



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Morten Kjos

CAAX-proteiner og sekresjon av virulensfaktorer i *Streptococcus pneumoniae*

CAAX-proteins and secretion of virulence factors in
Streptococcus pneumoniae

Catharina Sørлие Heiland

Bioteknologi
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av det to-årige masterstudiet bioteknologi ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet ble utført hos forskningsgruppen Molekylær mikrobiologi i perioden august 2017 til mai 2018.

Først og fremst vil jeg takke hovedveileder Dr. Morten Kjos for god veiledning og oppfølging underveis. Tusen takk for den gode faglige og praktiske veiledningen jeg har fått, for at du alltid har tatt deg tid til spørsmål og for alle timene du har lagt ned for å gi meg best mulig utgangspunkt. En stor takk også til medveileder Professor Leif Sigve Håvarstein for muligheten til å ta masteroppgave ved din forskningsgruppe.

Jeg ønsker også å takke alle andre som arbeider på laboratoriet for et morsomt og lærerikt år. Jeg setter veldig pris på at dere har alltid vært tilgjengelig for å svare på spørsmål. Spesielt vil jeg takke Dr. Gro Stamsås for kommentarer og innspill under skriveprosessen, og overingeniør Zhain Salehian for hjelp med umulige-PCR-reaksjoner og praktisk arbeid på laboratoriet.

Takk til Professor Morten Sørli for korrekturlesing og nyttige faglige innspill.

Tilslutt vil jeg gi en stor takk til medstudent Silje Olsen for et godt samarbeid gjennom hele studietiden. Jeg setter pris på alle timene vi har brukt sammen på labrapporter, eksamenslesing og nå tilslutt masteroppgaven.

Sammendrag

CAAX amino-terminal protease familien (heretter omtalt som CAAX-proteiner), består av antatt membranbundne metallproteaser. Dette er proteiner som finnes i både eukaryote- og prokaryote celler, men deres funksjon i prokaryote er fortsatt ukjent. I eukaryote celler spaltes disse proteinene av -AAX tripeptidet hos prenylerte proteiner som inneholder den C-terminale sekvensen CAAX. *Streptococcus pneumoniae* ble brukt som modellorganisme i dette arbeidet for å studere CAAX-proteiner i bakterier. I 2010 kom det ut en studie som tyder på at CAAX-proteiner er involvert i sekresjonen av virulensfaktorer i *Staphylococcus aureus*. *S. pneumoniae*, i likhet med *S. aureus*, sekreterer de fleste proteinene sine over den cytoplasmatiske membranen via Sec sekresjonsmaskineriet. Dette er et sekresjonsmaskineri som sekreterer ufoldede proteiner med et hydrofobt signalpeptid (også kalt ledersekvens). Dette signalpeptidet kløyves av det ufoldede proteinet etter fullført translokasjon. I *S. pneumoniae* er det identifisert to typer signalpeptider som bruker dette sekresjonsmaskineriet: de med normale hydrofobe signalsekvenser og de som i tillegg har et såkalt YSIRK-motiv.

Hovedmålsetningen for dette arbeidet var å karakterisere CAAX-proteinene i *S. pneumoniae*, og spesifikt studere hvordan disse proteinene og ledersekvenser påvirker sekresjonen av viktige virulensfaktorer. I dette arbeidet ble CAAX-genene identifisert som ikke-essensielle gener i *S. pneumoniae*. Det ble ikke observert noen karakteristisk fenotype med hensyn på vekst, antibiotikasensitivitet eller celled morfologi i mutanter hvor alle 10 genene som koder for CAAX-proteiner var deletert. CAAX-proteinene er membranproteiner som lokaliserer hovedsakelig til septum av cellen, selv om det er noe variasjon mellom de ulike CAAX-proteinene med hensyn på lokalisering. Disse forskjellene tyder på at proteinene kan ha ulike funksjoner i cellen.

Sekresjon av virulensfaktorer med ulike ledersekvenser (PspA og PspC) ble studert i villtypeceller og mutanter hvor CAAX-genene var fjernet. Det ble ikke funnet noe som tyder på at CAAX-proteiner er involvert i sekresjon av virulensfaktorer i *S. pneumoniae*. Basert på resultatene i denne oppgaven, er det derfor ikke mulig å konkludere med hvilke funksjoner CAAX proteinene har i *S. pneumoniae*. Under arbeidet med PspA og PspC, ble det derimot oppdaget at ledersekvensen er avgjørende for hvordan kolinbindende proteiner sekreteres i *S. pneumoniae*. Mens normale ledersekvenser fører til sekresjon ved cellepolene, gir ledersekvenser med såkalt YSIRK-motiv sekresjon i celledelingssonen i midten av cellen. En slik funksjon for YSIRK-ledersekvenser har ikke tidligere blitt rapportert i *S. pneumoniae*.

Abstract

The CAAX-aminoterminal protease family (from now on referred to as CAAX-proteins), consists of putative membrane-bound metalloproteases. These proteins are found in both eukaryotic and prokaryotic cells, but their function in prokaryotes is still unknown. In eukaryotic cells, these proteins cleave the -AAX tripeptide in prenylated proteins containing the C-terminal sequence CAAX. *Streptococcus pneumoniae* was used as a model organism in this work to study CAAX-proteins in bacteria. A study in 2010 suggested that CAAX-proteins are involved in the secretion of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *S. pneumoniae*, like *S. aureus*, secretes most of its proteins across the cytoplasmic membrane via Sec secretion machinery. This is a secretion machinery that secretes unfolded proteins with a hydrophobic signal peptide (also called leader sequence). The signal peptide is cleaved off the unfolded protein after translocation. In *S. pneumoniae* two types of signal peptides are identified: those with normal hydrophobic signal sequence and those which additionally have a so-called YSIRK-motif.

The main goal of this study was to characterize the CAAX-proteins in *S. pneumoniae*, and specifically study how these proteins and leader sequences influence the secretion of important virulence factors. In this study, CAAX-genes were identified as non-essential genes in *S. pneumoniae*. No characteristic phenotype was observed with respect to growth, antibiotic sensitivity or cell morphology in mutants where all 10 genes encoding CAAX-proteins were deleted. The CAAX-proteins are membrane proteins that mainly localize to the septum of the cell, although there is some variation among the different CAAX-proteins with regard to localization. These differences indicate that the proteins may have different functions in the cell.

Secretion of virulence factors with different leader sequences (PspA and PspC) was studied in wild-type cells and mutants where the CAAX-genes were removed. There was no evidence that CAAX-proteins are involved in secretion of virulence factors in *S. pneumoniae*. Based on the results of this study, it is therefore not possible to conclude which functions CAAX-proteins have in *S. pneumoniae*. When working with PspA and PspC it was discovered that the leader sequence is crucial for secretion of choline binding proteins of *S. pneumoniae*. While normal leader sequences lead to secretion at the cell poles, leader sequences with so-called YSIRK-motif give secretion in the cell division site in the center of the cell. Such function of YSIRK leader sequences has not previously been reported in *S. pneumoniae*.

Innholdsfortegnelse

1. Innledning.....	1
1.1 Slekten <i>Streptococcus</i>	1
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
1.3 Celleveggen hos <i>S. pneumoniae</i>	4
1.4 Virulensfaktorer i <i>S. pneumoniae</i>	6
1.4.1 Ulike virulensfaktorer	7
1.4.2 Sekresjon av virulensfaktorer	9
1.4.3 Overflatebinding av virulensfaktorer	11
1.5 Naturlig transformasjon hos <i>S. pneumoniae</i>	12
1.6 CAAX-protein familien	14
1.6.1 Funksjon av CAAX proteaser i eukaryote celler	15
1.6.2 CAAX proteaser i bakterier	16
1.6.3 CAAX er involvert i selv-immunitet mot antimikrobielle peptider	16
1.6.4 CAAX proteaser er involvert i proteinsekresjon i <i>S. aureus</i>	17
1.7 Bakgrunn og mål med oppgaven	18
2. Materialer	19
2.1 Vekstmedium	19
2.2 Løsninger og buffere	21
2.2.1 Diverse løsninger	22
2.2.2 Løsninger til gelelektroforese	22
2.2.3 Løsninger til fraksjonering, SDS-PAGE og Western blotting	22
3. Metoder	25
3.1 Dyrking og oppbevaring av <i>S. pneumoniae</i> og <i>Escherichia coli</i>	25
3.3 Rapid ID 32 STREP test	26
3.4 Hemolyseforsøk	26
3.5 Mikroskopi	27
3.5.1 Fasekontrastmikroskopi	27
3.5.2 Fluorescensmikroskopi	27
3.6 Molekylær kloning	28
3.6.1 Polymerase chain reaction	28
3.6.1.1 Protokoll for PCR med Phusion® DNA-polymerase	30
3.6.1.2 Protokoll for PCR med RedTaq-polymerase	31
3.6.2 Isolering av genomisk DNA	31
3.6.3 Agarosegelelektroforese	32
3.6.4 Rensing av DNA fragmenter fra agarosegel	33
3.6.5 Rensing av plasmid	34

3.6.6	Transformasjon av <i>S. pneumoniae</i>	35
3.6.7	Transformasjon av <i>E. coli</i>	36
3.6.8	Kloning ved bruk av restriksjonsenzymmer og ligering.....	37
3.7	Konstrukter/mutanter	38
3.7.1	Konstruksjon av <i>spd_0817-gfp</i> uttrykt i eget lokus	38
3.7.2	Konstruksjon av <i>gfp-CAAX</i> fusjoner ved hjelp av det integrative plasmidet pCG6	39
3.7.3	Konstruksjon av <i>CAAX-gfp</i> fusjoner ved hjelp av det integrative plasmidet pMK17	39
3.7.4	Konstruksjon av <i>pspA</i> -Janus	40
3.7.5	Konstruksjon av Δ <i>pspA</i> ::Janus	40
3.7.6	Konstruksjon av <i>pspA</i> -FLAG	40
3.7.7	Konstruksjon av <i>pspA-luc</i>	41
3.7.8	Konstruksjon av <i>pspA-gfp-cam^R</i>	41
3.7.9	Konstruksjon av <i>pspC</i> (leder)- <i>pspA</i> (mature)- <i>gfp-cam^R</i>	41
3.7.10	Konstruksjon av <i>pspC</i> -FLAG- <i>kan^R</i>	41
3.7.11	Konstruksjon av <i>pspC-gfp-cam^R</i>	42
3.7.12	Konstruksjon av <i>nanA</i> -FLAG- <i>kan^R</i>	42
3.7.13	Konstruksjon av <i>bga</i> :: <i>P_{zn}-nanA</i> -FLAG	42
3.7.14	Sekvensering.....	43
3.8	Luciferase assay	43
3.9	Generelle proteinteknikker.....	44
3.9.1	SDS-PAGE.....	44
3.9.2	Western blot.....	45
3.9.2.1	Protokoll for blotting.....	46
3.9.2.2	Protokoll for deteksjon	46
3.10	Prøvepreparering for analyse av proteinsekresjon	47
3.10.1	Hele celleekstrakt.....	47
3.10.2	Eluering av kolinbindende proteiner.....	47
3.10.3	Fraksjonering av supernatant, cellevegg og cellemembran.....	47
4.	Resultater.....	49
4.1	In silico analyse av CAAX-proteiner i <i>S. pneumoniae</i> D39	49
4.2	Vekstforsøk og test av antibiotikasensitivitet	51
4.3	Rapid ID 32 STREP test	53
4.4	Hemolyseforsøk.....	54
4.5	Single-cell analyser.....	54
4.6	Subcellulær lokalisering av CAAX-proteiner	57
4.7	Sekresjon av virulensfaktoren PspA.....	60
4.8	Sekresjon av YSRIK-proteinet PspC.....	64

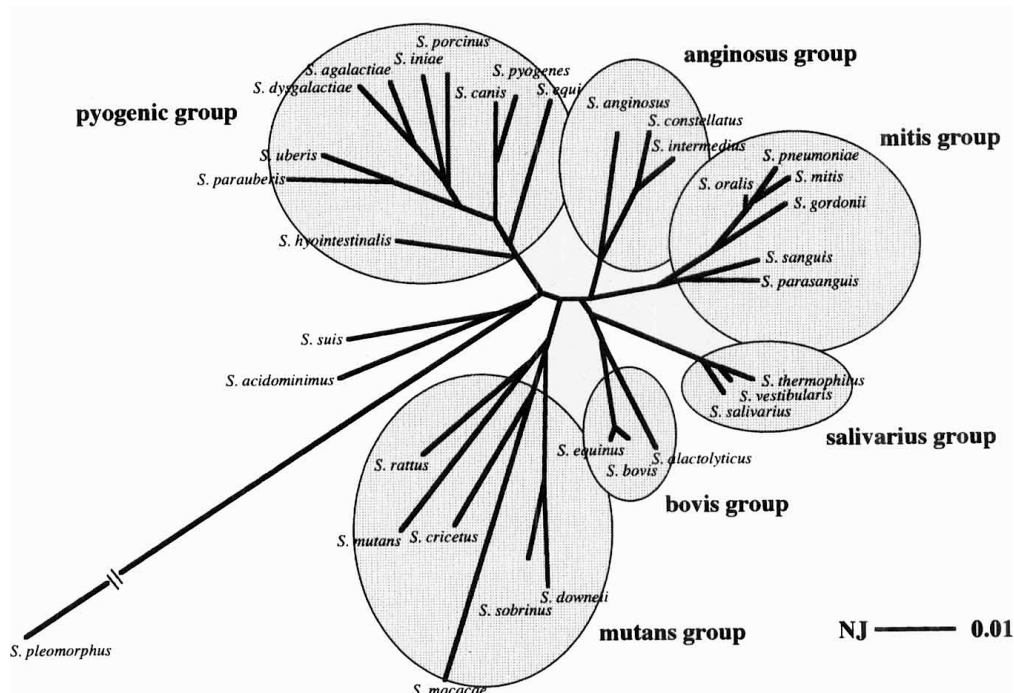
4.9 Forsøk med virulensfaktoren NanA	68
4.10 Involvering av YSIRK i sekresjon og lokalisering i <i>S. pneumoniae</i>	69
5. Diskusjon	73
5.1 <i>S. pneumoniae</i> D39 koder for 10 CAAX-proteiner, men disse påvirker ikke vekst eller sensitivitet mot antibiotika under laboratorieforhold	73
5.2 CAAX-proteinene i <i>S. pneumoniae</i> lokaliserer til septum, men påvirker ikke celledeling	76
5.3 Sekresjon av virulensfaktorene PspA og PspC påvirkes ikke av CAAX-proteinene i <i>S. pneumoniae</i>	77
5.4 YSIRK-motivet i ledersekvensen bestemmer lokalisering av sekresjon for kolinbindende proteiner i <i>S. pneumoniae</i>	80
6. Konklusjon og videre arbeid.....	84
7. Referanser.....	85
Vedlegg	I

1. Innledning

1.1 Slekten *Streptococcus*

Streptokokker er Gram-positive bakterier som vanligvis opptrer som ovale eller sfæriske celler arrangert i par (diplokokker) eller kjeder. De er ikke-sporulerende, katalase negative og har komplekse næringskrav (Hardie & Whiley, 1997). Streptokokker er aerotolerante, homofermentative bakterier uten en elektrontransportkjede med melkesyre som endeprodukt i fermentering (Tortora, Funke, & Case, 2013).

Til nå er 40 arter av slekten *Streptococcus* beskrevet, og disse finnes hovedsakelig på slimhinner hos mennesker og dyr, samt i jord, vann, planter, melkeprodukter og andre typer mat. Basert på 16S rRNA sekvenser er det klassifisert 6 artsgrupper i slekten *Streptococcus*: pyogenic, mitis, salivarius, anginosus, mutans og bovis (Figur 1.1) (Kawamura, Hou, Sultana, Miura, & Ezaki, 1995). Streptokokker kan forårsake sykdom: fra milde infeksjoner som ørebetennelse og bihulebetennelse til alvorlige akutte infeksjoner som lungebetennelse, sepsis og hjernehinnebetennelse forårsaket av *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* eller *Streptococcus pneumoniae*. Andre arter har mulighet til å agere som opportunistiske patogener i endokarditt, urinveisinfeksjoner og andre infeksjoner (Hardie & Whiley, 1995; Henriques-Normark & Tuomanen, 2013).



Figur 1.1: *Streptococcus* slekten. Fylogenetisk slektskap mellom 34 arter innenfor *Streptococcus* slekten. *S. pneumoniae* hører til i mitis gruppen. Avstandene ble kalkulert ved å bruke neighbor-joining (NJ) metoden. Figuren er hentet fra (Kawamura et al., 1995).

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae finner vi i de øvre luftveiene hos mennesker, hovedsakelig som en kommensal- eller som en gjennomreisende bakterie. Opptil 60% av barn bærer pneumokokken asymptomatisk, men dette faller ned til <10% hos voksne personer. (van der Poll & Opal, 2009). *S. pneumoniae* er en opportunistisk bakterie som forårsaker sykdom og dødelighet globalt, hvor særlig barn, eldre og immunkomprimerte mennesker er mest utsatt (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013).

I følge verdens helseorganisasjon (WHO) er *S. pneumoniae* den fjerde vanligste mikrobielle årsaken til dødelige infeksjoner, og den vanligste årsaken til bakteriell lungebetennelse og hjernehinnebetennelse (meningitt). I 2015 var lungebetennelse den største smittsomme dødsårsaken hos barn over hele verden, hvor over 900 000 barn under 5 år døde som årsak av lungebetennelse (WHO, 2011, 2016).

Bakterien smitter via dråpesmitte og kommer inn i neshulen hvor den fester seg til epitelcellene. Derfra kan den enten forbli en kolonisor eller spre seg videre til andre organer. Når bakterien har spredt seg til organene kan den trenge gjennom slimhinnebarrieren inn til blodet og/eller krysse blod-hjernebarrieren og gi hjernehinnebetennelse (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013)

Virulensen til pneumokokken avhenger av hvilken kapsel-serotype den har. Noen serotyper er vanligere i invasive sykdommer, mens andre er vanligere i asymptomatisk bæring (Sandgren et al., 2004). Det finnes 91 ulike serotyper av *S. pneumoniae*, hvor minst 20 av disse serotypene kan forårsake alvorlig sykdom (Hammerschmidt, 2007). Mennesker som er kolonisert av denne bakterien har som regel kun en serotype om gangen, selv om det er mulig å være kolonisert av flere typer (Hare, Morris, Smith-Vaughan, & Leach, 2008).

Nåværende pneumokokkvaksiner er rettet mot polysakkaridkapselen (CPS), som gir en veldig spesifikk serotypebeskyttelse. CPS er T-celle-avhengige antigener, og er derfor dårlig immunogene i barn under 2 år (Douglas, Paton, Duncan, & Hansman, 1983). Dette problemet ble løst ved å utvikle en pneumokokkonjugatvaksine (PKV). PKV består av kapselpolysakkarid konjugert til et bærerprotein som gjør antigenene mer immunogene (Rijkers, Sanders, Breukels, & Zegers, 1998). I dag er det utviklet PKV som beskytter mot 7, 10 og 13 serotyper.

I 2001 kom den første PKV på markedet i Norge som beskyttet mot 7 ulike serotyper. PKV7 ble i 2006 tatt med i barnevaksinasjonsprogrammet, og i 2009 kom både PKV10- og 13 på markedet. Fra 2011 ble PKV7 erstattet med PKV13 i barnevaksinasjonsprogrammet (Folkehelseinstituttet, 2017). PKV13 dekker ca. 50 % av serotypene som var årsak til invasiv pneumokokksykdom i Norge i 2012. Personer over 2 år i risikogrupper gis i tillegg en pneumokokkpolysakkaridvaksine (PPV) som beskytter mot 23 serotyper (Folkehelseinstituttet, 2015).

Ved kun å vaksinere mot noen serotyper vil det kunne skape et selektivt press som resulterer i at ikke-vaksine serotyper erstatter vaksine serotyper i nasopharynx (serotype replacement) (Spratt & Greenwood, 2000). Det er i tillegg dyrt å lage vaksiner som beskytter mot alle serotypene da de gir en veldig serotypespesifikk beskyttelse. Det er derfor behov for å utvikle nye vaksiner som ikke har disse svakhetene. Ønskelige mål for nye vaksiner er proteiner i bakterien som bidrar til virulens og som er vanlig hos alle serotypene, som for eksempel pneumococcal surface protein- A (PspA) og C (PspC), neuroamidase A (NanA) og pneumolysin (Ogunniyi, Grabowicz, Briles, Cook, & Paton, 2007).

Det er observert en økende resistens mot penicillin og andre antibiotika i tillegg til multiresistens hos pneumokokker. *S. pneumoniae* utvikler resistens mot antibiotika ved hjelp av mutasjoner, rekombinasjon eller via horisontal genoverføring av resistensgener eller genfragmenter (se avsnitt 1.5) fra andre streptokokker (Henriques-Normark, 2007). De første penicillinresistente isolatene ble funnet i Australia i slutten av 60-tallet, og har siden blitt sprett til andre kontinenter (Hansman & Bullen, 1967). Det er hovedsakelig mutasjoner i de penicillinbindende proteinene (PBP) som gir denne penicillinresistensen. Når penicillinresistensen oppstod ble nye typer antibiotika som macrolider og fluoroquinoloner benyttet til behandling, som har ført til et økt selektivt press for resistens mot disse også (Henriques-Normark, 2007). Antibiotikaresistente *S. pneumoniae* er regnet blant de mest problematiske patogene bakterier som finnes. I 2017 ble den listet opp av Verdens Helseorganisasjon (WHO) som en prioritert patogen for utviklingen av nye antibiotika (Tacconelli et al., 2017; WHO, 2017).

1.3 Celleveggen hos *S. pneumoniae*

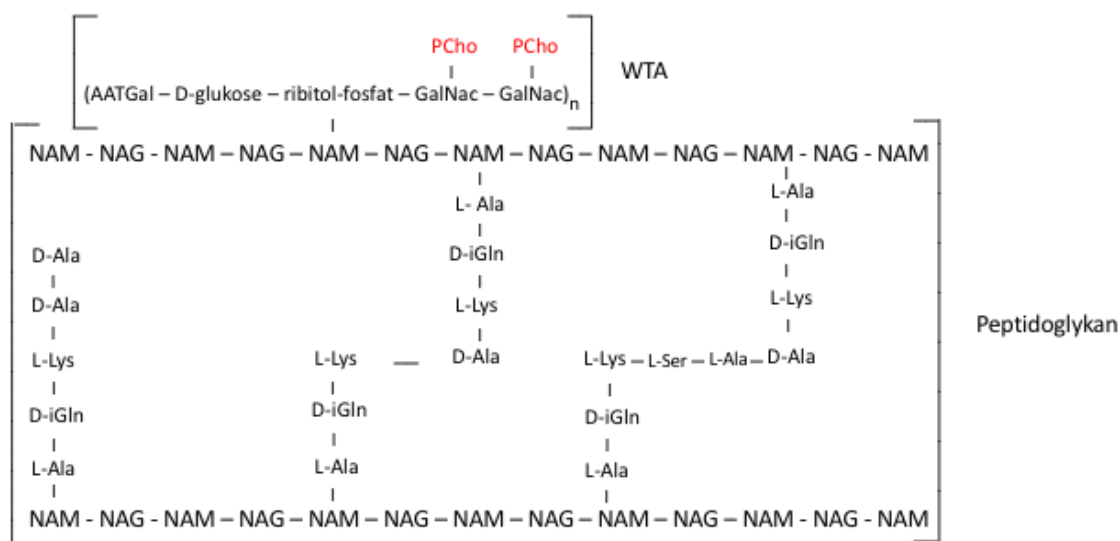
Celleveggen finner vi på utsiden av den cytoplasmatiske membranen hos nesten alle bakteriearter. Hovedfunksjonen til celleveggen er å beskytte cellen mot det indre turgortrykket (Rogers, Perkins, & Ward, 1980). Peptidoglykan (murein) er en essensiell komponent i celleveggen som er ansvarlig for stivheten av celleveggen, bestemmer formen på cellen i tillegg til å forankre andre celleveggkomponenter som proteiner (Dramsi, Davison, Magnet, & Arthur, 2008) og teikoinsyrer (Neuhaus & Baddiley, 2003). Celleveggkomponentene er viktige i flere fysiologiske prosesser som opptak av substrater, cellevekst og celledeling, binding til utvendige makromolekyler og adhesjon til overflater, interaksjon med vertsceller og opptak av DNA under transformasjon (Vollmer, 2007).

Peptidoglykanet består av repeterende disakkarider som er bygd opp av monosakkaridene *N*-acetylglukosamin (NAG) og *N*-acetylmuraminsyre (NAM). Monosakkaridene er bundet sammen av en β -(1,4)-glykosidbinding. NAG og NAM danner glykankjeder som bindes sammen av korte peptidkjeder mellom NAM-enhetene i de parallelle kjedene, men lengden på glykankjedene i pneumokokkens murein er ikke kjent. Strukturen til peptidkjedene som er bundet til NAM varierer hos ulike arter. I *S. pneumoniae* består peptidkjedene av 3 til 5 aminosyrer (L-Ala, D-iGln, L-Lys, D-Ala og D-Ala). Disse peptidene kan være direkte bundet med hverandre, eller indirekte via kryssbindinger av en kort peptidkjede (L-Ser og L-Ala eller L-Ala og L-Ala) (Figur 1.2) (Vollmer, 2007).

Celleveggen til *S. pneumoniae* inneholder to typer teikoinsyrer (TA): veggteikoinsyrer (WTA = wall teichoic acid) som er kovalent bundet til NAM og lipoteikoinsyrer (LTA = lipoteichoic acid) som er forankret i cellemembranen via et glykolipid. TA er ansvarlig for å binde kolinbindende celleveggproteiner, i tillegg til å være involvert i reguleringen av aktiviteten til celleveggshydrolaser, regulering- av celleveggelongering og celledeling, og resistens mot antimikrobielle peptider og lysozymer. De har også en viktig rolle i cellens evne til å binde til og infisere vertsceller (Neuhaus & Baddiley, 2003; Weidenmaier & Peschel, 2008).

TA i *S. pneumoniae* består av alt fra 2-8 repeterende enheter, hvor 6 – 7 enheter er vanligst. Den repeterende enheten er satt sammen av 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-galactose (AATGal), D-glukose, ribitol-fosfat og to *N*-acetylgalactose (GalNAc) som begge inneholder fosforylkolin (PCho) (Figur 1.2). PCho er uvanlig i bakterier. Avhengighet for eksogent kolin

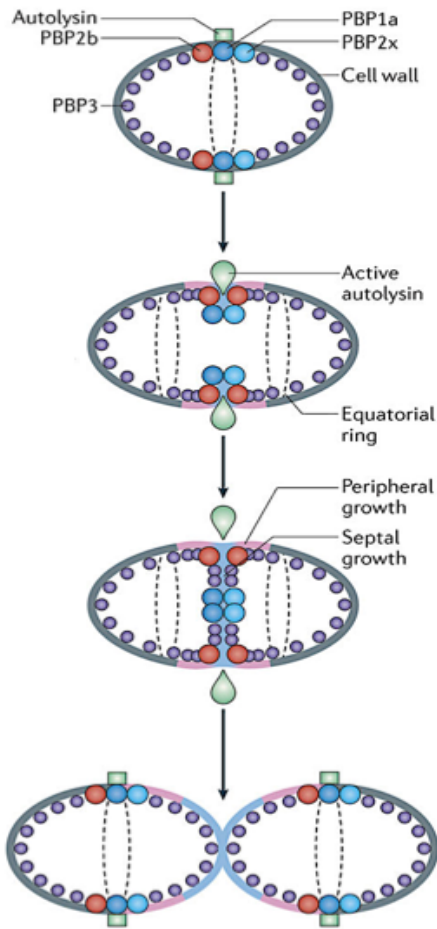
for vekst er kun observert for *S. pneumoniae* (Denapaite, Brückner, Hakenbeck, & Vollmer, 2012).



Figur 1.2: Oppbygning av cellevegg hos *S. pneumoniae*. Peptidoglykan (murein) består av de repeterende monosakkaridene N-acetylglukosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM). De parallelle glykankjedene bindes via korte peptider på NAM. Både direkte- og indirekte kryssbindinger mellom peptidene er vist. Vegg teikoin syrer (WTA) er kovalent bundet til NAM. WTA består av den repeterende enheten 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-D-galactose (AATGal), D-glukose, ribitol-fosfat og to N-acetylgalactose (GalNac). Fosforylkolin (PCho) er bundet til GalNac. Kolinbindende proteiner binder ikke-kovalent til PCho. LTA er ikke vist i figuren.

Syntesen av peptidoglykan involverer mer enn 20 enzymer og kan deles inn i tre steg (Vollmer, 2007). Det første steget foregår i cytoplasma. Her dannes forløperne UDP-NAG og UDP-NAM-pentapeptid (L-Ala, D-iGln, L-Lys, D-Ala og D-Ala) (Barreteau et al., 2008). Det andre steget involverer dannelsen av lipid II og transporten av lipid II fra cytoplasma til den ekstracellulære siden av cellemembranen. Først blir UDP-NAM-pentapeptid satt på lipidbæreren undecaprenyl fosfat (også kalt baktoprenol) for å danne lipid I. Deretter blir en β -(1,4)-glykosid bindingen dannet mellom UDP-NAG og UDP-NAM-pentapeptid i lipid I slik at lipid II dannes (Bouhss, Trunkfield, Bugg, & Mengin-Lecreulx, 2007). Tilslutt blir lipid II transportert over cellemembranen ved hjelp av flippaser (Mohammadi et al., 2011). Kryssbindinger mellom peptidene opptrer på lipid II nivå etter at lipid II har blitt flippet (Filipe, Severina, & Tomasz, 2001). Det siste steget i celleveggsyntesen er polymerisering- og kryssbinding av peptidoglykanenhetene som katalyseres av penicillinbindende proteiner (PBP) (Vollmer, 2007) og trolig også såkalte SEDS (shape, elongation, division, sportulation)-proteiner som RodA og FtsW (Meeske et al., 2016).

Innledning



Figur 1.3: Celleveggsyntese hos ovokokker. Både septal- og perifer peptidoklykan-syntese foregår hos ovokokker som *S. pneumoniae*. Den septale syntesen (lys blå) syntetiserer septal kryssveggen, mens den perifere syntesen (rosa) foregår mellom ekvatorialplanet og septum som resulterer i forlengelse av cellen. Ulike PBPer og autolysin er også indikert i figuren. Figuren er hentet fra (Pinho, Kjos, & Veening, 2013).

Celleveggen opprettholdes ved at PBPer syntetiserer celleveggen, mens autolysiner hydrolyserer peptidoglykan når cellene skal deles. Celledeling starter med dannelsen av en ring ved divisjonsetet ved at celledelingsproteinet FtsZ polymeriserer, en såkalt Z-ring. Dette fører til rekruttering av mer enn 10 essensielle celledelingsproteiner (Goehring & Beckwith, 2005).

I ovokokker, som *S. pneumoniae*, foregår peptidoglykansyntesen både septalt og i lengderetningen av cellen (Zapun, Vernet, & Pinho, 2008). Det er trolig to ulike celleveggmaskiner som står for septal- og perifer peptidoglykansyntese hos ovokokker (Figur 1.3). Både det septale- og det perifere maskineriet lokaliserer til divisjonssetet ved begynnelsen av en divisjonssyklus (Zapun et al., 2008).

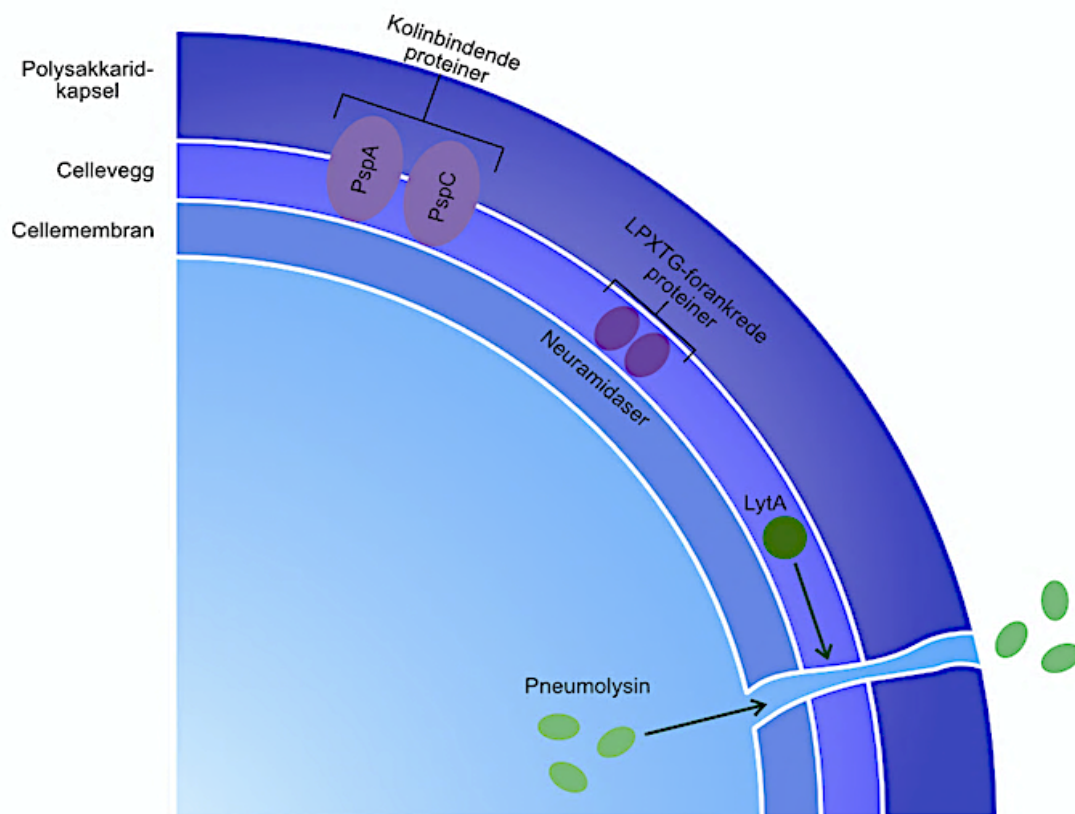
Den perifere celleveggsyntesen resulterer i en forlengelse av cellen, mens det septale celleveggmaskineriet syntetiserer den septale-kryssveggen (Figur 1.3). Det er fortsatt usikkert om disse maskineriene opererer samtidig eller hver for seg.

1.4 Virulensfaktorer i *S. pneumoniae*

En bakteries virulensfaktorer avgjør hvor sykdomsfremkallende den er. Virulensfaktorer kan være toksiner eller proteiner som påvirker muligheten for kolonisering, spredning, eller interaksjon med vertsceller. *S. pneumoniae* produserer flere virulensfaktorer som er involvert i sykdom. Ved å studere disse, og forstå deres rolle i patogenese kan dette brukes i behandling av sykdommer og i utvikling av vaksiner (Mitchell & Mitchell, 2010). I denne oppgaven er virulensfaktorene pneumokokk overflateprotein A (PspA), pneumokokk overflateprotein C (PspC) og neuramidase A (NanA) studert.

1.4.1 Ulike virulensfaktorer

Polysakkaridkapselen til *S. pneumoniae* er en av de viktigste virulensfaktorene. Den utgjør det ytterste laget på bakterien, og er ca. 200 – 400 nm tykk (Sørensen, Blom, Birch-Andersen, & Henrichsen, 1988). Kapselen er antifagocytotisk, siden den hindrer binding av komplement¹ og antistoff til bakterieoverflaten (Musher, 1992). Kapselen er også viktig i kolonisering, fordi den hindrer bakterien i å bli mekanisk rensset vekk av slim. Det vil si at bakterien slipper unna luftveienes og slimhinnenes rensing som består av flimmerhår som kontinuerlig er i bevegelse (Nelson et al., 2007) Det er mest gunstig med en tynn (gjennomsiktig) kapsel tidlig i koloniseringen, mens en tykkere (ugjennomsiktig) kapsel er å foretrekke for at bakterien skal unngå fagocytose (Bogaert, de Groot, & Hermans, 2004). Derfor er det også vist at *S. pneumoniae* kan ha ulik kapseltykkelse i ulike stadier av infeksjonen (Hammerschmidt et al., 2005). Figur 1.4 viser utvalgte virulensfaktorer i *S. pneumoniae*.



Figur 1.4: Utvalgte virulensfaktorer i *Streptococcus pneumoniae*. PspA = pneumococcal surface protein A. PspC = pneumococcal surface protein C. LytA = autolysin A.

¹ Proteinkaskade som er en del av det medfødte immunforsvaret

Innledning

PspA er essensielt for å kolonisere den øvre delen av svelget (nasopharynx) (McDaniel et al., 1987), og for å forårsake lungeinfeksjoner og bakteriemi (Ogunniyi, LeMessurier, et al., 2007). Proteinet beskytter *S. pneumoniae* fra vårt immunsystem, ved at det fører til en redusert komplement-aktivering (Ren, Szalai, Hollingshead, & Briles, 2004). I tillegg binder PspA til det jernbindende proteinet lactoferrin, og med det sikrer tilgang til jern som er nødvendig for formering (Hammerschmidt, Bethe, Remane, & Chhatwal, 1999) Det er lite fritt jern på slimhinnene ($\sim 10^{-18}$ M) (Bullen, Rogers, & Griffiths, 1978). For å overleve i omgivelser med så lite jern kan *S. pneumoniae* sikre seg jern via PspA-laktoferrin bindingen (Hammerschmidt et al., 1999). PspA har kolinbindende domener på den C-terminale delen av proteinet som er ansvarlig for å forankre proteinet til celleveggen (se avsnitt 1.4.3) (Frolet et al., 2010).

PspC er et multifunksjonelt celleveggprotein. Proteinet er også kjent som kolinbindende protein A (CbpA) og sekretorisk pneumokokk overflateprotein A (SpsA). Navnet SpsA oppstod fordi proteinet binder til sekretorisk immunoglobulin A (IgA). Antistoffet IgA er viktig for infeksjonsforsvaret på slimhinner og i tarmkanalen. Sekretorisk IgA er det første forsvaret bakterier møter på i slimhinnene og ved å binde til IgA vil dette fungere som en adhesjonsmekanisme, og lette kolonisering under det første trinnet i kolonisering (Hammerschmidt, Tillig, Wolff, Vaerman, & Chhatwal, 2000). PspC er, i likhet med PspA, viktig for kolonisering av den øvre delen av svelget, men er også viktig for bindingen av *S. pneumoniae* til epitelceller da det fungerer som et adhesin (Rosenow et al., 1997). I tillegg er det vist at PspC binder til faktor H som er en komponent i den alternative veien i komplementsystemet (Dave, Brooks-Walter, Pangburn, & McDaniel, 2001). Dette vil forhindre danning av C3b (komponent i komplementsystemet), og dermed forhindre pneumokokkopsonisering² (Quin et al., 2005). PspC-proteiner er veldig polymorfe, og kan deles inn i to grupper: (i) proteiner som binder til phosphorylcholine (PCho) (dette gjelder proteinet i D39-stammen som benyttes i dette studiet), og (ii) proteiner som forankres til celleveggen via LPxTG motivet (Se avsnitt 1.3.3). LPxTG motivet har blitt funnet i *pspC* gruppene 7 - 11 (Iannelli, Oggioni, & Pozzi, 2002). Proteinet har i tillegg et YSIRK-motiv (se avsnitt 1.3.2) for sekresjon (Frolet et al., 2010). LPxTG og YSIRK-motivene er ytterligere beskrevet i avsnitt 1.3.2 og 1.3.3.

