle de tre ComS*-konsentrasjonene tyder på at cellene ikke reagerer på et overuttrykk av proteinet RodA.

I de tre stammene CSS13, CSS14 og CSS15 er det native *rodA* genet slått ut og det eneste uttrykket av *rodA* er det som kommer fra P_{comX} og dermed påvirkes av ComS*-konsentrasjonen i mediumet. For CSS15 ble det observert en tydelig effekt av ComS* med

hensyn på hvor sensitive cellene var for antibiotika. For alle antibiotikaene som ble testet i dette forsøket ble det observert at når konsentrasjonen av ComS* ble senket så økte antibiotikasensitiviteten til cellene. Det var en klar sammenheng mellom gradvis økning i sensitivitet for antibiotikaene med synkende konsentrasjoner av ComS* i mediumet. Ved en ComS* konsentrasjon på 0,2 μM så det ut til at cellene var mer resistente enn ved 0,02 μM , men mer sensitive enn ved 2,0 μM . Cellene som vokste uten tilsatt ComS* var mer sensitive enn de ved 0,02 μM .

For de to stammene CSS13 og CSS14 var ikke resultatene like entydige som for CSS15. Når det gjelder CSS13 så viste den en effekt av ComS* når stammen ble testet mot erytromycin. Sensitiviteten for dette antibiotikumet så ut til å øke med minkende uttrykk av RodA, for penicillin og tetracyclin var det ikke mulig å observere denne effekten i dette forsøket. For CSS14 så det ut til å være en effekt av ComS* når stammen ble testet for sensitivitet for penicillin, men ikke for erytromycin.

Nesten alle resultatene viste at når mutantene ble indusert med 2,0 μM ComS* var sensitiviteten lik eller omtrent lik det den var hos kontrollstammen. Kontrollstammen var ved noen tilfeller litt mer resistent mot antibiotikumet (et eller to trinn på skalaen), men samtidig var det et par tilfeller hvor den induserte stammen var litt mer sensitiv enn kontrollstammen. Det virket dog ikke som om dette var en tydelig trend som lot seg reproducere.

Sensitiviteten overfor andre typer antibiotika enn de som er vist i Tabell 4.11 ble også testet. Penicillin er den foretrukne måten å behandle en infeksjon av *S. pneumoniae* på så sensitivitet overfor dette antibiotikumet er en ekstra interessant egenskap for denne bakterien. Derfor ble penicillin også tatt med i dette forsøket. Resultatene fra de siste undersøkelsene av antibiotika sensitivitet er presentert i Tabell 4.12. Alle de forskjellige antibiotikaene i dette forsøket var tilsatt på disketter så alle resultatene er oppgitt som størrelsen på den klare inhiberingssonen rundt disketten i cm. To forskjellige kontrollstammer ble brukt da dette forsøket ble utført; KHB24 og G.S.11. KHB24 er utgangsstammen for G.S.11. CSS15 er konstruert med G.S.11 som utgangspunkt (se Tabell 2.1 for oversikt over bakteriestammer).

Tabell 4.12: Tabellen viser hvor sensitiv *ΔrodA* mutanten CSS15 er for vancomycin, bacitracin, novobiocin, ceftazidime og penicillin G. KHB24 og G.S.11 ble brukt som kontrollstamme i hvert sitt uavhengige eksperiment. Verdiene er oppgitt i Cm.

Antibiotikum	Stamme/prøve og [ComS*]	Test 1	Test 2
Vancomycin	Kontroll	2,0 (KHB24)	1,8 (G.S.11)
	CSS15 2,0 μM	2,1	2,0
	CSS15 0,02 μM	2,3	2,2
	CSS15 – ComS*	2,4	2,3
Bacitricine	Kontroll	2,2 (KHB24)	2,2 (G.S.11)
	CSS15 2,0 μM	2,5	2,4
	CSS15 0,02 μM	2,7	2,4
	CSS15 – ComS*	3,0	2,6
Novobiocin	Kontroll	2,5 (KHB24)	2,4 (G.S.11)
	CSS15 2,0 μM	2,4	2,6
	CSS15 0,02 μM	2,8	2,7
	CSS15 – ComS*	3,0	3,0
Ceftazidime	Kontroll	3,1 (KHB24)	2,8 (G.S.11)
	CSS15 2,0 μM	3,4	3,4
	CSS15 0,02 μM	3,4	3,6
	CSS15 – ComS*	3,5	3,8
Penicillin G	Kontroll	4,0 (KHB24)	3,3 (G.S.11)
	CSS15 2,0 μM	4,0	4,1
	CSS15 0,02 μM	4,4	4,4
	CSS15 – ComS*	4,5	4,6

I disse forsøkene var det, som i de tidligere forsøkene, en effekt på antibiotika sensitiviteten til cellene når ComS* konsentrasjonen i omgivelsen ble endret. I dette forsøket ble det observert en gradvis økning i sensitivitet overfor alle de ulike antibiotikaene som ble testet når ComS* konsentrasjonen gradvis ble redusert fra 2,0 μM, 0,2 μM, 0,02 μM til 0 μM ComS* tilsatt.

For alle antibiotikaene var det veldig stort samsvar mellom resultatene for CSS15 ved begge forsøkene.

Sammenlignet med KHB24 var CSS15 induisert med 2,0 μ M ComS* omtrent like sensitiv overfor de ulike antibiotikaene. Det største avviket mellom de to var på tre millimeter. Når det gjelder G.S.11 så var den litt mindre sensitiv overfor alle antibiotikaene enn CSS15, men forskjellen var ikke veldig stor bortsett fra for penicillin hvor forskjellen var 8 millimeter (24 %).

