

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Førord

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av studieprogrammet Lektorutdanning i Naturvitenskapelige fag ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap. Arbeidet ble utført på Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap, seksjon for molekylær mikrobiologi, i perioden august 2011 til mai 2012.

Først og fremst vil jeg takke hovedveileder Prof. Leiv Sigve Håvarstein for god oppfølging og veiledning gjennom hele perioden. Mange ganger takk til medveileder Kari Helene Berg som bestandig har vært tilgjengelig for samtale og diskusjon. Jeg er evig takknemmelig alle timene du har lagt ned, for alle råd og vink og for at du alltid har vært positiv. Spesielt har dine kommentarer og innspill under skriveprosessen vært uvurderlige! En stor takk går også til Dr. Daniel Straume for alle gode innspill både i det praktiske arbeidet og under skriveprosessen.

Jeg ønsker også å takke alle som arbeider på laboratoriet. Dere har tatt meg godt imot som masterstudent, dere har alltid vært tålmodige og tilgjengelig for å svare på spørsmål. Ikke minst har dere sørget for at blodsukkeret mitt har holdt seg på et stabilt høyt nivå i løpet av hele året. Jeg vil spesielt takke Gro Stamsås for uvurderlig hjelp med umulige PCR-reaksjoner, og for gode råd under skriveprosessen. Takk til Dr. Anne-Mette Grønvold og Dr. Johan Bjørnstad for hjelp med korrekturlesing og retting av oppgaven.

Elin Ørmen på Mikroskopilaboratoriet ved IPM må takkes for teknisk assistanse ved SEM.

Til slutt vil jeg takke alle mine venner som har vært med og gjort studietiden ved UMB til en uforglemmelig periode. En takk går også til Sangkoret Lærken som har sørget for å bringe ”rarhet” inn i en eller seriøs studiehverdag.

Marita Terese Sæther

Ås, mai 2012

Sammendrag

Hovedfunksjonen til den bakterielle celleveggen er å motstå det intracellulære trykket og å opprettholde morfologien til bakteriene. Skjelettet i celleveggen består av peptidoglykan. Strukturen til peptidoglykan er kompleks, og selv om det har vært studert i mange år har man enda ikke en full forståelse av dets tredimensjonale struktur og hvordan dette makromolekylet syntetiseres. Celledeling og celleveggsyntese hos bakterier er nøye regulerte og koordinerte prosesser hvor mange komponenter inngår.

Streptococcus pneumoniae har en typisk Gram-positiv cellevegg og en ovoid morfologi. Celleveggsyntesen skjer som en kombinasjon av septal og perifer syntese i en såkalt tomaskineri-modell. Blant de mange komponentene som er assosiert med celleveggsyntesemaskineriet hos pneumokokker har de penicillinbindende proteinene (PBPene) sentrale roller. Klasse A PBPene (PBP1a, PBP1b og PBP2a) har både transglykosylase- og transpeptidaseaktivitet, mens de essensielle klasse B PBPene PBP2x og PBP2b kun har transpeptidaseaktivitet. Mutasjoner i PBPene har vist seg å føre til resistens mot penicillin og andre β -laktamantibiotika. Den økende spredningen av penicillinresistens fører til problemer i forbindelse med behandling av pneumokokksykdommer.

PBP2b og PBP2x er essensielle proteiner hos pneumokokker, og studier har vist at delesjon av både PBP1a eller PBP2a er letalt for *S. pneumoniae*. I dette arbeidet har ComRS-depletionsystemet blitt brukt til å studere interaksjonene mellom PBP1a og PBP2a, og mellom klasse A PBPene og klasse B PBPene PBP2b og PBP2x. Vekst og morfologistudier har vist flere indikasjoner på at PBP1a har en sentral rolle blant klasse A PBPene. Fra litteraturen vet man at PBP2a og PBP1a i en viss grad kan vikariere for hverandre, men resultatene fra dette arbeidet tyder derimot på at PBP2a ikke er en fullverdig erstatter for PBP1a. Videre ble det vist at PBP1a har en nøkkelrolle i samarbeid med klasse B PBPene. Vekst- og morfologistudier indikerte at det er en interaksjon mellom PBP2x og PBP1a i den septale celleveggsyntesen. Studiene viste også at PBP1a og PBP1b trolig er lokalisert sammen med PBP2b i det perifere celleveggsyntesemaskineriet. Disse resultatene bidrar til å styrke tomaskineri-modellen da studien er gjennomført med andre metoder enn det som tidligere har blitt brukt.

Abstract

The main function of the bacterial cell wall is to withstand osmotic pressure and to maintain the bacterial shape and structure. Peptidoglycan is the scaffold of the cell wall and although its three-dimensional structure is thoroughly studied, the complete structure of this great macro molecule is still not known. Bacterial cell division and cell wall synthesis are tightly regulated and coordinated processes. These processes require precise localization of a variety of proteins.

The Gram positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* forms an ovoid shape by a two-state model with a combination of both peripheral and septal peptidoglycan synthesis. Several penicillin binding proteins (PBPs) participate in the biosynthesis of peptidoglycan. The class A PBPs (PBP1a, PBP2a and PBP1b) are bifunctional proteins that possess both transpeptidase and transglycosylase activities, whereas class B PBPs (PBP2b and PBP2x) are monofunctional transpeptidases. Changes in the PBPs are associated with β -lactam resistance. The dramatic increase in penicillin resistant *S. pneumoniae* causes challenges in the treatment of pneumococcal diseases.

PBP2b and PBP2x are found to be essential proteins in *S. pneumoniae*. Several studies have shown that the simultaneous deletion of both PBP1a and PBP2a cannot be tolerated by the pneumococcus. Through experiments in this work the ComRS system was used to study the interactions between PBP1a and PBP2a. The system was also used to investigate the interactions between the class A and the class B PBPs. Growth experiments combined with studies of cell morphology indicates that PBP1a is the major class A PBP. From the literature we know that PBP1a and PBP2a can substitute for each other. The results from this work, however, showed that PBP2a cannot fully substitute all the functions that PBP1a perform. Results obtained in this work indicate that PBP1a interacts with PBP2x in the septal cell wall synthesis. The results also suggest that PBP1a, together with PBP1b, are co-located with PBP2b in the peripheral cell wall machinery. This work therefore supports the locations of PBP1a, PBP2b and PBP2x presented in the two-state model.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning.....	1
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.1.1 Fylogeni, morfologi og metabolisme	1
1.1.2 Naturlig genetisk transformasjon hos <i>S. pneumoniae</i>	4
1.1.3 Epidemiologi	4
1.1.4 Vaksinerings mot <i>S. pneumoniae</i>	5
1.2 Den bakterielle celleveggen	6
1.2.1 Peptidoglykan.....	8
1.3 Celleveggen til <i>S. pneumoniae</i>	11
1.3.1 Penicillinbindende proteiner hos <i>S. pneumoniae</i>	12
1.3.2 Penicillinresistens hos <i>S. pneumoniae</i>	15
1.4 Studier av essensielle gener.....	17
1.4.1 Utforming av ComRS-systemet for bruk i <i>S. pneumoniae</i>	19
1.5 Oppgavens målsetning	21
2. Materialer	22
2.1 <i>S. pneumoniae</i> stammer og plasmider.....	22
2.2 Peptider.....	24
2.3 Sekvenseringsprimere	24
2.4 Primere	25
2.5 Molekylvektstandarder, enzymer og nukleotider.....	27
2.6 Antibiotika.....	28
2.7 Kit.....	28
2.8 Dataprogrammer.....	28
2.9 Kjemikalier.....	29
2.10 Utstyr.....	30
2.11 Oppskrifter – Dyrkningsmedier, løsninger og buffere	32
2.11.1 Dyrkningsmedier	32
2.11.2 Løsninger til C-medium:	33
2.11.3 Løsninger og buffere	35
2.11.4 Fikseringsløsning for DIK og SEM	36
3. Metoder	37

3.1 Dyrking og oppbevaring av <i>S. pneumoniae</i>	37
3.2 Polymerase Chain Reaction	37
3.2.1 Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase	38
3.2.2 Taq DNA Polymerase	39
3.2.3 Overlap ekstension-PCR	41
3.3 Agarosegelelektroforese	44
3.3.1 Protokoll for agarosegelelektroforese, 1 % gel:	45
3.4 Ekstraksjon av DNA fra gel	46
3.5 Transformasjon av <i>S. pneumoniae</i>	46
3.5.1 Negativ seleksjon ved bruk av Januskassetten	46
3.5.2 Protokoll for transformasjon av <i>S. pneumoniae</i>	49
3.6 DNA-sekvensering:	49
3.6.1 Protokoll for DNA-sekvensering	50
3.7 Depletion av genekspressjon i <i>S. pneumoniae</i>	51
3.7.1 Protokoll for oppsett til depletion av <i>S.pneumoniae</i> :	52
3.7.2 Beregning av doblingstid	52
3.8 Luciferase genreporterassay og vekststudier.....	53
3.8.1 Protokoll for oppsett til luciferase genreporterassay:.....	53
3.9 Lysmikroskopi.....	54
3.9.1 Differensiell interferens kontrast (DIK)-mikroskopi	54
3.10 Elektronmikroskopi.....	55
3.10.1 Skanning-elektronmikroskopi (SEM)	55
4. Resultater.....	57
4.1 Depletion av <i>pbp2a</i> og <i>pbp1a</i>	57
4.1.1 Depletion av <i>pbp2a</i> i en Δ <i>pbp1a</i> -bakgrunn	58
4.1.2 Depletion av <i>pbp1a</i> i en Δ <i>pbp2a</i> -bakgrunn	62
4.1.3 Mikroskopi av <i>pbp1a</i> - og <i>pbp2a</i> - depletionmutantene	66
4.2 Depletion av <i>pbp2b</i> og <i>pbp2x</i>	68
4.2.1 Depletion av <i>pbp2x</i>	68
4.2.2 Mikroskopi av <i>pbp2x</i> -depletionmutanter	72
4.2.3 Depletion av <i>pbp2b</i>	74
4.2.4 Luciferaseaktivitet av <i>pbp2a</i> og <i>pbp1a</i> i dobbelmutantene	77
4.2.5 Mikroskopi av <i>pbp2b</i> -depletionmutanter	77

5. Diskusjon.....	81
5.1 Depletion av <i>pbp2b</i> i Δ <i>pbp1a</i> -bakgrunn	81
5.2 Mikroskopi indikerer at PBP1a samarbeider med PBP2b.	81
5.3 Depletion av <i>pbp2x</i> i Δ <i>pbp1a</i> -bakgrunn	83
5.4 PBP1a har en sentral rolle blant Klasse A PBPer	84
5.5 Delesjon av <i>pbp1a</i> gir lavere veksthastighet ved depletion av <i>pbp2a</i>	84
5.6 PBP1a samarbeider med PBP2b og PBP2x	85
6. Konklusjon og videre arbeid	88
Referanseliste	89
Vedlegg	I

1. Innledning

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae har en historisk viktig plass i forskningen innen genetikk og mikrobiologi. Bakterien ble først isolert av både Georg Sternberg og Louis Pasteur i 1880, og innen en tiårsperiode etter isoleringen var mange av infeksjonene bakterien kan forårsake kartlagt. Forskning på pneumokokker har spilt en viktig rolle for forståelsen av immunologi, og i utviklingen av vaksiner (Austrian 1981). Gjennom sitt arbeid med å utvikle en vaksine mot lungebetennelse oppdaget Frederick Griffith i 1928 genetisk transformasjon hos pneumokokker. Han injiserte levende, avirulente pneumokokker (uten kapsel) sammen med varmedrepte, virulente pneumokokker (med kapsel) inn i mus. Hver for seg forårsaket de ikke sykdom, men mus som ble inokulert med begge typene døde. Fra de døde musene isolerte Griffith virulente pneumokokker med kapsel, og dette funnet tydet på at man kunne transformere fenotyper fra døde til levende organismer (Griffith 1928). Betydningen av Griffiths observasjoner kom ikke til sin rett før Oswald T. Avery og hans medarbeidere fattet interesse for å finne ut hva som var det ”the transforming principle”. I deres arbeid fant de ut at DNA var den informasjonsbærende faktoren i transformasjon hos pneumokokker. Dette var det første beviset på at DNA utgjør det genetiske arvematerialet (Avery *et al.* 1944).

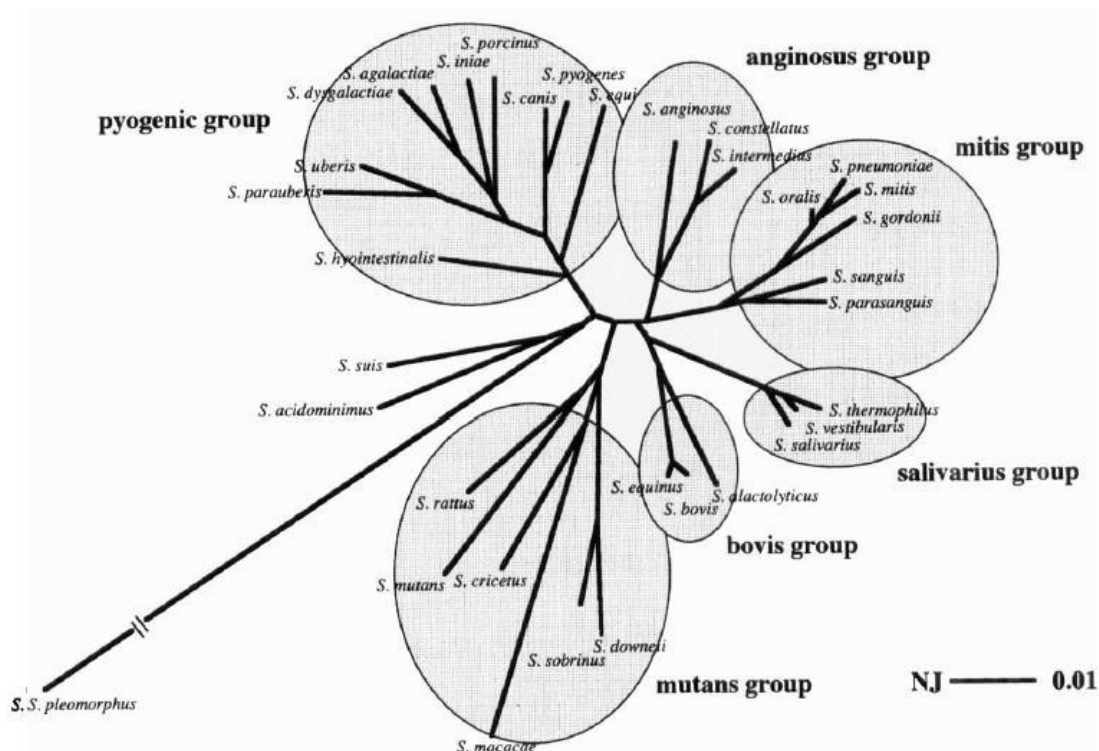
1.1.1 Fylogeni, morfologi og metabolisme

S. pneumoniae blir i *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology* (jf. Garrity *et al.* (2004) plassert blant de lav-G+C (36 – 46 %) Gram positive bakteriene i fylum Firmicutes, slekten *Streptococcus*. For hele taksonomien, se Tabell 1.1

Tabell 1.1 Taksonomisk oversikt over slekten *Streptococcus* (Garrity *et al.* 2004)

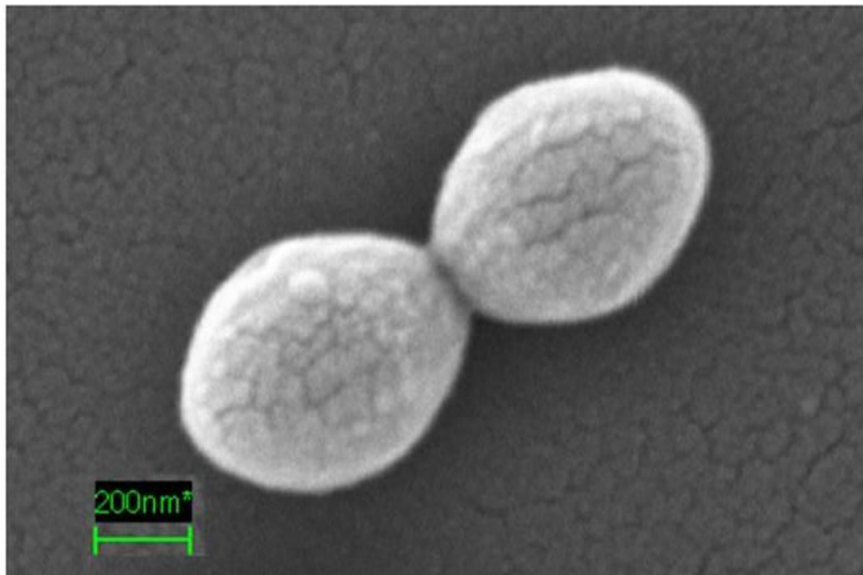
Taxon	Navn
Domene	Bacteria
Fylum	<i>Firmicutes</i>
Klasse	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familie	<i>Streptococcacea</i>
Slekt	<i>Streptococcus</i>

Analyser av 16S rDNA-sekvenser har ført til inndeling av slekten *Streptococcus* i seks fylogenetiske undergrupper; mitis, salivarius, mutans, anginosus, pyogenes og bovis. Figur 1.1 viser den fylogenetiske avstanden mellom 34 ulike streptokokkarter fordelt i de seks undergruppene (Kawamura *et al.* 1995; Kilian 1998). *S. pneumoniae* er plassert i mitisgruppen sammen med *S. mitis*, *S. oralis* og 9 andre arter av streptokokker. De fleste medlemmene av mitisgruppen, inkludert pneumokokkene, er kompetente for naturlig genetisk transformasjon (Kilian *et al.* 2008). Ved naturlig transformasjon blir ekstracellulært DNA aktivt tatt opp av cellen, og integrert i genomet ved homolog rekombinasjon (Claverys *et al.* 2009). Denne egenskapen har trolig vært med på å forme evolusjonen av medlemmene i mitisgruppen i stor grad, og er med på å bidra til og gjøre det vanskeligere å skille mellom de ulike artene i gruppen (Kilian *et al.* 2008).



Figur 1.1 Inndelingen av slekten *Streptococcus* i seks hovedgrupper basert på 16S rDNA analyser. Avstandene er kalkulert etter "neighbour-joining" (NJ)-metoden. *S. pneumoniae* er plassert i mitisgruppen som nå inneholder 12 arter (Kilian *et al.* 2008). Figuren er hentet fra Kawamura *et al.* (1995).

S. pneumoniae er Gram positive, katalase negative, ikke-sporedannende, fakultativt anaerobe bakterier. Cellene er ovoide med form som en rugbyball. Pneumokokker vokser hovedsakelig som diplokokker (Fig. 1.2), men kan også danne kortere kjeder. En av de første karakteristikene som ble brukt til å skille mellom ulike isolater var evnen til hemolyse når den dyrkes på blodagar. Alfahemolytiske streptokokker, som *S. pneumoniae*, produserer hydrogenperoksid som oksiderer hemoglobin til methemoglobin, og det vises som en grønn sone rundt koloniene på en blodagarplate. Pneumokokker er omgitt av en polysakkaridkapsel som i høy grad er assosiert med dens virulens (Kilian 1998). I dette arbeidet har det blitt jobbet med *S. pneumoniae* R6 som ikke har evne til å danne en polysakkaridkapsel og er dermed avirulent.



Figur 1.2 *Streptococcus pneumoniae*. Scanning elektronmikroskop(SEM)-bilde av MTS21, indusert med 0,2 μ M ComS, som ble tatt under dette arbeidet. Bildet viser den typiske diplokokkstrukturen som dominerer hos denne arten.

S. pneumoniae er en fakultativ anaerob bakterie som genererer energi til vekst og celledeling ved fermentering av karbohydrater. Melkesyre (laktat) er hovedendeproduktet ved fermentering (Kilian 1998). *S. pneumoniae* R6 har ikke genene som koder for en fullstendig elektrontransportkjede og heller ikke genene som koder for enzymene i TCA-syklus (Hoskins *et al.* 2001). Pneumokokker krever et sammensatt vekstmedium som i tillegg til karbohydrater må inneholde vitaminer, peptider, salter, pyrimidiner, puriner og aminosyrer (Kilian 1998).

1.1.2 Naturlig genetisk transformasjon hos *S. pneumoniae*

Naturlig genetisk transformasjon er en egenskap hos mange bakterier som gjør at de aktivt kan ta opp nakent, ekstracellulært DNA og inkorporere det i genomet ved homolog rekombinasjon (Claverys *et al.* 2009). For mange bakterier, inkludert *S. pneumoniae*, er det en transient tilstand. Når bakteriene er i denne tilstanden at de kan ta opp DNA, sies bakteriene å være kompetente for naturlig transformasjon (Johnsborg *et al.* 2007). Hos *S. pneumoniae* reguleres kompetansen via et utskilt kompetansestimulerende peptid (CSP) som kodes for av *comC*-genet (Håvarstein *et al.* 1995a). CSP transporteres ut av cellen via ComAB-sekresjonsapparatet som kodes for av *comAB*-operonet (Håvarstein *et al.* 1995b). Den ekstracellulære konsentrasjonen av CSP registreres av et to-komponent regulatorsystem som består av en histidin kinase (ComD) og en respons regulator (ComE). ComD overvåker den eksterne konsentrasjonen av CSP. Når CSP når en kritisk konsentrasjon bindes CSP til ComD og det aktiveres en autofosforylering av kinasen, og fosforylgruppen overføres til ComE. Fosforylert ComE initierer transkripsjon av kompetansegener (*com*-gener) som *comCDE* og *comX* og om lag 20 ulike tidlige kompetasegener. Uttrykk av ComCDE skaper en autokatalytisk loop som forsterker kompetanseuttrykket. ComX er en alternativ sigma faktor som kontrollerer transkripsjon av omtrent 80 sene kompetansegener. Blant disse er det proteiner som står for opptak og rekombinasjon av donor DNA (Johnsborg *et al.* 2007; Johnsborg & Håvarstein 2009b).

Ulike arbeider tyder på at pneumokokker har en mekanisme som gjør at de aktivt kan ta opp homologt DNA fra beslektede arter, denne mekanismen kalles fratricide (brodermord). Kompetente pneumokokker kan lysere beslektede ikke-kompetente celler ved hjelp av en utskilt mureinhydrolase kalt CbpD. CbpD er kodet for av de tidlige kompetasegenene og uttrykkes kun i de kompetente cellene. For å ikke selv lysere av CbpD uttrykker de kompetente pneumokokkene også et immunitetsprotein (kalt ComM) som beskytter mot CbpD (Håvarstein *et al.* 2006; Johnsborg *et al.* 2008).

1.1.3 Epidemiologi

Arter i slekten *Streptococcus* har sitt reservoar hos dyr og mennesker, og lever som kommensale eller patogene organismer i de øvre luftveiene. *S. pneumoniae* er en opportunistisk patogen, men i de fleste tilfeller opptrer den som en forbigående kommensal bakterie som til enhver tid koloniserer de øvre luftveiene og nasofarynks (nesesvelgrommet) hos mennesker (Hoskins *et al.* 2001). I utviklingsland er det estimert at opp til 85 % av små

barn er bærere av pneumokokker, mens i industriland er det beregnet at 27 % av små barn er bærere (WHO 2012). Bakteriell pneumoni (lungebetennelse), bakteriem (sepsis), meningitt (hjernehinnebetennelse), artritt (leddbetennelse) og endokarditt (betennelse i hjerteklaffen) er alvorlige sykdommer som pneumokokker kan forårsake. Mindre alvorlige infeksjoner som mellomørebetennelse (otitis media) og bihulebetennelse (sinusitis) kan også forårsakes av *S. pneumoniae* (Hiller *et al.* 2007; Jędrzejak 2001).

Det er estimert at pneumokokker årlig forårsaker 15 millioner alvorlige sykdomstilfeller og 1 – 2 millioner dødsfall blant barn under fem år verden over (Bogaert *et al.* 2004; Kadioglu *et al.* 2008). De fleste sykdomstilfeller forårsaket av pneumokokker oppstår i utviklingsland der flest dødsfall er i Afrika og Asia (O'Brien *et al.* 2009; van der Poll & Opal 2009; WHO 2012). I tillegg til små barn er eldre og mennesker med nedsatt immunforsvar spesielt utsatt for pneumokokkinfeksjoner (Henriques-Normark & Normark 2010). Virulensfaktorer som polysakkaridkapsel, pneumolysin (Ply), autolysin (deriblant LytA) og IgA1-protease er med på å gjøre *S. pneumoniae* til en viktig humanpatogen (Hoskins *et al.* 2001; Mitchell 2003). Polysakkaridkapselen er regnet som den viktigste virulensfaktoren, og noen av serotypene skaper hyppigere sykdom enn andre. Det er identifisert om lag 90 ulike serotyper av pneumokokker, disse baserer seg på forskjeller i polysakkaridkapselen til isolatene (Hoskins *et al.* 2001; Kilian 1998). Autolysiner er enzymer som degraderer peptidoglykanet i celleveggen til bakterier. Blant dem er LytA som er det mest potente autolysinet hos *S. pneumoniae*, og som er årsaken til den typiske autolysen av *S. pneumoniae* i stasjonærfase (Straume *et al.* 2012). Ved autolyse av pneumokokker frigjøres virulensfaktorer fra celleveggen og cytoplasma. Pneumolysin er en av de viktigste virulensfaktorene i cytoplasma som frigjøres ved autolyse. Pneumolysin har flere egenskaper som gir pneumokokker et fortrinn ved infeksjon, blant annet er det lytisk for vertcellene ved at den angriper kolesterolet i cellemembranen (Jędrzejak 2001; Mitchell 2003; van der Poll & Opal 2009).

1.1.4 Vaksinerings mot *S. pneumoniae*

Polysakkaridkapselen hos *S. pneumoniae* er et mål for vaksinerings mot spesifikke serotypeinfeksjoner. I 2000 kom en vaksine på markedet som beskyttet mot sju serotyper av pneumokokker, sjuvalent-pneumokokkonjugatvaksine (PKV7) (Black *et al.* 2000; Golubchik *et al.* 2012). Selv om vaksinen viste seg å ha en positiv effekt kom det fram nye utfordringer i kjølevannet av vaksinerings; serotypeskift blant pneumokokker kan forekomme ved utveksling av kapselgener under naturlig transformasjon. Dersom pneumokokker med

vaksineserotyper skifter til serotyper som ikke dekkes av vaksinen kan det føre til at pneumokokkene blir ”resistente” ved at immunforsvaret til verten ikke har blitt forberedt på å gjenkjenne dem. Det har blitt rapportert om slike ”vaccine escape recombinants” etter innføringen av PKV7 (Brueggemann *et al.* 2007; Golubchik *et al.* 2012).

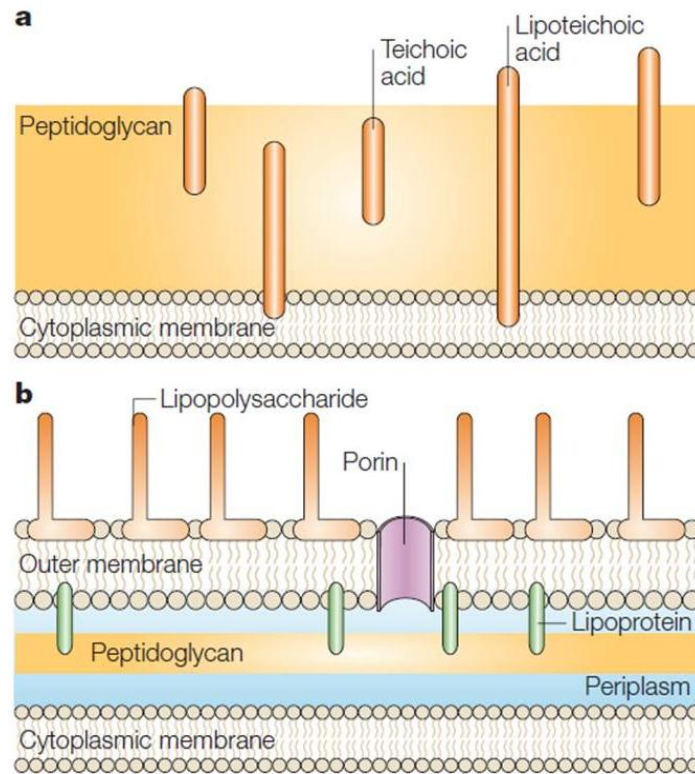
I Norge har konjugert pneumokokkvaksine vært med i barnevaksinasjonsprogrammet siden juli 2006 (Vestrheim *et al.* 2008). En undersøkelse i Norge i perioden 2004/2005 til 2008 (Vestrheim *et al.* 2010) viser at antall pneumokokkinfeksjoner, forårsaket av PKV7-serotypene, hos barn under fem år er redusert med 95 %. Undersøkelsen viser også til en økning i kolonisering av serotyper som ikke dekkes av vaksinen som en (mulig) effekt av vaksineringsen (Vestrheim *et al.* 2010). Dette viser at ”vaccine escape recombinants” også kan være en aktuell problemstilling i Norge, og det har allerede fått oppmerksomhet i media; på Dagbladet sine hjemmesider 22. januar 2012 kunne man lese artikkelen ”Bakterier som lurert vaksiner med genbytte” (Dagbladet 2012) som tar for seg artikkelen til Golubchik *et al.* (2012).

Vaksinering mot pneumokokkinfeksjoner har vist seg å være effektiv forebygging, men ved en infeksjon er bruken av antibiotika den vanligste formen for behandling. På samme måte som at ”vaccine escape recombinants” vanskeliggjør utviklingen av nye vaksiner, gjør spredningen av penicillinresistens blant *S. pneumoniae* det vanskeligere å behandle pneumokokkinfeksjoner (avsnitt 1.3.2). Penicilliner tilhører β -laktam antibiotika som angriper celleveggsyntesen hos *S. pneumoniae* (Denapaite *et al.* 2007). Kunnskap om celleveggs oppbygning, komponenter assosiert med celleveggen og regulering av disse er dermed nødvendig for å få en bedre forståelse for hvordan resistensen oppstår blant pneumokokker og for å finne nye mål for vaksiner og antibiotika.

1.2 Den bakterielle celleveggen

Celleveggen er bakterienes kontaktorgan med omverdenen, og sørger for interaksjon med omgivelsene og en eventuell vert. Celleveggen hos bakterier har to hovedfunksjoner; den sørger for at cellen opprettholder en form som arves gjennom generasjoner, og celleveggen motstår det intracellulære trykket (turgortrykk). Bakterier deles inn i Gram-negative og Gram-positive celler basert på strukturen til celleveggen. Denne klassifiseringen har sitt opphav hos den danske bakteriologen Hans Christian Gram som i 1884 utviklet Gram-fargingsteknikken. Det Gram ikke visste da han utviklet teknikken var at det dreide seg om forskjeller i

celleveggen mellom Gram-negative og Gram-positive celler (Cabeen & Jacobs-Wagner 2005). Figur 1.3 viser hovedforskjellene mellom en Gram-positiv (Fig. 1.3a) og en Gram-negativ (Fig. 1.3b) cellevegg.



Figur 1.3 Gram-positiv og Gram-negativ cellevegg. Forskjellene mellom celleveggen til a) Gram-positive celler og b) Gram-negative celler. Celleveggen til Gram-positive bakterier har et tykt lag med peptidoglykan. To typer teikoinsyrer er bundet til den Gram-positive celleveggen. Lipoteikoinsyrer er kovalent bundet til fosfolipider i cytoplasmamembranen, mens veggteikoinsyrer er kovalent bundet til peptidoglykanen. Gram-negative celler har en ytermembran som omgir et tynt lag med peptidoglykan. Lipoproteiner binder ytermembranen til peptidoglykanlaget. Mellom ytter- og cytoplasmarmembranen ligger periplasma. Gram-positive bakterier har også periplasma som ligger mellom cytoplasmamembranen og celleveggen, men det er mindre enn periplasma hos Gram-negative bakterier. Figuren er hentet fra Cabeen & Jacobs-Wagner (2005)

I en Gram-positiv celle kan turgortrykket være opptil 25 atm (Vollmer *et al.* 2008). Skjelettet i celleveggen består av lange glykankjeder som er bygd opp av vekselvis N-acetylglukosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM). Glykankjedene er kryssbundet med NAM-bundne peptidsidekjeder kalt muropeptider og utgjør til sammen peptidoglykan. Oppbygningen til peptidoglykan forklares nærmere i avsnitt 1.2.1. Strukturen til peptidoglykan er relativt lik hos alle bakterier, mens aminosyresammensetningen til peptidene varierer mellom arter. Gram-

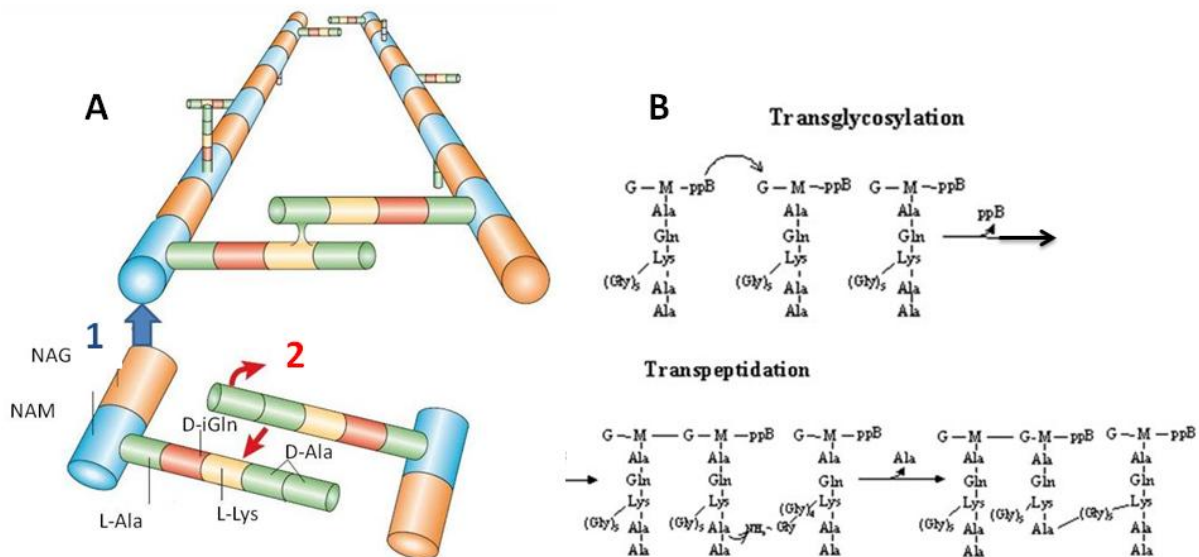
negative bakterier har et tynnere lag med peptidoglykan enn Gram-positive bakterier som har en cellevegg bestående av minst 10 til 20 peptidoglykanlag. I tillegg har Gram-negative bakterier, i motsetning til Gram-positive, en såkalt yttermembran som omslutter og er bundet til peptidoglykanlaget ved hjelp av lipoproteiner. Den Gram-positive celleveggen har teikoinsyrer kovalent bundet til peptidoglykanen, og proteiner som er bundet til celleveggen (Scheffers & Pinho 2005; Vollmer 2007; Vollmer *et al.* 2008).

1.2.1 Peptidoglykan

Peptidoglykan fungerer som et forankringspunkt for en rekke cellekomponenter som for eksempel proteiner og teikoinsyrer. Komponentene spiller viktige roller i mange fysiologiske prosesser som blant annet cellevekst og celledeling, adhesjon til overflater og makromolekyler, opptak av ulike substrater, kommunikasjon med andre celler via quorum sensing, opptak av DNA under transformasjon og adsorpsjon av bakteriofager (Vollmer 2007; Vollmer *et al.* 2008). Sentralt i celleveggen til Gram-positive bakterier er veggteikoinsyrer (WTA; wall teichoic acid) som er kovalent bundet til peptidoglykanen. De fleste Gram-positive celler har i tillegg lipoteikoinsyrer (LTA; lipo teichoic acid). LTA er kovalent bundet til et lipidmolekyl som er integrert i cytoplasmamembranen. Teikoinsyrene har som funksjon å binde overflateproteiner, og er også med på å beskytte cellen mot antimikrobielle lysozymer og peptider. De er blant annet involvert i regulering av celledeling og interaksjon med en eventuell vert (Denapaite *et al.* 2012).

Strukturen til peptidoglykan er kompleks, og selv om peptidoglykan har vært studert i mange år har man enda ikke en full forståelse av dets tredimensjonale struktur og hvordan dette makromolekylet syntetiseres. Man vet imidlertid at syntesen av peptidoglykan deles inn i tre steg; første del av peptidoglykansyntesen foregår i cytoplasma, hvor foreløperne (precursorene) UDP-NAM-pentapeptid og UDP-NAG dannes. Aminosyrene L-Ala, D-iGln, L-Lys og to D-Ala (pentapeptid) adderes til UDP-NAM, eventuelt med Ala-Ala eller Ser-Ala forgreininger. UDP-NAM-pentapeptid overføres til membranbundet baktoprenolfosfat, og danner lipid I. I andre steg av biosyntesen skjer dannelsen av lipid II hvor UDP-NAG adderes til lipid I. Lipid II transporteres over cytoplasmamembranen ved ukjent mekanisme (Esko *et al.* 2009). En oversikt over trinnene i biosyntesen er vist i Vedlegg A. Disse første to stegene involverer flere enzymer og reaksjoner, men detaljene blir ikke beskrevet nærmere her. Det tredje steget består av to reaksjoner som katalyseres av penicillinbindende proteiner som er hovedfokus i denne oppgaven (jf. 1.3.1). Den første reaksjonen er transglykosylering hvor

glykankjeden polymeriseres. Den andre reaksjonen er transpeptidering hvor glykankjedene kryssbindes med pentapeptider (Cabeen & Jacobs-Wagner 2005; Scheffers & Pinho 2005; Vollmer 2007). Figur 1.4 viser en forenklet molekylfigur av transglykosylering og transpeptidering i *S. pneumoniae*. Ved transglykosylering forlenges lipid II ved syntetisering av glykankjeder der NAM og NAG bindes sammen med β -1,4-glykosidbindinger. Ved transpeptideringen skjer det en kryssbinding mellom pentapeptidene i glykankjedene. Penicillinbindende protein 3 (PBP3) kløyver D-Ala-D-Ala bindingen på enden til et "donorpeptid". Den terminale D-Ala spaltes av og det dannes en kryssbinding til et annet, nærliggende "akseptorpeptid" (Cabeen & Jacobs-Wagner 2005; Scheffers & Pinho 2005; Vollmer 2007).



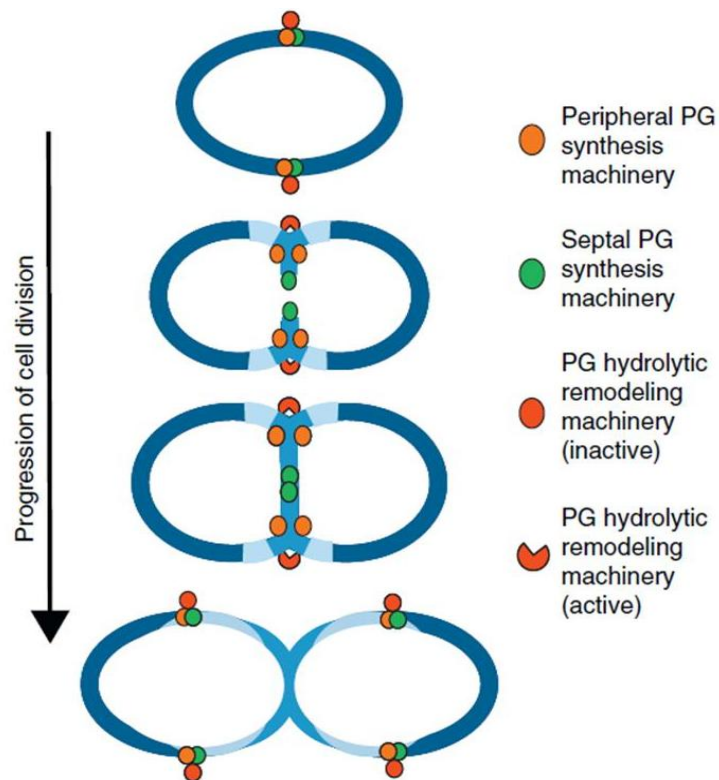
Figur 1.4 Transglykosylering og transpeptidering av peptidoglykan. (A.1) Transglykosylering av glykankjedene med repeterende enheter av NAM(blå) og NAG(orange). **(A.2)** Transpeptidering mellom pentapeptider. Pentapeptidene er bundet til NAM på glykankjeden. Pentapeptidene har ulik oppbygning i forskjellige arter, her er de illustrert med sammensetningen i *S. pneumoniae*. Figuren er modifisert etter Cabeen & Jacobs-Wagner (2005). **(B)** Molekylfigur av transglykosylering og transpeptidering. M indikerer NAM, og G indikerer NAG. Figuren er hentet fra Scheffers & Pinho (2005)

Mekanismen og lokaliseringen av maskineriet som deltar i syntesen av ny cellevegg varierer mellom bakterier med forskjellig morfologi. For stavformede bakterier som for eksempel *Escherichia coli* og *Bacillus subtilis*, skjer celleveggsyntesen ved elongering (forlengelse) av celleveggen samt ved dannelse av et septum. Mutasjoner som fører til at stavene får en deformert morfologi er assosiert med proteiner som har en rolle i perifer celleveggsyntese.

For eksempel har mutasjoner i RodA ført til at *B. subtilis* får en kokkoid form, og mutasjoner i PBPene har vist seg å føre til kokkoide *E. coli* og *B. subtilis*. Det aktinlignende proteinet MreB er fraværende hos kokkoide og ovoide bakterier, men hos staver danner MreB spiralformede strukturer i lengderetningen til cellen. Trolig organiserer MreB de øvrige Mre-proteinene (MreC og MreD) som videre rekrutterer proteiner som katalyserer elongeringen hos staver (Scheffers & Pinho 2005).

FtsZ finnes hos både staver og kokkoide bakterier. FtsZ-polymerer danner en ringformasjon (Z-ring) ved divisjonsstedet og rekrutterer proteiner som er involvert i celledelingen. For kokkoide celler som *Staphylococcus aureus* er septal celleveggsyntese trolig eneste mekanisme for cellevekst og -deling (Cabeen & Jacobs-Wagner 2005; Scheffers & Pinho 2005). Hos ovoide bakterier som streptokokker og enterokokker foregår celleveggsyntesen som en kombinasjon av perifer og septal syntese i cellens ekvatoriale område. Den perifere syntesen foregår i lengderetningen til cellen, mens den septale syntesen danner cellevegg loddrett til cellens akse (Zapun *et al.* 2008).

Det er foreslått at det er to ulike celleveggmaskinerier som står for den perifere og den septale syntetiseringen. De to celleveggsyntesemaskineriene lokaliseres ved ekvatorialplanet til cellen. Celleveggsyntesemaskineriet for perifer syntese starter med å forlenge celleveggen mellom det som blir det nye ekvatorialplanet og septum til cellen. Samtidig splittes den nysyntetiserte celleveggen, og det septale maskineriet bygger en perpendikulær cellevegg i septum (Sham *et al.* 2012). Penicillinbindende proteiner sine sentrale roller i syntesen av peptidoglykan (se over) gjør at de trolig er viktige komponenter i de perifere og septale celleveggsyntesemaskineriene, men sammensetningen av disse maskineriene er ikke klarlagt. Det er heller ikke klart om de to celleveggsyntesemaskineriene opererer som to forskjellige komplekser, eller om de danner ett stort syntesekompleks. Hos stavformede bakterier har studier vist at enkelte komponenter bytter mellom septal syntese og elongering av celleveggen. Dette tyder på at tomaskineri-modellen hos ovoide celler også kan være svært forenklet, og at sammensetningen av celleveggsyntesemaskineriene er mer kompleks (Sham *et al.* 2012; Zapun *et al.* 2008). Figur 1.5 viser i korte trekk den såkalte tomaskineri-modellen for celleveggsyntesen i *S. pneumoniae*.



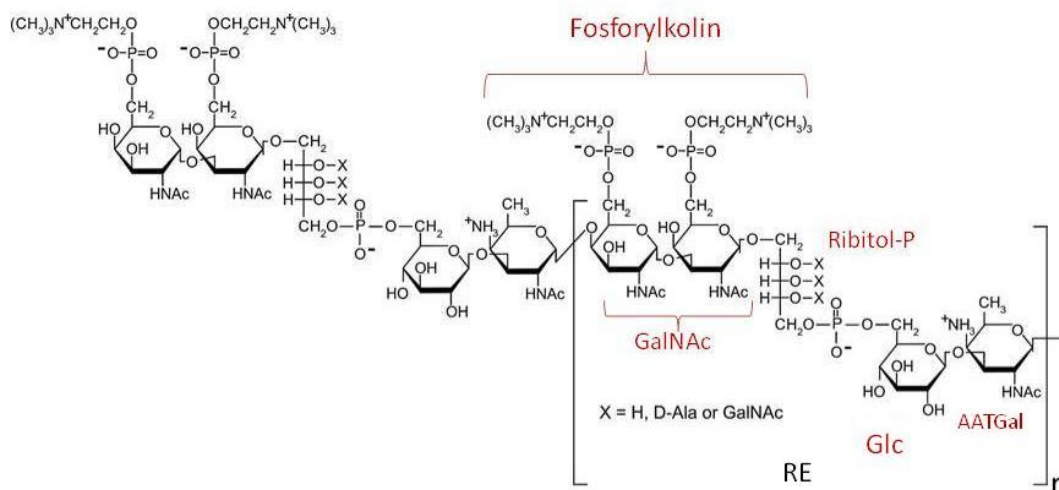
Figur 1.5 Celledeling og biosyntese av peptidoglykan hos *S. pneumoniae*. To maskinerier er foreslått å utføre septal og perifer syntese av peptidoglykan. Begge maskineriene samler seg ved det ekvatoriale planet til cellen. De orange prikkene illustrerer maskineriet til den perifere syntesen (lys blå cellevegg), og de grønne prikkene viser det septale maskineriet. Det septale syntesemaskineriet vil etter hvert dele cellen i to. De røde prikkene med hakk viser peptidoglykan hydrolaser. I figuren er celleveggsyntesemaskineriene plassert på ulike steder, men de ulike komponentene i maskineriet og deres lokalisering er ikke klarlagt. Figuren er hentet fra Sham *et al.* (2012)

1.3 Celleveggen til *S. pneumoniae*

Pneumokokker har en typisk Gram positiv cellevegg bestående av mange lag glykankjeder kryssbundet med muropeptider. Lineære peptider syntetiseres som pentapeptider (L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala) og er kovalent bundet til NAM (Fig. 1.4) Disse peptidene kryssbinder med nærliggende peptider (avsnitt 1.2.1). Noen peptider er forgrenede og inneholder L-Ser-L-Ala eller L-Ala-L-Ala som er bundet til L-Lys i tredje posisjon på peptidet. Sammen med peptidoglykan utgjør WTA en stor del av celleveggen, opp til hele 50 % av tørrvekta til celleveggen. Pneumokokker har også lipoteikoin syrre (LTA) som er bundet til cytoplasmamembranen, men disse står bare for omtrent 10 % av teikoin syrene (Bui *et al.* 2012; Vollmer 2007).