² Reaksjon mellom antistoff og antigen på overflaten til en bakterie slik at bakterien tas opp mer effektivt av fagocytter (eks. makrofager)

LytA er en acetylmuramyl-L-alanine amidase (Howard & Gooder, 1974) som kutter N-acetylmuramyl-L-alanine båndet i peptidoglykanveggen. På grunn av enzymets autolytiske virkning er det ansvarlig for lysing av bakterien i stasjonærfase (Berg, Bjørnstad, Johnsborg, & Håvarstein, 2012). Hvordan LytA bidrar til virulens hos *S. pneumoniae* er uklart. Én hypotese er at LytA har en rolle i sekresjonen av pneumolysin (Martner, Dahlgren, Paton, & Wold, 2008), men ikke alle støtter den hypotesen (Balachandran, Hollingshead, Paton, & Briles, 2001).

Pneumolysin er et 52kDa stort protein som er funnet hos alle *S. pneumoniae* isolater (Paton, Andrew, Boulnois, & Mitchell, 1993), og som ofte blir sett på som en av de viktigste virulensfaktorene hos pneumokokker. Pneumolysin er et kolesterol-avhengig cytolysin som forårsaker lysis i vertsceller ved å danne porer i cellemembranen deres (Kadioglu, Weiser, Paton, & Andrew, 2008). Dette er et cytoplasmatisk enzym som sekreteres ut, men det er fortsatt ukjent hvordan sekresjonen foregår. Som nevnt i avsnittet over, kan pneumolysin bli sekretert ved hjelp av LytA.

NanA er en eksoglykosidase som katalyserer frigjørelsen av terminale sialinsyrerester fra glykoproteiner, glykolipider og oligosakkarider fra celleoverflaten hos vertscellene eller i kroppsvæsken. Dette eksponerer potensielle reseptorer, som kan hjelpe pneumokokken i å binde seg til vertscellene under kolonisering (King, Hippe, & Weiser, 2006). *nanA* oppreguleres når *S. pneumoniae* danner biofilm (Oggioni et al., 2006). Frigjørelsen av sialinsyre bidrar til biofilmdannelse i luftveiseepitel, som gjør NanA til et ønskelig mål for terapeutiske inngrep (Parker et al., 2009). På den N-terminale delen har NanA et YSIRK-motiv (Se avsnitt 1.3.2), et sialidase domene som er ansvarlig for frigjørelsen av terminale sialinsyrerester og et LPxTG motiv (se avsnitt 1.3.3) på den C-terminale delen av proteinet (Frolet et al., 2010).

1.4.2 Sekresjon av virulensfaktorer

Bakterienes virulensfaktorer og toksiner produseres intracellulært. For at disse proteinene skal komme i kontakt med vertscellene, må de transporteres over cellemembranen (translokasjon) til utsiden av cellen. Ulike bakterier har utviklet en rekke ulike sekresjonssystemer (Green & Mecsas, 2016). Hos pneumokokker blir de fleste proteiner fraktet over den cytoplasmatiske membranen via Sec sekresjonsmaskineriet. Sec sekresjonsmaskineriet brukes for å sekretere ufoldede proteiner (Green & Mecsas, 2016) som har et hydrofobt signalpeptid (også kalt ledersekvens) (Blobel, 1980) på den N-terminale enden som vanligvis består av 15 – 20

Innledning

hydrofobe aminosyrer (Silhavy, Benson, & Emr, 1983). Signalpeptidet kløyves av det ufoldede proteinet etter fullført translokasjon. I *Streptococcus* er det identifisert to typer signalpeptider som bruker Sec maskineriet (Tettelin et al., 2001): de med normale hydrofobe sekvensmotiver og de som har et såkalt YSIRK-sekvensmotiv (Schneewind & Missiakas, 2012).

Proteiner med YSIRK-sekvensmotiver inneholder sekvensen YSIRK/G-S (koder for Tyr-Ser-Ile-Arg-Lys-x-x-x-Gly-x-x-Ser, der x er en ikke-konservert aminosyre) i den hydrofobe ledersekvensen. Denne typen ledersekvens finnes i mange proteiner hos streptokokker og stafylokokker, men er ikke funnet i bacilli, clostridia eller actinomycetes (DeDent, Bae, Missiakas, & Schneewind, 2008). YSIRK-ledersekvensen har blitt studert i *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes*. Proteinene med YSIRK-ledersekvens ser ut til å sekreteres mer effektivt enn proteiner med normale sekvensmotiver i *S. aureus* (Bae & Schneewind, 2003). I tillegg har det blitt vist i *S. pyogenes* og i *S. aureus* at proteiner med YSIRK-motiv sekreteres i bakteriens septum i motsetning til proteiner med normale sekvensmotiver som sekreteres ved polene (Carlsson et al., 2006; DeDent et al., 2008). Overflateproteiner med YSIRK-sekvensmotiv i *S. aureus* blir til slutt distribuert over hele celleoverflaten, mens overflateproteiner med normale sekvensmotiver fordeler seg kun ved cellepolene (Schneewind & Missiakas, 2012). Det er derimot fortsatt usikkert hvordan YSIRK-motivet bidrar til denne prosessen. For eksempel endrer mutasjon i de konserverte YSIRK-motivene i ulike proteiner ikke proteinlokaliseringen i septum i *S. aureus*. Dette indikerer at det er noe annet enn kun motivet som bestemmer lokaliseringen. Hvordan YSIRK-motivet påvirker grad av sekresjonseffektivitet og lokalisering har ennå ikke blitt studert i *S. pneumoniae*.

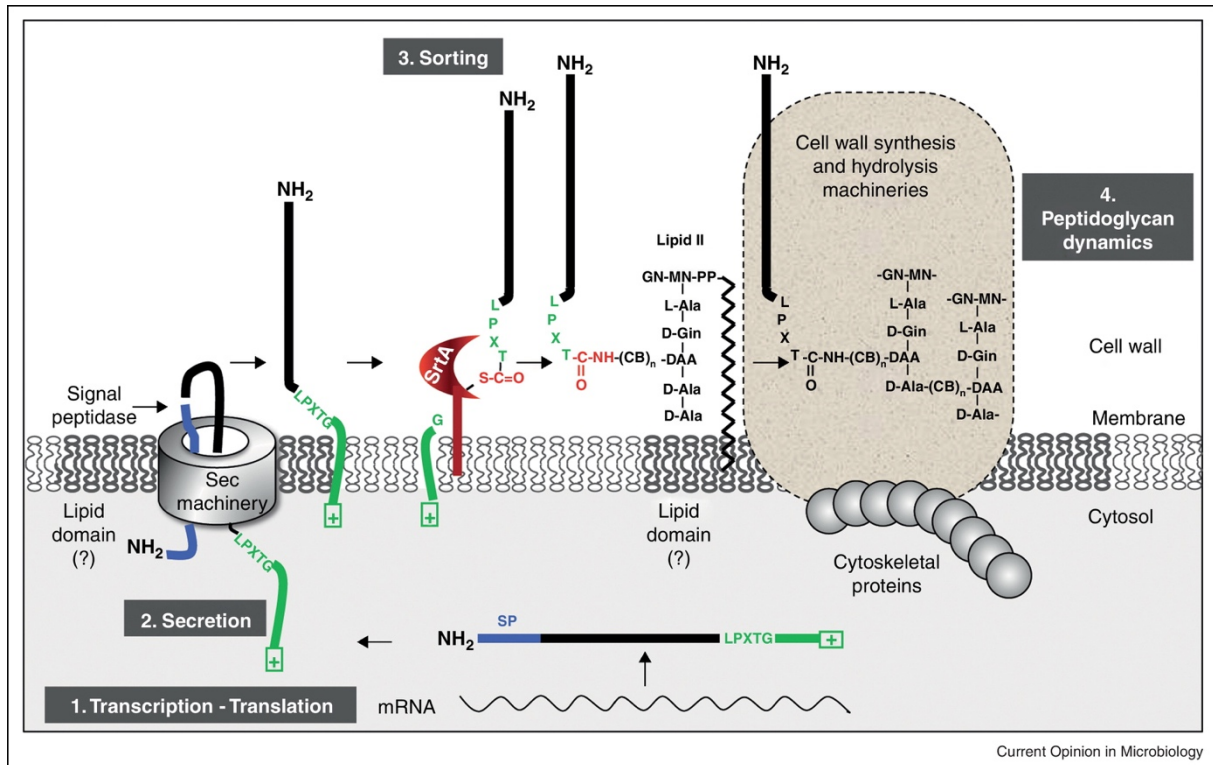
Selv om mange proteiner sekreteres via Sec-maskineriet i *S. pneumoniae*, finnes det også unntak. For eksempel har pneumolysin, ofte regnet som en av de aller viktigste virulensfaktorene i *S. pneumoniae*, ingen signalsekvens. Det er fortsatt ukjent hvordan dette proteinet transporteres til utsiden av cellen, selv om det er hypoteser på at LytA gjør dette (Martner et al., 2008). I tillegg har mange peptider (pneumociner) i *S. pneumoniae* såkalt dobbel-glycin (GG) ledersekvens som transporteres via ABC transportere (Lux, Nuhn, Hakenbeck, & Reichmann, 2007).

1.4.3 Overflatebinding av virulensfaktorer

Når virulensfaktorer har blitt sekretert over cellemembranen kan de enten frigjøres til omgivelsene eller festes til celleoverflaten. Gram-positive bakterier har utviklet ulike mekanismer for feste av proteiner til celleveggen; de kan for eksempel festes via membranankring (lipoproteiner), kovalente bindinger til celleveggen (LPxTG-proteiner) eller ikke-kovalent forankring til celleveggen via phosphorylcholine (PCho) (såkalte kolinbindende proteiner) (Bergmann & Hammerschmidt, 2006).

De kolinbindende proteinene binder ikke-kovalent til PCho, en komponent i celleveggen, via kolinbindende domener på den C-terminale delen av proteinet (Gosink, Mann, Guglielmo, Tuomanen, & Masure, 2000). Det kolinbindende motivet ble først beskrevet i *S. pneumoniae*, og har siden blitt identifisert i en rekke andre eksporterte proteiner i de Gram-positive bakteriene *Clostridium difficile* (von Eichel-Streiber & Sauerborn, 1990), *Clostridium beijerinckii* (Sanchez-Beato, Ronda, & Garcia, 1995), *Streptococcus mutans* (Banas, Russell, & Ferretti, 1990) og *Streptococcus downei* (Gilmore, Russell, & Ferretti, 1990). *S. pneumoniae* koder for 10-15 kolin-bindende proteiner i celleveggen. Som nevnt over, er de kolinbindende proteinene PspA, PspC og autolysinet LytA alle viktige for bakteriens virulens.

LPxTG proteiner inneholder LPxTG-motivet (koder for Leu-Pro-x-Thr-Gly, der x er en ikke-konservert aminosyre), et C-terminalt hydrofobt domene og en ladet hale. I proteinene er LPxTG-motivet konservert, men det hydrofobiske domenet og den ladede halen varierer i lengde og sekvens (Schneewind, Mihaylova-Petkov, & Model, 1993). LPxTG proteiner finnes i Gram-positive bakterier, og *S. pneumoniae* koder for 20 LPxTG proteiner (Frolet et al., 2010). LPxTG på den C-terminale enden av proteinet gjenkjennes av sortase enzymer (sortase A). Sortase A vil kløve peptidbindingen mellom threonin og glysin etter sekresjon, og deretter forankre proteinet til celleveggen ved å danne en kovalent binding mellom threonin i LPxTG-motivet og aminosyren i 3. posisjon på lipid II (Figur 1.5). Flere LPxTG-proteiner er også involvert i virulens, som for eksempel hyaluronidaser og neuroaminidaser som NanA (Mitchell & Mitchell, 2010).



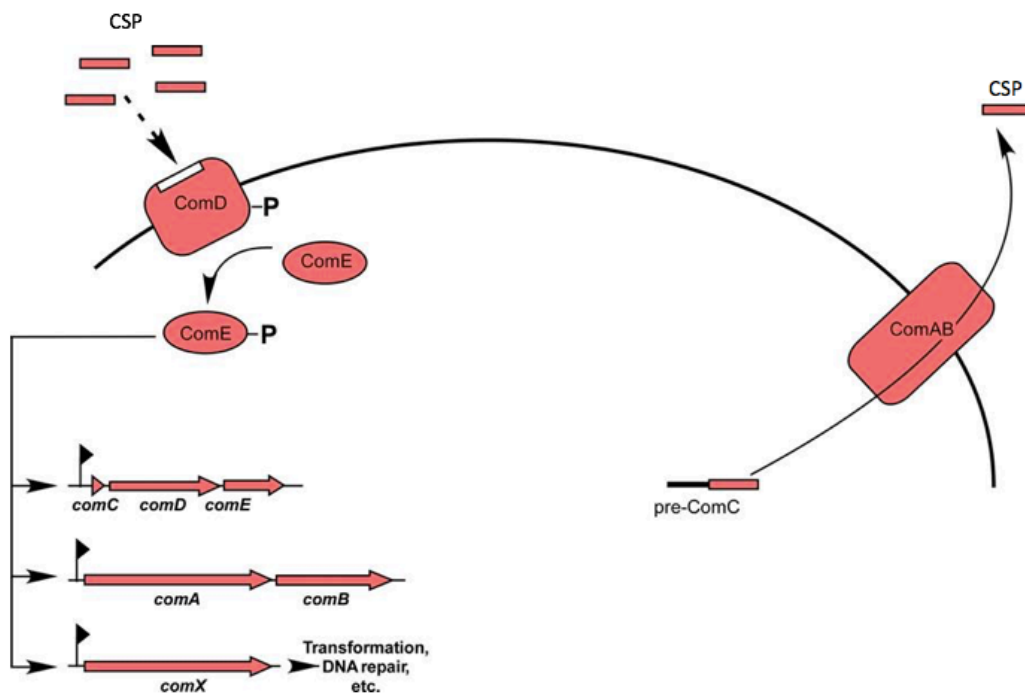
Figur 1.5: Forankring av LPxTG-proteiner i Gram-positive bakterier. Bakterier som sekreteres via Sec-maskineriet har et signalpeptid (SP) som vil kløyves etter fullført translokasjon. LPxTG proteiner er proteiner som inneholder LPxTG – motivet i tillegg til et hydrofobisk domene på den C-terminale enden og en ladet hale. Sortase A (SrtA) gjenkjenner LPxTG motivet og kløyver peptidbindingen mellom threonin og glysin etter sekresjon. SrtA forankrer proteinet til celleveggen ved å danne en kovalent binding mellom threonin i LPxTG-motivet og aminosyren i 3. posisjon på lipid II. Figuren er hentet fra (Bierne & Dramsi, 2012).

1.5 Naturlig transformasjon hos *S. pneumoniae*

Horisontal genoverføring er en viktig drivkraft i evolusjonen av bakterier. Horisontal genoverføring skjer ved tre ulike mekanismer i bakterier; konjugasjon, transduksjon og naturlig transformasjon. Naturlig genetisk transformasjon er godt studert i modellorganismen *S. pneumoniae* som er i stand til å ta opp DNA når den er i en såkalt kompetent tilstand. Kompetente pneumokokker bruker transformasjon til å ta opp eksogent DNA og inkorporerer det i genomet ved hjelp av homolog rekombinasjon (Straume, Stamsås, & Håvarstein, 2015).

Den kompetente tilstanden induseres ved at det kompetansestimulerende peptidet (CSP) som produseres av pneumokokken akkumuleres extracellulært til en kritisk konsentrasjon. CSP binder så til og aktiverer histidinkinasen ComD som fosforylerer transkripsjonsregulatoren ComE (Straume et al., 2015). ComE binder til et direkte repetert sekvensmotiv i promotoren til alle de tidlige kompetansegenene. Dette aktiverer transkripsjon av de tidlige genene som blant annet inkluderer *comAB* og *comCDE*. ComC som translateres fra *comC* produserer et forløperpeptid for CSP som bearbeides til ferdig CSP og sekreteres av ComAB transporteren.

comD genet koder for ComD kinasen og *comE* koder for transkripsjonsaktivatoren ComE. Transkripsjonen av de disse genene fører til økte extracellulære CSP nivåer og økte mengder fosforylert ComE som driver cellen til en kompetent tilstand (Johnsborg & Håvarstein, 2009b). Slike selvinduserende regulatoriske systemer som avhenger av celletettheten kalles ofte for quorum sensing systemer. Se figur 1.6 for illustrasjon av reguleringen av kompetanse (*comCDE* reaksjonsveien) hos *S. pneumoniae*.



Figur 1.6: Regulering av kompetanse hos *S. pneumoniae*. Den kompetente tilstanden induseres av et kompetanse stimulerende peptid (CSP). CSP binder til ComD (en histidin kinase) som fosforylerer transkripsjonsregulatoren ComE. ComE aktiverer dermed transkripsjonen av de tidlige kompetansegenene *comAB*, *comCDE* og *comX*. ComC produserer et forløperpeptid for CSP som bearbejdes til ferdig CSP og sekreteres av ComAB. ComX aktiverer transkripsjonen av de sene kompetansegenene som koder for proteiner som cellen trenger for opptak og inkorporering av ekstracellulært DNA. Figuren er laget av Morten Kjos.

ComX kodet av de tidlige kompetansegenene er en alternativ sigmafaktor og aktiverer transkripsjon av de sene kompetansegenene ved å binde til et konservert sekvens motiv i promotoren til disse genene (Campbell, Choi, & Masure, 1998). ComX er avgjørende for kompetansen fordi den kontrollerer ekspresjonen av de sene genene, og disse genene koder for proteiner som cellen trenger for opptak og inkorporering av ekstracellulært DNA (M. S. Lee & Morrison, 1999). Kompetente pneumokokker produserer en transformasjonspilus som tar opp

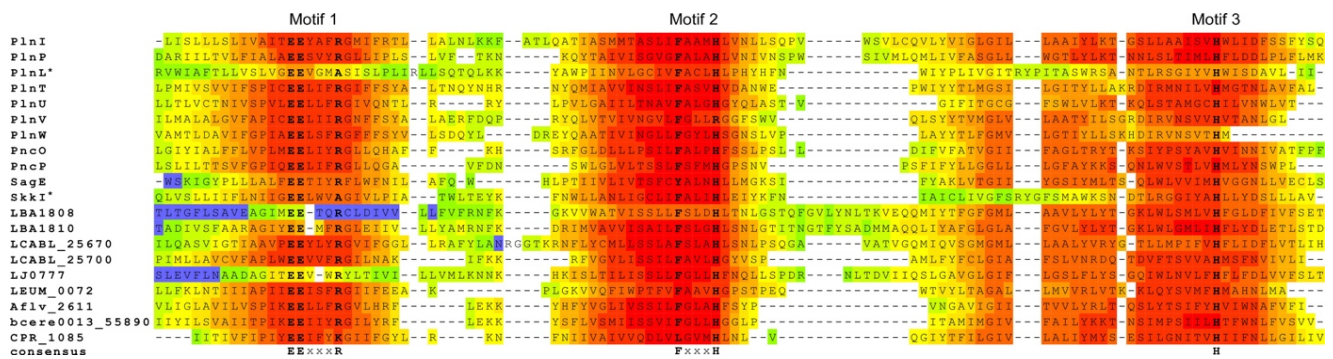
Innledning

extracellulært DNA. DNAet transporteres gjennom celleveggen og cellemembranen ved at pilusen depolymeriseres og drar det gjennom (Laurenceau et al., 2013).

Pneumokokker tar opp homologt DNA fra andre pneumokokker og nært beslektede arter som deler den samme nisjen (for eksempel *S.mitis* og *S. oralis*) ved hjelp av en mekanisme kalt ”fratricide” (Straume et al., 2015). Kompetente pneumokokker sekreterer en murein hydrolase (murein hydrolase kolinbindende protein D, CbpD) fra de sene kompetanse proteinene. CbpD angriper ikke-kompetente pneumokokkers og nært beslektede arters peptidoglykanlag hvilket resulterer i lysering av målcellene. Dette fører til frigjørelse av DNA som kan tas opp av de kompetente cellene (Johnsborg, Eldholm, Bjørnstad, & Håvarstein, 2008). De kolinbindende murein hydrolasene LytA og LytC bidrar også til lyseringen. Kompetente bakterier produserer immunitetsproteinene ComM for å beskytte seg selv mot disse angrepene. Mekanismen bak denne immuniteten er fortsatt ukjent (Straume et al., 2015). I tillegg til murein hydrolasene, uttrykker også pneumokokkene antimikrobielle peptider (såkalte pneumociner eller Blp-peptider) når de er kompetente, og det er vist at det også er sannsynlig at disse bidrar til fratricide-mekanismen ved å lysere målceller (Kjos et al., 2016). Det er også bevist at *S. pneumoniae* blir kompetent når den utsettes for stress, som for eksempel antibiotika (Prudhomme, Attaiech, Sanchez, Martin, & Claverys, 2006; Slager, Kjos, Attaiech, & Veening, 2014).

1.6 CAAX-protein familien

CAAX amino-terminal protease familien, også kjent som ABI familien (forkortelse for abortive infection) og CPBP familien (forkortelse for CAAX proteases and bacteriocin processing), består av antatte membranbundne metallproteaser. Disse finnes både i eukaryote- og prokaryote celler, men de fleste av disse proteinene er funnet i prokaryote (90%) (J. Pei & Grishin, 2001; Jimin Pei, Mitchell, Dixon, & Grishin, 2011). CAAX-proteinfamilien gjenkjennes ved tre konserverte motiver: (i) EExxxR (to glutamat og en arginin separert av tre aminosyrer), (ii) FxxxH (en fenylalanin og en histidin separert av tre aminosyrer), (iii) H (en histidin) (Figur 1.7). Man tror at det er disse tre motivene som utgjør det aktive setet i CAAX-proteasene (Kim et al., 1999)



Figur 1.7: Multiplert sekvenssammenstilling av de konservative motivene i CAAX-proteiner fra ulike bakteriosinlokus. De konservative aminosyrene er uthevet. Sekvenssammenstillingen ble laget ved bruk av T-COFFEE. Figur hentet fra (Kjos, Snipen, Salehian, Nes, & Diep, 2010).

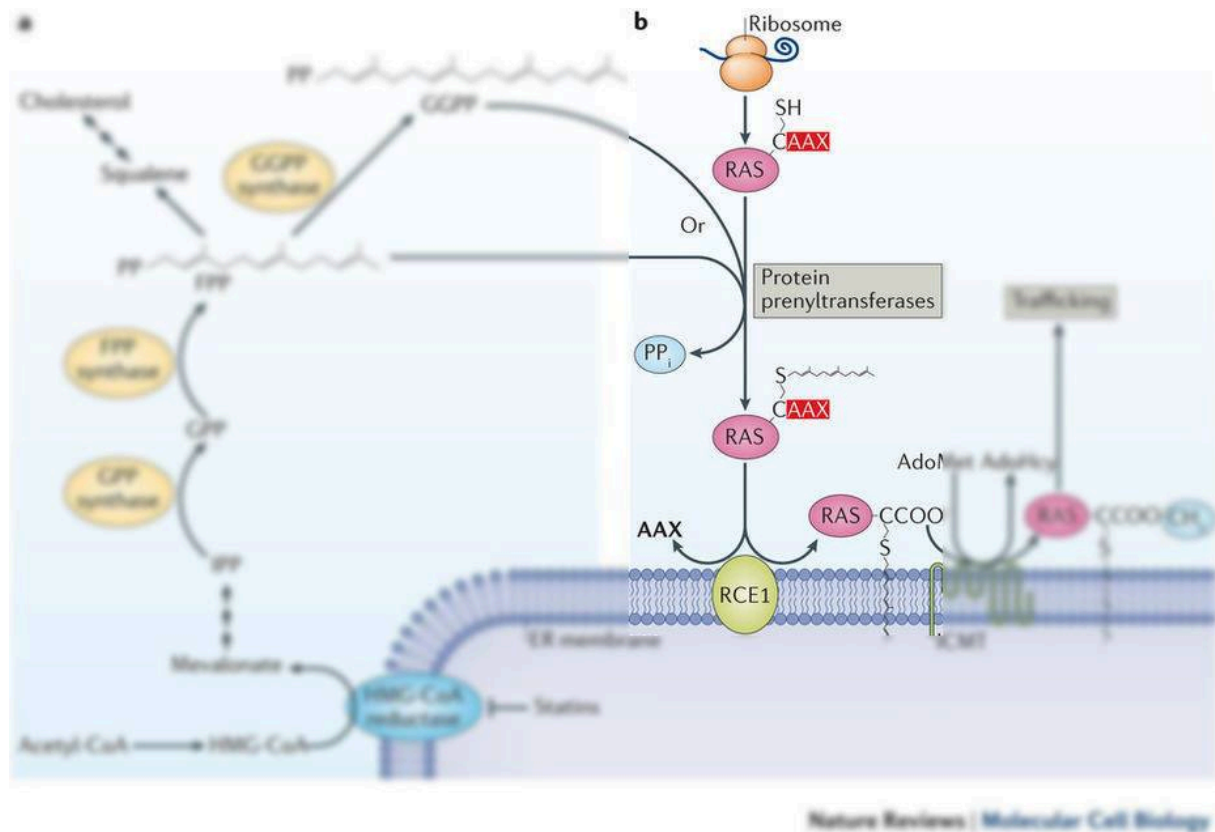
I eukaryote celler er det vist at disse proteinene spalter av -AAX tripeptidet hos lipiderte/prenylerte proteiner³ som inneholder den C-terminale sekvensen CAAX (Cystein og en hvilken som helst aminosyre separert av to alifatiske aminosyrer) (Figur 1.8b). Alifatiske aminosyrer er ikke-polare og hydrofobe. På grunn av at disse proteinene spalter proteiner med sekvensen CAAX oppstod "CAAX"-navnet.

1.6.1 Funksjon av CAAX proteaser i eukaryote celler

I eukaryote foregår prenylering av proteiner med CAAX-motivet i tre steg: (i) en farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase fester en prenyl gruppe (farnesyl isoprenoid/geranylgeranyl isoprenoid) på cystein, (ii) en CAAX endopeptidase spalter av -AAX tripeptidet (Figur 1.8b), og (iii) en isoprenylcystein carboxyl methyltransferase fester en metylgruppe på cystein som nå er en C-terminal isoprenoid-modifisert cystein med en metylgruppe. Proteinene som har blitt spaltet får en hydrofob C-terminal ende, som gir en økt mulighet til å interagere med cellemembranen. Prenylerings- og CAAX-motivet i proteinene kan til sammen bestemme lokaliseringen av proteinet i cellen (Wang & Casey, 2016). Liknende mekanisme er ikke funnet i prokaryote (se under).

³ Proteiner som har fått satt på hydrofobe molekyler

Innledning



Figur 1.8: Funksjonen av CAAX-proteaser i eukaryote celler. **b** Rekasjonsvei som viser (1) prenylering av RAS-proteinet som inneholder en C-terminal sekvens CAAX, samt (2) spaltning av AAX-tripeptidet ved RCE1 (en CAAX endopeptidase) i en eukaryot celle. RAS-proteinet settes så inn i endoplasmatisk retikulum (ER) membranen. Figuren er modifisert etter (Wang & Casey, 2016).

1.6.2 CAAX proteaser i bakterier

I dag er det lite kunnskap om den biologiske funksjonen til CAAX-proteinfamilien i prokaryote celler. Det er generelt mer av disse genene i Gram-positive bakterier enn i Gram-negative bakterier, og det er stor variasjon i antall CAAX-proteinkodende gener per genom (Kjos et al., 2010). Studier av CAAX-proteiner fra ulike bakterier har ikke vist noen klar proteaseaktivitet. *S. pneumoniae* som ble studert i denne oppgaven, koder ikke for noen proteiner med –CAAX sekvens i C-terminus (Morten Kjos, personlig kommunikasjon). Det er derfor trolig at CAAX-proteaser har andre funksjoner i bakterier enn i eukaryote celler.

1.6.3 CAAX er involvert i selv-immunitet mot antimikrobielle peptider

Det er utført studier på CAAX-proteiners involvering i biosyntese av bakteriosiner da flere CAAX-gener ligger i genklustere som inneholder gener som koder for bakteriosiner. Bakteriosiner er antimikrobielle peptider produsert av bakterier for å hemme vekst av beslektede bakterier (Kjos et al., 2010). *Blp* lokuset i *S. pneumoniae* (Lux et al., 2007), *pln*

lokuset i *Lactobacillus plantarum* (Diep, Straume, Kjos, Torres, & Nes, 2009) og *sag* lokuset i *Streptococcus pyogenes* (Datta et al., 2005) er kjente bakteriosinlokus som inneholder CAAX-gener. Datta et al. (2005) og Lux et al. (2007) viste ved hjelp av gen knockout eksperimenter at CAAX-genene *sagE* og *blpY* er involvert i selv-immunitet mot beslektede bakteriosiner hos streptokokker. Genene *skkI*, *plnI* og *plnLR* i *L. plantarum* har også vist seg å kode for immunitetsproteiner i likhet med *sagE* og *blpY* (Kjos et al., 2010). For SkkI og PlnI ble det vist at mutasjoner i de konserverte motivene gjorde at immunitetsfunksjonen ble svekket (Kjos et al., 2010). Likevel er det ikke klart hvordan CAAX gir immunitet mot antimikrobielle peptider, da ingen proteaseaktivitet ble påvist. Andre enkeltstudier har vist at et CAAX-protein i *Sphingomonas* sp. kan være en endopeptidase som degraderer toksinet microcystin (Saito et al., 2003), og i *Klebsiella pneumoniae* ser CAAX-proteinet MceF ut til å være viktig i eksport av bakteriosinet microcin E492 (Lagos et al., 2001).

1.6.4 CAAX proteaser er involvert i proteinsekresjon i *S. aureus*

Hos *S. aureus* er det laget delesjonsmutanter av CAAX-genene. I en screen etter proteiner involvert i proteinsekresjon, ble det funnet en reduksjon i forekomsten av protein A (SpA) hos celler med mutasjoner i CAAX-proteinene *spdA*, *spdB* og *spdC* (Frankel, Wojcik, DeDent, Missiakas, & Schneewind, 2010). Frankel et al. (2010) fant både en reduksjon i sekresjon av SpA og en reduksjon i transkripsjonen av *spa*-genet samt en tynnere septal cellevegg i *spd* mutanter sammenlignet med villtypen. Sistnevnte observasjon tyder på at CAAX-proteiner påvirker celleveggsyntese eller celledeling hos stafylokokkene. *S. aureus* er en kokk og *S. pneumoniae* er en ovokk. Disse bakteriene har noe ulike mekanismer for celledeling og celleveggsyntese, og man må derfor være forsiktig med å sammenligne disse for mye, selv om begge er Gram-positive bakterier. Siden SpA er et protein med et signalpeptid som inneholder YSIRK-motivet undersøkte Frankel et al. (2010) om andre proteiner med et slikt signalpeptid også ble påvirket av CAAX-mutantene. Det ble funnet en reduksjon av proteinene FnbA, FnbB og SdrD som indikerer at CAAX-proteiner har en rolle i sekresjonen av proteiner med YSIRK-motiver.

1.7 Bakgrunn og mål med oppgaven

Funksjonen til CAAX-proteinene i eukaryote celler er kjent, men det er lite kunnskap om deres biologiske funksjon i prokaryote celler. I en forstudie til denne oppgaven ble alle genene som koder for CAAX-proteiner deletert i *S. pneumoniae* stammen D39, og en proteomikkundersøkelse av overflateproteomet tydet på at disse genene kunne være involvert i proteinsekresjon på samme måte som i *S. aureus*.

Målet med denne oppgaven var derfor:

- Å karakterisere CAAX-proteinene og CAAX-mutantene i *S. pneumoniae*, og undersøke hvilke roller disse proteinene kan ha.
- Spesifikt studere hvordan CAAX-proteiner og eventuelt andre faktorer (inkludert ledersekvenser) påvirker sekresjonen av viktige virulensfaktorer (som PspA, PspC og NanA) i *S. pneumoniae*.

2. Materialer

I vedlegg A og B ligger tabeller over stammer og primere som ble brukt under dette arbeidet.

2.1 Vekstmedium

C+Y medium

S. pneumoniae ble i flytende kultur dyrket i C+Y medium. Basisen for C+Y mediet er såkalt Pre-C løsning som består av 11,25 mg/L cysteine HCL, 2 g/L natrium acetat, 5 g/L caseinhydrolysat, 6 mg/L L-tryptofan og 8,5 g/L K_2HPO_4 . Etter tillagning ble løsningen autoklavert på 121° i 15 minutter.

C+Y medium ble deretter laget ved å blande følgende:

TIL 150 ML PRE-C+Y MEDIUM TILSETTES:	SLUTTKONSENTRASJON
150 µl 0,4 mM $MnCl_2 \cdot 0$	0,0004 mM
1,5 ml 20% Glukose	0,2%
3,75 ml ADAMS III	*
110 µl 3% Glutamin	0,002%
2,25 ml 2% Na pyruvat	0,03%
95 µl 1,5 M Sucrose	0,95 mM
1,5 ml 2 mg/ml Uridin adenosin	0,02 mg/ml
1,5 ml 8% Albumin/BSA	0,08%
3,75 ml 10% Gjærekstrakt**	0,25%
3 ml 1 M HCL	2%

*ADAMS III er en løsning bestående av ulike metaller (jern, kobber, sink, magnesium, mangan), ulike vitaminer, kalsiumklorid, aspargin og kolin.

** Tillagning av gjærekstrakt er beskrevet under.

Gjærekstrakt. 40 g gjærekstrakt ble løst i 360 ml dH_2O og pH ble justert til 3,0 med HCl. Deretter ble 16 g aktivt kull tilsatt og løst. Dette ble oppbevart ved 4°C i 2 timer. Løsningen ble filtrert over natt gjennom en kolonne med glassull og celitt. Filtratet ble justert til pH 7,8 med NaOH, og dH_2O ble tilsatt til et sluttvolum på 400 ml. Løsningen ble sterilfiltrert med et 0,2 µm filter (Sarstedt) før bruk og oppbevart ved -80°C.

ADAMS I består av 0,30 ml/L biotin, 150 mg/L nikotinsyre, 175 mg/L pyridoxine hydroklorid, 600 mg/L kalsium panthothenate, 160 mg/L thiamin hydroklorid og 70 mg/L riboflavin. Dette

Materialer

ble løst i 900 ml dH₂O. pH ble justert til 7,0 før dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 1 liter. Løsningen ble sterilfiltrert med et 0,2 µm filter før bruk og oppbevart ved 4°C.

ADAMS II består av 5 g/L jernsulfat heptahydrat, 5 g/L kobbersulfat pentahydrat, 5 g/L sink sulfat heptahydrat, 2 g/L mangan(II)-klorid tetrahydrat og 100 ml/L HCl. Det ble tilsatt dH₂O til et sluttvolum på 1 liter. Løsningen ble sterilfiltrert med et 0,2 µm filter før bruk og oppbevart ved 4°C.

ADAMS III består av 128 ml ADAMS I, 3,2 ml ADAMS II, 1,4 g L-asparagine, 160 mg kolin, 0,4 g CaCl₂ og 16 g MgCl₂·6H₂O. Det ble tilsatt dH₂O til et sluttvolum på 800 ml og pH ble justert til 7,6 med NaOH. Løsningen ble sterilfiltrert med et 0,2 µm filter før bruk og oppbevart ved 4°C.

Etter tillagning ble C+Y mediumet sterilfiltrert med et 0,2 µm filter. I vekstmediet ble det også tilsatt 2% (v/v) 1 M HCl. Dette vil redusere pH i mediet til 6.8 – 7.0, slik at kompetanse for naturlig transformasjon ikke aktiveres i D39 stammen som ble brukt i denne oppgaven (Moreno-Gómez et al., 2017).

Lysogeny broth (LB) medium/agar

LB-medium ble brukt til å dyrke *E. coli* i både flytende kultur og til agarplater. LB består av 10 g/L NaCl, 10 g/L tryptone (Oxoid) og 5 g/L gjærekstrakt (Merck Millipore). Ved tillagning av LB-agar (LA) ble i tillegg 15 g/L (1,5%) Bacto™ Agar (Saween Werner) (1,5%) tilsatt. Løsningene ble autoklavert på 121°C i 15 minutter. Eventuell antibiotika ble tilsatt før agaren ble helt ut på skåler og oppbevart ved 4°C. Flytende LB-medium ble oppbevart ved romtemperatur.

Todd-Hewitt Agar

Todd-Hewitt agar ble brukt til å dyrke *S. pneumoniae* på agarplater. Denne består av 30 g/L Bacto™ Todd Hewitt buljong (BD Bioscience) og 15 g/L g Bacto™ Agar pulver (Saween Werner).

Todd Hewitt pulver ble løst i dH₂O og agar (1,5%) ble tilsatt før løsningen ble autoklavert på 121°C i 15 minutter. Antibiotika ble eventuelt tilsatt før agaren ble helt ut på skåler og oppbevart ved 4°C.

SOC-medium

SOC-medium ble brukt under transformasjon av *E. coli*. Det består av 20 g/L tryptone (Oxoid), 5 g/L gjærekstrakt (Merck Millipore) og 0,5 g/L g NaCl.

Ved tillagning av SOC-medium ble først 950 ml dH₂O tilsatt. Deretter ble 10 ml 250 mM KCl, 5 ml 2M MgCl₂ og 20 ml 1M glukose tilsatt. pH ble justert til 7,0 før dH₂O ble tilsatt opp til 1L og autoklavert på 121° i 15 minutter. SOC-medium ble oppbevart ved 4°C.

3% blodagar

Blodagar ble brukt for å dyrke *S. pneumoniae* på agarplater for å undersøke hemolysesoner. 40 g/L blodagarløsning (Oxoid) ble autoklavert på 121°C i 15 minutter. 30 ml hesteblood (Oxoid) ble tilsatt per L. Agaren ble helt ut på skåler og oppbevart ved 4°C.

Antibiotika benyttet under dyrking av *S. pneumoniae* og *E. coli* (Tabell 2.1):

Tabell 2.1: Antibiotika som ble benyttet under dyrking av *S. pneumoniae* og *E. coli*

Antibiotikum	Stockløsning	Konsentrasjon for seleksjon	Bakterie
Kanamycin	100 mg/ml	400 µg/ml	<i>S. pneumoniae</i>
Streptomycin	100 mg/ml	200 µg/ml	<i>S. pneumoniae</i>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	<i>E. coli</i>
Tetrasyklin	10 mg/ml	0,5 µg/ml	<i>S. pneumoniae</i>
Kloramfenikol	34/10 mg/ml	2 µg/ml	<i>S. pneumoniae</i>

Stockløsningene med antibiotika ble sterilfiltrert med et 0,2 µm filter før bruk og oppbevart ved -20°C. I vedlegg F ligger en tabell med produsent og produktnummer for disse antibiotikaene.

2.2 Løsninger og buffere

I vedlegg F ligger tabeller over kjemikalier, programmer og kit som ble brukt under dette arbeidet.

Materialer

2.2.1 Diverse løsninger

1x Phosphate-buffered Saline (PBS) består av 8 g/L NaCl, 0,201 g/L KCl, 1,7799 g/L Na₂HPO₄ og 0,272 g/L KH₂PO₄. Dette ble løst i 900 ml dH₂O. pH ble justert til 7,2 med HCl før dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 1 liter. PBS ble oppbevart ved romtemperatur.