4.2.8 Rensing av cellevegg og analyse av rensset cellevegg ved HPLC

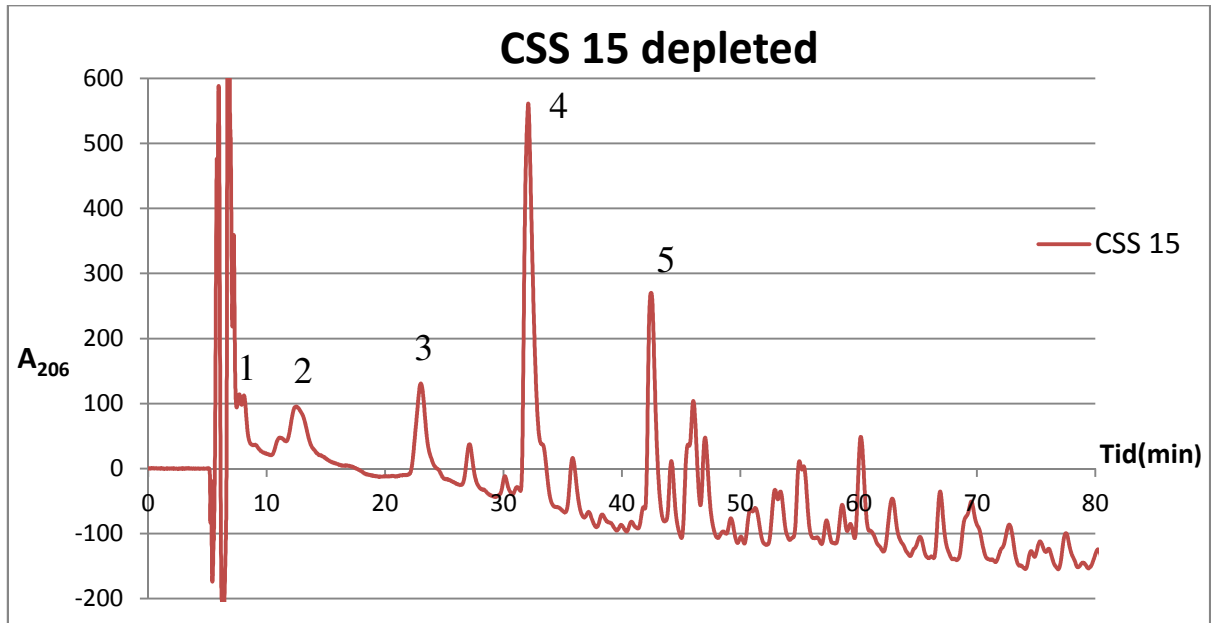
Når celler vokser er syntese av cellevegg en sentral del av prosessen som skjer. Når et eller flere av proteinene som deltar i celleveggsyntesen fjernes eller mister sin aktivitet påvirker dette denne prosessen.

Proteinet RodA deltar trolig i celleveggsyntesen i *S. pneumoniae*. Derfor ble cellevegg fra stammen CSS15 som hadde vokst uten eller med redusert uttrykk av RodA rensset og analysert. Hensikten med dette forsøket var å undersøke om mangel på RodA kunne føre til endringer i oppbygningen av celleveggen til *S. pneumoniae*. Det å analysere komponentene i bakteriers cellevegg er en forholdsvis tidkrevende prosess som innebærer storskala dyrking av bakteriekulturer av den/de aktuelle stammene, høsting av cellemateriale, selve rensingen av celleveggen etterfulgt av cellevegghydrolyse og analyse av cellematerialet ved HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). I dette forsøket ble cellevegg rensset og analysert fra en *rodA*-depletet CSS15 kultur og fra kontrollstammen G.S.11.

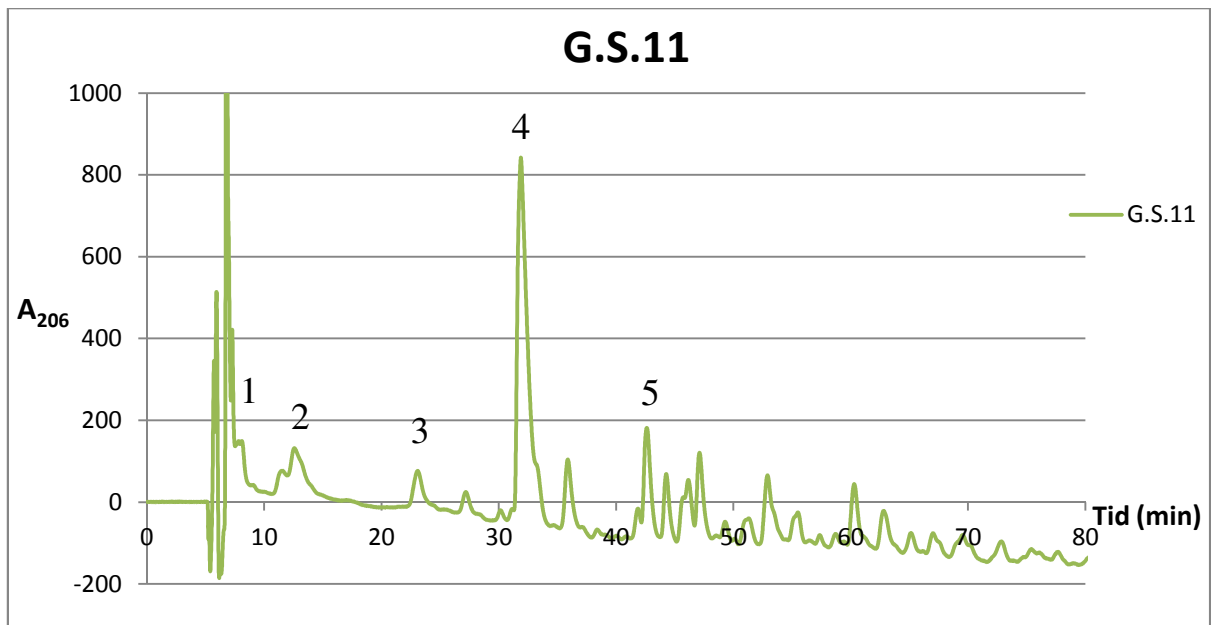
De to protokollene i avsnitt 3.3.2, for rensing av cellevegg og for klargjøring av cellevegg for HPLC ble fulgt. Utbyttet av rensset cellevegg var 17 mg for G.S.11 og 49 mg for CSS15.

Cellevegg (2 mg) fra G.S.11 og CCS15 ble behandlet med murein hydrolasen LytA som kutter bindingene mellom den første aminosyren i peptidkjeden og MurNAc enheten i glykankjeden og frigjør muropeptider fra celleveggen. Muropeptidene ble forbehandlet som beskrevet i seksjon 3.4.2 før de ble separert på en C18 kolonne (Vydac 218TP C18 5u, 250 mm x 4,6 mm) ved hjelp av HPLC (Gilson) og en 20 % acetonitril gradient over 105 minutter. Resultatene fra HPLC er presentert i Figur 4.16. Figuren viser kromatogrammene til de to prøvene og et kromatogram fra HPLC av cellevegg fra stammen RH1. Cellevegg fra RH1 ble rensset og analysert av Gro Stamsås i et tidligere eksperiment og resultatene fra denne analysen ble tatt med som en kontroll.