WTA og LTA i *S. pneumoniae* skiller seg fra andre Gram positive bakterier på flere områder. Hos de fleste arter er det forskjeller mellom strukturen til WTA og LTA, men hos

pneumokokkene har de identisk kjemisk struktur (Fischer 1997). Den repeterende enheten til teikoinisyrene i *S. pneumoniae* er også mer kompleks enn hos andre arter. Figur 1.6 viser strukturen av den repeterende enheten hos WTA og LTA. Den består av glukose (Glc), et sjeldent aminosukker 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose (AATGal), Ribitol-5-fosfat (Rib-5-P/Rib-P), og to enheter av aminosukkeret N-Acetyl-galactosamine (GalNAc) som begge har fosforylkolin bundet til seg via en esterbinding. Kolin er en aminoalkohol som er veldig uvanlig hos bakterier (Bui *et al.* 2012; Denapaite *et al.* 2012; Vollmer 2007). Kolin er bundet til teikoinisyrene hos pneumokokker, og *S. pneumoniae* er den eneste arten man vet hvor kolin er en essensiell vekstfaktor (Tomasz 1967).



Figur 1.6 Strukturen av den repeterende enheten (RE) teikoinisyrene hos *S. pneumoniae*. Strukturen av WTA og LTA er identisk. RE består av glucose (Glc), aminosukkeret 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose (AATGal), Ribitol-P og to N-Acetylgalactosamin (GalNAc) som begge har fosforylkolin bundet til seg via esterbinding. $n=2-8$ repeterende enheter. Figuren er modifisert etter Denapaite *et al.* (2012).

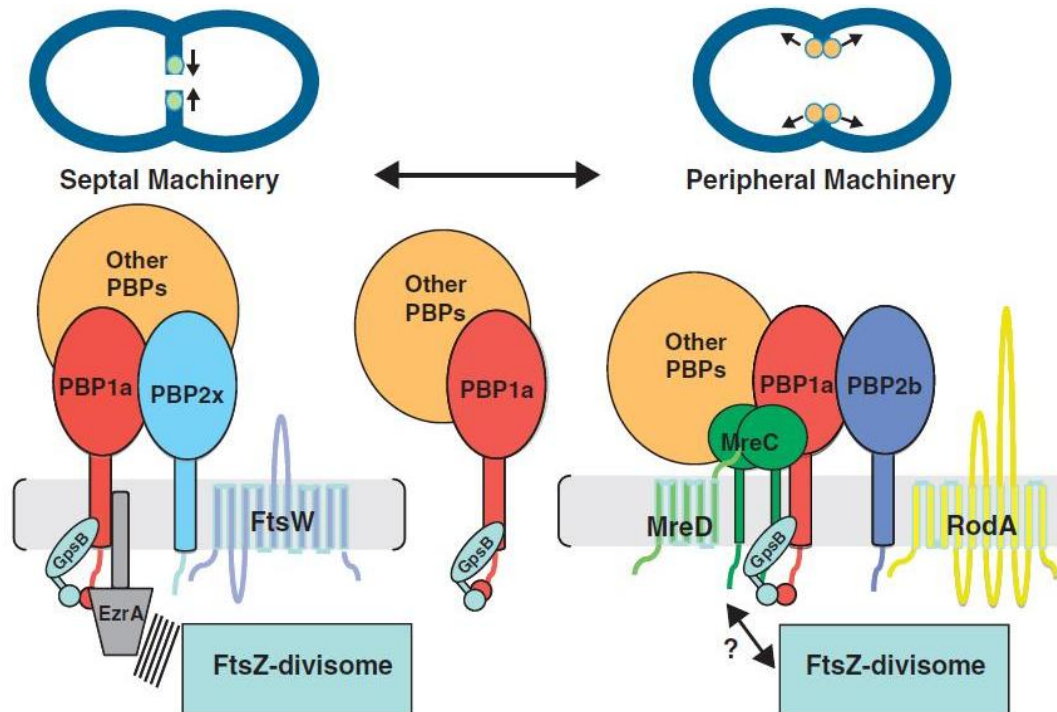
1.3.1 Penicillinbindende proteiner hos *S. pneumoniae*

Penicillinbindende proteiner (PBPer) har fått navn etter deres evne til å binde penicillin, og er proteiner som finnes i de fleste bakterier med cellevegg. PBPer har sentrale roller innen syntesen av peptidoglykan (avsnitt 1.2.1). DNA-sekvensering har vist at forskjellige bakteriearter innehar ulikt antall PBPer. Mellom ulike bakterier kan PBPer variere i for eksempel størrelse og affinitet for β -laktam antibiotika.

S. pneumoniae har seks PBPer; PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b, PBP2x og PBP3 (Hakenbeck *et al.* 1986). PBPer kan klassifiseres som høy-molekylmasse (HMM) og lav-molekylmasse (LMM) PBPer. PBP3 er et LMM-protein som fungerer som en D,D-carboxypeptidase. De fem øvrige PBPer er HMM-proteiner. HMM-PBPer har en hydrofob N-terminal ende som binder proteinene til cytoplasmamembranen, og basert på denne strukturen deles HMM-proteinene inn i klasse A og klasse B PBPer (Denapaité *et al.* 2007; Sauvage *et al.* 2008). PBP1a, 1b og 2a hører til klasse A, og PBP2b og 2x tilhører klasse B (Hoskins *et al.* 1999). Den N-terminale enden av klasse A PBPer har transglykosylaseaktivitet som polymeriserer glykankjedene, mens for klasse B er funksjonen til den N-terminale enden uklar. Både klasse A og klasse B PBPer har transpeptidaseaktivitet (Scheffers & Pinho 2005). Begge klasse B PBPer er essensielle for opprettholdelsen av livsfunksjoner hos *S. pneumoniae*, og dersom genene *pbp2b* eller *pbp2x* fjernes får det letalt utfall for bakterien (Kell *et al.* 1993). Individuelt kan genene som koder for klasse A PBPer, *pbp1a*, *pbp1b* og *pbp2a*, fjernes fra genomet uten at bakterien dør. Dette tyder på at ingen av klasse A-PBPer er essensielle. Dobbelmutanter av *pbp1a* og *pbp1b* ($\Delta pbp1a \Delta pbp1b$), og *pbp2a* og *pbp1b* ($\Delta pbp2a \Delta pbp1b$) er mulig, men dobbelmutant av *pbp1a* og *pbp2a* ($\Delta pbp1a \Delta pbp2a$) gir letalt utfall (Hoskins *et al.* 1999; Paik *et al.* 1999). *S. pneumoniae* kan altså klare seg uten enten *pbp1a* eller *pbp2a*, noe som kan tyde på at de har overlappende aktivitet og kan vikariere for hverandres funksjoner. Man vet ikke årsaken til at ($\Delta pbp1a \Delta pbp2a$)-dobbelmutanter ikke er levedyktige, og dette viser at det gjenstår mye arbeid for å avdekke alle mekanismene til PBPer i *S. pneumoniae*.

Som nevnt i avsnitt 1.2.1 har PBPer sentrale roller i celleveggsyntesen hos *S. pneumoniae*, men alle komponentene i celleveggsyntesemaskineriet i den perifere og den septale syntesen er ikke kjent. Basert på kunnskap om celleveggsyntesen hos stavformede bakterier har ulike studier kommet fram til noen komponenter som trolig har en plass i celleveggsyntesemaskineriet hos *S. pneumoniae*. Blant komponentene som er foreslått å være en del av det septale maskineriet til pneumokokker (Fig. 1.7) er PBP1a og PBP2x, og blant komponentene i det perifere celleveggsyntesemaskineriet er PBP1a og PBP2b (Sham *et al.* 2012; Zapun *et al.* 2008). Lokaliseringeksperimenter utført med immunofluorescensmikroskopi av pneumokokker i vekst tyder på at PBP1a og PBP2x er lokalisert i septum og at PBP2b og PBP2a er lokalisert til den perifere syntesen. Resultatene indikerte også at PBP1b kan høre til både den septale og den perifere syntesen (Morlot *et al.* 2003). Land & Winkler (2011) sitt arbeid med MreCD og PBP1a ga en indikasjon på at disse proteinene er en del av

den perifere syntesen av celleveggen hos pneumokokker (Land & Winkler 2011). Det kan tyde på at PBP1a kan høre til både den septale og den perifere celleveggsyntesen.



Figur 1.7 Modell for det septale og det perifere celleveggsyntesemaskineriet. Oversikt over komponentene som er foreslått å være en del av det septale maskineriet (til venstre) og det perifere maskineriet (til høyre). Basert på forskning gjort på celleveggsyntesemaskineriet hos stavformede bakterier er det foreslått at PBP2x, FtsW, EzrA hører til det septale maskineriet, og at PBP2b, MreD, RodA og MreC hører til det perifere maskineriet. PBP1a og GpsB er foreslått å høre til begge celleveggsyntesemaskineriene. RodA, MreC og MreD er proteiner som er med på å opprettholde formen til stavformede bakterier. FtsW og FtsZ er proteiner som er involvert i celledelingen hos *S. pneumoniae*, og EzrA er et protein som er med på regulering av septal ringformasjon (NCBI 2012). Figuren er hentet fra Sham *et al.* (2012).

En studie gjort med *Lactococcus lactis* (laktokokker) (Perez-Nunez *et al.* 2011) har vist at inhibering av PBP2x med β -laktamantibiotikumet methicillin førte til filamentering av cellene. De viste også at methicillinresistente laktokokker hadde mutasjoner i PBP2x som forhindret filamentering. Begge disse resultatene tyder på at PBP2x hører til i det septale celleveggsyntesemaskineriet hos laktokokker. I samme arbeid undersøkte de PBP2b sin rolle i celleveggsyntesen til laktokokker. *Pbp2b* mutanter dannet runde celler som indikerte at PBP2b hører til i den perifere syntesen hos laktokokker (Perez-Nunez *et al.* 2011). Siden PBP2x og PBP2b hos laktokokker og PBP2x og PBP2b hos pneumokokker er homologe, så tyder resultatene på at disse har samme rolle hos *S. pneumoniae* (Sham *et al.* 2012).

Selv om kunnskap om PBPers rolle i celleveggsyntesen hos andre bakterier kan være nyttig for arbeidet med å forstå celleveggsyntesemaskineriet i *S. pneumoniae* har ikke alle komponentene homologer i pneumokokker. Selv mellom artene i slekten *Streptococcus* finnes det forskjeller i celleveggsyntesemaskineriet. En økt forståelse av maskineriene, og komponentene de består av, er en viktig brikke i forskning på nye målområder for antibiotika (Sham *et al.* 2012). Økt forståelse er spesielt viktig også med tanke på spredningen av penicillinresistens blant pneumokokker.

I kliniske isolater er det endringer i PBP1a, PBP2b og PBP2x som oftest fører til resistens mot penicillin og andre β -laktamantibiotika. Mutasjoner i bindingssetene til PBPene påvirker affiniteten til β -laktamantibiotika, og gjør at det trengs en høyere konsentrasjon av antibiotikumet for å hemme deres aktivitet (Denapaite *et al.* 2007; Hakenbeck 1999). Mutasjoner i bindingssettet er ikke den eneste måten *S. pneumoniae* kan erverve resistens på; ved naturlig transformasjon kan pneumokokker ta opp *pbp*-gener som stammer fra nært beslektede arter innen slekten *Streptococcus* (avsnitt 1.1.2). Sekvensering av penicillinresistente *S. pneumoniae*-isolater viser *pbp*-gener med ulike, sammensatte mosaikkstrukturer, som er forskjellig fra villtypens sekvenser. Mosaikkstrukturer stammer fra uavhengige rekombinasjoner av ulike alleler innenfor samme art eller mellom beslektede arter. Penicillinresistens hos pneumokokker kan stamme fra kommensale *S. mitis* og *S. oralis* som etter langvarig eksponering for β -laktamantibiotika har utviklet punktmutasjoner i *pbp*-genene som gjør at PBPene har mindre affinitet for disse antibiotikaene. Genene har blitt tatt opp av *S. pneumoniae* med naturlig transformasjon og homolog rekombinasjon (Chi *et al.* 2007; Johnsborg & Håvarstein 2009b). Hos *S. pneumoniae*-stammer har man funnet mosaikkblokker med resistente *pbp2x* og *pbp2b* som stammer fra *S. mitis*- og *S. oralis*-stammer (Chi *et al.* 2007; Dowson *et al.* 1993; Sibold *et al.* 1994).

1.3.2 Penicillinresistens hos *S. pneumoniae*

På samme måte som Griffiths oppdagelse av naturlig transformasjon (Griffith 1928) var viktig for forskningen på *S. pneumoniae*, skulle Alexander Flemings oppdagelse av penicillin (Fleming 1929) vise seg å være svært viktig for bekjempelsen av pneumokokkinfeksjoner. På 1940-tallet ble penicillin introdusert på markedet, og siden da har man behandlet pneumokokkinfeksjoner med antibiotika. Utvikling av resistens mot antibiotika har vanskeliggjort behandlingen (Henriques-Normark 2007). På slutten av 1960-tallet kom de

første rapportene om penicillinresistente pneumokokker fra USA, Australia og Papa New Guinea. Etter dette har rapportene om penicillinresistente pneumokokker kommet fra hele verden. Bruken av penicillin har en klar sammenheng med utviklingen og spredningen av penicillinresistens. I Europa er det Ungarn og Spania som har størst utbredelse av resistente pneumokokker (Dowson *et al.* 1997; Hakenbeck 1999), mens i Norge er forekomsten lav. Undersøkelser har vist at blant pneumokokkisolater fra Norge er det 2 – 3 % som har nedsatt følsomhet for penicillin, og av disse var det kun enkeltisolater som viste penicillinresistens (Simonsen 2009). En undersøkelse fra 2001 viste at Norge, sammen med Danmark, er de landene som er mest restriktive med å skrive ut antibiotika i forhold til resten av Norden (Bergan 2001). Men i desember 2011 kunne man lese i flere norske aviser om en undersøkelse som viste at travle leger oftere foreskrev antibiotika til pasienter med akutte luftveisinfeksjoner. Undersøkelsen påpeker at bruken av antibiotika i Norge økte med 50 % i perioden 1974-2007. Selv om det fortsatt er lavere sammenlignet med andre europeiske land, så er det viktig å ta sine forhåndsregler med tanke på utviklingen av resistens mot penicilliner og andre typer antibiotika (Gjelstad *et al.* 2011).

Som nevnt i avsnitt 1.1.4 har undersøkelser vist at *S. pneumoniae* kan ta opp kapselgener og skifte serotype ved naturlig transformasjon (Brueggemann *et al.* 2007; Golubchik *et al.* 2012). Penicillinresistens hos pneumokokker er forbundet med endringer i de penicillinbindende proteinene (avsnitt 1.3.1). Siden genene *pbp1a* og *pbp2x*, som koder for PBP1a og PBP2x, flankerer kapsellocuset til *S. pneumoniae*, er det vist at pneumokokker kan erverve både β -laktamresistens og samtidig skifte serotype i én og samme transformasjon. Seleksjon for penicillinresistens kan dermed også føre til kapselbytte (Trzcinski *et al.* 2004). Naturlig transformasjon og fratricide (avsnitt 1.1.2) er mekanismer som er med på å gi *S. pneumoniae* tilgang til et ”supragenom” med gener fra andre pneumokokker og beslektede arter. Dette supragenomet består av flere gener enn genomet til én enkelt celle, og er med på å skape stammer med en høy diversitet i genomet. *S. pneumoniae* sin evne til tilpassning, ved blant annet å endre serotype og erverve penicillinresistens, gjør pneumokokkene til allsidige og tilpasningsdyktige patogene organismer. Dette gjør behandlingen av pneumokokkinfeksjoner betydelig vanskeligere, og pneumokokkene utvikler seg raskere enn immunforsvaret vårt klarer å tilpasse seg forandringene (Hiller *et al.* 2007).

Siden PBPene i *S. pneumoniae* innehar sentrale roller i celleveggsyntesen, og for utvikling og spredning av β -laktamresistens er forskning på PBPene veldig viktig med hensyn på

bekjempelsen av pneumokokkinfeksjoner, samt for utviklingen av nye mål for antibiotika, og utvikling av nye vaksiner.

1.4 Studier av essensielle gener

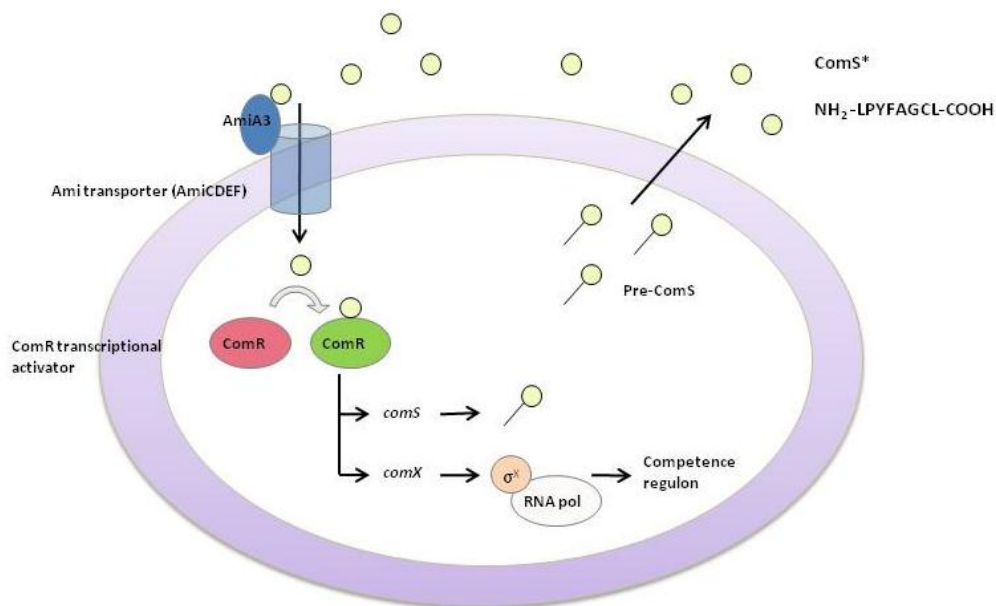
Essensielle gener er gener som er helt nødvendig for å opprettholde en normal cellefunksjon. Å studere funksjonen til essensielle gener er utfordrende og mange ganger umulig siden man ikke kan fjerne genet eller skru av dets ekspresjon uten at organismen dør. En studie utført av Song *et al.* (2005) har vist at *S. pneumoniae* R6 har minst 133 essensielle gener, og 32 av disse genene har ukjent funksjon (Song *et al.* 2005). Blant de identifiserte essensielle genene er de penicillinbindende proteinene *pbp2b* og *pbp2x* (Kell *et al.* 1993) som tidligere omtalt (avsnitt 1.3.1). På grunn av spredningen av resistens mot antibiotika hos pneumokokker er det viktig å studere funksjonen til de penicillinbindende proteinene for og utforske nye mål for antibiotika (Adam 2002; Song *et al.* 2005; Thanassi *et al.* 2002). Da essensielle gener ikke kan fjernes fra organismen kan regulering av deres uttrykk gi nyttig informasjon om funksjonen. Dette kan gjøres ved å benytte en titrerbar promotor (Berg *et al.* 2011).

Det har blitt utviklet ulike systemer som benytter seg av regulerbare promotorer for å studere essensielle gener hos *S. pneumoniae*. Heterologe promotorsystemer som reguleres av henholdsvis nisin og tetracyclin er eksempler på dette. Disse har vist seg å ikke være optimale systemer, da det basale nivået av genuttrykket er høyt og promotorene har smal titrerbar rekkevidde (Apfel *et al.* 1999; Eichenbaum *et al.* 1998). Andre systemer baserer seg på en sukkerregulert promotor. Et eksempel er å bruke en fukoseregulert promotor, P_{fcsk} , for å regulere transkripsjonen av essensielle gener. Chang *et al.* (2003) har i arbeidet sitt konstruert en genkassett bestående av tre elementer: (i) P_{fcsk} , (ii) en markør for antibiotikaresistens og (iii) flankerende regioner til ønsket gen. Kassetten ble introdusert oppstrøms for målgenet ved homolog rekombinasjon, slik at transkripsjonen av genet reguleres ved tilsetning av fukose til vekstmediet. Ulempen ved dette systemet er at gener i samme operon kan bli uønsket aktivert. Det er heller ikke kjent om fukose har noen innvirkning på metabolismen til *S. pneumoniae* selv om alle pneumokokker som er testet hittil ikke har vært i stand til å vokse med fukose som eneste karbon- og energikilde (Chan *et al.* 2003).

Et annet depletionsystem som blir benyttet for regulering av gener er Zn^{2+} -systemet, brukt av blant annet Kuipers sin gruppe ved Universitetet i Gröningen, Nederland (Kloosterman *et al.* 2007; Kloosterman *et al.* 2008). Zn^{2+} -systemet har også tidligere blitt brukt med hell på

laboratoriet vårt, blant annet i eksperimenter for å utrede LyR sin rolle i celledeling hos pneumokokker (Johnsborg & Håvarstein 2009a). I dette systemet benyttes en promotor som indueres av Zn^{2+} (P_{czcD}). En DNA-kassett med ønsket gen og en markør for antibiotikaresistens settes inn nedstrøms for P_{czcD} -promotoren. Ved å tilsette Zn^{2+} til mediet for å drive P_{czcD} og ektopisk uttrykke det ønskede genet, kan man fjerne det native genet fra genomet. Ved å redusere Zn^{2+} i vekstmediet reduseres transkripsjonen fra P_{czcD} og uttrykket av det ektopiske genet minker. Uttrykking av uønskede gener kan forekomme siden Zn^{2+} spiller en viktig rolle i pneumokokker sin fysiologi, og andre genprodukter kan potensielt bli påvirket av Zn^{2+} i vekstmediet (Eberhardt *et al.* 2009; Kloosterman *et al.* 2007).

Berg *et al.* (2011) har utviklet et annet gen-depletionsystem som gjør det mulig å studere essensielle gener i *S. pneumoniae*. Dette systemet er basert på ComRS-systemet som regulerer kompetanse for naturlig genetisk transformasjon i *Streptococcus thermophilus*. Systemet består av en transkripsjonsregulator (ComR), et induserpeptid (ComS*) og en ComR-induserbar promotor (P_{comX}) (Fontaine *et al.* 2010). En skematisk framstilling av systemet er vist i Figur 1.8.



Figur 1.8 Regulering av kompetanse hos *Streptococcus thermophilus*. En Ami-transporter tar opp ComS* og frakter det inn i cytoplasma. I cytoplasma binder ComS* til ComR. ComR aktiveres og binder seg til "invert repeats" sekvenser på DNA (ECom-boks) som ligger i $comX$ -promotoren. Transkripsjonen av genene som ligger nedstrøms for P_{comX} aktiveres. Figuren er lånt fra Kari Helene Berg.

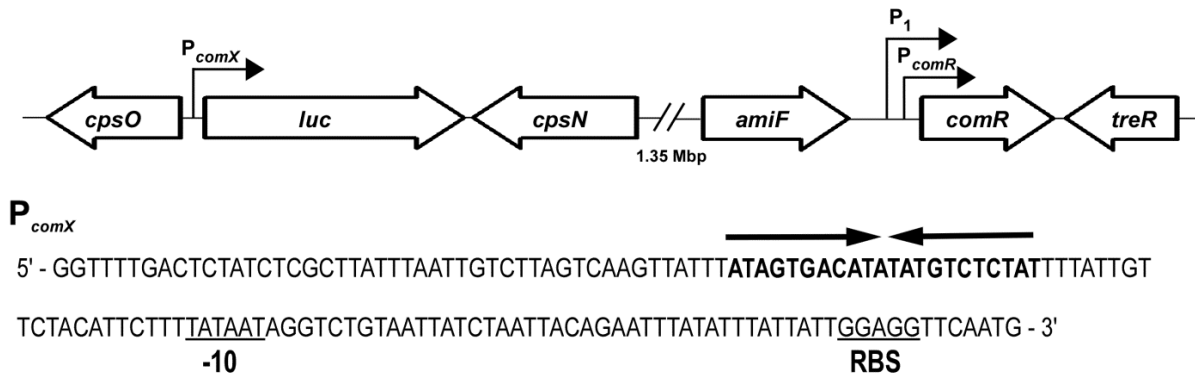
I *S. thermophilus* blir ComS* tatt opp i cytoplasma via en Ami-transporter. I cytoplasma vil ComS* binde til ComR som da gjennomgår en konformasjonsendring og aktiveres. Aktivert

ComR vil binde til to ”inverted repeats” sekvenser på DNA (ECom-boks) som ligger i *comX*-promotoren og aktivere transkripsjon av genet (*comX*) nedstrøms for P_{comX} (Fontaine *et al.* 2010). Dette systemet er ikke beslektet med ComCDE-systemet som regulerer kompetanse hos pneumokokker, og ingen av komponentene i ComRS-systemet har naturlige homologer i *S. pneumoniae*. Anvendelse av ComRS-systemet vil derfor ikke påvirke den naturlige fysiologien til *S. pneumoniae*. Dette gjør systemet godt egnet til å regulere uttrykket av gener i *S. pneumoniae* uten at det har store innvirkninger på cellens øvrige funksjoner. For å studere essensielle gener ved hjelp av ComRS-systemet blir først en rekombinant versjon av genet satt inn bak den induserbare promotoren P_{comX} , deretter kan det native genet fjernes. Så lenge induserpeptidet ComS* er til stede i mediet vil cellene overleve. Men ved å redusere eller øke konsentrasjonen av ComS* i mediet vil transkripsjonen av det essensielle genet endres, og dette kan gi informasjon om dets biologiske funksjon.

1.4.1 Utforming av ComRS-systemet for bruk i *S. pneumoniae*.

I arbeidet til Berg *et al.* (2011) ble gener fra ComRS-systemet i *S. thermophilus* klonet inn på nøytrale områder i genomet til *S. pneumoniae*. Laboratoriestammen *S. pneumoniae* R6 har ufullstendig kapselsyntese, og innsetting av andre gener i kapsellocuset skal ikke gi noen biologiske virkninger på bakterien. I locuset mellom de såkalte kapselgenene (capsular polysaccharide, cps) *cpsN* og *cpsO* ble genet som koder for luciferase enzymet (*luc*) klonet inn rett nedstrøms for *comX*-promotoren ($P_{comX}::luc$). *comR* med sin native promotor (P_{comR}) ble satt inn Ami-locuset (Fig. 1.9). Ami-locuset er et nøytralt område i genomet fordi det inneholder en degenerert transposase (spr1701). *S. pneumoniae* har egne native oligopeptidpermeaser som mest sannsynlig er i stand til å ta opp ComS* fra omgivelsene og transportere det over membranen. *S. thermophilus* sitt opptakssystem for ComS* ble derfor ikke satt inn i genomet til *S. pneumoniae*. Ved tilsetning av ComS* vil ComR aktivere transkripsjonen av genet bak P_{comX} , i dette tilfellet *luc*. Innledende eksperimenter viste at induksjon med ComS* ga lav uttrykking av *luc*-genet, noe som tydet på at P_{comR} ikke fungerer optimalt i *S. pneumoniae*. Man mistenkte lav ekspresjon av ComR som den begrensende faktor for *luc*-ekspresjonen. Det ble derfor satt inn en syntetisk, konstitutiv promotor, P_1 (Johnsborg & Håvarstein 2009a), oppstrøms for P_{comR} for å øke transkripsjonen av *comR*. Den ekstra produksjonen av ComR resulterte i en markant økning av *luc*-transkripsjon. Videre studier viste at økende konsentrasjoner av tilsatt ComS* ga økende luciferaseaktivitet, og at ved fjerning av ComS* fra mediet sank lysintensiteten gradvis etter omtrent én time (Berg *et*

al. 2011). Dette viste at systemet var titrerbart avhengig av mengde ComS* og kunne fungere som et gen-depletion system.



Figur 1.9. Skjematisk oversikt av ComRS-systemet i kapsellocuset til *S. pneumoniae*. Her vises konstruktene P_{comX}::*luc*, og P₁::P_{comR}::*comR*. Sekvensen til ECom boksen og P_{comX}-promotoren er vist nederst, indikert med piler. P_{comR} er den native ComR promotoren, og P₁ er en syntetisk konsitutiv promotor som ble satt inn for å øke transkripsjonen av *comR*. Figuren er hentet fra Berg *et al.* (2011)

Berg *et al.* (2011) demonstrerte at ComRS-systemet egnet seg til depletion av essensielle gener ved å konstruere en dobbel knockout av *licD1* og *licD2*. *licD1* og *licD2* er involvert i teikoinesyntesen, og *S. pneumoniae* kan ikke vokse uten teikoinesyre i celleveggen (Zhang *et al.* 1999). En $\Delta licD2$ mutant er levedyktig, men dobbelknockout av både *licD1* og *licD2* ($\Delta licD1 \Delta licD2$) i *S. pneumoniae* gir letalt utfall. Ved å uttrykke *licD1* ektopisk fra P_{comX} ved tilsetning av ComS* til vekstmediet var det mulig å fjerne begge de native genene. Ved å variere konsentrasjonen av ComS* i vekstmediet fant man ut hvilken konsentrasjon av ComS* som gav tilnærmet normal veksthastighet og morfologi i forhold til villtypen. Etter fjerning av ComS* fra mediet tok det fire til fem timer før det gjorde utslag på veksthastigheten. Uttrykket av det essensielle genet ble gradvis senket gjennom en 2-fold fortynningsrekke, og mot slutten avtok veksten helt. Dette indikerte at fjerning av intracellulært ComS*, enten ved peptidaser eller ved celledeling, er en langsom prosess og at ComS* trolig er stabilt i cytoplasma. Denne relativt langsomme prosessen er en fordel ved arbeid med essensielle gener siden bakteriene gradvis blir mer stresset og får tid til å utvikle en fenotype før de stopper å vokse (Berg *et al.* 2011).

Ved Seksjon for molekylær mikrobiologi, UMB, har den nylige utviklingen av ComRS-depletionsystemet gjort for det mulig å studere flere essensielle gener som deltar i

celleveggsyntesemaskineriet til *S. pneumoniae*. På laboratoriet vårt foregår det forskning på blant annet PcsB, RodA, FtsW, PBP2b og PBP2x som alle er viktige komponenter i pneumokokkenes celleveggsyntese (Sham *et al.* 2012).

1.5 Oppgavens målsetning

Målsetningen for dette arbeidet var å få en økt forståelse for forskjellene mellom PBP1a og PBP2a i *S. pneumoniae*. I tillegg bygger dette arbeidet videre på den pågående forskningen på PBP2b og PBP2x ved å se på en mulig interaksjon mellom disse klasse B PBPene og PBP1a, PBP1b og PBP2a. På grunn av begrenset tid ble det liten tid til å karakterisere mutantene, det ble derfor valgt å se på fenotypiske forandringer med hensyn på vekst og morfologi. Ved å bruke ComRS-depletionsystemet (Berg *et al.* 2011) var det mulig å undersøke hvordan veksthastighet og morfologi påvirkes ved deplektion av henholdsvis *pbp1a* og *pbp2a* i dobbelknockoutmutanter. Dette depletionsystemet gjorde det også mulig å undersøke forskjellene i vekst og morfologi mellom klasse A PBPer, og samspillet mellom disse og PBP2b og PBP2x.

2. Materialer

2.1 *S. pneumoniae* stammer og plasmider.

Tabell 2.1 Oversikt over *S. pneumoniae* stammer og plasmid som ble brukt i dette arbeidet med relevant beskrivelse av deres genotype.

Stammenavn/ plasmid	Genotype/relevant karakteristikk	Referanse/kilde
<i>S. pneumoniae</i>		
RH1	$\Delta egb::spc$, Ery ^R , Spc ^R	(Johnsborg <i>et al.</i> 2008)
RH426	RH425, men $\Delta IS1167::janus$; Ery ^R Kan ^R	(Johnsborg & Håvarstein 2009a)
SPH130	<i>comR</i> i <i>Ami</i> -locus, $P_{comX}::luc$, Kan ^R	(Berg <i>et al.</i> 2011)
SPH131	SPH130, men $\Delta luc::janus$, Kan ^R	(Berg <i>et al.</i> 2011)
SPH158	SPH157, men ($\Delta lytA::Spc$), Sm ^R , Spc ^R	(Straume <i>et al.</i> 2012)
SPH164	SPH163, men $\Delta janus::DEL$, Sm ^R	Kari Helene Berg
SPH165	SPH164, men ($\Delta lytA::Spc$), Sm ^R , Spc ^R	Kari Helene Berg
Plasmid:		
pR424	Bærer <i>luc</i> -genet	(Chastanet <i>et al.</i> 2001)

Tabell 2.2 Oversikt over mutantene som ble konstruert i dette arbeidet, samt en kort beskrivelse av deres konstruksjon og relevant genotype.

Stamme- navn	Genotype/ relevant karakteristikk	Konstruksjon
MTS1	SPH164, men $\Delta pbp2a_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS1 ble konstruert ved å transformere SPH164 med en Januskassett som erstatter <i>pbp2a</i> . Kan ^R ble ervervet
MTS2	SPH164, men $\Delta pbp1a_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS2 ble konstruert ved å transformere SPH164 med en Januskassett som erstatter <i>pbp1a</i> . Kan ^R ble ervervet
MTS3	MTS1, men $\Delta lytA_{wt}::Spc$, Kan ^R , Spc ^R	MTS3 ble konstruert ved å transformere MTS1 med $\Delta lytA::Spc$. Spc ^R ble ervervet
MTS4	MTS2 men $\Delta lytA_{wt}::Spc$, Kan ^R , Spc ^R	MTS4 ble konstruert ved å transformere MTS2 med $\Delta lytA::Spc$. Spc ^R ble ervervet
MTS5	SPH164, men $\Delta pbp1b_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS5 ble konstruert ved å transformere SPH164 med en Januskassett som erstatter <i>pbp1b</i> . Kan ^R ble ervervet
MTS11	SPH131, men $\Delta janus::pbp2a$, Sm ^R	MTS11 ble konstruert ved å transformere SPH131 med $\Delta janus::pbp2a$. Sm ^R ble ervervet

Stamme- navn	Genotype/ relevant karakteristik	Konstruksjon
MTS12	MTS11, men $\Delta pbp2a_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS12 ble konstruert ved å transformere MTS11 med $\Delta pbp2a::janus$. Kan ^R ble ervervet
MTS13	MTS12, men $\Delta janus::DEL$, Sm ^R	MTS13 ble konstruert ved å transformere MTS12 med $\Delta janus::DEL$. Sm ^R ble ervervet.
MTS14	MTS13, men $\Delta pbp1a_{wt}::janus$, Kan ^R .	MTS14 ble ervervet ved å transformere MTS13 med $\Delta pbp1a_{wt}::janus$. Kan ^R ble ervervet.
MTS15 ¹	SPH130, men $\Delta pbp1a_{wt}::janus$, Kan ^R .	MTS15 ble konstruert ved å transformere $\Delta pbp1a_{wt}::janus$. Kan ^R ble ervervet.
MTS16	MTS15, men $\Delta janus::DEL$, Sm ^R .	MTS16 ble konstruert ved å transformere $\Delta janus::DEL$. Sm ^R ble ervervet.
MTS17	MTS16, men $\Delta luc::janus$, Kan ^R .	MTS17 ble konstruert ved å transformere $\Delta luc::janus$. Kan ^R ble ervervet
MTS18	MTS17, men $\Delta janus::pbp1a$, Sm ^R .	MTS18 ble konstruert ved å transformere MTS17 med en Januskassett som erstatter <i>pbp1a</i> . Sm ^R ble ervervet.
MTS19	MTA18, men $\Delta pbp2a_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS19 ble konstruert ved å transformere MTS18 med $\Delta pbp2a::janus$. Kan ^R ble ervervet
MTS20	SPH158, men $\Delta pbp2a_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS20 ble konstruert ved å transformere SPH158 med en Januskassett som erstatter <i>pbp2a</i> . Kan ^R ble ervervet
MTS21	SPH158, men $\Delta pbp1a_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS21 ble konstruert ved å transformere SPH158 med en Januskassett som erstatter <i>pbp1a</i> . Kan ^R ble ervervet
MTS22	SPH158, men $\Delta pbp1b_{wt}::janus$, Kan ^R	MTS22 ble konstruert ved å transformere SPH158 med en Januskasset som erstattet <i>pbp1b</i> . Kan ^R ble ervervet
SPH166	MTS20, men $\Delta janus::luc$. Sm ^R	SPH166 ble konstruert ved å transformere MTS20 med en luc-kassett som erstattet Janus. Sm ^R ble ervervet
SPH 167	MTS21, men $\Delta janus::luc$. Sm ^R	SPH166 ble konstruert ved å transformere MTS20 med en luc-kassett som erstattet Janus. Sm ^R ble ervervet

¹ På grunn av komplikasjoner under arbeidet med å lage en *pbp1a*-depletionmutant, ble det SPH130 benyttet som utgangsstamme istedenfor SPH131.

2.2 Peptider

Tabell 2.3 Aminosyresekvens av det kompetansestimulerende peptidet CSP-1 og ComS* som ble benyttet i dette arbeidet.

Feromon	Stamme	Aminosyresekvens (N→C)	Stockløsning	Produsent
CSP-1	<i>S. pneumoniae</i> R6	EMRLSKFFRDFILQRKK	100 µg/ml	Research Genetics Inc
ComS*		LPYFAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies

2.3 Sekvenseringsprimere

Tabell 2.4 Sekvenseringsprimere. Tabellen viser en oversikt over sekvenseringsprimerene som ble benyttet i dette arbeidet, samt en beskrivelse og nukleotidsekvens av disse.

Primer- navn	Oligonukleotidsekvens (5'-3')	Beskrivelse	Referanse
mts21.F	GAGTTGTTCTCAAGTAATTG	158 bp oppstr. for <i>pbp2a</i>	Dette arbeidet
mts22.R	CTTCTAGTCGTGTAGGCTTG	148 bp nedstr. for <i>pbp2a</i>	Dette arbeidet
mts23.F	GATTTGATTCGCTTCTATCATC	152 bp oppstr. for <i>pbp1a</i>	Dette arbeidet
mts24.R	AACAAGATTACGGAAGTAGTC	148 bp nedstr. for <i>pbp1a</i>	Dette arbeidet
mts25.F	CTCATCAAAAATGTGCATGTG	159 bp oppstr. for <i>pbp1b</i>	Dette arbeidet
mts26.R	CCTAAAATCCACAGATTCCC	150 bp nedstr. for <i>pbp1b</i>	Dette arbeidet
mts31.F	GTTGAGCTGACTGACATCAG	Sek <i>pbp2a</i> , fra 340 bp	Dette arbeidet
mts32.F	CTGTATAATCCCTTGAATTCCG	Sek <i>pbp2a</i> , fra 744 bp	Dette arbeidet
mts33.F	GAGTTGTCGGTCAAGTTGC	Sek <i>pbp2a</i> , fra 1145 bp	Dette arbeidet
mts34.F	GCTCAAGCATACGCTGCCT	Sek <i>pbp2a</i> , fra 1546 bp	Dette arbeidet
mts35.F	ACTATTTTACCTTATACGCCAG	Sek <i>pbp2a</i> , fra 1948 bp	Dette arbeidet
mts36.F	TCTGCAAAGCAATTCCCTCC	Sek <i>pbp1a</i> , fra 339 bp	Dette arbeidet
mts37.F	TGAGAAAGCAGTCAATACACC	Sek <i>pbp1a</i> , fra 741 bp	Dette arbeidet
mts38.F	TGCCTTGGAGTACGGTGTC	Sek <i>pbp1a</i> , fra 1140 bp	Dette arbeidet
mts39.F	TCTAATGTCGGAACCTCGTGC	Sek <i>pbp1a</i> , fra 1546 bp	Dette arbeidet
mts40.F	TGGTGCTCGTTCTACGTGG	Sek <i>pbp1a</i> , fra 1950 bp	Dette arbeidet
khb39	TAAATAGCGAAGTTCCGTTCC	SekCpsO.F (~60 oppstrøms for innsatt PcomX- <i>luc</i> fragment)	(Berg <i>et al.</i> 2011)
khb40	ACAGTATAAAAAGCAGGAAATAG	SekCpsN.R (~60 nedstrøms for innsatt PcomX- <i>luc</i> fragment)	(Berg <i>et al.</i> 2011)

2.4 Primere

Tabell 2.5 Oversikt over primerne som ble benyttet i dette arbeidet med oligonukleotidsekvens og en kort beskrivelse.

Primer -navn	Oligonukleotidsekvens (5' - 3')	Beskrivelse	Referanse
Kan484 F	GTTTGATTTTTAATGGATAATGTG		Johnsborg et al.(2008)
RpsL41 R	CTTTCCTTATGCTTTTGGAC		Johnsborg et al.(2008)
LytAR	TCAACCATCCTATACAGTGAA		(Eldholm <i>et al.</i> 2009)
LytAF	TGTATCTATCGGCAGTGTGAT		(Eldholm <i>et al.</i> 2009)
mts1F	GCACAACCTGTTTCGTA CTCTTG	Binder ~1000 bp oppstrøms for <i>pbp2a</i>	Dette arbeidet
mts2R	CACATTATCCATTAAAAATCAAACG CGTTTATTTTATCATCTTCATC	Binder rett oppstrøms for <i>pbp2a</i> . Har Kan484.F- overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts3F	GTCCAAAAGCATAAAGGAAAGGATGC TTGTCAAAGCCTAGC	Binder rett nedstrøms for <i>pbp2a</i> . Har RpsL41.R- overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts4R	AGGTTTACTTCTGCAACTGTG	Binder ~1000 bp nedstrøms for <i>pbp2a</i>	Dette arbeidet
mts5F	CCTTGTGTTTCATAGCGAGG	Binder ~1000 bp oppstrøms for <i>pbp1a</i> .	Dette arbeidet
mts6R	CACATTATCCATTAAAAATCAAACCT TGTTTTACCACCTAATAAATG	Binder rett oppstrøms for <i>pbp1a</i> . Kan484.F- overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts7F	GTCCAAAAGCATAAAGGAAAGCATTT ATCATCCAGATTTTTCTG	Binder rett nedstrøms for <i>pbp1a</i> . Har RpsL41.R- overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts8R	AAAACGGCTTTGGTAGCAGATG	Binder ~1000 bp nedstrøms for <i>pbp1a</i>	Dette arbeidet
mts9F	GCCTGTA CTGGTAGTTTGG	Binder ~1000 bp oppstrøms for <i>pbp1b</i>	Dette arbeidet

Primer -navn	Oligonukleotidsekvens (5'-3')	Beskrivelse	Referanse
mts10R	CATTATCCATTA AAAATCAAACGGAT TTCCTCACTTTATCTATTA	Binder rett oppstrøms for <i>pbp1b</i> . Kan484.F- overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts11F	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGTTCTC TAAATGAAGTGGCCAATC	Binder rett nedstrøms for <i>pbp1a</i> . Har RpsL41.R- overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts12R	GACTATTCCAGTATAGCAC	Binder ~1000 bp nedstrøms for <i>pbp1b</i>	Dette arbeidet
mts13R	GAAAAATCTGGATGATAAATGCTTGT TTTACCACCTAATAAATG	For (Δ <i>janus</i> ::DEL)	Dette arbeidet
mts14F	TTTATTAGGTGGTAAAACAAGCATTTA TCATCCAGATTTTTCTG	For (Δ <i>janus</i> ::DEL)	Dette arbeidet
mts15R	GCTAGGCTTTGACAAGCATCGCGTTTA TTTTATCATCTTCATC	For (Δ <i>janus</i> ::DEL).	Dette arbeidet
mts16F	GATGAAGATGATAAAATAAACGCGAT GCTTGTC AAAGCCTAGC	For (Δ <i>janus</i> ::DEL)	Dette arbeidet
mts17F	ATTTATATTTATTATTGGAGGTTCAA TGAAATTAGATAAATTATTTGAGAA	Pbp2a F. PcomX.R overheng (fet skrift)	Dette arbeidet
mts18	GGGAAGAGTTACATATTAGAAATTA GCGAAATAGATTGACTATCG	For amplifisering av <i>Pbp2a</i> , settes inn i SPH131 bak PcomX med overheng (fet skrift)	Dette arbeidet
mts19	TTATATTTATTATTGGAGGTTCAATG AACAAACCAACGATTCTGC	For å amplifisere <i>pbp1a</i> , sette inn i SPH131 bak PcomX med overheng(fet skrift)	Dette arbeidet
mts20	TTGGGAAGAGTTACATATTAGAAAT TATGGTTGTGCTGGTTGAGG	For å amplifisere <i>pbp1a</i> inn i SPH131 med PcomX-overheng (fet skrift)	Dette arbeidet
khb31	ATAACAAATCCAGTAGCTTTGG	cpsO.F (~800 baser oppstrøms for insert)	Berg et al.(2011)
khb32	GGTCTAGAGATGATTTTAATTAC	cpsO.R	Berg et al.(2011)

Primer -navn	Oligonukleotidsekvens (5' - 3')	Beskrivelse	Referanse
khb33	TTTCTAATATGTAACCTCTTCCCAAT	cpsN.F	Berg et al.(2011)
khb34	CATCGGAACCTATACTCTTTTAG	cpsN.R (~800 baser nedstrøms for insert)	Berg et al.(2011)
khb35	ATTAAAATCATCTCTAGACC GGTTTTGACTCTATCTCGCTT	PcomX.F (med <i>cpsO</i> .R overheng)	Berg et al.(2011)
khb36	TGAACCTCCAATAATAAATATAAAT	PcomX.R	Berg et al.(2011)
khb54	ATTAAAATCATCTCTAGACCGTTTGA TTTTTAATGGATAATGTG	Kan484.F-cpsO (med <i>cpsO</i> .R overheng)	Berg et al.(2011)
khb55	ATTGGGAAGAGTTACATATTAGAAA CTTTCCTTATGCTTTTGGAC	RpsL41.R-cpsN (med <i>cpsN</i> overheng, fet skrift)	Berg et al.(2011)
khb78	ATGAGATCCGCCAAAAACATA	Fwd primer til amplifisering av <i>luc</i> , uten overheng	Kari H. Berg
gs64	TTACAATTTGGGCTTTCCGC	Revers primer til amplifisering av <i>luc</i> , uten overheng	Gro Stamsås

2.5 Molekylvektstandarder, enzymer og nukleotider

Tabell 2.6 Oversikt over molekylvekstandarder, enzymer og nukleotider som ble benyttet i dette arbeidet.