0,1 M ZnCl₂ består av 3,407 g ZnCl₂ som ble løst i 250 ml dH₂O. Sinkklorid ble oppbevart ved romtemperatur.

2.2.2 Løsninger til gelelektroforese

50 x TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer består av 242 g/L tris base, 57,1 ml/L eddiksyre og 100 ml/L 0,5 M EDTA, pH 8,0. Løsningen ble oppbevart ved romtemperatur. Det ble benyttet 1 x TAE buffer til agarose gelelektroforese.

10 x loadingbuffer består av 2 ml 1 % bromfenolblått, 5 ml 50 % glyserol og 8 ml dH₂O. Loadingbuffer ble oppbevart ved romtemperatur.

1 kb DNA ladder (50 ng/ml) består av 50 µl 1 kb ladder (Invitrogen), 200 µl 10 x loadingbuffer og 750 dH₂O. DNA ladder ble oppbevart ved 4°C

2.2.3 Løsninger til fraksjonering, SDS-PAGE og Western blotting

Alle buffere og løsninger ble oppbevart ved romtemperatur med mindre noe annet er oppgitt.

1 M Tris-HCl, pH 7,5 består av 157,6 g Tris-HCl som ble løst i 900 ml dH₂O. pH ble justert til 7,5 med HCl før dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 1 liter. 50 mM og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ble brukt under fraksjonering.

10 mM Tris-HCl 100 mM NaCl, pH 7,5 består av 50 ml 50 mM Tris-HCl og 1,46 g NaCl som ble løst i 200 ml dH₂O.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 består av 30,28 g Tris-HCl som ble løst i 400 ml dH₂O. pH ble justert til 6,8 med HCl før dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 500 ml.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 består av 90,83 g Tris-HCl som ble løst i 400 ml dH₂O. pH ble justert til 8,8 med HCl før dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 500 ml.

SEDS lysis buffer består av 15 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,02% SDS og 0,01% deoxycholate.

SDS loading buffer består av 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM DTT, 4% SDS, 0,2%, bromfenolblue og 20% glycerol.

100 mM protease inhibitor (PMSF) består av 0,01742 g PMSF som ble løst i 1 ml isopropanol. Fra dette ble 10 µl tilsatt til 100 µl dH₂O for å lage 10 mM PMSF. PMSF ble oppbevart ved -20°C.

30 % sukrose i 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 består av 30 g sukrose som ble løst i 100 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

1000 U/ml mutanolysin består av 1 mg mutanolysin som ble løst i 10 ml dH₂O. Dette ble sterilfiltrert før bruk og oppbevart ved -20°C. 100 U/ml mutanolysin ble brukt i cell wall digestion buffer.

Cell wall digestion buffer består av 1 µl 10 mM protease inhibitor PMSF, 100 µl 100 U/ml mutanolysin og 900 µl 30 % sukrose i 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

10x Tris-Glycin runningbuffer består av 30 g Trizma®base, 144 g glycin og 50 ml 20% SDS. dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 1 liter. 1x runningbuffer ble benyttet ved SDS-PAGE.

Western transfer-buffer består av 3 g/L Trizma®base, 14,4 g/L glycin, 200 ml metanol og 800 ml dH₂O. Transfer buffer ble oppbevart ved 4°C.

TBS-Tween (TBS-T) består av 8,8 g/L Trizma®base, 1,2 g/L NaCl og 500 µl tween. Det ble tilsatt dH₂O opp til 1 liter, og pH ble justert til 7,5 med HCl.

Materialer

Coomassie staining løsning (fargeløsning) består av 50 mg Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 ml etanol, 10 ml eddiksyre og 50 ml dH₂O. Løsningen ble filtrert med et 0,2 µm filter før bruk.

Destain løsning (avfargingsløsning) består av 40 ml etanol, 10 ml eddiksyre og 50 ml dH₂O.

3. Metoder

3.1 Dyrking og oppbevaring av *S. pneumoniae* og *Escherichia coli*

S. pneumoniae D39 ble dyrket i dagsferskt C+Y medium i vannbad på 37°C eller på TH-agarskåler i varmeskap på 37°C. *S. pneumoniae* vokser best under anaerobe betingelser. For å skape et anaerobt miljø ble det derfor benyttet lukkede rør ved dyrking i flytende C+Y medium. Ved dyrking på TH-agarskåler ble agarskålene satt i anaerobe kamre med AnaeroGen™ poser. Når AnaeroGen™ poser blir plassert i kammeret blir oksygenet raskt absorbert samtidig som det produserer karbondioksid (CO₂). Oksygenivået vil synke til 1% innen 30 minutter (Scientific, 2017).

Frysestock ble laget fra bakteriekulturer med optisk tetthet (OD)₆₀₀ ~ 0,4 ved å tilsette glyserol til en endelig konsentrasjon på 14,5%. Frysestocken ble oppbevart ved -80°C.

Arbeidskulturer (T2 celler) ble laget ved å inokulere 1/100 fra frysestock i C+Y medium. Dette ble inkubert på 37°C frem til en OD₆₀₀ ~ 0,4. Deretter ble 500 µl overført til et eppendorfrør og sentrifugert 8000 x g i 2 minutter. Pelleten ble resuspendert i 500 µl dagsferskt C+Y medium med 14,5% glyserol. Arbeidskulturene ble oppbevart ved -80°C.

E. coli ble dyrket i LB-medium i varmeskap på 37°C med risting eller på LB-agarskåler i varmeskap på 37°C. I motsetning til *S. pneumoniae* vokser *E. coli* best hvis den får oksygen, og dyrkes derfor med risting. Frysestock ble laget fra bakteriekulturer med synlig vekst ved å tilsette glyserol til en endelig konsentrasjon på 14,5%. Frysestocken ble oppbevart ved -80°C.

3.2 Vekstforsøk og test av antibiotikasensitivitet

Det ble satt opp vekstforsøk på 37°C og 42°C for å undersøke veksten til mutantene i forhold til villtypen. Vekstforsøket inkluderte stammene D39, SPMK13-, 25, 33, 50, 58, 63, 64, 59 og 78. Celler dyrket til OD₆₀₀ ~ 0,4 ble inokulert 1/1000 i C+Y medium. Fra dette ble 300 µL overført til brønner i en 96-brønns mikrotiterplate med tre paralleller per prøve. Medium uten celler ble inkludert som kontroll. Vekst i 96-brønnsplaten ble inkubert ved angitt temperatur i Synergy™ H1 (BioTek) mikrotiterplateleser, og OD₆₀₀ ble målt hvert 10. minutt i 15 timer.

Metoder

For å undersøke sensitiviteten for antibiotika i villtypestammen og stammen hvor alle CAAX-genene er deletert (SPMK78), ble det i tillegg satt opp vekstforsøk på 37°C hvor ulike fortynninger av utvalgte antimikrobielle peptider (bacitracin og nisin) ble tilsatt. Det ble laget 2-fold fortynninger av antibiotikaene på følgende måte: 100 µl C+Y medium ble tilsatt alle brønnene. Bacitracin og nisin ble tilsatt til en konsentrasjon på henholdsvis. 80 µg/ml og 40 µg/ml i første brønn, og fortynninger ble laget fra brønn 1-11. Brønn 12 fungerte som kontrollbrønn uten antibiotika. Videre ble celler ved OD ~ 0,4 inokulert 1/100 i C+Y medium og tilsatt i alle brønnene. Platen ble satt inn i Synergy™ H1 (BioTek) som målte OD₆₀₀ hvert 10. minutt i 15 timer.

3.3 Rapid ID 32 STREP test

Rapid ID 32 STREP test ble benyttet for å undersøke om SPMK78 og villtypen fermenterer ulike sukre. Rapid ID 32 STREP test er et standardisert system for identifikasjon av streptokokker og enterokokker. Testen består av 32 brønner som inneholder dehydrerte substrater, hovedsakelig ulike sukre. Ved hjelp av en pH indikator vil det bli et fargeomslag om bakterien vokser i brønnen med det spesifikke sukkeret (bioMérieux, Inc).

Stammene D39, SPMK13 og SPMK78 ble inokulert i 4 ml C+Y medium til en OD ~ 0,2 før 55 µl ble tilsatt til hver brønn. Testene ble inkubert i et fukt-kammer på 37°C i 4 timer før de ble avlest.

3.4 Hemolyseforsøk

For å undersøke om CAAX-proteiner har noen innvirkning på hemolyse hos *S. pneumoniae* ble stammene D39, SPMK13 og SPMK78, i tillegg til de tilfeldig utvalgte stammene SPMK17, SPMK33 og SPMK64 strøket ut på 3% blodagar. Stammene RH425 og Hermans 33 ble også inkludert i forsøket som kontroller. I tillegg til utstrykning, ble også celler støpt inn i agaren. Skålene ble inkubert anaerobt over natt på 37°C.

3.5 Mikroskopi

Fasekontrastmikroskopi ble brukt for å studere cellemorfologi, og fluorescensmikroskopi ble brukt for å studere den subcellulære lokaliseringen til CAAX-proteinene.

3.5.1 Fasekontrastmikroskopi

Alle stammene med delelesjoner i CAAX-genene (SPMK17-, 25, 33, 50, 58, 59, 63, 64 og 78) ble undersøkt ved fasekontrastmikroskopi for å studere morfologi hos mutantene sammenlignet med villtypestammen.

Objektglass ble vasket med etanol og dH₂O før og etter bruk. Det ble laget en 1,2% agarose PBS løsning (0,12 g agarose i 10 ml 1x PBS pH 7,4), som ble lagt på objektglassene for å unngå at bakteriene skal bevege seg under mikroskopering.

Celler ble dyrket opp til OD₆₀₀ ~ 0,2 (eksponentiell fase) på 37°C. Deretter ble cellene (1ml) sentrifugert ved 8000 x g i 2 min, og resuspendert i 50 µL 1x PBS. Videre ble DAPI (kromosom/DNAstain) og Nile Red (membranstain) tilsatt til en sluttkonsentrasjon på henholdsvis 50 µg/ml og 5 µg/ml. Tilslutt ble 0,5 µL av hver prøve satt på objektglassene med agarose før dekkglass ble lagt på.

Bilder ble tatt ved å bruke et Zeiss AxioObserver med Zen Blue Software, og et ORCA-Flash 4.0 V2 Digital CMOS kamera (Hamamatsu Photonics) ved å bruke et 100x fasekontrast objektiv. Programmet ImageJ (Fiji) (Schindelin et al., 2012) med plugin MirobeJ (Ducret, Quardokus, & Brun, 2016) ble benyttet for å sammenligne cellelengde- og bredde hos villtype celler og CAAX-mutant celler.

3.5.2 Fluorescensmikroskopi

For å studere lokaliseringen av CAAX-proteinene ble alle CAAX-proteinene GFP-tagget og deretter studert ved fluorescensmikroskopi. Proteinene PspA og PspC ble også GFP-tagget for å studere lokaliseringen av disse. Objektglass ble i likhet med fasekontrastmikroskopi vasket med etanol og dH₂O før og etter bruk. En 1,2 % agarose løsning ble lagt på objektglassene.

De GFP-taggede stammene ble dyrket i C+Y medium til en OD₆₀₀ ~ 0,2 på 37°C. For stammene som uttrykker fusjonsgener fra en sink-induserbar promotor (se vedlegg A), ble 0,2 mM ZnCl₂

Metoder

tilsatt i mediet under dyrking. Cellene (1 ml) ble sentrifugert i 2 minutter ved 8000 x g, og resuspendert i 50 µl 1 x PBS. Deretter ble 0,5 µl av hver prøve satt på objektglassene med agarose før dekkglass ble lagt på.

Stammene som uttrykker *pspA-gfp*, *pspC-gfp* og *pspA* med *pspC* ledersekvens-*gfp* (*pspC^L-pspA-gfp*) ble i tillegg mikroskopert etter kolinvasjon. En CAAX-GFP stamme ble inkludert som kontroll. Stammene ble dyrket i C+Y medium til en OD ~ 0,25 – 0,3 på 37°C. Cellene (1 ml) ble sentrifugert i 2 minutter ved 8000 x g. Pelleten ble resuspendert i 2 % kolin og ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Dette ble igjen sentrifugert i 2 minutter ved 8000 x g før pelleten ble resuspendert i 50 µl 1 x PBS. Deretter ble 0,5 µl av hver prøve satt på objektglassene med agarose før dekkglass ble lagt på.

Bilder ble tatt ved bruk av Zeiss AxioObserver med samme software, kamera og objekt som nevnt ovenfor. Et HXP 120 Illuminator (Zeiss) ble brukt som en fluorescerende lyskilde. Programmet ImageJ (Fiji) (Schindelin et al., 2012) med plugin MicrobeJ (Ducret et al., 2016) ble benyttet til å lage figurer.

3.6 Molekylær kloning

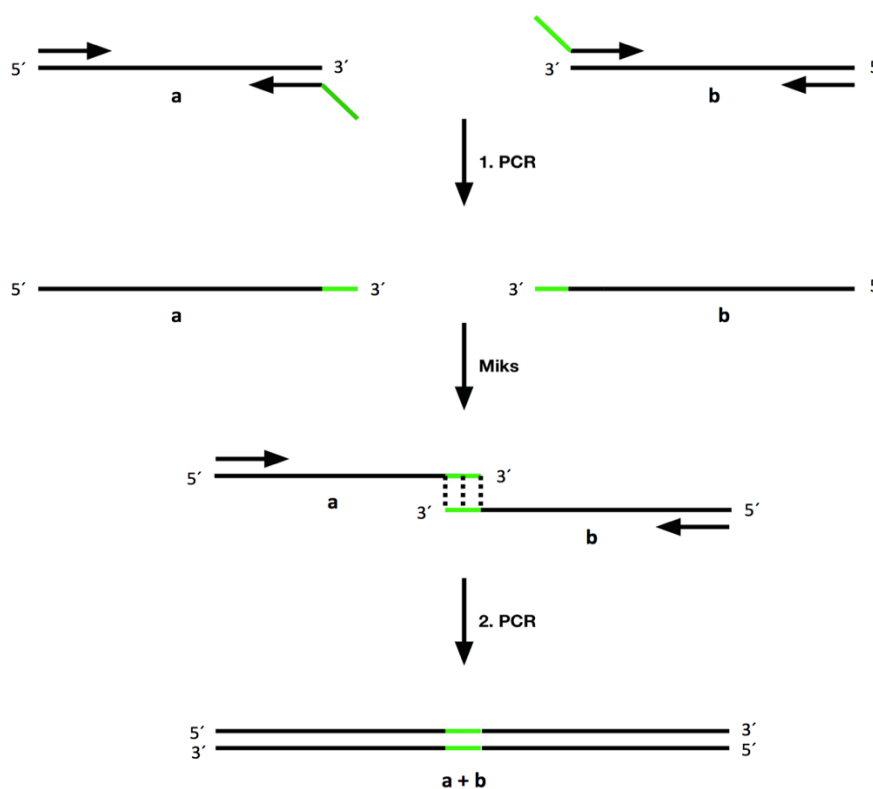
Molekylær kloning er en metode innen molekylærbiologi som refererer til prosessen der rekombinert DNA transformeres inn i en vertsorganisme hvor insertet vil replikeres. *S. pneumoniae* kan transformeres med både plasmid og lineært DNA, og begge metoder ble benyttet i dette arbeidet. Ved plasmidkloninger, ble ønsket DNA ligert inn i en plasmidvektor som ble transformert inn i *E. coli*. Ved å bruke plasmider vil det ønskede DNAet lett kunne isoleres i store mengder fra *E. coli* før det transformeres videre inn i *S. pneumoniae*. Plasmider og lineære fragmenter som brukes til kloning inneholder gener som koder for antibiotikaresistens slik at det kan selekteres for riktige transformanter (Tortora et al., 2013).

3.6.1 Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) er en teknikk som brukes innen molekylærbiologi for å amplifisere en bestemt del av en DNA sekvens. Ved hjelp av denne metoden får man mange millioner kopier av den ønskede sekvensen man oppformerer.

PCR foregår i tre trinn: denaturering-, hybridisering- og forlengelse av DNA. I det første trinnet vil temperaturen ligge på ca. 95°C slik at DNA denatureres og blir enkelttrådet. Videre i trinn to vil temperaturen synke til mellom 50°C og 65°C slik at primerne hybridiserer til komplementære sekvenser på DNA tråden. I det siste trinnet vil polymerasen syntetisere nytt DNA ved en temperatur på ca. 72°C. Disse tre trinnene vil gjentas ca. 30 ganger. Det dannes to nye dattertråder for hver templattråd, så antall sekvenser øker eksponentielt under en PCR reaksjon. En PCR-reaksjon krever templattråd, nukleotider (dATP, dTTP, dCTP og dGTP), to primere som flankerer DNA sekvensen man ønsker å amplifisere, buffer og en varmestabil DNA-polymerase (Saiki et al., 1988).

Overlapp PCR gjør det mulig å sette sammen PCR produkter fra ulike templatler til et større PCR produkt ved hjelp av samme prinsipp som ble forklart i avsnittet over. Ønsker man å sette sammen flere enn to sekvenser kan prinsippet anvendes flere ganger. For å få til dette må en del av sekvensen fra et templat overlappe med den andre sekvensen via en forlengelse på 5'enden. (Higuchi, Krummel, & Saiki, 1988). I figur 3.1 er prinsippet for ”overlap extension PCR” illustrert.



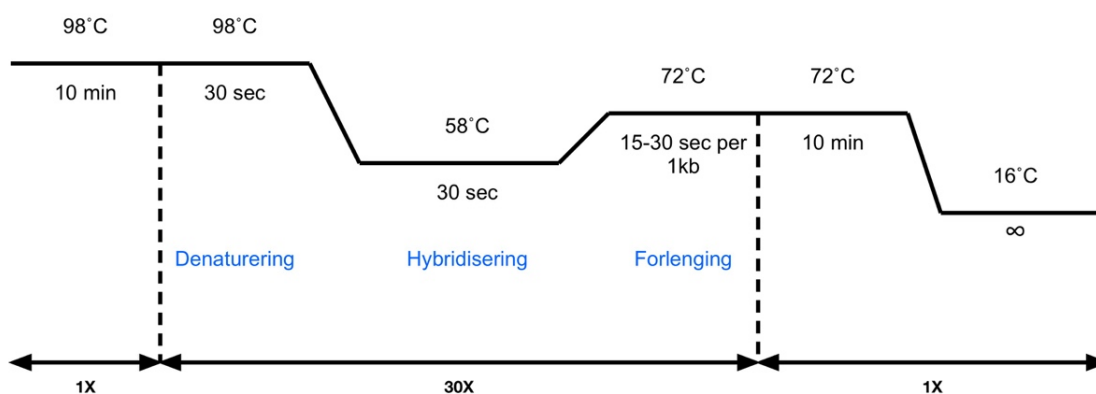
Figur 3.1: Prinsippet for ”overlap extension PCR”. Det grønne området viser overlappen på primerne som tilslutt setter sammen de to PCR-produktene. 1. PCR er de to første PCR rundene som kjøres for å oppformere de ønskede fragmentene. Disse to fragmentene brukes som templat i 2. PCR.

3.6.1.1 Protokoll for PCR med Phusion® DNA-polymerase

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

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
10 µl 5X Phusion® HF-buffer	1x
1 µl dNTP 10mM	200 µM
2,5 µl forward primer (10 µM)	0,5 µM
2,5 µl reverse primer (10 µM)	0,5 µM
x µl templat DNA	< 250 ng
0,30 µl Phusion® DNA polymerase	
x µl MQ-vann	til sluttvolum 50 µl
Totalt volum	50 µl

2. I figur 3.2 vises PCR-programmet som ble brukt for amplifisering av DNA med Phusion® DNA-polymerase. Forlengingstiden avhengte av størrelsen på produktet. Det ble beregnet ca. 30 sekunder per 1kb.



Figur 3.2: Phusion® PCR program. Figuren viser PCR-programmet som ble kjørt med Phusion® DNA-polymerase med volum 50 µl. Forlengingstiden avhengte av størrelsen på PCR-produktet.

Touchdown PCR ble brukt hvis produkter var vanskelig å amplifisere eller sette sammen ved vanlig PCR-reaksjon. Under en touchdown PCR starter syklusen med en høy hybridiseringstemperatur som avtar for hver nye syklus (Korbie & Mattick, 2008). I denne oppgaven ble det først kjørt 5 sykler med en hybridiseringstemperatur på 58°C, deretter 5 sykler med en hybridiseringstemperatur på 55°C og tilslutt 30 sykler med en hybridiseringstemperatur på 52°C.

3.6.1.2 Protokoll for PCR med RedTaq-polymerase

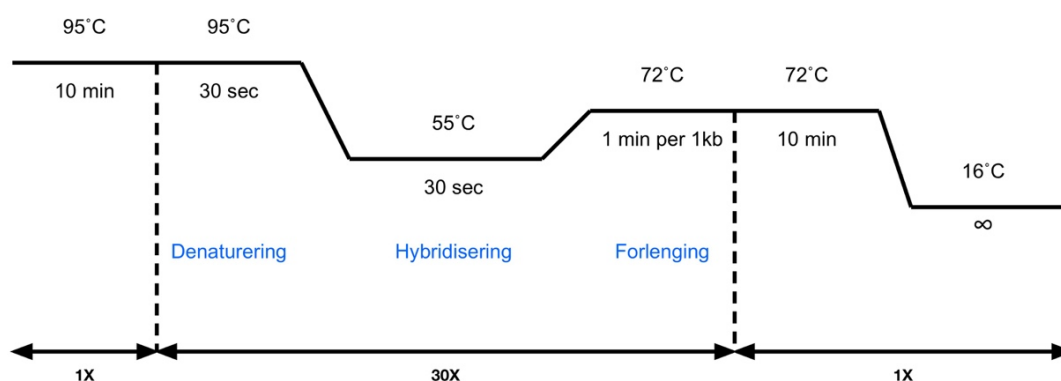
1. RedTaq-polymerase ble benyttet for å verifisere transformaten. Følgende reagenser ble blandet i et PCR- rør:

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
5 µl RedTaq mix*	
0,2 µl forward primer (10 µM)	0,2 µM
0,2 µl reverse primer (10 µM)	0,2 µM
4,6 µl MQ-vann	til sluttvolum 10µl
Totalt volum	10 µl

*Inneholder buffer, polymerase, nukleotider og loading dye.

2. Kolonier ble plukket fra agarskåler med en steril tannpirker, og dyppet oppi PCR-røret. Tannpirkeren ble deretter overført til et rør med kulturmedium med antibiotika for oppdyrking. Dette ble gjort for både *S. pneumoniae* og *E. coli*.

3. I figur 3.3 vises PCR-programmet for verifisering av transformanter med RedTaq-polymerase. Forlengingstiden avhenge av størrelsen til PCR-produktet. Det ble beregnet ca. 1 minutt per 1kb.



Figur 3.3: RedTaq - PCR program. Figuren viser PCR-programmet som ble kjørt for å verifisere transformanter med RedTaq-polymerase med volum 10µl. Forlengingstiden avhenge av størrelsen på PCR-produktet.

3.6.2 Isolering av genomisk DNA

Genomisk DNA ble isolert fra *S. pneumoniae* og brukt som templat DNA i PCR-amplifiseringer.

1. Stammen *S. pneumoniae* D39 OD₆₀₀ ~ 0,4 ble fortynnet 100 ganger i 10 ml C+Y medium. Stammen ble så dyrket til en OD ~ 0,4 – 0,5 (midt-eksponentiell fase).
2. Kulturen ble sentrifugert i 10 minutter på 4000 x g.

Metoder

3. Pelleten ble resuspendert i 800 μ l Nuclei Lysis solution (Promega®), 4 μ l 10% SDS, 20 μ l 1% deoxycholate (DOC) og 16 μ l 5 mg/ml RNase A før det ble overført til et 2 ml eppendorfrør. DOC induserer det lytiske enzymet LytA som vil føre til autolysering av cellene, dermed vil SDS kunne løse opp cellemembranen. RNase A degraderer RNA slik at det kun er DNA vi sitter igjen med til slutt.
4. Kulturen ble inkubert på 37°C i 20 minutter for å lysere cellene.
5. Videre ble kulturen inkubert på 80°C i 5 minutter. Deretter ble de inkubert 10 minutter på 37°C før de ble avkjølt til romtemperatur.
6. 250 μ l Protein Precipitation solution (Promega®) ble tilsatt de lyserte cellene og dette ble vortexet i 20 sekunder for å blande løsningen med de lyserte cellene. Løsningen skal nå ha en melkeaktig farge fordi proteinene faller ut av løsningen.
7. Løsningen ble inkubert på is i 20 minutter før den ble sentrifugert på 14 000 x g i 10 minutter.
8. Supernatanten som inneholder DNA ble overført til et nytt 2 ml eppendorfrør og ble tilsatt 800 μ l isopropanol for å felle ut DNA. Dette ble blandet forsiktig til trådlignende masse av DNA ble synlig.
9. Løsningen ble sentrifugert i 10 minutter på 14 000 x g.
10. Supernatanten ble helt ut og 600 μ l romtemperert 70% etanol ble tilsatt for å vaske pelleten. Røret ble vendt flere ganger.
11. Løsningen ble sentrifugert 14 000 x g i 5 minutter.
12. Etanolen ble helt av og restene ble pipettert ut før røret ble lufttørket i varmeskap på 37°C i 10 minutter.
13. 100 μ l vann ble tilsatt, og røret ble plassert i et varmebad på 65°C i 15 minutter for å rehydrere DNAet. Løsningen ble blandet ved å banke lett på røret periodevis.
14. Løsningen som inneholder DNA ble overført til en nytt eppendorfrør og oppbevart ved -20°C.

3.6.3 Agarosegelelektroforese

Agarose gelelektroforese brukes for å separere DNA. Agarose er et polysakkarid som danner heliske strukturer (porer). En høyere konsentrasjon av agarose vil gi mindre porestørrelse, mens en lavere konsentrasjon av agarose vil gi en større porestørrelse (P. Y. Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012). I en gelelektroforese vil de negativt ladede DNA-molekylene vandre mot den positive polen når agarosegelen utsettes for elektrisitet. Større molekyler har vanskeligere for å

trengte gjennom porene og vil derfor vandre saktere enn de mindre molekylene (Mathews, Van Holde, Appling, & Anthony-Cahill, 2013). peqGREEN (Saveen) binder til DNA og tilsettes derfor i agarosen for å kunne se DNAet under UV-belysning, da det vil fluorescere.

Tillagning av 1% agarose til gelelektroforese:

1. Til 300 ml 1xTAE buffer ble det tilsatt 3 g agarose. Dette ble varmet i mikrobølgeovn til agarosen var løst opp.
2. 15 µl peqGREEN ble tilsatt per 300ml.
3. Agarosen ble helt over i støpekar med brønnkammer av ønsket størrelse.
4. Da gelen var stivnet ble den overført til et elektroforesekammer og dekket med 1xTAE buffer.
5. 5 µl 1 kb DNA Ladder (BioNordika®) ble tilsatt som størrelsesmarkør. Loading dye ble tilsatt prøvene før de ble applisert i brønnene.
6. Elektroforesen ble gjennomført ved 90V.
7. DNA ble visualisert under UV-lys i en Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad)

3.6.4 Rensing av DNA fragmenter fra agarosegel

Til rensing av PCR-produkter etter separasjon på agarosegel ble NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel) kitet benyttet. Prosedyren som ble benyttet er som følger:

1. Ønskede fragmenter ble kuttet ut fra gelen med skalpell og plassert i eppendorfrør.
2. For hver 100 mg agarosegel ble 200 µl Buffer NTI tilsatt og inkubert i vannbad på 55°C til alle gelrester var løst opp. NTI brukes for å fjerne rester av nukleotider, primere og polymerase fra PCR reaksjonen.
3. Prøven ble overført til en NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Column med et 2 ml oppsamlingsrør før det ble sentrifugert i 30 sekunder på 11,000 x g.
4. 700 µl Buffer NT3 ble tilsatt, og prøven ble igjen sentrifugert i 30 sekunder på 11,000 x g. I dette steget vil DNA binde seg til Si-OH grupper i silica membranen, og dermed bli igjen i kolonnen når NTI bufferen vaskes vekk.
5. Prøven sentrifugeres i 1 minutt på 11,000 x g for å fjerne gjenværende NT3 buffer fordi den inneholder etanol som kan inhibere enzymatiske reaksjoner.

Metoder

6. Kolonnen ble overført til et eppendorfrør og det ble tilsatt 15-30 μ l Buffer NE for å eluere DNA. Dette stod 1 minutt på romtemperatur før røret ble sentrifugert i 1 minutt på 11,000 x g.

Ved rensing av DNA fragmenter fra løsning ble samme kit benyttet med en noe modifisert protokoll. Buffer NT1 ble tilsatt direkte til DNA løsningen og blandet før prøvene ble satt på kolonnen. Steg 3-6 ble deretter utført på samme måte som beskrevet over. Etter rensing ble DNA konsentrasjonen målt på NanoDrop 2000.

3.6.5 Rensing av plasmid

Til rensing av plasmid DNA fra *E. coli* ble E.Z.N.A® Plasmid DNA Kit II benyttet. Før rensing ble det satt opp en overnatt kultur på 1 – 5 ml.

1. Kulturen ble sentrifugert 8000 x g i 2 minutter.
2. Pelleten ble resuspendert i 250 μ l Solution I blandet med RNase A. Prøven ble vortexet før løsningen ble overført til et nytt eppendorfrør.
3. 250 μ l Solution II ble tilsatt før røret ble blandet til et klart lysat.
4. 350 μ l Solution III ble tilsatt. Innholdet ble blandet frem til et hvitt presipitat ble dannet. Dette ble sentrifugert på 16 000 x g i 10 minutter.
5. Supernatanten ble overført til en HiBind® DNA mini column med et 2 ml oppsamlingsrør.
6. Videre ble 500 μ l HBC Buffer fortynnet med isopropanol tilsatt før prøven ble sentrifugert 16 000 x g i 1 minutt. Filtratet ble kastet.
7. 700 μ l DNA Wash Buffer fortynnet med etanol ble tilsatt og sentrifugert 16 000 x g i 30 sekunder. Filtratet ble kastet. Dette steget ble gjentatt for et ekstra vasketrinn.
8. Den tomme HiBind® DNA mini column ble sentrifugert 16 000 x g i 2 minutter for å tørke kolonnen.
9. Kolonnen ble overført til et nytt eppendorfrør og det ble tilsatt 30 – 100 μ l Elution Buffer. Dette stod 1 min på romtemperatur før det ble sentrifugert i 1 minutt på 16 000 x g.

Etter rensing ble plasmid DNA konsentrasjonen målt på NanoDrop 2000.

3.6.6 Transformasjon av *S. pneumoniae*

S. pneumoniae er i stand til å ta opp extracellulært DNA ved naturlig transformasjon, og denne egenskapen ble benyttet for å lage mutanter i dette arbeidet. Kompetente pneumokokker inkorporer extracellulært DNA i genomet ved hjelp av homolog rekombinasjon. Induksjon av denne såkalte kompetente tilstanden oppnås ved å tilsette CSP til vekstmediet. Alle stammer som ble brukt i dette arbeidet var induserbare med CSP-1.

Før transformasjon av *S. pneumoniae* ble det laget pre-kompetente celler (Tc celler). De pre-kompetente cellene ble laget ved at ønskede stammer ble dyrket i 4 ml C+Y medium på 37°C til en OD ~ 0,11. Deretter ble 1 ml av kulturen overført til et nytt eppendorfrør og sentrifugert i 2 minutter på 8000 x g før pelleten ble resuspendert i 100 µl C+Y medium med 14,5 % glyserol. Cellene ble oppbevart ved -80°C.

Ved transformasjon ble et rør med pre-kompetente celler tint, og tilsatt 900 µl C+Y medium (uten HCl) og CSP-1 til en sluttkonsentrasjon på 2 µg/ml. Cellene ble deretter inkubert på 37°C i 12 minutter for aktivering av kompetanse. Videre ble 100 µl av cellene overført til nye eppendorfrør og DNA som skulle transformeres ble tilsatt. Kontroll uten DNA ble også inkludert. Cellene ble inkubert ved 30°C i 20 minutter som er optimal temperatur for opptak av DNA. Deretter ble 900 µl C+Y medium (med 2% HCl) tilsatt, og røret ble inkubert på 37°C i 1 -1,5 time for rekombinasjon av DNA slik at cellen kan uttrykke antibiotikaresistensgenene som ble transformert inn. Ønsket volum (10-100 µl) av transformasjonsreaksjonen ble så platet ut på Todd Hewitt (TH) agar med passende antibiotikum før det ble inkubert på 37°C over natt i et anaerobt miljø. *S. pneumoniae* kan transformeres med både PCR- produkter og plasmider, så lenge de inneholder homologe sekvenser som kan rekombineres inn i genomet, og begge deler ble benyttet i denne oppgaven.

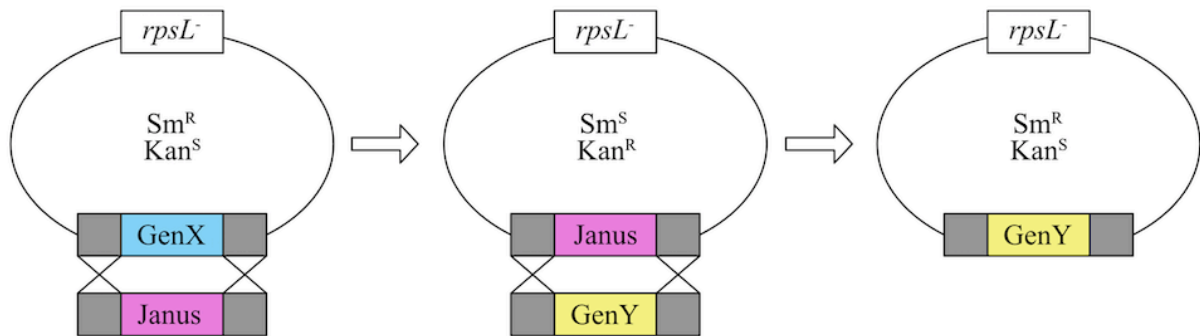
Negativ seleksjon ved bruk av Januskassetten

Januskassetten kan brukes i en to-steps transformasjon for å lage *S. pneumoniae* mutanter uten å introdusere en ny antibiotikaresistens markør (Figur 3.4). Januskassetten er en 1,3 kb stor kassett som inneholder en kanamycinresistens markør (Kan^R) og en dominant streptomycinsensitivitet allel av genet *rpsL* (Sm^S) (Sung, Li, Claverys, & Morrison, 2001). For å kunne bruke Januskassetten til negativ seleksjon må utgangsstammen være resistent mot streptomycin (Sm^R) og sensitiv mot kanamycin (Kan^S). Streptomycinresistens kan oppstå

Metoder

spontant hos bakterier, og skyldes en mutasjon i genet *rpsL* (Salles, Creancier, Claverys, & Mejean, 1992). Stammene som ble benyttet til transformasjon med Januskassetten i denne oppgaven hadde introdusert et streptomycinresistent *rpsL* allel.

I det første steget i to-steps transformasjonen blir Januskassetten med flankerende områder nedstrøms og oppstrøms for målgenet transformert inn i en Sm^R – stamme som erverver fenotypen Kan^R og Sm^S . I den andre transformasjonen blir Januskassetten erstattet med donor DNA ved homolog rekombinasjon, og gjenoppretter fenotypen Kan^S og Sm^R (negativ seleksjon) (Sung et al., 2001). Janus systemet ble benyttet for konstruksjon av mutanter i dette arbeidet og mutantene ble verifisert ved PCR og sekvensering.



Figur 3.4: Negativ seleksjon ved bruk av Januskassetten. Januskassetten sammen med flankerende områder nedstrøms og oppstrøms for målgenet transformeres inn i en streptomycin resistent (Sm^R) og kanamycin sensitiv (Kan^S) stamme. Stammen erverver fenotypen streptomycin sensitiv (Sm^S) og kanamycin resistent (Kan^R). Januskassetten blir så erstattet med donor DNA ved homolog rekombinasjon, og gjenoppretter fenotypen Kan^S og Sm^R . Figuren er modifisert etter (Fernebrot, 2007).

3.6.7 Transformasjon av *E. coli*

Til forskjell fra *S. pneumoniae*, kan ikke *E. coli* ta opp DNA ved naturlig transformasjon. I stedet ble derfor kjemisk behandling av cellene med $CaCl_2$ og varmesjokk benyttet.

I likhet med transformasjon av *S. pneumoniae* må dette også her bli laget kompetente celler før selve transformasjonen. Det ble satt opp en over-natt kultur av *E. coli* som ble fortyntet 1/1000 i 100 ml LB-medium. Kulturen vokste til en $OD \sim 0,2 - 0,4$. Kulturen ble deretter satt på is i 15 – 20 minutter, og cellene ble holdt kalde i alle videre trinn. Etter 15 – 20 minutter ble kulturen sentrifugert $5000 \times g$ i 5 minutter. Supernatanten ble helt av og resuspendert i 50 ml 0,1 M $CaCl_2$ for å svekke celledmembranen. Kulturen ble deretter holdt på is i 1 – 2 timer. Cellene ble

så sentrifugert 5000 x g i 5 minutter og resuspendert i 5 ml 0,1 M CaCl₂. Tilslutt ble cellene tilsatt glyserol til en sluttkonsentrasjon på 15% og holdt på is i 30 minutter. Cellene ble oppbevart ved -80°C.

Ved transformasjon ble et rør med kompetente *E. coli* celler tint. Per transformasjon brukes 50 µl kompetente *E. coli* celler. Cellene ble tilsatt 10 µl av rensset ligeringsreaksjon (se avsnitt 3.6.8), og ble deretter satt på is i 30 minutter. Etter 30 minutter på is ble cellene utsatt for et varmesjokk (heat shock): Cellene ble satt på 42°C i 45 – 50 sekunder for å åpne porer i cellemembranen slik at DNA kan tas opp. Raskt etter at cellene ble usatt for varmesjokket ble 250 µl LB- eller SOC medium tilsatt, før røret ble inkubert i varmeskap på 37°C med risting i én time. Kulturen ble så platet ut på LB-skåler med passende antibiotikum og med ønsket volum. Skålene ble inkubert på 37°C over natt.

3.6.8 Kloning ved bruk av restriksjonsenzymmer og ligering

Plasmidene pKB01, pCG6 og pMK17 ble brukt som vektorer i denne oppgaven. Dette er plasmider som vil integrere i lokuset *bgaA* i genomet hos *S. pneumoniae*. Plasmidet pCG6 ble brukt for å lage en N-terminal fusjon av *gfp* til CAAX-genene, mens pMK17 ble brukt for å lage en C-terminal fusjon av *gfp* til de CAAX-genene som ikke ga et godt signal med en N-terminal GFP. Plasmidet pKB01 ble brukt for å kunstig uttrykke *nanA*. Alle disse plasmidene inneholder en sink-promotor som gjør at man kan indusere ekspresjon ved hjelp av ZnCl₂ (Eberhardt, Wu, Errington, Vollmer, & Veening, 2009).

Den valgte plasmidvektoren og PCR-fragmentet med riktige kuttsetter ble kuttet med restriksjonsenzymmer slik det vises i tabell 3.1. Dette ble inkubert på 37°C i 30 minutter for High-Fidelity (HF®) restriksjonsenzymmer og én time for ikke-HF restriksjonsenzymmer.