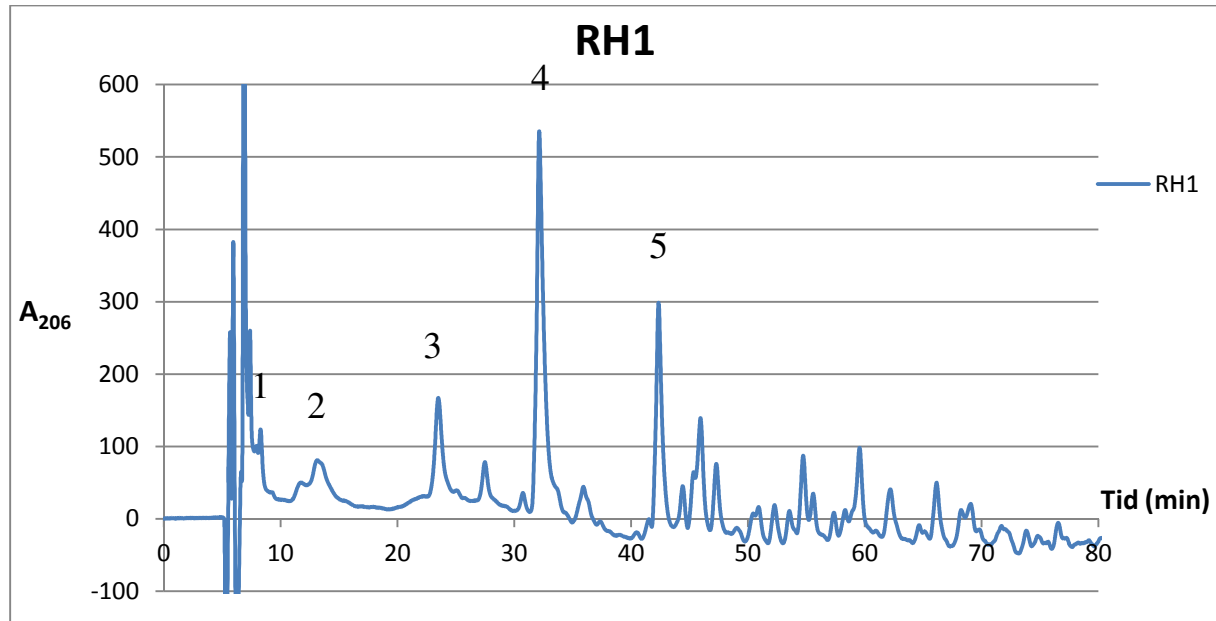
A



B



C



Figur 4.16: Viser resultatet fra HPLC. Figur A viser resultatene fra depletede celler fra stammen CSS15. Figur B viser resultatene fra kontrollstammen G.S.11, som er utgangsstammen til CSS15. Figur C viser analyse av celleveggen til stammen RH1 rensert og analysert av Gro Stamsås i et tidligere forsøk. Nummereringen fra 1 til 5 representerer de ulike peptidene som tidligere er bestemt ved massespektroskopi (Garcia-Bustos *et al.*, 1987).

Resultatene fra HPLC (Figur 4.16) viser at kromatogrammet til stammen RH1 og kromatogrammet til de RodA depletede cellene fra stammen CSS15 lignet på hverandre. Forholdene mellom de ulike toppene er likt, som betyr at sammensetningen av muropeptider i celleveggen er den samme. Kromatogrammet til kontrollstammen G.S.11 var ulikt begge de to andre stammene.

Ved massespektroskopi kan man analysere de ulike muropeptidene i den behandlede celleveggen for å se hvilke muropeptider de ulike toppene representerer. Dette er gjort for *S. pneumoniae* tidligere (Garcia-Bustos *et al.*, 1987) og viste at de muropeptidene som vandrer gjennom kolonnen raskest er monomere. De peptidkjedene som ikke har dannet kryssbindinger til andre peptidkjeder representerer altså de tre første toppene i kromatogrammet. Den første toppen (1) som kommer før 10 minutter representerer det uforgreinede (lineære) tripeptidet L-Ala-D-iGln-L-Lys hvor de to D-Ala-D-Ala enhetene er fjernet. Dette peptidet er veldig lite hydrofobt og kommer dermed raskt igjennom kolonnen. Topp nummer to (2) etter ca. 12 minutter er det uforgreinede pentapeptidet L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala.

Den tredje toppen (3) etter 24 minutter representerer det forgreinede pentapeptidet hvor dipeptidet L-Ser-L-Ala er bundet til L-Lys i posisjon 3 i peptidkjeden og D-Ala-D-Ala i posisjon 4 og 5 er fjernet (Garcia-Bustos *et al.*, 1987).

Topp nummer fire (4) og fem (5) representerer to dimerer (to peptidkjeder bundet til hverandre med en kryssbinding). Kryssbindingene i dimerene dannes enten via en peptidbro bestående av dipeptidet L-Ser-L-Ala fra D-Ala i posisjon 4 på det ene peptidet til L-Lys i posisjon 3 på det andre peptidet eller ved en binding mellom de samme to enhetene i peptidene, men uten en peptidbro. De resterende toppene representerer ulike trimerer (peptider med to kryssbindinger) blant muropeptidene i celleveggen (Garcia-Bustos *et al.*, 1987).

Resultatene fra HPLC (Figur 4.16) viser at det ikke har skjedd en endring i muropeptidkomposisjonen i celleveggen til de RodA-depletede cellene sammenlignet med RH1 cellene, forholdene mellom de ulike peptidkjedene er den samme. Ut fra disse resultatene virker det ikke som om mangel på RodA påvirker sammensetningen av muropeptidene i *S. pneumoniae*.

Kromatogrammet til G.S.11 er unormalt i seg selv ved at topp 3 som representerer de forgreinede monomerene er lavere enn i RH1 stammen mens topp nummer 4 som representerer kryssbunnede peptidkjeder uten en peptidbro mellom peptidkjedene (Garcia-Bustos *et al.*, 1987) er betydelig lavere enn i de to andre kromatogrammene. Det er lite trolig at de RodA depletede cellene fra stammen CSS15 (stammer fra G.S.11) hadde fått gjenopprettet normal celleveggstruktur ved vekst uten ekspresjon av *rodA* så antagelig har det skjedd noe med G.S.11 eller CSS15 stammen underveis i forsøket for eksempel ved dyrkingen av cellene, eller ved prøvepreparering eller separasjon av G.S.11.

5. Diskusjon

Målet med denne masteroppgaven har vært å undersøke de to proteinene FtsW og RodA. De to proteinene er homologe proteiner som begge antas å delta i celleveggsyntese. FtsW er identifisert som en flippase som flipper lipid II over cellemembranen i *E. coli* (Mohammadi *et al.*, 2011). Vi ønsket å undersøke hvordan *S. pneumoniae* ble påvirket av mangel på FtsW og RodA under vekst og brukte et gen-depletion system for å undersøke dette. Morfologien til FtsW og RodA-depletete *S. pneumoniae* celler ble studert for å se om dette kunne fortelle noe om proteinenes aktivitet.

Et mål var å undersøke om de to proteinene FtsW og RodA kan vikariere for hverandre ved mangel på et av genene.