Navn	Stock- konsentrasjon	Produktnummer	Produsent
1 kb DNA ladder	50 ng/μl i loadingbuffer og MQ-vann	15615-024	Invitrogen
dATP, dCTP, dGTP og dTTP	100 mM		Promega
Phusion TM High-Fidelity DNA Polymerase	2,0 U/μl	M0530L	New England BioLabs
Taq DNA Polymerase	5,0 U/ml	M0267S	New England BioLabs

2.6 Antibiotika

Tabell 2.7 Oversikt over antibiotika benyttet I dette arbeidet, konsentrasjon av stockløsninger og brukskonsentrasjoner for selektiv dyrking.

Antibiotikum	Stockløsning	Brukskonsentrasjon	Produktnummer	Leverandør
Kanamycin	100mg/ml	400µg/ml	K4000	Sigma Aldrich
Streptomycin	100mg/ml	200µg/ml	S6501	Sigma Aldrich
Spectinomycin	50mg/ml	200µg/ml	S9001	Sigma Aldrich

2.7 Kit

Tabell 2.8 Kit benyttet i dette arbeidet med bruksområde, produktnummer og produsent.

Navn	Bruksområde	Produktnummer	Produsent
NucleoSpin ® Extract II	Rensing av DNA fra agarosegel	740609.250	Machnery-Nagel

2.8 Dataprogrammer

Tabell 2.9 Oversikt over dataprogrammer som ble benyttet i arbeidet.

Dataprogram	Bruksområde	Tilgjengelig fra
Chromas	Analyse av sekvenseringsresultater	http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Chromas-Lite.shtml
Reverse Complement	Reverskomplementerer DNA-sekvenser	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

2.9 Kjemikalier

Tabell 2.10 Alfabetisk oversikt over kjemikalier som ble brukt i dette arbeidet med kjemisk formel, leverandør og produktnummer.

Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produkt- nummer
Aktivt kull	C	Merck	1.02184.1000
Bacto Agar		Saveen Werner AB	B1000-1
Bacto™ Casitone		Becton, Dickinson and Co	225930
Bacto™ Todd Hewitt Broth		Becton, Dickinson and Co	249240
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Fluka	19606
Bromfenolblå 1 %	C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa	Sigma Aldrich	B-5525
Celite® Standard super- Cel® NF, acid washed	O=Si=O	Acros Organics	206352500
Cholin klorid	C ₅ H ₁₄ NO.Cl	Sigma Aldrich	045K0155
D-Luciferin		Thermo Scientific	16515
di-Kaliumhydrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	Merck	1.05104.1000
di-Natriumhydrogenfosfat	Na ₂ HPO ₄	Merck	1.06580.1000
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	VWR	20 296.360
Ethidiumbromid, EtBr	C ₁₂ H ₂₀ BrN ₃	Sigma-Aldrich	E1510
Gjærekstrakt granulert		Merck	1.03753.0500
Glassull		Merck	1.04086.0250
Glucose 20 %	C ₆ H ₁₂ O ₆	VWR	101176K
Glutardialdehyd, 25 % løsning	C ₅ H ₈ O ₂	Merck	S4281203
Glyserol	C ₃ H ₅ (OH) ₃	Merck	1.04094.1000
Jernsulfat heptahydrat	FeO ₄ S.7H ₂ O	Fluka	44970
Kaliumklorid	KCl	Merck	1.04936.1000
Kalsium klorid dehydrert	CaCl	Fluka	21075
Kalsium pantothenat	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	Sigma Aldrich	044K1490
Kobbersulfat pentahydrat	CuO ₄ S.5H ₂ O	Fluka	61240

Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produkt-nummer
L-Asparagine monohydrat	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma Aldrich	124K06151
L-Cystein Hydrochloride Monohydrate	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka	30130
L-tryptofan	$C_{11}H_{12}NO_2$	Fluka	93660
Magnesiumklorid hexahydrat	$ClMg \cdot 6H_2O$	Fluka	63072
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Riedel-deHaën	31422
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	Sigma Aldrich	S3272
Natriumklorid	NaCl	Merck	1.06404.1000
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	Fluka	72309
Paraformaldehyd, pulver 95 %	$(CH_2O)_n$	Sigma-Aldrich	S46536
Poly-L-lysin hydrobromide	L-Lys-(L-Lys) _n -L-Lys · xHBr	Sigma Aldrich	P1274
Pyridoxin hydroklorid	$C_8H_{11}NO_3HCl$	Fluka	95180
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich	094K0098
Sink sulfat heptahydrat	$O_4SZn \cdot 7H_2O$	Fluka	96500
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	BHD	102745C
Thiamin hydroklorid	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	Sigma Aldrich	084K0072

2.10 Utstyr

Tabell 2.11 Oversikt over maskiner og utstyr som ble benyttet i dette arbeidet. Utover utstyret som er oppført her, ble det i tillegg benyttet vanlig laboratorieutstyr.

Utstyr	Modell	Produsent
Anaerobe dyrkningsposer	AnaeroGen	Oxoid
Autoklav		Certoclav
Beholder for anaerob dyrkning		Oxoid
Bordsentrifuge II	Centrifuge 5424	Eppendorf
Bordsentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf

Utstyr	Modell	Produsent
Elektroforesekar til agarosegelelektroforese	Mini-sub Cell GT	BioRad
Engangskyvetter		Brand
Filter (0.2µm)		Sarstedt
Fryser min - 80	Minus 86 °C ULT Freezer	ThermoForma
Geldokumentasjon	GelDoc-1000	BioRad
Inkubatorskap		Termax
Inoklueringslupe	1.0, 10µl	Sarstedt
Magnetrører	MR 3001 K	Heidolph
Mikrobølgeovn	MWO602	Whirlpool
Mikroskop (DIK)	LSM700	Zeiss
Mikroskop (SEM)	EVO 50 EP	Zeiss
Mikrotiterplate-avleser	FLUOstar Optima	BMG Labtech
Mikrotiterplater	Assay Plate, 96 well	Corning
PCR-maskin, termosyklar	PTC-100 TM	MJ Research, Inc.
pH-meter	PHM 210	MeterLab®
Pipetter	Finpipette (50, 1000, 5ml, 10ml)	Thermopol
Pipetter	Pipetman (20, 200, 1000)	Gilson
Scanning-elektronmikroskop		Zeiss
Sentriguge	Multifuge 3 S-R	Heareus
Spektrofotometer	LKB Novaspec II	Pharmacia
Sprøyter til sterilfiltrering		BD Plastipak
Sterilbenk	AV-100	Telstar
Strømforsyning til gelelektroforese	Power Pac 200	BioRad
Vannbad	7A	Julabo
Vannbad (max 120°C)		GFL
Vekt for finveing	CP 124 S	Sartorius
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA®

2.11 Oppskrifter – Dyrkningsmedier, løsninger og buffere

2.11.1 Dyrkningsmedier

Pre C-medium:

Til 4 liter:

0,045 g L-Cystein Hydrochloride Monohydrate($C_3H_7NO_2S.HCl.H_2O$)

8 g NaAcetat

20 g Bacto™ Casitone. Pancreas Digest of Casein.

0,024 g L-tryptofan ($C_{11}H_{12}NaO_2$)

34 g K_2HPO_4

4 l dH₂O

C-medium:

Til 150 ml Pre C-medium tilsettes:

150 µL MnCl. 0,4 mM

1,5 mL Glucose 20 %

3,75 mL ADAMS III

110 µL Glutamin 3 %

2,25 mL Na pyruvat 2 %

95 mL Sucrose 1,5 M

1,5 mL Uridine adenisin 2 mg/ml

1,5 mL Albumin BSA 8 %

3,75 mL Gjærekstrakt

Todd Hewitt Agar:

15 g Bacto™ Todd Hewitt buljong

7,5 g Bacto agar

15 g buljon og 7,5 g agar ble tilsatt dH₂O til et sluttvolum på 500 ml. Løsningen ble autoklavert i 15 minutter ved 121 °C. Etter avkjøling til ca 60 grader ble evt antibiotika tilsatt mediet før det ble støpt i petriskåler. Skålene ble oppbevart ved 4 °C.

2.11.2 Løsninger til C-medium:**Gjærekstrakt:**

40 g yeast extract

360 ml dH₂O

6 ml 12N/37 % HCl → pH 3

16 g aktivt kull

40 g gjærekstrakt ble tilsatt 360 ml dH₂O og pH ble justert til 3 ved HCl. Løsningen ble blandet i 10 minutter før den ble oppbevart på 4 °C i 2 – 4 timer. Løsningen ble så filtrert over natt gjennom en kolonne pakket med glassull og et 5 cm lag med celite. Filtratet ble pH-justert til 7.6 ved NaOH og volumet ble justert til 400 ml ved dH₂O. Gjærekstraktet ble så sterilfiltrert og overført til 15 ml Falcon rør med 4 ml i hver. Oppbevares ved -80 °C.

ADAMS I:

0.15 ml Biotine 0,5 mg/ml

75 mg Acide nicotinique

87.5 mg Pyridoxine hydrochloride

300 mg Ca panthothenate

80 mg Thiamine hydrochloride

35 mg riboflavin

500 ml dH₂O

Juster pH til 7,0

ADAMS II – 10x:

500 mg FeSO₄·7H₂O

500 mg CuSO₄·5H₂O

500 mg ZnSO₄·7H₂O

200 mg MnCl₂·4H₂O

10 ml konsentrert HCl

Tilsatt MQ H₂O til 100 ml sluttvolum. Løsningen ble steriltfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

ADAMS III:

128 ml ADAMS I

3,2 ml ADAMS II-10X

1,6 mg Aspargin monohydrat

160 mg Choline

0,4 g CaCl₂ anhydre

16 g MgCl₂·6H₂O

800 ml dH₂O

pH ble justert til 7.6.

2.11.3 Løsninger og buffere

50 % glycerol

85 % glycerol 20 g
MQ-vann 100 ml
Autoklavert i 15 min ved 121 °C

dNTP-miks, 10 mM

10 µl 100 mM dATP

10 µl 100 mM dCTP

10 µl 100 mM dGTP

10 µl 100 mM dTTP

60 µl MQ-vann

Oppbevares ved -20 °C

Løsninger og buffere til agarosegelelektroforese

50 x TAE(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. 1 x TAE ble benyttet til gelstøping og gelelektroforese

10 x loadingbuffer

2 ml 1 % bromfenolblått

5 ml 50 % glycerol

8 ml Mq-vann

Løsningen ble oppbevart ved 4 °C.

2.11.4 Fikseringsløsning for DIK og SEM

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 μ l 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.

3. Metoder

3.1 Dyrking og oppbevaring av *S. pneumoniae*

S. pneumoniae ble dyrket i flytende, dagferskt C-medium (Lacks & Hotchkiss 1960), eller på Todd Hewitt (TH)-agarskåler. Ved dyrking på TH-agarskåler ble skålene plassert i lufttette beholdere sammen med AnaeroGenTM-poser som i løpet av 30 minutter reduserer oksygenivået i beholderen til under 1 % (Oxoid). Dyrking i flytende medium ble utført i rør med kork for å få et tilnærmet anaerobt miljø. *S. pneumoniae* ble dyrket i varmeskap eller i vannbad ved 37 °C. For de kulturene det var nødvendig ble det tilsatt ComS* (NH₂-LPYFAGCL-COOH) til en sluttkonsentrasjon på 0,2 eller 0,02 µM i det flytende mediet eller direkte på TH-agarskålene.

Starterkulturer ble laget ved å tilsette 80 % glycerol (til sluttkonsentrasjon 15 %) til kulturer med OD₅₅₀ ~0,3. Frysestokker ble laget av 1 ml kultur med samme OD₅₅₀ og glycerolkonsentrasjon som starterkulturene. Starterkulturer og frysestokker ble oppbevart ved -80 °C.

3.2 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode for å amplifisere mange kopier av et bestemt DNA-fragment. I teorien trengs det kun ett DNA-molekyl for å kunne amplifisere flere millioner kopier av en ønsket målsekvens fra dette templatet. I tillegg til DNA-templat trengs det primere, en DNA-polymerase, DNA-polymerase buffer og de fire deoksynukleotidtrifosfatene (dNTP); dATP, dTTP, dCTP og dGTP. Primere er oligonukleotider med en ledig 3'OH-ende, og med en nukleotidsekvens som er komplementær med de flankerende områdene av DNA-fragmentet som skal amplifiseres.

PCR-reaksjonen består av tre trinn som gjentas i sykler, 25 til 30 ganger. I reaksjonens første trinn denatureres dobbeltrådet DNA (dsDNA) til enkelttrådet DNA (ssDNA) ved å øke temperaturen til 94 – 98 °C. Temperaturen avhenger av hvor varmestabil DNA-polymerase som benyttes i reaksjonen er. Temperaturen senkes til primernes smeltepunkttemperatur, T_m, for å optimalisere forholdene for primerhybridisering til deres komplementære sekvens på ssDNA. I dette arbeidet har primere blitt designet til å ha en smeltetemperatur på 58 – 60 °C. Smeltepunktstemperaturen til primerne ble beregnet etter regelen om at G og C = 4 °C, og A og T = 2 °C. Primerne har en ledig 3'OH-ende som fungerer som startpunkt for elongering

ved hjelp av DNA-polymerasen og syntese av ny DNA-tråd. I det tredje trinnet økes vanligvis temperaturen til 72 °C som er optimal temperatur for de fleste kommersielle termostabile DNA-polymeraser. I dette arbeidet ble det benyttet to ulike polymeraser; Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase og *Taq* DNA polymerase (NewEnglandBioLabs), se avsnitt 3.2.1 og 3.2.2. Polymerasen syntetiserer en ny DNA-tråd ved å inkorporere dNTP som er komplementære med templatstråden. Elongeringstiden avhenger av hvor effektiv polymerasen er, og av lengden av DNA-fragmentet som skal amplifiseres. Disse tre trinnene gjentas i 25 – 30 syklus avhengig av mengden templat og av primernes effektivitet. Antall DNA-kopier vil i teorien dobles for hver runde slik at amplifiseringen øker eksponentielt (Sambrook & Russel 2001).

3.2.1 Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase har 5'→3' polymeraseaktivitet og 3'→5' eksonukleaseaktivitet, og arbeider med en hastighet på 15 sekunder pr kilobase med PCR-produkter som templat og 30 sekunder pr kilobase med genomisk DNA som templat. Phusion® polymerasen er dermed raskere enn *Taq* DNA polymerase, og Phusion har også en feilinkorporeringsrate som er 50 ganger lavere enn *Taq* DNA polymerase. Alt arbeid med oppsett til PCR ble utført på is for å forhindre uspesifikk binding av primere. Phusion Polymerase ble tilsatt som siste komponent i reaksjonen for å forhindre degradering av primere ved eksonukleaseaktiviteten til Phusion (NewEnglandBioLabs 2012a). I dette arbeidet ble Phusion Polymerase brukt ved amplifisering og overlap ekstension (avsnitt 3.2.3) av DNA-fragmenter brukt til transformasjon av *S. pneumoniae*.

3.2.1.1 Protokoll for PCR med Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

1. På is ble følgende reagenser blandet i et PCR-rør:

Reagens	Suttkonsentrasjon/-volum
10 µl 5x Phusion® HF-Buffer	1x
1 µl dNTP (10mM)	0,2mM
2,5 µl primer A (10pmol/µl)	0,5µM
2,5 µl primer B (10pmol/µl)	0,5µM
x ml templat-DNA	1-100 ng (avhengig av type templat)
0,5 µl Phusion® DNA Polymerase (2U/µl)	0,02 U/µl
x µl MQ-vann	til sluttvolum 50µl
Totalt volum	50µl

2. PCR-reaksjonen ble utført i en termosyklus (MJ Research) med et program tilpasset det aktuelle templatet, primernes smeltetemperatur, og lengde av fragmentet som skulle amplifiseres. Følgende oppsett ble benyttet som utgangspunkt:

Trinn	Temperatur og tid
1. Innledende denaturering	98 °C, 30 sekunder → 1,5 minutter
2. Denaturering	98 °C, 10 sekunder
3. Primerhybridisering	50-60 °C, 30 sekunder
4. Elongering	72 °C, x sekunder
5. Gå til trinn 2 25-30 ganger	25-30 sykler totalt
6. Utfylling av ender	72 °C, 5 minutter
7. Midlertidig oppbevaring i termosyklus	4 °C, ∞

3.2.2 Taq DNA Polymerase

Taq DNA Polymerase er ikke like nøyaktig under DNA-syntese som Phusion Polymerase da den mangler 3'→5' eksonukleaseaktivitet. Den har heller ikke like rask polymeraseaktivitet som Phusion®, da den bruker 1 minutt pr kb på genomisk DNA sammenlignet med 30 sekunder per 1 kb for Phusion® (NewEnglandBioLabs 2012b). Av økonomiske årsaker ble *Taq* DNA polymerase benyttet for å kontrollere nye mutanter og tilstedeværelse av klonede DNA-fragmenter i disse.

3.2.2.1 Protokoll for PCR med Taq DNA Polymerase.

1. Følgende reagenser ble blandet i et PCR-rør på is:

Reagens	Suttkonsentrasjon/-volum
2,0 µl 10x ThermoPol Reaction Buffer	1x
0,5 µl dNTP (10 mM)	0,2 mM
0,5 µl primer A (10 pmol/µl)	0,5 µM
0,5 µl primer B (10 pmol/µl)	0,5 µM
x µl templat-DNA	1-100 ng (avhengig av type templat)
0,5 µl Taq Polymerase	0,02 U/µl
x µl MQ-vann	til sluttvolum 20 µl
Totalt volum	20 µl

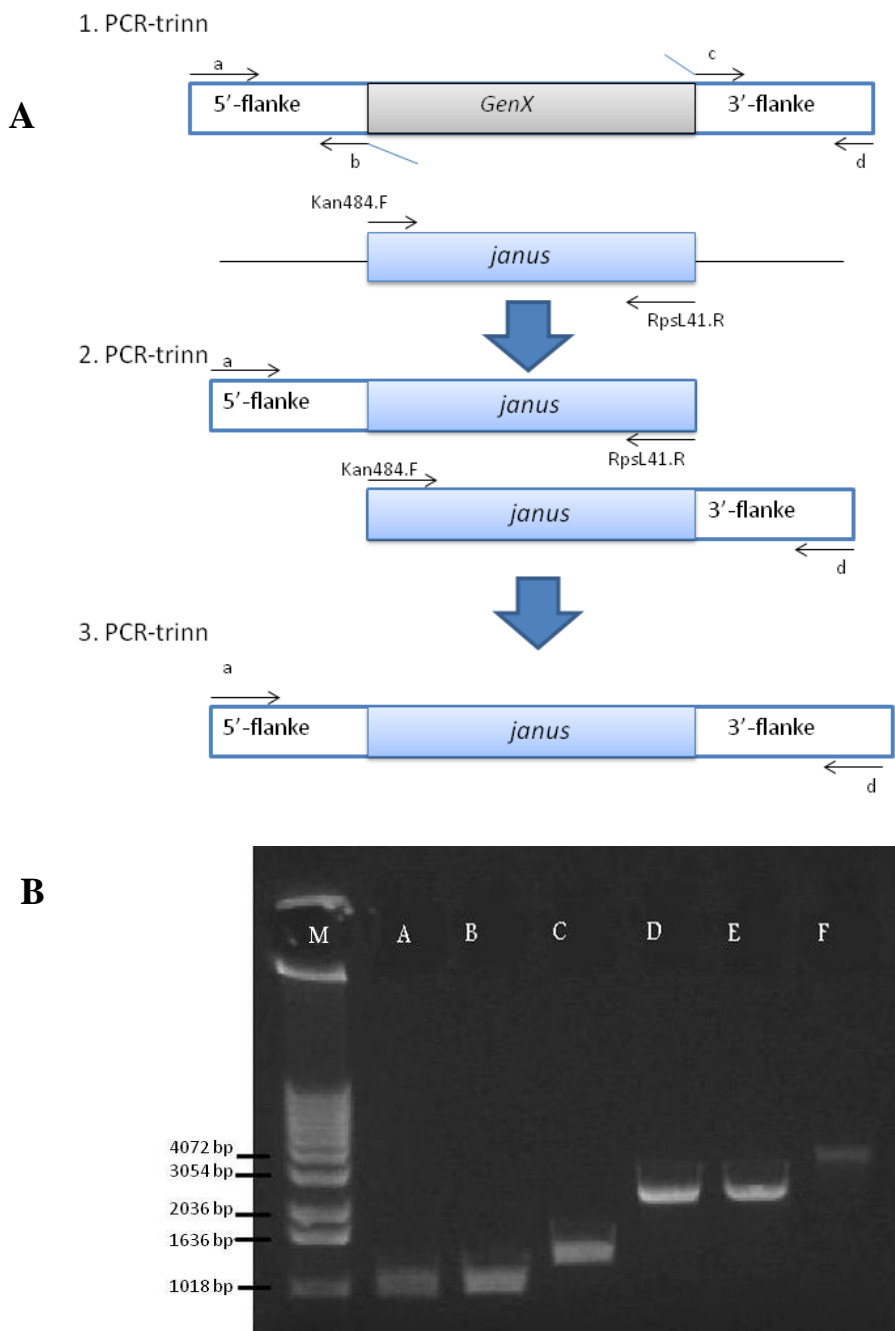
2. PCR-reaksjonen ble utført i en termosyklus (MJ Research) med et program tilpasset det aktuelle templatet, primernes smeltetemperatur, og lengde av fragmentet som skulle amplifiseres. Følgende oppsett ble benyttet som utgangspunkt:

Trinn	Temperatur og tid
1. Innledende denaturering	94 °C, 5 minutter
2. Denaturering	94 °C, 30 sekunder
3. Primerhybridisering	50-60 °C, 30 sekunder
4. Elongering	68 °C, x sekunder
5. Gå til trinn 2 25 – 30 ganger	25 – 30 syklus totalt
6. Utfylling av ender	68 °C, 5 minutter
7. Midlertidig oppbevaring i termosyklus	4 °C, ∞

3.2.3 Overlap ekstension-PCR

Ved å utføre en overlap ekstension-PCR kan man fusjonere to eller flere DNA-fragmenter til ett DNA-fragment. Ved hjelp av denne metoden kan man konstruere DNA-fragmenter som ikke er tilgjengelig fra stammer eller plasmider. Overlap ekstension-PCR kan benyttes til å sette inn punktmutasjoner eller insersjoner/delesjoner i en DNA-sekvens (Higuchi *et al.* 1988; Ho *et al.* 1989).

Utgangspunktet for en overlap ekstension-PCR er at de DNA-fragmentene som skal fusjoneres sammen må ha overlappende 3'-ender. DNA-fragmenter med overlappende 3'-ender syntetiseres i hver sin PCR-reaksjon. Dette gjøres mulig ved å bruke primere med 5'-haler som er komplementære med hverandre; 5'ende til revers primer i PCR-reaksjon nr 1 er komplementær med 5'ende av forward primer i PCR-reaksjon nr.2. Disse to PCR-produktene vil da få 3'-ender som er komplementære med hverandre. Fragmentene kan fusjoneres i en ny PCR-reaksjon ved at de overlappende 3'endene hybridiserer, de 3'OH-endene fungerer da som en primer for den komplementære tråden og en polymerase kan forlenge tråden. Flankerende primere kan inneholde en insersjonsekvens (Figur 3.1), eller en punktmutasjon. Ved delesjon av en sekvens har to av primerne (b og c i Figur 3.1) en 3'-ende som hybridiserer med templatsekvensen på den ene siden av delesjonen og en 5'-ende som er komplementære med sekvensen på den andre siden av delesjonen (Higuchi *et al.* 1988; Ho *et al.* 1989). I Figur 3.1 kan man se at i andre PCR-trinn dannes produktene 5'flanke+janus og janus+3'-flanke, hvor de har overlappende 3'-ender. I det tredje PCR-trinnet dannes et fullstendig overlap ekstension-produkt ved at 5'-flanke+janus og janus+3'-flanke brukes som templat for reaksjonen, og primerene a og d, samt en DNA-polymerase, benyttes for å forlenge de 3'OH-endene i overlappene. Rekkefølgen man velger å sette sammen de individuelle fragmentene i kan variere, eksempler er vist i Figur 3.1 og Figur 3.2.

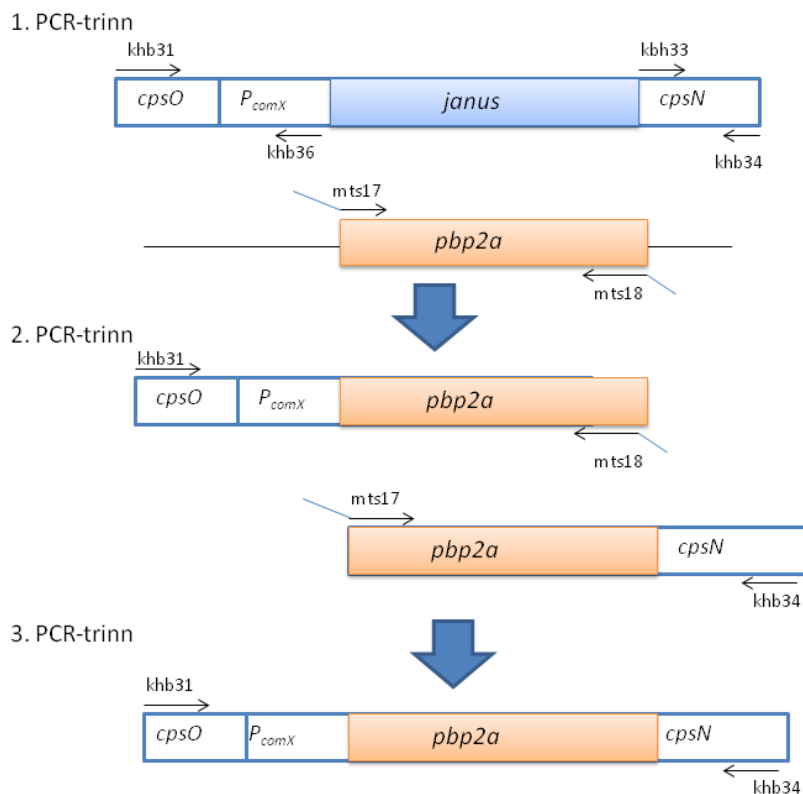


Figur 3.1 Konstruksjon av insersjon av en Januskassetten ($kan-rpsL^+$) i et DNA-fragment ved hjelp av overlap ekstension-PCR. (A) Primere vises som piler der pilens retning indikerer 5' – 3' orienteringen. Primerene b og c har en hale i 5'-ende som er komplementær med Januskassetten sine sekvenser i henholdsvis 5'-ende og 3'-ende. I første trinn amplifiseres oppstrøms- og nedstrøms flanke til målgenet, samt Januskassetten, hver for seg med sine respektive primere. Deretter benyttes henholdsvis primerene a/RpsL41.R og Kan484.F/d, til å amplifisere konstruktene henholdsvis 5'-flanke og janus, og janus + 3'-flanke Disse overlapper nå med Januskassetten. I det tredje og siste trinnet benyttes primerene a+d til å fusjonere de to konstruktene til ett PCR-konstrukt. Figuren er modifisert etter Song *et al.* (2005). (B) Brønn M er 1kb ladder (Invitrogen). Brønn A, B og C viser produktene etter første PCR-trinn. I brønn A er oppstrømsflanken til *pbp1a*, og i brønn B er nedstrømsflanken. Begge fragmentene er ca 1000 bp store. I brønn C vises Januskassetten, ~1300 bp stort. Brønn D og E illustrerer andre PCR-trinn, her vises henholdsvis oppstrømsflanke fusjonert med janus, og janus fusjonert med nedstrømsflanken. Begge på omtrent 2300 bp. I brønn F vises det ferdige konstruktet der oppstrøms+janus er satt sammen med janus+nedstrøms ved overlap ekstension-PCR.

I dette arbeidet ble overlap ekstension-PCR benyttet til følgende tre formål: i) konstruere knockout-fragmenter for delesjon av gener ved bruk av Januskassetten ($\Delta pbp2a::janus$, $\Delta pbp1a::janus$ og $\Delta pbp1b::janus$), ii) sette inn *pbp2a* og *pbp1a* bak P_{comX} i ComRS-systemet i kapsellocuset til *S. pneumoniae* og iii) konstruere *luc*-fragment for luciferase reporterassay. Januskassetten er beskrevet nærmere i avsnitt 3.5.1. Figur 3.1 og Figur 3.2 illustrerer de ulike trinnene i en overlap ekstension-PCR. Figur 1B viser en agarosegel med PCR-produktene etter de ulike trinnene i en overlap ekstension-PCR for konstruksjon av et DNA-fragment for å slå ut *pbp1a* med en Januskassett ($\Delta pbp1a::janus$). I første trinn ble Januskassetten amplifisert med primerparet Kan484.F/RpsL41.R med RH426 som DNA-templat. Fragmenter tilsvarende områdene ~1000 bp oppstrøms og ~1000 bp nedstrøms for *pbp1a* ble amplifisert fra RH1 ved å benytte primerparene mts5/mts6 og mts7/mts8. Primer mts6 har Kan484.F-overheng i 5'-ende, og primer mts7 har RpsL41.R-overheng i 5'-ende. I andre trinn ble oppstrømsfragmentet fusjonert med Januskassetten ved å benytte primerparet mts5/RpsL41.R, og Januskassetten og nedstrømsfragmentet ble fusjonert med primerne Kan484.F/mts8. I siste PCR-trinn ble de to fragmentene fusjonert til ett fragment ved å benytte primerne mts5 og mts8.

Overlap ekstension-PCR ble i dette arbeidet også benyttet for å sette inn *pbp2a* og *pbp1a* bak P_{comX} i ComRS-systemet i kapsellocuset til *S. pneumoniae*. Konstruert for å sette inn *pbp2a* bak P_{comX} -promotoren ble konstruert på følgende måte (Figur 3.2): I første PCR-trinn ble *cpsN* og *cpsO*+ P_{comX} amplifisert fra SPH131 ved å bruke henholdsvis primerparene khb31/khb36 og khb33/khb34. *pbp2a* ble amplifisert fra RH1 ved å bruke primerparene mts17/mts18. Primer mts17 har P_{comX} -overheng, og primer mts18 har *cpsN*-overheng. I neste PCR-trinn ble *cpsO*+ P_{comX} fusjonert med *pbp2a* ved å benytte primerparet khb31/mts18, og *pbp2a* ble fusjonert med *cpsN* ved å bruke primerparet mts17/khb34. I tredje, og siste trinn ble de to fragmentene fusjonert til ett fragment ved å benytte primerne khb31/khb34.

Ved luciferasegenreporterassay ble *luc*-genet benyttet som et reporter-gen, jf. avsnitt 3.8. Det ble laget *luc*-kassetter for å transformere inn rett nedstrøms for de native promotorene til *pbp2a* og *pbp1a*. Primerne khb78 og gs64 ble benyttet for å amplifisere *luc* fra plasmidet pR424. *luc*-kassetene ble konstruert ved overlap ekstension-PCR etter samme prinsipp som beskrevet for Januskassetten (Figur 3.1).



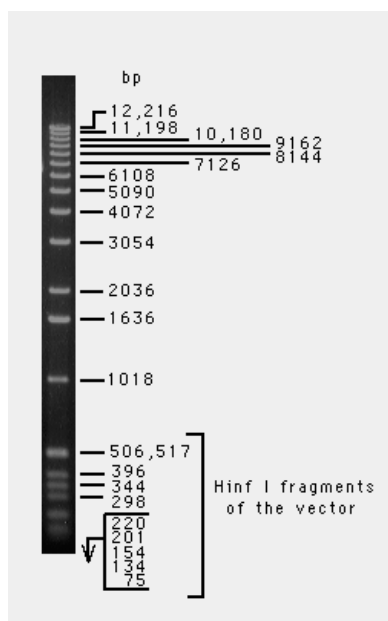
Figur 3.2 Konstruksjon av *pbp2a* bak P_{comX} . Primere vises som piler der pilens retning indikerer 5' – 3' orienteringen. Primeren mts17 har en hale i 5'-ende som er komplementær med P_{comX} , og mts18 har en hale i 5'-ende som er komplementær med *cpsN*. I første trinn amplifiseres *cpsO*+ P_{comX} og *cpsN* fra SPH131 med sine respektive primere, og *pbp2a* amplifiseres fra RH1. Deretter benyttes henholdsvis primerene khh31/mts18 til å amplifisere *cpsO*+ P_{comX} +*pbp2a*, og primerene mts17/khh34 benyttes til å amplifisere *pbp2a*+*cpsN*.. Disse konstruktene overlapper nå med *pbp2a*. I det tredje og siste steget benyttes primerene khh31/khh34 til å fusjonere de to konstruktene til ett PCR-konstrukt som er klart til transformasjon. Figuren er modifisert etter Song *et al.* (2005).

3.3 Agarosegelelektroforese

Agarosegelelektroforese er en metode for å separere DNA-fragmenter avhengig av deres ulike størrelser (Sambrook & Russel 2001). Agarosegelen ligger i et kar med elektroder i hver ende og en buffer som leder strøm og skaper et elektrisk felt i karet. DNA inneholder negativt ladde fosfatgrupper som gjør at DNA-molekyler migrerer fra katoden (negativ pol) til anoden (positiv pol) i det elektriske feltet. For at det skal være lettere å applisere prøvene til brønnene blir prøvene tilsatt loadingbuffer. Loadingbufferen inneholder fargestoffet bromfenoblått som gjør løsningen synlig under applisering, og glycerol som gjør løsningen viskøs. Hastigheten til molekylet som migrerer gjennom gelen avhenger av størrelsen og konformasjonen til molekylet og den elektriske spenningen og agarosekonsentrasjonen. Ved lave konsentrasjoner er det større porer i gelen og molekylene som skal separeres kan være større. Agarosegelen kan lages med ulik grad av tetthet avhengig av mengde agarose. For å visualisere DNA i gelen

blir den tilsatt etidiumbromid (EtBr) under støping. EtBr interkalierer mellom basene i DNA og har den egenskapen at den fluoriserer i UV-lys med bølgelengde mellom 302 nm og 366 nm bare når det er bundet til DNA (Sambrook & Russel 2001)

For å beregne størrelsen på DNA-fragmentene appliseres også en molekylvektstandard på gelen. I dette arbeidet ble 1kb DNA Ladder (Invitrogen) benyttet (Figur 3.3) Denne standarden inneholder DNA-fragmenter av bestemte størrelser (jf. Figur 3.3) som gjør at man kan størrelsesbestemme fragmenter som er mellom 500bp og 12 kb.



Figur 3.3 1 kb ladder fra Invitrogen. 1636-båndet utgjør 10 % av den totale mengden DNA som er applisert på gelen. Bildet er hentet fra <https://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15615016.pdf>

3.3.1 Protokoll for agarosegelelektroforese, 1 % gel:

1. Til 50 ml TAE-buffer ble det tilsatt 0,5 g agarose. Løsningen ble varmet i mikrobølgeovn til agarosen var løst opp.
2. Løsningen ble avkjølt til ca 60 °C og deretter tilsatt EtBr til sluttkonsentrasjon 0,5 µg/ml.
3. Løsningen ble overført til i et støpekar, og brønnkammer av ønsket størrelse ble plassert i gelen.
4. Polymerisert gel ble overført til et elektroforesekar, kammene ble fjernet, og 1 x TAE-buffer ble tilsatt til den dekte gelen og fylte brønnene.
5. Et volum på 10 µl 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) ble benyttet som størrelsesmarkør
6. Elektroforese ble utført ved 0,6 V/cm² til tilstrekkelig migrering av prøvene. DNA i gelen ble visualisert under UV-lys i en Gel Doc-1000 (Bio Rad).

3.4 Ekstraksjon av DNA fra gel

Ekstraksjon av DNA-fragmenter fra agarosegel etter gelelektroforese ble utført ved å benytte NucleoSpin[®] Extract II fra Macherey-Nagel. Protokollen fra produsenten ble fulgt uten endringer. Kort oppsummert ble det ønskede fragmentet kuttet ut fra gelen og løst i bindingsbuffer. Bindingsbufferen NT inneholder chaotrofe salter som gjør at DNA binder seg til silikamembranen i spin-kolonnen som følger med utstyrskitet. En etanolholdig vaskebuffer (NT3) ble brukt for å vaske bort salter og andre komponenter som kontaminerer DNAet. Det rensede DNAet ble eluert fra silikamembranen med elueringsbuffer NE (5mM Tris/HCl, pH 8,5), og oppbevart ved -20 °C.

3.5 Transformasjon av *S. pneumoniae*

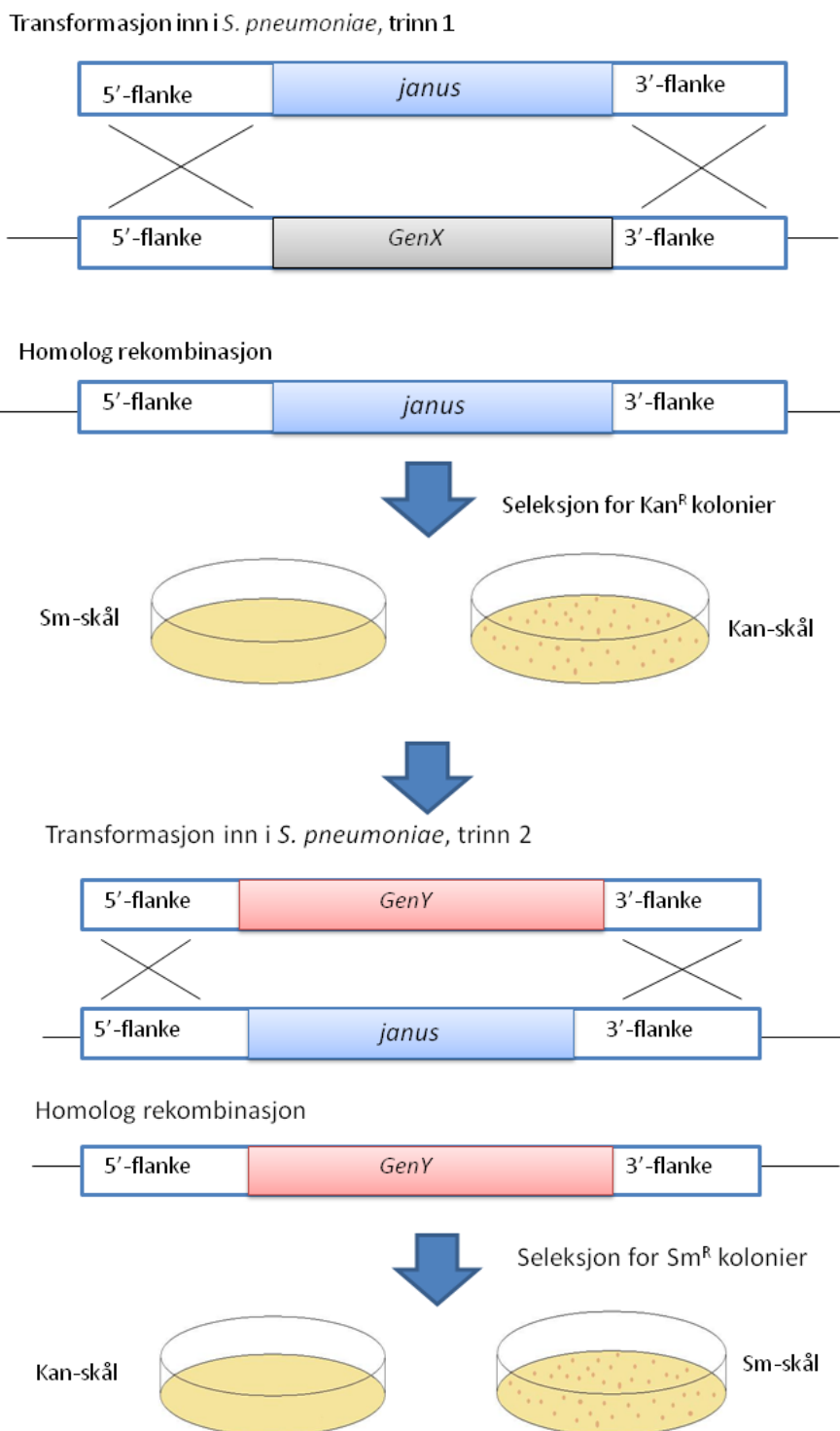
Som nevnt i innledningen er *S. pneumoniae* kompetent for naturlig transformasjon (avsnitt 1.1.2). Kompetente pneumokokker kan integrere DNA i genomet ved homolog rekombinasjon. Hos *S. pneumoniae* er kompetanse en transient fenotype som reguleres via et kompetansestimulerende peptidferomon (CSP). Etter introduksjon av CSP-1 til mediet er pneumokokkene kompetente i om lag 20 minutter, og etter ca 40 minutter har de fleste cellene gått tilbake til en ukompetent tilstand (Håvarstein *et al.* 1995a; Morrison 2007; Tomasz 1966). I dette arbeidet har *S. pneumoniae* sin native egenskap for naturlig genetisk transformasjon blitt benyttet for å lage nye mutanter. Alle mutantene som ble brukt i dette arbeidet er $\Delta comA$ (CSP transporter)-mutanter. Dette betyr at de ikke kan skille ut CSP og heller ikke bli naturlig kompetente. Dette gjør det mulig å kontrollere spesifikt når cellene skal bli kompetente ved å tilsette syntetisk CSP-1 til mediet.

3.5.1 Negativ seleksjon ved bruk av Januskassetten

Sung *et al.* (2001) har konstruert en *kan-rpsL*⁺ DNA-kassett, kalt Janus, som gjør det mulig med negativ seleksjon hos *S. pneumoniae*. Januskassetten gir resistens for kanamycin (Kan^R) og dominant streptomycinsensitivitet (Sm^S) i en streptomycinresistent bakgrunn (Sung *et al.* 2001). Et kriterium for å kunne bruke Januskassetten til negativ seleksjon er at utgangstammen er resistent mot streptomycin (Sm^R), og sensitiv for kanamycin (Kan^S). Streptomycinresistens kan oppstå spontant hos *S. pneumoniae* ved en mutasjon i *rpsL*-genet (*rpsL*⁻) (Salles *et al.* 1992). Ved innsetting av Januskassetten vil *rpsL*⁺ allelet føre til

streptomycinsensitivitet da streptomycinresistens er en recessiv egenskap (Claverys *et al.* 1980).

Figur 3.4 viser bruk av Januskassetten ved totrinns transformasjon. I første transformasjon blir en Januskasset med flankerende regioner til målgenet satt inn ved homolog rekombinasjon. Fenotypen Kan^R og Sm^S blir ervervet, og man kan selektere (positivt) for Kan^R-kolonier på TH-agarskåler som er tilsatt Kanamycin (400 µg/ml). I andre transformasjon blir Januskassetten erstattet med donor-DNA ved homolog rekombinasjon, donor-DNAet har også flankerende regioner som er homologe til målområdet. Den opprinnelige fenotypen (Kan^S og Sm^R) blir gjenopprettet, og man kan selektere for Sm^R-kolonier på TH-agarskåler tilsatt Streptomycin (200 µg/ml). Dette kalles negativ seleksjon. I dette arbeidet ble Janussystemet benyttet for konstruksjon av en rekke mutanter (Tabell 2.2).



Figur 3.4 Totrinns transformasjon i *S. pneumoniae* ved negativ seleksjon. En Januskassett (*kan-rpsL*⁺) med flankerende sekvenser homologe med 5'- og 3'-flanke til målgenet transformeres inn i en *S. pneumoniae* ved dobbel overkryssing. Utgangstammen er Sm^R og Kan^S, men etter transformasjonen erverver den Sm^S og Kan^R. Dermed kan man selekttere for Kan^R-kolonier på THA-skåler tilsatt Kanamycin (400 µg/ml). I neste transformasjon erstattes Januskassetten med donor-DNA (GenY) som også er flankert av DNA homologt til 5'- og 3'-flanke til målområdet. Den opprinnelige genotypen med Sm^R og Kan^S gjenopprettes og man kan selekttere for Sm^R-kolonier på THA-skåler tilsatt Streptomycin (200 µg/ml). Janussystemet gjør det mulig å erstatte målgenet uten at seleksjonsmarkøren blir permanent inkorporert i genomet, en fordel ved påfølgende mutasjoner i samme stamme. Figuren er modifisert etter Song *et al.* (2005)

3.5.2 Protokoll for transformasjon av *S. pneumoniae*

1. Bakteriekulturen ble fortynt i C-medium til en $OD_{550} \sim 0,05$ eller lavere
2. Bakteriekulturen ble inkubert på 37 °C vannbad i 15 – 20 minutter, eller til OD_{550} var mellom 0,05 og 0,1. Bakteriekulturen med volum 1 ml ble indusert med CSP-1 (250 ng/ml), og tilsatt 0,5-1 µg/ml DNA for transformasjon. Det ble også benyttet en negativ kontroll; 1 ml kultur indusert med 250 ng/ml CSP-1, men uten tilsatt DNA. Kulturene ble inkubert i 2 timer på vannbad ved 37 °C.
3. Transformanter ble selektert ved utplating (20µl og 100µl kultur) på TH-agarskåler med aktuelt antibiotikum i konsentrasjon (Tabell 2.7) Skålene ble inkubert anaerobt over natt ved 37 °C.
4. Dagen etter ble eventuelle transformanter plukket med sterile tannpirkere og dyrket opp i C-medium tilsatt antibiotika. Når cellene var i god eksponentiell vekst ble det laget frysestokker av kulturene.
5. Verifisering av transformanter ble gjort ved PCR (jf. avsnitt 3.2.2) og sekvensering (jf. avsnitt 3.6)

Før plukking av transformanter (jf. punkt fire) ble det gjort en sammenligning av veksten på positive og negative skåler. Dersom det var vekst på den negative skålen kunne det være en indikasjon på at kulturen var resistent fra før av eller at det var en blandingskultur. Det kunne også være en indikasjon på at agarskålene ikke hadde riktig konsentrasjon av aktuelt antibiotika, eller at antibiotika var blitt degradert under støping av skålene (for eksempel ved for høy temperatur av mediet).