Tabell 3.1: Restriksjonskuttingsreaksjon

Restriksjonskutting av plasmid	Restriksjonskutting av PCR-fragment
2 µl Cutsmart buffer	2 µl Cutsmart buffer
1 µl av hvert restriksjonsenzym	1 µl av hvert restriksjonsenzym
10 µl plasmid	16 µl PCR-fragment
6 µl vann	

Etter kutting ble plasmidet og PCR-fragmentet separert på en 1% agarosegel. Plasmid og PCR-fragment ble kuttet ut av gelen og isolert ved bruk av PCR Clean-up (Machery-Nagel) kitet.

Metoder

DNA konsentrasjonen ble målt ved bruk av NanoDrop 2000. Plasmidet og PCR-fragmentet ble deretter ligert slik det vises i tabell 3.2. Kontroll med kun kuttet plasmid ble også satt opp. Ligeringen ble inkubert over natt på 16°C.

Tabell 3.2: Ligeringsreaksjon

	Volum
Kuttet plasmid	3 µl
Kuttet PCR-fragment	10 µl
T4 ligase buffer	2 µl
T4 ligase	1 µl
Vann	4 µl

3.7 Kontrukter/mutanter

Beskrivelse av stammer er gitt i vedlegg A og primersekvenser er gitt i vedlegg B.

3.7.1 Konstruksjon av *spd_0817-gfp* uttrykt i eget lokus

Det ble laget en C-terminal *gfp*-fusjon til genet *spd_0817* for å undersøke lokaliseringen til dette CAAX-proteinet når det ble uttrykt fra eget lokus. I denne oppgaven ble det benyttet en såkalt monomerisk superfolder GFP, m(sf)GFP, som er en versjon av GFP som inneholder mutasjoner som gjør at den folder seg raskt og som ikke dimeriserer. *M(sf)gfp*-genet (heretter kun kalt *gfp*) er i tillegg kodonoptimalisert for *S. pneumoniae*, og har tidligere vist seg å være svært godt egnet til å analysere proteinlokalisering i *S. pneumoniae* D39 (Overkamp et al., 2013; van Raaphorst, Kjos, & Veening, 2017). For alle fusjoner ble det benyttet en linker-sekvens mellom *gfp* og CAAX-genene (Eberhardt et al., 2009).

Primerparene mk137/CSH5 og CSH6/mk140 ble brukt for å amplifisere henholdsvis oppstrøms for *spd_0817* + genet, og nedstrøms for *spd_0817* med gDNA fra D39 som templat. Monomerisk superfolder GFP (*gfp*) ble amplifisert fra plasmidet pMK17 ved bruk av primerparet CSH3/CSH4. PCR fragmentene ble fusert ved hjelp av overlapp PCR med de ytre primerne mk137 og mk140, slik at *spd_0817* og *gfp* ble fusert til en leseramme. PCR-produktet ble transformert inn i stammen SPMK48. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne CSH3 og mk140 og sekvensert.

3.7.2 Konstruksjon av *gfp*-CAAX fusjoner ved hjelp av det integrative plasmidet pCG6

Det ble laget N-terminale *gfp*-CAAX fusjoner av alle CAAX-genene ved bruk av plasmidet pCG6. pCG6 inneholder homologe sekvenser som gjør at konstruktene integreres ektopisk i *bgaA* lokuset. CAAX-genene fusert N-terminalt til *gfp* blir da integrert som en ekstra kopi i genomet. Genene *spd_0817*, *spd_0268*, *spd_0172*, *spd_0146*, *spd_0147*, *spd_1944*, *spd_1180* og *spd_1097* ble amplifisert fra stammen D39 med henholdsvis primerparene CSH19/CSH20, CSH31/CSH32, CSH33/CSH34, CSH35/CSH36, CSH37/CSH38, CSH39/CSH40, CSH41/CSH42 og CSH43/CSH44. Alle genfragmentene (unntatt *spd_0147*) og plasmidet pCG6 ble kuttet med restriksjonsenzymene BamHI og NotI. *spd_0147* ble kuttet med restriksjonsenzymene XbaI og NotI. pCG6 ble kuttet med SpeI og NotI til ligering med *spd_0147*. XbaI og SpeI er kompatible restriksjonsseter. Ved å bruke disse restriksjonssetene blir CAAX-genene satt inn slik at de uttrykkes i samme leseramme som *gfp*. N-terminal *gfp* fusjon til CAAX genene *spd_0473* og *spd_0475* ble laget av Morten Kjos før oppgaven ble påbegynt.

Plasmid og CAAX-genene ble ligert og transformert inn i *E. coli*. Konstruktene ble verifisert ved PCR med primerne mk70 og mk71. Plasmid ble isolert og rensset fra de ulike *E. coli* stammene, som videre ble sekvensert og transformert inn i stammen *S. pneumoniae* D39. Korrekt konstrukt i *S. pneumoniae* ble verifisert ved PCR med primerne mk311 og mk312. For å uttrykke de ekstra kopiene ble det tilsatt 0,2 mM ZnCl₂ ved oppdyrking. ZnCl₂ vil indusere ekspresjon fra promotoren P_{zn}.

3.7.3 Konstruksjon av CAAX-*gfp* fusjoner ved hjelp av det integrative plasmidet pMK17

Det ble laget C-terminale fusjoner til *gfp* av genene *spd_0268*, *spd_0172*, *spd_0146* og *spd_0147* ved bruk av plasmidet pMK17 fordi disse genene ikke ga godt nok GFP signal med N-terminal *gfp* fusjon. Genene *spd_0268*, *spd_0172*, *spd_0146* og *spd_0147* ble amplifisert, henholdsvis, fra stammen D39 med primerparene CSH54/CSH55, CSH56/CSH57, CSH58/CSH59 og CSH60/CSH61. Alle genfragmentene ble kuttet med restriksjonsenzymene XbaI og NotI. Plasmidet ble kuttet med restriksjonsenzymene SpeI og NotI. Plasmidet ble ikke kuttet med XbaI fordi det er flere XbaI kuttseter i plasmidet, men SpeI og XbaI er kompatible.

Metoder

Plasmid og CAAX-genene ble ligert og transformert inn i *E. coli*. Plasmider med ligert konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne CSH54/mk71, CSH56/mk71, CSH58/mk71, CSH60/mk71 og CSH62/mk71 for henholdvis *spd_0268*, *spd_0172*, *spd_0146*, *spd_0147* og *spd_1180*. Plasmid ble isolert og rensert fra de ulike *E. coli* stammene, som videre ble sekvensert og transformert inn i stammen *S. pneumoniae* D39. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne CSH4 og mk78. For å uttrykke de ekstra kopiene med CAAX-*gfp* ble det tilsatt 0,2 mM ZnCl₂ ved oppdyrking. ZnCl₂ vil indusere ekspresjon fra promotoren P_{zn}.

3.7.4 Konstruksjon av *pspA*-Janus

Det ble laget stammer med en Janus-kassett nedstrøms for *pspA*-genet for å senere kunne lage konstruktene *pspA*-FLAG og *pspA*-*luc*. *pspA*-Janus ble amplifisert fra stammen SPMK92 ved å bruke primerne mk249 og mk252, og transformert inn i stammene D39, SPMK13, SPMK17, SPMK25, SPMK33, SPMK50, SPMK58, SPMK59, SPMK63, SPMK64 og SPMK78. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne mk249 og mk252 og sekvensert.

3.7.5 Konstruksjon av Δ *pspA*::Janus

Det ble laget en stamme hvor *pspA* ble byttet ut med en Januskassett. Primerparet CSH52/CSH53 ble brukt for å amplifisere området oppstrøms for *pspA*, og primerparet JanusF/mk252 ble brukt for å amplifisere Januskassetten + området nedstrøms for *pspA*. Stammen CSH1 ble brukt som templat. PCR fragmentene ble fusert ved hjelp av overlapp PCR med de ytre primerne CSH51 og mk252. PCR-produktet ble transformert inn i stammen SPMK13. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne janusF og mk252 og sekvensert.

3.7.6 Konstruksjon av *pspA*-FLAG

Stammer som uttrykker *pspA*-FLAG ble laget for å detektere PspA med Western blotting. *pspA*-FLAG konstruktet ble amplifisert fra stammen SPMK95 ved bruk av primerne mk249 og mk252, og transformert inn i stammene CSH2, CSH3 og CSH9 – CSH16 som inneholder en Januskassett nedstrøms for *pspA*. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne mk249 og mk252 og sekvensert.

3.7.7 Konstruksjon av *pspA-luc*

Stammer som uttrykker *pspA-luc* ble laget for å undersøke transkripsjonen av *pspA* ved bruk av et luciferase assay. *pspA-luc* konstruktet ble amplifisert fra stammen SPMK98 ved bruk av primerne mk249 og mk252, og transformert inn i stammene CSH2 og CSH3 som inneholder en Januskassett nedstrøms for *pspA*. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne mk249 og mk252 og sekvensert.

3.7.8 Konstruksjon av *pspA-gfp-cam^R*

Stammer hvor *pspA* er byttet ut med fusjonsgenet *pspA-gfp* ble laget for å undersøke lokaliseringen til PspA-proteinet med fluorescensmikroskopi. Konstruktet ble laget av Morten Kjos.

3.7.9 Konstruksjon av *pspC(leder)-pspA(mature)-gfp-cam^R*

Fra *pspA-gfp-cam^R* konstruktet ble det laget et nytt konstrukt hvor den vanlige ledersekvensen til PspA ble byttet ut med YSIRK-ledersekvensen til PspC. Dette ble gjort for å se om ledersekvensen bestemmer lokaliseringen av proteinet. Primerparet CSH45/CSH52 og CSH46/mk252 ble brukt for å amplifisere, henholdsvis, området oppstrøms for *pspA* og *pspA-gfp-cam^R* konstruktet med stammen 130 som templat. PCR fragmentene ble fusert ved hjelp av overlapp PCR med de ytre primerne CSH52 og mk252. PCR-produktet ble transformert inn i stammen CSH56 (SPMK13, men *pspA::janus*). Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne mk290 og mk252 og sekvensert.

3.7.10 Konstruksjon av *pspC-FLAG-kan^R*

Det ble laget et *pspC-FLAG-kan^R* konstrukt for å undersøke om CAAX-proteiner har noen innvirkning på sekresjonen av PspC. Det var ønskelig å undersøke dette fordi PspC har YSIRK motivet i sin ledersekvens. Primerparene CSH24/CSH22 og CSH30/CSH28 ble brukt for å amplifisere, henholdsvis, *pspC* og området nedstrøms for *pspC* med stammen D39 som templat. Kanamycinresistensgenet ble amplifisert fra stammen CSH26 ved bruk av primerparet CSH15/MK283. PCR fragmentene ble fusert ved hjelp av overlapp PCR med de ytre primerne CSH24 og CSH28. PCR-produktet ble transformert inn i stammene D39, SPMK13 og SPMK78. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne mk283 og CSH27 og sekvensert.

3.7.11 Konstruksjon av *pspC-gfp-cam^R*

Stammer hvor *pspC* er byttet ut med fusjonsgenet *pspC-gfp* ble for å undersøke lokaliseringen til PspC-proteinet med fluorescensmikroskopi. Konstruktet ble laget av Morten Kjos.

3.7.12 Konstruksjon av *nanA-FLAG-kan^R*

Et *nanA-FLAG-kan^R* konstrukt ble laget for å undersøke om CAAX-proteiner har noen innvirkning på sekresjonen av NanA. I likhet med PspC har NanA YSIRK motivet i sin ledersekvens. Primerparene CSH9/CSH10 og CSH14/CSH16 ble brukt for å amplifisere, henholdsvis, *nanA* og området nedstrøms for *nanA* med D39 som templat. Kanamycinresistensgenet ble amplifisert fra stammen mk450 ved bruk av primerparet CSH11/MK283. PCR fragmentene ble fusert ved hjelp av overlapp PCR med de ytre primerne CSH17 og CSH18 som ligger 100 basepar innenfor CSH9 og CSH14. PCR-produktet ble transformert inn i stammene D39, SPMK13 og SPMK78. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne CSH9 og mk283 og sekvensert.

3.7.13 Konstruksjon av *bga::P_{zn}-nanA-FLAG*

nanA-FLAG-kan^R konstruktet ble i tillegg satt inn i plasmidet pKB01 for å kunne overuttrykke det med sink-induksjon. *nanA-FLAG-kan^R* ble amplifisert fra stammen CSH26 ved bruk av primerparet CSH21 og CSH14. Plasmidet pKB01 og *nanA-FLAG-kan^R* ble kuttet med restriksjonsenzymene NotI og SpeI. Plasmidet og konstruktet ble ligert og transformert inn i *E. coli*. Plasmidet med ligert konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne CSH9 og mk71. Det ble isolert og rensset plasmid fra *E. coli* som videre ble transformert inn i stammene D39, SPMK13 og SPMK78. Korrekt konstrukt ble verifisert ved PCR med primerne mk311 og mk312.

Konstruktet vil integrere som en ekstra kopi i genomet på lokuset *bgaA*. For å få stammen til å uttrykke *nanA-FLAG* ble det tilsatt 0,2 mM ZnCl₂ ved oppdyrking. ZnCl₂ vil indusere ekspresjon fra promotoren P_{zn}.

3.7.14 Sekvensering

DNA sekvensering er prosessen hvor baserekkefølgen i DNA bestemmes. Under arbeidet med oppgaven ble DNA sendt til GATC Biotech for sekvensering. Dette ble gjort for å kontrollere at korrekt konstrukt ble satt inn i ønskede stammer. Det var sangersekvensering som ble benyttet.

Sanger sekvensering ble oppfunnet i 1977 av Frederick Sanger og hans kolleger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977). Til en sekvenseringsreaksjon tilsettes enkeltrådet DNA, primer, polymerase, deoksyribonukleotrifosfat (dNTP) og di-deoksyribonukleotrifosfat (ddNTP). ddNTP mangler en hydroksylgruppe (-OH) som kreves for å danne en fosfodiester binding mellom nukleotider, og dermed vil sekvensen stoppe når ddNTP blir satt inn. ddNTPene er i tillegg merket med et fluorokrom som detekteres i sekvensatoren, og dermed gjør det mulig å bestemme sekvensen til DNAet.

3.8 Luciferase assay

Luciferase er et enzym som katalyserer oksidasjonen av luciferin som resulterer i luminescens. Den kjemiske reaksjonen foregår i 2 trinn:

- luciferin + ATP \rightarrow luciferyl adenylate + PP_i
- luciferyl adenylate + O₂ \rightarrow oxyluciferin + AMP + lys

Det produseres lys fordi reaksjonen danner oxyluciferin i en eksitert tilstand. Når oxyluciferin går tilbake til sin grunntilstand frigjøres det et foton som vi detekterer som lys. På grunn av denne egenskapen brukes luciferase til å indirekte måle transkripsjonsraten til gener, da luminiscens er proporsjonal med transkripsjonsraten som gir oss et mål på transkripsjonsraten til *luc* genet (Baldwin, 1996).

Firefly (ildflue) luciferase genet, *luc*, ble satt inn nedstrøms for *pspA* i villtypen og i SPMK78, for å sammenligne transkripsjonen av *pspA* i disse to stammene. Celler med OD ~ 0,2 ble inokulert 1/1000 i C-medium. Cellene ble satt opp i 3 paralleller med 270 µl kultur og 30 µl luciferin (0,27 mg/ml), og kontroller uten luciferin ble satt opp. Luciferase aktiviteten ble målt direkte i vekstmedium parallelt med OD målinger på 37°C.

3.9 Generelle proteinteknikker

SDS-PAGE ble brukt for å analysere proteiner. De separerte proteinene ble enten farget med Coomassie blue eller overført til en membran for Western blot analyse.

3.9.1 SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) er den mest brukte teknologien for å separere proteiner. SDS denaturerer proteinene, slik at de separeres etter størrelse, ikke ladning. Proteinene vil vandre mot den positive polen når gelen utsettes for elektrisitet. Det er akrylamidkonsentrasjonen som bestemmer porestørrelsen i gelen. Polymerisering av akrylamid initieres ved å tilsette ammonium persulfate (APS) og basen *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED). En SDS-PAGE gel består av to geldeler; en "stacking gel" og en separeringsgel. "Stacking gelen" har en større porestørrelse (4% akrylamid) enn separeringsgelen fordi den skal konsentrere proteinprøven til et sterkt bånd før det vandrer ned i separeringsgelen (Walker, 1996).

Det tilsettes vanligvis en molekylvektstandard i en av brønnene for å bestemme proteinestørrelsen til prøven. For å se resultatet av proteingelen farges gelen med "Coomassie Blue".

Tillagning av 10% akrylamidgel til SDS-PAGE:

1. Glassplater ble vasket, montert i støperammer og sjekket for eventuelle lekkasjer.
2. Separeringsgelen ble laget ved å tilsette og blande disse løsningene i et begerglass:
 - 4,78 ml ddH₂O
 - 2,5 ml 1.5M Tris-HCL, pH 8,8
 - 0,1 ml 10% SDS
 - 2,5 ml 40% acrylamide+0,8% bis-acrylamide
 - 0,1 ml 10% APS
 - 0,005 ml TEMED
3. 3,2 ml av separasjonsgel-løsningen ble applisert mellom glassplatene og det ble fylt opp med dH₂O. Gelen stod ca. ~20 minutter til den var polymerisert.
4. Stackinggelen ble laget ved å tilsette og blande disse løsningene i et begerglass:
 - 3,15 ml ddH₂O
 - 1,25 ml 0,5M Tris-HCL, pH 6,8

- 0,05 ml 10% SDS
 - 0,5 ml 40% acrylamide+0,8% bis-acrylamide
 - 0,05 ml 10% APS
 - 0,005 ml TEMED
 - 0,05 ml bromfenolblå
5. Vannet ble helt av separasjonsgelen før glassplatene ble fylt opp med stackinggel-løsingen og brønnskammere ble satt i. Gelen stod ca. ~20 minutter til den var polymerisert.
 6. Glassplatene ble fjernet fra støperammen, og brønnskammerene ble tatt ut. Glassplatene med gelen ble satt i gelkammeret før det ble fylt opp med runningbuffer i det indre- og ytre bufferkammeret. Det indre bufferkammeret ble kontrollert for lekkasje.
 7. Ferdig preparerte prøver og en størrelsesstandard på 11 – 245 kDA (BioNordika®) ble applisert på gelen.
 8. 90 V strøm ble satt på til stackinggelen hadde migrert ned til separeringsgelen, deretter 200 V frem til blåfargen hadde migrert ut av gelen.
 9. Gelen som ikke skulle brukes til Western blot ble farget med Coomassie, og ble deretter avfarget.
 10. Gelen ble visualisert i en Azure Imager c400.

3.9.2 Western blot

Western blot er en teknikk som brukes for å detektere spesifikke proteiner fra en blanding av proteiner ved hjelp av antistoff. I det første trinnet blir proteiner separert etter størrelse ved bruk av SDS-PAGE. Deretter overføres proteinene i gelen til en membran (blotting) ved å bruke et elektrisk felt på overflaten av gelen som forårsaker at proteinene beveger seg ut av gelen og på membranen. For å unngå at antistoffer binder uspesifikt til membranen blir den blokket med enten 5% BSA eller med skummet melk. Etter blokkettrinnet tilsettes ulike antistoffer (indirekte deteksjon): et antistoff som er spesifikt til det ønskede proteinet (primært antistoff) og et antistoff som er spesifikt til det primære antistoffet (sekundært antistoff). Tilslutt detekteres antistoffkomplekset ved hjelp av kjemiluminiscens eller kromogent (Mahmood & Yang, 2012).

Blottettrinnet der proteinene i gelen overføres til membranen kan gjøres ved våt eller halvtørr overføring. I dette arbeidet ble elektroblot (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell) med halvtørr overføring benyttet. Det sekundære antistoffet som ble brukt i dette arbeidet var koblet

Metoder

til enzymet horseradish peroxidase (HRP) som katalyserer reaksjonen mellom luminol og hydrogenperoksid (kjemiluminiscens) som vil produsere lys ved 425 nm. Lyset som produseres tilsvarer posisjonen til proteinet av interesse. Signalet ble visualisert i en Azure Imager c400.

3.9.2.1 Protokoll for blotting

1. Én membran (Immun-blot®PVDF, BIO-RAD) og filterpapir (4 stk) ble klippet ut i en størrelse som passer gelen.
2. Membranen ble lagt ett minutt i metanol for aktivering. Deretter ble membranen vasket tre ganger i dH₂O. Etter dette ble membranen, filterpapirene og gelen plassert i kald transferbuffer.
3. To filterpapir ble plassert på anode platen (bunnplaten), etterfulgt av membranen, gelen og tilslutt de to siste filterpapirene. Det er viktig å unngå luftbobler mellom lagene for å oppnå optimal proteinoverføring. Katodeplaten (topplaten) ble så satt på.
4. Det ble blottet 15V i 1 time.
5. Membranen ble så lagt til blokkering i 1 time med 30 ml 5% skummet melk i TBS-T. Blokkering ble eventuelt gjort over natt på 4°C.

3.9.2.2 Protokoll for deteksjon

1. Melken ble helt av membranen, og vasket to ganger med TBS-T.
2. For FLAG-taggede proteiner ble 2,5 µl av antistoffet α-FLAG (Sigma Aldrich) tilsatt til 10 ml TBS-T, og for GFP-taggede proteiner ble 2,5 µl av antistoffet α-GFP (Thermo Fischer) tilsatt til 10 ml TBS-T. Begge antistoffene ble tilsatt 1:4000. Dette ble inkubert en time på ristebord.
3. Membranen ble vasket 3 x 10 minutter med TBS-T.
4. 10 ml TBS-T og 2,0 µl av det sekundære antistoffet α-Rabitt-HRP (Sigma Aldrich) (1:5000) ble tilsatt og inkubert en time på ristebord.
5. Membranen ble vasket 4 x 10 minutter med TBS-T.
6. Blottet ble fremkalt ved å tilsette 2,5 ml SuperSignal™ West Pico PLUS Stable Peroxide Solution og 2,5 ml SuperSignal™ West Pico PLUS Luminol/Enhancer Solution før det ble visualisert i en Azure Imager c400.

3.10 Prøvepreparering for analyse av proteinsekresjon

3.10.1 Hele celleekstrakt

Ønskede stammer ble dyrket i 4 ml C+Y medium til en OD ~ 0,3 – 0,4. For stammer som må indusere ekspresjon av det ønskede proteinet med sink ble 0,2 mM ZnCl₂ tilsatt. Kulturen ble overført til 2 ml eppendorfrør og sentrifugert 8000 x g i 5 minutter. 100 µl av supernatanten ble tatt ut i egne rør og pelleten ble tilsatt 100 µl SEDS lysisbuffer og inkubert på 37°C i 20 minutter.

Pellet og supernatant ble tilsatt 100 µl 2x SDS loading buffer før det ble kokt i 5 minutter. 10 µl prøve ble applisert i brønnene på en 10% SDS-gel.

3.10.2 Eluering av kolinbindende proteiner

Stammer ble dyrket til OD ~ 0,2 – 0,3 i 45 ml C+Y medium. For stammer med en *gfp*-fusjon ble de dyrket til OD ~ 0,2 i 4 ml C+Y medium. Kulturen ble sentrifugert 7000 x g i 10 minutter (8000 x g i 2 minutter for stammer med GFP-fusjon), og supernatanten ble helt av. Pelleten ble resuspendert i 2 % kolin og inkubert i romtemperatur i 15 minutter. Prøven ble så sentrifugert 8000 x g i 5 minutter. Supernatanten ble overført til nye rør. Pelleten ble resuspendert i 250 µl SEDS lysis buffer og satt i vannbad på 37°C i 20 minutter. Både supernatanten og pelleten ble tilsatt 100 µl 2x SDS loading buffer før prøvene ble kokt i 5 minutter. 10 µl prøve ble applisert i brønnene på en 10% SDS-gel.

3.10.3 Fraksjonering av supernatant, cellevegg og cellemembran

Stammer ble dyrket til OD ~ 0,4 i 30 ml C+Y medium uten BSA. Kulturen ble så sentrifugert 7000 x g i 10 min. Supernatant ble pipettert ut og sterilfiltrert med et 0,2 µm filter. For å oppkonsentrere proteiner i supernatanten, ble det utført ammoniumsulfatfelling ("salting out"). Dette ble gjort ved å tilsette 40% ammoniumsulfat til supernatanten. Dette ble løst opp og stod deretter på is i 30 minutter. Etter 30 minutter på is ble supernatanten sentrifugert i 30 minutter ved 20 000 x g. Supernatanten ble helt av, og pelleten ble resuspendert i 100 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. 50 µl av dette ble tatt ut til SDS-PAGE (Wingfield, 1998).

For isolering av cellevegg, ble pelleten fra 30 ml kulturen resuspendert og vasket i 30 ml 1xPBS. Løsningen ble sentrifugert og supernatanten ble pipettert ut. Videre ble pelleten resuspendert i

Metoder

200 μ l cell wall digestion buffer som inneholder mutanolysin. Mutanolysin er en N-acetylmuramidase som kutter β -(1,4)-glykosidbinding mellom NAG og NAM i celleveggen. Løsningen stod i vannbad på 37°C i 3 timer med risting av røret med jevne mellomrom. Deretter ble kulturen sentrifugert 14 000 x g i 10 minutter. I supernatanten finner vi nå celleveggfraksjonen. Supernatanten ble tatt av og resuspendert i 50 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Morsczeck et al., 2008).

For isolering av membranfraksjonen, ble den gjenværende pelleten resuspendert i 1 ml buffer bestående av 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5. Løsningen ble overført til fastpreprør med 0,5 g glasskuler ($\leq 106\mu$ m). Cellene ble lysert ved bruk av fastprep: 6.5 m/s, 20 sekunder. Dette ble gjentatt 3 ganger, og røret ble avkjølt mellom hver gang. Innholdet ble så overført til falconrør med 25 ml buffer bestående av 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5 før det ble sentrifugert 7000 x g i 10 minutter. 20 ml av supernatanten ble overført til et nytt sentrifugerør og ble deretter sentrifugert 1 time ved 25 000 x g. I supernatanten finner vi nå cytosol, og pelleten består av membranfraksjon. Supernatanten ble tatt ut, og pelleten ble resuspendert i 50 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Straume, Stamsås, Salehian, & Håvarstein, 2017).

For SDS-PAGE, ble alle fraksjonene tilsatt 50 μ l 2x SDS sample buffer før prøvene ble kokt i 5 minutter. 10 μ l av prøven ble applisert i brønnene på en 10% SDS-PAGE gel.

Resultater

Tabell 4.1: Stammer som ble brukt i oppgaven, samt beskrivelse av genene.

Stammenummer	Genotype	Beskrivelse
SPMK17	<i>Δspd_0268</i>	I operon med <i>spd_0267</i> (guanin-hypoxanthin permease)
SPMK25	<i>Δspd_0172</i>	I operon med <i>spd_0170</i> (<i>ruvA</i> , DNA-helikase) og <i>spd_0171</i> (<i>tag</i> , DNA-3-metyladenin glykosylase).
SPMK33	<i>Δspd_0146, Δspd_0147</i>	I operon med <i>spd_0145</i> og <i>spd_0148</i> .
SPMK50	<i>Δspd_1944</i>	I operon med <i>spd_1945, spd_1946, spd_1947</i> (transkripsjonsregulator), <i>spd_1948, spd_1949</i> og <i>spd_1950</i> (hisidyl tRNA syntetase).
SPMK58	<i>Δspd_1180</i>	**
SPMK59	<i>Δspd_0473 (blpY), Δspd_0475 (pncP)</i>	I operon med <i>spd_0474</i> .
SPMK63	<i>Δspd_1097</i>	Ikke i operon.
SPMK64	<i>Δspd_0817</i>	Ikke i operon.
SPMK78 (Δ CAAX)	Alle CAAX-gener deletert	

* Gener i samme operon er indikert som lokus-tag (*spd*-nummer). Dersom alternativt gennavn eller annoter var tilgjengelig via PneumoBrowse (<https://veeninglab.com/pneumobrows>) er dette også indikert.

** Ikke uttrykt i C+Y medium (Yuzenkova et al., 2014).

Tabellen viser at to av genene er monocistroniske, mens sju av CAAX-genene ligger i operon med andre gener. De fleste genene som ligger i operon med CAAX-gener koder for proteiner uten klar annotert funksjon. Unntakene er *spd_0268*, som ligger i operon med en antatt permease, og *spd_0172* som ligger i operon med en helikase (*ruvA*) og en glykosylase (*tag*). I tillegg er det tidligere kjent at *blpY* og *pncP* er lokalisert i *blp* genklusteret (Lux et al., 2007).

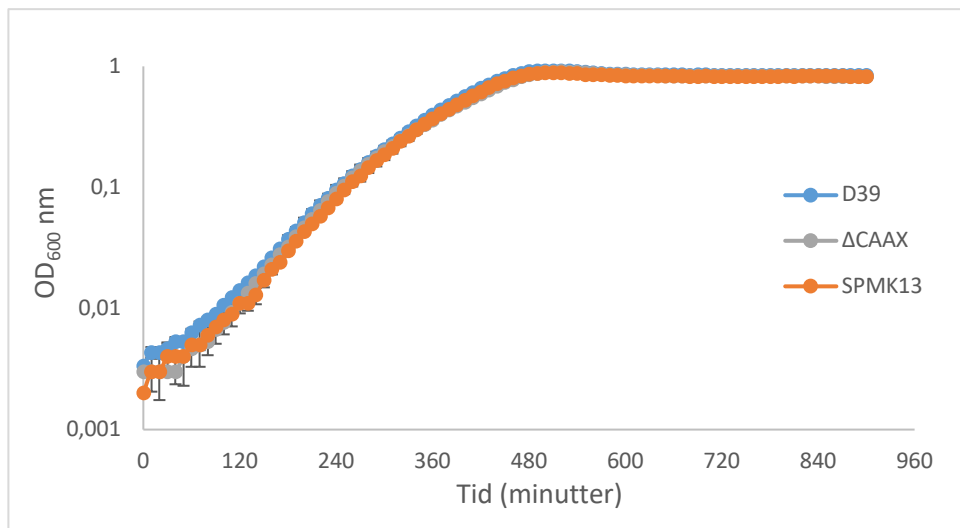
Villtypen som ble brukt i denne oppgaven var stammen *S. pneumoniae* D39. Fra D39 ble stammen SPMK13 laget ved å introdusere en punktmutasjon i genet *rpsL-1* som vil gi resistens mot streptomycin. Før arbeidet med oppgaven startet ble det, ved bruk av Januskassetten, laget en stamme hvor alle CAAX-genene er deletert. Denne fikk navnet SPMK78 og omtales heretter som Δ CAAX. Δ CAAX stammen ble genomsekvansert, og det ble ikke funnet noen sekundære mutasjoner.

For å innsikt i hvilke prosesser CAAX-proteinene kan være involvert i, ble det gjort ulike fenotypiske tester og karakterisering av disse proteinene og mutantene (kapittel 4.2 – 4.6). Videre ble det undersøkt mer spesifikt om CAAX-genene kan være involvert i sekresjon av virulensfaktorer (kapittel 4.7 – 4.9).

4.2 Vekstforsøk og test av antibiotikasensitivitet

Vekstforsøk

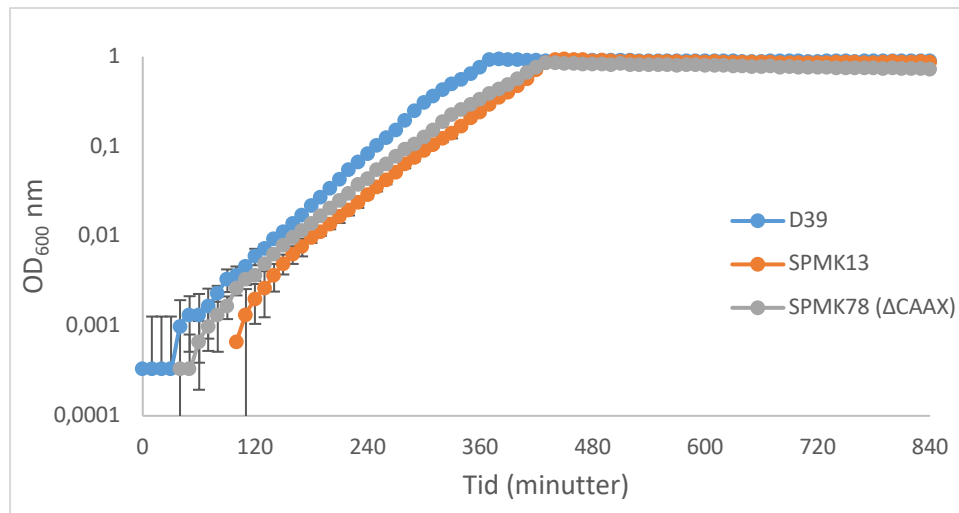
Det var mulig å lage delesjonsmutantene av CAAX-genene i *S. pneumoniae* D39. Dette viser at CAAX-genene ikke er essensielle for vekst under dyrking i C+Y medium. Fenotypene til mutantene ble likevel karakterisert for å se om CAAX-proteinene påvirker veksten til bakterien. Veksten til alle CAAX-mutantene inkludert villtypen og Δ CAAX ble først sammenlignet på 30°C, som tilsvarer temperaturen pneumokokker lever i når de koloniserer nasopharynx. Det er kun resultater fra stammene *S. pneumoniae* D39, SPMK13 og Δ CAAX som vises.



Figur 4.2: Vekstforsøk ved 30°C. Diagrammet viser en sammenligning av vekst hos villtypen(e) D39, SPMK13 og Δ CAAX ved 30°. Kultur ved OD₆₀₀ = 0,4 ble fortynnet 1000 ganger i C+Y medium, og OD₆₀₀ ble målt hvert 10. minutt i tilsammen 15 timer. Standardavvik som ble berget fra tre målinger vises.

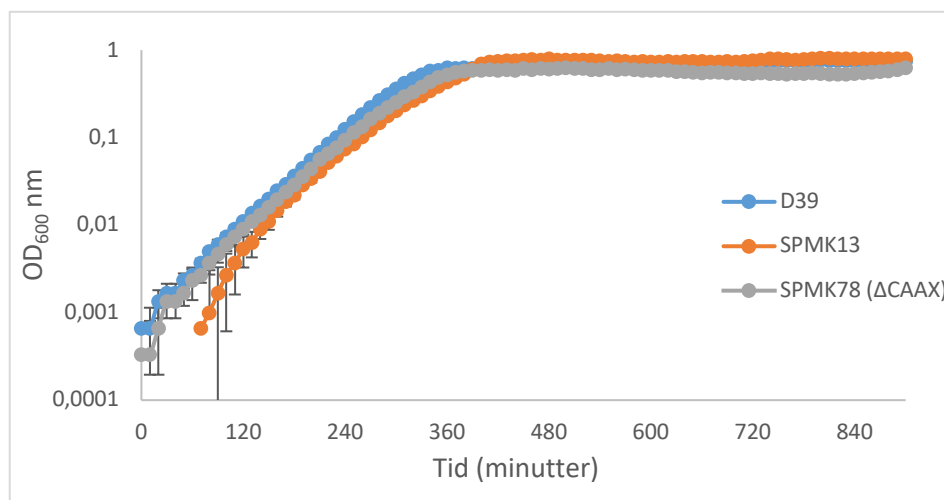
Det ble deretter gjort tilsvarende vekstforsøk ved 37°C, som er optimal veksttemperatur for pneumokokker.

Resultater



Figur 4.3: Vekstforsøk ved 37°. Diagrammet viser en sammenligning av vekst hos villtypen(e) D39, SPMK13 og SPMK78 (Δ CAAX) ved 37°C. Kultur ved OD₆₀₀ = 0,4 ble fortynnet 1000-ganger i C+Y medium, og OD₆₀₀ ble målt hvert 10. minutt i tilsammen 15 timer. Standardavvik som ble beregnet fra tre målinger vises.

Og tilslutt ble et tilsvarende vekstforsøk ved 42°C gjennomført, for å undersøke hvordan CAAX-mutantene vokser når de er stresset.



Figur 4.4: Vekstforsøk ved 42°. Diagrammet viser en sammenligning av vekst hos villtypen(e) D39, SPMK13 og SPMK78 (Δ CAAX) ved 42°C. Kultur ved OD₆₀₀ = 0,4 ble fortynnet 1000-ganger i C+Y medium, og OD₆₀₀ ble målt hvert 10. minutt i tilsammen 15 timer. Standardavvik som ble beregnet fra 3 målinger vises.

Det ble ikke observert noen klare forskjeller mellom villtypen(e) og CAAX-mutantene hverken ved 30°C (Figur 4.2) 37°C (Figur 4.3) eller ved 42°C (Figur 4.4), hvilket indikerer at CAAX-proteinene ikke påvirker vekst ved disse temperatuene i C+Y medium.

Test av antibiotikasensitivitet

Tidligere resultater tyder på at CAAX-gener er viktig for spesifikk selvimmunitet mot enkelte antimikrobielle peptider. Dette gjelder blant annet *blpY*, som trolig er et immunitetsgen mot pneumociner, selv om det er ukjent hvordan dette eventuelt fungerer (Lux et al., 2007). Derfor ble det undersøkt om CAAX-genene er viktig for generell beskyttelse mot antimikrobielle peptider. De bredspektrede antimikrobielle peptidene nisin (virker mot cellevegg) og bacitracin (virker mot cellevegg) ble valgt ut i denne oppgaven.

Det ble ikke observert forskjell i vekst for D39, SPMK13 og Δ CAAX i bakteriekulturer tilsatt ulike konsentrasjoner av bacitracin og nisin. Bakterieveksten ble hemmet ved en bacitracin konsentrasjon på 1,25 μ g/ml og ved en nisin konsentrasjon på 40 μ g/ml (Tabell 4.2).

Tabell 4.2: MIC (minimum inhiberende konsentrasjon) for *S. pneumoniae* stammene D39, SPMK13 og Δ CAAX som ble behandlet med bacitracin og nisin.

Stamme	MIC (μ g/ml) for:	
	Bacitracin	Nisin
D39	1,25	40
SPMK13	1,25	40
Δ CAAX	1,25	40

Det ble også undersøkt om det var forskjeller i sensitivitet mot andre typer antibiotika som har andre virkningsmekanismer, slik som penicilliner (virker mot cellevegg) og fluorokinoloner (påvirker DNA syntese), men ingen forskjeller ble observert (utført av Morten Kjos).

4. 3 Rapid ID 32 STREP test

CAAX-proteinene er membranproteiner, og da det tidligere har blitt observert at CAAX-kodene gener er lokalisert på genomet sammen med gener som er involvert i transport (Kjos et al., 2010) ble det derfor undersøkt om CAAX-proteinene kan være involvert i opptak av ulike sukre, ved å studere fermenteringsmønstre. Dette ble gjort ved å sammenligne villtypen og Δ CAAX ved bruk av en RAPID ID 32 STREP test som inneholder 32 ulike substrater. Det ble ikke observert noen forskjeller i fermentering av sukker hos villtypen eller Δ CAAX (resultatene vises ikke). I vedlegg C er det en oversikt over de 32 ulike substratene i testen.