5.1 Genet *ftsW* er essensielt hos *S. pneumoniae*

Resultatene fra transformasjonene for å knocke ut det native *ftsW* med Janus (Tabell 4.4) viste at reelle transformanter var i stand til å danne kolonier, men antallet transformanter var lavere enn forventet ved transformasjon med Janus-kassetten. Gen-depletion eksperimenter med stammen CSS12 viste at veksten til *S. pneumoniae* påvirkes av mangel på FtsW og cellene ikke er i stand til å vokse uten at *ftsW* uttrykkes.

Basert på tidligere arbeid (Thanassi *et al.*, 2002) og arbeidet utført i denne studien peker alle data mot at genet *ftsW* i *S. pneumoniae* er et essensielt gen hos denne bakterien. Likevel ble det vist i denne studien at det i visse tilfeller var mulig å slå ut det native *ftsW* med Janus. Dette gjør det vanskelig å avgjøre om genet faktisk er essensielt slik som tidligere arbeid har vist (Thanassi *et al.*, 2002). Antallet transformanter ved alle transformasjonene hvor *ftsW* ble knocket ut (Tabell 4.4) var høyere enn det som er vanlig for knockout av essensielle gener.

Grunnen til at noen pneumokokker var levedyktige uten *ftsW*, dog med veldig lav vekstrate, kan være at disse mutantene i tillegg til å ha fjernet *ftsW* har spontanmutert andre steder i genomet som følge av mangel på *ftsW*. Disse mutasjonene kan ha skjedd for å kompensere for mangelen på FtsW. Det er vist tidligere at pneumokokker muterer svært raskt når de blir utsatt for seleksjonspress (Leiv Sigve Håvarstein personlig kommunikasjon). For å kartlegge hvilke mutasjoner som kan ha oppstått i Δ *ftsW*-mutantene ville det vært ønskelig å sekvensere hele genomet til denne klonen. En annen mulighet til at *S. pneumoniae* kan overleve uten FtsW er at cellene trenger en veldig lav konsentrasjon av dette proteinet. Dersom det er tilfellet vil cellene trolig kunne vokse i en kort periode selv om nye FtsW proteiner ikke syntetiseres.

Resultater fra forsøk hvor uttrykket av *ftsW*-promoteren ble analysert kan også tyde på at uttrykket av genet er veldig lavt.

Siden transformasjon av *S. pneumoniae* med *Janus:ΔftsW* indikerte at pneumokokkene kunne tilpasse seg å leve uten *ftsW* valgte vi å benytte et gen-depletionsystem (ComRS) for å ha bedre kontroll på når *ftsW*-ekspresjonen skulle slås av. Målinger av veksten til celler som ble depletet for FtsW viste at celleveksten ble hemmet ved mangel på FtsW (Figur 4.4 og 4.5). I de høyeste fortyningene (~1:20000 fortykning) var ikke cellene i stand til å vokse i det hele tatt (resultater ikke vist) uten ComS* til stede. Basert på den lave vekstraten til *ΔftsW*-mutantene som ble dyrket og forsøk med gen-depletion av *ftsW* ble det etter hvert tydelig at genet er essensielt i *S. pneumoniae* slik som det er i *E. coli* (Gérard *et al.*, 2002)

5.2 FtsW deltar i celleveggsyntese i *S. pneumoniae*

Mikroskoperingen av *S. pneumoniae* depletet for FtsW viste at fenotypen til disse cellene endres drastisk (Figur 4.7 og 4.9). For det første var de *ftsW*-depletede cellene mye større enn de induserte cellene (kontrollcellene) og for det andre utviklet mange av cellene nye fenotyper av å vokse uten FtsW. Det var to fenotyper som utmerket seg hos de *ftsW*-depletede cellene; (I) bakteriene fikk en avlang fasong og (II) de utviklet en sitronliknende form, med relativt normale poler mens septum hadde svulmet kraftig opp.

Fenotypene til de *ftsW*-depletede pneumokokkene viste tydelig at de hadde problemer med å dele seg. Den forlengede celleformen mange av cellene viste kan være et resultat av at cellene hadde fortsatt å vokse selv ved lav ekspresjon av FtsW, men uten å klare å danne et normalt septum. FtsW tilhører familien med SEDS (shape, elongation, division og sporulation) proteiner og mange mener at dette proteinet, som deltar i syntesen av cellevegg, bidrar ved dannelsen av septum i cellen og ikke ved elongering (Zapun *et al.*, 2008). En mulig forklaring på den forlengede cellefasongen som ble observert kan være at når FtsW ikke er uttrykt blir cellevegg kun syntetisert av det perifere celleveggsyntesemaskineriet som er mer jevnt fordelt i cellemembranen enn det septale maskineriet som kun er lokalisert i septum. Hvis dette er tilfelle vil det forklare hvorfor så mange av de depletede cellene får en mer avlang form enn cellene som uttrykker FtsW.

Grunnen til at de *ftsW*-depletede cellene viste to forskjellige fenotyper (avlang- eller sitronfasong) er vanskelig å forklare. I utgangspunktet ville man anta at det var den avlange

celleformen som ville dominere hos de *ftsW*-depletede cellene fordi mangel på FtsW fører til at cellene da kun ville syntetisere cellevegg med det perifere celleveggsyntesemaskineriet. Grunnen til at den sitronlignende celleformen oppstår kan ha å gjøre med lokaliseringen til et eller flere av proteinene eller noen av byggesteinene som er nødvendig i celleveggsyntesen. Det kan tenkes at når cellene nærmer seg punktet for å fullføre celledelingen vil lipid II normalt ansamles rundt septum, men uten FtsW til stede til å flippe lipid II over membranen vil dannelsen av septum og celledeling ikke skje. Den sitronlignende celleformen kan derfor være et resultat at det perifere celleveggsyntesemaskineriet går som normalt, men uten at cellene klarer å fullføre celledelingen.

Fikserte *S. pneumoniae* celler depletet for FtsW ble innkubert med BODIPY[®] FL vancomycin før de ble mikroskopert ved hjelp av fluorescens mikroskopi. Resultatene (Figur 4.10) viste at i cellene uten uttrykt FtsW var distribusjonen av lipid II jevnere fordelt i cellemembranen enn hos kontrollstammen, hvor lokaliseringen av lipid II i større grad var konsentrert rundt septum i cellene. Resultatet av fargingen og mikroskoperingen av kontrollstammen var ikke så vellykket som vi hadde håpet på, men de bildene som ble tatt tydet på at lipid II var lokalisert ved cellenes septum i kontrollstammen.

Mangelen på et tydelig septum i de depletede cellene kan tyde på at cellene ikke klarer å transportere en økt mengde lipid II til septum selv om cellene er i vekst og at lipid II dermed blir mer spredt utover i hele cellemembranen. Resultatene stemmer overens med at FtsW er en flippase for lipid II også i *S. pneumoniae*.