3.6 DNA-sekvensering:

På 1970-tallet ble det utviklet metoder for sekvensering av DNA. Ved sekvensering kan man bestemme baserekkefølgen i DNA. Sekvensering blir blant annet brukt til å kontrollere nye kloner, til å sjekke PCR-produkter og til å identifisere mutasjoner (Sambrook & Russel 2001). Maxam og Gilbert (1977) publiserte en DNA-sekvenseringsteknikk som var basert på selektiv modifikasjon og degradering av basene i DNA ulike med kjemiske reagenser, men den teknikken som brukes mest i dag er Sangermetoden (jf. Sanger *et al.* 1977).

I sekvenseringsreaksjoner benyttes DNA-polymerase, en syntetisk oligonukleotidprimer, templat, deoksynukleotider (dNTP) og dideoksynukleosider (ddNTP) som er merket med et fluorokrom. De fire ddNTPene ddATP, ddGTP, ddCTP og ddTTP er merket med hver sitt

fluorokrom. ddNTP er analog til dNTP og kan inkorporeres i DNA-kjeden av DNA-polymerase. ddNTP mangler, i motsetning til dNTP, en 3'OH-gruppe. Dette gjør at når ddNTP inkorporeres i DNA-tråden, kan den ikke danne fosfodiesterbindinger med nye dNTP, og videre syntese av DNA termineres. Det er en lavere konsentrasjon av ddNTP i sekvenseringsreaksjonen i forhold til dNTP, og det vil være tilfeldig hvor ddNTP inkorporeres i den nysyntetiserte DNA-tråden. Resultatet av sekvenseringsreaksjonen er mange fragmenter av ulike lengder, der den 5'ende er lik og 3'ende avslutter med ddNTP (Sambrook & Russel 2001). Fragmentene separeres basert på størrelse i en sekvensator som detekterer fluorokromet til ddNTP og bestemmer baserekkefølgen til sekvensene.

3.6.1 Protokoll for DNA-sekvensering

I dette arbeidet ble sekvensering utført for å kontrollere om nye kloner hadde den ønskede sekvens av det klonede DNA.

1. Følgende reagenser ble blandet i et PCR-rør:

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
2 µl BigDye Sequencing Terminator	
3 µl 5x Sequencing Buffer	
x µl	3,2 pmol primer
x µl templat-DNA	50–500 ng
x µl MQ-vann (til 20 µl)	

2. Sekvenseringsreaksjonen ble utført i en termosyklus på følgende program:

Trinn	Temperatur og tid
1. Denaturering	96 °C, 30 sekunder
2. Primerhybridisering	50 °C, 15 sekunder
3. Elongering	60 °C, 4 minutter
4. Gå til trinn 1) 25 ganger	
5. Midlertidig oppbevaring i termosyklus	4 °C, ∞

3. Felling av ekstensjonsproduktet ble utført for å konsentrere og rense DNA i fra rester av primere og nukleotider fra sekvenseringsreaksjonen i trinn 2.

- a. De 20 μ l templat fra trinn 2 ble tilsatt 2 μ l 125 mM EDTA, 2 μ l 3 M NaAc (pH 5,2) og 52 μ l 96 % EtOH
- b. Løsningen ble inkubert 15 minutter ved romtemperatur og deretter sentrifugert 30 minutter ved 15 000 x *g* ved 4 °C.
- c. Supernatanten ble fjernet, og pelleten vasket med 200-400 μ l 70 % EtOH ved å pipettere etanolen sakte ned langs kanten på røret på motsatt side av pelleten, og deretter pipettert sakte av igjen.
- d. Pelleten ble tørket, og deretter lagret ved - 20 °C fram til sekvensering.

Sekvenseringen ble utført på Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), UMB. Senere ble sekvenseringen utført av GATC Biotech.

3.7 Depletion av genekspresjon i *S. pneumoniae*

Som beskrevet i innledningen (avsnitt 1.4) gjør depletionsystemet konstruert av Berg *et al.* (2011) det mulig å studere essensielle gener i *S. pneumoniae* ved å uttrykke dem ektopisk fra en titrerbar promotor. I dette arbeidet ble depletionsystemet anvendt til å studere genene *pbp1a* [*spr0329*], *pbp1b* [*spr1909*], *pbp2a* [*spr1823*], *pbp2b* [*spr1517*] og *pbp2x* [*spr0304*]. Det ble konstruert dobbelknockoutmutanter for å forsøke å studere samspillet mellom de ulike proteinene. Mutantene ble undersøkt med hensyn på veksthastighet og morfologi. Depletion av de essensielle genene *pbp2b* og *pbp2x* ble gjort i $\Delta pbp1a$, $\Delta pbp2a$ og $\Delta pbp1b$ bakgrunn. Det ble også utført depletion av *pbp1a* i $\Delta pbp2a$ bakgrunn, og depletion av *pbp2a* i $\Delta pbp1a$ bakgrunn. Se Tabell 2.2 for fullstendig oversikt over mutantene som ble konstruert i dette arbeidet, samt en kort beskrivelse av hvordan de ble konstruert.

Bakteriekulturene ble først dyrket i vekstmedium tilsatt ComS* før kulturene ble vasket to ganger i medium uten tilsatt ComS*. Innledende forsøk utført på laboratoriet har vist at to vask av cellene ikke er tilstrekkelig for å få fjernet alt ekstracellulært ComS* (Berg *et al.* 2011). Som omtalt innledningsvis (avsnitt 1.4.1) tok det lengre tid enn forventet fra kulturen ble overført til et medium uten ComS* til det ble observert en depletionseffekt med hensyn på vekst. Dette kan tyde på at ComS* blir langsomt brutt ned i cellen, enten ved at det blir en fortyningseffekt ved celledeling eller at ComS* blir brutt ned av peptidaser. Ved depletioneksperimentene ble det laget 2-fold fortynningsrekker av bakteriekulturene slik at man kunne oppnå en fortyningseffekt av ComS* når cellene delte seg.

3.7.1 Protokoll for oppsett til depletion av *S.pneumoniae*:

1. Bakteriekulturen ble fortynnet i dagfersk og sterilfiltrert C-medium til $OD_{550} \sim 0,05$. Ved behov ble $0,2 \mu\text{M}$ eller $0,02 \mu\text{M}$ ComS* tilsatt mediet.
2. Kulturene ble inkubert i vannbad på $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i 1,5 time eller til $OD_{550} \sim 0,3$.
3. Cellene ble høstet ved sentrifugering ($3000 \times g$) i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten ble deretter vasket to ganger med C-medium for å fjerne overflødig ComS*; cellepelletten ble resuspendert i C-medium, overført til eppendorfrør og spunnet ned i bordsentrifuge ved $3000 \times g$ i 2,5 minutter.
4. Den vaskede bakteriekulturen ble inokulert i C-medium til $OD_{492} \sim 0,04$ og det ble laget en 2-fold fortynningsrekke. Ved uttak til mikroskopi (avsnitt 3.9.1.1.) ble fortynningsrekkene laget med større volum som ble dyrket under tilnærmet samme forhold som uttaket til mikrotiterplata, jf. punkt fem.
5. Fra hver fortynning ble det overført $300 \mu\text{l}$ til to parallelle brønnrekker i en 96 brønners mikrotiterplate (Corning). I en rekke ble det ikke tilsatt ComS*, i den parallelle rekken ble det på forhånd tilsatt ønsket konsentrasjon av ComS*.
6. I en brønn ble det tilsatt $300 \mu\text{l}$ rent C-medium som blank.
7. Platen ble inkubert ved $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i et Fluostar Optima luminometer (BMG Labtech) som måler både absorbans og luminescence. Maskinen ble programmert til å måle OD_{492} hvert 10 minutt i totalt 20 timer.

Ved uttak til mikroskopi av kulturene ble protokoll for differensiell interferens kontrast (DIK)-mikroskopi fulgt (avsnitt 3.9.1.1).

3.7.2 Beregning av doblingstid

Doblingstid er den tiden det tar før en bakteriekultur har blitt doblet i antall celler. Etter gjennomføringen av vekstforsøkene ble det gjort beregninger av doblingstiden til de ulike mutantene for å kunne få en bedre sammenligning med hensyn på veksthastighet. Beregning av doblingstiden ble gjort ved å se hvor lang tid det tok fra bakteriekulturen hadde en celletetthet (OD_{492}) på 0,2 til den nådde en celletetthet på 0,4.

3.8 Luciferase genreporterassay og vekststudier

Et reporterassay kan benyttes for å måle transkripsjonsraten til et gen ved å benytte et reporter-gen som gir en målbar egenskap hos bakterien. I dette arbeidet ble det benyttet et reporter-gen, *luc*, som baserer seg på luciferaseaktivitet. *luc*-genet stammer fra den amerikanske ildfluen *Photinus pyralis*. *luc*-genet kan transformeres inn rett nedstrøms for ønsket gen eller promotor i genomet, det kan også settes inn i en plasmidvektor. Enzymet luciferase kodes for av *luc*. Luciferase spalter D-luciferin til oxyluciferin, og samtidig skjer det en eksitasjon av lys (luminescens) som kan måles ved bølgelengde 590 nm (ThermoScientific). Verdien av luminescens er proporsjonal med transkripsjonsraten, og det gir et mål på transkripsjonsraten til *luc*-genet, og samtidig et indirekte mål på transkripsjonsraten til ønsket gen, eller aktiviteten til ønsket promotor.

I dette arbeidet ble luminescensmålinger benyttet for å undersøke transkripsjonsraten av *pbp1a* og *pbp2a* ved depletion av *pbp2b* i $\Delta pbp2b$ - og $\Delta pbp1a$ -bakgrunn. *luc*-konstruktet ble laget ved overlap extension (jf. avsnitt 3.2.3) og ble transformert inn istedenfor Januskassetten ($\Delta janus::luc$).

3.8.1 Protokoll for oppsett til luciferase genreporterassay:

1. Protokoll for oppsett til depletion (avsnitt 3.7.1) ble fulgt fram til punkt fem.
2. Fra hver fortykning ble det overført 280 μ l til to parallelle brønnrekker i en 96 brønners mikrotiterplate (Corning). Til hver av brønnene ble det tilsatt 20 μ l luciferin. I en rekke ble det ikke tilsatt ComS*, i den parallelle rekken ble det på forhånd tilsatt ønsket konsentrasjon av ComS*.
3. I en brønn ble det tilsatt 280 μ l rent C-medium som blank, og 20 μ l luciferin.
4. Platen ble inkubert ved 37 °C i et Fluostar Optima luminometer (BMG Labtech) som måler både absorbans og luminescens. Maskinen ble programmert til å måle celletetthet ved OD₄₉₂, og luminescens ved OD₅₅₀ hvert 10 minutt.

3.9 Lysmikroskopi

Lysmikroskopi har lenge vært brukt til å studere morfologien til mikroorganismer. Begrensningene for lysmikroskopets oppløsningsevne ligger i lysets bølgelengde. Oppløsningen i mikroskopet kan ikke bli større enn halve bølgelengden ($\lambda/2$), og siden den korteste bølgelengden for synlig lys er omtrent 400 nm (0,4 μm) begrenses mikroskopets oppløsningsevne til 0,2 μm . Oppløsningsevnen til menneskets øye er begrenset til 0,2 mm, og for å se en streptokokk på ca 2,0 μm må man bruke 1000 x forstørrelse. På grunn av den begrensede oppløsningen så vil ikke en høyere forstørrelse enn dette gi mer informasjon – vi får såkalte tomme forstørrelser (FEI-Company 2006). I tillegg til oppløsning og forstørrelse er også kontrasten i bildet viktig for å kunne skjelne detaljer i prøven. Kontrasten kan økes ved farging av prøven, eller ved å bruke optiske kontrastforbedringsteknikker.

3.9.1 Differensiell interferens kontrast (DIK)-mikroskopi

DIK utnytter faseforandringer av lyset når det passerer prøven. For bakterieceller vil den største faseforskjellen være i kanten av cellene, cellene vil dermed framstå som mørkere enn omgivelsene, og det vises som en tredimensjonallignende skyggeeffekt (Davidson & Abramowitz). I dette arbeidet ble differensiell interferens kontrast (DIK)-mikroskopi i første omgang benyttet for å se en eventuell fenotype hos mutantene, nærmere studier av pneumokokkene ble gjort ved elektronmikroskopi (avsnitt 3.10). Fordi oppløsningen ved bruk av lysmikroskopi er på grensen av det som er mulig for å studere detaljer om pneumokokkenes morfologi, er elektronmikroskopi et bedre alternativ.

3.9.1.1 Protokoll for DIK

1. Depletion av kulturene i fortynningsrekkene ble fulgt ved å se på vekstkurvene målt av Fluostar Optima luminometer (avsnitt 3.7.1).
2. Ved ønsket tidspunkt ble celler fra fortynningsrekkene tatt ut og fiksert med en fikseringsbuffer bestående av paraformaldehyd og glutardialdehyd. Til 1000 μl kultur ble 400 μl fikseringsløsning ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 2,5 % paraformaldehyd og 0,006 % glutardialdehyd. Cellene ble fiksert på is i 30 – 60 minutter eller over natt ved 4 °C.

3. For å studere cellene ble mikroskopi utført med Zeiss LSM 700 mikroskop. I dette arbeidet ble et 63 x objektiv benyttet fordi optikken er bedre enn 100 x objektivet. Det ble i tillegg benyttet digital forstørrelse.

3.10 Elektronmikroskopi

For å studere objekter som er mindre enn 0,2 μm , som for eksempel detaljer i morfologien til pneumokokkene, kan man benytte elektronmikroskop. Her benyttes elektroner som strålingskilde. Akselererte elektroner i vakuum oppfører seg som lys, men bølgelengden kan være opptil 100 000 ganger mindre enn bølgelengden til synlig lys. Dette gjør at man ved elektronmikroskopi kan oppnå mye høyere oppløsningsevne, og komme opp i mye høyere forstørrelser enn ved lysmikroskopi.

3.10.1 Skanning-elektronmikroskopi (SEM)

Med SEM kan man studere overflatedetaljer til cellene. Ved SEM skannes overflaten av prøvene punkt for punkt med en tynn elektronstråle ($< 4\text{nm}$). Sekundære elektroner slås ut av atomene på overflaten av objektet, og detekteres av en detektor som igjen omformer signalene til et bilde. Ut ifra disse signalene fra de sekundære elektronene kan man få informasjon om topografien av objektets overflate (FEI-Company 2006). For å forhindre at bakterier kollapser i vakuumkammeret, og for å bevare overflatestrukturene, må bakteriene først fikseres, dehydreres og tørkes (Willey *et al.* 2009). For å få et kraftigere signal fra sekundærelektronene kan prøvene coats (belegges) med et tynt lag med gull. Gull avgir mange sekundære elektroner som igjen gir et godt bilde. SEM kan gi 400 000x forstørrelser og en oppløsningsevne ned i 1 nm (FEI-Company 2006).

3.10.1.1 Protokoll for SEM

1. Preparering av cellene:
 - a. Fikserte celler ble høstet ved sentrifugering (3000 x g , 5 minutter) og vasket i PBS (pH til 7,4), 3x 10 minutter. De vaskede cellene ble overført til hvert sitt dramsglass.
 - b. Runde dekkglass (8 mm) ble ladet ved å gni dem i linsepapir, coatet med polylysin i ca 30 sekunder, og latt tørke på et filterpapir. Polylysinen gir

- dekkglassene en positiv ladning som hjelper å binde negativt ladde bakterieceller.
- c. Dekkglassene ble plassert i hvert sitt dramsglass inneholdende fikserte celler og inkubert i 30 minutter for at cellene i kulturen skulle feste seg til dekkglasset.
2. Dehydrering:
 - a. Cellene (nå festet til dekkglassene) ble dehydrert i økende konsentrasjon av EtOH. Utskiftning av væske ble utført ved pipettering på/av.
 - i. 70 % EtOH 1x 10 minutter
 - ii. 90 % EtOH 1 x 10 minutter
 - iii. 96 % EtOH 1 x 10 minutter
 - iv. 100 % EtOH 4 x 10 minutter
 - b. Dekkglassene ble oppbevart i 100 % EtOH fram til kritisk punkt tørking.
 3. Tørking av celler: I kritisk punkttørkeren tørkes prøvene ved at all væske fjernes fra prøvene. EtOH i kammeret byttes først ut med CO₂ (l). Ved riktig temperatur og trykk går væsken i prøven direkte over fra væske- til gassfase (sublimering, CO₂ (l) → CO₂ (g)), og prøvene blir skånsomt tørket.
 - a. Dekkglassene ble overført til et stativ fylt med 100 % EtOH. Stativet ble videre montert i et kammer med 100 % EtOH i Kritisk Punkt Tørkeren. Prøvene var dekket av 100 % EtOH hele tiden.
 - b. Protokoll for kritisk punkt tørking ble fulgt uten modifiseringer.
 - c. Ferdig tørkede prøver ble montert på stubber med dobbeltsidig karbontape.
 4. Coating og mikroskopi av celler:
 - a. Prøvene ble coatet (belagt) med gullpalladium i en sputtercoater (Polaron Range).
 - b. SEM-mikroskopi ble utført av Avdelingsingeniør Elin Ørmen på Mikroskopilaboratoriet, Institutt for plante- og miljøvitenskap, UMB.

I dette arbeidet ble DIK-mikroskopi og SEM benyttet for å studere effekten av et redusert nivå av ektopisk uttrykte gener (*pbp2a*, *pbp1a*, *pbp2x* og *pbp2b*) i sine respektive mutanter. Celler som ble dyrket med og uten ComS* ble sammenlignet ved DIK-mikroskopi. SEM-mikroskopi ble brukt for å studere morfologiske detaljer til noen av mutantene.

4. Resultater

4.1 Depletion av *pbp2a* og *pbp1a*

Rollene til klasse A PBPene (PBP1a, PBP1b og PBP2a) i celleveggsyntesen hos *S. pneumoniae* er ikke fullstendig klarlagt (Sham *et al.* 2012), men flere arbeider har fokusert på å få mer informasjon om deres funksjon. Som nevnt i innledningen har eksperimenter gjort av Hoskins *et al.* (1999) og Paik *et al.* (1999) vist at ingen av klasse A PBPene er essensielle for pneumokokker. Det har også vært gjort forsøk med dobbelmutanter av *pbp1a* og *pbp1b*, og av *pbp1a* og *pbp2a*. Dobbelmутanten $\Delta pbp1a\Delta pbp1b$ var levedyktig, men dobbelmутanten $\Delta pbp1a\Delta pbp2a$ viste seg derimot å ikke være levedyktig (Hoskins *et al.* 2001; Paik *et al.* 1999). Paik *et al.* (1999) gjorde i tillegg undersøkelser med dobbelmutanter av *pbp1b* og *pbp2a*. Resultatene viste at pneumokokker var levedyktige med inaktivering av både *pbp1b* og *pbp2a*, noe som tyder på at disse ikke er essensielle i pneumokokker. Begge disse studiene tyder på at enten PBP1a eller PBP2a må være funksjonell for at *S. pneumoniae* skal være levedyktig *in vitro* (Hoskins *et al.* 1999; Paik *et al.* 1999).

Som omtalt innledningsvis har Land & Winkler (2011) sitt arbeid med MreCD og PBP1a gitt en indikasjon på at disse proteinene er en del av den perifere celleveggsyntesen hos pneumokokker. Morlot *et al.* (2003) sine lokaliseringseksperimenter ga en indikasjon på at PBP1a hører til i den septale syntesen, og at PBP1b kan høre til i både den septale og den perifere syntesen. Samme undersøkelse tydet på at PBP2a hører til i det perifere celleveggsyntesemaskineriet (Morlot *et al.* 2003). Dette har ført til en teori om at PBP1a kan høre til både i den septale og den perifere celleveggsyntesen, jf. fig 1.7 (Sham *et al.* 2012).

I dette arbeidet var det ønskelig å undersøke eventuelle forskjeller mellom PBP1a og PBP2a. På grunn av tidsbegrensning ble det valgt å gjøre undersøkelser kun med hensyn på fenotypene vekst og morfologi. ComRS-systemet gjør det mulig å konstruere depletionmutanter med dobbelknockout av *pbp1a* og *pbp2a* ved at ett av genene samtidig blir ektopisk uttrykt. Med begrepet depletionmutant menes det her at det aktuelle genet blir ektopisk nedregulert (depletet) fra P_{comX} mens det native genet er slått ut med en Januskassett (for eksempel blir *pbp2a* ektopisk uttrykt fra P_{comX} i en *pbp2a*-depletionmutant). ComRS-systemet gjør det også mulig å studere vekst og morfologi hos mutantene ettersom uttrykket av det ektopiske genet reguleres ned. For å komme nærmere et svar på om PBP1a eller PBP2a har en likestilt rolle i celleveggsyntesen hos *S. pneumoniae*, eller om den ene er mer viktig enn den andre, ble det konstruert depletionmutanter av hvert av genene som koder for disse

proteinene. Fra *pbp2a*-depletionmutanten ble det konstruert en dobbelknockout-mutant i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn, og fra *pbp1a*-depletionmutanten ble det konstruert en dobbelknockout-mutant i $\Delta pbp2a$ -bakgrunn.

”Depletion” er et engelsk uttrykk som i denne sammenhengen brukes for å beskrive gradvis nedregulering av ektopisk uttrykk av et gen. I mangel på et godt norsk uttrykk som er dekkende for dette, vil ”depletion” her bli benyttet med tilnærming til det norske språk ved bøyning av ordet.

Resultatene blir her framstilt med et utdrag av fortynningsrekkene fra depletion-eksperimentene. Vedlegg B inneholder fullstendige vekstkurver for hver mutant.

4.1.1 Depletion av *pbp2a* i en $\Delta pbp1a$ -bakgrunn

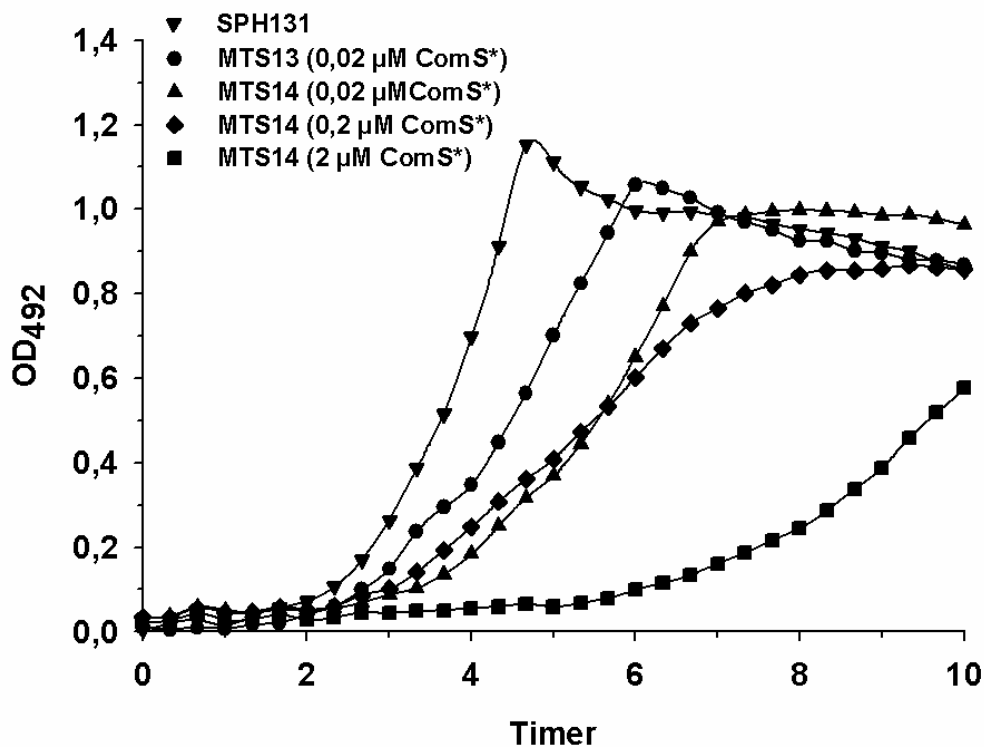
Det ble gjort depletionforsøk med *pbp2a* i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn for å se om depletion av *pbp2a* påvirket veksten og morfologien til *S. pneumoniae*. Konstruksjon av *pbp2a*-depletionmutanten ble gjort på følgende måte: *pbp2a* ble transformert inn bak P_{comX} -promotoren i SPH131 med et PCR-fragment konstruert som forklart i avsnitt 3.2.3 og Figur 3.2. Den resulterende stammen (MTS11) ble videre transformert med en Januskasset for å erstatte det native genet *pbp2a_{wt}*, denne Januskassetten ble så fjernet (MTS13; $P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a$). Til slutt ble det native *pbp1a_{wt}*-genet slått ut med en Januskasset og resulterte i stammen MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a$ $\Delta pbp1a$). Ved transformasjon av MTS13 ble det tilsatt 0,02 μ M ComS* for å aktivere P_{comX} -promotoren til å uttrykke *pbp2a*.

Depletion av kulturene ble utført etter protokoll (3.7.1). Kort oppsummert ble MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a$ $\Delta pbp1a$) dyrket i C-medium tilsatt 0,02 μ M ComS*. Cellene ble høstet ved sentrifugering og vasket to ganger for å fjerne ekstracellulært ComS*. Cellene ble deretter resuspendert i C-medium uten ComS* til en OD_{492} ~0,04 før det ble laget en to-fold fortynningsrekke i eppendorfrør med C-medium. Som nevnt tidligere (jf. avsnitt 3.7) er ikke to vask av cellene nok til at man klarer å fjerne alt ekstracellulært ComS*. Det er også mulig at konsentrasjonen av ComS* er bevart intracellulært, og at ComS* brytes langsomt ned. For å oppnå en depletioneffekt lager man en 2-fold fortynningsrekke av kulturene slik at man kan oppnå en fortyningseffekt av ComS* når cellene deler seg.

Fortynningsrekken ble så overført til en mikrotiterplate i paralleller som inneholdt 0 μ M, 0,02 μ M, 0,2 μ M eller 2,0 μ M ComS*. 2,0 μ M ComS* antas å gi et overuttrykk av *pbp2a*. Platen

ble så inkubert i FluoStar Optima (BMG LabTech) plateavleser ved 37 °C. Vekst av kulturene tilsatt ulike ComS*-konsentrasjoner ble fulgt hvert 10. minutt ved absorbansmåling (OD₄₉₂). Både SPH131 og MTS13 ble brukt som kontroller da SPH131 har begge de native *pbp2a*- og *pbp1a*-genene intakt, og MTS13 har det native *pbp1a*-genet intakt i genomet.

Vekstkurvene for fortytning fire er vist i Figur 4.1, en oversikt over doblingstider beregnet ut ifra denne figuren er vist i Tabell 4.1. Fra vekstforsøkene går det fram at MTS14 ($P_{comX}::pbp2a, \Delta pbp2a_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$) tilsatt 2,0 μM ComS* har veldig lav veksthastighet sammenlignet med kontrollen. Mutanten har en doblingstid på 90 minutter i første fortytning, mens SPH131 ($P_{comX}::janus$) i samme fortytning har en doblingstid ~40 minutter (data ikke vist). I fjerde fortytning var doblingstiden til MTS14-kulturen tilsatt 2,0 μM ComS* omtrent 90 minutter lengre enn tilsvarende hos SPH131 (Fig 4.1 og Tab 4.1).



Figur 4.1 Veksthastighet av kulturer tilsatt ComS* av SPH131, MTS13 og MTS14. Fra bakteriekulturer med OD₄₉₂ ~0,04 ble det laget 2-fold-fortynningsrekker av SPH131 ($P_{comX}::pbp2a$), MTS13 ($P_{comX}::pbp2a, \Delta pbp2a_{wt}$) og MTS14 ($P_{comX}::pbp2a, \Delta pbp2a_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$). Fortynningsrekkeene ble overført til en 96-brønners plate og inkubert ved 37 °C i en mikrotiteravleser (FLUOstar PTIMA, BMG Labtech). Celletettheten (OD₄₉₂) ble målt hvert 10. minutt i totalt 20 timer. Figuren viser kun kulturer tilsatt ComS* fra fjerde fortytning og et utdrag på ti timer. Figuren viser veksthastigheten til SPH131 (trekanter med spiss ned), MTS13 (sirkler), og MTS14 tilsatt 0,02 μM ComS* (trekant spiss opp), og 0,2 μM ComS* (diananter) 2,0 μM ComS* (firkanter). Utvalget som er presentert her er representativt for fire uavhengige oppsett.

Fra Figur 4.1 og Tabell 4.1 går det fram at ved fjerde fortytning har MTS13 ($P_{comX::pbp2a}$, $\Delta pbp2a_{wt}$) omtrent 10 minutter lengre doblingstid enn SPH131. For MTS14 ga tilsetning av 0,2 μM eller 0,02 μM ComS* tilnærmet lik veksthastighet, men doblingstiden for disse var ca 30 minutter lengre enn for SPH131 i tilsvarende fortytning. Ingen av ComS*-konsentrasjonene som ble tilsatt kulturene ga tilsvarende doblingstid som kontrollstammen SPH131. Ved å bruke en tettere titreringsrekke med ulike ComS*-konsentrasjoner kunne man trolig funnet en mer optimal ComS*-konsentrasjon som gav et uttrykk av det ektopiske $pbp2a$ -genet som i større grad kompenserte for tapet av villtypegenene i MTS13 og MTS14.

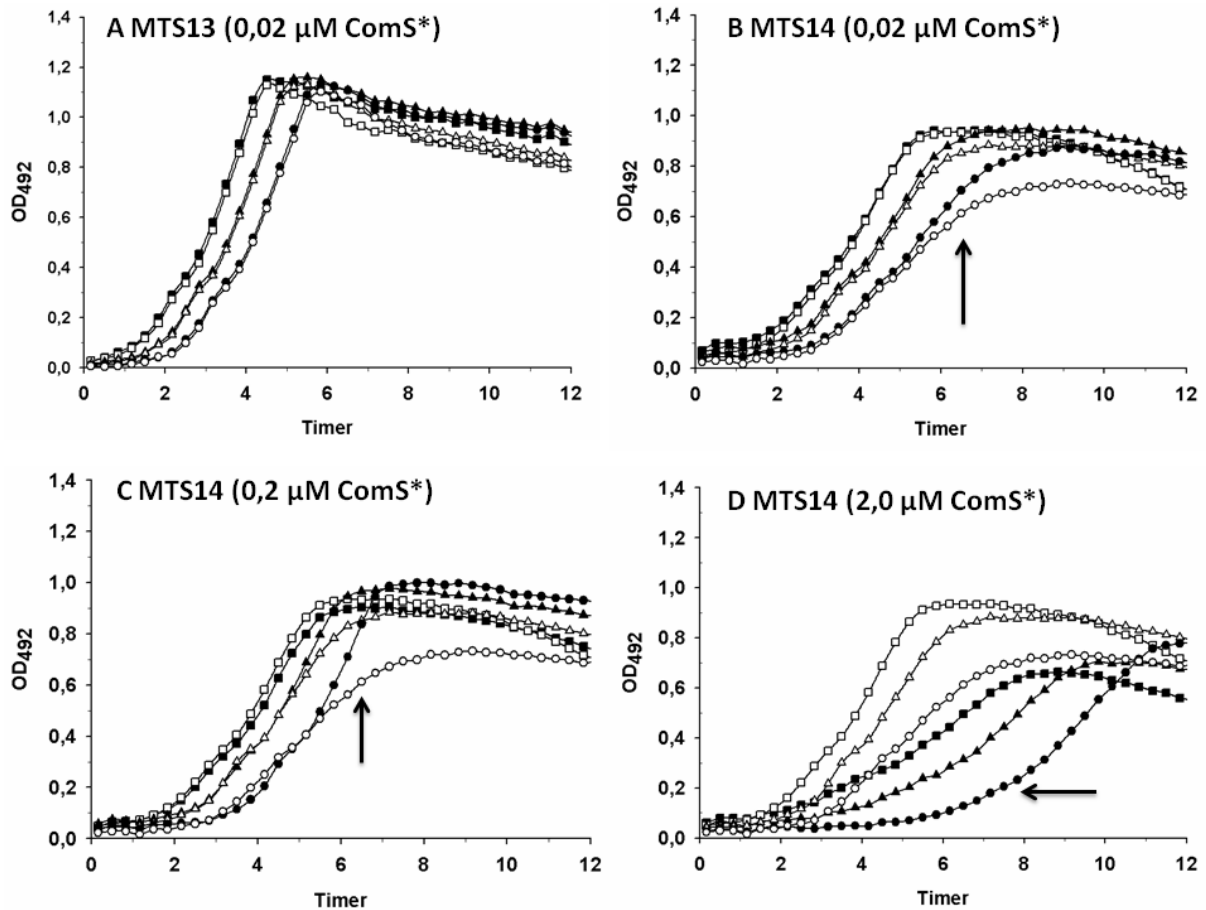
Tabell 4.1 Beregning av doblingstid. Doblingstiden er beregnet ut ifra tiden det tok fra kulturene hadde en celletetthet (OD_{492}) på $\sim 0,2$ til $\sim 0,4$. Beregninger er gjort for fjerde fortyttingsrekke. SPH131 er utgangsstammen for MTS13 ($P_{comX::pbp2a}$, $\Delta pbp2a_{wt}$) og MTS14 ($P_{comX::pbp2a}$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$), og doblingstiden for denne er tatt med som kontroll.

Kulturer	Doblingstid
SPH131	~ 40 minutter
MTS13 (0 μM ComS*)	~ 50 minutter
MTS13 (0,02 μM ComS*)	~ 50 minutter
MTS14 (0 μM ComS*)	~ 80 minutter
MTS14 (0,02 μM ComS*)	~ 70 minutter
MTS14 (0,2 μM ComS*)	~ 70 minutter
MTS14 (2,0 μM ComS*)	~ 130 minutter

For å undersøke for hvordan depleksjon av $pbp2a$ påvirker veksthastigheten til MTS14 ($P_{comX::pbp2a}$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) og MTS13 ($P_{comX::pbp2a}$, $\Delta pbp2a_{wt}$) ble det fra disse kulturene også laget en parallell fortyttingsrekke uten tilsatt ComS*. Av vekstkurvene (Fig. 4.2B-D) går det fram at veksthastigheten av MTS14 ($P_{comX::pbp2a}$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) gradvis påvirkes når $pbp2a$ depletes fra cellene. En begynnende nedgang i veksthastighet ser man først i fjerde fortytning, fra sjettsjuende fortytning klarer ikke cellene å vokse opp (Vedlegg B.4). Fra kurvene (Fig. 4.2 B-D) ser man at ingen av kulturene tilsatt ComS* kommer opp i like høy maks- OD_{492} som MTS13 før cellene går inn i stasjonærfase.

Vekstkurven for MTS13 (Fig. 4.2A) tyder, som forventet, på at det ikke var noen effekt av fjerning av ComS* fra mediet. Beregninger viste også at doblingstiden er lik for kulturene

med og uten ComS* (Tabell 4.1). MTS13 går senere i autolyse enn SPH131 når cellene er i stasjonær fase (Vedlegg B.2 og B.3). Eksperimentet er gjennomført fire ganger med samme resultat.



Figur 4.2 Depletion av *pbp2a* i Δ *pbp1a* bakgrunn. Fra en OD₄₉₂ ~0,04 ble bakteriekulturer av MTS13 ($P_{comX}::pbp2a$, Δ *pbp2a*_{wt}) og MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, Δ *pbp2a*_{wt} Δ *pbp1a*_{wt}) 2-fold fortynnet i parallelle fortynningsrekker med og uten ComS*. Kulturene ble inkubert ved 37 °C i en mikroplateavleser (FLUOstar OPTIMA) og celletettheten (OD₄₉₂) ble målt automatisk hvert 10. min i totalt 20 timer. Vekstkurvene i figuren viser et utdrag på 12 timer av fortynningsrekke med fortynningene to (firkanter), tre (trekanter) og fire (sirkler). Alle kurvene viser kulturer tilsatt ComS* (svarte symboler) og kulturer uten ComS* (hvite symboler). (A) MTS13 (0,02 μM ComS*). For MTS14 ble det laget fortynningsrekker med ulike konsentrasjoner av ComS*; (B) MTS14 (0,02 μM ComS*), (C) MTS14 (0,2 μM ComS*) og (D) MTS14 (2,0 μM ComS*). Pilene indikerer tidspunktet hvor det ble tatt ut celler (både med og uten tilsatt ComS*) til mikroskopi fra fortynning fire, jf Figur 4.5. Eksperimentet ble utført fire ganger med samme resultat.

Ved depletion av *pbp2a* kan man se en tydelig reduksjon i veksthastighet når *pbp1a* er fjernet (MTS14), doblingstida for MTS14 var også betydelig lavere enn for MTS13 (*pbp2a*-enkelmutant)

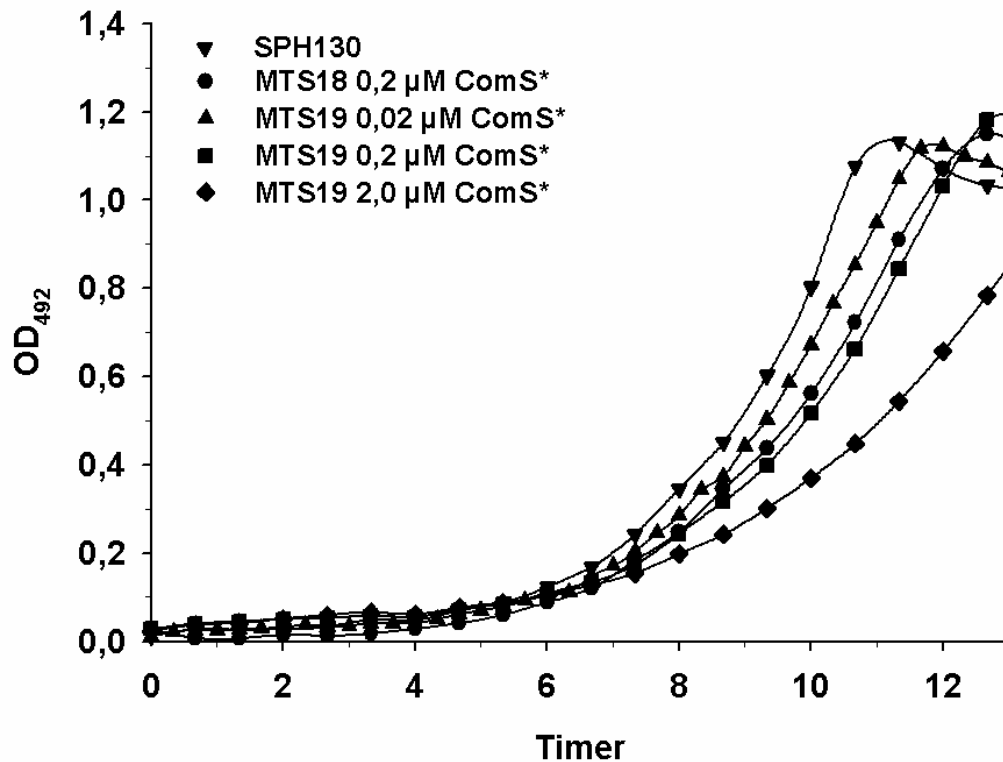
Diagrammer som viser en oversikt av samtlige fortynninger (1 - 12) i fortynningsrekka av kulturer som er dyrket med og uten ComS* er vist i Vedleggene B.1 – B.5. For MTS13 (Vedlegg B.2), MTS14 dyrket i 0,02 μM (Vedlegg B.3), MTS14 dyrket i 0,2 μM (Vedlegg 4) og MTS14 dyrket i 2 μM ComS* (Vedlegg B.5). Kontrollen SPH131 er vist i Vedlegg B.1.

4.1.2 Depletion av *pbp1a* i en $\Delta pbp2a$ -bakgrunn

Effekten av depletion av *pbp1a* på vekst etter fjerning av *pbp1a_{wt}* og *pbp2a_{wt}* ble deretter undersøkt. ComS* (0,2 μM) ble tilsatt mediet ved transformasjon av MTS18 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$) til MTS19 (hvor *pbp2a_{wt}* ble slått ut) for å ektopisk uttrykke *pbp1a*-genet med ComRS-systemet.

Som for MTS14 (avsnitt 4.1.1) var det også med *pbp1a*-depletionmutanten MTS19 ønskelig å finne ut ved hvilken ComS*-konsentrasjon ektopisk uttrykk av *pbp1a* fra P_{comX} ga en doblingstid som best mulig tilsvarte kontrollen. Eksperimentet ble utført etter protokoll, jf. 3.7.1. Det ble også her laget fire parallelle 2-fold fortynningsrekker fra MTS19 med $OD_{492} \sim 0,04$ som ble tilsatt 0 μM , 0,02 μM , 0,2 μM eller 2,0 μM ComS*.

Fra vekstkurven (Fig. 4.3) og Tabell 4.2 ser man at MTS18 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$) tilsatt ComS* og MTS19 tilsatt 0,02 μM eller 0,2 μM ComS* har en doblingstid som er om lag ti minutter lengre enn kontrollen SPH130. MTS19 tilsatt 2,0 μM ComS* har en doblingstid på omtrent 60 minutter, 20 minutter lavere doblingstid enn SPH130.



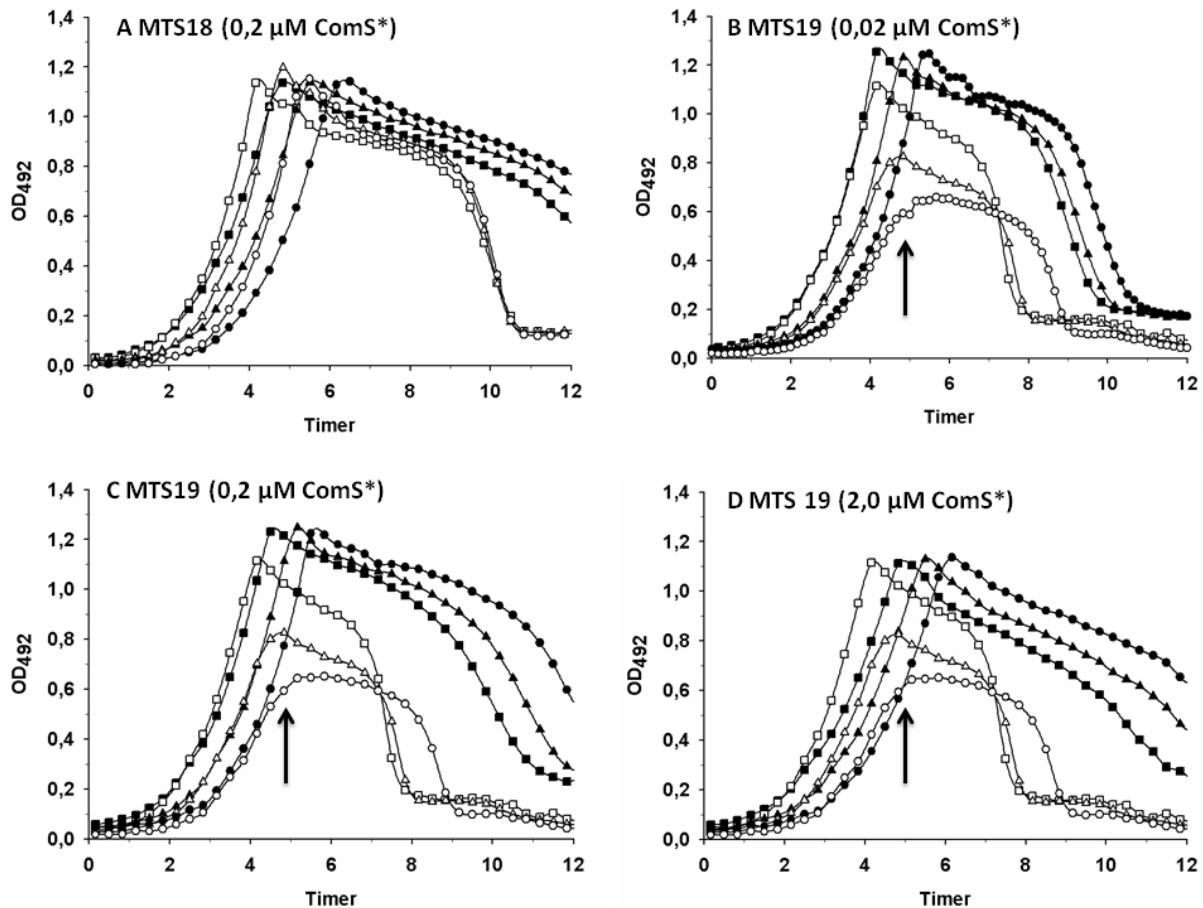
Figur 4.3 Veksthastigheten til kulturer av SPH130, MTS18 og MTS19 dyrket i medium med ComS*. Fra bakteriekulturer av SPH130, MTS18 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$) og MTS19 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$ $\Delta pbp2a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$ ble det laget 2-fold fortynningsrekker. Fortynningsrekkeene ble overført til en 96-brønners plate og inkubert ved 37 °C i en mikrotiteravleser (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech). Celletettheten (OD_{492}) ble målt hvert 10. minutt i totalt 20 timer. Figuren viser kun et utdrag på tolv timer fra fjerde fortynning. Trekant spiss ned indikerer SPH130, sirkler indikerer MTS18 tilsatt 0,2 μM ComS*, trekant spiss opp indikerer MTS19 med 0,02 μM ComS*, firkanter indikerer MTS19 tilsatt 0,2 μM ComS* og diamanter indikerer MTS19 tilsatt 2,0 μM ComS*.