4.4 Hemolyseforsøk

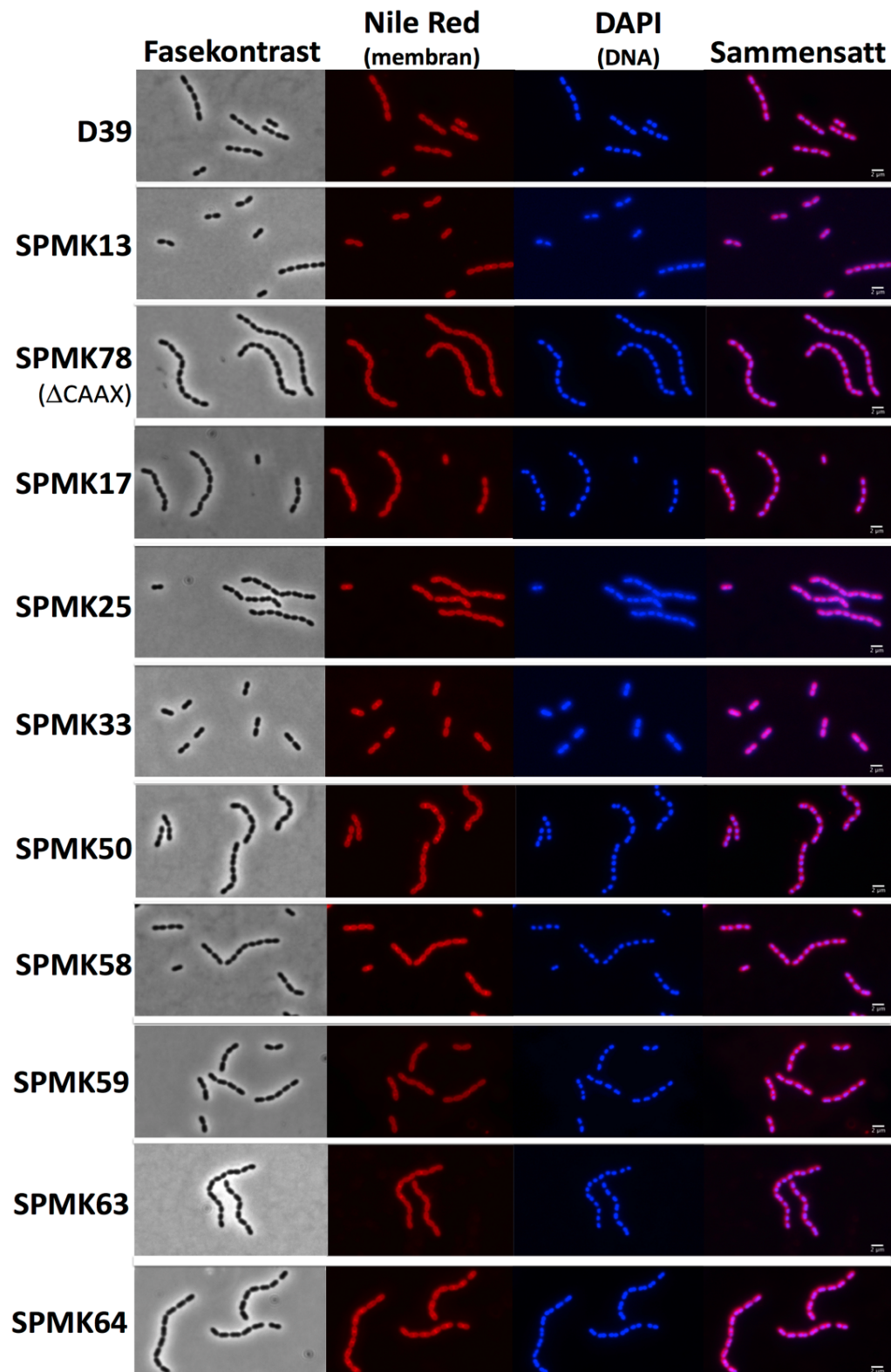
S. pneumoniae er α -hemolytisk, som forårsakes av at den produserer hydrogenperoksid som resulterer i oksidasjon av hemoglobin til grønn methemoglobin (Hardie & Whiley, 1995). I *Streptococcus agalactiae* (en gruppe B streptokokk), er det rapportert at CAAX-proteinet Abx1, påvirker hemolyse, trolig via en regulatorisk mekanisme (Firon et al., 2013). For å undersøke om CAAX-proteiner har noen innvirkning på pneumokokkens α -hemolytiske egenskaper ble villtypen(e) (D39 og SPMK13) og Δ CAAX dyrket på blodagar skåler. Stammene RH425 og Hermans 33 ble inkludert som kontroller.

Det ble ikke observert noen forskjeller mellom villtypen og Δ CAAX, og stammene var tydelig α -hemolytiske (resultatene vises ikke). Det er derfor ikke noe som tyder på at CAAX-proteiner er involvert i hemolyse i *S. pneumoniae* D39.

4.5 Single-cell analyser

Frankel et al (2010) viste at delesjoner i CAAX-gener i *S. aureus* forårsaket en tynnere septal cellevegg. For å undersøke om samme fenotype opptrer hos *S. pneumoniae* ble det utført fasekontrastmikroskopi av mutantene og villtypen for å sammenligne cellestørrelse og cellemorfologi. Dersom pneumokokkene har problemer med celledeling vil det kunne observeres ved abnormale cellemorfologier eller store forskjeller i cellelengder eller cellekjeding (Berg, Stamsås, Straume, & Håvarstein, 2013; Fleurie et al., 2014; Liu et al., 2017).

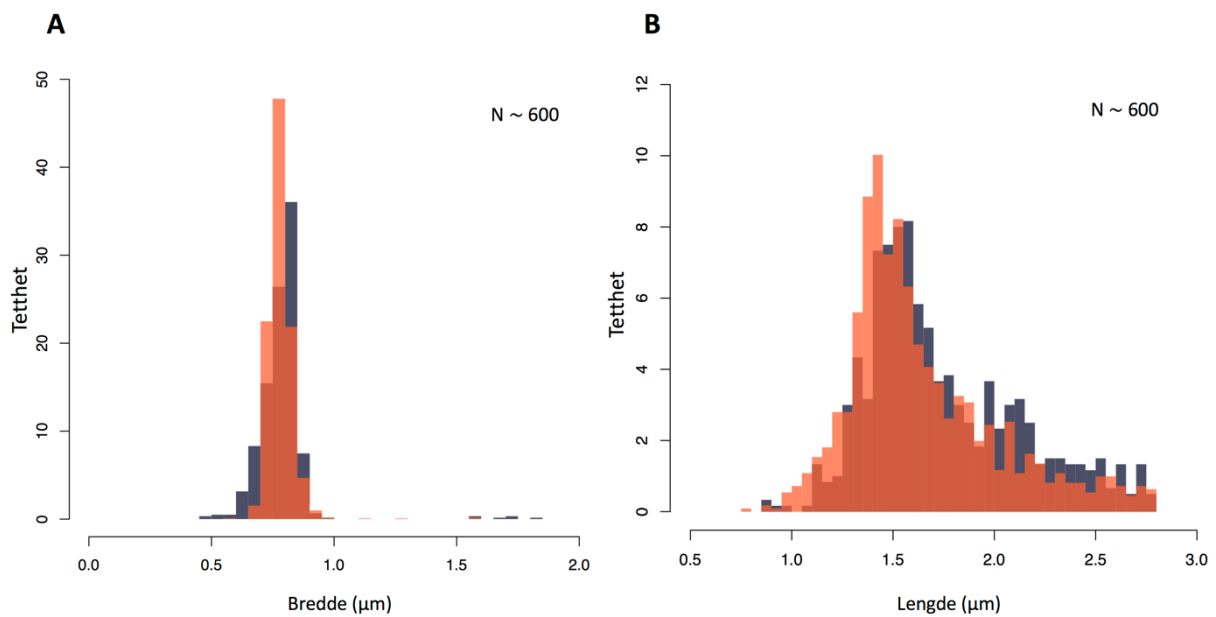
Pneumokokker opptrer normalt som diplokokker eller i kjeder. Mikroskopibildene viste at alle stammene har mulighet for å danne lange kjeder, men noen stammer hadde litt kortere kjeder enn andre (Figur 4.5). Både hos villtypen og Δ CAAX ble det funnet kjeder med opptil 30 bakterier, og heller ingen av enkeltmutantene viste store forskjeller i kjededannelse.



Figur 4.5: Fasekontrastmikroskopi av villtypen og alle CAAX-mutantene. Cellene ble farget med Nile Red (membranfarging) og DAPI (DNA farging). Bildene viser fasekontrast, Nile Red, DAPI og et sammensatt bilde av Nile Red og DAPI.

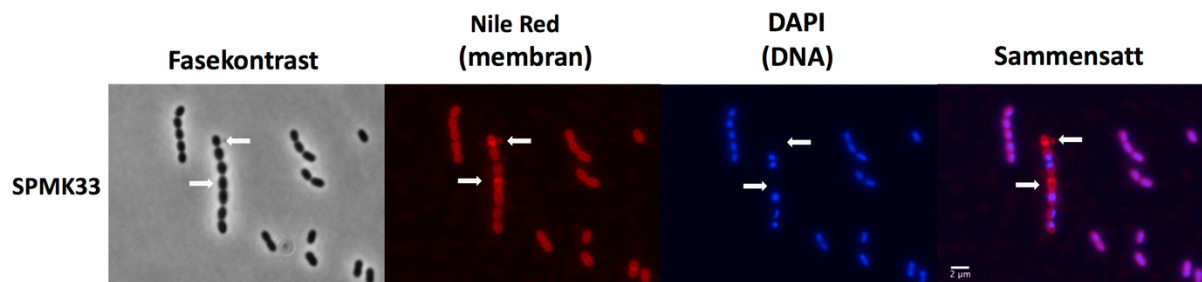
Resultater

Cellelengden og celledybden til villtypen og Δ CAAX ble sammenlignet ved eksponentiell vekst (OD \sim 0,2) for å se om CAAX-proteinene har noen defekt i celledeling. Cellene ble studert i mikroskopi og programmet ImageJ (Fiji) (Schindelin et al., 2012) med plugin MicrobeJ (Ducret et al., 2016) ble benyttet for å regne ut cellelengde- og bredde for >600 celler per stamme (Figur 4.6). Histogrammene viser at det ikke er noen klare forskjeller i cellelengde- og bredde hos villtypen og Δ CAAX (Figur 4.6). De øvrige delelesjonsstammene ble analysert på tilsvarende måte, men ingen av disse hadde klare forskjeller i cellelengde- eller bredde.



Figur 4.6: Histogram over morfologiske egenskaper (celleform) hos villtype *S. pneumoniae* D39 og Δ CAAX. A: Sammenligning av celledybde hos D39 og Δ CAAX. Grått søylediagram representerer D39, og oransje søylediagram representerer Δ CAAX. B: Sammenligning av cellelengde hos D39 og Δ CAAX. Grått søylediagram representerer D39, og oransje søylediagram representerer Δ CAAX.

De ulike stammene ble i tillegg til DAPI (fluorescerende DNA farge) også farget med Nile Red (fluorescerende fargestoff som binder cellemembranen). Ved å gjøre fluorescensmikroskopi, er det da mulig å finne ut om cellene har problemer med kromosomsegregeringen eller har abnormale membranstrukturer. Generelt ble det ikke observert klare ulikheter i cellemembranene til CAAX-mutantene (Figur 4.5). For tre av stammene, SPMK33 (Δ *spd_0146* og Δ *spd_0147*), SPMK64 (Δ *spd_0817*) og SPMK78 (Δ CAAX), ble det imidlertid observert noen få celler som manglet DNA. I figur 4.7 vises et eksempel for stammen SPMK33. Andelen celler med manglende DAPI-innfarging for disse stammene var imidlertid veldig lavt ($<0,5\%$, $n > 500$). Siden det ble observert i så få celler, ble ikke dette undersøkt noe nærmere.



Figur 4.7: Fasekontrastmikroskopi av SPMK33. Cellene ble farget med Nile Red (membranfarging) og DAPI (DNA farging). Figuren viser fasekontrast, Nile Red, DAPI og et sammensatt bilde av Nile Red og DAPI. SPMK33 hadde noen få celler som ikke hadde DNA som vist i figuren (se pilene).

4.6 Subcellulær lokalisering av CAAX-proteiner

Den subcellulære lokaliseringen av proteiner er viktig for hvilken funksjon de har. For eksempel vil noen membranproteiner og membranassosierte proteiner lokalisere jevnt rundt hele cellemembranen, noen vil lokalisere til cellepolene, mens andre lokaliserer til septum.

For å undersøke hvordan CAAX proteinene lokaliserer i cellemembranen ble CAAX-genene fusert til *gfp*, slik at disse fusjonsproteinene kunne observeres med fluorescensmikroskopi. Først ble det å laget en C-terminal fusjon av *gfp* direkte til *spd_0817* genet, men dette ga ingen signaler. Siden uttrykk av *spd_0817-gfp* fra eget lokus ikke var vellykket, ble det isteden laget konstrukter hvor fusjonsgenene uttrykkes med en induserbar promotor fra et ektopisk lokus (*bgaA*-lokuset). N-terminale fusjoner til *gfp* ble først laget for alle CAAX-proteinene. Dersom N-terminal *gfp*-fusjon ikke ga godt nok signal, ble C-terminal fusjon laget.

Ved hjelp av prediksjonsverktøyene Protter (Omasits, Ahrens, Müller, & Wollscheid, 2013), TMPred (Hofmann, 1993) og TMHMM (Krogh, Larsson, Von Heijne, & Sonnhammer, 2001) ble topologien til CAAX-proteinene i *S. pneumoniae* D39 predikert. Det er prediksjonene fra Protter som hovedsakelig har blitt brukt i oppgaven. Antall transmembrane helikser varierer fra fire (hos SPD_0475) til åtte (hos SPD_1097). I vedlegg D vises topologipredikasjonen til CAAX-proteinene.

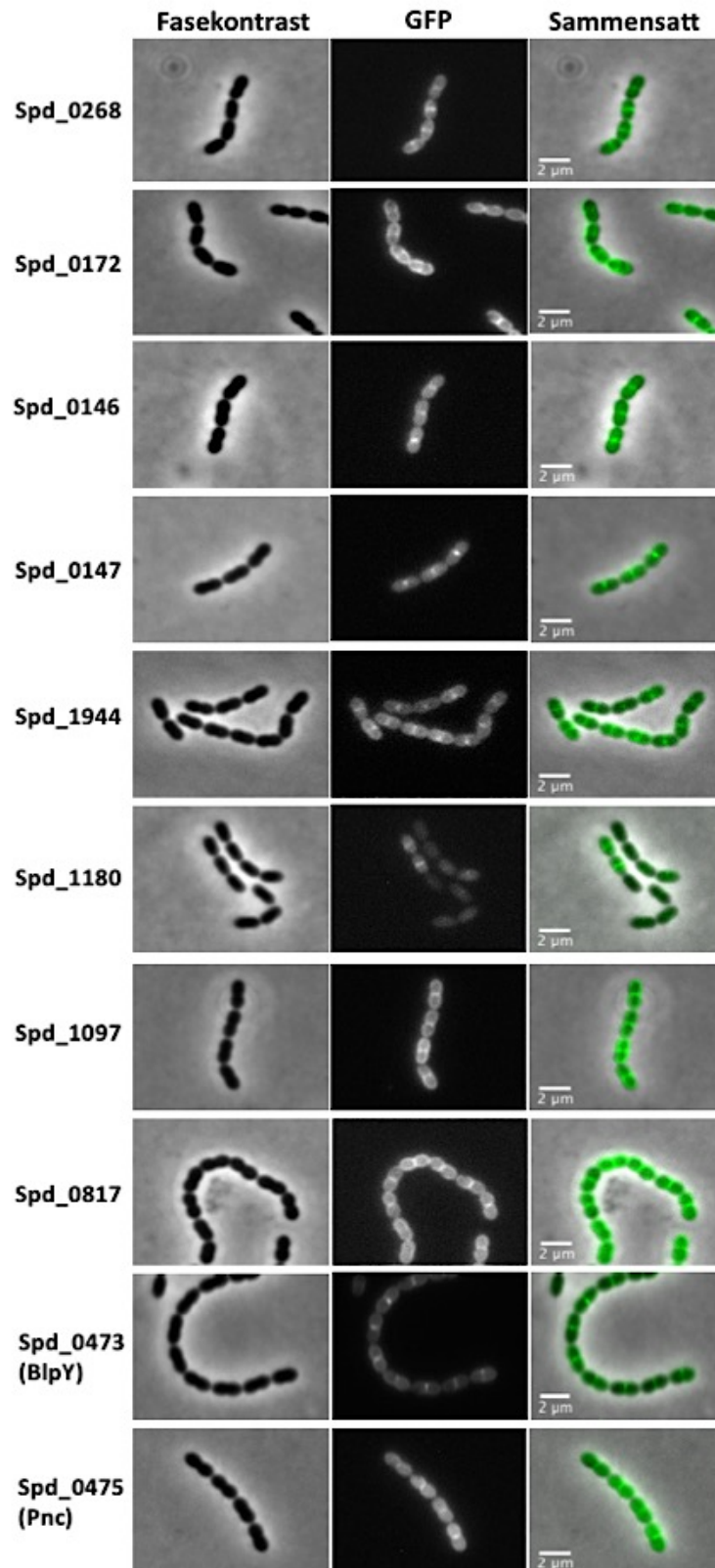
I tabell 4.2 vises en oversikt over hvilke *gfp*-fusjoner som ble brukt til fluorescensmikroskopi, samt hvilke proteiner som har N-terminal og C-terminal ende intracellulært eller ekstracellulært.

Resultater

Tabell 4.2: Oversikt over hvilke *gfp*-fusjoner som ble brukt til fluorescensmikroskopi, samt hvilke proteiner som har N-terminal og C-terminal ende intracellulært eller ekstracellulært.

Stammenavn	Gen	N-terminus	C-terminus	<i>gfp</i> -fusjon
SPMK17	<i>spd_0268</i>	Intracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Dårlig signal C-terminal fusjon: Figur 4.8
SPMK25	<i>spd_0172</i>	Intracellulær	Ekstracellulær	N-terminal fusjon: Dårlig signal C-terminal fusjon: Figur 4.8
SPMK33	<i>spd_0146</i>	Intracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8 C-terminal fusjon: Dårlig signal
SPMK33	<i>spd_0147</i>	Intracellulær	Ekstracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8 C-terminal fusjon: Dårlig signal
SPMK50	<i>spd_1944</i>	Intracellulær	Ekstracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8
SPMK58	<i>spd_1180</i>	Intracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8 C-terminal fusjon: Gikk ikke ⁴
SPMK59	<i>spd_0473</i> (<i>blpY</i>)	Intracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8
SPMK59	<i>spd_0475</i> (<i>pncP</i>)	Intracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8
SPMK63	<i>spd_1097</i>	Intracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8
SPMK64	<i>spd_0817</i>	Ekstracellulær	Intracellulær	N-terminal fusjon: Figur 4.8

⁴ Plasmid med *gfp* fusjonen ville ikke transformeres inn i *S. pneumoniae*



Figur 4.8: Subcellulær lokalisering av CAAX-proteinene. Alle CAAX-proteinene ble enten tagget med en N-terminal *gfp* eller med en C-terminal *gfp* for å studere den subcellulære lokaliseringen av proteinene. Figuren viser fasekontrast, GFP og et sammensatt bilde av fasekontrast og GFP.

Resultater

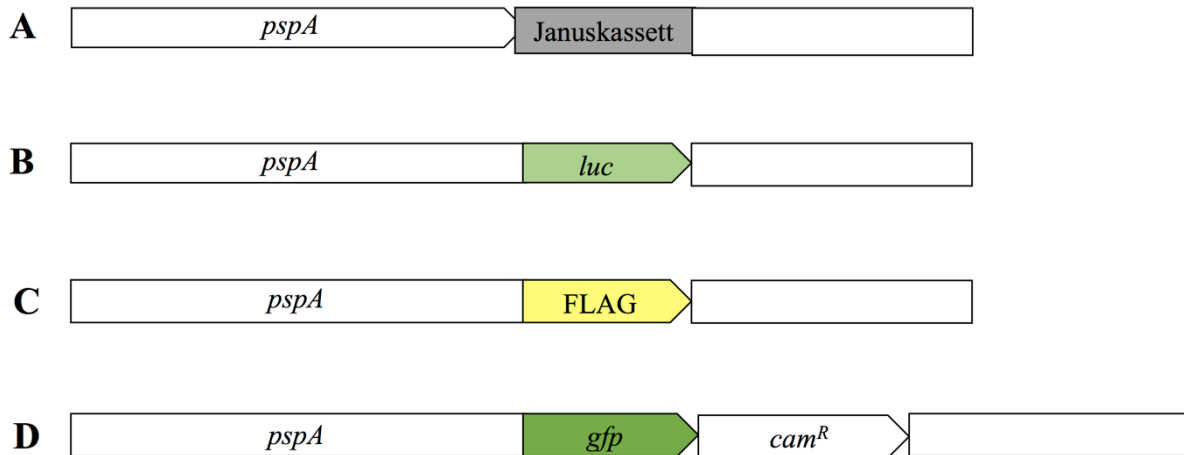
Alle CAAX-proteinene ble observert i cellemembranen. De var i ulik grad anrikt i septum (Figur 4.8). Mens SPD_0268, SPD_0146, SPD_0147, SPD_1180 og BlpY (SPD_0473) viser klar septum-lokalisering, ser det ut til at de øvrige er mer jevnt lokalisert over hele membranen. Sink-systemet som ble brukt for å uttrykke CAAX-*gfp* fusjonene (Eberhardt et al., 2009), gir heterogenitet i populasjonen, som medfører ulike ekspresjonsnivåer i cellene ved sink induksjon, og man vil derfor ikke se den samme signalstyrken i alle bakteriene (Figur 4.8).

4.7 Sekresjon av virulensfaktoren PspA

I en publisert genetisk screen etter proteiner som påvirket sekresjonen av proteinet SpA, ble det identifisert tre ulike CAAX-gener som var involvert i sekresjon i *S. aureus* (Frankel et al., 2010). Det ble vist at mutanter der disse tre genene var inaktivert, ble sekresjonen av SpA og flere andre proteiner tydelig redusert. Vi ønsket derfor å undersøke om dette er en generell egenskap for CAAX-proteiner i flere bakteriearter.

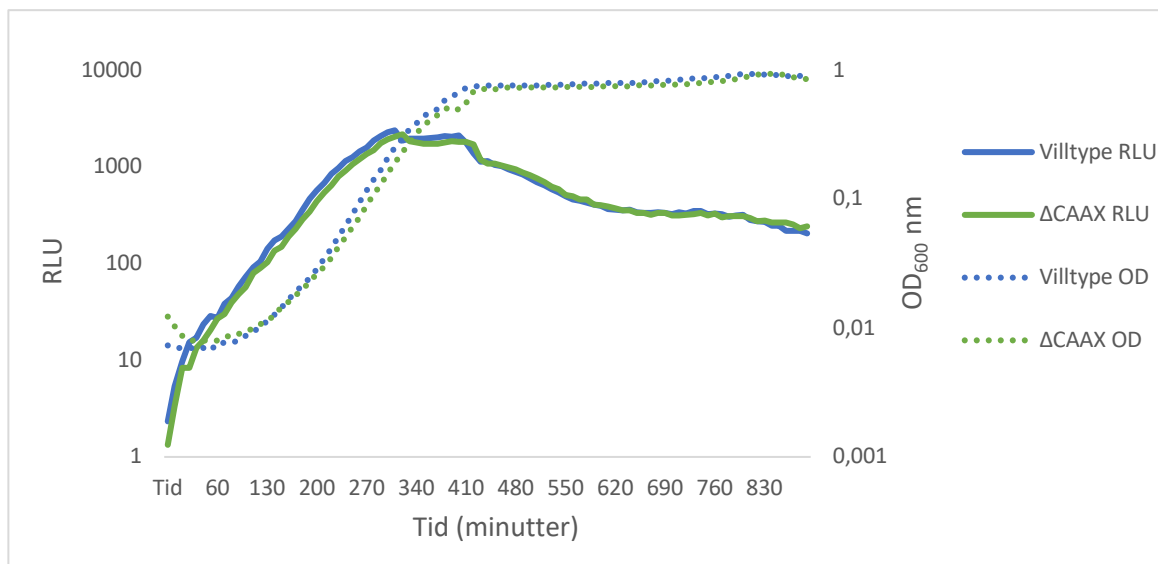
For å finne eventuelle forskjeller i sekresjon av proteiner mellom D39 villtype og Δ CAAX ble cellene behandlet med serinproteasen trypsin, og peptider som ble hydrolysert fra celleveggen ble analysert kvalitativt og kvantitativt ved hjelp av LC-MS/MS (utført av Morten Kjos før oppgaven ble påbegynt). Ved denne teknikken ble overflateproteiner i villtypen og mutanten kvantifisert og sammenlignet med tilsammen fire parallelle forsøk. Resultatene viste at mutanten hadde redusert mengde av virulensfaktoren PspA i alle de fire parallelle forsøkene (ca. 3-ganger redusert). Reduksjonen i PspA var også den mest signifikante forskjellen observert mellom villtypen og mutanten. Dette var et potensielt interessant resultat som ble fulgt opp videre.

Vi ønsket først å undersøke om den antatt reduserte mengden av PspA i Δ CAAX i forhold til villtypen, var på grunn av en redusert transkripsjon hos Δ CAAX ved å sette inn et reporter-gen som koder for luciferase (*luc*) nedstrøms for *pspA*-genet i genomet hos villtypen og Δ CAAX-stammen. Dette ble gjort ved å første sette inn en Janus-kassetten nedstrøms for *pspA*-genet, og deretter bytte ut Janus-kassetten med *luc*. (Figur 4.9 A,B).



Figur 4.9: *pspA*-konstrukt. Skjematisk fremstilling av *pspA*-Janus (A), *pspA-luc* (B), *pspA-FLAG* (C) og *pspA-gfp* konstrukt (D) som ble brukt til luciferase-assay, immunoblotting og fluorescensmikroskopi. Størrelsesforholdene mellom de ulike genetiske komponentene er ikke skalert.

Transkripsjonsraten til *pspA* i villtype og Δ CAAX ble sammenliknet i et luciferaseassay, men det ble ikke observert noen forskjeller (Figur 4.10).



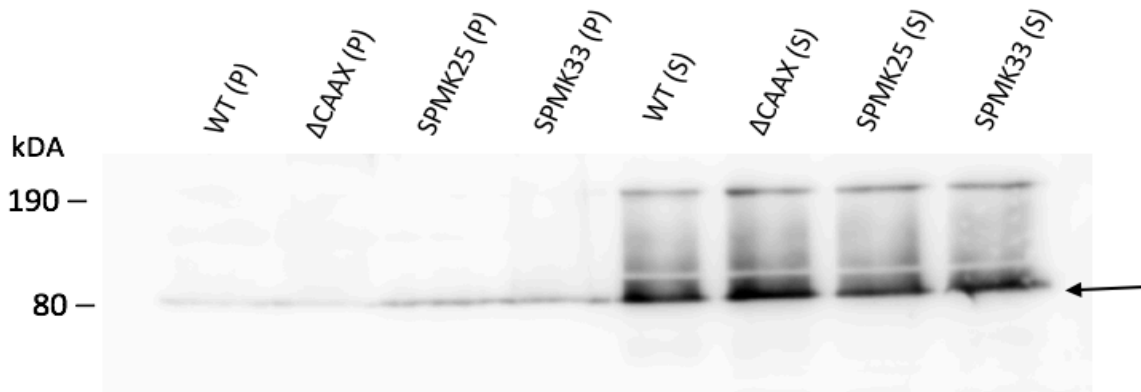
Figur 4.10: Transkripsjonsraten til *pspA*. *luc*-genet ble satt nedstrøms for *pspA* for å sammenligne transkripsjonsraten til *pspA* hos villtype og Δ CAAX ved bruk av et luciferase-assay. OD og RLU (relative light unit) ble målt hvert 10. minutt i tilsammen 15 timer.

Resultater

Da det ikke ble påvist forskjell i transkripsjonsrate, var det ønskelig å detektere proteinet med Western blot for å verifisere at det var redusert sekresjon. PspA er et kolinbindende protein som binder ikke-kovalent til celleveggen til *S. pneumoniae*. For å detektere PspA-proteinene i celleveggen ble det laget en versjon av genet som uttrykker en FLAG-tagget versjon av proteinet (Figur 4.9 C). Det FLAG-taggede *pspA*-genet ble transformert inn i villtypen, Δ CAAX og de resterende CAAX-mutantene.

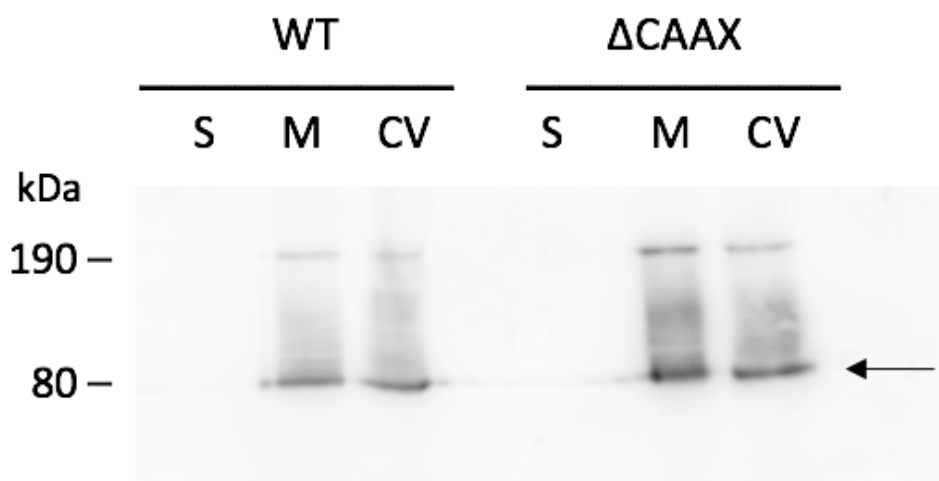
Villtypen, Δ CAAX og to vilkårlige CAAX-mutanter som uttrykker *pspA*-FLAG (SPMK25 og SPMK33) ble dyrket til eksponentiell fase og cellene ble deretter vasket med 2% kolin. Kolin i løsning vil utkonkurrere PCho, som resulterer i at PspA faller av celleveggen. Vi analyserte supernatant (S, proteiner som løsner fra celleoverflaten) og cellepellet (P) ved immunoblotting for tilstedeværelse av PspA-FLAG. PspA-FLAG ble detektert ved å bruke det primære antistoffet α -FLAG sammen med det sekundære antistoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP.

PspA ble funnet i både supernatant og pellet i like stor mengde for villtypen, Δ CAAX og de utvalgte CAAX-mutantene (SPMK25, SPMK33) (Figur 4.11). PspA er et protein med en molekylvekt på ~ 69 kDa, som sammen med FLAG vil ha en vekt på ~ 77 kDa. Dette stemmer overens med den observerte størrelsen (Figur 4.10). Det er i tillegg et bånd med en molekylvekt på ~ 190 kDa i supernatanten, som mest sannsynlig skyldes uspesifikk binding av antistoffet til andre proteiner (Figur 4.10). Det er mer PspA-FLAG i supernatanten enn i pelleten for både villtypen og CAAX-mutantene, hvilket viser at PspA-FLAG blir sekretert. For å verifisere at det er lik mengde totalprotein i alle prøvene, ble en tilsvarende gel farget med Coomassie (Vedlegg E).



Figur 4.11: Deteksjon av PspA-FLAG etter kolinvaske. Deteksjon av villtypen (WT), Δ CAAX, SPMK25 og SPMK33 (som uttrykker *pspA*-FLAG) ved immunoblotting med α -FLAG og det sekundære antistoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP. Cellene ble vasket med 2% kolin og deretter separert i pellet (P) og supernatant (S) før de ble analysert ved immunoblotting. Pila viser PspA-FLAG.

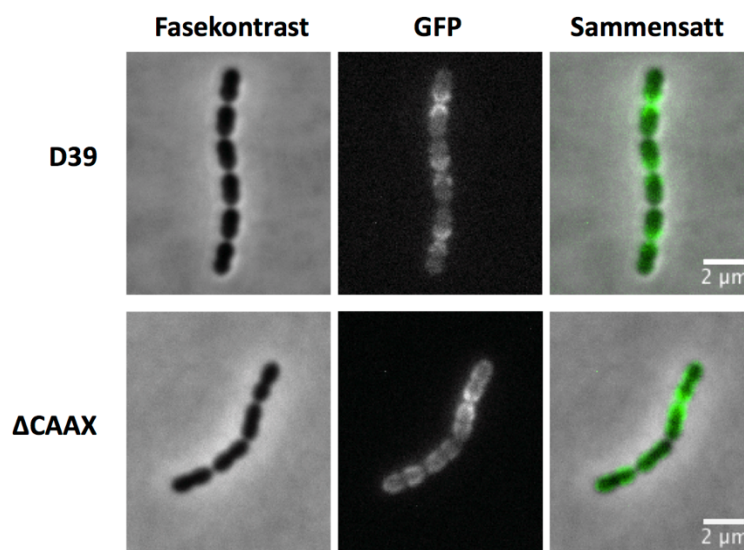
Villtypen og Δ CAAX ble i tillegg fraksjonert til supernatant (S), cellevegg (CV), og cellemembran (M) for å undersøke om det var noen forskjell i proteinmengde i de ulike fraksjonene. Kultursupernatanten ble helt av før celleveggen ble nedbrutt av mutanolysin. Cellemembranen ble isolert slik det står beskrevet i protokollen (se avsnitt 3.10.3). Overraskende ble det heller ikke her funnet noen forskjell i proteinmengde i de ulike fraksjonene hos villtypen i forhold til Δ CAAX (Figur 4.12). For å verifisere at det er lik mengde totalprotein i alle prøvene, ble en tilsvarende gel farget med Coomassie (Vedlegg E).



Figur 4.12: Deteksjon av PspA-FLAG etter full fraksjonering. Deteksjon av villtypen (WT) og Δ CAAX (som uttrykker *pspA*-FLAG) ved immunoblotting med α -FLAG og det sekundære antistoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP. Cellene ble fraksjonert til supernatant (S), cellemembran (M) og cellevegg (CV) før de ble analysert ved immunoblotting. Pila viser PspA-FLAG.

Resultater

Som en tredje fremgangsmåte for å finne ut om vi kunne bekrefte eller avkrefte PspA-funnene fra trypsin-shaving og LC-MS/MS, ble *pspA* fusert til *gfp* (isteden for FLAG) (Figur 4.9 D). *pspA-gfp* konstruktet, som også inneholder en kloramfenikolresistensmarkør til seleksjon, ble klonet inn i både villtypestammen og Δ CAAX, og analysert ved fluorescensmikroskopi. Som vist i Figur 4.13 finner vi heller ikke her noen forskjeller mellom villtype og Δ CAAX, da proteinet ser ut til å lokalisere likt i begge stammene. Vi konkluderer derfor med at den reduserte mengden PspA som ble funnet i Δ CAAX-stammen ved trypsin shaving og LC-MS/MS ikke ser ut til å være reell.



Figur 4.13: Lokalisering av PspA-GFP hos villtypestammen (*S. pneumoniae* D39) og Δ CAAX-stammen. PspA hos både villtypestammen og Δ CAAX-stammen lokaliserer likt. Bildene viser fasekontrast, GFP og et sammensattbilde av fasekontrast og GFP.

4.8 Sekresjon av YSRIK-proteinet PspC

Oppfølgingsforsøkene viste at CAAX-mutantene ikke har redusert sekresjon av PspA, til tross for at resultatene av trypsin-shaving og LC-MS/MS tydet på dette. I studien til Frankel *et al.* (2010) fant de en reduksjon i sekresjonen av proteiner med såkalt YSIRK signalsekvens hos CAAX-mutanter i *S. aureus*. PspA har en normal signalsekvens som ikke inneholder YSIRK-motivet. Det finnes derimot flere andre proteiner i *S. pneumoniae* D39 som har disse YSIRK-motivene i ledersekvensen. Derfor var det ønskelig å se om en av disse hadde en redusert sekresjon i *S. pneumoniae* også. PspC er et av proteinene i *S. pneumoniae* som har YSIRK-motivet i ledersekvensen (inneholder **YSRIKFSIGVAS** i signalsekvensen, konserverte

aminosyrer er uthevet), og det ble derfor undersøkt om det var en reduksjon i forekomsten av dette proteinet hos *S. pneumoniae*.

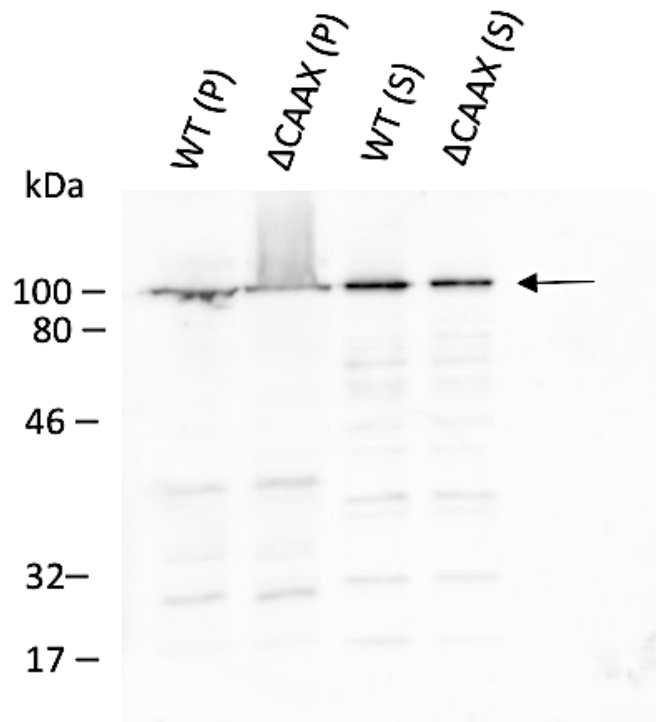
PspC er også et kolinbindende protein som binder ikke-kovalent til celleveggen til *S. pneumoniae*. Det ble laget en FLAG-tagget versjon av proteinet for å detektere det ved immunoblotting, for å undersøke om det er en redusert forekomst i CAAX mutanter (Figur 4.14A). Dette konstruktet, som også inneholder en kanamycinresistensmarkør til seleksjon, ble transformert inn i villtypen og Δ CAAX.



Figur 4.14: *pspC*-konstrukt. Skjematiske fremstillinger av *pspC*-FLAG-*kan^R* (A) og *pspC*-*gfp* (B) konstrukt som ble brukt til immunoblotting og fluorescensmikroskopi. Størrelsesforholdene mellom de ulike genetiske komponentene er ikke skalert.