5.3 Ekspresjonen av *ftsW*-genet påvirkes ikke av mangel på FtsW

Det er naturlig å anta at ekspresjonen til et gen med en så viktig funksjon som *ftsW* er nøye regulert. Et alternativ er at konsentrasjonen av selve proteinet regulerer uttrykket av genet, eller at det blir regulert ved registrering av aktiviteten til FtsW. Resultatene fra mitt forsøk med å sette luciferase-genet inn på plassen til det native *ftsW* tyder ikke på at dette er tilfellet. Produksjonen av lys så ikke ut til å gå opp når *S. pneumoniae* ble depletet for FtsW selv om veksten helt tydelig avtok som følge av dette (Figur 4.11).

Fra resultatene av dette forsøket virker det som om uttrykket av FtsW øker når bakteriekulturen er i vekst, men at hemming av celleveggsyntesen eller mangel på FtsW ikke fører til en oppregulering av genuttrykket. Produksjonen av lys økte når cellene gikk inn i den

eksponentielle vekstfasen, men avtok igjen veldig raskt. Dette sammen med det faktum at styrken på lysproduksjonen var relativt lav kan tyde på at cellene trenger lite av dette proteinet selv i eksponentiell vekstfase. Andre forskere har også foreslått at promoteren til *ftsW* enten er veldig svak eller sitter langt oppstrøms for *ftsW* (Ikeda *et al.*, 1989).

At *S. pneumoniae* trenger og dermed også produserer lite av FtsW støttes av resultatene fra gen-depletion hvor en effekt av mangelen på FtsW ikke ble observert før fortynning 6 og 7. I studier av andre proteiner som man vet er høyt uttrykt i *S. pneumoniae* har man observert en effekt av depletion allerede ved fortynning 2 og 3.

5.4 *rodA* er ikke et essensielt gen i *S. pneumoniae*

RodA er vist å være essensielt i *E. coli* og *B. subtilis* og man antar at dette proteinet fungerer som en flippase på samme måte som FtsW selv om dets substrat ikke er identifisert (Henriques *et al.*, 1998). I denne studien ville vi først undersøke om *rodA* også var et essensielt gen i *S. pneumoniae*. For å teste dette ble det utført transformasjoner av *S. pneumoniae* for å knocke ut *rodA*. Når man fjerner et essensielt gen fra genomet til en bakterie forventer man at antall transformanter skal bli null eller lik såkalt normal bakgrunnsvekst. I forsøkene med transformasjoner av Janus inn for det native *rodA* var antallet positive transformanter høyere enn det som var forventet når man fjerner essensielle gener fra genomet til *S. pneumoniae*, se Tabell 4.5.

Resultatene fra knockout-forsøkene viste at pneumokokker var i stand til å overleve fravær av *rodA*. I tillegg ble det utført gen-depletion av *rodA* som viste at cellene overlevde reduserte ekspresjonsnivåer av *rodA*. Selv i de høyeste fortynningene var cellene i stand til å vokse opp til en OD₄₉₂ rundt 0,5 (Figur 4.12 og 4.13). Basert på disse dataene ble det konkludert med at *rodA* ikke er et essensielt gen i pneumokokker, men at cellene får en tydelig reduksjon i vekstrate når RodA er fraværende. *rodA* er heller ikke identifisert som et av de 113 essensielle genene i *S. pneumoniae* (Thanassi *et al.*, 2002).

Tidligere studier av *rodA* hos *S. thermophilus* og *S. pyogenes* har også indikert at genet ikke var essensielt i disse bakteriene (Zapun *et al.*, 2008, Thibessard *et al.*, 2002). Hos *E. coli* derimot er *rodA* et essensielt gen, dette er muligens fordi *E. coli* er en stavformet bakterie, mens *S. pneumoniae* og *S. thermophilus* er ovale kokker. Det har blitt foreslått at RodA er aktivt i celleveggsyntesen som skjer ved elongeringen av celler (maskineriet for perifer

celleveggsyntese). Det kan tenkes at elongeringen av cellene er en mer kritisk prosess for stavformede bakterier som *E. coli* og *B. subtilis* enn for pneumokokker (Thibessard *et al.*, 2002, Zapun *et al.*, 2008).

Dette er i overenstemmelse med at $\Delta rodA$ -depletede *S. pneumoniae* ikke viste tegn til morfologiske forandringer. Thibessard *et al.* (2002) observerte at en *S. thermophilus* stamme som hadde slått ut *rodA* fikk en mer sfærisk form til forskjell fra den normale ovale formen og at cellene var organisert i lengre kjeder enn utgangsstammen. En slik effekt ble ikke observert for pneumokokkene som var depletet for RodA i dette studiet.

Den reduserte veksthastigheten som ble observert for $\Delta rodA$ -mutanten og ved *rodA*-depletion (CSS15) skyldes med stor sannsynlighet mangel på RodA i cellene. I forsøk hvor genet *thiJ*, som er genet direkte nedstrøms for *rodA*, ble knokket ut ble det ikke observert noen endring på veksthastigheten til *S. pneumoniae* (Figur 4.15). Antallet transformanter som klarte å vokse opp etter at *thiJ* var knokket ut var også betydelig høyere enn det som ble observert når *rodA* ble knokket ut (Tabell 4.8 og 4.5). Basert på dette konkluderte vi med at den reduserte veksthastigheten sammenlignet med villtype celler skyldtes fravær av RodA.

Observasjoner fra gen-depletion forsøk viste at $\Delta rodA$ -mutanter, som til å begynne med fikk en redusert vekst ved mangel på RodA, fikk en vekst som var lik de cellene som uttrykte *rodA* etter hvert som kulturen ble dyrket. Dette skyldes trolig spontane mutasjoner som oppstår andre steder i genomet til *S. pneumoniae* når *rodA* knockes ut. Det skjer hyppige mutasjoner i pneumokokker når cellene utsettes for et seleksjonspress. Slike mutasjoner kan ha oppstått for å kompensere for mangelen på RodA (L.S. Håvarstein personlig kommunikasjon).

S. pneumoniae har trolig flere ulike flippaser som har i oppgave å transportere precursorer til forskjellige syntesereaksjoner over den hydrofobe cellemembranen. Et eksempel er flippasen TacF som er produktet fra det essensielle genet *tacF* og antas å transportere ut precursoren til tekoinsyresyntesen i *S. pneumoniae* (Damjanovic *et al.*, 2007, González *et al.*, 2008, Eberhardt *et al.*, 2009). Man kan også tenke seg andre flippaser som transporterer for eksempel sakkaridenheter til kapseldannelse i *S. pneumoniae* over cellemembranen.