Tabell 4.2 Dobblingstid til MTS18 og MTS19. Dobblingstiden er beregnet ut ifra hvor lang tid det tok fra kulturene hadde en celletetthet(OD_{492}) på $\sim 0,2$ til $\sim 0,4$. SPH130 er utgangsstammen for MTS19, og doblingstid for denne mutanten er tatt med i tabellen som kontroll.

Kulturer	Dobblingstid
SPH130	~ 40 minutter
MTS18 (0 μM ComS*)	~ 40 minutter
MTS18 (0,2 μM ComS*)	~ 50 minutter
MTS19 (0 μM ComS*)	~ 60 minutter
MTS19 (0,02 μM ComS*)	~ 50 minutter
MTS19 (0,2 μM ComS*)	~ 50 minutter
MTS19 (2,0 μM ComS*)	~ 60 minutter

MTS19 ($P_{comX::pbp1a}, \Delta pbp1a_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$) og MTS18 ($P_{comX::pbp1a}, \Delta pbp1a_{wt}$) ble overført til medium uten ComS* og effekten av depletion av *pbp1a* ble undersøkt. Vekstkurvene i Figur 4.4 viser et utdrag med fortyningene hvor man best kan sammenligne endring i veksthastighet mellom kulturene uten ComS* og kulturene tilsatt ulike ComS*-konsentrasjoner. For MTS19 (Fig. 4.4 B og C) ser man at i andre fortytning kommer ikke kulturen uten ComS* opp i like høy maks-OD₄₉₂ som kulturene tilsatt ComS*. Kulturen uten tilsatt ComS* går raskt i lysis etter stasjonærfase, og fra sjette fortytning klarer ikke kulturen å vokse opp (Vedlegg B.8). Fra vekstkurvene kan man også se at MTS19 uten tilsatt ComS* går raskere i autolyse etter stasjonærfasen sammenlignet med kulturene tilsatt ComS*.

Vekstkurven til MTS18 (Fig. 4.4 A) viser kultur tilsatt 0,2 μ M ComS* sammenlignet med depletet kultur. Av vekstkurven går det fram at kulturen tilsatt ComS* vokser noe senere enn kulturen uten ComS*, beregninger viste at doblingstiden til kultur tilsatt ComS* var omtrent 10 minutter lengre enn doblingstiden til depletet kultur (Tabell 4.2). Dette tyder på at det ektopiske uttrykket av *pbp1a* i MTS18-kulturen tilsatt ComS* gir en veksthastighet som ikke korrelerer med veksthastigheten til villtypestammen. En tettere titrering med flere ComS*-konsentrasjoner kunne kanskje gitt oss en vekst nærmere villtypestammen. Den depletete kulturen av MTS18 ($P_{comX::pbp1a}, \Delta pbp1a_{wt}$) har ca 60 minutter kortere stasjonærfase enn kulturen dyrket i ComS*, dette ble ikke observert for MTS13 (Fig. 4.2A) hvor *pbp1a_{wt}* ikke er fjernet fra genomet.



Figur 4.4 Depletion av *pbp1a*. Det ble laget 2-fold fortynningsrekker fra bakteriekulturene MTS18 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$) og MTS19 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$ $\Delta pbp2a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Fortynningsrekke ble overført til en mikrotiterplate som ble dyrket ved 37 °C i en mikroplateavleser (FLUOstar OPTIMA). Celletetthet (OD_{492}) ble målt automatisk hvert 10. min. Vekstkurvene viser et utdrag med fortynningene 2 (firkanter), 3 (trekanter) og 4 (sirkler). Alle kurvene viser kulturer tilsatt ComS* (svarte symboler) og kulturer tilsatt ComS* (hvite symboler). (A) MTS18 med og uten tilsatt 0,2 μ M ComS*. For MTS19 ble det laget fortynningsrekker med ulike konsentrasjoner av ComS*: (B) MTS19, 0,02 μ M ComS*, (C) MTS19, 0,2 μ M ComS* og (D) MTS19, 2,0 μ M ComS*. Pilene indikerer tidspunkt for uttak til mikroskopi. Oppsettet ble gjentatt fire ganger med samme resultat.

Man kan se en tydelig depletionseffekt av *pbp1a* når *pbp2a* er fjernet (MTS19). Sammenlignet med MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$, Fig. 4.2) går også de MTS19-kulturene som ikke er dyrket med ComS* raskere i lysis etter stasjonærfasen.

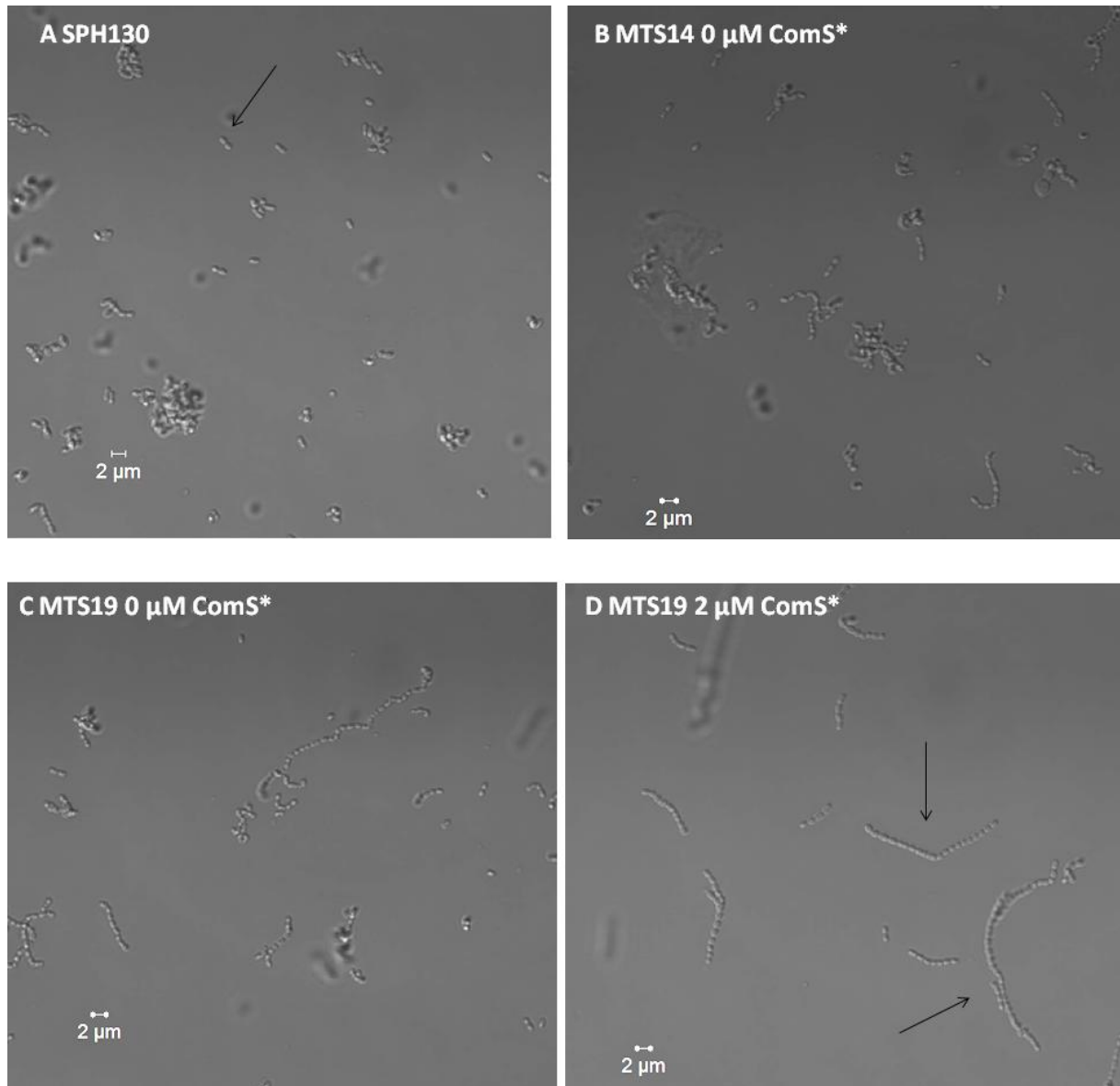
Diagrammer som viser en oversikt av samtlige fortynninger (1 - 12) i fortynningsrekka av kulturer som er dyrket med og uten ComS* er vist i vedleggene B.6 – B.10. For MTS18 (Vedlegg B.7), MTS19 dyrket i 0,02 μ M (Vedlegg B.8) og MTS19 dyrket i 0,2 μ M (Vedlegg B.9), og MTS19 dyrket i 2,0 μ M ComS* (Vedlegg B.10). Kontrollen SPH130 er vist i vedlegg B.6.

4.1.3 Mikroskopi av *pbp1a*- og *pbp2a*- depletionmutantene

Fenotype ved depletion av *pbp1a* og *pbp2a* ble også undersøkt ved mikroskopi. Hoskins *et al.* (1999) og Paik *et al.* (Paik *et al.* 1999) utførte mikroskopi av enkeltmutanter av *pbp1a*, *pbp1b* og *pbp2a*, men mutantene viste ingen endringer i morfologi i forhold til kontrollstammen. Paik *et al.* (1999) utførte i tillegg mikroskopi av $\Delta pbp1a\Delta pbp1b$ -, og $\Delta pbp1b\Delta pbp2a$ -dobbelmutanter. Resultatene viste at disse mutantene hadde septum plassert i unormale vinkler, og ikke parallelt med hverandre som i kontrollstammen (Paik *et al.* 1999). Mikroskopi av en $\Delta pbp1a\Delta pbp2a$ -dobbelmutant har ikke tidligere blitt utført, men ComRS-depletionsystemet har gjort det mulig å undersøke morfologien til disse mutantene.

Ved uttak til mikroskopi ble vekstkurvene til mutantene fulgt. Da vekstkurven til kulturene uten tilsatt ComS* viste en reduksjon i veksthastighet sammenlignet med tilsvarende parallell tilsatt ComS*, ble det tatt ut prøver fra de parallelle fortyningene og fra en kontroll. Cellene ble fiksert etter protokoll 3.9.1.1. SPH130 (Fig. 4.5A) ble benyttet som kontrollstamme ved mikroskopi. Morfologien til SPH130 viser normale ovoide diplokokker og noen kortere kjeder. For MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) (Fig. 4.5B) ble det ikke observert noen signifikant forskjell i morfologi fra kontrollen SPH130, det var heller ingen signifikante forskjeller mellom kulturene med ComS* og den depletete kulturen.

For MTS19 var det antydning til mer kjededannelse for kulturen tilsatt 2,0 μ M ComS* (Fig. 4.5D), men for kulturene tilsatt 0,02 μ M eller 0,2 μ M ComS* var det ingen signifikant forskjell fra kontrollen (data ikke vist). Depletet MTS19-kultur (Fig. 4.5C) var heterogen med både diplokokker, enkeltceller og en antydning til mer kjededannelse enn i SPH130. Cellene hadde normal størrelse og så ellers normale ut i fasongen. Det ble ikke utført mikroskopi av MTS13 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a_{wt}$) og MTS18 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$) da mikroskopi av *pbp1a*- og *pbp2a*-enkelmutanter har blitt utført tidligere uten å observere noen avvikende fenotype (Hoskins *et al.* 1999; Paik *et al.* 1999).



Figur 4.5 DIK-bilder av SPH130, MTS14 og MTS19. (A) SPH130 uten tilsatt ComS*, (B) MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) uten tilsatt ComS*, (C) MTS19 uten tilsatt ComS* og (D) MTS19 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$ $\Delta pbp2a_{wt}$) tilsatt 2,0 μM ComS*. Bildene er fra fjerde fortykning, tidspunkt for uttak til mikroskopi er indikert i Figur 4.2 og 4.4. Pilen i A viser en normal morfologi for pneumokokker. Pilene i D indikerer lange kjeder som ble sett ved tilsetning av 2,0 μM ComS* til MTS19.

Kort oppsummert viste ikke mikroskopi noen avvikende fenotype for depletet MTS14 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$ $\Delta pbp2a_{wt}$) og MTS19 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$ $\Delta pbp2a_{wt}$). MTS19-kultur tilsatt 2 μM ComS* viste mer kjededannelse enn MTS19-kultur tilsatt de øvrige ComS*-konsentrasjonene. Kulturer tilsatt 0,02 μM eller 0,2 μM ComS* viste ingen avvik i morfologi fra kontrollen.

4.2 Depletion av *pbp2b* og *pbp2x*

Som omtalt i innledningen viste Kell *et al.* (1993) at PBP2b og PBP2x er essensielle proteiner hos pneumokokker. Lokaliseringseksperimentene til Morlot *et al.* (2003) tydet på at PBP2x er lokalisert til den septale syntesen og at PBP2b er lokalisert til den perifere syntesen av celleveggen til pneumokokker. Siden PBP2x og PBP2b hos laktokokker er homologe med de i pneumokokker så gir resultatene grunn til å tro at disse proteinene har samme rolle hos de to artene (Sham *et al.* 2012). Studier gjort med laktokokker (Perez-Nunez *et al.* 2011) er i samsvar med teorien om at PBP2x hører til i det septale divisomet og at PBP2b hører til i den perifere syntesen pneumokokker (jf. 1.3.1 og Fig. 1.7).

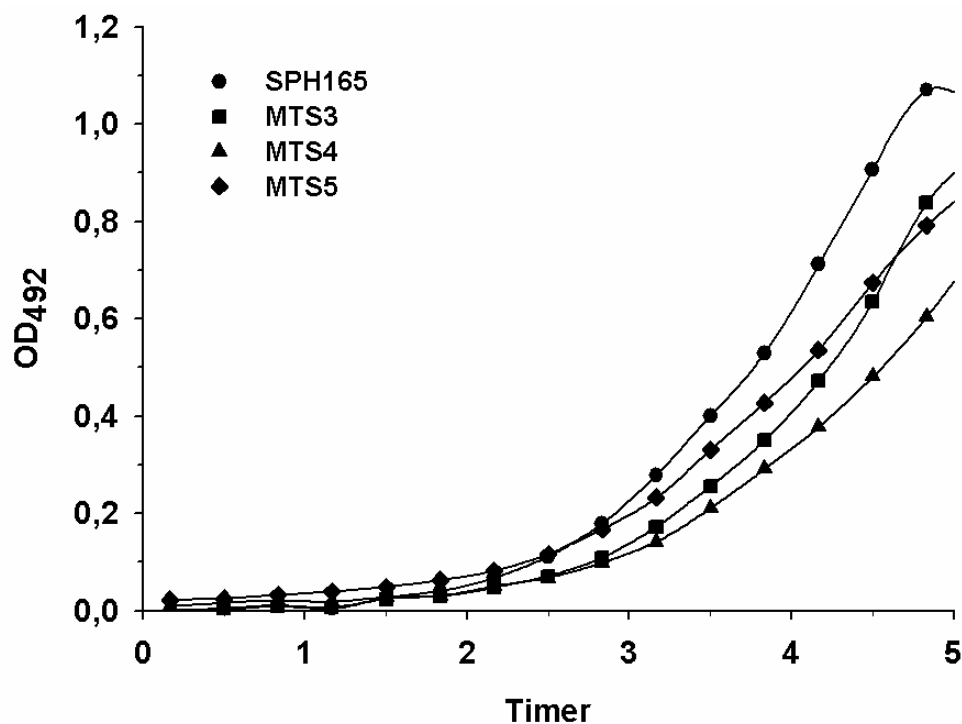
På seksjon for molekylær mikrobiologi, UMB, pågår det eksperimenter med depletionmutanter av både *pbp2b* (SPH158) og *pbp2x* (SPH165). Ved depletionforsøk med SPH158 ser man liten forskjell i veksthastigheten mellom kulturen uten ComS* og kulturene med ComS*, når en 2-fold fortynningsrekke lages tilsvarende som beskrevet her. Vekstforsøk med SPH165 har vist en tydelig redusering av veksthastigheten ved depletion. Mikroskopi av begge de to depletionmutantene har imidlertid vist tydelige fenotyper ved depletion (K. H. Berg pers. kom). I dette arbeidet var det ønskelig å se om en bakgrunn med $\Delta pbp1a$, $\Delta pbp1b$ eller $\Delta pbp2a$ hadde en ytterligere effekt på SPH158 (*pbp2b*)- og SPH164 (*pbp2x*)-depletionmutantene.

4.2.1 Depletion av *pbp2x*

SPH164 er en *pbp2x*-depletionmutant der *pbp2x* er satt inn bak P_{comX} , og det native *pbp2x_{wt}*-genet er fjernet. Fra SPH164 ble det laget dobbelmutanter med $\Delta pbp1a_{wt}$ (MTS4), $\Delta pbp2a_{wt}$ (MTS3) og $\Delta pbp1b_{wt}$ (MTS5) bakgrunn. MTS3 og MTS4 er i tillegg $\Delta lytA$ -mutanter som betyr at cellene ikke autolyserer. SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}\Delta lytA_{wt}$) ble benyttet som kontroll for disse i de påfølgende forsøkene. MTS5 er ikke $\Delta lytA$ -mutant og ble derfor sammenlignet med SPH164 som kontroll. Forsøk gjort på laboratoriet ved seksjon for molekylær mikrobiologi har vist at SPH165/SPH164 vokser tilnærmet normalt ved tilsetning av 0,2 μ M ComS* sammenlignet med en stamme med villtype-*pbp2x* inntakt (K. H. Berg pers. kom). 0,2 μ M ComS* ble også brukt ved ComS*-induksjon og transformasjon av MTS3, MTS4 og MTS5.

Det ble utført vekstforsøk med MTS3 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}\Delta pbp2a_{wt}$), MTS4 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}\Delta pbp1a_{wt}$) og MTS5 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}\Delta pbp2a_{wt}$) for å

undersøke hvorvidt veksthastigheten var endret fra kontrollene SPH164/SPH165. Fra Tabell 4.3 går det fram at veksthastigheten til SPH164 og 165 er den samme. Vekstkurvene for de tre mutantene i fortytning fire, med 0,2 μM ComS*, mot SPH165 som kontroll er vist i Figur 4.6. Av mutantene var det kun MTS4 som hadde en doblingstid som avvok fra kontrollen målt for fortytning fire (Fig. 4.6). Doblingstiden til SPH165 er omtrent 40 minutter, mens doblingstiden til MTS4 er omtrent 50 minutter (Tabell 4.3).



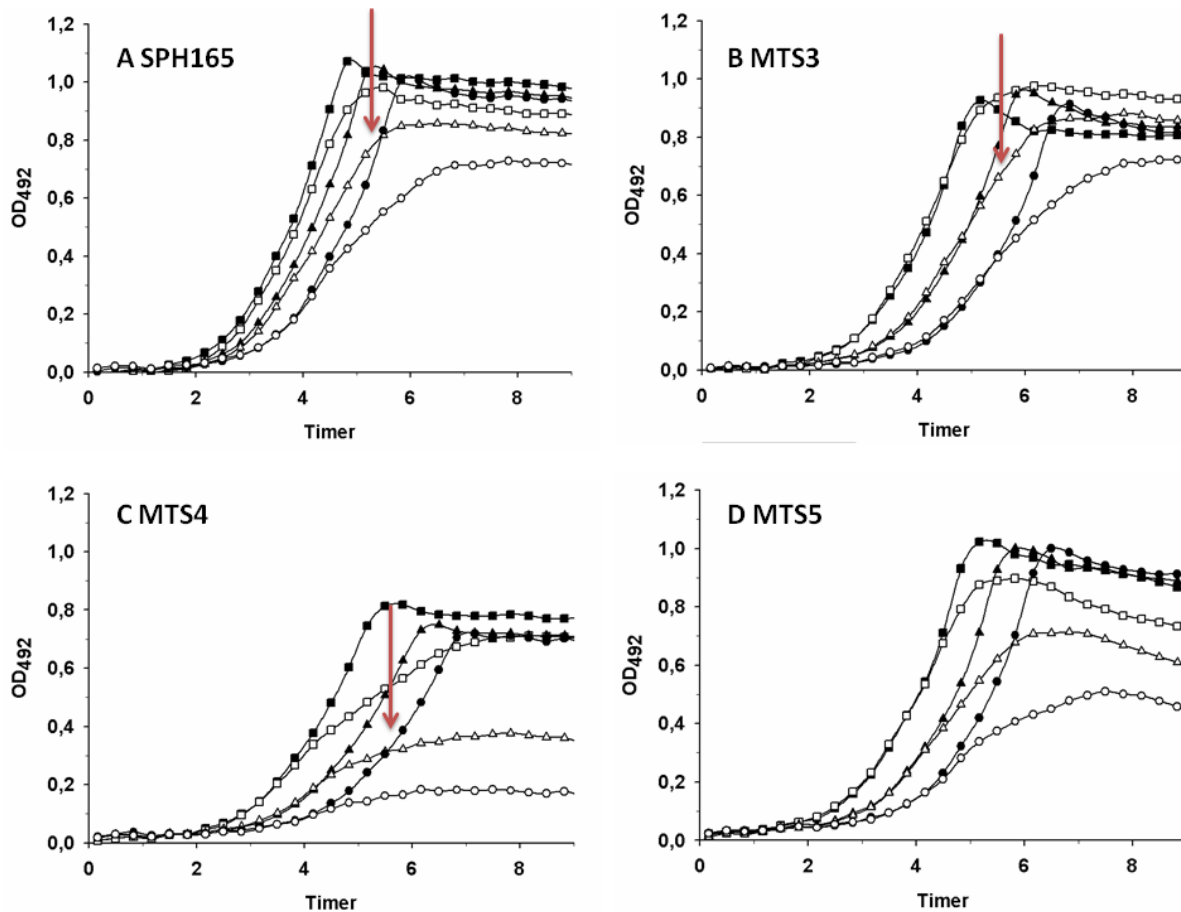
Figur 4.6 Veksthastighet til SPH165, MTS3, MTS4 og MTS5. Det ble laget to parallelle 2-fold fortyttingsrekker fra kulturer med $OD_{492} \sim 0,04$ som ble inkubert med 0,2 μM ComS* ved 37 °C i en mikrotiteravleser. OD_{492} ble målt hvert 10. minutt. Figuren viser veksthastigheten til SPH165 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt}$) (sirkler), MTS3 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$) (firkanter), MTS4 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$) (trekanter) og MTS5 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp1b_{wt}$) (dianter). Alle kurvene er fra fjerde fortytning. Det bemerkes at dataene for MTS5 er hentet fra en tidligere gjennomføring av eksperimentet (Vedlegg B.12). Eksperimentet er gjennomført fire ganger, med samme resultat

Tabell 4.3 Doblingstid for SPH164/SPH165, MTS3, MTS4 og MTS5. Doblingstiden er beregnet ut ifra fjerde fortynningsrekke hvor man ser en begynnende vekstreduksjon for MTS4. Doblingstiden er beregnet etter hvor lang tid det tar fra kulturen har en celletetthet (OD_{493}) på 0,2 til 0,4. Alle kulturene i tabellen er tilsatt 0,2 μ M ComS*.

Kulturer	Doblingstid
SPH165/SPH164	~ 40 minutter
MTS3	~ 40 minutter
MTS4	~ 50 minutter
MTS5	~ 40 minutter

Vekstforsøkene (Fig. 4.7) gir en indikasjon på at *S. pneumoniae* responderer raskere på depletion av *pbp2x* når *pbp1a_{wt}* er fjernet (MTS4), enn når *pbp2a_{wt}* (MTS3) og *pbp1b_{wt}* (MTS5) er fjernet. Fra vekstkurvene til MTS4 (Vedlegg B.15) går det fram at mutanten fra og med første fortynning ikke vokser opp til en like høy maks- OD_{492} som SPH165 (Vedlegg B.13). Fra fjerde fortynning (Fig. 4.7 C) ser man en begynnende redusering i veksthastigheten, doblingstiden her er ca 50 minutter (Tab 4.3). Fra sjuende fortynning vokser ikke MTS4-kulturen opp (Vedlegg B15).

I vekstmedium uten ComS* ser man en klar endring i veksten til SPH165 (Fig. 4.7A). En begynnende endring i veksthastigheten ser man ved femte fortynning, og etter fortynning vokser ikke kulturen opp (Vedlegg B.13). Fra vekstkurvene for MTS3 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$, Fig. 4.4 B) og MTS5 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp1b_{wt}$, Fig. 4.4 D) kan man ikke se noen signifikant tilleggseffekt utover den man ser for SPH165 (Fig. 4.4 A)/.SPH164 (Vedlegg B.11).



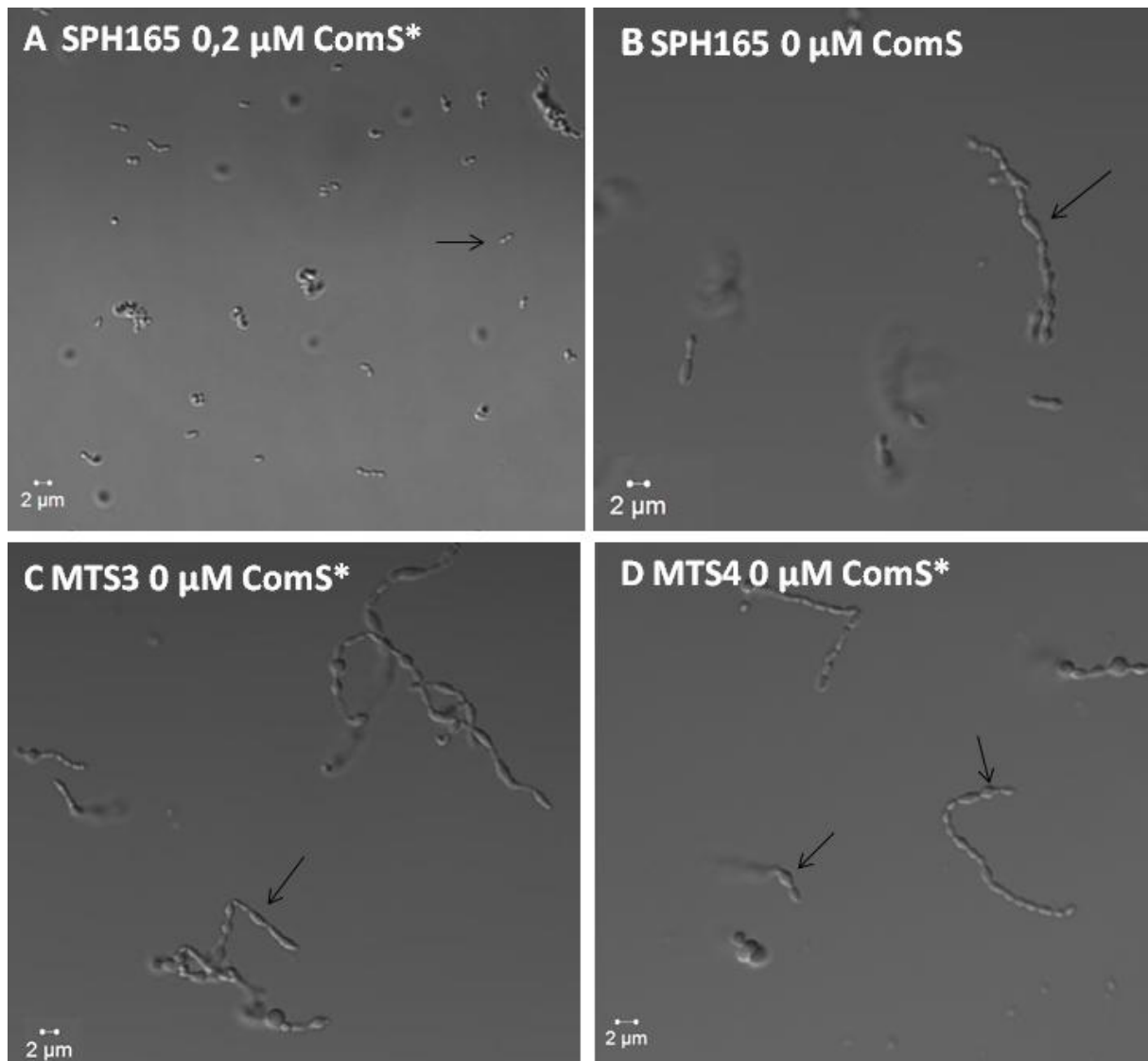
Figur 4.7 Vekstforsøk med depleksjon av *pbp2x* i $\Delta pbp1a$, $\Delta pbp2a$ eller $\Delta pbp1b$ bakgrunn. Fra bakteriekulturer med OD₄₉₂ ~0,04 ble det laget 2-fold fortynningsrekker som ble dyrket ved 37 °C i en mikroplateavleser (FLUOstar OPTIMA, BMG Lactech). Celletettheten (OD₄₉₂) ble målt automatisk hvert 10. min, et utdrag på 9 timer er vist her. Firkanter indikerer fortynning 4, trekkanter fortynning 5 og sirkler fortynning 6. De svarte symbolene indikerer kulturer tilsatt 0,2 μM ComS*, og de hvite symbolene indikerer kulturer uten ComS*. Figuren viser vekst av (A) kontrollen SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}$, $\Delta lytA_{wt}$), (B) MTS3 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}$, $\Delta pbp2a_{wt}$, $\Delta lytA$), (C) MTS4 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}$, $\Delta pbp1a_{wt}$, $\Delta lytA$) og (D) MTS5 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}$, $\Delta pbp1b_{wt}$). Pilene indikerer hvor det ble tatt ut prøver til mikroskopi ved femte fortynning. Det ble tatt ut prøver fra både kultur tilsatt ComS* og uten ComS*. Oppsettet har blitt utført fire ganger med samme resultat.

Diagrammer som viser en oversikt av samtlige fortynninger (1 - 12) i fortynningsrekka av kulturer som er dyrket med og uten ComS* er vist i Vedleggene B.11 – B.15. For MTS3 (Vedlegg B.14), MTS4 (Vedlegg B.15) og MTS5 (Vedlegg 12). SPH164 er vist i B.11, og SPH165 er vist i Vedlegg B.13.

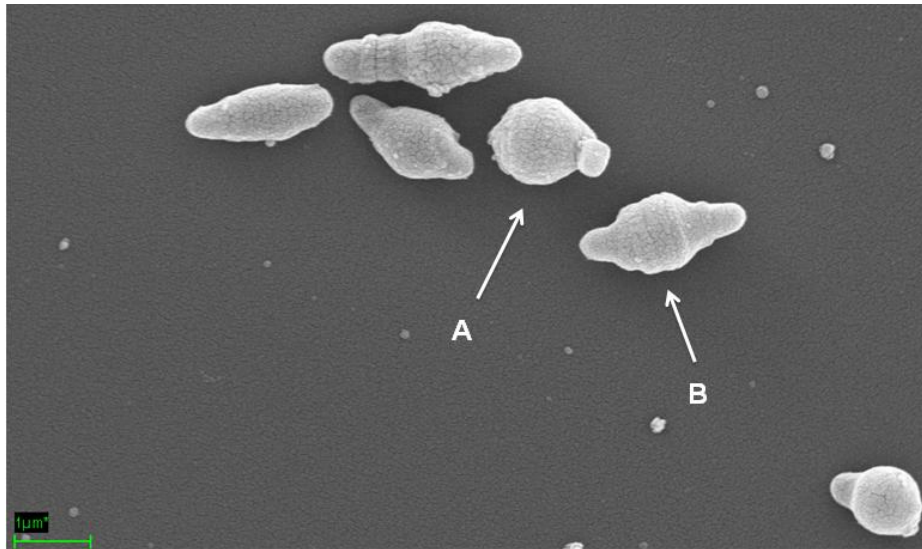
4.2.2 Mikroskopi av *pbp2x*-depletionmutanter

Morfologien til mutantene ble undersøkt ved å ta ut prøver til mikroskopi fra de ulike fortyningene når kulturene var i eksponentiell fase, eller når en reduksjon i veksthastighet ble sett for kulturene i parallellen uten tilsatt ComS*. Det ble tatt ut prøver fra både kulturene tilsatt ComS* og kulturene som ble dyrket uten ComS*. SPH165 tilsatt ComS* viste normal fenotype med diplokokker, og ovoide celler i mindre kjeder (Fig. 4.8A). MTS3 og MTS4 dyrket med ComS* viste ingen avvik fra kontrollen SPH165.

Mikroskopi viste videre at det ikke var en signifikant forskjell i morfologien mellom MTS3 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$), MTS4 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$) og SPH165 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt}$) uten tilsatt ComS*. De depletete cellene er oppblåst, noen er avlange og noen har en sitronlignende form der cellene er oppblåst på midten og har tupper i endene. De fleste cellene vokser i kjeder av ulik lengde. De depletete cellene er også betydelig større enn de cellene som ble dyrket i medium med ComS*. Denne fenotypen er også blitt observert i tidligere forsøk som er gjort med SPH165 på laboratoriet (K. H. Berg pers. kom). Figur 4.9 viser SEM-bilde av SPH165 ved 30 000x forstørrelse, her vises morfologiske detaljer godt. Cellene dyrket uten ComS* hadde normal morfologi fram til ca femte fortytning. Fra sjettede fortytning kan den særegne morfologien observeres, men her er ikke cellene så oppblåst. En gradvis sterkere morfologi med flere oppblåste celler og flere celler med sitronform vises fra sjettede fortytning og utover. Ved 10. - 12. fortytning er de fleste cellene kraftig forstørret, formet som ballonger eller med en sitronlignende form (K. H. Berg pers. kom). Det ble ikke utført mikroskopi av MTS5 da hovedfokuset i denne oppgaven var på PBP1a og PBP2a samt at vekstforsøket ikke viste avvik fra kontrollen.



Figur 4.8 DIK-bilder av kulturer med depletion av *pbp2x*. (A) SPH165 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt}$) med ComS*, (B) depletet SPH165, (C) depletet MTS3 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$), (D) depletet MTS4 ($P_{comX}::pbp2x, \Delta pbp2x_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$). Pilen i A viser en diplokokk som er normal morfologi for *S. pneumoniae*. Pilene i B, C og D indikerer celler med trekk som er særegne ved *pbp2x*-depletion. Cellene er høstet fra femte fortyndning, tidspunkt for høstingen er indikert med piler i figur 4.7. Størrelsesmarkør er oppgitt på bildet.



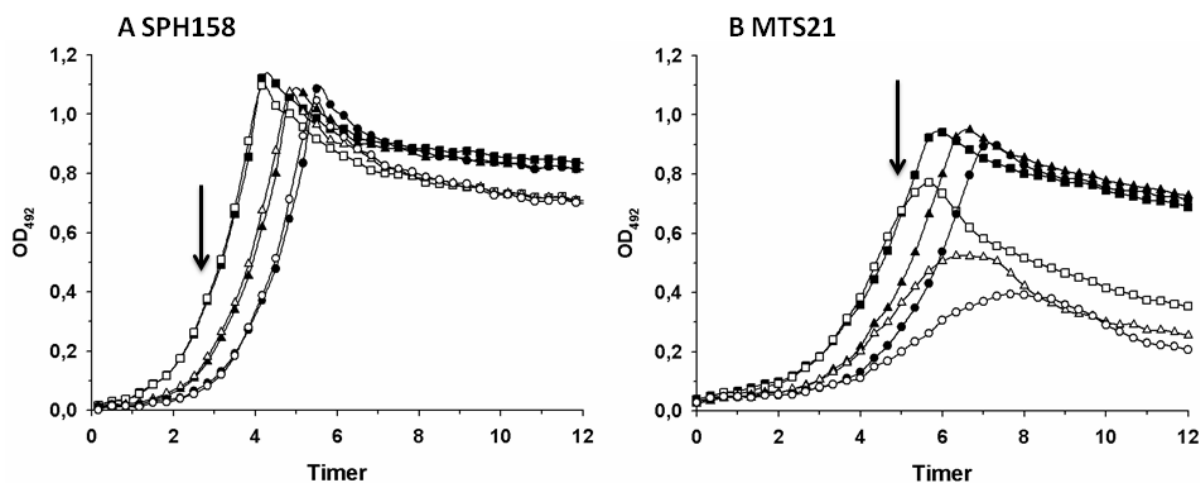
Figur 4.9 SEM- bilde av SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$, $\Delta pbp2x_{wt}$). Cellene er høstet fra eksponentiell fase, fiksert og preparert etter protokoll 3.10.1.1. Figuren viser celler uten tilsatt ComS* i vekstmediet, 30 000 x forstørret fra fortyning åtte. Pilene indikerer celler med særegen morfologi; (A) ballongformet (B) sitronformet med "belte". Størrelsesmarkøren (grønn strek) indikerer 1 μm . Figuren er lånt fra Kari Helene Berg.

4.2.3 Depletion av *pbp2b*

For å få et mer helhetlig bilde av PBPers rolle i celleveggsyntesen til *S. pneumoniae* ble det i dette arbeidet også gjort videre undersøkelser med PBP2b. *Pbp2b*-depletionmutanten SPH158 har *pbp2b* satt bak P_{comX} og det native *pbp2b*-genet er slått ut. SPH158 er også $\Delta lytA$ (Tabell 2.1). Fra SPH158 ble det laget mutanter med $\Delta pbp1a$ - (MTS21), $\Delta pbp2a$ - (MTS20) og $\Delta pbp1b$ -bakgrunn (MTS22). Det ble benyttet 0,2 μM ComS* ved indusering av mutantene da innledende forsøk har vist at denne konsentrasjonen gir optimal vekst i forhold til en kontroll med intakt villtype *pbp2b* (K. H. Berg pers. kom).

Som nevnt tidligere ser man ved depletion av *pbp2b* kun en liten effekt på veksthastigheten (Vedlegg B.16), tross et tydelig utslag på morfologi. Ved depletion av *pbp2b* i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn (MTS21) ser man en tydelig additiv effekt. For MTS21 ser man en klar forskjell ved at kulturen fra første fortyning (Vedlegg B.18) ikke kommer opp i like høy celletetthet (OD_{492}) som kontrollen SPH158 (Vedlegg B.16), og fra fjerde fortyning reduseres veksthastigheten. Figur 4.10 viser et utdrag av fortyningene der effekten av $\Delta pbp1a$ -bakgrunn vises best. Dobblingstiden (Tabell 4.4) for MTS21-kulturen dyrket uten ComS* ved fjerde fortyning var ca 70 minutter, og omtrent 60 minutter for kulturen dyrket med ComS*. Dobblingstiden til kontrollen SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$) er ved fjerde fortyning omtrent 40 minutter. Effekten av depletion inntreffer mye tidligere i fortyningsrekken for

MTS21, hvor *pbp1a* er fjernet fra genomet, enn for de andre dobbelmutantene (Fig 4.11 B og C).



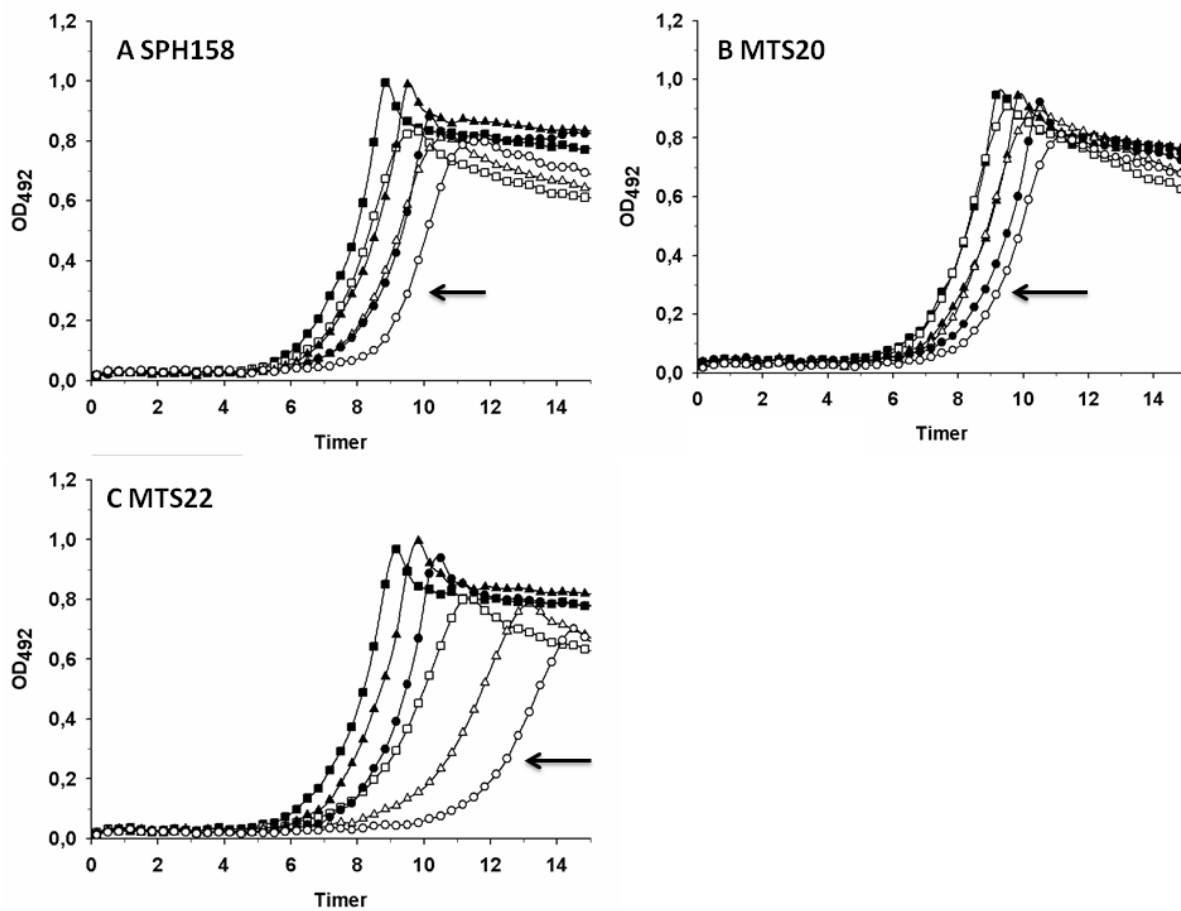
Figur 4.10 Depletion av *pbp2b* i Δ *pbp1a* bakgrunn. Fra bakteriekulturene (A) SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, Δ *pbp2b*_{wt}) og (B) MTS21 ($P_{comX}::pbp2b$, Δ *pbp2b*_{wt}, Δ *pbp1a*_{wt}) med $OD_{492} \sim 0,04$ ble det laget to-fold fortynningsrekker. Kulturene ble inkubert ved 37 °C i en mikroplateavleser (FLUOstar OPTIMA). Celletettheten (OD_{492}) ble målt automatisk hvert 10. min i 20 timer. Figuren viser et utdrag på 12 timer fra fortynningene tre (firkanter), fire (trekanter) og fem (sirkler). Svarte symboler indikerer kulturer tilsatt 0,2 μ M ComS*, og hvite symboler indikerer depletete kulturer (0 μ M ComS*). Pilene indikerer tidspunkt for uttak til mikroskopi for fortynning fire. Det ble tatt ut prøver fra kulturer dyrket med og uten 0,2 μ M ComS*. Oppsettet har blitt utført tre uavhengige ganger, vekstkurvene vist her er representative for alle oppsettene.

Tabell 4.4 Dobblingstid for SPH158, MTS20, MTS21 og MTS22. Dobblingstiden er beregnet både for fortynning fire og for fortynning 10. Beregning av doblingstiden ble gjort ved å beregne hvor lang tid kulturen brukte fra den hadde en celletetthet (OD_{492}) på 0,2 til celletettheten var oppe i 0,4.

Kultur	Dobblingstid 4.fortynning		Dobblingstid 10. fortynning	
	0 μ M ComS*	0,2 μ M ComS*	0 μ M ComS*	0,2 μ M ComS*
SPH158	~ 40 minutter	~ 40 minutter	~ 50 minutter	~ 50 minutter
MTS20	~ 40 minutter	~ 40 minutter	~ 50 minutter	~ 50 minutter
MTS21	~ 70 minutter	~ 50 minutter	-	-
MTS22	~ 40 minutter	~ 40 minutter	~ 70 minutter	~ 50 minutter

Vekstkurvene (Fig. 4.11) viser at det ikke er signifikant forskjell i veksthastighet mellom SPH158 (Fig. 4.11A) og MTS20 (Fig. 4.11 B), men MTS22 (Fig. 4.11 C) viser en klar forskjell i veksthastighet fra fortynning ni (Vedlegg B.19). Dette vises tydelig i de tre siste fortynningene (fortynning 10 – 12) hvor den depletete kulturen av MTS22 ($P_{comX}::pbp2b$,

$\Delta pbp2b_{wt}\Delta pbp1b_{wt}$) vokser opp over tre timer etter kulturen dyrket i ComS* (Fig 4.11C). Beregninger viser at doblingstiden (Tabell 4.4) til den depletete kulturen av MTS22 er omtrent 70 minutter, mens kulturen dyrket i ComS* har en doblingstid på ca 50 minutter. Ved samme tidspunkt er doblingstiden til SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$) og MTS20 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}\Delta pbp2a_{wt}$) omtrent 50 minutter, både for kulturer med og uten tilsatt ComS*.



Figur 4.11 Depletion av *pbp2b* i $\Delta pbp2a$ og $\Delta pbp1b$ bakgrunn. Fra $OD_{492} \sim 0,04$ ble bakteriekulturer av (A) SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$), (B) MTS20 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$, $\Delta pbp2a_{wt}$) og (C) MTS22 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$, $\Delta pbp1b_{wt}$) ble 2-fold fortynnet i parallelle fortynningsrekker med og uten $0,2 \mu\text{M}$ ComS*. Kulturene ble så inkubert ved 37°C i en mikroplateavleser (FLUOstar OPTIMA), og celletettheten (OD_{492}) ble målt automatisk hvert 10. min. Figuren viser et utdrag på 15 timer fra fortynningsrekkene 10 (firkanter), 11 (trekanter) og 12 (sirkler). Svarte symboler viser kulturer tilsatt $0,2 \mu\text{M}$ ComS*, og hvite symboler indikerer depletete kulturer. Pilen indikerer tidspunkt for uttak til mikroskopi fra tolvte fortynning. Det ble tatt ut prøver fra kulturer dyrket med og uten $0,2 \mu\text{M}$ ComS*. Figuren er representativ for tre uavhengige oppsett.

Diagrammer som viser en oversikt av samtlige fortyntninger (1 - 12) i fortyntningsrekka av kulturer som er dyrket med og uten ComS* er vist i Vedleggene B.16 – B.19. For MTS20 (Vedlegg B.17), MTS21 (Vedlegg B.18) og MTS22 (Vedlegg 19). SPH158 er vist i B.16.

4.2.4 Luciferaseaktivitet av *pbp2a* og *pbp1a* i dobbelmutantene

På grunn av at effekten av depletion av *pbp2b* i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn var så påfallende, ble det undersøkt om depletion av *pbp2b* førte til oppregulering av *pbp1a* eller *pbp2a*. Det ble konstruert mutanter med *luc*-genet direkte nedstrøms for de native promotorene til *pbp1a* og *pbp2a*. For innsetting bak *pbp1a* ble *luc*-konstruktet transformert inn i MTS21 istedenfor Januskassetten ($\Delta luc::janus$) og resulterte i stammen SPH167. Fra MTS20 ble et *luc*-konstrukt transformert inn bak den native *pbp2a*-promotoren og resulterte i stammen SPH166. *luc*-konstruktet for hver innsetting i hver av mutantene ble konstruert med overlap ekstension-PCR som forklart i avsnitt 3.2.3.

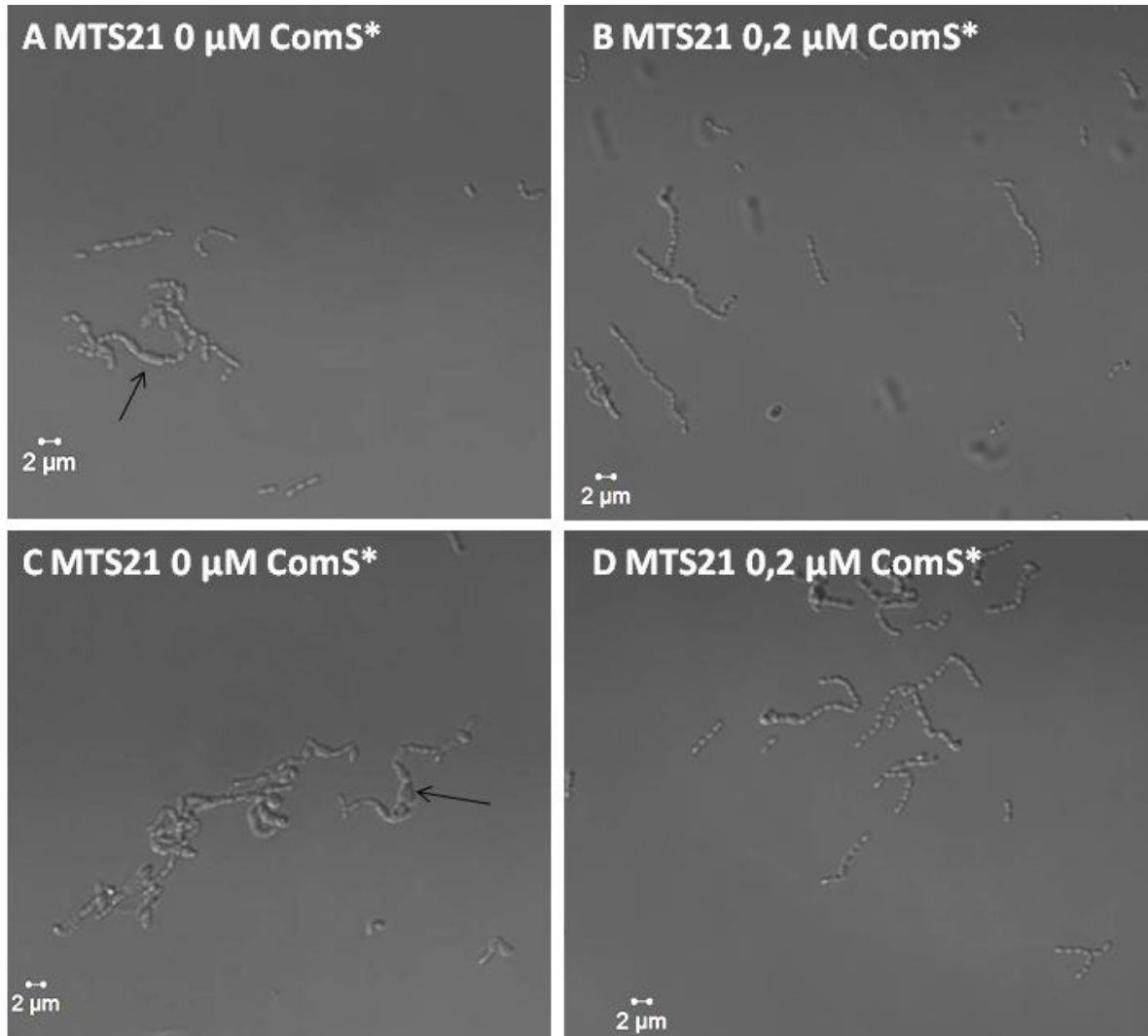
Reporterassayet ble utført i et luminometer (Fluostar Optima), på tilsvarende måte som de foregående vekststudiene. Eneste forskjellen var at det ble tilsatt luciferin til kulturene ved start (jf. protokoll 3.8.1). Resultatene indikerte at det ikke var noen utlag på lysemisjon utover bakgrunnsstøyen (data ikke vist). På grunn av tekniske problemer med maskinen, har oppsettet ikke blitt repetert, og man kan dermed ikke si noe sikkert ut ifra resultatene fra den ene kjøringen.

4.2.5 Mikroskopi av *pbp2b*-depletionmutanter

I tillegg til vekstforsøk ble det også her utført mikroskopi for å undersøke eventuell endret fenotype av mutantene. Forsøk gjort på laboratoriet har vist at depletion av *pbp2b* gir celler som til dels er oppblåste og deformerte og som danner veldig lange kjeder. Cellene ligger tidvis klistret og trykt sammen, og kan av og til se ut som én sammenhengende celle. Kjedelengde og andelen syke celler øker utover i fortyntningsrekken. Fra og med fortyntning 7 blir det observert lange kjeder, og i fortyntning 11 og 12 er det et overtall av lange kjeder med >100 celler (K. H. Berg, pers. kom).

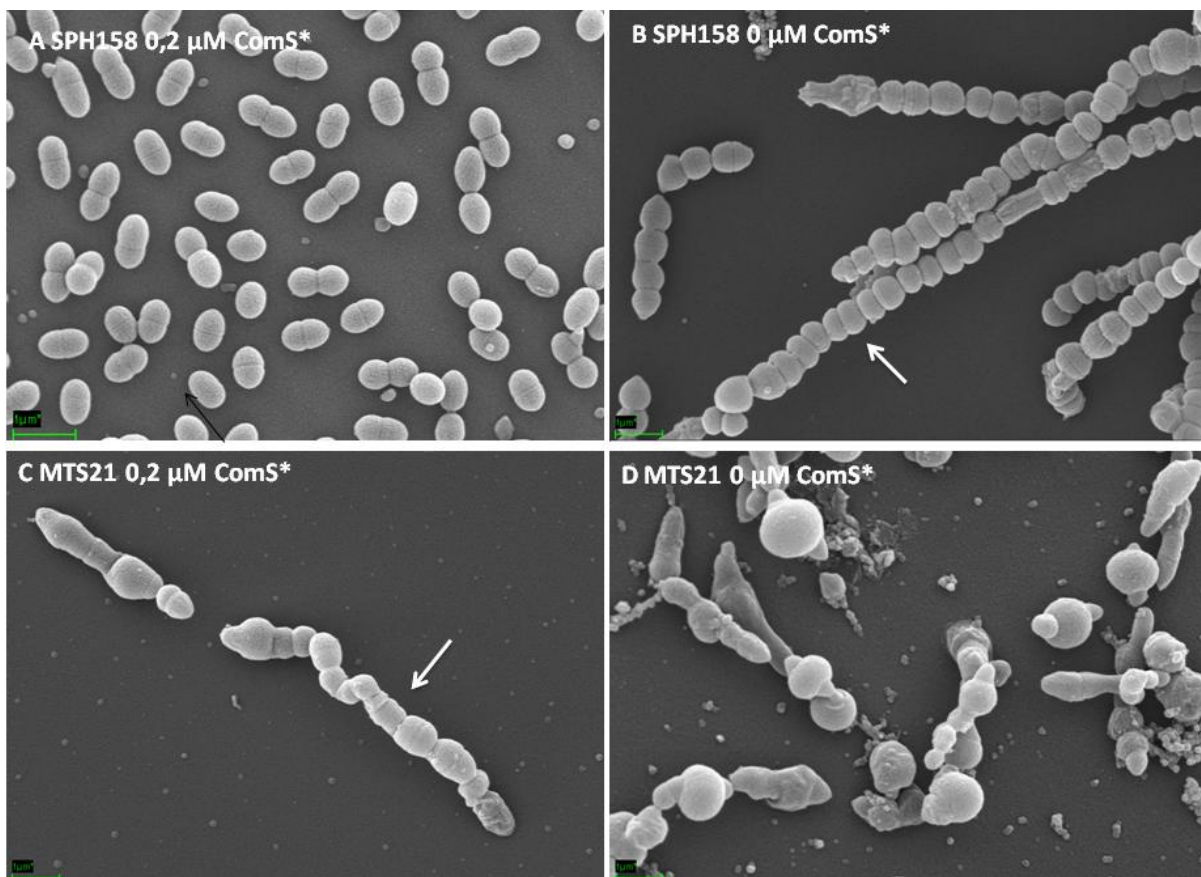
Ved mikroskopi vises effekten av *pbp2b*-depletion på morfologi tidligere i en $\Delta pbp1a$ -bakgrunn (MTS21) enn for kontrollen SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$). Allerede i første fortyntning er det antydning til oppblåste og syke celler for den depletete MTS21-kulturen

(Fig. 4.12B), og i tredje fortynning er det en tydelig signifikant forskjell mellom depletet kultur og kontrollen. Depletet MTS21 består av celler som er syke og oppblåst og som danner kjeder av ulik lengde. Kjedene blir ikke like lange som depletet kultur av SPH158 (Fig. 4.14B). Også MTS21-kulturen tilsatt ComS* er heterogene med celler i kortere og lengre kjeder, også her er noen celler oppblåst og deformert.



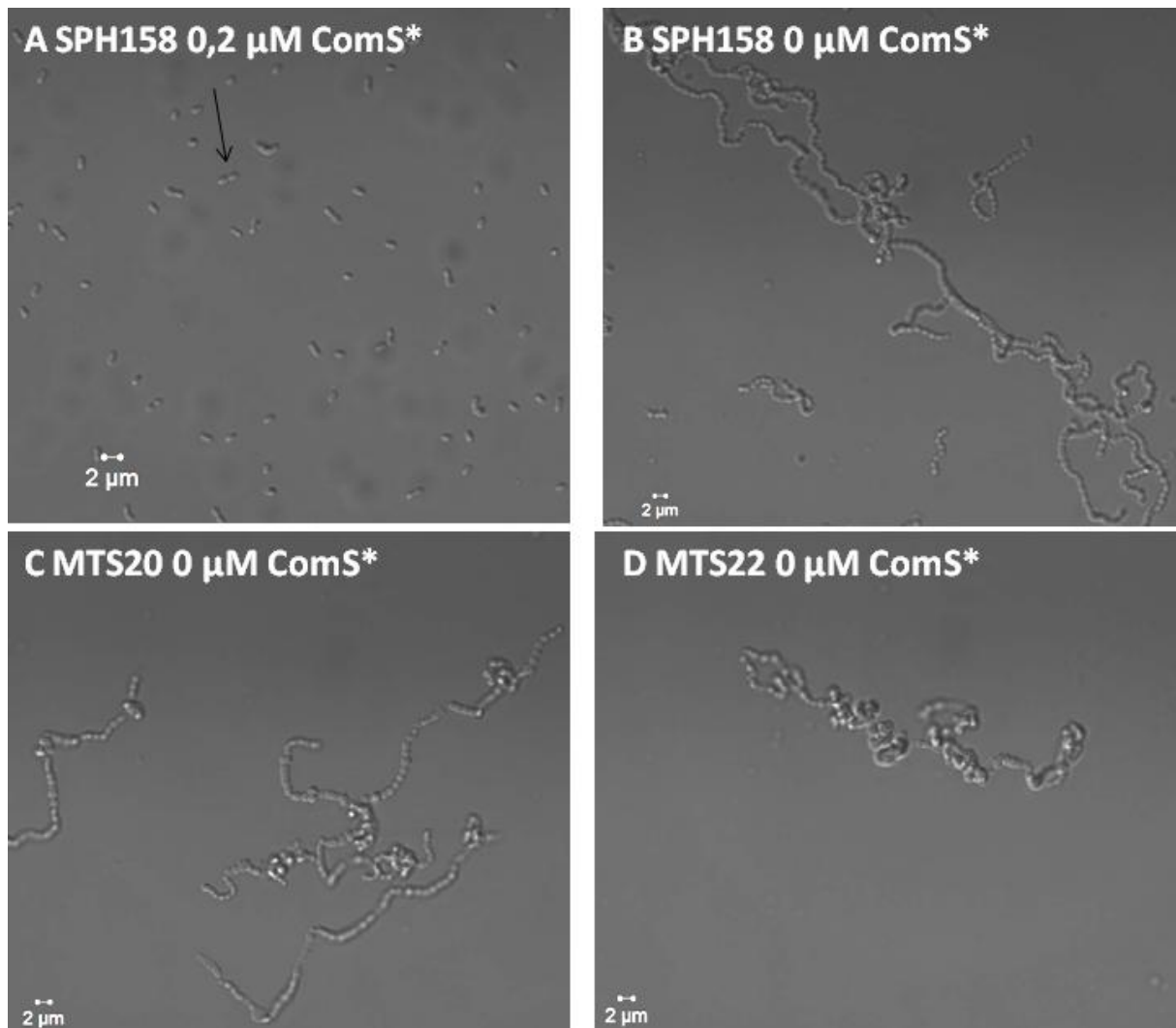
Figur 4.12 DIK-bilder av MTS21. (A) og (C) viser depletete kulturer av MTS21 ($P_{comX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$), og (B) og (D) viser kulturer tilsatt 0,2 μM ComS*. Kulturene ble høstet i eksponensiell fase, markert i Fig 4.10. (A) og (B) er fra første fortynning, og (C) og (D) er fra tredje fortynning. SPH158 ($P_{comX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt}$) ble benyttet som kontroll, men både kulturene dyrket med og uten ComS* viste ved disse fortynningene normal fenotype med diplokokker og pneumokokker i korte kjeder. MTS21-kulturen dyrket med ComS* viser antydning til mer kjededannelse fra første fortynning. Kulturene uten tilsatt ComS* er heterogene med celler i kortere og lengre kjeder som er mer oppblåst og avlange, dette kan man se antydning til fra første fortynning (A). Størrelsesmarkør er oppgitt på bildet.

For å undersøke detaljer i morfologien til SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$) og MTS21 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) nærmere ble det utført SEM-mikroskopi av disse kulturene (Fig. 4.13). Cellene ble høstet, fiksert og preparert som beskrevet i protokoll for SEM (avsnitt 3.10.1.1). Prepareringen av cellene ble gjennomført i samarbeid med Kari Helene Berg. Mikroskoperingen ble utført av personell på Mikroskopilaboratoriet, IPM (UMB). SEM-bildet av SPH158 dyrket med 0,2 μM ComS* viser normale pneumokokker, jf. Figur 4.13 A. SPH158 dyrket uten ComS* (Fig 4.13B) viser celler i lange kjeder, de fleste cellene er sammentrykte og noen er mer oppblåst. Figur 4.13C viser MTS21 dyrket i ComS*, her er de fleste normale diplokokker, men noen celler er mer oppblåst og deformert. For depletet kultur av MTS21 (Fig 4.13D) kan man se at de fleste cellene ligger i kjeder, og cellene er oppblåst og deformert. Også her er noen celler sammentrykte i kjeder.



Figur 4.13 SEM-bilder av SPH158 og MTS21. Alle bildene viser fikserte celler fra eksponentiell fase. (A) SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$) dyrket i 0,2 μM ComS* fra femte fortyning. (B) SPH158 dyrket uten ComS* fra 10. fortyning. (C) MTS21 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) dyrket med 0,2 μM ComS* og D MTS21 dyrket uten ComS*, begge fra fortyning fire. Alle bildene er fra 30 000 X forstørrelse. Størrelsesmarkøren (grønn strek) på bildene indikerer 1 μm . Pilene i (B) og (C) viser eksempler på sammentrykte celler. (A) og (B) er lånt fra Kari Helene Berg.

I dette arbeidet viste mikroskopi av depletion av *pbp2b* MTS20 (Fig. 4.14C) og MTS22 (Fig. 4.14D) samme tendenser som for SPH158 (Fig. 4.14 B). SPH158, MTS20 og MTS22 dyrket i 0,2 μM ComS* gir normale diplokokker, vist for SPH158 i Fig. 4.14A.



Figur 4.14 DIK-bilder av SPH158, MTS20 og MTS22. Alle bildene er fra fortytning 12, og kulturene er høstet i eksponentiell fase. (A) viser SPH158 ($P_{comX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt}$) dyrket med 0,2 μM ComS*, pilen indikerer normal morfologi. (B) viser SPH158 dyrket uten ComS*. (C) viser depletet kultur av MTS20 ($P_{comX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$), og (D) er depletete celler av MTS22 ($P_{comX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt} \Delta pbp1b_{wt}$). MTS20 og MTS22-kulturene dyrket i ComS* (data ikke vist) viste ingen signifikant forskjell fra induisert SPH158. Størrelsesmarkør er oppgitt på bildet.

5. Diskusjon

5.1 Depletion av *pbp2b* i Δ *pbp1a*-bakgrunn

Innledende eksperimenter utført på laboratoriet ved Seksjon for Molekylær Mikrobiologi, har vist at gradvis senking av ektopisk *pbp2b*-uttrykk (depletion) i SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$) ikke gir noen tydelig fenotype med hensyn på vekst. Det var derfor av interesse å undersøke om delesjon av *pbp1a*, *pbp2a* eller *pbp1b* kunne gi en ytterligere effekt ved depletion av *pbp2b*. Eksperimentene viste at MTS21 med depletion av *pbp2b* i Δ *pbp1a*-bakgrunn, ikke vokste opp til like høy maks-OD₄₉₂ som kontrollen. Dette ble vist for både MTS21-kulturen som ble dyrket med ComS* og kulturen som ble dyrket uten ComS*. En forklaring på dette kan være at tapet av PBP1a skaper en celleveggrelatert defekt som gjør at cellene ikke vokser optimalt, og som gjør at de stopper å vokse ved en lavere OD₄₉₂ enn kontrollen. Det ble videre vist at både MTS21 og MTS22 ($P_{comX}::pbp2b$, $\Delta pbp2b_{wt}$ $\Delta pbp1b_{wt}$) hadde en tidligere respons på depletion med hensyn på vekstreduksjon, enn responsen som ble vist for SPH158. Den samme vekstreduksjonen ble ikke observert ved depletion av *pbp2b* i en Δ *pbp2a*- bakgrunn. Vekstreduksjonen som ble vist for MTS22 (Fig. 4.11C) inntraff betydelig senere enn det som ble observert for MTS21 (Fig. 4.10B). Dette indikerer at en delesjon av *pbp1b* har en negativ effekt på *S. pneumoniae* når *pbp2b* depletes, dog ikke like negativ som ved delesjon av *pbp1a*. Dette tyder på at PBP2b påvirkes av manglende Pbp1a-aktivitet i større grad enn den påvirkes av manglende aktivitet av PBP2a og PBP1b.

Det ble også utført et eksperiment for å undersøke om depletion av *pbp2b* førte til en oppregulering av transkripsjonen fra de native promotorene til *pbp1a* eller *pbp2a*. Resultatet viste ikke utslag på luciferaseaktiviteten utover bakgrunnsstøyen. Det kan bety at det ikke skjer en oppregulering av transkripsjonen fra promotorene til *pbp1a* og *pbp2a* under disse forholdene. Det kan også skyldes at transkripsjonen fra promotorene til *pbp1a* og *pbp2a* er så lav at det ikke detekteres av maskinen (L. S. Håvarstein pers. kom). På grunn av tekniske problemer med maskinen har ikke oppsettet blitt repetert og man kan dermed ikke si noe sikkert ut ifra disse resultatene.

5.2 Mikroskopi indikerer at PBP1a samarbeider med PBP2b.

DIK- og SEM-mikroskopi av SPH158 viste at mange av cellene var sammentrykte og linseformede (Fig. 4.14A). Dette støtter teorien om at PBP2b er involvert i perifer celleveggsyntese (Morlot *et al.* 2003). Med utgangspunkt i denne teorien kan det tenkes at når

uttrykket av *pbp2b* gradvis reduseres, reduseres også transpeptidaseaktiviteten i det perifere celleveggsyntesemaskineriet. Konsekvensen av dette ser ut til å være at cellen ikke klarer å inkorporere nytt peptidoglykan i sideveggene. PBP2x er fremdeles intakt i cellen og utøver trolig transpeptidering i septum, dette kan føre til at det blir en ubalanse i celleveggsyntesen som fører til at septum dannes uten fullført perifer syntese av sideveggene. Dette kan være en forklaring på den særegne fenotypen som blir sett ved mikroskopi; avkortede celler som ikke klarer å opprettholde en ovoid form. Samtidig er det vanskelig å forklare fenotypen utelukkende kun på grunnlag av PBPene, da disse inngår i kompleks med andre viktige komponenter av syntesemaskineriet (jf. avsnitt 1.31). Man kan også spekulere i at fenotypen som blir observert delvis kan skyldes en sekundæreffekt hvor depletion av *pbp2b* innvirker på andre komponenter i celleveggsyntesemaskineriet.

Mikroskopi av MTS21 viste endring i morfologi tidligere enn observert for kontrollen SPH158 når disse kulturene ble depletet for PBP2b. Endring i morfologi inntraff samtidig med at veksthastigheten begynte å avta for kulturen uten tilsatt ComS*. Allerede fra tredje fortyning (Fig 4.14C og Fig 4.15C og D), viste en stor andel av cellene i kulturen en oppblåst og deformert morfologi. Heterogeniteten som ble observert kan trolig forklares med at cellene var i ulike stadier av depletion, og at noen celler dermed hadde en mer fremtredende fenotype enn andre.

Resultatene fra vekstforsøkene og mikroskopi indikerer at PBP1a inngår i syntesen av den perifere celleveggen til pneumokokker. Den tidlige effekten av depletion av PBP2b som ble observert i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn tyder på at PBP2b er avhengig av tranglykosylase- og/eller transpeptidiseringsaktiviteten til PBP1a, og at verken PBP1b eller PBP2a kan vikariere fullstendig for PBP1a i den perifere celleveggsyntesen.

Mikroskopi fra høyere fortyninger av SPH158-celler som er depletet for *pbp2b*, viste en tydelig fenotype med celler i veldig lange kjeder (Fig 4.14B). De lange kjedene som ble observert ved depletion av SPH158 tyder på at cellene ikke klarer å separere seg fra hverandre etter celledeling. LytB er et protein som er assosiert med den siste fysiske separasjonen av dattercellene ved celledeling. *S. pneumoniae* som har fjernet *lytB* fra genomet er karakterisert ved at de danner lange kjeder (De Las Rivas *et al.* 2002; Garcia *et al.* 1999). Det er mulig at substratet til LytB er endret som følge av depletion av PBP2b. Det kan igjen ha ført til at LytB ikke kunne utføre sin aktivitet slik at cellene ble separert og det ble dannet lange kjeder.

5.3 Depletion av *pbp2x* i Δ *pbp1a*-bakgrunn

På Seksjon for Molekylær Mikrobiologi har det blitt utført innledende eksperimenter som har vist at depletion av *pbp2x* i SPH165-mutanten innvirker sterkt på cellenes vekst og morfologi. For å undersøke om noen av klasse A PBPene interagerer med PBP2x ble det utført studier for å undersøke om man kunne observere ytterligere fenotyper ved delesjon av *pbp1a*, *pbp1b* eller *pbp2a* fra genomet.

Mikroskopi av SPH165 viste at ved depletion av *pbp2x* var cellene signifikant større sammenlignet med villtypen. Cellene viste også en karakteristisk morfologi der cellene var litt avlange med tupper i endene som ga dem en sitronlignende form (fig. 4.8 og 4.9). Morlot *et al.* (2003) har tidligere kommet med en teori om at PBP2x hører til i det septale syntesemaskineriet. Morfologien til SPH165 med depletion av *pbp2x* kan støtte denne teorien. Fordi PBP2x er essensiell hos pneumokokker kan man gå ut ifra at PBP2x er den primære transpeptidasen i det septale celleveggsyntesemaskineriet. Ved gradvis senket uttrykk av ektopisk *pbp2x*, og delesjon av *pbp2x_{wt}* fra genomet, kan man derfor tenke seg at det septale celleveggsyntesemaskineriet gradvis mister sin transpeptideringsaktivitet. Man kan se for seg en situasjon der det septale celleveggsyntesemaskineriet ikke fungerer optimalt slik at cellene ikke klarer å dele seg som normalt. Samtidig kan man tenke seg at transpeptideringen av den perifere celleveggen har tatt overhånd slik at det blir en ubalanse over på perifer celleveggsyntese.

Mikroskopi av mutantene med delesjon av *pbp1a*, *pbp2a* og *pbp1a* viste ingen avvikende fenotype utover det som ble observert for SPH165. Derimot viste vekststudiene at *S. pneumoniae* responderer raskere på *pbp2x*-depletion når *pbp1a* er fjernet fra genomet (MTS4, fig 4.7C) enn effekten som ble observert for kontrollen. Dette tyder på at PBP2x avhenger av transglykosylase- og/eller transpeptideringsaktiviteten til PBP1a. Det at man ikke ser samme effekt i en Δ *pbp1b*- eller Δ *pbp2a*-bakgrunn, gir grunn til å tro at ingen av de andre klasse A PBPene kan vikariere fullstendig for PBP1a.

Også her må man være klar over at resultatene ikke kan forklares bare med bakgrunn i funksjonen til PBPene. Både det perifere og det septale syntesemaskineriet består av mange komponenter som trolig kan påvirke både vekst og morfologi, og det er også mulig at disse komponentene kan bli påvirket av depletion av *pbp2x*.

5.4 PBP1a har en sentral rolle blant Klasse A PBPer

Resultatene i dette arbeidet tyder på at PBP1a har en mer sentral rolle i celleveggsyntesen hos pneumokokker enn de øvrige klasse A PBPer. Fjerning av *pbp1a* fra genomet ser ut til å påvirke mutantene ved depletion av begge klasse B PBPer. Dette tyder på at PBP1a har en nøkkelrolle i samarbeid med klasse B PBPer. Det er mulig at PBP2x og PBP2b er avhengig av transglykosylerings- og/eller transpeptidaseaktiviteten til PBP1a spesielt. Likevel kan *S. pneumoniae* overleve med PBP2a i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn, noe som tyder på at PBP2a kan vikariere for PBP1a i en viss grad (Hoskins *et al.* 1999; Paik *et al.* 1999). Resultatene fra depletion av PBP2x og PBP2b i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn indikerte imidlertid at PBP2a ikke klarer å utfylle funksjonen til PBP1a fullstendig. Resultatene fra depletionstudiene av PBP2a og PBP1a ga også en videre indikasjon på at PBP1a har en mer sentral rolle i celleveggsyntesen i forhold til de andre klasse A PBPer (jf. avsnitt 5.5).

5.5 Delesjon av *pbp1a* gir lavere veksthastighet ved depletion av *pbp2a*

Som omtalt innledningsvis vet man fra litteraturen at det ikke er mulig å lage en $\Delta pbp1a \Delta pbp2a$ -dobbelmutant av *S. pneumoniae*. Det ble dermed også gjort vekstforsøk for å undersøke om man kan observere en forskjell mellom depletion av *pbp2a* i $\Delta pbp1a$ -bakgrunn, og depletion av *pbp1a* i $\Delta pbp2a$ -bakgrunn.

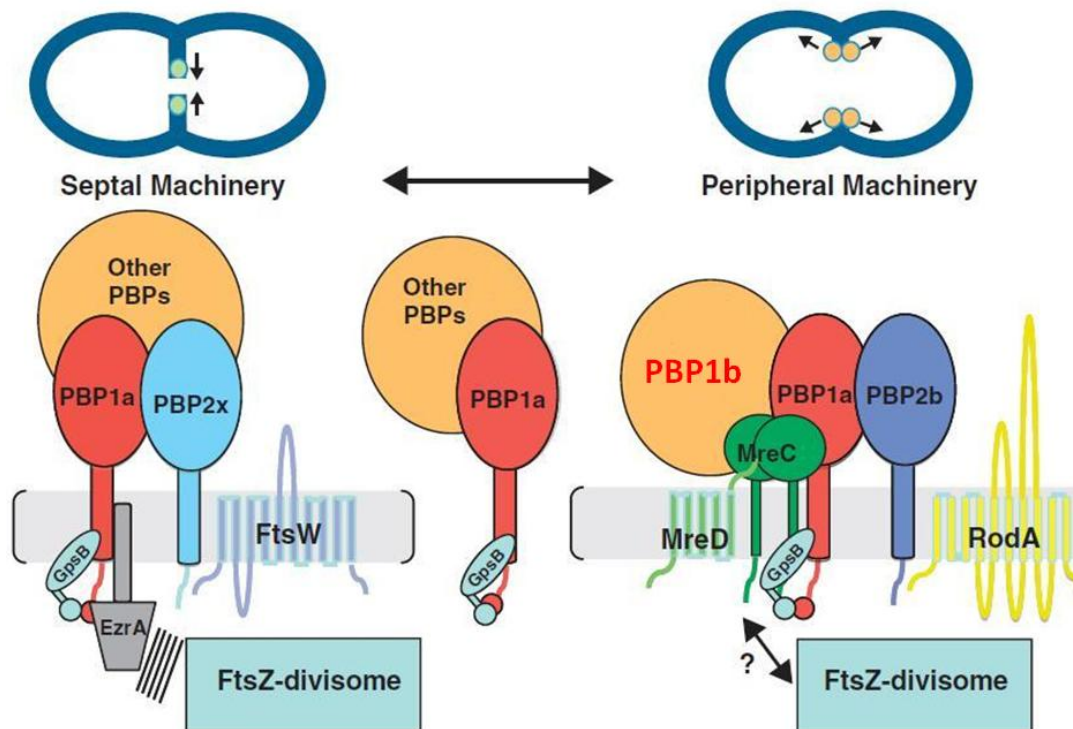
Resultatene fra vekstforsøk med MTS14, hvor *pbp2a* depletes i en $\Delta pbp1a$ -bakgrunn, viser en større effekt enn depletion av *pbp2a* i en MTS13-enkelmutant (Fig 4.2). Denne effekten viser seg ved redusert veksthastigheten for MTS14 dyrket uten ComS*. Vekstreduksjonen man ser for depletet MTS14 blir ikke observert for MTS19 hvor *pbp1a* depletes i en $\Delta pbp2a$ -bakgrunn (Fig 4.3 og Tab.4.2). Depletion av MTS19 ble imidlertid vist å gå raskere i autolysis etter stasjonærfasen. Depletion av PBP1a i MTS18 viste at den går raskere i autolysis etter stasjonærfase (Fig. 4.4A) enn *pbp2a*-depletion mutanten MTS13 (Fig 4.2A). Det kan tyde på at celleveggen blir skjørere når *pbp1a* er fjernet fra genomet enn når *pbp2a* er fjernet. Man kan tenke seg at PBP1a har en større rolle i celleveggsyntesen enn *pbp2a*, eller at det trengs en høyere konsentrasjon av PBP1a enn PBP2a for optimal vekst hos pneumokokker.

For å undersøke hvorvidt et økt uttrykk av *pbp2a* i større grad kunne kompensere for tapet av *pbp1a*, ble det forsøkt med et overuttrykk av *pbp2a*. Uttrykket av PBPer er normalt sett lavt hos pneumokokker. Tidligere eksperimenter på laboratoriet med PBPer og andre lavt uttrykte proteiner, har vist at 2,0 μM ComS* gir et uttrykk fra P_{comX} som er høyere enn det native

uttrykket. Vekstkurvene (Fig. 4.1) viser en betydelig redusert veksthastighet ved tilsetning av 2,0 μM ComS* i vekstmediet til MTS14 i forhold til vekst ved de lavere ComS*-konsentrasjonene, og sammenlignet med kontrollen. Det tyder på 2,0 μM ComS* fører til et overuttrykk av *pbp2a* som er kunstig sammenlignet med normalen, og det kan forklare hvorfor veksthastigheten reduseres. På tross av overuttrykk av *pbp2a* ser ikke dette ut til å kompensere for tapet av *pbp1a*. Derimot ser det ut til at et overuttrykk av *pbp2a* er skadelig for cellen.

5.6 PBP1a samarbeider med PBP2b og PBP2x

Som omtalt innledningsvis trengs både perifer og septal celleveggsyntese for å danne den ovoide formen som er klassisk morfologi hos *S. pneumoniae*. Studier har kommet fram til en teori om at det er to celleveggsyntesemaskinerier hos pneumokokker hvor celleveggsyntesen foregår. Det er ikke avklart om disse celleveggsyntesemaskineriene danner ett stort kompleks, eller om maskineriene arbeider separat i to komplekser (Land & Winkler 2011; Zapun *et al.* 2008). Sham *et al.* (2012) har presentert en modell som viser en mulig sammensetting av det septale og det perifere maskineriet (fig. 1.7). Resultatene fra mitt arbeid støtter denne modellen med hensyn på samlokaliseringen av PBP1a og klasse B PBPene, og i tillegg har resultatene gitt en indikasjon på lokalisering av PBP1b sin rolle i denne modellen, jf. Figur 5.1.



Figur 5.1 Modell for det septale og det perifere celleveggsyntesemaskineriet hos *S. pneumoniae*. Modellen er modifisert fra Sham *et al.* (2012) etter resultatene som kom fram under dette arbeidet. I tillegg til at resultatene i dette arbeidet støtter lokaliseringen av PBP1a, PBP2x og PBP2b, har resultatene gitt indikasjoner på at PBP1b (rød skrift) kan høre til i det perifere maskineriet.

Med utgangspunkt i denne modellen (Sham *et al.* 2012), kan man tenke seg at morfologien som ble observert ved depleksjon av *pbp2b* viser at PBP2b er involvert i den perifere celleveggsyntesen. Dette støttes også av lokaliseringsstudiene som ble utført av Morlot *et al.* (2003). Både mikroskopi- og depleksjonsstudiene viste en raskere utviklet fenotype når *pbp1a* var fjernet fra genomet enn det som ble sett for enkeltmutanten. Man kan ut ifra dette, og fra modellen vist i figur 5.1, tenke seg at PBP2b og PBP1a samarbeider i et kompleks i det perifere celleveggsyntesemaskineriet. Depleksjonseffekten som ble observert da *pbp1b* var fjernet fra genomet indikerer at også PBP1b samarbeider med PBP2b, og det kan også tyde på at PBP1b kan høre til i det perifere celleveggsyntesemaskineriet.

Med utgangspunkt i modellen til Sham *et al.* (2012) tydet morfologien som ble observert ved depleksjon av *pbp2x*, på at PBP2x hører til i den septale celleveggsyntesen. Depleksjon av *pbp2x* viste seg også å utvikle fenotypen tidligere da *pbp1a* var fjernet fra genomet. Dette gjør at man kan tenke seg at PBP2x samarbeider med PBP1a, og at PBP1a er en del av det septale syntesemaskineriet.

Depletionstudiene av PBP1a og PBP2a ga flere indikasjoner på at PBP1a er sentral blant klasse A PBPene. Blant annet ser man oppvekst til lavere maks OD₄₉₂ og tidligere autolyse når *pbp1a* er slått ut, og man kan tenke seg at celleveggen da blir annerledes og kanskje skjøre. Fra litteraturen vet man at PBP2a og PBP1a kan vikariere for hverandre i en viss grad. Resultatene fra dette arbeidet tyder derimot på at PBP2a ikke er en fullverdig erstatter for PBP1a, dette viste seg spesielt ved deplektion av PBP2b og PBP2x i $\Delta pbp1a$ - bakgrunn. Et stort antall studier har vist at det er endringer i PBP1a, PBP2b og PBP2x som oftest fører til resistens mot penicillin og andre β -laktamantibiotika. Mutasjoner i PBP2b og PBP2x fører til "low-level" resistens mot β -laktamantibiotika hos pneumokokker. Studier har vist at pneumokokker utvikler "high-level" resistens ved mutasjoner i PBP1a i tillegg til PBP2b eller PBP2x (Grebe & Hakenbeck 1996; Hakenbeck *et al.* 1998). Dette styrker teorien om at PBP1a samarbeider med PBP2b og PBP2x, og at PBP1a har en hovedrolle blant klasse A PBPene.

Som allerede nevnt kan man ikke tolke resultatene fra denne oppgaven kun med å se på PBPene isolert sett. Celledeling og celleveggsyntese er nøye regulerte og koordinerte prosesser hvor mange komponenter inngår. Som man ser i modellen, jf. fig 5.1, er det sannsynlig at PBPene samarbeider med andre komponenter i maskineriene. Resultatene mine støtter modellen i Fig. 5.1 med hensyn på PBPenes lokalisering. Siden de er oppnådd ved hjelp av andre metoder enn de som er brukt tidligere, bidrar de til å styrke denne modellen.

6. Konklusjon og videre arbeid

I dette arbeidet ble det vist at PBP1a er sentral blant klasse A PBPene i *S.pneumoniae*. Fra litteraturen vet man at PBP2a og PBP1a kan vikariere for hverandre til en viss grad. Det ble her vist at PBP2a er en mulig, men ikke fullverdig erstatter for PBP1a. Resultatene ga også indikasjoner på at PBP1a har en sentral rolle i samarbeid med PBP2x i det septale celleveggsyntesemaskineriet. Videre tydet eksperimentene på at PBP1a, sammen med PBP1b, også samarbeider med PBP2b i den perifere celleveggsyntesen. Resultatene fra dette studiet styrker dermed tomaskineri-modellen som har blitt foreslått å være gjeldende for celleveggsyntesen pneumokokker.

I dette arbeidet gikk det meste av tiden til å lage mutantene. På grunn av begrenset tid ble det liten tid til å karakterisere mutantene, og det ble valgt å se på fenotypiske forandringer med hensyn på vekst og morfologi. Det hadde derfor vært interessant å utføre andre eksperimenter for eventuelt å underbygge to-maskinerimodellen ytterligere. For eksempel hadde det vært av interesse å undersøke PBPenes lokalisering i celleveggen hos de forskjellige mutantene under den ektopiske nedreguleringen av uttrykket. En mulig strategi kunne vært å benytte GFP, eller antistoffer og immunofluorescensmikroskopi som ble brukt i arbeidet til Morlot *et al.* (2003).

Som nevnt ble det forsøkt å undersøke hvorvidt transkripsjonen av *pbp1a* eller *pbp2a* økte ved depletion av *pbp2b*. Det ble forsøkt utført et luciferasegenreporterassay, men på grunn av tekniske problemer med maskinen ble dette eksperimentet ikke repetert. På laboratoriet ved seksjon for molekylær mikrobiologi vil dette bli gjentatt. En alternativ strategi, som også er langt mer sensitiv er å utføre real-time PCR for å måle transkripsjonen av mRNA under depletion.

Videre kan det også være verdt å undersøke i hvilken grad PBP1a, PBP1b og PBP2a samhandler med andre proteiner i celleveggsyntesemaskineriet. En mulighet kan være å lage depletionmutanter av andre essensielle gener som er assosiert med dette maskineriet, for deretter å deplete de aktuelle genene i en $\Delta pbp1a$, $\Delta pbp1b$ eller $\Delta pbp2a$ -bakgrunn. Det vil også være av interesse å undersøke hvorvidt depletion av $\Delta pbp1a\Delta pbp2a$ -dobbelknockoutmutantene medfører endringer i cellens overflate. Ved å rense celleveggen fra depletete kulturer av $\Delta pbp1a\Delta pbp2a$ -dobbelknockoutmutantene og degradere dem med LytA kan peptidene i celleveggen frigjøres og analyseres for grad av kryssbinding og forgreininger ved HPLC (High performance liquid chromatography) og MS (Massespektrometri).

Referanseliste

- Adam, D. (2002). Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 (suppl 1): 1-5.
- Apfel, M., Taka, B., Fountoulakis, M., Stieger, M. & Keck, W. (1999). Use of Genomics To Identify Bacterial Undecaprenyl Pyrophosphate Synthetase: Cloning, Expression, and Characterization of the Essential *uppS* Gene. *Journal of Bacteriology*, 181: 483-492.
- Austrian, R. (1981). Pneumococcus: The First One Hundred Years. *Reviews of Infectious Diseases*, 3 (2).
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Mol Med*, 1 (4): 344-65.
- Berg, K. H., Biørnstad, T. J., Straume, D. & Håvarstein, L. S. (2011). A peptide-regulated gene depletion system developed for use in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*.
- Bergan, T. (2001). Antibiotic usage in Nordic countries. *Int J Antimicrob Agents*, 18 (3): 279-82.
- Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., Lewis, E., Ray, P., Hansen, J. R., Elvin, L., Ensor, K. M., Hackell, J., Siber, G., et al. (2000). Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J*, 19 (3): 187-95.
- Bogaert, D., De Groot, R. & Hermans, P. W. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4 (3): 144-54.
- Brueggemann, A. B., Pai, R., Crook, D. W. & Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog*, 3 (11): e168.
- Bui, N. K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., Simorre, J. P. & Vollmer, W. (2012). Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Biochem*, 421 (2): 657-66.
- Cabeen, M. T. & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (8): 601-610.
- Chan, P. F., O'Dwyer, K. M., Palmer, L. M., Ambrad, J. D., Ingraham, K. A., So, C., Lonetto, M. A., Biswas, S., Rosenberg, M., Holmes, D. J., et al. (2003). Characterization of a Novel Fucose-Regulated Promoter (P_{fcsK}) Suitable for Gene Essentiality and Antibacterial Mode-of-Action Studies in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 185 (6): 2051-2058.
- Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J. P. & Msadek, T. (2001). Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol*, 183 (24): 7295-307.
- Chi, F., Nolte, O., Bergmann, C., Ip, M. & Hakenbeck, R. (2007). Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int J Med Microbiol*, 297 (7-8): 503-12.
- Claverys, J. P., Roger, M. & Sicard, A. M. (1980). Excision and repair of mismatched base pairs in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet*, 178 (1): 191-201.
- Claverys, J. P., Martin, B. & Polard, P. (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, 33 (3): 643-56.
- Dagbladet. (2012). *Bakterier som lurar vaksiner med genbytte*. Dagbladet. Oslo. Tilgjengelig fra:

- <http://www.dagbladet.no/2012/01/29/nyheter/bakterier/vaksine/sykdom/19999271/29.01.2012>.
- Davidson, M. W. & Abramowitz, M. Optical Microscopy.
- De Las Rivas, B., Garcia, J. L., Lopez, R. & Garcia, P. (2002). Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo-beta-N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol*, 184 (18): 4988-5000.
- Denapaite, D., Chi, F., Maurer, P., Nolte, O. & Hakenbeck, R. (2007). Mechanisms of Penicillin Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Targets, Gene Transfer and Mutations. I: Hakenbeck, R. & Chhatwal, S. (red.) *Molecular Biology of Streptococci*, s. 291-303. Norfolk: Horizon Bioscience.
- Denapaite, D., Bruckner, R., Hakenbeck, R. & Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of Teichoic Acids in *Streptococcus pneumoniae* and Closely Related Species: Lessons from Genomes. *Microb Drug Resist*.
- Dowson, C. G., Coffey, T. J., Kell, C. & Whiley, R. A. (1993). Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 9 (3): 635-43.
- Dowson, C. G., Barcus, V., King, S., Pickerill, P., Whatmore, A. & Yeo, M. (1997). Horizontal gene transfer and the evolution of resistance and virulence determinants in *Streptococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 26: 42S-51S.
- 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 (2): 395-408.
- Eichenbaum, Z., Federle, M. J., Marra, D., De Vos, W. M., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M. & Scott, J. R. (1998). Use of the Lactococcal *nisA* Promoter To Regulate Gene Expression in Gram-Positive Bacteria: Comparison of Induction Level and Promoter Strength. *Journal of Bacteriology*, 64 (8).
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H. S. & Havarstein, L. S. (2009). Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology*, 155 (Pt 7): 2223-34.
- Esko, J. D., L., D. T. & Raet, C. R. H. (2009). Eubacteria and Archaea. I: Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Betrtozzi, C. R., Hart, G. W. & Etzlers, M. E. (red.) *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press.
- FEI-Company. (2006). *All you wanted to know about about Electron Microscopy*. Hillsbro.
- Fischer, W. (1997). Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb Drug Resist*, 3 (4): 309-25.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. haemophilus*. *Br. J. Exp. Pathol*, 10: 226–236.
- 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*. *J Bacteriol*, 192 (5): 1444-54.
- Garcia, P., Gonzalez, M. P., Garcia, E., Lopez, R. & Garcia, J. L. (1999). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol*, 31 (4): 1275-81.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition.
- Gjelstad, S., Straand, J., Dalen, I., Fetveit, A., Strom, H. & Lindbaek, M. (2011). Do general practitioners' consultation rates influence their prescribing patterns of antibiotics for

- acute respiratory tract infections? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (10): 2425-2433.
- Golubchik, T., Brueggemann, A. B., Street, T., Gertz, R. E., Spencer, C. C. A., Ho, T., Giannoulatou, E., Link-Gelles, R., Harding, R. M., Beall, B., et al. (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nature Genetics*, 44 (3): 352-355.
- Grebe, T. & Hakenbeck, R. (1996). Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 40 (4): 829-34.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*, 27 (2): 113-59.
- Hakenbeck, R., Ellerbrok, H., Briese, T., Handwerger, S. & Tomasz, A. (1986). Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrob Agents Chemother*, 30 (4): 553-8.
- Hakenbeck, R., Konig, A., Kern, I., van der Linden, M., Keck, W., Billot-Klein, D., Legrand, R., Schoot, B. & Gutmann, L. (1998). Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 180 (7): 1831-40.
- Hakenbeck, R. (1999). beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and evolutionary mechanism. *Chemotherapy*, 45 (2): 83-94.
- Henriques-Normark, B. (2007). Molecular Epidemiology and Mechanisms for Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. I: Hakenbeck, R. & Chhatwal, S. (red.) *Molecular Biology of Streptococci*, s. 269-290. Norfolk: Horizon Bioscience.
- Henriques-Normark, B. & Normark, S. (2010). Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Experimental Cell Research*, 316 (8): 1408-1414.
- Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 16 (15): 7351-67.
- Hiller, N. L., Janto, B., Hogg, J. S., Boissy, R., Yu, S., Powell, E., Keefe, R., Ehrlich, N. E., Shen, K., Hayes, J., et al. (2007). Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome. *J Bacteriol*, 189 (22): 8186-95.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77 (1): 51-9.
- Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D. L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T. I., Nicas, T. I. & Jaskunas, S. R. (1999). Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 181 (20): 6552-5.
- Hoskins, J., Alborn, W. E., Jr., Arnold, J., Blaszczyk, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., et al. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol*, 183 (19): 5709-17.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D. A. (1995a). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (24): 11140-4.
- Håvarstein, L. S., Diep, D. B. & Nes, I. F. (1995b). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol*, 16 (2): 229-40.

- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. & Claverys, J. P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol*, 59 (4): 1297-307.
- Jedrzejewski, M. J. (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65 (2): 187-207 ; first page, table of contents.
- Johnsborg, O., Eldholm, V. & Havarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*, 158 (10): 767-78.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjornstad, M. L. & Håvarstein, L. S. (2008). A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Mol Microbiol*, 69 (1): 245-53.
- 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*. *J Bacteriol*, 191 (18): 5859-64.
- Johnsborg, O. & Håvarstein, L. S. (2009b). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev*, 33 (3): 627-42.
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (4): 288-301.
- 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*. *Int J Syst Bacteriol*, 45 (2): 406-8.
- Kell, C. M., Sharma, U. K., Dowson, C. G., Town, C., Balganesh, T. S. & Spratt, B. G. (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett*, 106 (2): 171-5.
- Kilian, M. (1998). *Streptococcus* and *Lactobacillus*. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 2: 633-667.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L. S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. & Sorensen, U. B. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One*, 3 (7): e2683.
- Kloosterman, T. G., van der Kooi-Pol, M. M., Bijlsma, J. J. E. & Kuipers, O. P. (2007). The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn²⁺ stress by activation of the Zn²⁺-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 65 (4): 1049-1063.
- Kloosterman, T. G., Witwicki, R. M., van der Kooi-Pol, M. M., Bijlsma, J. J. E. & Kuipers, O. P. (2008). Opposite Effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-Mediated Expression of the Virulence Genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 190 (15): 5382-5393.
- Lacks, S. & Hotchkiss, R. D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta*, 39: 508-18.
- Land, A. D. & Winkler, M. E. (2011). The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a. *Journal of Bacteriology*, 193 (16): 4166-4179.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Biotechnology*, 24: 99-103.
- Mitchell, T. J. (2003). The pathogenesis of streptococcal infections: from Tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, 1 (3): 219-230.

- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Molecular Microbiology*, 50 (3): 845-855.
- Morrison, D. A. (2007). Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Strategies for Genome Modification. I: Chhatwal, R. H. a. S. (red.) *Molecular Biology of the Streptococci*, s. 3-24. Norfolk: Horizon Bioscience.
- NCBI. (2012). *The National Centre For Biotechnology Information*. . Tilgjengelig fra: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/> 25.04.2012.
- NewEnglandBioLabs. (2012a). *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*
- NewEnglandBioLabs. (2012b). *Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer*.
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S. & Cherian, T. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374 (9693): 893-902.
- Oxoid. AnaeroGenTM, produktbeskrivelse. Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England.
- Paik, J., Kern, I., Lurz, R. & Hakenbeck, R. (1999). Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, 181 (12): 3852-6.
- Perez-Nunez, D., Briandet, R., David, B., Gautier, C., Renault, P., Hallet, B., Hols, P., Carballido-Lopez, R. & Guedon, E. (2011). A new morphogenesis pathway in bacteria: unbalanced activity of cell wall synthesis machineries leads to coccus-to-rod transition and filamentation in ovococci. *Mol Microbiol*, 79 (3): 759-71.
- 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 Res*, 20 (22): 6103.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (red.). (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. . 3 utg.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. . *Biotechnology*, 24: 104-8.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32 (2): 234-58.
- Scheffers, D. J. & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (4): 585-+.
- 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*, 15 (2): 194-203.
- Sibold, C., Henrichsen, J., Konig, A., Martin, C., Chalkley, L. & Hakenbeck, R. (1994). Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol*, 12 (6): 1013-23.
- Simonsen, G. S. (2009). Overvaking og forekomst av antibiotikaresistens i Norge. *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, 129 (7): 623-7.
- Song, J. H., Ko, K. S., Lee, J. Y., Baek, J. Y., Oh, W. S., Yoon, H. S., Jeong, J. Y. & Chun, J. (2005). Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells*, 19 (3): 365-74.
- Straume, D., Berg, K., Wei, H. & Håvarstein, L. S. (2012). Damage to the integrity of the cell envelope makes exponentially growing *Streptococcus pneumoniae* sensitive to exogenous LytA. *Molecular Microbiology*, Submitted Manuscript.

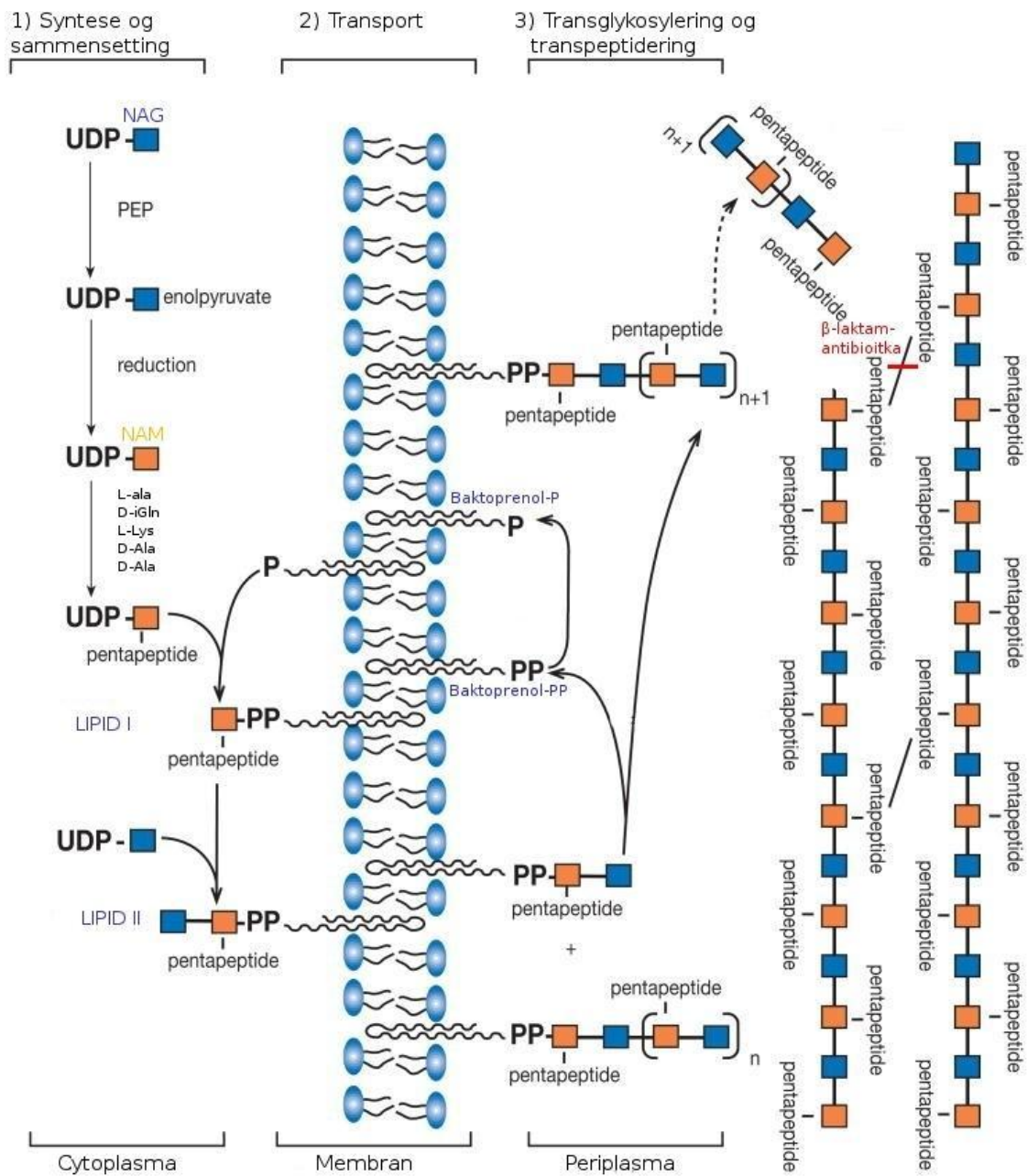
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. & Morrison, D. A. (2001). An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11): 5190-5196.
- Thanassi, J. A., Hartman-Neumann, S. L., Dougherty, T. J., Dougherty, B. A. & Pucci, M. J. (2002). Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res*, 30 (14): 3152-62.
- ThermoScientific. (2012). *D-Luciferin Instructions*. Biotechnology, P. (red.).
- Tomasz, A. (1966). Model for the mechanism controlling the expression of competent state in *Pneumococcus* cultures. *J Bacteriol*, 91 (3): 1050-61.
- Tomasz, A. (1967). Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science*, 157 (3789): 694-7.
- Trzcinski, K., Thompson, C. M. & Lipsitch, M. (2004). Single-step capsular transformation and acquisition of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 186 (11): 3447-52.
- van der Poll, T. & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374 (9700): 1543-56.
- Vestrheim, D. F., Lovoll, O., Aaberge, I. S., Caugant, D. A., Hoiby, E. A., Bakke, H. & Bergsaker, M. R. (2008). Effectiveness of a 2+1 dose schedule pneumococcal conjugate vaccination programme on invasive pneumococcal disease among children in Norway. *Vaccine*, 26 (26): 3277-81.
- Vestrheim, D. F., Hoiby, E. A., Bergsaker, M. R., Ronning, K., Aaberge, I. S. & Caugant, D. A. (2010). Indirect effect of conjugate pneumococcal vaccination in a 2+1 dose schedule. *Vaccine*, 28 (10): 2214-21.
- Vollmer, W. (2007). Structure and Biosynthesis of the Pneumococcal Cell Wall. I: Hakenbeck, R. & Chhatwal, S. (red.) *Molecular Biology of Streptococci*, s. 83-117. Norfolk: Horizon Bioscience.
- Vollmer, W., Blanot, D. & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *Fems Microbiology Reviews*, 32 (2): 149-167.
- WHO. (2012). Pneumococcal vaccines - WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, 87 (14): 129-144.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2009). *Prescott's principles of Microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Zapun, A., Vernet, T. & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 (2): 345-360.
- Zhang, J. R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W. & Tuomanen, E. I. (1999). Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol*, 31 (5): 1477-88.

Vedlegg

Vedleggsinnhold

Vedlegg A Biosyntese av peptidglykan	I
Vedlegg B Diagram fra vekstforsøk	II
B.1 Vekstkurve for SPH 131	
B.2 Vekstkurve for MTS13	
B.3 Vekstkurve for MTS14 (0,02 μM ComS*)	
B.4 Vekstkuve for MTS14 (0,2 μM ComS*)	
B.5 Vekstkurve for MTS14 (2,0 μM ComS*)	
B.6 Vekstkurve for SPH130	
B.7 Vekstkurve for MTS18	
B.8 Vekstkurve for MTS19 (0,02 μM ComS*)	
B.9 Vekstkurve for MTS19 (0,2 μM ComS*)	
B.10 Vekstkurve for MTS19 (2,0 μM ComS*)	
B.11 Vekstkurve for SPH164	
B.12 Vekstkurve MTS5	
B.13 Vekstkurve SPH165	
B.14 Vekstkurve for MTS3	
B.15 Vekstkurve for MTS4	
B.16 Vekstkurve for SPH158	
B.17 Vekstkurve for MTS20	
B.18 Vekstkurve for MTS21	
B.19 Vekstkurve for MTS22	
Vedlegg C Benevninger og forkortelser	XXI
C.1 Benevninger	
C.2 Forkortelser	

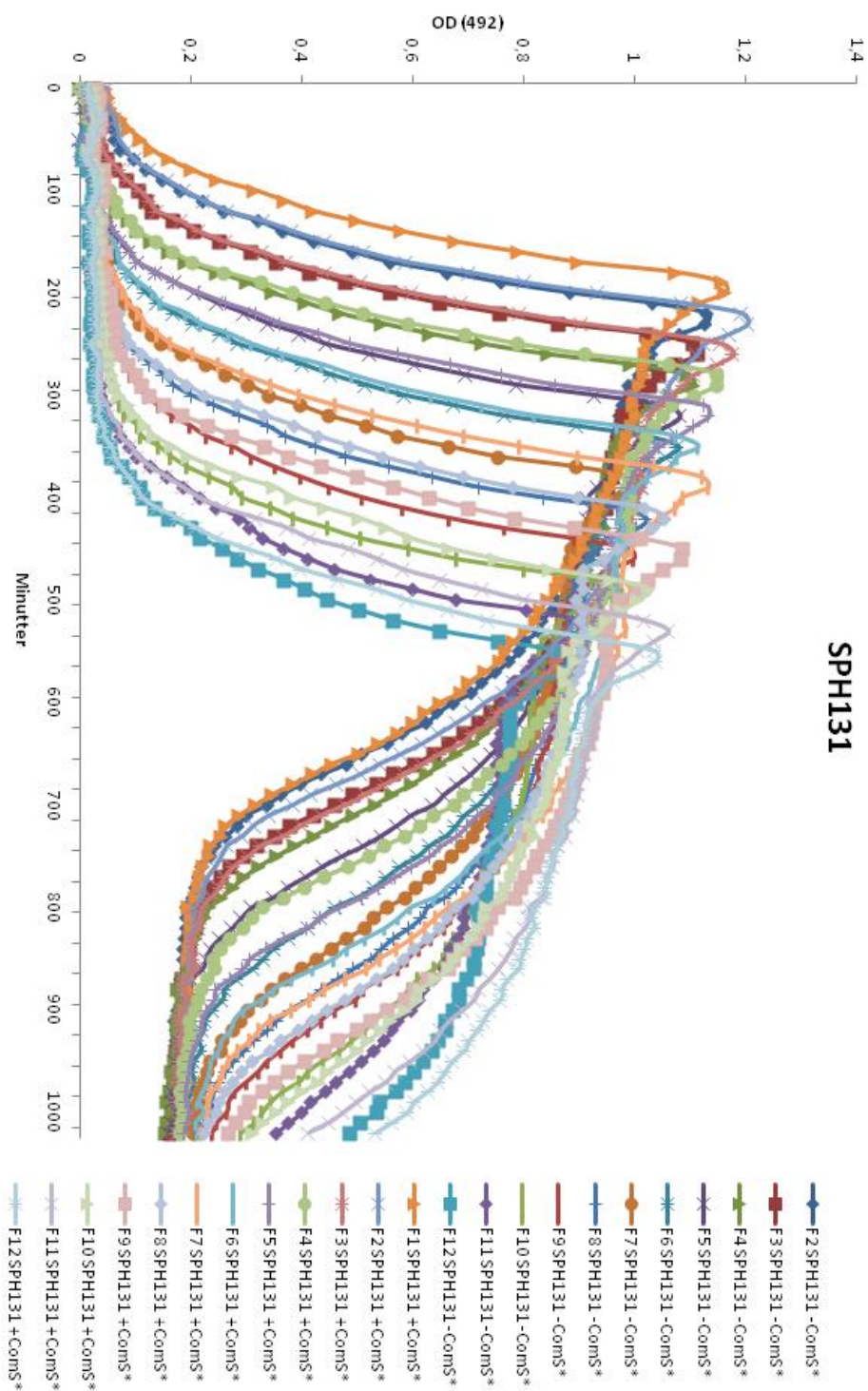
Vedlegg A Biosyntese av peptidoglykan



Figur A Biosyntese av peptidoglykan. Figuren viser en skjematisk oversikt over biosyntese av peptidoglykan hos *S. pneumoniae*. Uridin-trifosfat-N-acetylmuraminsyre (UPD-NAM, oransje) dannes i reaksjoner med fosfoenolpyruvat (PEP) og Uridin-trifosfat-N-acetylglukosamin (UPG-NAG, blå). Pentapeptid bestående av L-Ala, D-iGln, L-Lys og to D-Ala adderes til UDP-NAM. Lipid I dannes ved at UDP-NAM pentapeptid overføres til baktoprenolfosfat som er bundet til membranen. Lipid II dannes ved addisjon av UPD-NAG. Lipid II transporteres over membranen. Transglykosylering og transpeptidering inkorporerer NAG-NAM-pentapeptid inn i allerede eksisterende peptidoglykan. Baktoprenol-PP deforyleres til batoprenol-P. Markert på figuren er også angrepspunktet for β -laktamantibiotika. Figuren er modifisert etter Esko *et al.* (2009)

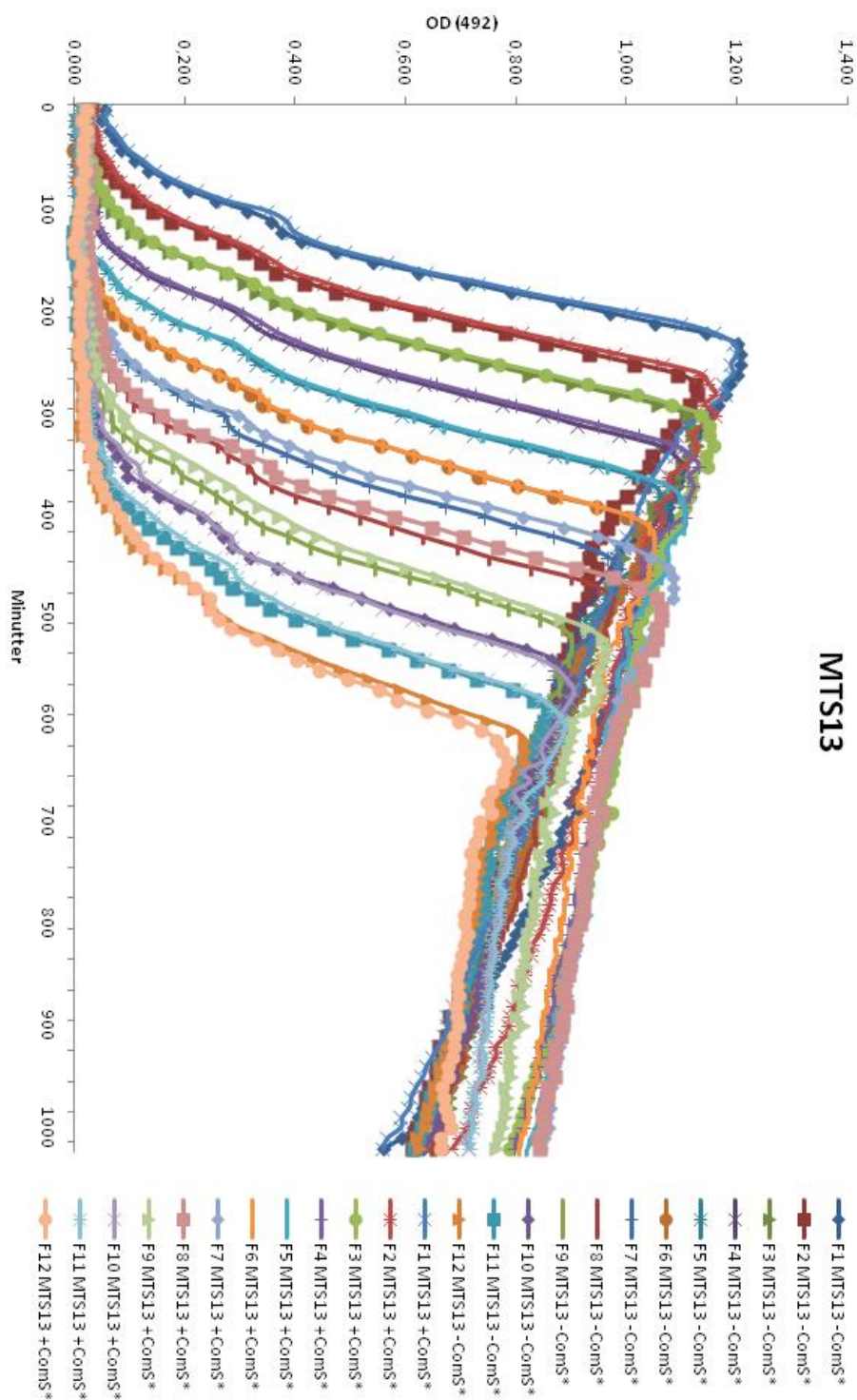
Vedlegg B Diagram fra vekstforsøk

B.1 Vekstkurve for SPH131



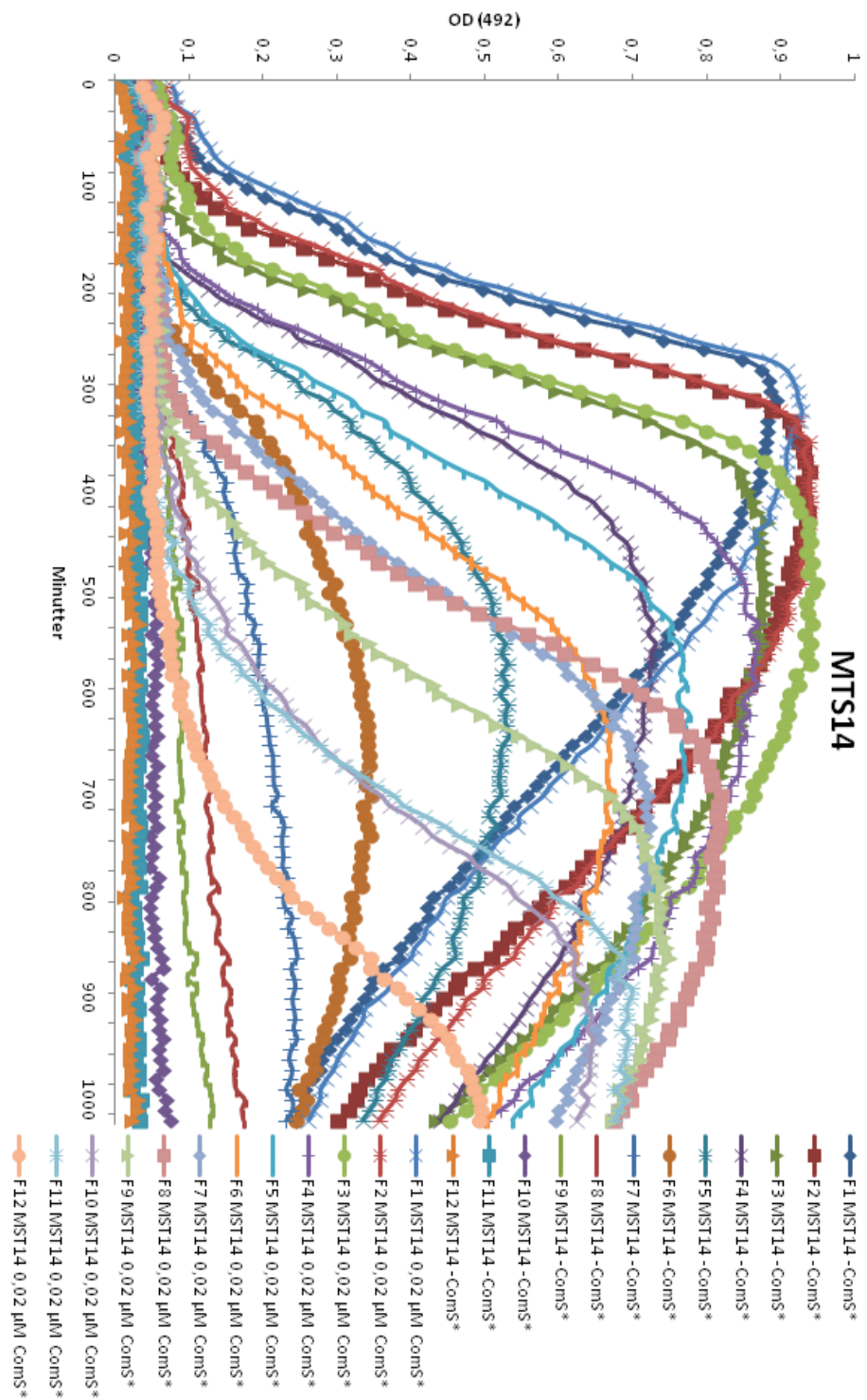
Figur B.1 Vekstkurve for SPH131. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra SPH131 (*Pc_{omx}::janus*) med OD₄₉₂ ~0,04. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD₄₉₂-målinger hvert 10. minutt.

B.2 Vekstkurve for MTS13

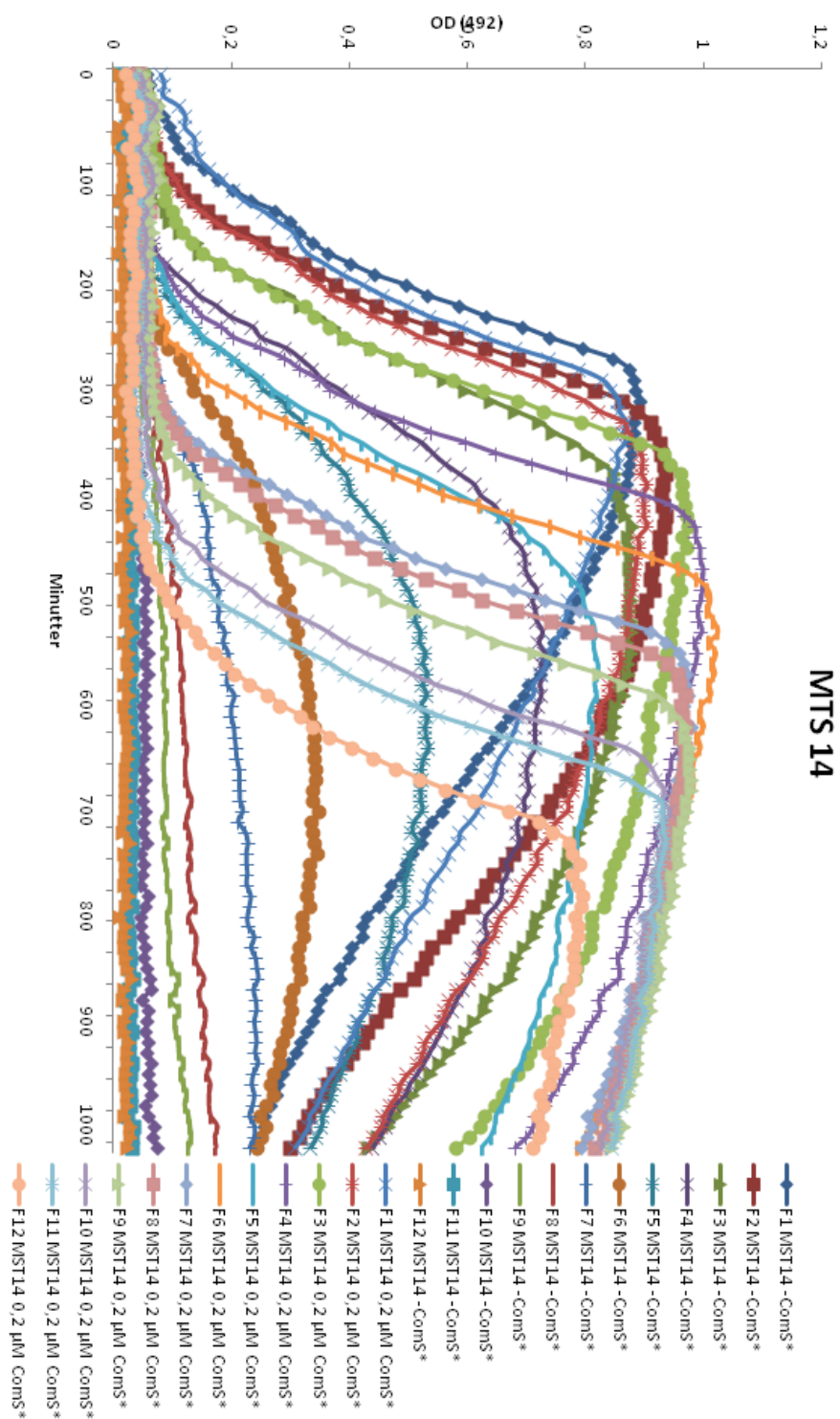


Figur B.2 Vekstkurve for MTS13. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS13 ($Pc_{omX}::pbbp2a$, $\Delta pbbp2a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten $0,02 \mu\text{M ComS}^*$ ved 37°C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt.

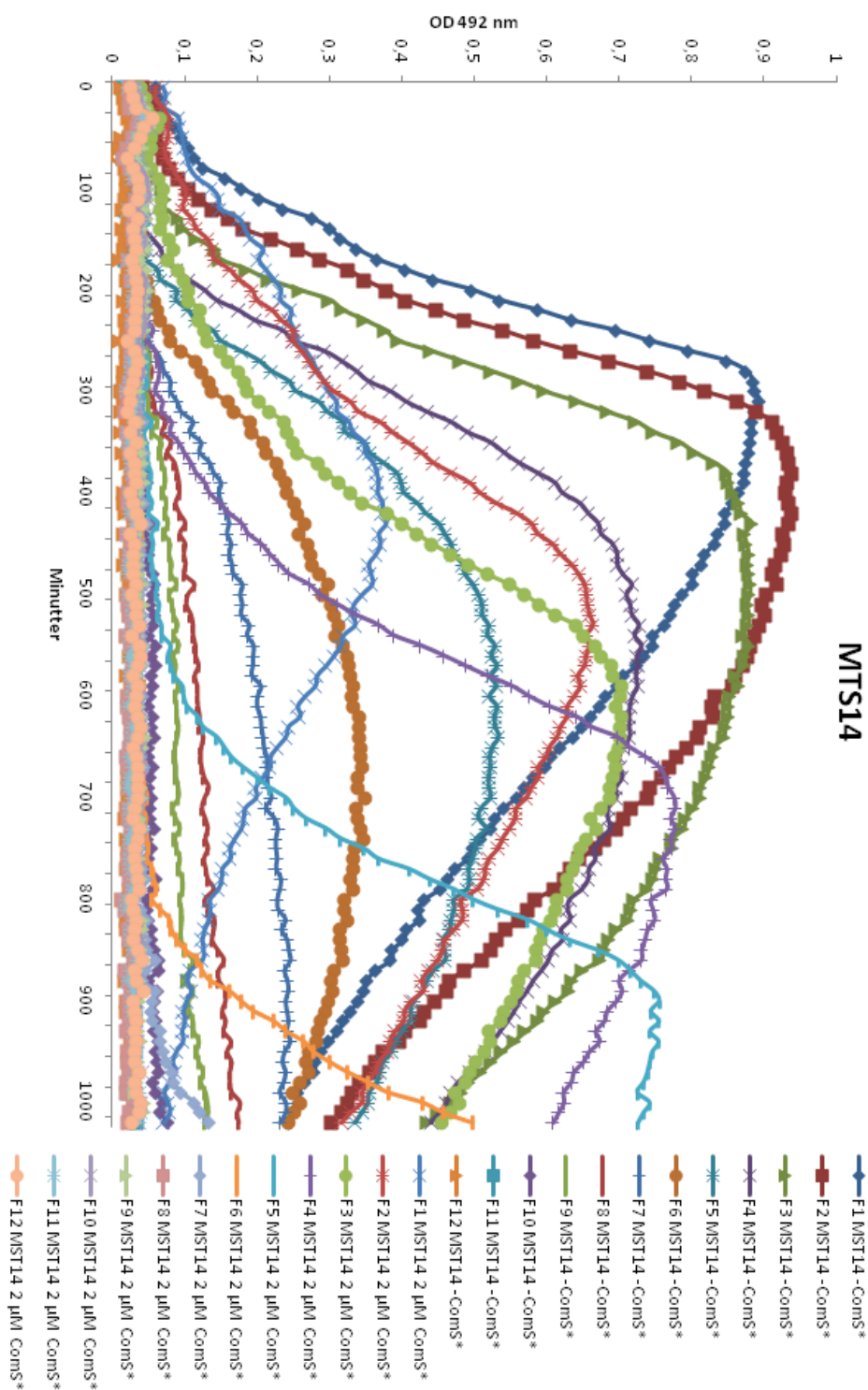
B.3 Vekstkurve for MTS14 (0,02 μM ComS*)



Figur B.3 Vekstkurve for MTS14. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS14 ($P_{comX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a_{wt}$ $\Delta pbp1a_{wt}$) med OD₄₉₂ ~0,04. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,02 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD₄₉₂-målinger hvert 10. minutt.

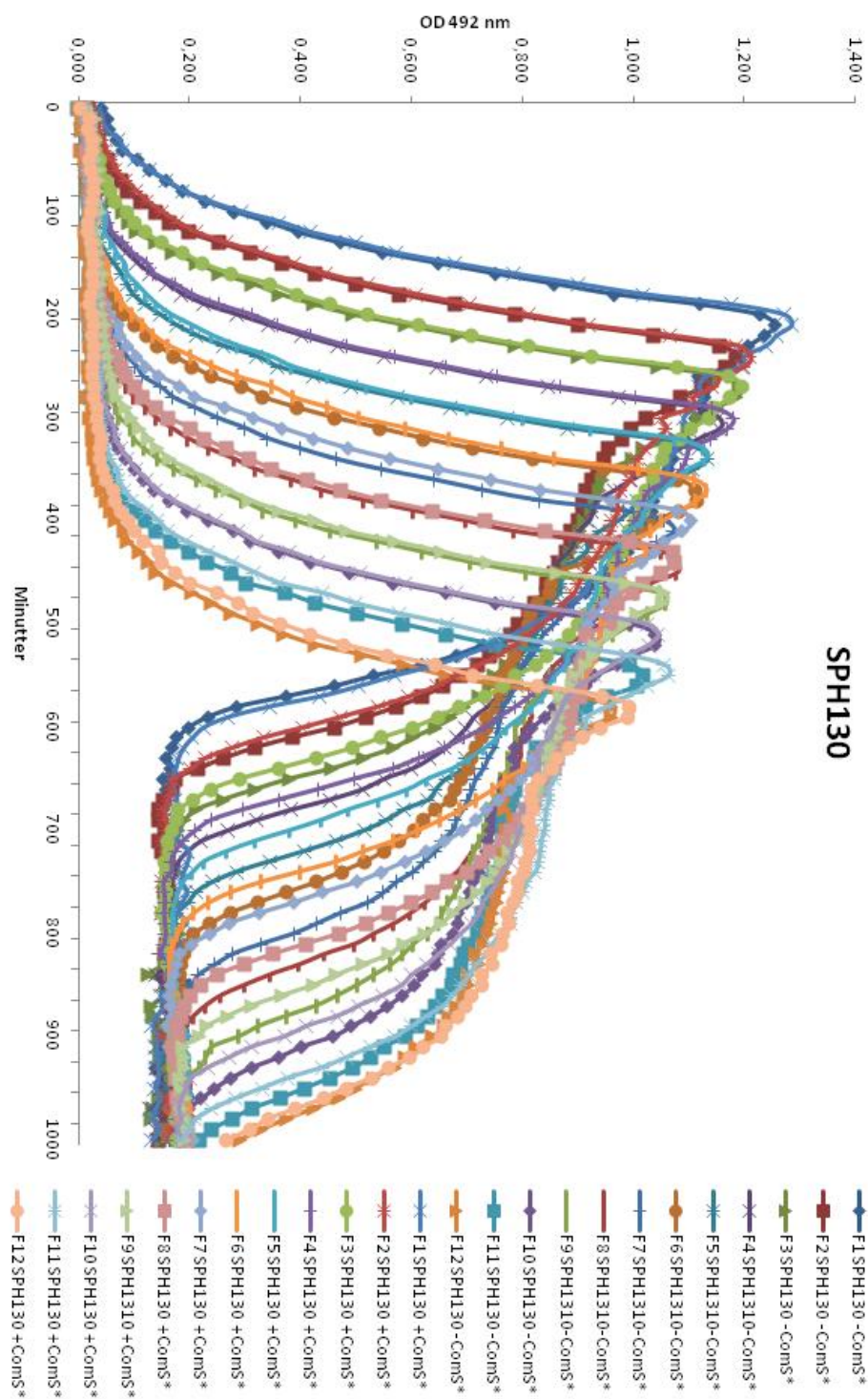
B.4 Vekstkurve for MTS14 (0,2 μM ComS*)

Figur B.4 Vekstkurve for MTS14. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS14 ($Pc_{omX}::pbp2a$, $\Delta pbp2a_{wt}$, $\Delta pbp1a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt.

B.5 Vekstkurve for MTS14 (2,0 μM ComS*)

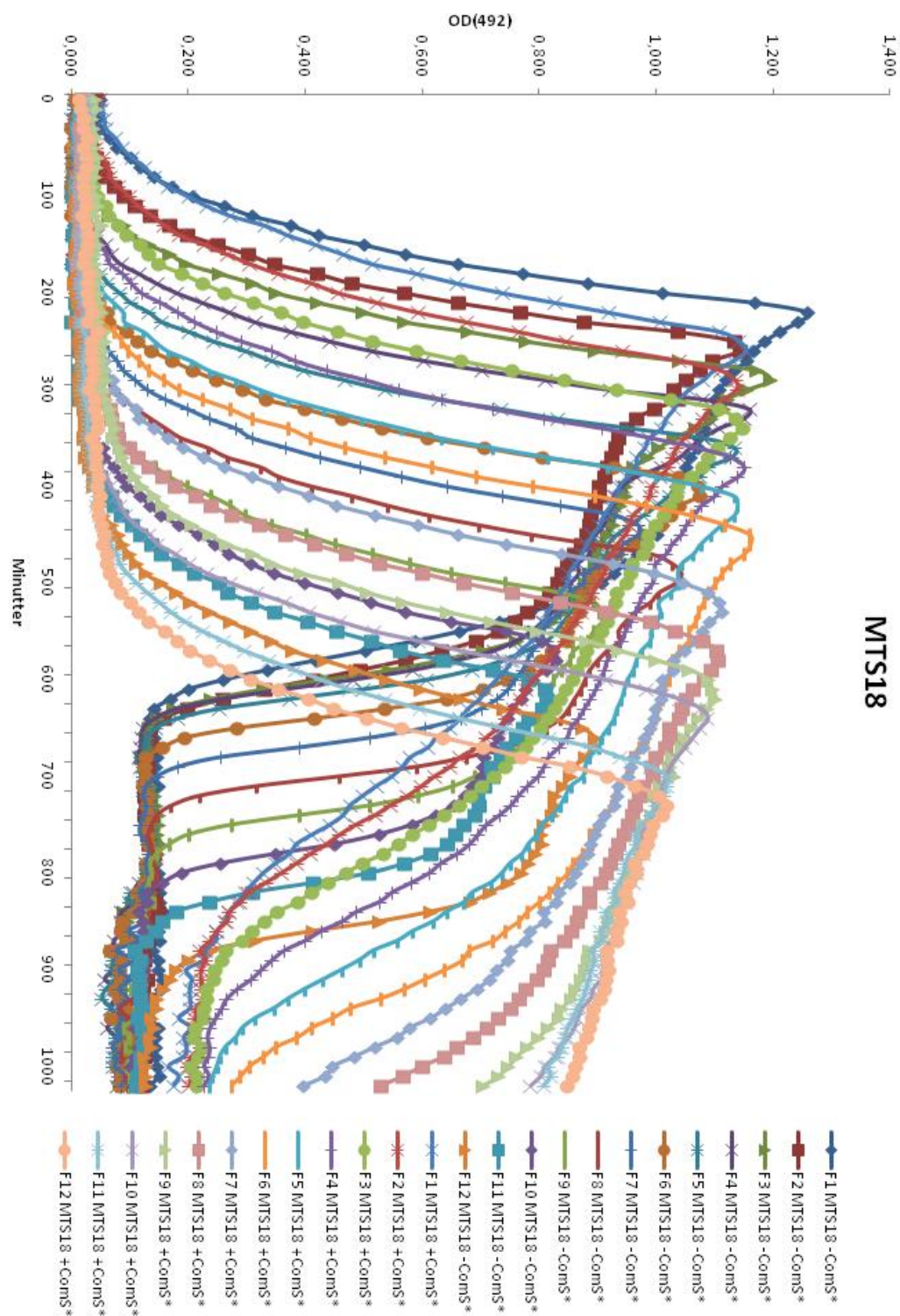
Figur B.5 Vekstkurve for MTS14. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS14 ($P_{c_{omX}}::pbp2a, \Delta pbp2a_{wt} \Delta pbp1a_{wt}$) med OD₄₉₂ ~0,04. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 2,0 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD₄₉₂-målinger hvert 10. minutt.

B.6 Vekstkurve for SPH130



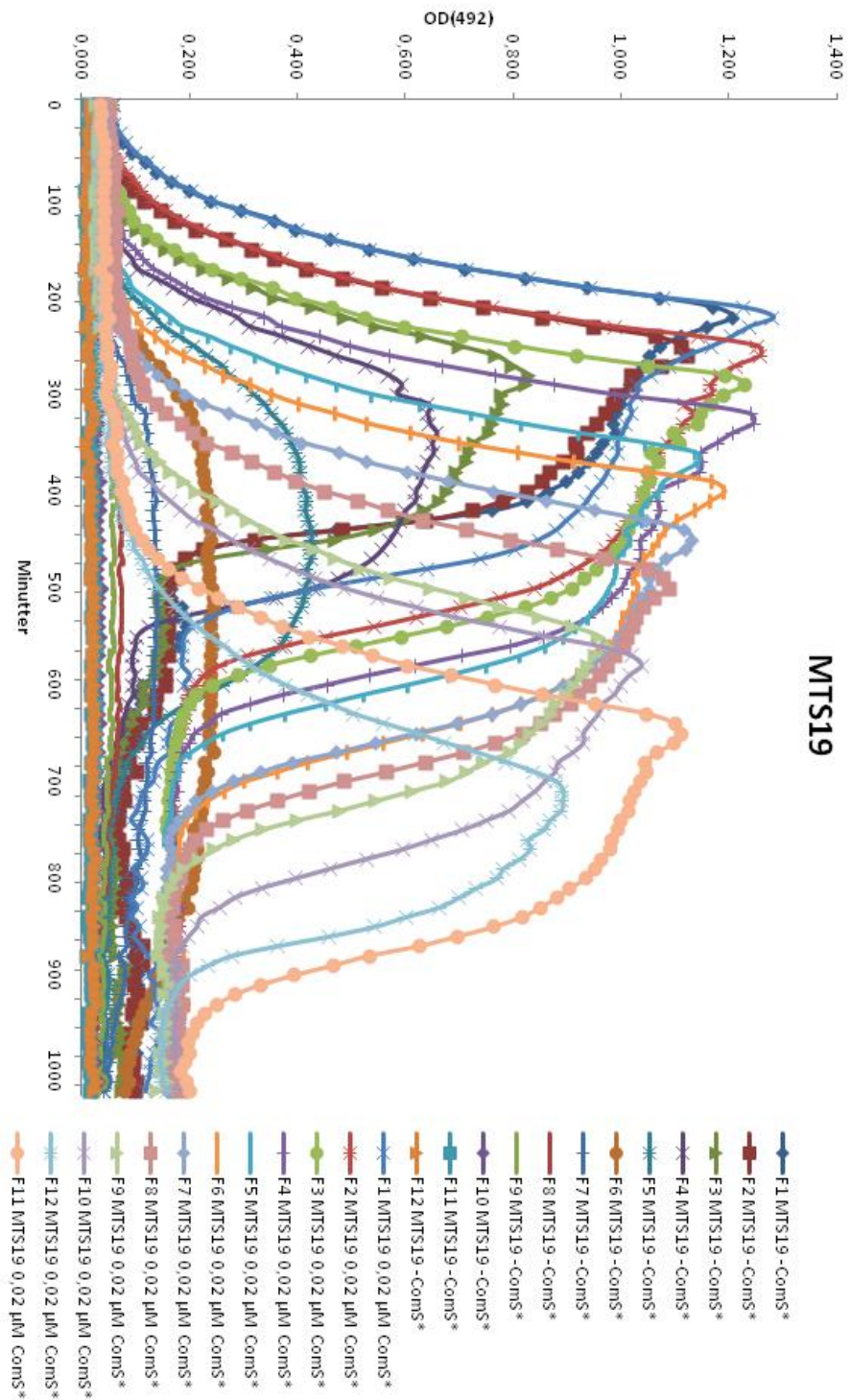
Figur B.6 Vekstkurve for SPH130. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra SPH130 ($P_{comX}::luc$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten $2,0 \mu\text{M ComS}^*$ ved 37°C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt.