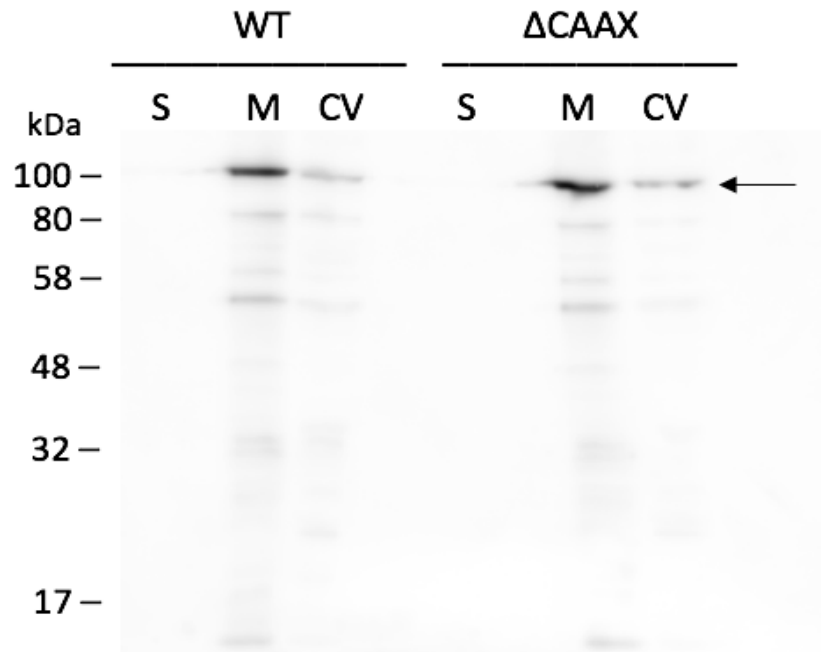
Villtypen og Δ CAAX som uttrykker PspC-FLAG ble vasket med 2% kolin og analysert ved immunoblotting som beskrevet for PspA. Det ble ikke funnet noen forskjeller i proteinmengde verken i supernatant eller pellet hos villtypen i forhold til Δ CAAX (Figur 4.15). Mengden PspC i supernatant og pellet er tilnærmet lik for både villtypen og Δ CAAX (Figur 4.15). PspC er et protein med en molekylvekt på 75 kDa (83 kDa med FLAG), men vandrer likevel med en masse på ca. 112 kDa på SDS-PAGE, noe som også er vist i en tidligere studie (Rosenow et al., 1997). Det er flere bånd med en lavere molekylvekt enn 112 kDa og dette er mest sannsynlig på grunn av uspesifikk binding av antistoffet til andre proteiner, eller degraderte deler av PspC. For å verifisere lik mengde totalprotein i alle prøvene, ble en tilsvarende gel farget med Coomassie (Vedlegg E).

Resultater



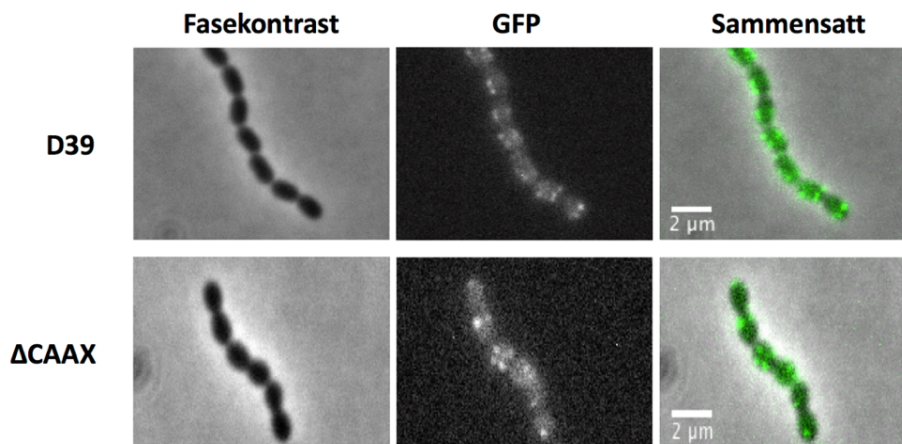
Figur 4.15: Deteksjon av PspC etter kolinvasjon. Deteksjon av villtypen (WT) og Δ CAAX (som uttrykker *pspC*-FLAG) ved immunoblotting med α -FLAG og det sekundære antistoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP. Cellene ble vasket med 2% kolin og deretter separert i pellet (P) og supernatant (S) før de ble analysert ved immunoblotting. Pila viser PspC-FLAG.

De samme stammene ble også fraksjonert til supernatant (S), cellevegg (CV) og cellemembran (M) før de ble analysert ved immunoblotting, på samme måte som tidligere. Her ble det heller ikke funnet noen forskjell i mengde PspC-FLAG i de ulike fraksjonene hos villtypen i forhold til Δ CAAX (Figur 4.16). For å verifisere at lik mengde protein i alle prøvene, ble en tilsvarende gel farget med Coomassie (Vedlegg E).



Figur 4.16: Deteksjon av PspC etter full fraksjonering. Deteksjon av villtypen (WT) og Δ CAAX (som uttrykker *pspC*-FLAG) ved immunoblotting med α -FLAG og det sekundære antifoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP. Cellene ble fraksjonert til supernatant (S), cellemembran (M) og cellevegg (CV) før de ble analysert ved immunoblotting. Pila viser PspC-FLAG:

Deretter ble det laget et *pspC-gfp* konstrukt (Figur 4.14B), på samme måte som for *pspA*, som ble transformert inn i villtypestammen og Δ CAAX-stammen for å se om det er forskjeller i lokalisering av PspC i de to stammene. Figur 4.17 viser at PspC-GFP lokaliserer (som foci) på samme måte i begge stammene. Vi konkluderer derfor med at sekresjonen av YSRIK-signalsekvensproteinet PspC ikke påvirkes av CAAX-proteiner i *S. pneumoniae* D39.

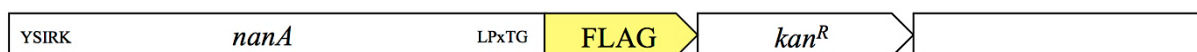


Figur 4.17: Lokalisering av PspC-GFP hos villtypestammen (*S. pneumoniae* D39) og Δ CAAX-stammen. PspC hos både villtypestammen og Δ CAAX-stammen lokaliserer likt (som foci). Bildene viser fasekontrast, GFP og et sammensattbilde av fasekontrast og GFP.

4.9 Forsøk med virulensfaktoren NanA

NanA er også et sekretert protein i *S. pneumoniae* D39 som har YSIRK-motivet i ledersekvensen (inneholder sekvensen **YSIRKLSLGAVS**, konserverte aminosyrer er uthevet). I motsetning til PspA og PspC, festes NanA til celleoverflaten ved kovalent binding til peptidoglykanet via en sortase-katalysert reaksjon med et såkalt LPxTG-motiv i den C-terminale enden av proteinet. Fordi kombinasjonen av YSIRK-signal og LPxTG-motiv også ble funnet hos proteinene med redusert sekresjon i Frankel et al. (2010) studien, ble NanA også undersøkt i *S. pneumoniae* på samme måte som PspA og PspC.

Det ble laget en FLAG-tagget versjon av proteinet for å detektere det ved immunoblotting, for å undersøke om det er en redusert forekomst av proteinet i CAAX mutanter. Dette ble gjort ved å fusere *nanA*-genet med en FLAG-tag kodende sekvens i den C-terminale enden ved hjelp av overlapp PCR (Figur 4.18). Dette konstruktet, som også inneholder en kanamycinresistensmarkør til seleksjon, ble transformert inn i villtypen og Δ CAAX. Denne fremgangsmåten er ikke optimal for NanA, siden FLAG-sekvensen trolig vil kuttes bort av sortase når proteinet festes på utsiden av cellen. Likevel forventet vi å se en økning i intracellulær NanA-FLAG dersom sekresjonen var påvirket. Immunoblottingen ga derimot ingen resultater. Det ble ikke detektert noe signal ved å bruke det primære antistoffet α -FLAG sammen med det sekundære antistoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP på hele celleekstrakt.



Figur 4.18: *nanA*-FLAG konstrukt. Skjematiske fremstilling av *nanA*-FLAG-*kan^R* konstruktet som ble brukt til immunoblotting. Størrelsesforholdene mellom de ulike genetiske komponentene er ikke skalert.

RNA-sekvenseringsdata og LC-MS/MS analyse viser at *nanA* blir svært lavt uttrykt/ikke uttrykt i *S. pneumoniae* D39 under våre lab-forhold (svært lav transkripsjon og ingen protein detektert).

På bakgrunn av dette ble *nanA*-FLAG-*kan^R* konstruktet satt inn i plasmidvektoren pKB01 bak en sink-induserbar promotor for å ektopisk uttrykke proteinet. Plasmidet ble transformert inn i villtypen og Δ CAAX. For at stammene skal uttrykke den ekstra kopien av *nanA* ble 0,2 mM ZnCl₂ tilsatt ved oppdyrking. Ved immunoblotting av hele celleekstrakt ble det heller ikke her

detektert noe signal. Grunnen til at det ikke blir noe signal når NanA uttrykkes fra Zn promotoren er uklart. Resultatene fra forsøkene med NanA ga derfor ingen konklusjoner.

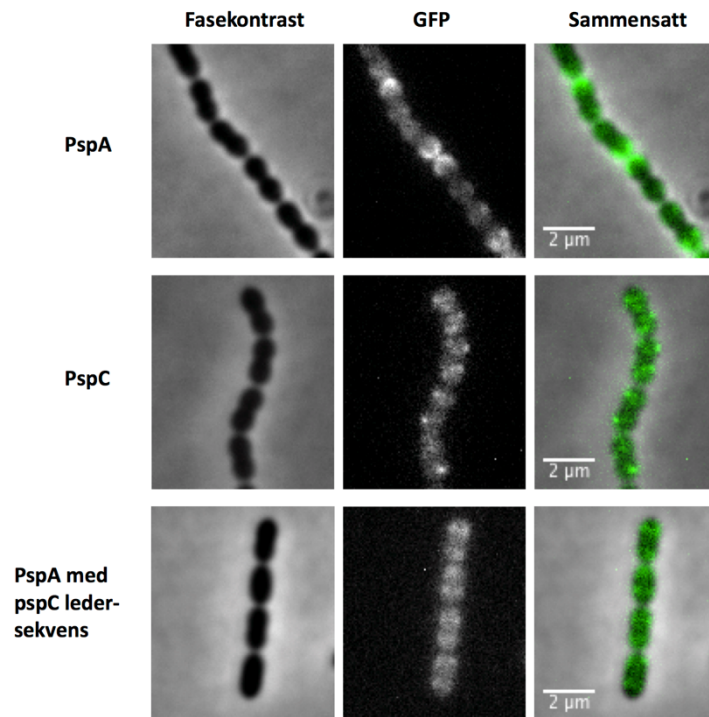
4.10 Involvering av YSIRK i sekresjon og lokalisering i *S. pneumoniae*

Forsøkene ga ingen støtte til hypotesen om at CAAX-proteinene påvirker sekresjonen av virulensfaktorene PspA eller PspC. Dette var overaskende på bakgrunn av resultatene fra LC-MS/MS og publikasjonen til Frankel et al (2010) om *S. aureus*.

Under arbeidet med PspA og PspC ble det derimot oppdaget en svært interessant forskjell i lokaliseringen av disse to kolinbindene proteinene. PspA-GFP ser hovedsakelig ut til å lokalisere til cellens poler, mens PspC-GFP danner foci i nærheten av midten av cellene (Figur 4.13 og 4.17).

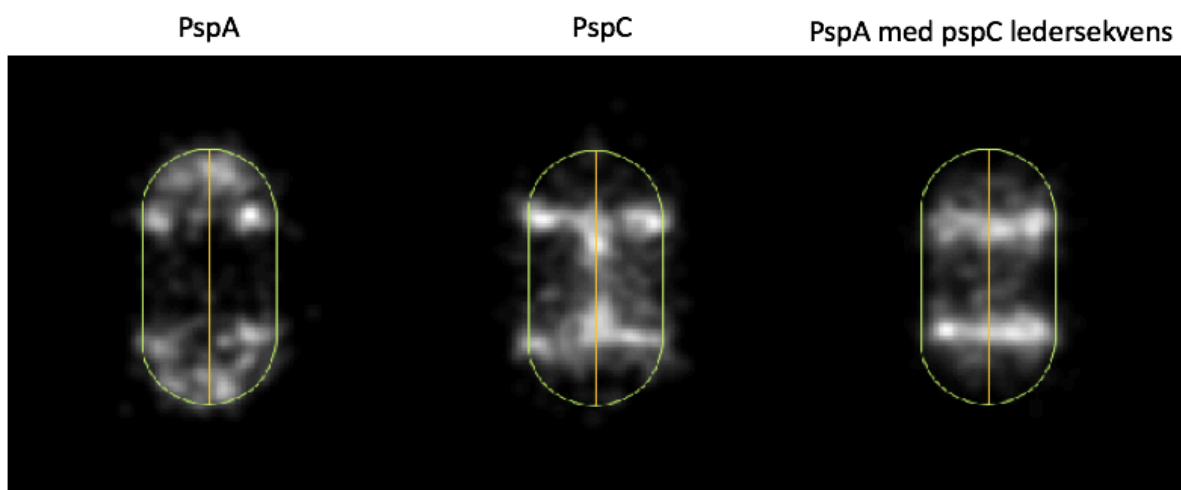
Disse to proteinene har ulike ledersekvenser for sekresjon. PspA har en normal ledersekvens, mens PspC har en YSIRK ledersekvens. Tidligere observasjoner tyder på at YSIRK påvirker lokalisering i andre bakterier (Carlsson et al., 2006; DeDent et al., 2008), selv om dette ikke er entydig (Brega, Caliot, Trieu-Cuot, & Dramsi, 2013). Det ble derfor undersøkt om YSIRK påvirker lokalisering i *S. pneumoniae*. Dette ble gjort ved å bytte ut PspA ledersekvensen med PspC ledersekvensen som inneholder YSIRK-motivet (PspC^L-PspA). Fluorescensmikroskopi av PspC^L-PspA viser interessant nok at PspA mister den polare lokaliseringen, og danner isteden foci og lokaliserer til midten av cellene (Figur 4.19) når den har YSIRK-ledersekvens.

Resultater



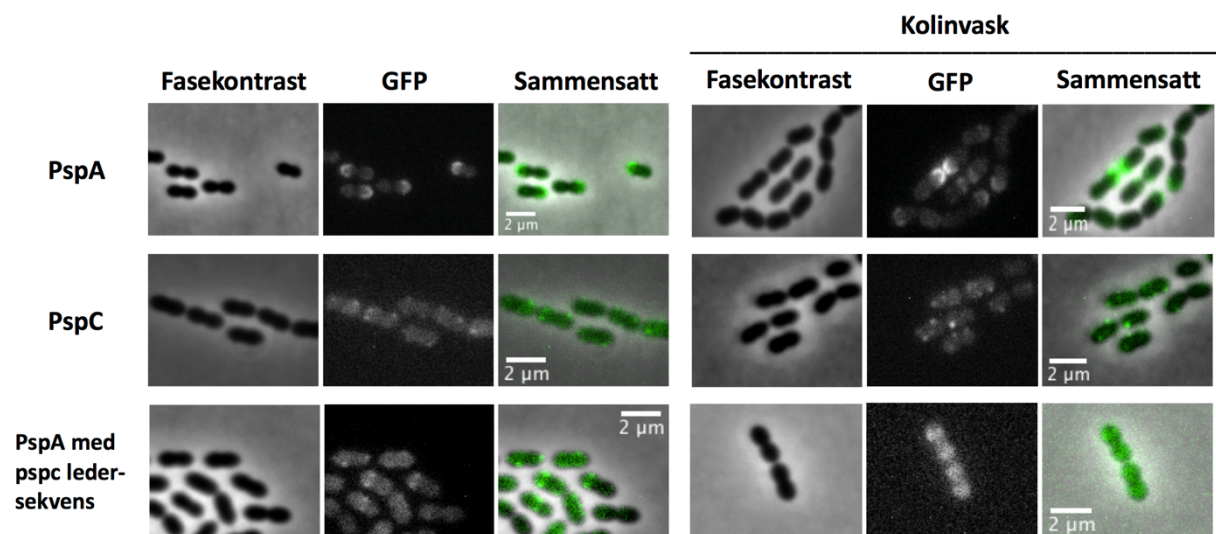
Figur 4.19: Lokalisering av PspA-GFP, PspC-GFP og PspC^L-PspA-GFP. PspA lokaliserer hovedsakelig til cellens poler, mens PspC lokaliserer til midten av cellen hvor den danner foci. Når PspA bytter sin normale ledersekvens med PspC sin YSIRK ledersekvens lokaliserer også PspA til midten av cellen og danner foci. Bildene viser fasekontrast, GFP og et sammensatt bilde av fasekontrast av GFP.

For å kvantifisere lokaliseringen til PspA, PspC og PspC^L-PspA ble programmet Image J (Fiji) med plugin Microbe J benyttet. Fluorescenssignal relativt til bakteriestørrelsen ble målt i > 1000 celler. I figur 4.20 vises lokaliseringen til de ulike proteinene i et lokaliseringskart. Lokaliseringskartet ble laget ved at enkeltceller med fluorescens plottes relativt til cellestørrelsen og kombineres i et plott. I lokaliseringskartet vises det også veldig tydelig at PspA bytter lokalisasjon fra cellepolene til midten av cellen når den normale ledersekvensen byttes ut med PspC-ledersekvensen som inneholder YSIRK-motivet.



Figur 4.20: Lokaliseringskart av PspA, PspC og PspA med pspC ledersekvens. Bakteriestørrelse og fluorescens ble målt i > 1000 celler per stamme.

PspA og PspC er som tidligere nevnt kolinbindende proteiner. For å undersøke om signalene som ble detektert kommer fra proteiner som er sekretert og festet til PCho i celleveggen ble cellene (stammer som uttrykker *pspA-gfp*, *pspC-gfp* og *pspC^L-pspA-gfp*) vasket med 2 % kolin før de ble mikroskopert. Kolin vil utkonkurrere PCho, og dermed vil proteinene falle av celleveggen. Dette vil resultere i at det ikke lengre observeres noe signal i celleveggen. Det ble imidlertid fortsatt oppdaget signal i celleveggen etter kolinvaske hos alle stammene (Figur 4.21), hvilket tyder på at proteinene sitter i sekresjonsmaskineriet i membranen. Dette er også tidligere blitt vist for det kolinbindende proteinet LytA (Mellroth et al., 2012)



Figur 4.21: Kolinvaske av PspA, PspC og PspA med pspC ledersekvens. Stammer som uttrykker *pspA-gfp*, *pspC-gfp* og *pspC^L-pspA-gfp* ble vasket i 2 % kolin før de ble mikroskopert. I figuren vises fasekontrast, GFP og et sammensatt bilde av fasekontrast og GFP.

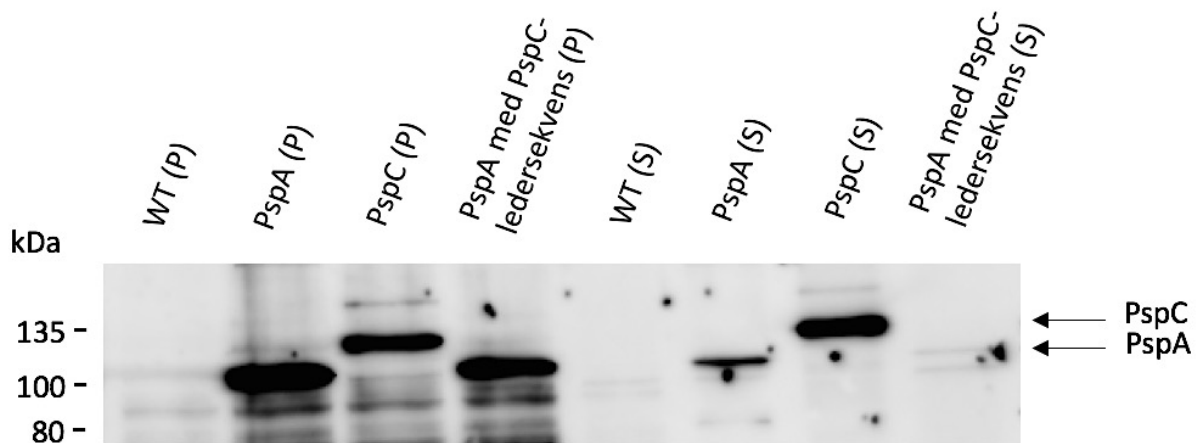
Villtypen D39 og celler som uttrykker *pspA-gfp*, *pspC-gfp* og *pspC^L-pspA-gfp* ble vasket i 2% kolin og analysert ved immunoblotting for å se om konstruktet er intakt og om YSIRK-ledersekvensen til PspC påvirker sekresjonen av PspA. Proteinene ble detektert ved å bruke det primære antistoffet α -GFP sammen med det sekundære antistoffet α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP.

GFP er 786 basepar langt, som vil gi en molekylvekt på ~ 28 kDa noe som er mye høyere enn FLAG-sekvensen (8 kDa). Derfor vil proteinene ha en høyere molekylvekt enn de hadde i de tidligere forsøkene med Western Blot hvis fusjonene er intakte. Det vises tydelig at både PspA-GFP og PspC-GFP har en høyere molekylvekt enn PspA-FLAG og PspC-FLAG, som ble analysert tidligere (Figur 4.11, 4.15 og 4.22). Tidligere resultater viste at det var mer PspA-FLAG i supernatanten enn i pelleten (Figur 4.11), men dette ble ikke observert i celler med

Resultater

PspA-GFP (Figur 4.22). Dette kan tyde på at GFP-proteinet påvirker sekresjonen. Derimot er det tilnærmet like mye PspC-GFP i både pellet og supernatant (Figur 4.22), slik de tidligere resultatene viste (Figur 4.15). For å verifisere at lik mengde protein ble satt på i alle brønnene, ble en tilsvarende gel farget med Coomassie (Vedlegg E).

Proteiner med YSIRK-ledersekvens har tidligere vist å bli sekretert mer effektivt enn proteiner med en normal ledersekvens (Bae & Schneewind, 2003), og det var derfor interessant å undersøke om PspC^L-PspA sekreteres mer effektivt enn PspA med normal ledersekvens. Det derimot ble observert lite protein i supernatanten hos PspC^L-PspA, enda mindre enn i supernatanten hos PspA (Figur 4.21).



Figur 4.22: Deteksjon av PspA-GFP, PspC-GFP og PspC^L-PspA-GFP etter kolinvasjon. Deteksjon av villtypen (WT) og WT celler som uttrykker *pspA-gfp*, *pspC-gfp* og *pspC^L-pspA-gfp* ved immunoblotting. Antistoffene som ble brukt var α -GFP og α -Rabbit som er koblet til enzymet HRP. Cellene ble vasket med 2% kolin og deretter separert i pellet (P) og supernatant (S) før de ble analysert ved immunoblotting.

Det ser ut som GFP-proteinet påvirker sekresjonen av PspA, og det er derfor ikke mulig å konkludere om PspC^L-PspA hverken sekreteres mer effektivt eller dårligere enn PspA med normal ledersekvens. Resultatene viser derimot at det ser ut til at sekresjonen av PspA og PspC påvirker hvor de lokaliserer i celleveggen.

5.Diskusjon

5.1 *S. pneumoniae* D39 koder for 10 CAAX-proteiner, men disse påvirker ikke vekst eller sensitivitet mot antibiotika under laboratorieforhold

CAAX-proteiner er membranproteiner som finnes i både eukaryote- og prokaryote celler. Av 1100 bakteriegenomer inneholder 793 av disse minst et gen som koder for et CAAX-protein. Antallet CAAX-gener i genomet varierer innenfor de ulike prokaryotiske rekkene. For eksempel mangler 50% av proteobacteria CAAX-proteinkodende gener, mens hos firmicutes og actinobacteria er det ikke uvanlig å finne mellom 5-20 CAAX-proteinkodende gener. Bakterien med flest CAAX-kodende gener er *Streptococcus sanguinis*, som har 21 stykker (Jimin Pei et al., 2011). Dette er altså proteiner som er vidt utbredt. CAAX-proteinene har en kjent proteaseaktivitet i eukaryote, der de kan spalte av tripeptidet -AAX hos lipiderte proteiner med den C-terminale sekvensen CAAX. CAAX-proteiners funksjon er imidlertid fortsatt ukjent i prokaryote. Siden proteiner med -CAAX sekvens i C-terminus ikke er funnet hos *S. pneumoniae*, er det trolig at CAAX-proteiner har andre funksjoner i bakterier. Til tross for flere enkeltstudier av denne proteinfamilien i bakterier, inkludert studier som viser at de er involvert i immunitet mot bakteriosiner, mangler det klare eksperimenter som viser enzymatisk aktivitet i bakterier, selv om de konserverte sekvensene tyder på at de er proteaser.

CAAX-proteinene har tre konserverte motiver som man antar utgjør det aktive setet i CAAX-proteinene. Konserverte sekvenser, enten DNA- eller aminosyresekvenser, antas å ha funksjonell verdi. På bakgrunn av dette er det sannsynlig at CAAX-proteinene har en biologisk funksjon i bakterier som har blitt bevart gjennom evolusjonen. Disse konserverte motivene ser ut til å være viktig for deres enzymatiske funksjon, da immunitetsproteinet SkkI (fra *Lactobacillus sakei*) mistet sin funksjon da motivene ble mutert (Kjos et al., 2010).

S. pneumoniae D39 koder for 10 ulike CAAX-proteiner, hvor det kun er to av dem som har blitt studert til en viss grad. BlpY og PncP er begge funnet i bacteriocin lokuset *blp*. PncP sin funksjon er fortsatt uklar, men BlpY ser ut til å være involvert i selvimmunitet mot pneumociner selv om mekanismen bak er ukjent (Lux et al., 2007). Alle CAAX-proteinene i *S. pneumoniae* D39 har komplette konserverte motiver, unntatt SPD_0147 hvor glutamat har blitt byttet ut med aspartat i motiv 1 (Figur 4.1). Glutamat og aspartat er begge sure aminosyrer, så dette har mest sannsynlig ikke ført til noen endringer. En proteinfamilie har vanligvis like tredimensjonale

Diskusjon

strukturer, funksjoner og signifikant sekvenslikhet (Lesk, 2016). Dermed kan vi anta at alle de 10 proteinene har en lik enzymatisk funksjon, men de er ikke nødvendigvis involvert i de samme reaksjonsveiene.

Resultater fra RNA-sekvensering av *S. pneumoniae* D39 (Yuzenkova et al., 2014) viser at CAAX-genene *spd_0268*, *spd_0172*, *spd_0146*, *spd_0147*, *spd_1944*, *spd_0473* (*blpY*) og *spd_0475* (*pncP*) ligger i operon, hvor genene *spd_0146* og *spd_0147*, og *blpY* og *pncP* ligger i operon med hverandre (Tabell 4.1). Gener som ligger i operon vil transkriberes sammen eller være avslått sammen, og er ofte involvert i samme reaksjonsvei eller har relaterte funksjoner. Det er allerede kartlagt at *blpY* og *pncP* ligger i samme bacteriocin lokus, og dermed trolig har relaterte funksjoner. Ut i fra dette kan man anta at *spd_0146* og *spd_0147* koder for enzymer som har relaterte funksjoner. Basert på hvilke andre gener de ligger i operon sammen med (Tabell 4.1), er det imidlertid vanskelig å predikere hvilke funksjoner de kan ha.

RNA-sekvensering har vist at alle CAAX-genene, bortsett fra *spd_1180* er uttrykt under vekstbetingelsene som ble brukt i dette arbeidet (Yuzenkova et al., 2014; Aprianto, Slager, Holsappel, & Veening, 2018). *S. pneumoniae* finnes vanligvis i de øvre luftveiene, mens under arbeidet ble den dyrket i C+Y medium, som vil si at bakterien dyrkes under ulike vekstforhold sammenlignet med dens naturlige nisje i kroppen. Dette gjelder også generelt i de andre forsøkene som ble gjort. På grunn av at *in vitro* forholdene er ulike *in vivo* forholdene behøver det ikke bety at *spd_1180* er et lavt uttrykt gen under alle vekstforhold. Det kan være at genet er lavt uttrykt når bakterien vokser i C+Y medium, men er høyt uttrykt når den vokser i de øvre luftveiene. En ny studie tyder faktisk på at *spd_1180* er høyere uttrykt når vekstbetingelsene ligner mer på forholdene i de øvre luftveiene (Aprianto et al., 2018).

Som tidligere nevnt var det mulig å lage delesjonsmutanter av CAAX-genene, så dette er ikke essensielle proteiner for vekst hos *S. pneumoniae* i C+Y medium. Da man ikke vet hvilke funksjoner CAAX-proteiner har i prokaryote celler ønsket vi å karakterisere dem ved hjelp av ulike fenotypiske tester.

Dette er første gang alle CAAX-genene har blitt fjernet fra en bakterie med CAAX-gener i genomet. Det var uventet at det var mulig å lage en delesjonsstamme hvor alle CAAX-genene var deletert uten at det så ut til å ha innvirkning på vekst. Vi ønsket derfor å se grundigere på veksten til de ulike delesjonsmutantene for å undersøke om det kunne være forskjeller mellom

dem og villtypen. Resultatene fra vekstforsøkene på 30°C (Figur 4.2), 37°C (Figur 4.3) og 42°C (Figur 4.4) viste at villtypen og Δ CAAX vokste likt, hvilket tyder på at proteinene ikke har noen funksjon for vekst ved disse valgte temperaturene under laboratorieforhold.

CAAX-proteinet BlpY (SPD_0473) er som nevnt viktig for selvimmunitet mot pneumociner. På bakgrunn av dette ble det testet om CAAX-proteiner er viktig for generell beskyttelse av antimikrobielle peptider. Det ble testet mot de bredspektrede peptidene bacitracin (sykliske peptider) og det modifiserte peptidet nisin. Bacitracin er et syklisk peptid som inhiberer enzymatisk defosforylering av baktopenol. Denne defosforyleringen er et essensielt steg i syntesen av peptidoglykan, da baktopenol må defosforyleres før den kan danne lipid I (Se avsnitt om cellevegg). Bacitracin inhiberer dermed celleveggsyntesen (Ming & Epperson, 2002). Nisin er et polysyklisk, modifisert peptid som binder til lipid II. Lipid II er det siste forløpermolekylet i peptidoklykansyntesen, og ved å binde til dette molekylet blir celleveggsyntesen inhibert (Garg et al., 2014). I tillegg kan nisin danne porer i cellemembranen etter binding til lipid II. Det ble ikke observert forskjeller i sensitivitet mellom villtypen og Δ CAAX for noen av antibiotikaene. Det ser derfor ikke ut som CAAX-proteiner beskytter mot de gitte antimikrobielle peptidene. Videre har det også blitt testet mot andre klasser av antibiotika med ulike virkningsmekanismer (penicilliner og fluorokinoloner), men heller ikke her ble det observert noen forskjeller.

Det er tidligere blitt rapportert at CAAX-gener ofte finnes i nærheten av gener som koder for transportproteiner (Kjos et al., 2010). Da det ble klart at CAAX-proteinene ikke påvirker vekst i C+Y medium (med glukose som karbonkilde) ble det undersøkt om de kan ha funksjoner i opptak av ulike sukre. Rapid ID 32 strep testen har sine svakheter da det kan være vanskelig å skille mellom fargene, men siden det ikke var noen forskjeller mellom villtypen og Δ CAAX for noen av de 32 karbonkildene var ikke dette et problem. Det ser derfor ikke ut som CAAX-proteiner har funksjoner i opptak eller fermentering av sukker i *S. pneumoniae*.

Ut fra de fenotypiske testene som ble utført ble vi ikke klokere på hva funksjonen til CAAX-proteiner i *S. pneumoniae* er. En storskalastudie av alle genene i *S. pneumoniae*, tyder på at inaktivering av noen CAAX-gener (*spd_0268*, *spd_1944*, *spd_1097* og *spd_0473*) reduserer koloniseringsevnen i nasopharynx (van Opijnen & Camilli, 2012). For å videre karakterisere CAAX-proteinene burde derfor *in vivo* forsøk benyttes.

5.2 CAAX-proteinene i *S. pneumoniae* lokaliserer til septum, men påvirker ikke celledeling

Det har aldri tidligere blitt undersøkt hvordan CAAX-proteiner lokaliserer i bakterieceller, og vi var derfor interessert i å finne ut om de har en spesifikk lokalisering (for eksempel til septum eller polene), eller om de er fordelt jevnt utover membranen. For å studere de subcellulære lokaliseringene av CAAX-proteinene i *S. pneumoniae* ble det laget N-terminale og C-terminale *gfp* fusjoner av alle CAAX-proteinene. Fordelen ved å bruke GFP-fusjonsproteiner er at det er mulig å visualisere proteinet av interesse i levende celler, og at det vil resultere i fluorescens så lenge tilstrekkelig O₂ er tilstede. Da *gfp* enkelt kan fuseres til genet av interesse vil det gi en presis lokalisering av proteinet. Ulemper ved denne fremgangsmåten er at fusjonen kan forstyrre funksjonen eller foldingen til proteinet av interesse og at genet ofte må ektopisk uttrykkes for å kunne observere fluorescens (Giepmans, Adams, Ellisman, & Tsien, 2006). Det ideelle resultatet ved å bruke GFP-fusjoner vil være å få et fluoriserende protein som opprettholder sin funksjon og lokalisasjon.

Ved bruk av «vanlig» GFP er det en fordel å ha GFP på den intracellulære siden av cellemembranen for å få optimal folding av proteinet, men superfolder GFP, som ble benyttet i denne oppgaven, er vist å kunne brukes til proteinlokalisering også når GFP-molekylet er ekstracellulært (Dinh & Bernhardt, 2011). Genene *spd_0172*, *spd_0147* og *spd_0817* hadde GFP ekstracellulært, men siden det ble brukt superfolder GFP i denne oppgaven så ikke det ut til å påvirke fluorescensen. Det ble først forsøkt å fusere *gfp* direkte på genet *spd_0817*, men dette ga ingen signaler. Dette kan være fordi proteinet ikke er høyt nok uttrykt under de vekstforholdene vi dyrket bakteriene. Dermed valgte vi å ektopisk uttrykke CAAX genene i *bgaA* lokuset bak en sink-induserbar (P_{Zn}) promotor, for å få signaler for alle fusjonsproteinene.

Resultatene fra fluorescencemikroskoperingen viste at alle CAAX-proteinene i *S. pneumoniae* er anriket i septum. Noen proteiner ser ut til å nærmest kun lokalisere i septum (for eksempel BlpY), mens andre lokaliserer rundt hele cellemembranen i tillegg til septum (for eksempel SPD_0817). Disse forskjellene kan tyde på at de ulike CAAX-proteinene har ulike funksjoner i cellen.

I likhet med proteiner involvert i celledeling og cellevegg syntese, lokaliserer altså CAAX-proteiner til bakteriens septum. Frankel et al. (2010) rapporterte også at CAAX-proteiner påvirker celleveggsdannelse i *S. aureus*. For å nærmere studere sammenhengen mellom CAAX-proteiner og celledeling i *S. pneumoniae*, ble de morfologiske egenskapene til CAAX-mutantene undersøkt. Dette ble gjort fordi morfologien til cellene kan gi oss indikasjoner om funksjonene til disse proteinene er relatert til celledeling, dersom vi for eksempel ser forskjeller i kjededannelse eller cellestørrelse. Det ble ikke funnet store forskjeller i kjededannelse (Figur 4.4), cellelengde eller cellebredde (Figur 4.6) mellom villtypen og CAAX-mutantene. Selv om vi ikke ser en endret cellemorfologi er det ikke nødvendigvis sikkert at CAAX-proteiner ikke har funksjoner innenfor celledeling. Hvis CAAX-proteiner har funksjoner i celledeling er de ikke nødvendigvis de eneste proteinene som utfører den gitte oppgaven. Ved å fjerne CAAX-genet(ene) er det mulig at de andre proteinene klarer å utføre oppgaven slik at ikke cellemorfologien endres.

Merking av DNA ved DAPI-farging viste at stammene SPMK33 (Δspd_0146 og Δspd_0147), SPMK64 (Δspd_0817) og SPMK78 ($\Delta CAAX$) hadde noen få celler hvor det ikke var DNA tilstede (Figur 4.7). Dette kan bety at CAAX-genene *spd_0146*, *spd_0147* og *spd_0817* indirekte påvirker kromosomsegregering eller replikasjon. Siden dette ble observert i så få av disse cellene (<0,5%), er det ikke mulig å konkludere sikkert i dette tilfellet.

Enkeltstudier av CAAX-proteiner har, som tidligere nevnt, vist at proteinene er involvert i ulike prosesser i cellen, for eksempel innen hemolyse i *S. agalactiae* (Firon et al., 2013) og celledeling i *S. aureus* (Frankel et al., 2010). Dette er studier vi baserte våre undersøkelser på, men det ser ikke ut til at CAAX-proteiner er direkte involvert i de samme prosessene i *S. pneumoniae*. Det er stor grunn til å tro at dette er enzymatiske proteiner med funksjoner i *S. pneumoniae* grunnet de konserverte motivene og antall CAAX-kodende gener i genomet. Ut fra våre resultater ser det ut til at CAAX-proteinene mest sannsynlig utfører de samme enzymatiske funksjonene, men at utfallet av dette er ulikt i ulike bakteriearter.

5.3 Sekresjon av virulensfaktorene PspA og PspC påvirkes ikke av CAAX-proteinene i *S. pneumoniae*

Virulensfaktorer er bakterienes verktøy for å kunne kolonisere- og forårsake sykdom hos mennesker og dyr. For å lære mer om sykdomsbildet er det dermed viktig å vite hvordan

Diskusjon

bakteriene bruker de ulike virulensfaktorene for å påføre sykdom. Ut fra studien til Frankel et al. (2010) så det ut til at CAAX-proteiner var involvert i sekresjon av virulensfaktorer i *S. aureus*. Økende antibiotikaresistens blant bakterier er blitt et problem over hele verden. Det er derfor nødvendig å utvikle nye typer antibiotika som ikke dreper bakterier, slik at de som overlever ikke kan bli resistente. Virulensfaktorer har blitt sett på som potensielle nye mål for anti-infeksjonsmedisiner, da dette vil svekke bakterienes muligheter for å påføre sykdom. Hvis CAAX-proteiner påvirker sekresjonen av flere virulensfaktorer vil disse kunne være et attraktivt mål for antiinfeksjonsmedisiner i fremtiden.

Etter at det ble laget delesjonsstammer ble villtype og Δ CAAX celler behandlet med trypsin. Peptidfragmentene ble analysert ved hjelp av LC-MS/MS for å kvantifisere overflateproteinene i de to stammene. Da det ble påvist en redusert mengde av PspA hos Δ CAAX, var det ønskelig å undersøke om dette skyldtes redusert sekresjon slik det ble vist hos *S. aureus*. For å være sikre på at denne reduksjonen ikke skyldtes en forskjell i transkripsjonsraten hos *pspA* ble det utført et luciferase assay, men det ble ikke observert noen forskjeller i transkripsjonsraten (Figur 4.10).