Lipid II er og andre precursorer som skal transporteres over cellemembranen bindes til transportmolekyler, gjerne lipider, som gjør det mulig å transportere enhetene over membranen. Bactoprenol er bundet til lipid II mens celleveggprecursoren transporteres over cellemembranen til *S. pneumoniae*. På samme måte vil trolig andre precursorer som skal

transporteres gjennom cellemembranen være bundet til bactoprenol eller andre lignende transportmolekyler.

Spontane mutasjoner som skjer i genomet til *S. pneumoniae* under seleksjonspresset som oppstår på grunn av mangel på RodA kan muligens føre til at andre flippaser kan erstatte RodA og FtsW. Spesifisiteten til disse flippasene kan ved mutasjoner bli mindre som gjør at de i større eller mindre grad er i stand til å transportere lipid II over membranen. Grunnen til at det ble observert flere transformanter når *rodA* ble knokket ut enn når *ftsW* ble knokket ut er sannsynligvis at færre mutasjoner er nødvendige for at andre flippaser kan overta for RodA. Mutasjoner som gjør at nye flippaser i liten grad kan overta for RodA vil gi dårlig vekst, mens de som klarer det bedre vil gi bedre vekst hos transformantene. På grunn av det vedvarende seleksjonspresset $\Delta rodA$ -mutantene utsettes for vil det hele tiden selekteres for mutasjoner som gir bedre fungerende flippaser som gjør at veksthastigheten til $\Delta rodA$ -mutanten vil bli stadig bedre. Akkurat slik som ble observert for vår $\Delta rodA$ -mutant.

Selv om dette er en sannsynlig forklaring ble det ikke funnet noen eksperimentell bevis for dette annet en den observerte veksten til $\Delta rodA$ -mutanten. Neste skritt for å finne ut av dette ville være å sekvensere genomet til flere $\Delta rodA$ -mutanter (og $\Delta ftsW$ -mutanter) som hadde fått gjenopprettet den normale veksthastigheten selv uten ComS* for å se etter mutasjoner som har oppstått. Et naturlig sted å begynne sekvenseringen ville vært genet *tacF* eller gener for andre foreslåtte flippaser.

Slike spontane mutasjoner gjør det vanskelig å jobbe med forsøk hvor genet *rodA* knokkes ut fordi mutasjonene maskerer effektene av mangel på RodA, og fordi reproduksjon av resultatene bli vanskelig. Det å tolke resultatene og trekke konklusjoner blir også en stor utfordring på grunn av at det er vanskelig å vite om den reelle effekten av RodA mangel egentlig er større enn det vi observerer.

5.5 Mangel på RodA påvirker sensitiviteten overfor forskjellige antibiotika

Med tanke på at RodA antas å ha en funksjon relatert til celleveggsyntese ønsket vi å teste om redusert uttrykk av RodA påvirket sensitiviteten for ulike antibiotika. Ulike antibiotika påvirker bakterier på forskjellige måter. Noen påvirker celleveggsyntesen slik som penicillin, mens for eksempel tetracyclin påvirker bakterienes proteinsyntese. På forhånd var tanken at det muligens var kun overfor de antibiotikaene som påvirker celleveggsyntesen man ville se

en endring i sensitivitet når cellene ble depletet for RodA. Mangel på dette proteinet vil dermed kunne føre til at kvalitet på celleveggen blir redusert og endringer i oppbygningen av celleveggen kan redusere bakterienes evne til å motstå angrep av antibiotika som påvirker celleveggen (Zapun *et al.*, 2008, Thibessard *et al.*, 2002).

Resultatene fra forsøkene hvor sensitiviteten overfor ulike antibiotika ble undersøkt hos ulike *ΔrodA*-mutanter mens de ble depletet for RodA viste en tydelig økning i sensitivitet overfor ulike antibiotika når uttrykket av RodA gikk ned (Tabell 4.10, 4.11 og 4.12). Økningen i sensitivitet økte gradvis avhengig av minkende ComS*-konsentrasjoner i mediumet, mens cellene dyrket med 2,0 μM ComS* viste lik sensitivitet som hos kontrollstammene. Dette var viktig for at de effektene som ble observert på de depletede cellene faktisk er reelle effekter av mangel på RodA.

Fra resultatene på forsøkene virker det som om cellene reagerte med en økning i sensitiviteten overfor alle de ulike typene antibiotika ikke kun overfor de som påvirker celleveggen. Det kan være flere mulige årsaker til dette. En av grunnene til at bakteriene reagerer på alle antibiotikaene som ikke hemmer celleveggsyntese kan være at disse lettere trenger inn i cellene som en følge av at celleveggen er svekket som følge av *rodA*-depletion. Som betyr det samme som at antibiotikumet vil hemme ved en lavere konsentrasjon enn normalt. En annen mulighet er at RodA på en eller annen måte er del av et forsvarssystem mot antibiotika og at mangel på dette proteinet hemmer forsvarssystemet. Og dermed gir opphav til en økt sensitivitet overfor ulike antibiotika.

Med tanke på at det er et konstant behov for utvikling av nye typer antibiotika med andre mekanismer å hemme bakterievekst på enn penicilliner, var det en interessant observasjon at sensitiviteten overfor ulike antibiotika økte ved mangel på RodA. Det er mulig å tenke seg at RodA og andre homologe proteiner som for eksempel FtsW i fremtiden kan fungere som mulige mål for nye antibiotika alternativt til penicillin. Grunnet den økende resistensen mot antibiotika som er observert i blant annet *S. pneumoniae* vil dette være viktig i fremtiden.

5.6 Depletion av *rodA* påvirker ikke peptidkomposisjonen i celleveggen til *S. pneumoniae*

Resultatene fra HPLC av rensset cellevegg fra stammen CSS15 som ble depletet for RodA (Figur 4.16) viste at analysen av celleveggen fra disse cellene ga et kromatogram som samsvarte med det som tidligere er observert for stammen RH1 (Figur 4.16). Kontrollstammen G.S.11 fikk et noe annet mønster i kromatogrammet enn de to andre kromatogrammene. Det er lite trolig at gen-depletion av *rodA* skulle føre til en gjenoppretting

av normal peptidkomposisjon fra den peptidkomposisjonen vi så for G.S.11. Det er derfor trolig skjedd en feil ved et eller annet punkt for kontrollstammen G.S.11, for eksempel ved dyrkingen av cellene eller under prøveprepareringen.

En annen mulighet er at det har skjedd spontane mutasjoner, slik som beskrevet i avsnitt 5.4, i de depletede cellene underveis i dyrkingen som gjør at cellene har delvis fått opprettet de opprinnelige fysiologiske egenskapene. Og dermed også fått opprettet celleveggstrukturen slik at den ligner på det vi ser i kontrollstammen RH1. Dersom dette er tilfellet kan det tenkes at resultatet fra HPLC av G.S.11 kan være riktig og at denne mutanten har en endret peptidkomposisjon i celleveggen. Og at de depletede CSS15 cellene har fått gjenopprettet normal celleveggstruktur som følge av spontane mutasjoner som følge av seleksjonspress når *rodA* ikke uttrykkes.

Grunnet to mislykkede forsøk ved storskaladyrking av stammen CSS15 med *rodA* uttrykt ved 2,0 μM ComS* og mangel på tid var det ikke mulig å høste cellevegg fra denne stammen. Et kromatogram fra analyse av rensede cellevegg fra slike celler ville fortalt hvordan cellene vokser når *rodA* uttrykkes ektopisk og dermed også mer om hva som hadde skjedd med de depletede cellene underveis i dyrkingen uten ComS*.

5.7 Deltar RodA i celleveggsyntese?

Publikasjoner om RodA tyder på at RodA fungerer som en flippase. RodA's homologi overfor andre proteiner som er kjente flippaser og oppgavene til RodA's homologer i stavformede bakterier som *E. coli* og *B. subtilis* har gjort at man antar at RodA deltar i celleveggsyntesen ved elongering av celler (Thibessard *et al.*, 2002, Sham *et al.*, 2012, Zapun *et al.*, 2008). Resultatene i denne studien viser at pneumokokker ikke er like avhengig av RodA som FtsW. FtsW er vist å flippe lipid II (Mohammadi *et al.*, 2011), noe som er helt essensielt for celleveggsyntese, mens substratet til RodA ennå er ukjent.

Det ble ikke observert noen tydelig endring av morfologien til RodA depletede celler i denne oppgaven. Men samtidig var det tydelig at veksten til *S. pneumoniae* ble hemmet ved mangel på RodA. Dessuten tyder observasjoner av veksten til $\Delta rodA$ -mutanten at cellene adapterer seg til fravær av RodA som gjør at kulturer med $\Delta rodA$ -mutanten vokser gradvis raskere når bakteriene utsettes for seleksjonspress. Disse tingene tyder på at RodA utfører en viktig, men ikke essensiell funksjon i *S. pneumoniae*.

Man kan spekulere i om RodA fungerer som flippase for et annet substrat enn lipid II i *S. pneumoniae*. Bactoprenoldelen i lipid II kan fungere som et dockingmolekyl for andre ligander enn MurNAc-GlcNAc forbindelsen, for eksempel ulike sukkerforbindelser til glykosylering eller til dannelse av kapsel i *S. pneumoniae*. TacF er nevnt tidligere som et eksempel på en annen flippase som bruker bactoprenol som dockingmolekyl for å transportere precursoren til tekoinsyresyntesen over cellemembranen (Damjanovic *et al.*, 2007, González *et al.*, 2008).

5.8 Kan RodA og FtsW utføre den samme jobben i *S. pneumoniae*?

Når *S. pneumoniae* vokste under gen-depletion av *ftsW* var cellene ikke i stand til å vokse normalt og cellene uten uttrykt FtsW klarte ikke å vokse. Ut fra disse resultatene var det lite som tydet på at RodA var i stand til å erstatte FtsW og gjøre den samme oppgaven. Det at *ftsW* er et essensielt gen gjør at det er vanskelig å observere om proteinet FtsW spiller en rolle ved depletion av RodA.

Det er mulig å se for seg et eksperiment der man konstruerer en dobbelmutant hvor både *rodA* og *ftsW* er slått ut og uttrykket av *ftsW* reguleres av ComRS systemet. En slik mutant burde ut fra tidligere resultater vokse dårligere enn villtypen på grunn av mangel på RodA, men den ville vokse når *ftsW* uttrykkes av ComRS systemet. Ved depletion av FtsW i denne mutanten kunne man se om det var en økt effekt av depletion av FtsW som følge av at cellene ikke produserer RodA. Dette kunne kanskje gi en pekepinn på om RodA kan utføre jobben til FtsW i *S. pneumoniae*.

En annen mulighet vil være å se på uttrykket av det andre genet ved bruk av et luciferase reportergen når cellene blir depletet for enten FtsW eller RodA. Dersom uttrykket av det andre genet går opp når cellen blir depletet for det andre genet vil det indikere at proteinene kan fungere som reserver/alternativer for/til hverandre.

Det er trolig mer sannsynlig at det kan skje mutasjoner i de to proteinene som for eksempel gjør at spesifisiteten overfor substratene går ned og at proteinene på den måten kan vikariere for hverandre.

6. Konklusjon og videre studier

Genet *ftsW* er et essensielt gen i *S. pneumoniae*, og utfra resultater fra mikroskopering av fenotyper som oppstår ved mangel på proteinet FtsW virker det som om FtsW deltar i celleveggsyntesen ved dannelse av septum hos *S. pneumoniae*.

Genet *rodA* virker ikke å være essensielt i bakterien *S. pneumoniae*. Men det er tydelig at ved mangel på RodA hemmer veksten av *S. pneumoniae*. Likevel, virker det som at cellene på en eller annen måte tilpasser seg mangel på RodA og at det selekteres for mutasjoner som gjør cellene bedre tilpasset mangelen på proteinet når de vokser.

S. pneumoniae utsatt for gen-depletion av *rodA* blir mer sensitive overfor ulike typer antibiotika. Sensitiviteten øker både for antibiotika som påvirker celleveggsyntese og antibiotika som påvirker andre prosesser i cellene. Disse resultatene tyder på at RodA deltar i celleveggsyntese i *S. pneumoniae*. På bakgrunn av den observasjonen er det mulig å tenke at proteinet RodA kan være et mulig mål for utvikling av nye antibiotika i fremtiden.

Et naturlig skritt videre med denne oppgaven ville være å sekvensere utvalgte gener hos *ΔrodA*- og *ΔftsW*-mutantene for å se hva som gjør at cellene overkommer effektene som ble observert ved depletion av disse proteinene. Man kan starte med utvalgte gener som man mistenker koder for andre flippaser i *S. pneumoniae* for å se om det har skjedd mutasjoner i disse genene som gjør at lipid II kan transporteres ved hjelp av disse flippasene istedenfor.

En mulig videre studie kan være å sammenligne analyser av cellevegg fra *S. pneumoniae* depletet for FtsW eller RodA for å se om endringene i oppbygningen av celleveggen er de samme. Dette vil kunne være et skritt mot å se om de to proteinene utfører den samme oppgaven i celleveggsyntesen, men på forskjellige steder eller om oppgavene de utfører er forskjellige.

Det er ikke vist hvilket substrat RodA transporterer over cellemembranen, bare at flippasen er involvert i celleveggsyntese i *E. coli* (Noirclerc-Savoye *et al.*, 2003). Det kan tenkes at RodA er en flippase for et annet substrat enn lipid II i celleveggsyntesen. Det er kjent ulike flippaser i *S. pneumoniae* som flipper substrater over cellemembranen og trolig er det mange flere som ikke er identifisert. Videre arbeid kan ha som mål å identifisere hvilket substrat RodA transporterer over cellemembranen.

7. Referanser

- BERG, K. H., BIORNSTAD, T. J., STRAUME, D. & HAVARSTEIN, L. S. 2011. Peptide-Regulated Gene Depletion System Developed for Use in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 193, 5207-5215.
- DAMJANOVIC, M., KHARAT, A. S., EBERHARDT, A., TOMASZ, A. & VOLLMER, W. 2007. The Essential *tacF* Gene Is Responsible for the Choline-Dependent Growth Phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 189, 7105-7111.
- EBERHARDT, A., WU, L. J., ERRINGTON, J., VOLLMER, W. & VEENING, J.-W. 2009. Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Molecular Microbiology*, 74, 395-408.
- FONTAINE, L., BOUTRY, C., DE FRAHAN, M. H., DELPLACE, B., FREMAUX, C., HORVATH, P., BOYAVAL, P. & HOLS, P. 2010. A Novel Pheromone Quorum-Sensing System Controls the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of Bacteriology*, 192, 1444-1454.
- GARCIA-BUSTOS, J. F., CHAIT, B. T. & TOMASZ, A. 1987. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 15400-15405.
- GÉRARD, P., VERNET, T. & ZAPUN, A. 2002. Membrane Topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW Division Protein. *Journal of Bacteriology*, 184, 1925-1931.
- GONZÁLEZ, A., LLULL, D., MORALES, M., GARCÍA, P. & GARCÍA, E. 2008. Mutations in the *tacF* Gene of Clinical Strains and Laboratory Transformants of *Streptococcus pneumoniae*: Impact on Choline Auxotrophy and Growth Rate. *Journal of Bacteriology*, 190, 4129-4138.
- HAKENBECK, R. 2000. Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. *Research in Microbiology*, 151, 453-456.
- HAKENBECK, R. & CHHATWAL, S. 2007. *Molecular Biology of Streptococci*, Great Britain, Horizon bioscience.
- HARDIE, J. M. & WHILEY, R. A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*.
- HECKMAN, K. L. & PEASE, L. R. 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protocols*, 2, 924-932.
- HENRIQUES, A. O., GLASER, P., PIGGOT, P. J. & MORAN JR, C. P. 1998. Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 28, 235-247.
- IKEDA, M., SATO, T., WACHI, M., JUNG, H. K., ISHINO, F., KOBAYASHI, Y. & MATSUHASHI, M. 1989. STRUCTURAL SIMILARITY AMONG *ESCHERICHIA-COLI* FTSW AND RODA PROTEINS AND *BACILLUS-SUBTILIS* SPOVE PROTEIN, WHICH FUNCTION IN CELL-DIVISION, CELL ELONGATION, AND SPORE FORMATION, RESPECTIVELY. *Journal of Bacteriology*, 171, 6375-6378.
- JOHNSBORG, O., ELDHOLM, V., BJØRNSTAD, M. L. & HÅVARSTEIN, L. S. 2008. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *S. pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology*.
- JOHNSBORG, O., ELDHOLM, V. & HÅVARSTEIN, L. S. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158, 767-778.
- JOHNSBORG, O. & HÅVARSTEIN, L. S. 2009a. Pneumococcal LytR, a Protein from the LytR-CpsA-Psr Family, Is Essential for Normal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 191, 5859-5864.
- JOHNSBORG, O. & HÅVARSTEIN, L. S. 2009b. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *Federation of European Microbiological Societies*, 33, 627-642.
- KAWAMURA, Y., HOU, X.-G., SULTANA, F., MIURA, H. & EZAKI, T. 1995. Determination of 16S rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 406-408.

- MELLROTH, P., DANIELS, R., EBERHARDT, A., RÖNNLUND, D., BLOM, H., WIDENGREN, J., NORMARK, S. & HENRIQUES-NORMARK, B. 2012. LytA, Major Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, Requires Access to Nascent Peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 11018-11029.
- MOHAMMADI, T., VAN DAM, V., SIJBRANDI, R., VERNET, T., ZAPUN, A., BOUHSS, A., DIEPEVEEN-DE BRUIN, M., NGUYEN-DISTECHE, M., DE KRUIJFF, B. & BREUKINK, E. 2011. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J*, 30, 1425-1432.
- NEUE, U. D. 1997. What is HPLC? *HPLC Columns Theory, Technology and Practice*. New York, USA: Wiley-VCH.
- NOIRCLERC-SAVOYE, M., MORLOT, C., GERARD, P., VERNET, T. & ZAPUN, A. 2003. Expression and purification of FtsW and RodA from *Streptococcus pneumoniae*, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively. *Protein Expression and Purification*, 30, 18-25.
- NORDLI, S. & TORJUSEN, A. 2012. Bruken av antibiotika kan få alvorlige konsekvenser [Online]. NRK.no. Available: <http://www.nrk.no/nyheter/distrikt/ostfold/1.8012495>.
- NORTH.DAKOTA.UNIVERSITY. 2012. MOLECULAR DIAGNOSTICS [Online]. Available: <http://www.und.nodak.edu/instruct/rsimmons/MOLECULAR.htm>.
- POLL, T. V. D. & OPAL, S. M. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374, 1543-1556.
- SALLES, C., CREANCIER, L., CLAVERYS, J.-P. & MEJEAN, V. 1992. The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 20, 6103.
- SCHEFFERS, D.-J. & PINHO, M. G. 2005. Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 585-607.
- SHAM, L.-T., TSUI, H.-C. T., LAND, A. D., BARENDT, S. M. & WINKLER, M. E. 2012. Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Current Opinion in Microbiology*.
- SUNG, C. K., LI, H., CLAVERYS, J. P. & MORRISON, D. A. 2001. An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5190-5196.
- THANASSI, J. A., HARTMAN-NEUMANN, S. L., DOUGHERTY, T. J., DOUGHERTY, B. A. & PUCCI, M. J. 2002. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 30, 3152-3162.
- THIBESSARD, A., FERNANDEZ, A., GINTZ, B., LEBLOND-BOURGET, N. & DECARIS, B. 2002. Effects of rodA and pbp2b Disruption on Cell Morphology and Oxidative Stress Response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Journal of Bacteriology*, 184, 2821-2826.
- VOLLMER, W., BLANOT, D. & DE PEDRO, M. A. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 149-167.
- WILLEY, J. M., SHERWOOD, L. M. & WOOLVERTON, C. J. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*, McGraw-Hill Higher Education.
- ZAPUN, A., VERNET, T. & PINHO, M. G. 2008. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 345-360.