B.7 Vekstkurve for MTS18



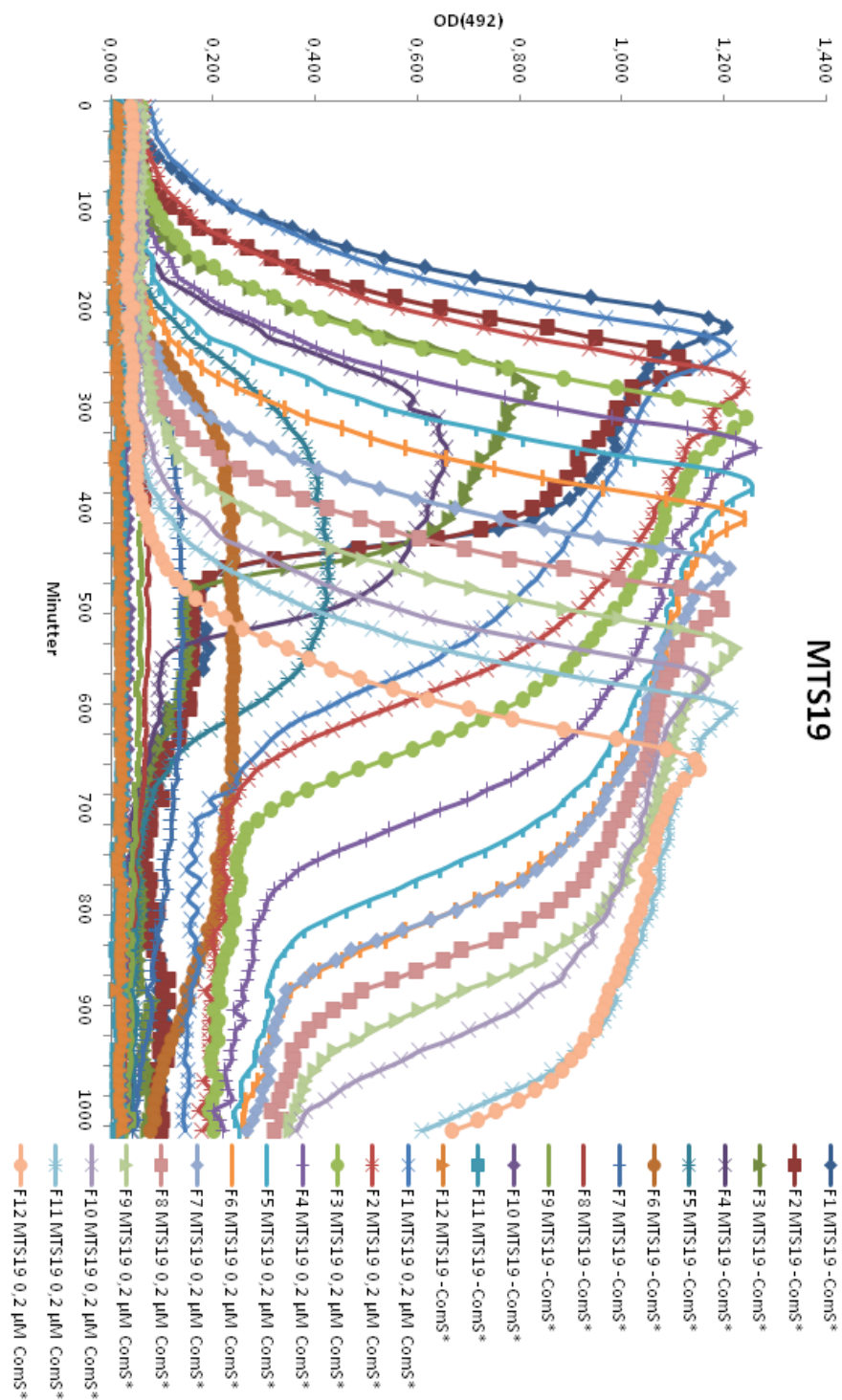
Figur B.7 Vekstkurve for MTS18. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS18 ($Pc_{omX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 2,0 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD-målinger hvert 10. minutt.

B.8 Vekstkurve for MTS19 (0,02 μM ComS*)



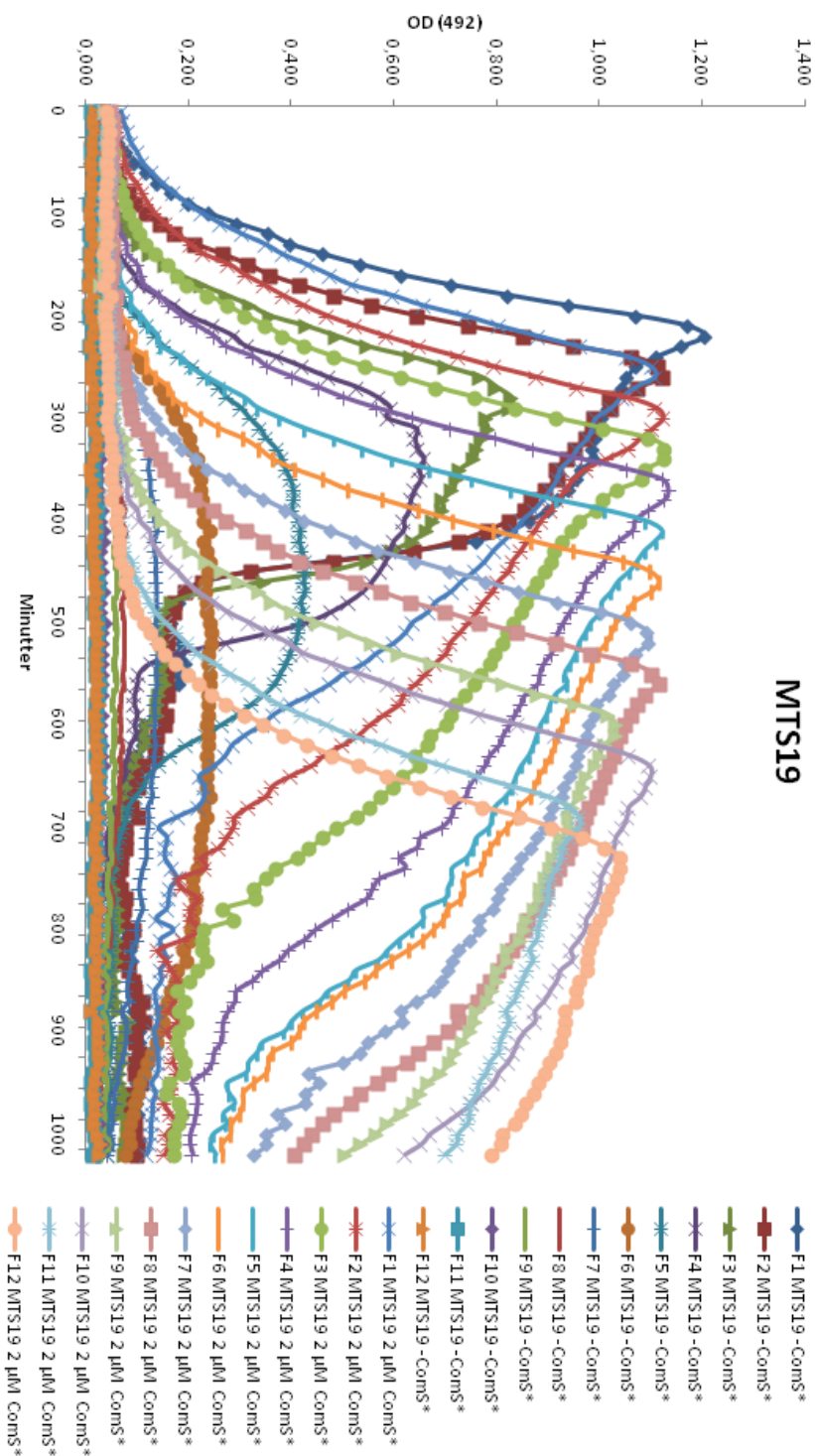
Figur B.8 Vekstkurve for MTS19. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS19 ($Pc_{omX}::ppb1a$, $\Delta ppb1a_{wt}$ $\Delta ppb2a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,02 μM ComS* ved 37 $^{\circ}\text{C}$ i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt.

B.9 Vekstkurve for MTS19 (0,2 μ M ComS*)



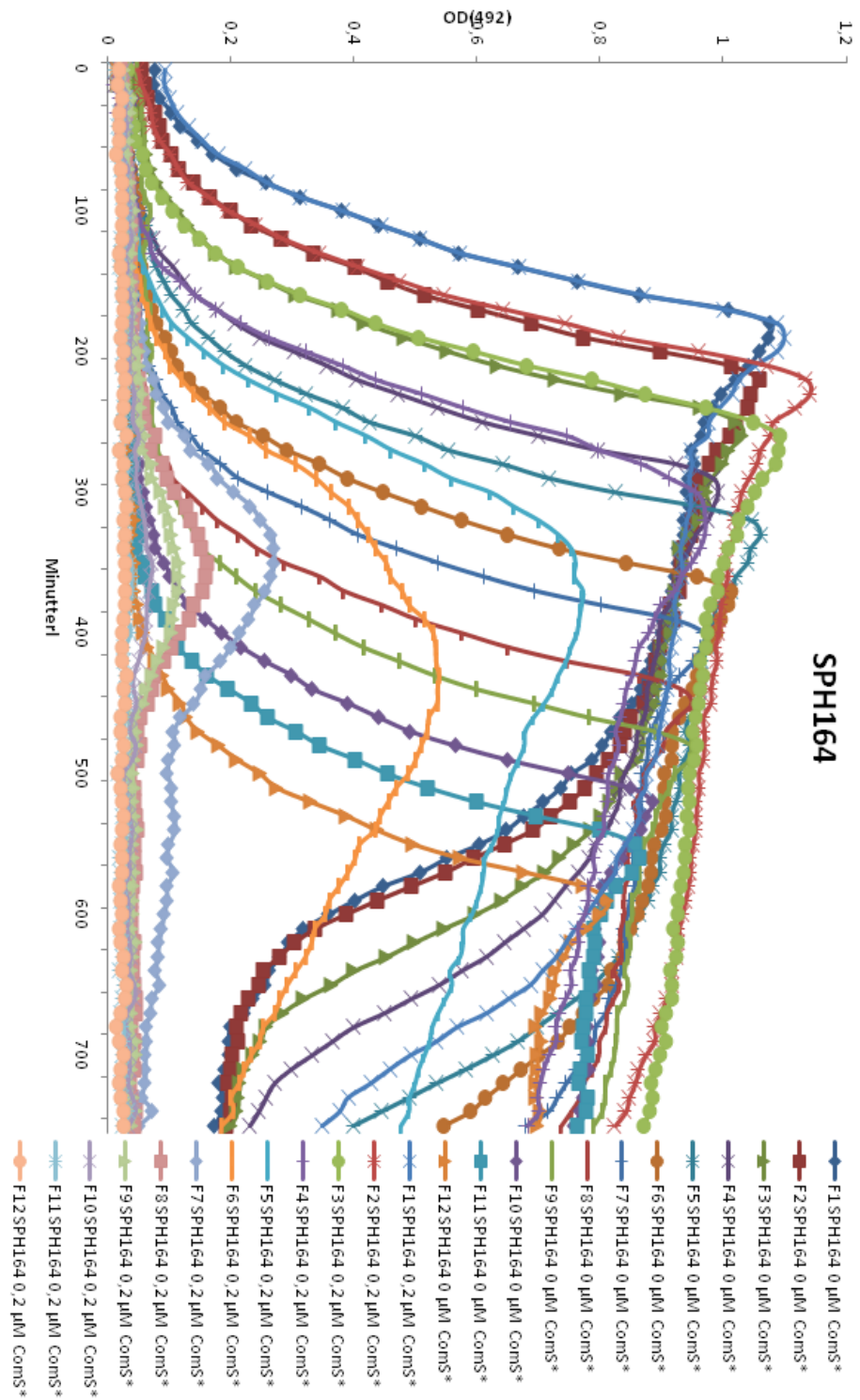
Figur B.9 Vekstkurve for MTS19. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS19 (*Pc_{omX}::p**bp1a**, Δ *p**bp1a**_{wt}* Δ *p**bp2a**_{wt}*) med OD₄₉₂ ~0,04. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μ M ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD₄₉₂-målinger hvert 10. minutt.*

B.10 Vekstkurve for MTS19 (2,0 μM ComS*)



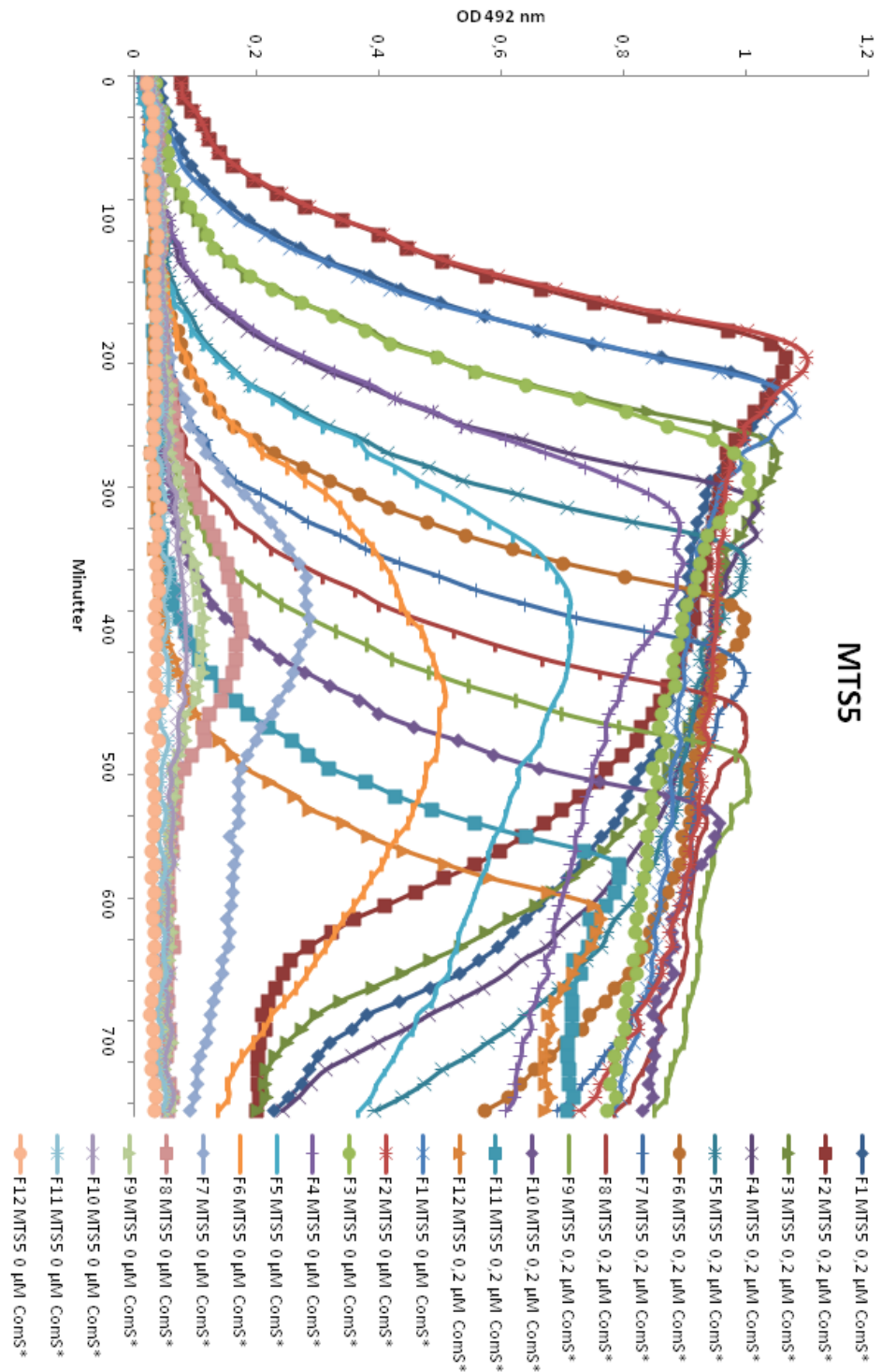
Figur B.10 Vekstkurve for MTS19. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS19 ($P_{comx}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_{wt}\Delta pbp2a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 2,0 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt.

B.11 Vekstkurve for SPH164



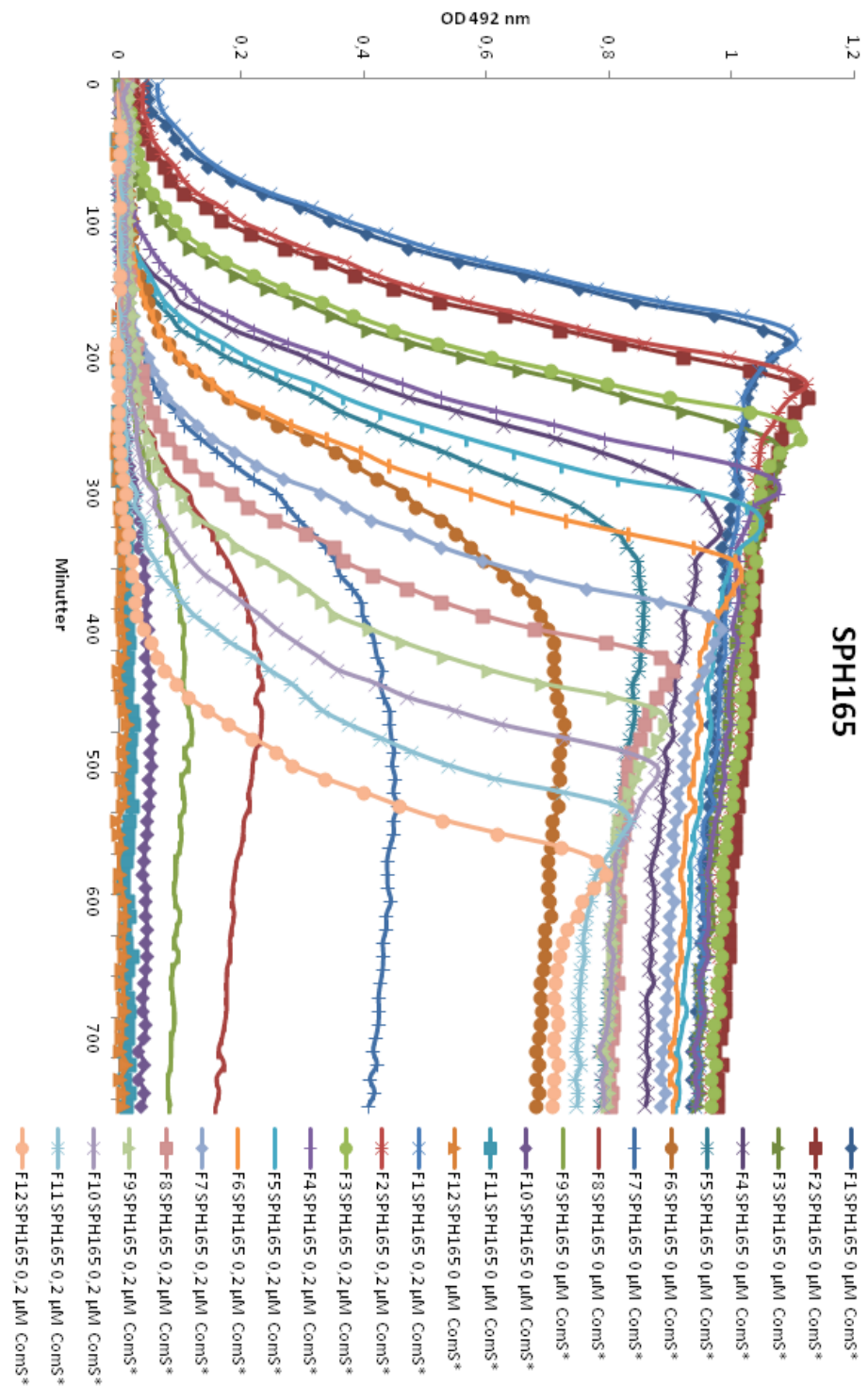
Figur B.11 Vekstkurve for SPH164. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra SPH164 ($P_{comX}::pbp1a$, $\Delta pbp1a_wt\Delta pbp2a_wt$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.12 Vekstkurve for MTS5



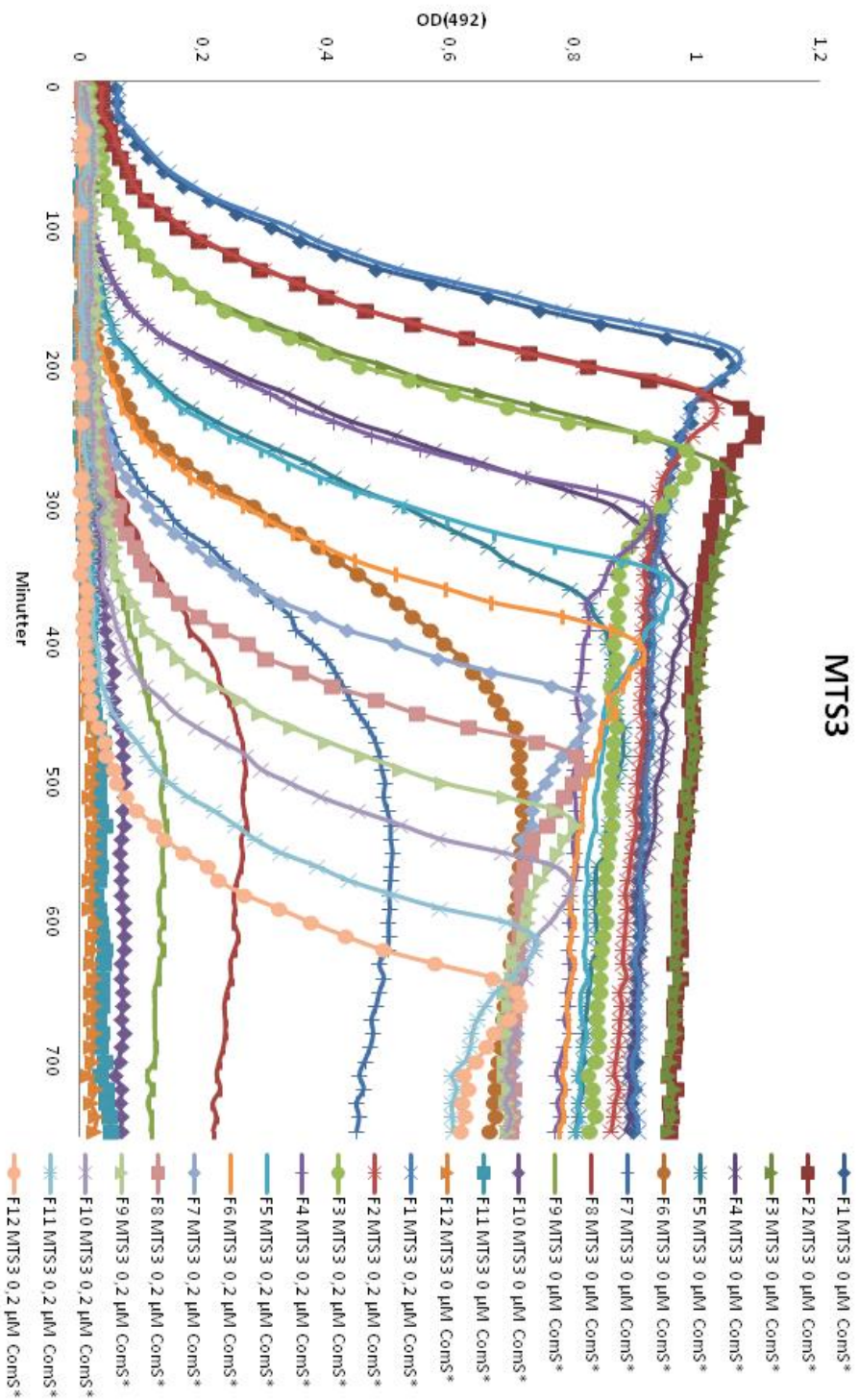
Figur B.12 Vekstkurve for MTS5. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS5 (*Pc_{omX}::p_{bbp2x}, Δp_{bbp2x_{wt}}*) med OD₄₉₂ ~0,04. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD₄₉₂-målinger hvert 10. minutt

B.13 Vekstkurve for SPH165



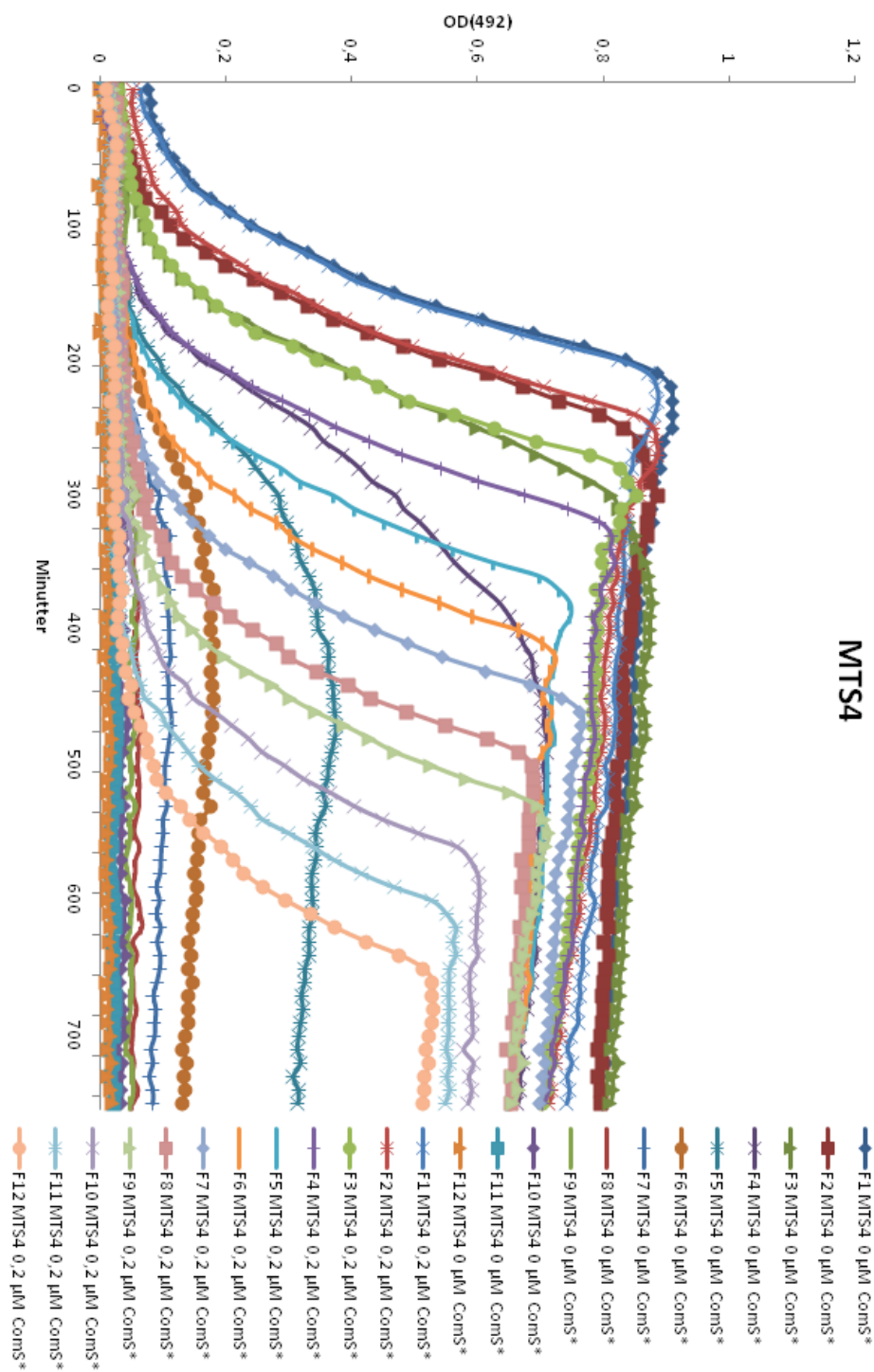
Figur B.13 Vekstkurve for SPH165. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra SPH165 ($P_{c_{omx}}::p_{bp2x}$, $\Delta p_{bp2x_w} \Delta lytA$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 µM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.14 Vekstkurve for MTS3



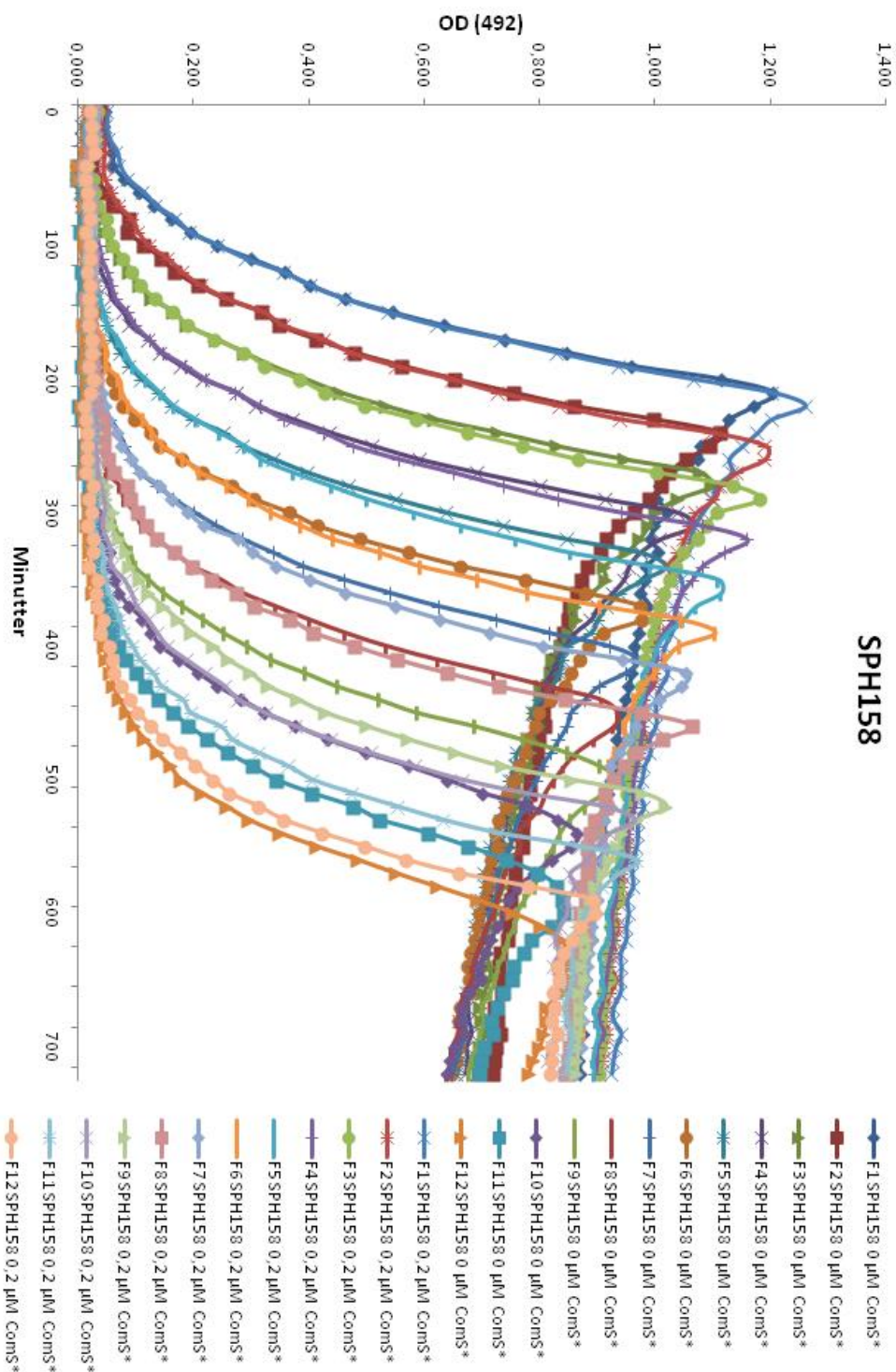
Figur B.14 Vekstkurve for MTS3. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS3 ($Pc_{omX}::pbp2x, \Delta pbp2x_w \Delta pbp2a_w$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten $0,2 \mu\text{M ComS}^*$ ved 37°C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.15 Vekstkurve for MTS4



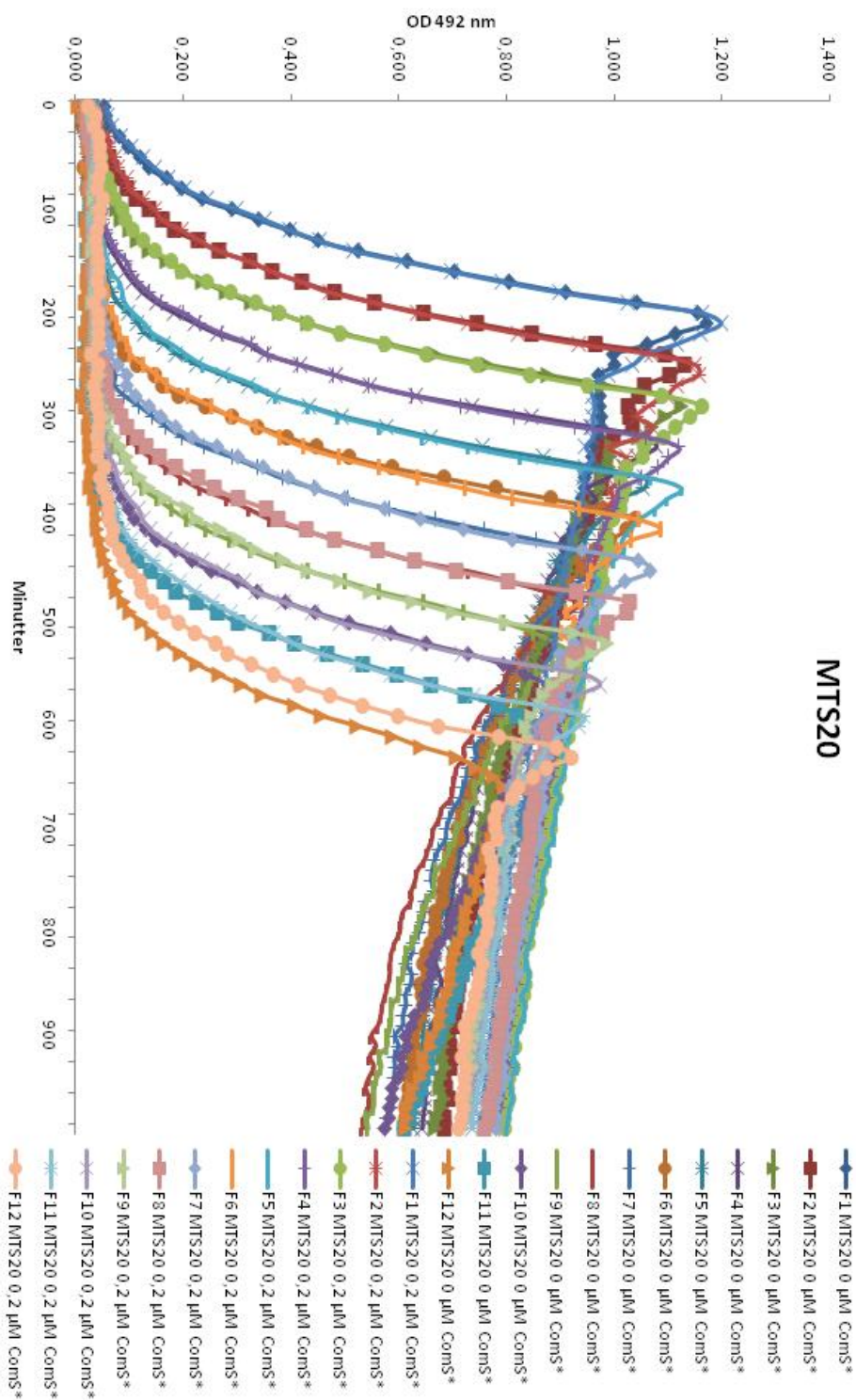
Figur B.15 Vekstkurve for MTS3. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS4 ($Pc_{omX}::pbb2x, \Delta pbb2x_{wt} \Delta pbb1a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten $0,2 \mu\text{M ComS}^*$ ved 37°C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.16 Vekstkurve for SPH158



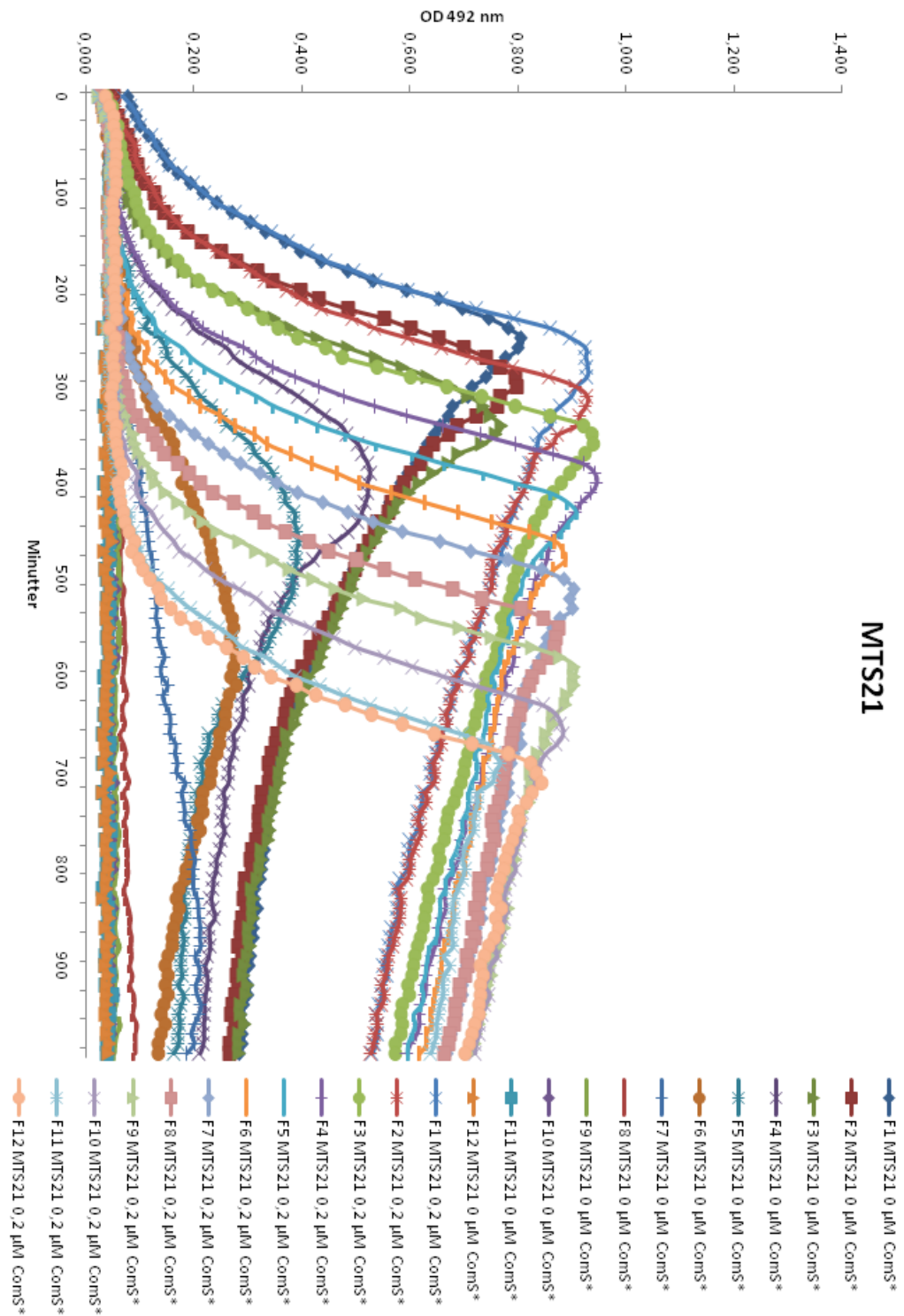
Figur B.16 Vekstkurve for SPH158. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra SPH158 ($Pc_{omx}::pbb2b$, $\Delta pbb2b_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μ M ComS* ved 37 $^{\circ}$ C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.17 Vekstkurve for MTS20



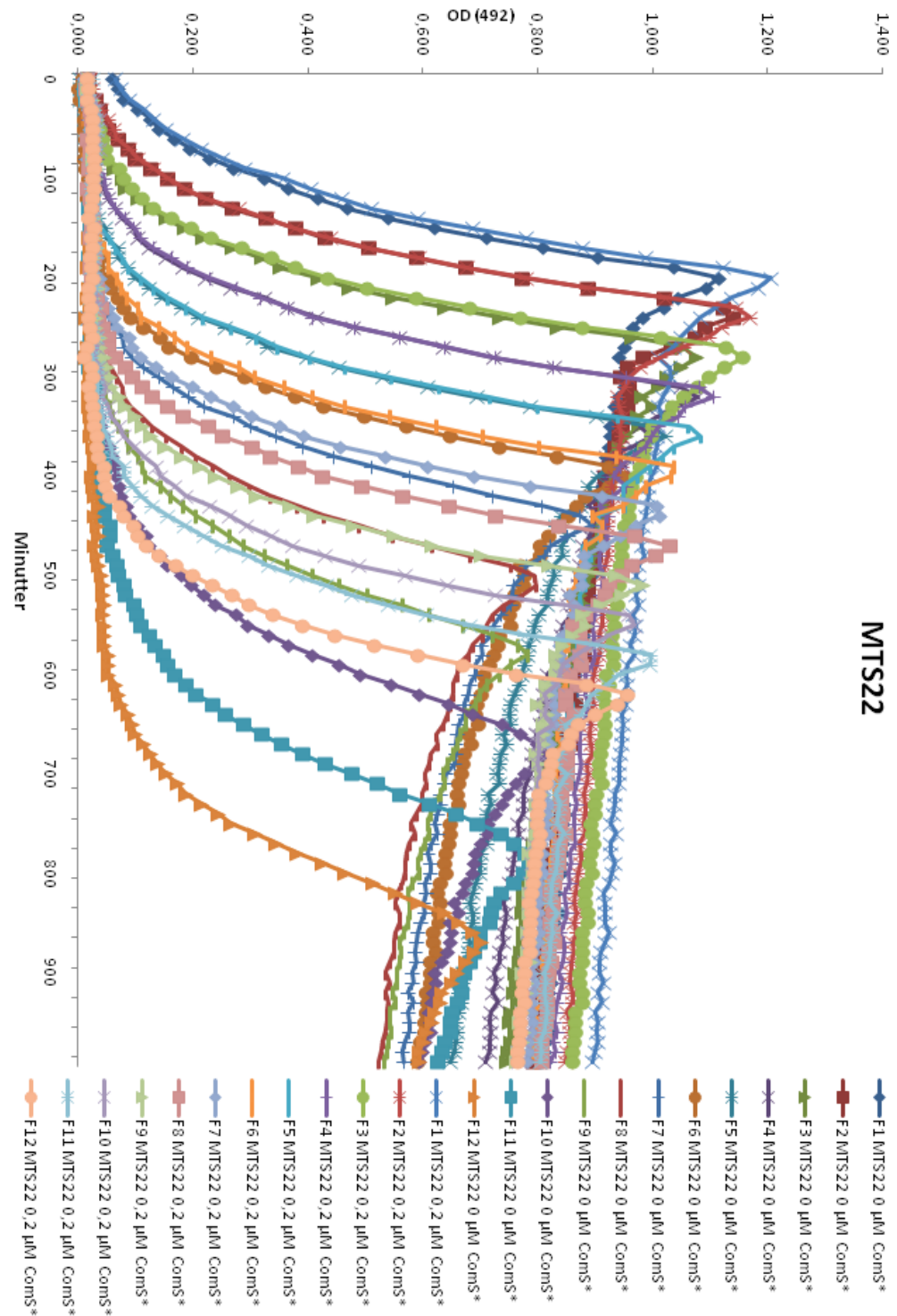
Figur B.17 Vekstkurve for MTS20. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS20 ($Pc_{omX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt} \Delta pbp2a_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μ M ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.18 Vekstkurve for MTS21



Figur B.18 Vekstkurve for MTS21. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS21 ($Pc_{omX}::pbp2b, \Delta pbp2b_wt \Delta pbp1a_wt$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten $0,2 \mu\text{M ComS}^*$ ved 37°C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

B.19 Vekstkurve for MTS22



Figur B.19 Vekstkurve for MTS22. Det ble laget en 2-fold fortynningsrekke fra MTS22 ($Pc_{omX}::pbp2b, \Delta pbp2b_{wt} \Delta pbp1b_{wt}$) med $OD_{492} \sim 0,04$. Parallele fortynningsrekker av bakteriekulturen ble dyrket med og uten 0,2 μM ComS* ved 37 °C i Fluostar Optima med OD_{492} -målinger hvert 10. minutt

Vedlegg C Benevninger, forkortelser og aminosyreforkortelser

C.1 Benevninger

°C	grader celcius
µg	mikrogram
µl	mikroliter
atm	atmosfæres trykk (1atm= 1kPa)
Bp	basepar
g	gram
kb	kilobaser
l	liter
M	molar
mg	milligram
min	minutt
ml	milliliter
nm	nanometer
V	volt

C.2 Forkortelser

::(f.eks <i>Δbpb1a::janus</i>)	Betegner elementet som er satt inn i posisjonen til genet/elementet som er deletert
aa	aminosyre
BSA	Bovin Serum Albumin
dATP	deoksy-adenosintrifosfat
DIK	Differensiell interferens kontrastmikroskopi
dCTP	deoksy-cytidintrifosfat
ddNTP	2',3'-dideoksynukleosidtrifosfat
dGTP	deoksy-guanintrifosfat
DNA	deoksyribonukleinsyre
dNTP	deoksynukleosid trifosfat
dsDNA	dobbeltrådet DNA
dTTP	deoksy-thymintrifosfat
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid

EtOH	etanol
Glc	glukose
Kan ^R	kanamycin resistent
Kan ^S	kanamycin sensitiv
LTA	lipoteikoinsyre(lipo teichoic acid)
MQ-vann	Milli-Q-vann
NAG	N-Acetylglukosamin
NAM	N-acetylmuraminsyre
OD	optisk tetthet
OD ₄₉₂	optisk tetthet ved 492 nm
OD ₅₅₀	optisk tetthet ved 550 nm
PBP	penicillinbindende protein
PCR	polymerase chain reaction
SEM	scanning elektronmikroskopi
Sm ^R	streptomycin resistent
Sm ^S	streptomycin sensitiv
ssDNA	enkeltrådet DNA
TA	teikoinsyre(teichoic acid)
TAE-buffer	tri-Acetat-EDTA-buffer
TH agar	Todd Hewitt agar
UV	ultrafiolett
wt	villtype
WTA	veggteikoinsyre(wall teichoic acid)
Δ (f.eks $\Delta pbp1a$)	delta, symboliserer delesjon av et gen/genelement