For å undersøke og verifisere resultatene fra LC-MS/MS som viste en redusert sekresjon av PspA i Δ CAAX, ble proteinet FLAG-tagget. FLAG er et kunstig antigen som kan detekteres med kommersielt antistoff. Dette ble brukt istedenfor et antistoff direkte mot PspA. Strukturen til FLAG-taggen er optimalisert i forhold til andre epitop-tagger ved at den er mer hydrofil, og det er derfor mindre sannsynlig at den denaturerer eller forstyrrer foldingen til proteinet den er festet til (Hopp et al., 1988). Cellene ble vasket i 2% kolin før immunoblottingen. PspA binder til celleveggen ved ikke-kovalent forankring til PCho. Ved å tilsette kolin vil kolinet utkonkurrere PCho som fører til at PspA faller av celleveggen. Dermed har vi muligheten til å detektere sekretert PspA i supernatanten. Veldig overraskende viste resultatene fra immunoblottingen ingen reduksjon av sekresjonen til PspA hos stammer uten CAAX-proteiner (Figur 4.11). Celler som uttrykker PspA-FLAG ble også fraksjonert til supernatant, cellemembran og cellevegg for å studere om det er forskjell i proteinmengde i fraksjonene, hovedsakelig mellom cellevegg- og cellemembransfraksjonene. Resultatene viste heller ikke her noen reduksjon av sekresjonen til PspA hos stammer uten CAAX-proteiner (Figur 4.12). Som et siste forsøk for å undersøke om CAAX-proteiner påvirker sekresjonen av PspA ble det laget en *gfp* fusjon direkte til *pspA*. Grunnen til at det var mulig å lage en direkte fusjon av *gfp*

til *pspA*, men ikke til *spd_0817* er antakeligvis fordi *pspA* er fem ganger så høyt uttrykt (Yuzenkova et al., 2014). Mikroskopi viste at PspA lokaliserer til cellepolene, men det var ingen forskjell mellom villtypen og Δ CAAX (Figur 4.13). Dermed kunne ikke den reduserte mengden PspA som ble funnet i Δ CAAX etter trypsin shavingen verifiseres med metodene vi benyttet her. Dette tyder på at CAAX-proteiner ikke påvirker sekresjonen til virulensfaktoren PspA i *S. pneumoniae*.

Resultatene fra disse forsøkene kunne som sagt ikke verifisere funnene fra shavingen av overflateproteiner og LC-MS/MS. Trypsin er en protease som ofte brukes i proteomikk analyser fordi den er relativt spesifikk (kutter alltid på C-siden av lysin eller arginin) og som gir ideelle peptidfragmenter for massespektrometri analyser (Olaya-Abril, Jiménez-Munguía, Gómez-Gascón, & Rodríguez-Ortega, 2014). Metoden for bruk av trypsin i shaving av overflateproteomet er også optimalisert for *S. pneumoniae* (Olaya-Abril, Gómez-Gascón, Jiménez-Munguía, Obando, & Rodríguez-Ortega, 2012), så det er derfor uklart hvorfor vi ikke fikk verifiserte funnene fra shavingen. Shavingen tydet på at sekretert PspA var redusert med > 3 ganger, og dette burde vært klart synlig ved Western blotting.

Frankel et al. (2010) fant en redusert sekresjon av proteiner med YSIRK-ledersekvens hos stammer med inaktiverede CAAX-gener. Da forsøkene med PspA ikke viste redusert sekresjon hos stammer uten CAAX-proteiner var det ønskelig å se på proteiner med YSIRK-ledersekvens i *S. pneumoniae*. PspC er et av flere proteiner i *S. pneumoniae* som har en YSIRK-ledersekvens (Frolet et al., 2010). Dette proteinet er i tillegg et høyt uttrykt protein i C+Y medium slik at det er lett å arbeide med.

PspC er også et kolinbindende protein som er festet til celleveggen ved hjelp av ikke-kovalent forankring til PCho slik som PspA. For å undersøke sekresjonen av proteinet i villtypestammen og Δ CAAX ble PspC FLAG-tagget, men verken immunoblotting fra kolinvaske (Figur 4.15) eller fraksjonering (Figur 4.16) viste noen reduksjon av PspC i Δ CAAX. *pspC* ble også fusert til *gfp*. Mikroskopi viste at PspC danner foci i midten av cellene, men at det ikke er noen forskjell mellom villtypen og Δ CAAX (Figur 4.17). Ut fra de tre sekresjonsforsøkene ser vi at CAAX-proteiner ikke reduserer sekresjonen av YSIRK-protein PspC i *S. pneumoniae*.

Diskusjon

I et siste forsøk på å undersøke om CAAX-proteiner påvirker sekresjonen av virulensfaktorer ble NanA studert. NanA er et protein i *S. pneumoniae* som inneholder en YSIRK-ledersekvens og har et LPxTG-motiv i den C-terminale enden. Ved hjelp av en sortase-katalysert reaksjon bindes proteinet kovalent til celleveggen. YSIRK-proteinene med en redusert sekresjon i Frankel et al. (2010) studien hadde LPxTG-motiver, og det var derfor vi ønsket å studere sekresjonen av NanA. Da NanA-FLAG som ble uttrykt fra eget lokus ikke ble detektert i hele celleekstrakt fra celler dyrket i C+Y medium ble NanA-FLAG ektopisk uttrykt ved hjelp av sink-systemet. Dette ga heller ingen resultater. Fra tidligere forsøk vet vi at sink-systemet fungerer, og det er derfor mest sannsynlig ikke der feilen ligger. En annen mulighet er at alle NanA-FLAG proteinene ble prosessert av sortase, også dette virker lite sannsynlig. Optimalt burde FLAG-sekvensen blitt satt inn rett etter ledersekvensen, slik at den ikke blir fjernet under prosesseringen, men siden NanA ikke ser ut til å uttrykkes under våre labforhold valgte vi å ikke gå videre med dette. Det er derfor uklart hvorfor det ikke uttrykkes, og basert på forsøkene våre kan vi dermed ikke vite om sekresjonen av NanA påvirkes av CAAX-proteiner eller ikke.

I januar 2018 kom gruppen hvor Frankel et al. (2010) studien ble utført ut med en ny artikkel som tar for seg sekresjonen av SpA i *S. aureus* (Yu, Missiakas, & Schneewind, 2018). I stammer hvor CAAX-gener var inaktivert fant Frankel et al. (2010) en reduksjon av virulensfaktoren SpA. I den nye artikkelen hvor de diskuterer nettopp sekresjonen av SpA er ikke CAAX-proteiner nevnt. Dette kan bety at CAAX-proteinene spiller en mindre rolle for sekresjon av SpA, enn det som studien fra 2010 tydet på.

5.4 YSIRK-motivet i ledersekvensen bestemmer lokalisering av sekresjon for kolinbindende proteiner i *S. pneumoniae*

Under arbeidet med PspA og PspC fant vi en interessant forskjell i lokalisering hos disse proteinene. PspA ser hovedsakelig ut til å lokalisere til cellepolene, hvor proteinet er konsentrert til den ene cellepolen hos bakterien (Figur 4.13). PspC derimot danner foci i midten av cellen på begge sider (Figur 4.17). På grunn av deres ulike ledersekvenser ble det undersøkt om YSIRK-ledersekvensen påvirker lokaliseringen. Dette har blitt studert hos LPxTG proteiner i andre bakterier, men det har ennå ikke blitt studert i *S. pneumoniae* eller hos kolinbindende proteiner. Det ser ut som YSIRK-ledersekvensen påvirker lokalisering av LPxTG proteiner i *S. pyogenes* og *S. aureus* (Carlsson et al., 2006; DeDent et al., 2008), men ikke i *S. agalactiae* (Brega et al., 2013).

For å undersøke dette ble PspA sin ledersekvens byttet ut med PspC sin YSIRK-ledersekvens. Ved å bytte ut hele ledersekvensen er det mulig å undersøke om det er ledersekvensen som er ansvarlig for lokaliseringen, eller om det er noe med selve proteinet som gjør at det lokaliserer slik det gjør. Mikroskopi av den nye stammen (PspC^L-PspA) viste at PspA lokaliseringen endret seg fra en polar lokalisering til å danne foci i midten av cellen når ledersekvensen ble byttet ut (Figur 4.19). Resultatet ble forsterket da mikroskopibildene ble analysert, og lokaliseringskartet bekreftet det vi så i mikroskopet (Figur 4.19). Disse resultatene indikerer at YSIRK-ledersekvensen bestemmer lokaliseringen til de kolinbindende proteinene PspA og PspC i *S. pneumoniae*.

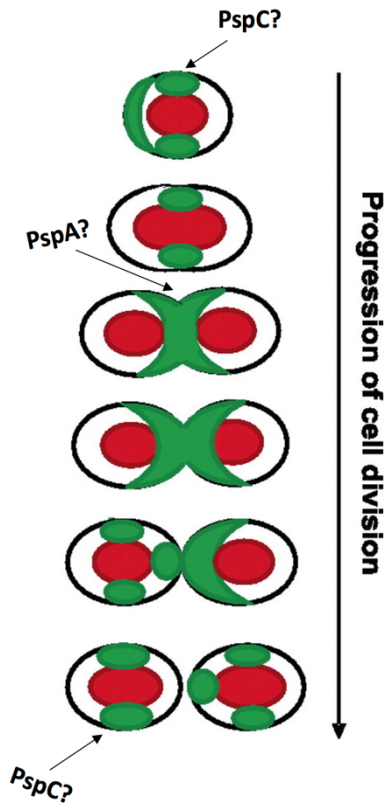
Om det er selve YSIRK-motivet alene som står for denne lokaliseringen er uklart. Det er forsøkt å mutere YSIRK-motivet i *S. agalactiae*, *S. pyogenes* og *S. aureus*, uten at det endret lokaliseringen til proteinene (Carlsson et al., 2006; DeDent et al., 2008; Brega et al., 2013). Dette ble gjort på nytt hos SpA i *S. aureus*, hvor det ser ut som aminosyrene Ser og Arg i YSIRK-motivet og GXXS-motivet er viktig i septal sekresjon hos *S. aureus* (Yu et al., 2018). Hvorvidt YSIRK/GXXS-motivene alene er viktig for lokalisering i *S. pneumoniae* er ennå ikke undersøkt.

Det er foreslått at ledersekvenser kan spille en rolle i transkripsjon, og at de ulike lokaliseringene derfor kan skyldes forskjeller i ekspresjonsnivåer eller polypeptidsyntese/stabilitet (Bierne & Dramsi, 2012). Fra studiene til Carlsson et al. (2006) og DeDent et al. (2008) ser det ut til at proteiner med YSIRK-ledersekvenser er høyt uttrykt proteiner. Dette ser midlertidig ikke ut til å være tilfellet i *S. pneumoniae*. Ut fra våre resultater ser vi at både PspA med normal ledersekvens og PspC med YSIRK-ledersekvens er høyt uttrykte proteiner, mens NanA med YSIRK-ledersekvens ikke er det.

Både PspA og PspC sekreteres via Sec maskineriet, og det ser derfor ut til at proteiner med YSIRK-ledersekvenser bruker sekresjonsmaskinerier som er lokalisert andre steder enn det proteiner med normale ledersekvenser gjør. Dette kan forårsakes av hjelpeproteiner som dirigerer proteiner med ulike ledersekvenser til sekresjonsmaskinerier på ulike steder i cellen. Lokaliseringen til SecA og SecY, som er en del av Sec sekresjonsmaskineriet, har blitt studert i *S. pneumoniae* (Tsui, Keen, Sham, Wayne, & Winkler, 2011). Der så man at lokaliseringen til SecA og SecY endret seg underveis i celledelingen. De lokaliserer til midten av cellen før celledelingen startet og tidlig i celledelingsprosessen. Underveis i celledelingen lokaliserer de

Diskusjon

til septum i en halvmåne-struktur, før de relokaliserte til midten av cellen i nydelte celler (Figur 5.1). Dette lokaliseringsmønsteret fører til at man vil finne SecA og SecY ved nye, men ikke gamle cellepoler.



Figur 5.1: Skjematisk fremstilling av SecA sin lokalisering i *S. pneumoniae*. Det røde representerer DNA, mens det grønne representerer SecA. SecA lokaliserer til midten av cellen før celledeling. Under celledeling lokaliserer den i en halvmåne-struktur i septum av cellen, før den relokaliserte til midten av cellen i nydelte celler. Samme lokaliseringsmønster ble funnet for SecY. Figuren er modifisert fra fra (Tsui et al., 2011). Hvor PspA og PspC muligens sekreteres under celledelingen er indikert.

Ved å studere mikroskopibildene er det tydelig at PspA konsekvent lokaliserer til den ene cellepolen, mens PspC finnes som foci i midten av cellen. Hvis lokaliseringen av SecA og SecY er riktig ser det ut til at PspA sekreteres under celledelingen, mens PspC sekreteres når cellen har delt seg (Figur 5.1). Dette kan forklare de ulike lokaliseringene vi ser. Hvorfor PspA sekreteres tidlig, og PspC sekreteres sent er uklart. PspA er ansvarlig for binding til lactoferrin, slik at bakterien får tatt opp jern. Opptak av jern er viktig for at bakteriene skal få delt seg, og det kan være en mulig grunn til at PspA sekreteres tidlig under celledelingen. Om disse lokaliseringene er viktig for virulens er ennå for tidlig å si.

Proteiner med YSIRK-ledersekvenser ser ut til å sekreteres mer effektivt enn proteiner med normale ledersekvenser i *S. aureus* (Bae & Schneewind, 2003). Dette har enda ikke blitt studert i *S. pneumoniae* og vi var derfor interessert i å undersøke om PspC^L-PspA sekreteres mer effektivt enn PspA. Ved å vaske cellene med kolin og så separere dem i pellet og supernatant vil de sekreterte proteinene detekteres i supernatanten. Ved å sammenligne supernatanten til

PspA og PspC^L-PspA kan vi se forskjeller i sekresjon. Mens PspA-FLAG blottet viste mer PspA i supernatanten enn i pelleten (Figur 4.11), viste PspA-GFP blottet mindre PspA i supernatanten i forhold til pelleten (Figur 4.22). Dette kan tyde på at GFP påvirker sekresjonen av PspA, da dette er et større molekyl enn FLAG-taggen. PspC-FLAG blottet og PspC-GFP blottet viste begge en lik mengde protein i supernatant og pellet (Figur 4.15 og 4.22). Det er mulig at GFP påvirker sekresjonen av PspA, men ikke sekresjonen av PspC da de er ulike proteiner med ulike foldingsmekanismer. Siden sekresjonen av PspA påvirkes av GFP er det ikke mulig å konkludere med at PspC^L-PspA sekreteres mer effektivt eller ikke enn PspA, og dermed ikke om YSIRK-ledersekvenser påvirker graden av sekresjon i *S. pneumoniae*.

Forsøkene i denne oppgaven tyder på at GFP potensielt ser ut til å forstyrre sekresjonen av PspA, og det er derfor vanskelig å konkludere med at YSIRK påvirker sekresjonseffektiviteten eller ikke i *S. pneumoniae*. Alle forsøkene i denne oppgaven er utført med proteiner der PspA eller PspC er fusert til GFP eller FLAG. For å kunne undersøke sekresjonen videre uten potensielt forstyrrende antistoffer, ville det derfor vært en fordel å ha tilgang til antistoff direkte mot PspA og PspC.

6. Konklusjon og videre arbeid

S. pneumoniae koder for 10 CAAX-proteiner som inneholder tre konserverte motiver som tyder sterkt på at de har en eller annen viktig funksjon i bakterien. Arbeidet i denne oppgaven viste at CAAX-genene kan fjernes fra *S. pneumoniae* D39 uten at dette påvirker vekst, celledeling, sensitivitet mot bredspektrede antimikrobielle peptider eller proteinsekresjon. Under arbeidet med karakterisering av CAAX-proteinene ble det desverre funnet lite som ga oss en indikasjon på deres funksjon i *S. pneumoniae*. Siden det ga oss lite resultater ved å dyrke mutantene under laboratorieforhold, vil en mulig strategi for å karakteriser disse proteinene videre, være å undersøke mutantene ytterligere *in vivo*. Under arbeidet ønsket vi å teste mutantenes evne til å danne biofilm, men metoden vi hadde til bruk var ikke sensitiv nok til å detektere forskjeller. Et naturlig skritt videre ville vært og undersøkt biofilmdannelse eller hvordan disse proteinene påvirker kolonisering og virulens hos *S. pneumoniae*.

De 10 CAAX-genene i *S. pneumonaie* finnes i ulike operon. Det ble også observert en forskjell i subcellulær lokalisering hos CAAX-proteinene. Noen proteiner lokaliserer jevnt rundt cellemembranen og i septum, mens andre er mer konsentrerte kun i septum. Dette tyder på at disse proteinene har ulike funksjoner i cellen.

I denne oppgaven ble det også for første gang vist hvordan ledersekvenser bestemmer lokalisering av sekresjon i *S. pneumoniae*. Mens PspA, som har en normal hydrofob ledersekvens, lokaliserer i en halvmåne-struktur på den ene cellepolen, dannet YSIRK-proteinet PspC foci i midten av cellen. Dette er også første gangen det har blitt vist at YSIRK-motiver kan påvirke lokalisering av kolinbindende proteiner. Tidligere har dette kun blitt vist i andre bakterier (*S. aureus* og *S. pyogenes*) for kovalent forankrede proteiner (LPxTG-proteiner). Mekanismen bak denne lokaliseringen er fortsatt ukjent, men resultatene våre tyder på at disse proteinene blir sekretert på ulike stadier av celledelingen. For å videre undersøke dette fenomenet hadde det vært interessant og byttet ut PspC sin YSIRK ledersekvens med PspA sin normale ledersekvens, i tillegg til å mutere YSIRK-motivet for å se om dette endret lokaliseringen. Videre for å undersøke om PspA sekreteres tidlig under celledelingen, mens PspC sekreteres sent hos nydelte celler ville det vært interessant og undersøkt dette ved bruk av fluorescens timelaps-mikroskopi, der PspA og PspC er merket med ulike fluorescerende proteiner.

7. Referanser

- Aprianto, R., Slager, J., Holsappel, S., & Veening, J.-W. (2018). High-resolution analysis of the pneumococcal transcriptome under a wide range of infection-relevant conditions. *BioRxiv*, 283739.
- Bae, T., & Schneewind, O. (2003). The YSIRK-G/S motif of staphylococcal protein A and its role in efficiency of signal peptide processing. *Journal of Bacteriology*, 185(9), 2910-2919.
- Balachandran, P., Hollingshead, S. K., Paton, J. C., & Briles, D. E. (2001). The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3108-3116.
- Baldwin, T. O. (1996). Firefly luciferase: The structure is known, but the mystery remains. *Structure*, 4(3), 223-228.
- Banas, J. A., Russell, R., & Ferretti, J. (1990). Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 58(3), 667-673.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., & Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 168-207.
- Berg, K. H., Bjørnstad, T. J., Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2012). Properties and biological role of streptococcal fratricins. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3515-3522.
- Berg, K. H., Stamsås, G. A., Straume, D., & Håvarstein, L. S. (2013). Effects of low Pbp2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Bacteriology*, 195(19), 4342-4354.
- Bergmann, S., & Hammerschmidt, S. (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*, 152(2), 295-303.
- Bierne, H., & Dramsi, S. (2012). Spatial positioning of cell wall-anchored virulence factors in gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), 715-723.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1496-1500.
- Bogaert, D., de Groot, R., & Hermans, P. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(3), 144-154.
- Bogaert, D., Engelen, M. N., Timmers-Reker, A. J., Elzenaar, K. P., Peerbooms, P. G., Coutinho, R. A., . . . Hermans, P. W. (2001). Pneumococcal carriage in children in the netherlands: A molecular epidemiological study. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3316-3320.
- Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D., & Mengin-Lecreulx, D. (2007). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 208-233.
- Brega, S., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2013). SecA localization and SecA-dependent secretion occurs at new division septa in group B *Streptococcus*. *PLoS ONE*, 8(6), e65832.
- Bullen, J., Rogers, H. J., & Griffiths, E. (1978). Role of iron in bacterial infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (s. 1-35). New York, USA: Springer.

- Campbell, E. A., Choi, S. Y., & Masure, H. R. (1998). A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Molecular Microbiology*, 27(5), 929-939.
- Carlsson, F., Stålhammar-Carlemalm, M., Flärdh, K., Sandin, C., Carlemalm, E., & Lindahl, G. (2006). Signal sequence directs localized secretion of bacterial surface proteins. *Nature*, 442(7105), 943-946.
- Datta, V., Myskowski, S. M., Kwinn, L. A., Chiem, D. N., Varki, N., Kansal, R. G., . . . Nizet, V. (2005). Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. *Molecular Microbiology*, 56(3), 681-695.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M. K., & McDaniel, L. S. (2001). PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infection and Immunity*, 69(5), 3435-3437.
- DeDent, A., Bae, T., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2008). Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of *Staphylococcus aureus*. *The EMBO Journal*, 27(20), 2656-2668.
- Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R., & Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: Lessons from genomes. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 344-358.
- Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562-1574.
- Dinh, T., & Bernhardt, T. G. (2011). Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. *Journal of Bacteriology*, 193(18), 4984-4987.
- Douglas, R., Paton, J., Duncan, S., & Hansman, D. (1983). Antibody response to pneumococcal vaccination in children younger than five years of age. *Journal of Infectious Diseases*, 148(1), 131-137.
- Dramsi, S., Davison, S., Magnet, S., & Arthur, M. (2008). Surface proteins covalently attached to peptidoglykan: Examples from both gram-positive and gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*.
- Ducret, A., Quardokus, E. M., & Brun, Y. V. (2016). MicrobeJ, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nature Microbiology*, 1, 16077.
- 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.
- Edgar, R. C. (2004). Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Fernebro, J. (2007). *Genetic approaches towards understanding pneumococcal virulence and biology*. Stockholm, Sverige: Institutionen för mikrobiologi, tumör-och cellbiologi/Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology.
- Filipe, S. R., Severina, E., & Tomasz, A. (2001). Functional analysis of *Streptococcus pneumoniae* murM reveals the region responsible for its specificity in the synthesis of branched cell wall peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39618-39628.

- Firon, A., Tazi, A., Da Cunha, V., Brinster, S., Sauvage, E., Dramsi, S., . . . Trieu-Cuot, P. (2013). The ABI-domain protein Abx1 interacts with the CovS histidine kinase to control virulence gene expression in group B *Streptococcus*. *PLOS Pathogens*, *9*(2), e1003179.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., . . . Kuru, E. (2014). MapZ marks the division sites and positions FtsZ rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*, *516*(7530), 259.
- Folkehelseinstituttet. (2015). *Anbefalinger for bruk av pneumokokkvaksine utenfor barnevaksinasjonsprogram i norge*. (2015:7). Hentet fra <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/rapport-20157-pdf.pdf>.
- Folkehelseinstituttet. (2017). Pneumokokkvaksine - veileder for helsepersonell. Hentet fra <https://www.fhi.no/nettpub/vaksinasjonsveilederen-for-helsepersonell/vaksiner-mot-de-enkelte-sykdommene/pneumokokkvaksinasjon---veileder-fo/#pneumokokkinfeksjon>
- Frankel, M. B., Wojcik, B. M., DeDent, A. C., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2010). ABI domain-containing proteins contribute to surface protein display and cell division in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, *78*(1), 238-252.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernet, T., & Di Guilmi, A. M. (2010). New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiology*, *10*(1), 190.
- Garg, N., Oman, T. J., Wang, T.-S. A., De Gonzalo, C. V. G., Walker, S., & Van Der Donk, W. A. (2014). Mode of action and structure–activity relationship studies of geobacillin I. *The Journal of Antibiotics*, *67*(1), 133.
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., & Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, *312*(5771), 217-224.
- Gilmore, K., Russell, R., & Ferretti, J. (1990). Analysis of the *Streptococcus downei* *gtfA* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infection and Immunity*, *58*(8), 2452-2458.
- Goehring, N. W., & Beckwith, J. (2005). Diverse paths to midcell: Assembly of the bacterial cell division machinery. *Current Biology*, *15*(13), R514-R526.
- Gosink, K. K., Mann, E. R., Guglielmo, C., Tuomanen, E. I., & Masure, H. R. (2000). Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *68*(10), 5690-5695.
- Green, E. R., & Mecsas, J. (2016). Bacterial secretion systems—an overview. *Microbiology Spectrum*, *4*(1).
- Hammerschmidt, S. (2007). *Molecular Biology of Streptococci*. Poole, Great Britan: Horizon Scientific Press.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P. H., & Chhatwal, G. S. (1999). Identification of pneumococcal surface protein a as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, *67*(4), 1683-1687.
- Hammerschmidt, S., Tillig, M. P., Wolff, S., Vaerman, J. P., & Chhatwal, G. S. (2000). Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Molecular Microbiology*, *36*(3), 726-736.

- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Müller, E., & Rohde, M. (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity*, 73(8), 4653-4667.
- Hansman, D., & Bullen, M. (1967). A resistant pneumococcus. *The Lancet*, 290(7509), 264-265.
- Hardie, J., & Whiley, R. (1995). The genus *Streptococcus* *The genera of lactic acid bacteria* (s. 55-124): Springer.
- Hardie, J., & Whiley, R. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 83(S1).
- Hare, K. M., Morris, P., Smith-Vaughan, H., & Leach, A. J. (2008). Random colony selection versus colony morphology for detection of multiple pneumococcal serotypes in nasopharyngeal swabs. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(2), 178-180.
- Henriques-Normark, B. (2007). *Molecular Biology of Streptococci*. Poole, Great Britain: Horizon Scientific Press.
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(7), a010215.
- Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 16(15), 7351-7367.
- Hofmann, K. (1993). Tmbase-a database of membrane spanning proteins segments. *The Journal of Biological Chemistry. Hoppe-Seyley*, 374, 166.
- Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Cerretti, D. P., . . . Conlon, P. J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nature Biotechnology*, 6(10), 1204.
- Howard, L. V., & Gooder, H. (1974). Specificity of the autolysin of *Streptococcus* (diplococcus) *pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 117(2), 796-804.
- Iannelli, F., Oggioni, M. R., & Pozzi, G. (2002). Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, 284(1), 63-71.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjørnstad, M. L., & Håvarstein, L. S. (2008). A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology*, 69(1), 245-253.
- Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2009a). Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 191(18), 5859-5864.
- Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2009b). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 627-642.
- 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 406-408.
- Kim, E., Ambroziak, P., Otto, J. C., Taylor, B., Ashby, M., Shannon, K., . . . Young, S. G. (1999). Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8383-8390.
- King, S. J., Hippe, K. R., & Weiser, J. N. (2006). Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 59(3), 961-974.
- Kjos, M., Miller, E., Slager, J., Lake, F. B., Gericke, O., Roberts, I. S., . . . Veening, J.-W. (2016). Expression of *Streptococcus pneumoniae* bacteriocins is induced by antibiotics via regulatory interplay with the competence system. *PLOS Pathogens*, 12(2), e1005422.
- Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2010). The ABI proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *Journal of Bacteriology*, 192(8), 2068-2076.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452-1456.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes¹. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-580.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J. A., . . . Monasterio, O. (2001). Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Molecular Microbiology*, 42(1), 229-243.
- Laurenceau, R., Péhau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., . . . Claverys, J.-P. (2013). A type IV pilus mediates DNA binding during natural transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS Pathogen*, 9(6), e1003473.
- Lee, M. S., & Morrison, D. A. (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 5004-5016.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*(62).
- Lesk, A. M. (2016). *Introduction to protein science: Architecture, function, and genomics*. Oxford, United Kingdom: Oxford university press.
- Liu, X., Gallay, C., Kjos, M., Domenech, A., Slager, J., van Kessel, S. P., . . . Veening, J. W. (2017). High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Systems Biology*, 13(5), 931.
- Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R., & Reichmann, P. (2007). Diversity of bacteriocins and activity spectrum in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 189(21), 7741-7751.
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429.

- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J. C., & Wold, A. E. (2008). Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infection and Immunity*, 76(9), 4079-4087.
- Mathews, K. C., Van Holde, K. E., Appling, D. R., & Anthony-Cahill, S. J. (2013). *Biochemistry*. New Jersey, USA: Pearson Canada Inc.
- McDaniel, L. S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W. R., & Briles, D. E. (1987). Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein a (PspA). *Journal of Experimental Medicine*, 165(2), 381-394.
- Meeske, A. J., Riley, E. P., Robins, W. P., Uehara, T., Mekalanos, J. J., Kahne, D., . . . Rudner, D. Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature*, 537(7622), 634.
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., . . . Henriques-Normark, B. (2012). LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11018-11029.
- Ming, L.-J., & Epperson, J. D. (2002). Metal binding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 46-58.
- Mitchell, A. M., & Mitchell, T. J. (2010). *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 411-418.
- Mohammadi, T., Van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., . . . Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal*, 30(8), 1425-1432.
- Moreno-Gámez, S., Sorg, R. A., Domenech, A., Kjos, M., Weissing, F. J., Doorn, G. S., & Veening, J.-W. (2017). Quorum sensing integrates environmental cues, cell density and cell history to control bacterial competence. *Nature Communications*, 8(1), 854.
- Morsczeck, C., Prokhorova, T., Sigh, J., Pfeiffer, M., Bille-Nielsen, M., Petersen, J., . . . Nyborg-Nielsen, P. (2008). *Streptococcus pneumoniae*: Proteomics of surface proteins for vaccine development. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 74-81.
- Musher, D. M. (1992). Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 801-807.
- Nelson, A. L., Roche, A. M., Gould, J. M., Chim, K., Ratner, A. J., & Weiser, J. N. (2007). Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and Immunity*, 75(1), 83-90.
- Neuhaus, F. C., & Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 686-723.
- Oggioni, M. R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S., . . . Pozzi, G. (2006). Switch from planktonic to sessile life: A major event in pneumococcal pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1196-1210.
- Ogunniyi, A. D., Grabowicz, M., Briles, D. E., Cook, J., & Paton, J. C. (2007). Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 75(1), 350-357.

- Ogunniyi, A. D., LeMessurier, K. S., Graham, R. M., Watt, J. M., Briles, D. E., Stroehner, U. H., & Paton, J. C. (2007). Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein a (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infection and Immunity*, *75*(4), 1843-1851.
- Olaya-Abril, A., Gómez-Gascón, L., Jiménez-Munguía, I., Obando, I., & Rodríguez-Ortega, M. J. (2012). Another turn of the screw in shaving gram-positive bacteria: Optimization of proteomics surface protein identification in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteomics*, *75*(12), 3733-3746.
- Olaya-Abril, A., Jiménez-Munguía, I., Gómez-Gascón, L., & Rodríguez-Ortega, M. J. (2014). Surfomics: Shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *Journal of Proteomics*, *97*, 164-176.
- Omasits, U., Ahrens, C. H., Müller, S., & Wollscheid, B. (2013). Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, *30*(6), 884-886.
- Overkamp, W., Beilharz, K., Weme, R. D. O., Solopova, A., Karsens, H., Kovács, Á. T., . . . Veening, J.-W. (2013). Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(20), 6481-6490.
- Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A. J., & Prince, A. (2009). The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infection and Immunity*, *77*(9), 3722-3730.
- Paton, J. C., Andrew, P. W., Boulnois, G. J., & Mitchell, T. J. (1993). Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins. *Annual Reviews in Microbiology*, *47*(1), 89-115.
- Pei, J., & Grishin, N. V. (2001). Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(5), 275-277.
- Pei, J., Mitchell, D. A., Dixon, J. E., & Grishin, N. V. (2011). Expansion of type II CAAX proteases reveals evolutionary origin of γ -secretase subunit APH-1. *Journal of Molecular Biology*, *410*(1), 18-26.
- Pinho, M. G., Kjos, M., & Veening, J.-W. (2013). How to get (a) round: Mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(9), 601.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., & Claverys, J.-P. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, *313*(5783), 89-92.
- Quin, L. R., Carmicle, S., Dave, S., Pangburn, M. K., Evenhuis, J. P., & McDaniel, L. S. (2005). In vivo binding of complement regulator factor H by *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, *192*(11), 1996-2003.
- Ren, B., Szalai, A. J., Hollingshead, S. K., & Briles, D. E. (2004). Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infection and Immunity*, *72*(1), 114-122.
- Rijkers, G., Sanders, E., Breukels, M., & Zegers, B. (1998). Infant B cell responses to polysaccharide determinants. *Vaccine*, *16*(14-15), 1396-1400.

- Rogers, H. J., Perkins, H. R., & Ward, J. B. (1980). *Microbial cell walls and membranes*. London, United Kingdom: Chapman and Hall London.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., & Masure, H. R. (1997). Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 25(5), 819-829.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saito, T., Okano, K., Park, H.-D., Itayama, T., Inamori, Y., Neilan, B. A., . . . Sugiura, N. (2003). Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 271-276.
- Salles, C., Creancier, L., Claverys, J.-P., & Mejean, V. (1992). The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6103.
- Sanchez-Beato, A. R., Ronda, C., & Garcia, J. L. (1995). Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain: Molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *Journal of Bacteriology*, 177(4), 1098-1103.
- Sandgren, A., Sjöström, K., Liljequist, B. O., Christensson, B., Samuelsson, A., Kronvall, G., & Normark, B. H. (2004). Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Infectious Diseases*, 189(5), 785-796.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Schmid, B. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676.
- Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D., & Model, P. (1993). Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *The EMBO Journal*, 12(12), 4803.
- Schneewind, O., & Missiakas, D. M. (2012). Protein secretion and surface display in gram-positive bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367(1592), 1123-1139.
- Scientific, T. (2017). Anaerogen. Hentet fra http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=AN0035&cat=&sec=2&c=UK&lang=EN
- Silhavy, T. J., Benson, S. A., & Emr, S. D. (1983). Mechanisms of protein localization. *Microbiological Reviews*, 47(3), 313.
- Slager, J., Kjos, M., Attaiech, L., & Veening, J.-W. (2014). Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell*, 157(2), 395-406.
- Spratt, B. G., & Greenwood, B. M. (2000). Prevention of pneumococcal disease by vaccination: Does serotype replacement matter? *The Lancet*, 356(9237), 1210-1211.

- Straume, D., Stamsås, G. A., & Håvarstein, L. S. (2015). Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, *33*, 371-380.
- Straume, D., Stamsås, G. A., Salehian, Z., & Håvarstein, L. S. (2017). Overexpression of the fratricide immunity protein ComM leads to growth inhibition and morphological abnormalities in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, *163*(1), 9-21.
- Studio, R. (2012). RStudio: Integrated development environment for R. *RStudio Inc, Boston, Massachusetts*.
- Sung, C., Li, H., Claverys, J., & Morrison, D. (2001). An *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(11), 5190-5196.
- Sørensen, U. S., Blom, J., Birch-Andersen, A., & Henriksen, J. (1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infection and Immunity*, *56*(8), 1890-1896.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., . . . Carmeli, Y. (2017). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., . . . Dodson, R. J. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 498-506.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2013). *Microbiology an introduction* New Jersey, USA: Pearson Education, Inc.
- Tsui, H.-C. T., Keen, S. K., Sham, L.-T., Wayne, K. J., & Winkler, M. E. (2011). Dynamic distribution of the SecA and SecY translocase subunits and septal localization of the HtrA surface chaperone/protease during *Streptococcus pneumoniae* D39 cell division. *MBio*, *2*(5), e00202-00211.
- van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet*, *374*(9700), 1543-1556.
- van Opijnen, T., & Camilli, A. (2012). A fine scale phenotype–genotype virulence map of a bacterial pathogen. *Genome Research*, *22*(12), 2541-2551.
- van Raaphorst, R., Kjos, M., & Veening, J.-W. (2017). Chromosome segregation drives division site selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(29), E5959-E5968.
- Vollmer, W. (2007). *Molecular Biology of Streptococci*. Poole, Great Britain: Horizon Scientific Press.
- von Eichel-Streiber, C., & Sauerborn, M. (1990). *Clostridium difficile* toxin A carries a c-terminal repetitive structure homologous to the carbohydrate binding region of streptococcal glycosyltransferases. *Gene*, *96*(1), 107-113.
- Walker, J. M. (1996). *The protein protocols handbook*. Dordrecht, Nederland: Springer Science & Business Media.
- Wang, M., & Casey, P. J. (2016). Protein prenylation: Unique fats make their mark on biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(2), 110-122.

Referanser

- Weidenmaier, C., & Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 276.
- WHO. (2011). Pneumococcal disease. Hentet fra http://www.who.int/immunization/topics/pneumococcal_disease/en/
- WHO. (2016). Pneumonia. Hentet fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>
- WHO. (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Hentet fra <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>
- Wingfield, P. (1998). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 13(1), A. 3F. 1-A. 3F. 8.
- Yu, W., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2018). Septal secretion of protein A in *Staphylococcus aureus* requires SecA and lipoteichoic acid synthesis. *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/245522>
- Yuzenkova, Y., Gamba, P., Herber, M., Attaiech, L., Shafeeq, S., Kuipers, O. P., . . . Veening, J.-W. (2014). Control of transcription elongation by GreA determines rate of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10987-10999.
- Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 345-360.

Vedlegg

Vedleggsinnhold

VEDLEGG A – Stammeliste	II
VEDLEGG B – Primerliste	V
VEDLEGG C – Rapid ID 32 Strep test	VIII
VEDLEGG D - Membranprediksjon av CAAX-proteinene	IX
VEDLEGG E – SDS-PAGE geler	XI
E.1 PspA-FLAG (kolinvaske)	XI
E.2 PspA-FLAG (fraksjonerte celler).....	XI
E.3 PspC-FLAG (kolinvaske).....	XII
E.4 PspC-FLAG (fraksjonerte celler).....	XII
E.5 PspA med PspC ledersekvens (kolinvaske)	XIII
VEDLEGG F - Materialer	XIV
F. 1 Kjemikalieliste	XIV
F.2 Utstyrliste	XVI
F.3 Dataprogrammer.....	XVII
F.4 Kit.....	XVIII
F.5 Antibiotika	XVIII
F.6 Antistoffer.....	XIX
VEDLEGG H - Forkortelser	XX

VEDLEGG A – Stammeliste

I tabell A.1 vises en stammeliste av *S. pneumoniae* og *E. coli* som ble brukt og laget under oppgaven.

Tabell A.1: *S. pneumoniae* og *E. coli* stammeliste som viser hvilke stammer som ble brukt og laget under oppgaven. Hvilke typer antibiotika de er resistent mot er indikert.

Stammenavn	Bakterie	Genotype	Kilde/Referanse
D39	<i>S. pneumoniae</i>	Villtypestamme	
SPMK13	<i>S. pneumoniae</i>	D39, <i>rpsL1</i> , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK17	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_0268 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK25	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_0172 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK33	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_0146-7 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK50	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_1944 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK58	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_1180 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK59	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_0473 , Δspd_0475 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK63	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_1097 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK64	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men Δspd_0817 , Sm ^R	Morten Kjos
SPMK78	<i>S. pneumoniae</i>	Alle CAAX gener deletert, Sm ^R	Morten Kjos
DH5 α	<i>E. coli</i>	Villtypestamme	Invitrogen
RH425	<i>S. pneumoniae</i>	<i>comA::erm</i> – <i>eryR</i> , Sm ^R	(Johnsborg & Håvarstein, 2009a)
SPMK77	<i>S. pneumoniae</i>	RH425, men alle CAAX-gener deletert, Sm ^R	Morten Kjos
Hermans-33	<i>S. pneumoniae</i>	Villtypestamme	(Bogaert et al., 2001)
SPMK48	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men $\Delta spd_0817::janus$, Kan ^R	Morten Kjos
SPMK92	<i>S. pneumoniae</i>	RH425, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	Morten Kjos
SPMK95	<i>S. pneumoniae</i>	RH425, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	Morten Kjos
SPMK98	<i>S. pneumoniae</i>	RH425, men <i>papA_luc</i> , Sm ^R	Morten Kjos
CSH1	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH2	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH3	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH4	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspA</i> -FLAG Sm ^R	
CSH5	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspA_luc</i> , Sm ^R	
CSH6	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>pspA_luc</i> , Sm ^R	
CSH7	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH8	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK64, men <i>spd_0817-gfp</i> , Sm ^R	
CSH9	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK17, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH10	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK25, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH11	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK33, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH12	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK50, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH13	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK58, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	
CSH14	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK59, men <i>pspA</i> -Janus, Kan ^R	

Stammenavn	Bakterie	Genotype	Referanse
CSH17	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK17, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH18	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK25, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH19	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK33, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH20	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK50, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH21	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK58, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH22	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK59, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH23	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK63, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH24	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK64, men <i>pspA</i> -FLAG, Sm ^R	
CSH25	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>nanA</i> -FLAG, Kan ^R	
CSH26	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>nanA</i> -FLAG, Kan ^R	
CSH27	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>nanA</i> -FLAG, Kan ^R	
CSH28	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_0817</i> insert, Amp ^R	
CSH29	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK64, men <i>bgaA::gfp-spd_0817</i> , Tet ^R	
CSH30	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::P_{zn}-nanA</i> -FLAG, Tet ^R	
CSH31	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>bgaA::P_{zn}-nanA</i> -FLAG, Tet ^R	
CSH32	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>bgaA::P_{zn}-nanA</i> -FLAG, Tet ^R	
CSH33	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>pspC</i> -FLAG, Kan ^R	
CSH34	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspC</i> -FLAG, Kan ^R	
CSH35	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>pspC</i> -FLAG, Kan ^R	
CSH36	<i>E. coli</i>	DH5 α , pKB0I med <i>nanA</i> -FLAG insert, Amp ^R	
130	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>pspA-gfp</i> , Cam ^R	Morten Kjos
131	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspA-gfp</i> , Cam ^R	Morten Kjos
132	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>pspA-gfp</i> , Cam ^R	Morten Kjos
133	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>pspC-gfp</i> , Cam ^R	Morten Kjos
134	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspC-gfp</i> , Cam ^R	Morten Kjos
135	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK78, men <i>pspC-gfp</i> , Cam ^R	Morten Kjos
CSH37	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_1097</i> insert, Amp ^R	
CSH38	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_1944</i> insert, Amp ^R	
CSH39	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_1180</i> insert, Amp ^R	
CSH40	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_0147</i> insert, Amp ^R	
CSH41	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_0146</i> insert, Amp ^R	
CSH42	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_0172</i> insert, Amp ^R	
CSH43	<i>E. coli</i>	DH5 α , pCG6 med <i>spd_0268</i> insert, Amp ^R	

Vedlegg

Stammenavn	Bakterie	Genotype	Referanse
CSH44	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_1097</i> , Tet ^R	
CSG45	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_1944</i> , Tet ^R	
CSH46	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_1180</i> , Tet ^R	
CSH47	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_0147</i> , Tet ^R	
CSH48	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_0146</i> , Tet ^R	
CSH49	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_0172</i> , Tet ^R	
CSH50	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::gfp-spd_0268</i> , Tet ^R	
CSH56	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspA::Janus</i> , Kan ^R	
CSH57	<i>S. pneumoniae</i>	SPMK13, men <i>pspA</i> med <i>pspC</i> ledersekvens- <i>gfp</i> , Cam ^R	
CSH58	<i>S. pneumonaie</i>	D39, men <i>bgaA::spd_0146-gfp</i> , Tet ^R	
CSH59	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::spd_0147-gfp</i> , Tet ^R	
CSH60	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::spd_0268-gfp</i> , Tet ^R	
CSH61	<i>S. pneumoniae</i>	D39, men <i>bgaA::spd_0172-gfp</i> , Tet ^R	
CSH62	<i>E. coli</i>	DH5α, pMK17 med <i>spd_0146</i> insert, Amp ^R	
CSH63	<i>E. coli</i>	DH5α, pMK17 med <i>spd_0147</i> insert, Amp ^R	
CSH64	<i>E. coli</i>	DH5α, pMK17 med <i>spd_0268</i> insert, Amp ^R	
CSH65	<i>E. coli</i>	DH5α, pMK17 med <i>spd_0172</i> insert, Amp ^R	

Sm = streptomycin, Kan = kanamycin, Cam= kloramfenikol, Tet= tetrasyklin, Amp= ampicillin
 _ (understrek) betyr transkripsjonsfusjon
 - (bindestrek) betyr translasjonsfusjon

VEDLEGG B – Primerliste

I tabell B.1 vises en liste over primere som ble brukt under oppgaven.

Tabell B.1: Liste over primere som ble brukt i oppgaven. Restriksjonssteder er uthevet.

Beskrivelse	Primer- navn	Sekvens (5' → 3')
Amplifisering til <i>spd_0817- gfp</i> konstrukt	Mk137	GATTGGGCTTTCCACCGAG
	Mk140	GGCGTCCGTCGCTCCA
	CSH3	TCTAGAGGATCTGGTGGAGAAG
	CSH4	TTACTTATAAAGCTCATCCATGC
	CSH5	CTTCTCCACCAGATCCTCTAGA ACTTCTGAAAATAG- GAGTAACCA
	CSH6	GCATGGATGAGCTTTATAAGTAACTTACTAAAAAAT- GTCGGAATTT
Amplifisering til <i>pspA- Janus, pspA- luc, pspA- FLAG</i>	Mk249	GAAGATCAACTTAAAGCTGCTGA
	Mk252	ATCCCTGTCGAGTCTTTCTTC
Amplifisering til <i>nanA- FLAG</i> konstrukt	CSH9	ATCCATACGATGCACGAAGG
	CSH10	TTATTTATCATCATCATCTTTATAATCAATATCATGA- TCTTTATAATCACCATCATGATCTTTATAATCTTGTT- CTCTCTTTTTCCCTAG
	CSH11	TATAAAGATGATGATGATAAATAAAAGATCCACTAG- TCGCAAGCTGGGG
	CSH14	TCCCCATTCTTCTGTCTAGCAT
	CSH16	CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTAAGAGAAGAATT- CTAAACATTTGATTTTG
	CSH17	TGAGTTGACTTGGCTCAAACA
	CSH18	CTTATCTACAACCTCAAAGCG
	Mk283	GGTACTAAAACAATTCATCCAG
Amplifisering til <i>pzn-nanA- FLAG</i> konstrukt	CSH21	ACGTGGATCCGCGGGCCGCGGTAGGAGCGGTTTCT- ATG
	CSH14	TCCCCATTCTTCTGTCTAGCAT
Amplifisering til <i>pspC- FLAG-kan</i> konstrukt	CSH15	TTGATTATAAAGATGATGATGATAAATAAGGATCCG- TTTGATTTTAAATGGA
	Mk283	GGTACTAAAACAATTCATCCAG
	CSH22	TTATTTATCATCATCATCTTTATAATCAATATCATGAT- CTTTATAATCACCATCATGATCTTTATAATCGTTTACC- CATTCCATTGGC
	CSH24	CGCCGTA ACTACCCAACCA
	CSH28	CTCAGCCTTTCGTACCATCG
	CSH30	CTGGATGAATTGTTTTAGTACCTAACTAGTTAATACT- GACTTCCTGT

Vedlegg

Beskrivelse	Primer- navn	Sekvens (5' → 3')
Amplifisering til <i>gfp- spd_0817</i> konstrukt	CSH19	ATCGGGATCCATGAAAAACGGGCTATTCAAAT
	CSH20	ATCGCGGCCGCTAACTTCCTGAAAATAGGAGT
Amplifisering til <i>gfp- spd_0268</i> konstrukt	CSH31	ATCGGGATCCTGGAAAGAATTGTTGAATCGTG
	CSH32	ATCGCGGCCGCTTACACAGAAATTCCTAATGTC
Amplifisering til <i>gfp- spd_0172</i> konstrukt	CSH33	ATCGGGATCCATGTCTAACAAAAATAAGGGAATT
	CSH34	ATCGCGGCCGCTCATTCTACTATACTGATAGCTAA
Amplifisering til <i>gfp- spd_0146</i> konstrukt	CSH35	ATCGGGATCCAAGAAAATGAAAGAAGTGAAATTT
	CSH36	ATCGCGGCCGCTAATATCCAAATACCAATAAAGT
Amplifisering til <i>gfp- spd_0147</i> konstrukt	CSH37	ATCGTCTAGAAAAAAGATAATCTCACACCGCT
	CSH38	ATCGCGGCCGCTTACAGTAACATCAAAAGCTGAC
Amplifisering til <i>gfp- spd_1944</i> konstrukt	CSH39	ATCGGGATCCAAATTACTTAAAAACCTTGGCTGG
	CSH40	ATCGCGGCCGCTTATAGCATGAGAATCATCAAAAA
Amplifisering til <i>gfp- spd_1180</i> konstrukt	CSH41	ATCGGGATCCAAAAGAATAATTCCAGTTTATATAT
	CSH42	ATCGCGGCCGCTTAAAAAAGCAGCAAACCTATAAAC
Amplifisering til <i>gfp- spd_1097</i> konstrukt	CSH43	ATCGGGATCCAAGAACAAGAATATTTAAAGACT
	CSH44	ATCGCGGCCGCTCACATCCTTTCATTTTCTTTCTT
Sjekkprimere til pCG6 og pMK17	Mk70	AGCGTGACCACATGGTGCT
	Mk71	CGACCGGCGCTCAGCGA
	Mk78	GCTGCTGATACGGCGGTC
Primere til Januskasset	JanusF	GTTTGATTTTTAATGGATAATGTG
	JanusR	CTTTCCTTATGCTTTTGGAC
Primere til <i>gfp</i>	CSH3	TCTAGAGGATCTGGTGGAGAAG
	CSH4	TACTTATAAAGCTCATCCATGC
Amplifisering til <i>ΔpspA::Janus</i>	CSH51	AAAATCAATTGACAGATGCTAC
	CSH52	GGATAAACCTAAAAGTAATATAGT
	CSH53	CACATTATCCATTA AAAATCAAACCTAAATTTACCT- CTTTTCTGATAG
	JanusF	GTTTGATTTTTAATGGATAATGTG
	Mk252	ATCCCTGTCGAGTCTTTCTTC

Beskrivelse	Primer- navn	Sekvens (5'→3')
Amplifisering til <i>pspC</i> (leder)– <i>pspA</i> (mature) – <i>gfp-cam</i>	CSH45	TAGCTACTCCAATACTAAATTTACGAATTGAATAATG- TACTTTTCTTTTCGCTTTTGGATGCAAACATCTAAATTT- ACCTCTTTTCTGATAGT
	CSH46	CGTAAATTTAGTATTGGAGTAGCTAGTGTAGCTGTTG- CCAGTCTTGTTATGGGAAGTGTGGTTCATGCGACAGA- AGAATCTCCCGTAGCCAGTC
	CSH52	GGATAAACCTAAAAGTAATATAGT
	Mk252	ATCCCTGTTCGAGTCTTTCTTC
	Mk290	GGATCTGGTGGAGAAGCTGCA
Amplifisering til <i>spd_0268</i> - <i>gfp</i> konstrukt	CSH54	ATCGGCGGCCGCAGGAGATAGGTGATGAAAGAGA
	CSH55	ATCGTCTAGACACAGAAATTCCTAATGTCCG
Amplifisering til <i>spd_0172</i> - <i>gfp</i> konstrukt	CSH56	ATCGGCGGCCGCAGTGGAAAGGTCTTAAATGAT
	CSH57	ATCGTCTAGATTTTACTATACTGATAGCTAAAATG
Amplifisering til <i>spd_0146</i> - <i>gfp</i> konstrukt	CSH58	ATCGGCGGCCGCAGGAGATAATAGGATGAAGAAA
	CSH59	ATCGTCTAGAATATCCAAATACCAATAAAGTAAC
Amplifisering til <i>spd_0147</i> - <i>gfp</i> konstrukt	CSH60	ATCGGCGGCCGCAGGTGATATATGAAAAAGATAATC
	CSH61	ATCGTCTAGACAGTAACATCAAAGCTGACC
Sjekkprimere til integrering i <i>bgaA</i>	Mk311	CTTGATGAAACCTACATTTG
	Mk312	GCTTCCATTAAGGATAGTTC

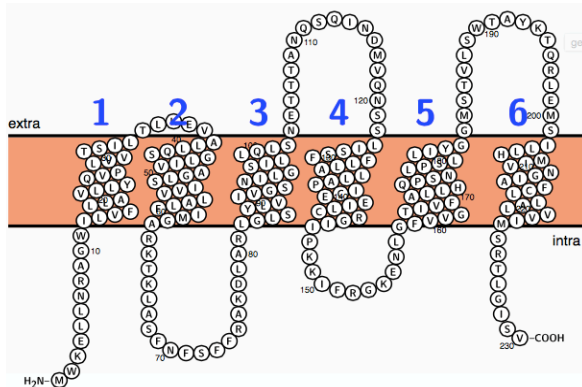
VEDLEGG C – Rapid ID 32 Strep test

Oversikt over hvilke 32 substrater det ble testet mot i Rapid ID 32 Strep testen:

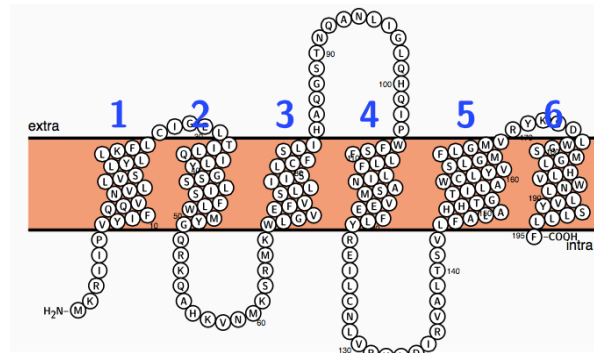
- L-arginine
- Resorufin- β D-glucopyranoside
- Resorufin- β D-galactopyranoside
- Resorufin- β D-glucuronide
- 4-nitrophenyl- α D-galactopyranoside
- 4-nitrophenyl- β D-galactopyranoside-2-CHA
- D-ribose
- D-mannitol
- D-sorbitol
- D-lactose
- D-trehalose
- D-raffinose
- D-saccharose
- L-arabinose
- D-arabitol
- α cyclodextrine
- Sodium pyruvate
- L-alanyl-L-phenylalanyl-L-proline- β -naphthylamide
- 2-naphthyl- β D-galactopyranoside
- Acide pyroglutamique- β -naphthylamide
- 6-bromo-2-naphthyl-N-acetyl- β D-glucosaminide
- L-glycyl-L-tryptophane- β -naphthylamide
- Sodium hippurate
- Glycogene
- Pullulan
- D-maltose
- D-melibiose
- D-melezitose
- Methyl- β D-glucopyranoside
- D-tagatose
- 4-nitrophényl- β D-mannopyranoside
- urea

VEDLEGG D - Membranprediksjon av CAAX-proteinene

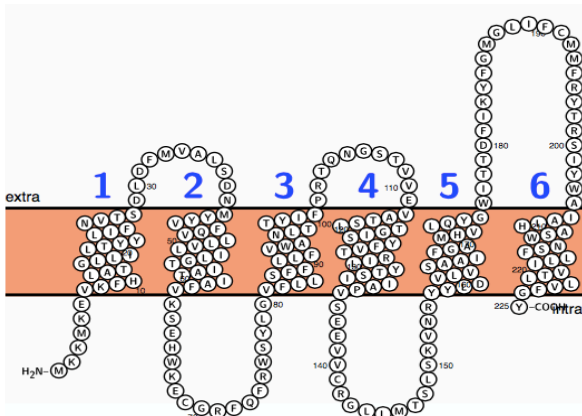
Det ble brukt tre ulike verktøy for å predikere topologien til CAAX-proteinene i *S. pneumoniae*. De tre verktøyene som ble brukt var Protter, TMPred og TMHMM. Bildene som vises er fra Protter. * I disse tilfellene var kun to av de tre av prediksjonsverktøyene enige.



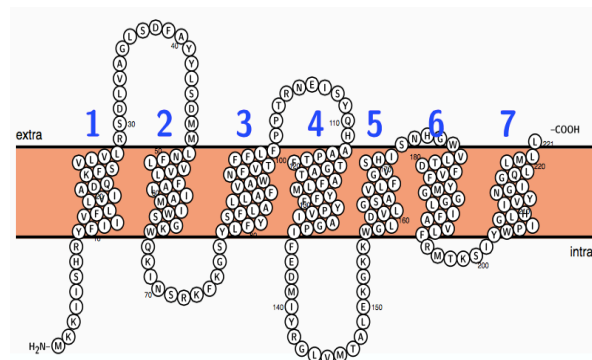
SPD_0268



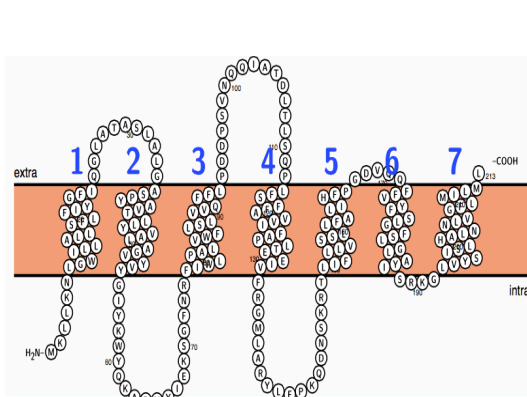
SPD_1180*



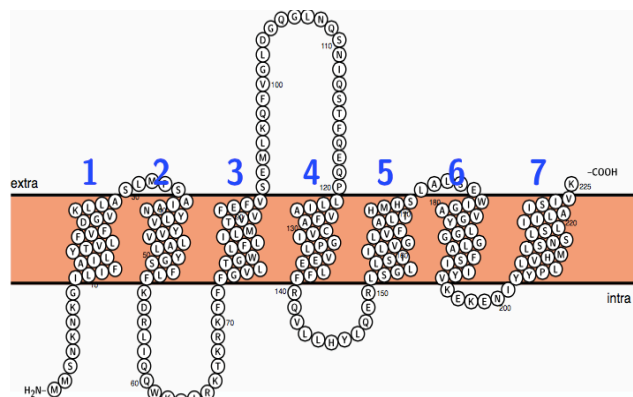
SPD_0146



SPD_0147

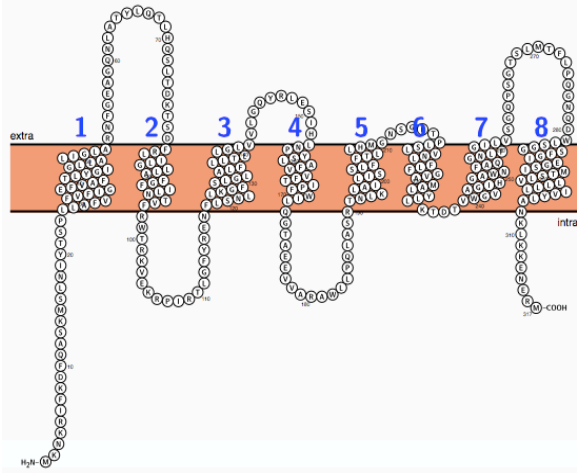


SPD_1944

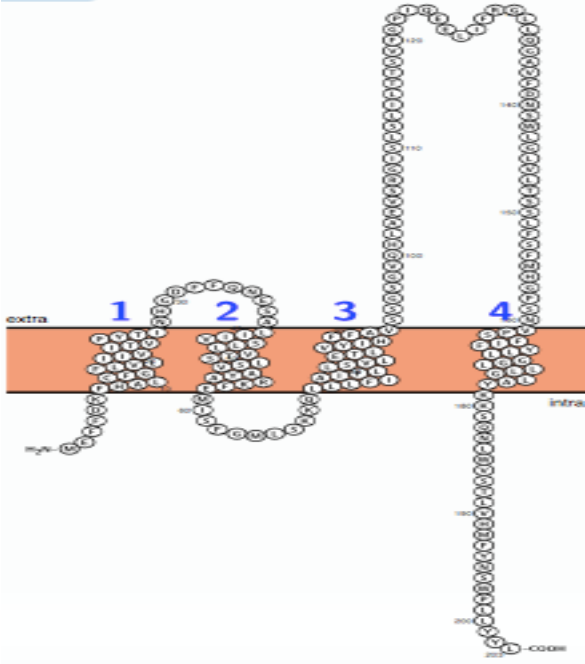


SPD_0172

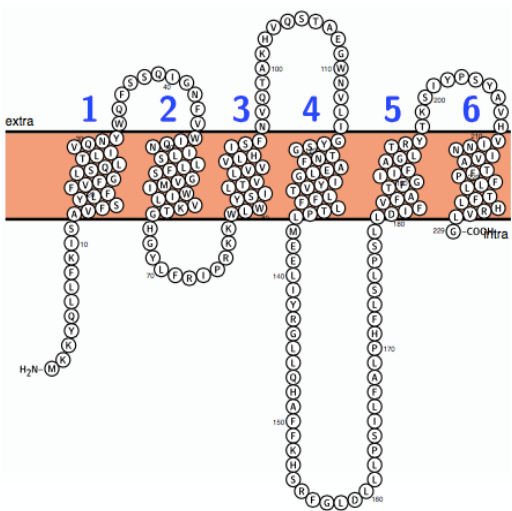
Vedlegg



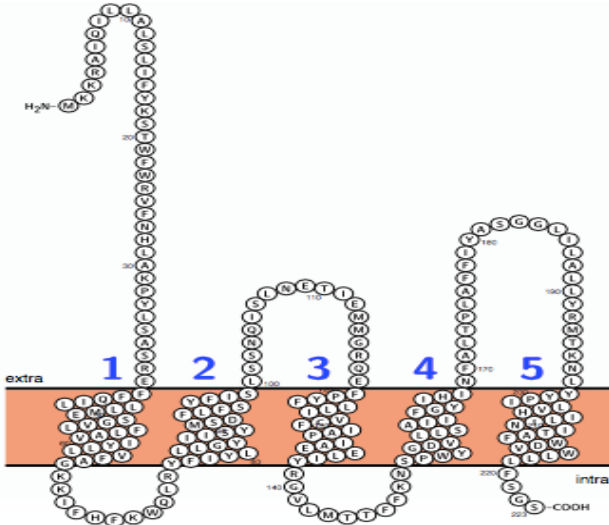
SPD_1097*



SPD_0475 (PncP)*



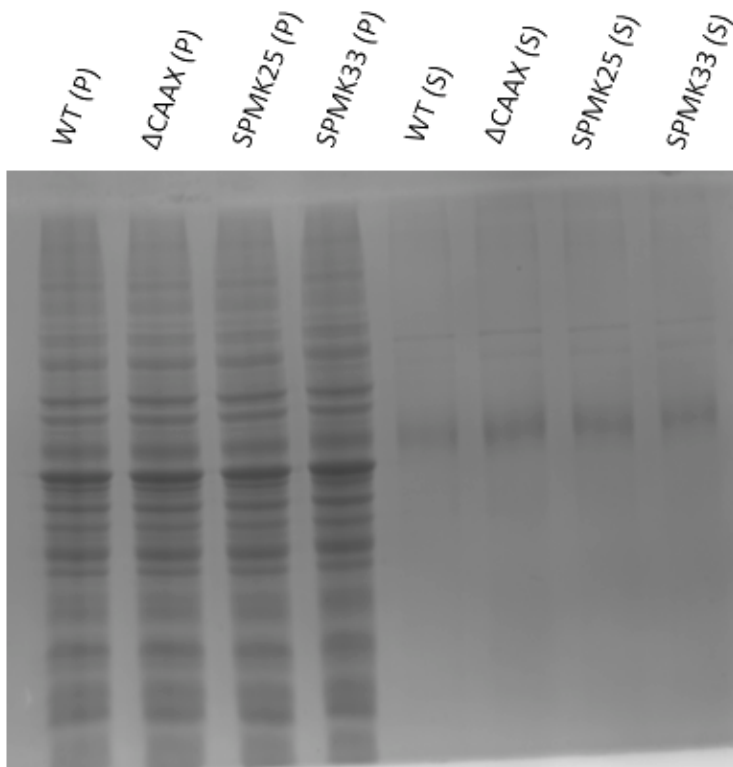
SPD_0473 (BlpY)*



SPD_0817

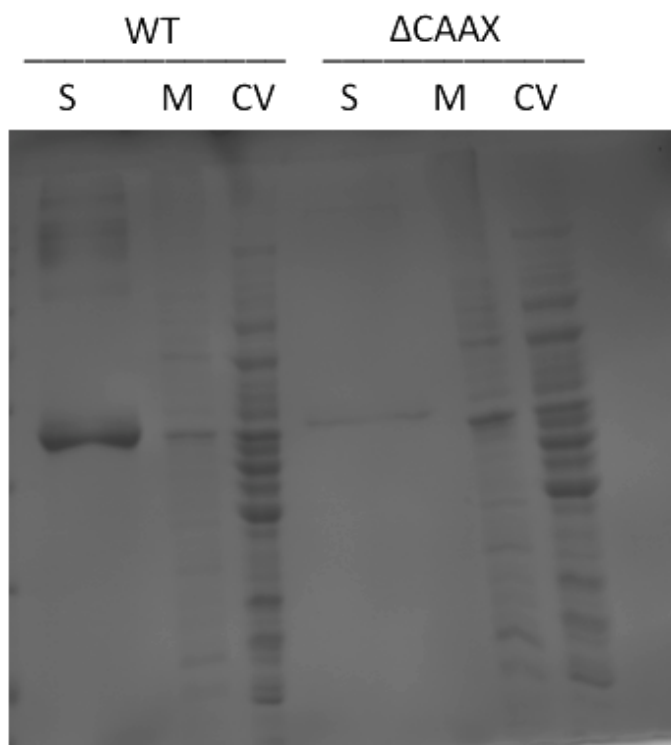
VEDLEGG E – SDS-PAGE geler

E.1 PspA-FLAG (kolinvaske)



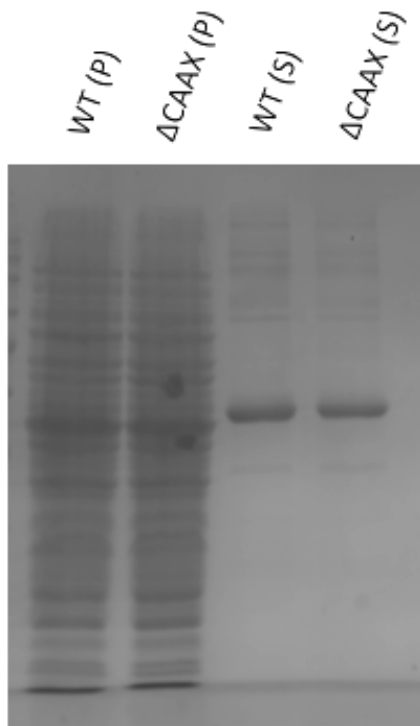
Figur E.1.1: Utgangsmengde protein: Utgangsmengde protein før PspA-FLAG blot. Coomassie farget 10% SDS-PAGE. Gelen viser lik mengde utgangsmengde protein påsatt i de fire stammene.

E.2 PspA-FLAG (fraksjonerte celler)



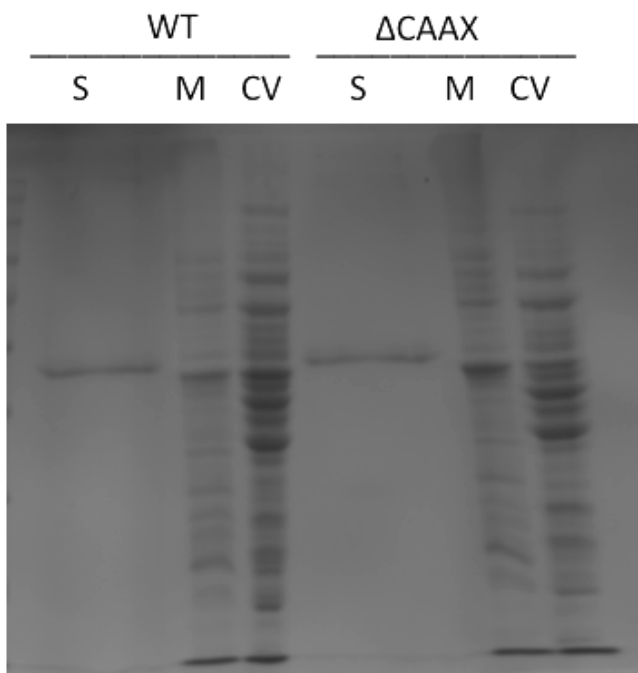
Figur E.2.1: Utgangsmengde protein: Utgangsmengde protein før PspA-FLAG blot. Coomassie farget 10% SDS-PAGE-gel. Gelen viser lik mengde utgangsprotein i M (membranfraksjon) og CV (celleveggsfraksjon) påsatt for de to stammene. S (supernatant) mengden er ulik, men her ble det heller ikke detektert PspA-FLAG i immunoblottingen.

E.3 PspC-FLAG (kolinvaske)



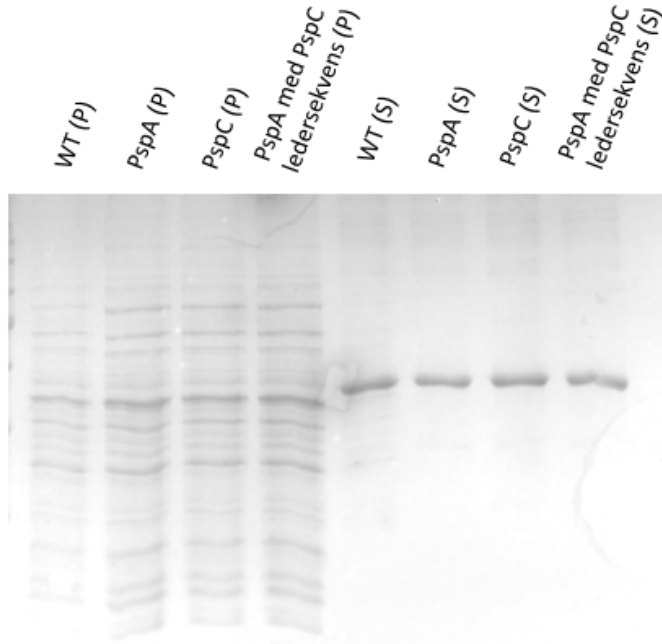
Figur E.3.1: Utgangsmengde protein: Utgangsmengde protein før PspC-FLAG blot. Coomassie farget 10% SDS-PAGE. Gelen viser lik mengde utgangsmengde protein påsatt i de to stammene.

E.4 PspC-FLAG (fraksjonerte celler)



Figur E.4.1: Utgangsmengde protein: Utgangsmengde protein før PspC-FLAG blot. Coomassie farget 10% SDS-PAGE. Gelen viser lik mengde utgangsmengde protein påsatt i de to stammene.

E.5 PspA med PspC ledersekvens (kolinvaske)



Figur E.5.1: Utgangsmengde protein: Utgangsmengde protein før PspC^L-PspA-GFP blot. Coomassie farget 10% SDS-PAGE. Gelen viser lik mengde utgangsmengde protein i de fire stammene.

VEDLEGG F - Materialer

F. 1 Kjemikalieliste

Tabell F.1: Alfabetisk oversikt over kjemikalier som ble brukt under dette arbeidet med kjemisk formel, leverandør og produktnummer.

Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produktnummer
Agarose		Invitrogen	15510-027
Akrylamid (40%) 29:1	C ₃ H ₅ NO	VWR Life Science	0211-500ML
Aktivt kull	C	Merck	1.02184.1000
Albumin		Sigma-Aldrich	A7906
Ammonium persulfat for elektroforese ≥ 98%	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Sigma	A3678
Bacto™ Agar		Saveen Werner	BIAC41
Bacto™ Casitone		BD Diagnostic Systems	225930
Bacto™ Todd Hewitt Broth		BD Diagnostic Systems	249240
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Sigma Aldrich	19606
Blodagar		Oxoid	CM0271
Bromfenolblå 1%	C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa	Sigma Aldrich	B-5525
Coomassie Brilliant Blue R- 250		Thermo Scientific	20278
di-Kaliumhydrogenfosfat	KH ₂ HPO ₄	Merck	1.05104.1000
Deoxycholate	C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na	Sigma	D-6750
di-Natriumhydrogenfosfat- Duhidrat	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck	1.06580.1000
Dithiothreitol (DDT)	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	Sigma	D9779
Eddiksyre (glacial) 100%	CH ₃ COOH	Merck	1.00063.1011
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	VWR	20 296.360
Etidiumbromid, EtBr	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	Sigma	E1510
Gjærekstrakt granulert		Merck	1.03753.0500
Glassull		Merck	1.04086.0250

Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produktnummer
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Merck	1.04201.1000
Glycerol 85%	$C_3H_5NO_2$	Merck	1.04094.1000
Hesteblood, defibrinert		Oxoid	HB035
Isopropanol	C_3H_8O	A/S Vinmonopolet	
Jern(II)sulfat heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka	44970
Kaliumklorid	KCl	Merck	1.04936.1000
Kalsium panthotenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma	C8731
Kalsiumklorid andehydret	CaCl	Fluka	44970
Kobber(II)sulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka	61240
Kolin klorid	$C_5H_{14}NO \cdot Cl$	Sigma Aldrich	C1879
L-Aspergine monohydrat	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma Aldrich	124K06151
L-Cystein hydrogenklorid monohydrat	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka	30130
L-Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_2$	Fluka	49419
L-Tryptofan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Fluka	93660
Magnesiumklorid hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Fluka	63072
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Riedel-de Haën	31422
Metanol	CH_2OH	Merck	603-001-00-x
Mutanolysin		Sigma Aldrich	M9901
Natriumacetat	$C_2H_3O_2Na$	Sigma	S3272
Natriumklorid	NaCl	Merck	1.06404.1000
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma	P8574
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	Fluka	72309
Phenylmethanesulfonyl fluoroide (PMSF)	$C_7H_7FO_2S$	Sigma	P7626
Pyridoxin hydroklorid	$C_8H_{11}NO_3HCl$	Fluka	95180
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma Aldrich	R-7649
Saltsyre	HCl	Riedel-de Haën	30721

Vedlegg

Navn	Kjemisk formel	Produsent	Produktnummer
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	Fluka	05030
Sinkklorid	ZnCl_2	Merck	781116
Sinksulfat heptahydrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka	96500
Skummet melk-pulver		Merck	1.15363.05000
Sukrose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	BHD	102745C
TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylene diamine)	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Sigma	T9281
Thiamin hydroklorid	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	Sigma	T4625
Trizma®base, minimum 99,9% titration	$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	Sigma	T1503
Trizma®hydrochloride		Sigma	T3253
Tryptone		Oxoid	LP0042
Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	BioRad	170-6531
Uridin, minimum 99%	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	Sigma	U6381

F.2 Utstysliste

Tabell F.2: Oversikt over utstyr og maskiner som ble brukt i dette arbeidet. Utover det som er oppført her ble vanlig laboratorieutstyr benyttet.

Utstyr	Modell	Produsent
Anaerobe dyrkningsposer	AnaeroGen	Oxoid
Autoklav		Certoclav
Beholder for anaerob dyrking		Oxoid
Blottecelle	Trans-Blot SD Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Celleknuser	FastPrep®-24	M.P Biomedicals
Elektroforesekar til agarose-gelelektroforese	Mini-Sub Cell® GT	Bio-Rad
Elektroforesekar til SDS-PAGE	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad

Utstyr	Modell	Produsent
Filter (0,2 µm)		Sarstedt
Fluorescensmikroskop	Observer.Z1, HAL 100	Zeiss
Geldokumentasjon	Gel Doc™ XR+	Bio-Rad
Glass Beads, syre vasket	≤106 µm	Sigma
Mikrotiterplater	Microtest Plate, 96 brønner	Sarstedt
Mikrotiterplate- avleser	Synergy™ H1	Bio-Tek
PCR-maskin	ProFlex PCR System	ThermoFischer

F.3 Dataprogrammer

Tabell F.3: Oversikt over dataprogrammer og deres bruksområder som ble brukt under dette arbeidet.

Dataprogram	Bruksområde	Tilgjengelig fra/Referanse
CLC Sequence viewer	Analyse av sekvenseringsresultater	https://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-sequence-viewer/
ImageJ (Fiji)	Analyse av mikroskopibilder	Schindeling et al. (2012)
MicrobeJ	Analyse av mikroskopibilder	Ducret et al. (2016)
Promega Biomath Calculator	Utrekning av molekylær vekt (kDA)	http://www.promega.com/a/apps/biotmath/?cale=dnaprotein
Protter	Prediksjon av transmembran proteintopologi	http://wlab.ethz.ch/protter/start/
Reverse Complement	Reverskomplmenterer DNA sekvenser	https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
SignalP 4.1	Prediksjon av signalsekvenser	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/

Dataprogram	Bruksområde	Tilgjengelig fra/Referanse
TMHMM	Prediksjon av transmembran proteintopologi	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TMpred	Prediksjon av transmembran proteintopologi	https://embnet.vital- it.ch/software/TMPRED_form.html
R studio	Databehandling av mikroskopibilder	(Studio, 2012)

F.4 Kit

Tabell F.4: Oversikt over kit som ble benyttet i dette arbeidet med bruksområde, produsent og produktnummer.

Navn	Bruksområde	Produsent	Produktnummer
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Rensing av DNA fra agarosegel	Machnery-Nagel	740609.250
E.Z.N.A® Plasmid DNA Kit II	Rensing av plasmid DNA fra <i>E. coli</i>	OMEGA Bio-tek	D6943-02

F.5 Antibiotika

Tabell F.5: Oversikt over antibiotika som ble benyttet i dette arbeidet med leverandør og produktnummer.

Antibiotikum	Leverandør	Produktnummer
Ampicillin	Sigma	A-9518
Bacitracin	Fluka	11702
Kanamycin	Sigma-Aldrich	K4000
Nisin	Sigma	N-5764
Streptomycin	Sigma-Aldrich	S6501
Tetracyclin	Sigma	T-3383

F.6 Antistoffer

Tabell F.6: Oversikt over antistoffer som ble benyttet i dette arbeidet med brukskonsentrasjon, produsent, produktnummer og hvor de er isolert fra.

Navn	Isolert fra	Brukskons.	Produsent	Produktnummer
Anti-FLAG	Kanin	1:4000	Sigma-Aldrich	F7425
Anti-Rabbit-HRP	Geit	1:5000	Sigma-Aldrich	12-348
GFP Tag	Kanin	1:4000	ThermoFisher	A-11122

VEDLEGG H - Forkortelser

ABI-protein	Abortive infection protein
CAAX-protein	CAAX (cystein og en hvilken som helt aminosyre separert av to alifatiske aminosyrer) amino-terminal protease
CPS	Polysakkaridkapsel
CSP	Kompetanse stimulerende protein
CBPD	Kolin-bindende protein D
CBPA	Kolin-bindende protein A
CPBP	CAAX proteaser og bakteriosin-prosesserende enzymer
GFP	Green fluorescence protein
HRP	Horeseradish peroxide
IgA	Immunoglobulin A
LC	Liquid chromatography (væske kromatografi)
LTA	Lipoteikoinisyre
MS	Massespektrometri
NAG	N-acetylglukosamin
NAM	N-acetylmuraminsyre
NanA	Neuramidase A
OD	Optisk tetthet
PBP	Penicillinbindende protein
PCho	Fosforylkolin
PKV	Pneumokokkonjugatvaksine
PPV	Pneumokokkpolysakkaridvaksine
PspA	Pneumokokk overflateprotein A
PspC	Pneumokokk overflateprotein C
PCR	Polymereasechain reaction
SDS-PAGE	Sodium deodecyldulfat polyakrylamid gelelektroforese
SpsA	Sekretorisk pneumokokk overflateprotein A
TA	Teikoinisyre
WTA	Veggteikoinisyre



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway