



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2018 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap  
Daniel Straume

# **Overuttrykk, rensing og karakterisering av CbpD, et nøkkelenzym for fratrisidmekanismen hos *Streptococcus pneumoniae***

Overexpression, purification and characterization of  
CbpD, a key enzyme for fratricide in *Streptococcus  
pneumoniae*

**Silje Olsen**

Bioteknologi  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap



## **Forord**

Arbeidet i denne masteroppgaven er utført som en del av det toårige masterstudiet i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Arbeidet er utført i molekylær mikrobiologisk forskningsgruppe ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap i perioden august 2017 til mai 2018.

Først og fremst vil jeg gi en stor takk til min hovedveileder Dr. Daniel Straume. Takk for kjempegod opplæring på laboratoriet og for alt du har lært meg i løpet av dette skoleåret, både med det praktiske arbeidet og i skriveprosessen. Jeg vil også gi en stor takk til min medveileder Prof. Leiv Sigve Håvarstein for flere gode tips, og for å ha gitt meg muligheten til å utføre denne masteroppgaven hos dere.

Takk til hele laboratoriegruppa for å ha lært meg masse, for å besvare alle mine spørsmål, og ikke minst for mange gøy påfunn! En ekstra takk til overingeniør Zhian Salehian for å ha hjulpet mye med det praktiske arbeidet på laboratoriet, og til Dr. Gro Anita Stamsås for gode tips i skriveprosessen.

En stor takk til medstudent Catharina Sørli Heiland for et godt samarbeid, og for mye gøy gjennom hele studieperioden.

Til slutt ønsker jeg å takke familie, venner og ikke minst min kjære samboer Håkon Homme for all støtte gjennom dette året.

Silje Olsen

Ås, Mai 2018

## Sammendrag

*Streptococcus pneumoniae* er en viktig humanpatogen bakterie, som har evnen til å bli kompetent for naturlig genetisk transformasjon. Dette gjør at den kan ta opp nakent DNA fra omgivelsene og inkorporere det i sitt eget genom via homolog rekombinasjon. Å kunne bli kompetent for naturlig genetisk transformasjon har vært, og er en viktig drivkraft for evolusjonen til *S. pneumoniae*. Naturlig genetisk transformasjon er nært knyttet til fratrisidmekanismen hos *S. pneumoniae*. Fratrisidmekanismen, også kalt brodermord, går ut på at kompetente pneumokokker lyserer andre ikke-kompetente pneumokokker og nært beslektede streptokokker. Når målcellene lyserer, lekker det ut DNA til omgivelsene som de kompetente angripercellene kan ta opp via naturlig genetisk transformasjon. Fratrisid antas å være viktig for at pneumokokkene skal få tilgang på homologt DNA, og at de dermed kan erverve nye fordelaktige egenskaper, som penicillinresistens og virulensfaktorer.

For å få tilgang på homologt DNA produserer kompetente pneumokokker celleveggshydrolasen CbpD, som binder til og lyserer ikke-kompetente streptokokker. De kompetente pneumokokkene er derimot selv immune mot CbpD som produseres. Siden *S. pneumoniae* forårsaker mange dødsfall hvert år på grunn av dens virulente egenskaper, og siden antall penicillinresistente isolater øker, er det viktig å få en fundamental forståelse av hvordan disse genene spres mellom streptokokker. På grunn av at CbpD er en essensiell komponent i fratrisid, og dermed gir tilgang på homologt DNA, har vi i dette arbeidet forsøkt å finne ut mer om de biokjemiske egenskapene til dette enzymet, samt dets målgruppe.

Tidligere er det forsøkt å rense CbpD fra *S. pneumoniae* (CbpD<sup>Spn</sup>), men dette ble mislykket. I dette arbeidet overuttrykket og rensset vi derfor CbpD fra *S. mitis* og fra *S. oralis*, som er CbpD<sup>Spn</sup>-homologer. Vi klarte å holde CbpD fra *S. mitis* stabilt, samt å finne en god oppbevaringsmetode for proteinet, noe som er viktig for videre analyser. Eksperimenter utført i dette arbeidet viser at *S. pneumoniae* danner immunitet mot CbpD fra både *S. mitis* og *S. oralis*, og i tillegg er de immune over flere generasjoner. Vi viste også at lysering forårsaket av CbpD er doseringsavhengig, og at CbpD lyserer flere streptokokkarter. Vi klarte derimot ikke å finne hvor i peptidoglykanet CbpD kutter, eller å løse dets 3D-struktur.

## Abstract

*Streptococcus pneumoniae* is an important human pathogenic bacterium, which has the ability to become competent for natural genetic transformation. This allows the bacterium to take up naked DNA from the environment and incorporate the DNA into its own genome via homologous recombination. Being competent for natural genetic transformation is a major driving force for the evolution of *S. pneumoniae*. Natural genetic transformation is closely connected to the fratricide mechanism in *S. pneumoniae*. The fratricide mechanism makes it possible for competent pneumococci to lyse and kill other non-competent pneumococci and closely related streptococci. When the target cells lyse, DNA leaks to the environment for the competent attacker cells to take up, through natural genetic transformation. Fratricide is thought to be important for the pneumococci to gain access to homologous DNA, and thereby obtain new beneficial properties, such as penicillin resistance and virulence factors.

In order to gain access to homologous DNA, competent pneumococci produce the cell wall hydrolase CbpD, which binds to and lyses non-competent sister cells. The competent pneumococci are, however, immune against CbpD that are produced. Since *S. pneumoniae* causes many deaths each year because of its virulent factors, and since the number of penicillin resistant isolates increases, it is important to gain a fundamental understanding of how these genes spread between streptococci. Because CbpD is an essential component of fratricide, hence providing access to homologous DNA, we have tried to find out more about the biochemical properties of this enzyme, and its target range of streptococci.

Previously, it has been attempted to purify CbpD from *S. pneumoniae* (CbpD<sup>Spn</sup>), but this was unsuccessful. In this study, we therefore overexpressed and purified CbpD from *S. mitis* and from *S. oralis*, which are CbpD<sup>Spn</sup> homologues. We managed to keep CbpD purified from *S. mitis* stable, and found a suitable storage condition for the protein, which is important for further analyses. Experiments performed in this study, show that cells of *S. pneumoniae* are immune against CbpD produced by both *S. mitis* and *S. oralis*, and also, they are immune for several generations. We showed that lysis caused by CbpD is dose dependent, and that CbpD lyses several streptococcal species. We did not, however, find which bond in the peptidoglycan CbpD cuts. Neither did we solve the 3D-structure of CbpD.



# Innholdsfortegnelse

<b>1. Innledning.....</b>	<b>1</b>
1.1 Streptokokker.....	1
1.1.1 Streptokokker i mitis-gruppen.....	2
1.1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	3
1.2 Horisontal genoverføring hos bakterier.....	4
1.3 Naturlig kompetanse hos <i>S. pneumoniae</i> .....	5
1.3.1 Regulering av kompetansesystemet i <i>S. pneumoniae</i> .....	5
1.4 Fratrissid hos <i>S. pneumoniae</i> .....	9
1.4.1 Oppbygging av CbpD og andre fratrissiner hos streptokokker.....	10
1.4.2 ComM gir immunitet mot CbpD.....	12
1.4.3 Biologiske effekter av fratrissidmekanismen.....	13
1.5 Celleveggstruktur og celledeling hos <i>S. pneumoniae</i> .....	15
1.5.1 Oppbygging av celleveggen til <i>S. pneumoniae</i> .....	15
1.5.2 Teikoinsyrer i celleveggen til <i>S. pneumoniae</i> .....	16
1.5.3 Peptidoglykansyntese og celledeling hos <i>S. pneumoniae</i> .....	18
1.6 Oppgavens målsetting.....	20
<b>2. Materialer.....</b>	<b>21</b>
2.1 Bakteriestammer og plasmider.....	21
2.2 Peptidferomon.....	22
2.3 Primere.....	23
2.4 Sekvenseringsprimere.....	24
2.5 Antibiotika.....	24
2.6 Vekstmedier.....	24
2.7 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører.....	26
2.8 Buffere og løsninger.....	27
2.8.1 Løsninger for tillaging av C-medium.....	27
2.8.2 Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese.....	28
2.8.3 Buffere og løsninger til SDS-PAGE.....	28
2.8.4 Buffere og løsninger for rensing av proteiner.....	30
2.8.4.1 Løsninger til DEAE-cellulose.....	30
2.8.4.2 Løsninger til dialyse.....	31
2.8.4.3 Løsninger til gelfiltrering.....	31
2.8.5 Buffere og løsninger for HPLC.....	31
2.8.6 Andre buffere og løsninger.....	32
2.9 Kjemikalier.....	32
2.10 Kit.....	32
2.11 Instrumenter.....	33

<b>3. Metoder</b> .....	<b>34</b>
3.1 Dyrkning og lagring av bakterier .....	34
3.1.1 Dyrkning av <i>E. coli</i> .....	34
3.1.2 Dyrkning av streptokokker .....	34
3.1.3 Lagring av bakterier .....	34
3.2 Transformasjon av <i>E. coli</i> .....	34
3.3 Prinsippet bak Sanger sekvensering .....	35
3.4 Prinsippet bak polymerase kjedereaksjon .....	36
3.4.1 PCR-protokoll for 50 µl PCR-miks med Phusion® High-Fidelity (New England BioLabs) DNA-polymerase .....	37
3.4.2 PCR-protokoll for 20 µl PCR-miks med One Taq® (New England BioLabs) DNA-polymerase .....	38
3.4.3 Primerdesign .....	38
3.5 Agarose gelelektroforese .....	39
3.5.1 Protokoll for agarose gelelektroforese .....	39
3.5.2 Rensing av PCR-produkter fra agarosegel .....	39
3.5.3 Måling av DNA-konsentrasjon ved bruk av Nanodrop 2000 .....	40
3.6 Overuttrykk av CbpD i transformerte <i>E. coli</i> BL21 .....	40
3.6.1 Preparering av kjemisk kompetente <i>E. coli</i> DH5α og <i>E. coli</i> BL21 .....	40
3.6.2 Rensing av plasmider fra <i>E. coli</i> DH5α .....	40
3.6.2.1 Plasmidet pRSET A .....	41
3.6.3 Kloning av <i>cbpD<sup>B6</sup></i> og <i>cbpD<sup>Uo5</sup></i> inn i pRSET A .....	42
3.6.4 Overekspresjon av CbpD i <i>E. coli</i> BL21 .....	43
3.7 Rensing av CbpD ved bruk av diethylaminoethyl-cellulose affinitetskromatografi .....	43
3.7.1 Protokoll for DEAE-cellulose affinitetskromatografi .....	44
3.7.2 Dialyse av CbpD <sup>B6</sup> .....	45
3.8 Videre rensing av CbpD <sup>B6</sup> ved bruk av gelfiltrering .....	45
3.8.1 Protokoll for gelfiltrering .....	45
3.9 SDS-PAGE .....	46
3.9.1 Protokoll for støping og farging av SDS-PAGE .....	46
3.9.2 Protokoll for preparering av prøver til SDS-PAGE .....	47
3.10 Zymografi .....	48
3.10.1 Protokoll for zymografi .....	48
3.11 Vekstforsøk ved tilsetning av CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	49
3.11.1 Protokoll for mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader .....	49
3.12 Ulike oppbevaringsmetoder for CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	49
3.13 Isolering av peptidoglykan .....	50
3.13.1 Protokoll for isolering av cellevegg fra <i>S. pneumoniae</i> .....	50
3.14 High Performance Liquid Chromatography .....	51
3.14.1 Preparering av prøver til HPLC og HPLC-program .....	52
<b>4. Resultater</b> .....	<b>53</b>
4.1 Overuttrykk og rensing av CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	54
4.2 Stabilitet og lagring av CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	57



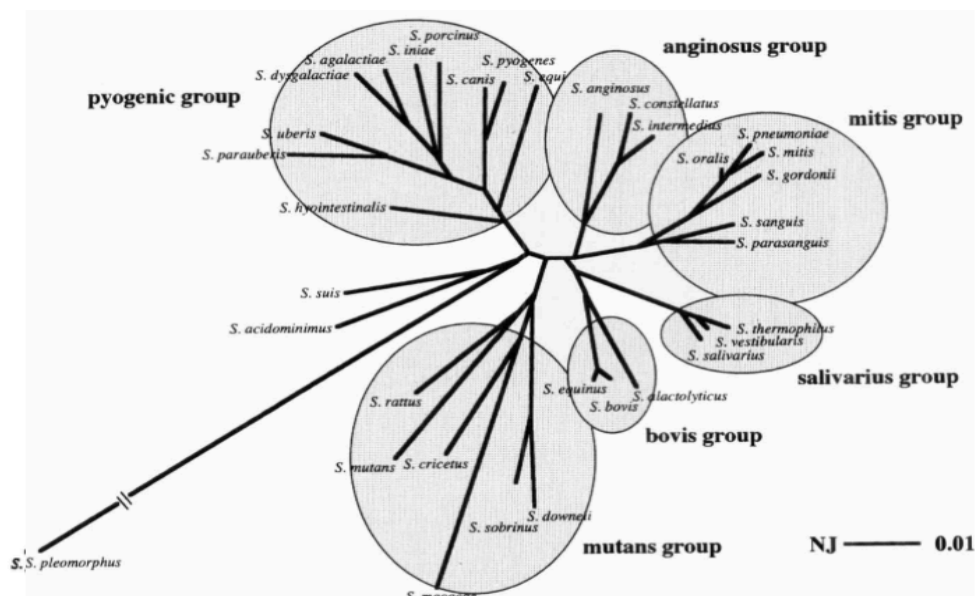
4.3 <i>S. pneumoniae</i> - immunitet mot CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	58
4.4 Ulike streptokokkarters sensitivitet for CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	62
4.5 Polysakkaridkapselens betydning for CbpD-sensitivitet hos pneumokokker .....	64
4.6 Virker CbpD bedre under reduserende betingelser? .....	65
4.7 CbpD <sup>B6</sup> kan substituere for CbpD <sup>Spn</sup> <i>in vivo</i> i <i>S. pneumoniae</i> .....	66
4.8 CbpDs kuttsete i peptidoglykanet .....	67
<b>5. Diskusjon .....</b>	<b>75</b>
5.1 Overuttrykk, rensing og oppbevaring av CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	75
5.2 Cellelysing forårsaket av CbpD er doseavhengig .....	77
5.3 <i>S. pneumoniae</i> sin immunitetsdannelse mot CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> .....	78
5.3.1 Har polysakkaridkapsel hos målcellen betydning for immunitet mot CbpD? .....	81
5.4 CbpD <sup>B6</sup> og CbpD <sup>Uo5</sup> sine lysingsevner mot ulike streptokokkarter .....	81
5.5 Identifikasjon av CbpDs kuttsete i peptidoglykanet .....	83
<b>6. Konklusjon og fremtidige perspektiver .....</b>	<b>86</b>
<b>Referanser .....</b>	<b>88</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>97</b>



# 1. Innledning

## 1.1 Streptokokker

Bakterier i slekten *Streptococcus* er å finne i normalfloraen hos pattedyr. Streptokokker kjennetegnes ved at de er homofermentative, aerotolerante kokker som enten ligger i par eller kjeder. De er i tillegg Gram-positive og katalase-negative. Så langt er det oppdaget over 50 arter av streptokokker (Kilian et al., 2008), hvor mange av dem inndeles i seks fylogenetiske grupper: pyogenic, anginosus, mitis, salivarius, bovis og mutans (Figur 1.1) (Kawamura, Hou, Sultana, Miura, & Ezaki, 1995). Streptokokker kan videre klassifiseres basert på om de er alfa-, beta- eller gamma-hemolytiske (ikke-hemolytiske). Alfa-hemolyse vises som grønne soner på blodagarskål og forårsakes av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produksjon som gir oksidasjon av hemoglobin, mens beta-hemolyse vises som klare soner på blodagarskål og forårsaker fullstendig lysering av erythrocytter (Vos et al., 2011). Flere streptokokkarter er opportunistisk patogene, som for eksempel *Streptococcus agalactiae* (beta-hemolytiske), og kan derfor forårsake infeksjoner hos både mennesker og andre pattedyr. Andre arter som *Streptococcus pneumoniae* (alfa-hemolytiske) og *Streptococcus pyogenes* (beta-hemolytiske) er kjente for hovedsakelig å være humanpatogene. Særlig viktig er *S. pneumoniae* som er årsak til mer enn 100 millioner humane infeksjoner i verden per år, hvorav 1-2 millioner er dødelige (Hardie & Whiley, 1997; Hoskins et al., 2001).

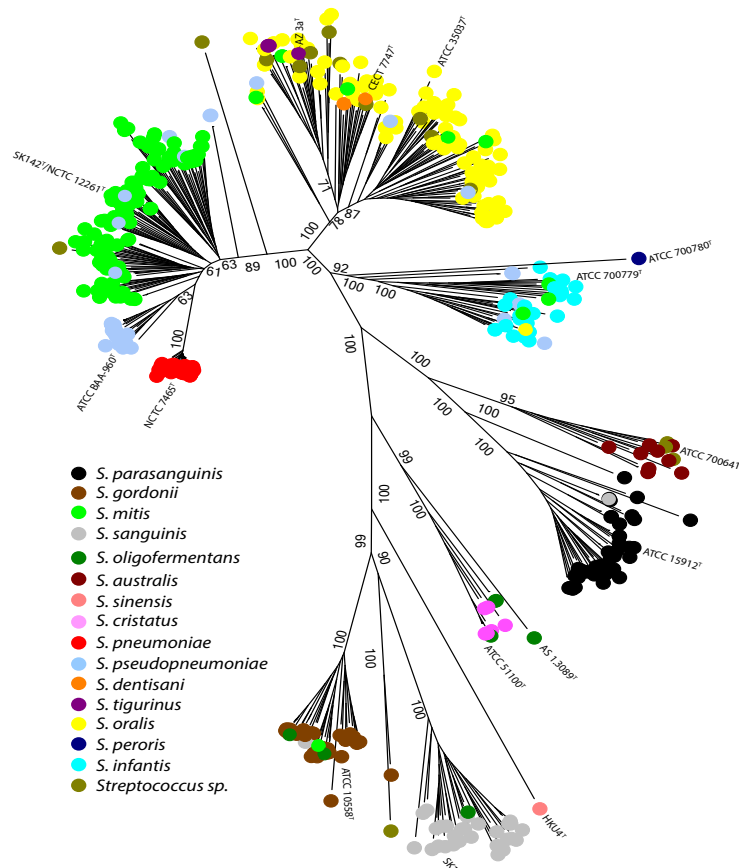


**Figur 1.1** Fylogenetisk slektskap mellom 34 arter av streptokokker. 31 av disse er delt inn i de seks fylogenetiske gruppene pyogenic, anginosus, mitis, salivarius, bovis og mutans ved bruk av neighbor-joining (NJ)-metoden. Inndeling av de seks fylogenetiske gruppene er basert på 16S rRNA-sekvenser (transkribert fra rDNA). *S. pneumoniae* tilhører mitis-gruppen (Hentet fra (Kawamura et al., 1995)).

## Innledning

### 1.1.1 Streptokokker i mitis-gruppen

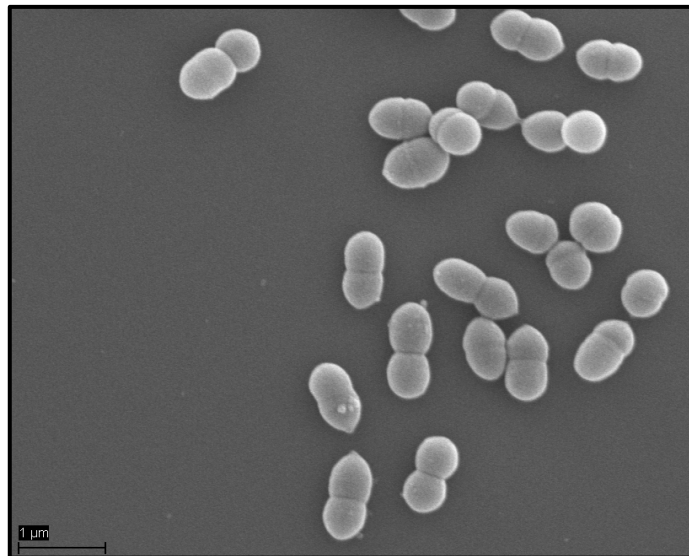
Mitis-gruppen består hittil av cirka tjue streptokokkartene, og inkluderer blant annet *S. pneumoniae*, *Streptococcus mitis* og *Streptococcus oralis* (Figur 1.2) (Jensen, Scholz, & Kilian, 2016). De fleste streptokokkene i mitis-gruppen er kommensale og lever i de øvre luftveiene hos mennesker og dyr. En annen egenskap som kjennetegner streptokokker i denne gruppen er at de har evnen til å bli naturlig kompetente for genetisk transformasjon, og dermed ta opp DNA og inkorporere det i sitt eget genom (se seksjon 1.3). Dette har trolig vært med på å forme evolusjonen til medlemmene av mitis-gruppen, og gjør det dermed vanskeligere å skille dem fra hverandre. *S. pneumoniae* skiller seg likevel fra de andre medlemmene ved at den regnes som humanpatogen (Kilian et al., 2008). En annen typisk egenskap hos flere av streptokokkene i mitis-gruppen er at de har teikoin syrer i celleveggen som inneholder fosforylkolin (se seksjon 1.5.2) (Denapaite, Brückner, Hakenbeck, & Vollmer, 2012).



**Figur 1.2 Fylogenetisk slektskap mellom streptokokkene i mitis-gruppen.** Evolusjonstre som inkluderer alle streptokokkartene som hittil er å finne i mitis-gruppen. Det fylogenetiske slektskapet er regnet ut ved bruk av syv «housekeeping»-gener ved hjelp av multilokus sekvensanalyse (MLSA). De lengste grenene inneholder «bootstrap»-verdier som reflekterer styrken til oppdelingen av treet (basert på 500 replikasjoner). Ut i fra evolusjonstreet ser man at *S. pneumoniae* (rød), *S. mitis* (lys grønn) og *S. oralis* (gul) er svært nært beslektet (Hentet fra (Jensen et al., 2016)).

### 1.1.2 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* har en oval kokkoid form og er vanligvis å finne som diplokokker eller i korte kjeder (Figur 1.3) (Kilian et al., 2008). *S. pneumoniae*, også kalt pneumokokker, ble for første gang isolert i 1880 av både Georg Stenberg og Louis Pasteur (Austrian, 1981), og har gjennom historien vært av spesiell interesse fordi den er en viktig humanpatogen. *S. pneumoniae* finnes i nasopharynx hos cirka ti prosent av verdens befolkning, og kan gi milde sykdommer som mellomørebetennelse, men også alvorlige sykdommer som lungebetennelse, sepsis, bakteriemi og meningitt. Det er oftest barn under fem år, eldre og mennesker med svekket immunforsvar som rammes (Bogaert, de Groot, & Hermans, 2004; Hackel et al., 2013). I følge World Health Organization (WHO) er pneumokokker den vanligste årsaken til bakteriell lungebetennelse hos små barn i verden (World Health Organization, 2016).



**Figur 1.3 Morfologien til *S. pneumoniae*.** Mikrograf av *S. pneumoniae* R6 tatt med scanning elektronmikroskopi (SEM). Pneumokokkene har en oval kokkoid form, og ligger som diplokokker. Bildet er lånt av Dr. Daniel Straume.

*S. pneumoniae* har flere virulensfaktorer som bidrar til at bakterien kan etablere en infeksjon hos mennesker. Blant de viktigste virulensfaktorene er frigjøring av proteinet pneumolysin og syntese av en polysakkaridkapsel som omslutter cellen (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013; van der Poll & Opal, 2009). Pneumolysin er et cytotoxisk protein som kan lysere alle celler med kolesterol i cellemembranen (Alhamdi et al., 2015; McCullers & Tuomanen, 2001; Tuomanen, 2000), mens polysakkaridkapselen beskytter pneumokokken mot vertens immunforsvar og er essensiell for kolonisering av verten (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013).

## Innledning

Pneumokokker kan ha kapsler med ulike polysakkaridsammensetning (ulike serotyper). Så langt er det funnet flere enn 90 ulike serotyper av slike kapsler, hvorav 13 er mest assosiert med sykdom (Kilian, Riley, Jensen, Brüggemann, & Tettelin, 2014). Dagens pneumokokkvaksiner er basert på polysakkaridkapselen, og inneholder 13 av de mest sykdomsassocierede serotypene (Klugman, 2011; Moffitt & Malley, 2011). Dagens vaksiner er effektive, men en ulempe med denne type vaksiner er at genene som er involvert i kapselsyntese, såkalte kapsel-gener (*cps*-gener), kan utveksles mellom pneumokokker av ulike serotyper. Det er observert kapselbytte hos flere serotyper, som stort sett ser ut til å skyldes rekombinasjon i *cps*-loket (Wyres et al., 2013). En konsekvens av vaksinasjon mot serotypene som er mest assosiert med sykdom, ser ut til å være at det skjer en seleksjon for nye kapselvarianter hos populasjoner av pneumokokker (Golubchik et al., 2012). Det er også en rekke andre faktorer som er viktige for virulens og kolonisering. I tillegg til polysakkaridkapselen og pneumolysin, har patogene pneumokokker gener for blant annet adhesjonsproteiner og for flere andre enzymer som ødelegger vertens celler (van der Poll & Opal, 2009).

En spesielt viktig egenskap hos *S. pneumoniae* er at den er naturlig kompetent for genetisk transformasjon. En konsekvens av dette er at spredningen av blant annet virulensgener skjer i mye større grad mellom pneumokokker enn hos mange andre bakterier. På grunn av dette har *S. pneumoniae* vært, og er fortsatt, en av de viktigste modellorganismene for å studere horisontal genoverføring hos bakterier. Det var for eksempel studier av naturlig kompetente *S. pneumoniae* som førte til oppdagelsen av at DNA er molekylet som bærer på den arvelige genetiske informasjonen, og at DNA kan utveksles mellom bakterier (Avery, MacLeod, & McCarty, 1944; Griffith, 1928).

### **1.2 Horisontal genoverføring hos bakterier**

Bakterier kan utveksle DNA ved hjelp av horisontal genoverføring, noe som er essensielt for deres evolusjonære utvikling. Horisontal genoverføring gjør det mulig for bakteriene å erverve nye egenskaper i form av for eksempel antibiotikaresistens, virulensfaktorer eller metabolske prosesser. I bakterier er det tre kjente mekanismer for horisontal genoverføring: naturlig genetisk transformasjon, konjugasjon og transduksjon. Via naturlig genetisk transformasjon kan bakterier ta opp fritt DNA fra omgivelsene. Ved konjugasjon overføres DNA ved celle-celle interaksjoner via en konjugasjonspilus, mens ved transduksjon overføres gener via bakteriofager (Ochman, Lawrence, & Groisman, 2000).

Av de tre mekanismene for horisontal genoverføring er det naturlig genetisk transformasjon som har størst betydning for pneumokokker, der bakteriene aktivt kan ta opp eksogent DNA. Dette gjør *S. pneumoniae* ekstremt tilpasningsdyktig når den møter stress, og er en stor drivkraft til den raske økningen i antall antibiotikaresistente pneumokokkisolater (Straume, Stamsås, & Håvarstein, 2015).

### 1.3 Naturlig kompetanse hos *S. pneumoniae*

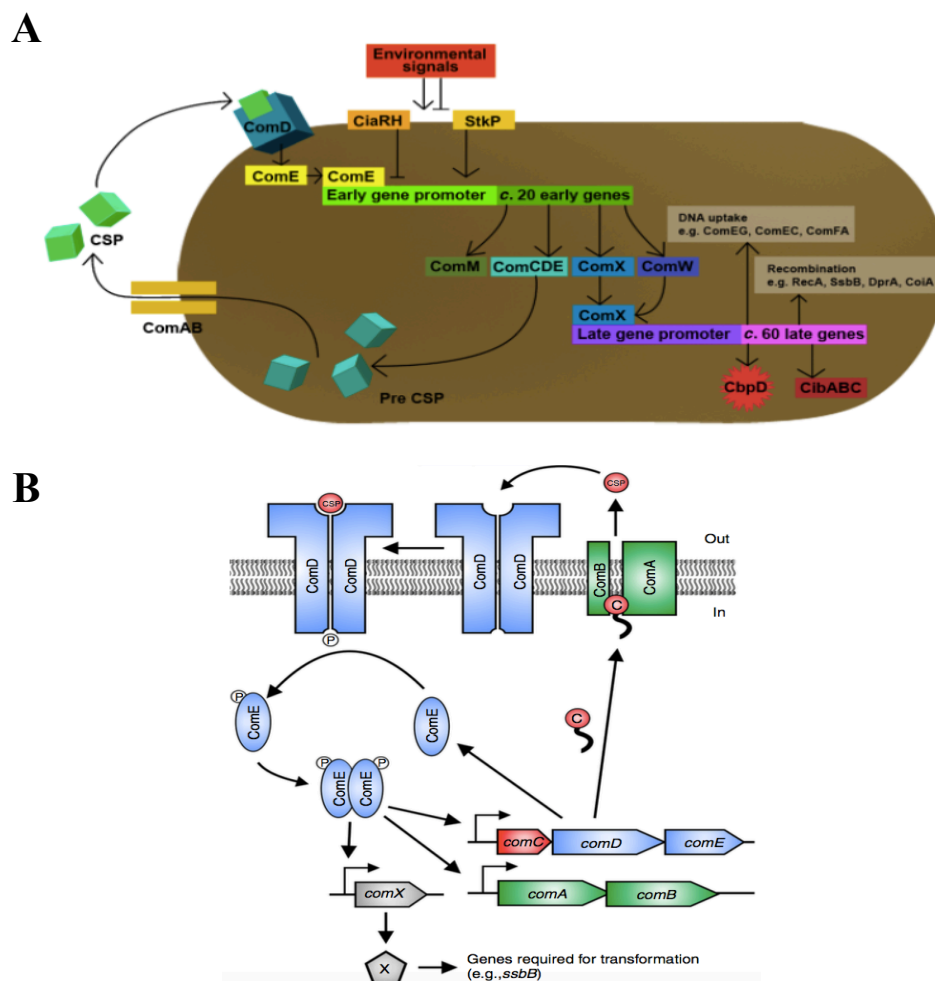
Naturlig genetisk transformasjon hos *S. pneumoniae* ble for første gang oppdaget i 1928 av Frederick Griffith. Han injiserte varmeinaktiverte pneumokokker med polysakkaridkapsel (virulent stamme) i én gruppe mus, og levende pneumokokker uten polysakkaridkapsel (ikke virulent stamme) i en annen gruppe mus. I begge tilfellene holdt musene seg friske. Da han derimot injiserte en blanding av både varmeinaktiverte pneumokokker med kapsel og levende pneumokokker uten kapsel i de samme musene, døde musene kort tid etter. Han kunne da isolere levende virulente pneumokokker med polysakkaridkapsler fra de døde musene. De levende avirulente pneumokokkene som han injiserte musene med hadde altså ervervet virulente egenskaper tilsvarende hos de døde virulente pneumokokkene (Griffith, 1928). Få år etter klarte Dawson og Sia (1931) å demonstrere naturlig genetisk transformasjon hos *S. pneumoniae in vitro*.

#### 1.3.1 Regulering av kompetansesystemet i *S. pneumoniae*

Å være naturlig kompetent for genetisk transformasjon er en forbigående tilstand hos *S. pneumoniae* som reguleres via et klassisk «quorum-sensing»-system (Figur 1.4A). Systemet består av et kompetansestimulerende peptid (ComC), en membranbundet ComC-reseptor (ComD) og en responsregulator (ComE). ComC, også kalt CSP («competence stimulating peptide»), produseres i relativt lave mengder hos ikke-kompetente pneumokokker (lekkasje fra  $P_{ComC}$ -promotoren). Pre-CSP prosesseres og transporteres ut av cella via en ComAB-transporter, hvor aktivt CSP binder til ComD. Interaksjonen mellom ComD og CSP fører til autofosforylering av kinase-domenet til ComD på innsiden av cellemembranen (Håvarstein, Gaustad, Nes, & Morrison, 1996). Denne fosforylgruppen overføres til ComE. En dimer av fosforylert ComE fungerer som transkripsjonsaktivator og binder til spesifikke sekvensmotiv i promotorene til såkalte tidlige kompetansegener (*com*-gener), inkludert *comABCDE* (Figur 1.4A og B) (Ween, Gaustad, & Håvarstein, 1999). ComABCDE utgjør derfor en autokatalytisk loop, som aktiveres når ekstracellulært CSP akkumuleres til en kritisk konsentrasjon. Hos ikke-

## Innledning

kompetente pneumokokker er sannsynligvis nivået av CSP på en konsentrasjon som ligger et sted mellom tilstrekkelig og ikke-tilstrekkelig stimuli av ComD. Når den ekstracellulære konsentrasjonen av CSP øker, blir ComD tilstrekkelig stimulert og den autokatalytiske loopen initieres. Konsentrasjonen av CSP kan påvirkes av celletetthet og ulike miljøparametere som pH, oksygen, fosfat eller eksponering for antibiotika (Moreno-Gamez et al., 2016). Derfor kan ulike vekstbetingelser og stressfaktorer indusere den kompetente tilstanden hos pneumokokker.



**Figur 1.4 Regulering av kompetanse for naturlig genetisk transformasjon i *S. pneumoniae*.** A) Eksterne og interne signaler resulterer i transkripsjon av de omlag 20 tidlige *com*-genene. Når CSP binder til ComD-reseptorer på cellas overflate blir ComE fosforylert. Fosforylert ComE fører til transkripsjon av de tidlige *com*-genene. Disse koder blant annet for den alternative sigmafaktoren ComX, som binder til promoterer til de omlag 80 sene *com*-genene, og som dermed fører til transkripsjon av disse (Hentet fra (Johnsborg & Håvarstein, 2009b)). B) En nærmere fremstilling av hvordan CSP binder til ComD og gir fosforylering av ComE. En dimer av fosforylert ComE fungerer som transkripsjonsaktivator for de tidlige *com*-genene. Ved uttrykk av disse, produseres det blant annet mer pre-CSP. Ved transport ut av cella, gjennom ComAB, kløyves lederpeptidet til pre-CSP av. CSP som nå er på utsiden av cellen kan binde seg til nye ComD-reseptorer, og øke induksjon av kompetansesystemet enda mer (Hentet fra (Moreno-Gamez et al., 2016)).



I den tidlige fasen av kompetanse uttrykkes omlag 20 tidlige *com*-gener, som oppnår maksimalt uttrykk cirka ti minutter etter induksjon av kompetanse (Peterson et al., 2004). Blant disse er *comM* (se seksjon 1.4.2), *comX* og *comW*. ComX er en alternativ sigmafaktor ( $\sigma^X$ ) som sammen med en RNA-polymerase danner et holoenzym, og binder seg til promotorer oppstrøms for «sene» *com*-gener og aktiverer transkripsjon av disse. ComW er et lite protein (9,6 kDa) som øker tilgjengeligheten av RNA-polymerase for  $\sigma^X$ , noe som fører til høyere aktivitet og økt stabilitet av  $\sigma^X$ . Dette medfører en mer effektiv transkripsjon av de «sene» *com*-genene (Sung & Morrison, 2005). Nylig er det også vist at ComW spiller en rolle i å slå av transkripsjon av de «sene» *com*-genene, selv om mekanismen for dette er uklar (Tovpeko, Bai, & Morrison, 2016).

De omlag 80 sene *com*-genene koder blant annet for proteiner som muliggjør opptak av DNA og homolog rekombinasjon. Maksimalt uttrykk av disse genene forekommer cirka tjue minutter etter kompetanseinduksjon (Peterson et al., 2004). «Single stranded DNA-binding protein» (SsbB), RecA og «DNA processing protein A» (DprA) er proteiner som kodes for av sene *com*-gener (Figur 1.4A). Kompetente pneumokokker danner en transformasjonspilus som binder til ekstracellulært dobbeltrådet DNA (Laurenceau et al., 2013), men det er kun den ene DNA-tråden som blir transportert inn i cella. SsbB har en viktig rolle i DNA-transporten inn til cytoplasma siden det danner en beskyttende kappe rundt DNA-tråden, som hindrer DNAet i å bli degradert, i tillegg til å forberede DNAet for rekombinasjon (Attaiech et al., 2011). Ett av de andre proteinene, RecA, inkorporerer DNAet, som er tatt opp under kompetanse, inn i pneumokokkens eget genom ved hjelp av homolog rekombinasjon. Mengden RecA øker betraktelig under kompetanse, noe som er viktig for effektiv DNA-rekombinasjon (Mortier-Barrière, De Saizieu, Claverys, & Martin, 1998; Straume et al., 2015). DprA er funnet å ha to oppgaver under kompetanse. For det første hjelper den RecA med inkorporering av homologt DNA inn i genomet, og for det andre har den en viktig funksjon i å slå av kompetansesystemet. DprA binder og inaktiverer fosforylert ComE som fører til at ComE ikke binder seg til promoterene til de tidlige *com*-genene, og kompetansesystemet skruses dermed av (Mirouze et al., 2013).

Som nevnt tidligere, kan ulike stressfaktorer trigge *S. pneumoniae* til å bli kompetent, ved å påvirke uttrykket av, eller stabiliteten til CSP. Både interne og eksterne signaler kan resultere i transkripsjon av de tidlige *com*-genene (Figur 1.4A). Slike signaler kan registreres av to-komponentsystemet CiaRH og serin/treonin proteinkinasen StkP, som begge sitter i

## Innledning

cellemembranen til pneumokokkene. Både CiaRH og StkP er med på å påvirke induksjon av kompetanse (Straume et al., 2015).

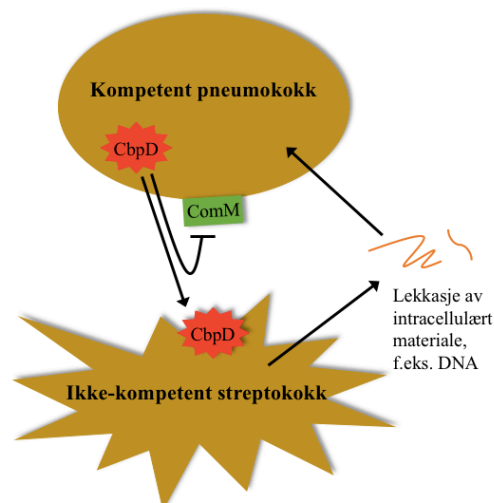
CiaRH består av en transmembran histidinkinase, CiaH, og en responsregulator, CiaR. CiaRH-systemet regulerer transkripsjonen av *htrA*, som koder for en protease lokalisert i cellemembranen. HtrA er vist å kløyve misfoldede membranproteiner, men har også proteolytisk aktivitet mot CSP (Cassone, Gagne, Spruce, Seeholzer, & Sebert, 2012), noe som bidrar til å hindre kompetanseinduksjon hos *S. pneumoniae* (Straume et al., 2015). Stress som øker antall feilfoldede proteiner i cella, som for eksempel antibiotika som inhiberer proteinsyntesen, vil føre til at HtrA-aktiviteten opptas av å bryte ned feilfoldede proteiner, mens nedbrytning av CSP reduseres (Moreno-Gamez et al., 2016). Dette resulterer i økt konsentrasjon av ekstracellulært CSP, og kompetanse induseres i cella. Det spekuleres i om dette er en stressrespons pneumokokker har, der de kan lete etter nye gener for å unngå feil folding av proteiner, som for eksempel ved eksponering for noen typer antibiotika (Cassone et al., 2012; Stevens, Chang, Zwack, & Sebert, 2011). StkP, som er et nøkkelprotein for regulering av celleveggssyntese og celledeling (Beilharz et al., 2012; Fleurie et al., 2014), ser også ut til å ha betydning for transkripsjonen av *com*-gener hos kompetente *S. pneumoniae* (Straume et al., 2015). Nøyaktig hvorfor StkP påvirker uttrykk av disse genene under kompetanse er ukjent, men det er sett at delesjon av *stkP* øker uttrykk av tidlige *com*-gener. Likevel produseres det mindre av sene kompetanseproteiner, noe som fører til at genetisk transformasjon hos *stkP*-mutantene minker (Sasková, Nováková, Basler, & Branny, 2007).

I tillegg til å indusere kompetansesystemet i bakteriecellen, vil CSP som dannes også kunne binde seg til ComD-reseptorer på andre nært beslektede bakterieceller. Det er funnet et stort antall CSPer med ulike sekvenser (ferotyper), både fra streptokokker i mitis-gruppen og i anginosus-gruppen. Dette tyder på at det kun er et begrenset antall bakteriearter som kan kommunisere med hverandre. Naboceller med like CSPer antas å kunne respondere ved selv å bli kompetente når CSP først produseres av en bakteriecelle (Johnsborg & Håvarstein, 2009b).

## 1.4 Fratrissid hos *S. pneumoniae*

Kompetente streptokokker skiller ikke mellom homologt og ikke-homologt DNA. Prosessen kan derfor være farefull da de risikerer å ta opp gener som kan ha en toksisk effekt på cella, eller DNA som kan inaktivere essensielle gener. For å få tilgang på homologt DNA produserer kompetente *S. pneumoniae* celleveggshydrolyasen kolin-bindende protein D (CbpD). Dette enzymet kodes for av et sent *com*-gen, og skiller ut for å lysere ikke-kompetente pneumokokker, eller andre nært beslektede streptokokker (*S. mitis* og *S. oralis*). Mekanismen antas å være viktig for at de kompetente pneumokokkene skal få tilgang på homologt DNA, som deretter kan tas opp og integreres i genomet via homolog rekombinasjon. Denne mekanismen kalles kompetanse-indusert cellelysering, eller fratrissid (Johnsborg & Håvarstein, 2009b; Straume et al., 2015).

CbpD binder til målcellens celleoverflate og lager kutt i celleveggen hos sensitive celler slik at disse lyserer og DNA frigjøres. Kompetente celler beskytter seg selv mot egenprodusert CbpD ved å uttrykke immunitetsproteinet ComM. Dette proteinet kodes for av et tidlig *com*-gen, slik at cellen rekker å bli immun før CbpD uttrykkes (Figur 1.5) (Johnsborg & Håvarstein, 2009b). Fratrissidmekanismen er ikke unik for pneumokokker, men finnes også hos de fleste andre streptokokkarter (Berg, Bjørnstad, Johnsborg, & Håvarstein, 2012; Johnsborg, Eldholm, Bjørnstad, & Håvarstein, 2008).



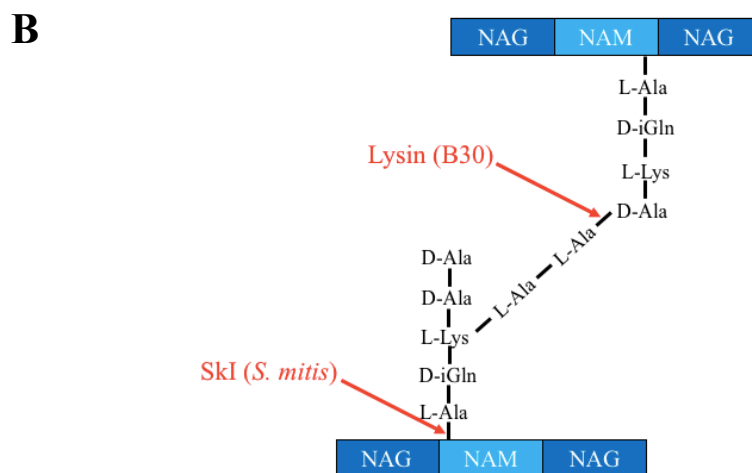
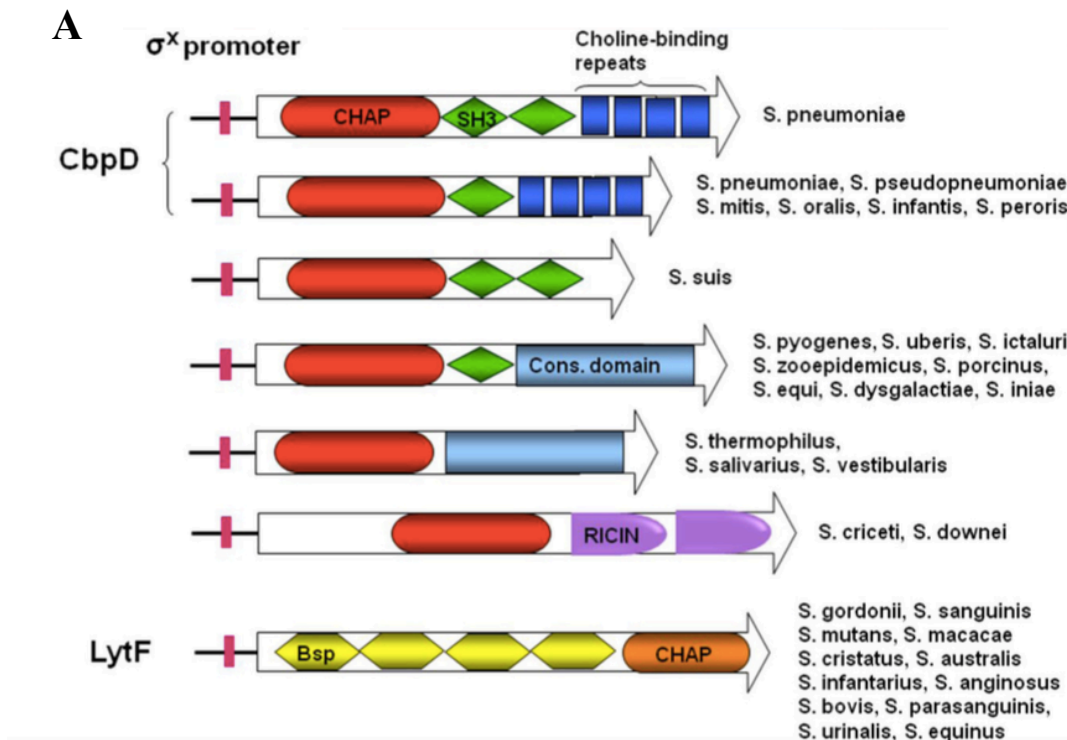
**Figur 1.5 Kompetanseindusert cellelysering.** Kompetent pneumokokk produserer CbpD som binder til celleveggen til en ikke-kompetent streptokokk. Den ikke-kompetente streptokokken lyserer, og intracellulært materiale lekker ut til omgivelsene, som den kompetente pneumokokken vil kunne ta opp. Den kompetente pneumokokken er immun mot egenprodusert CbpD fordi den uttrykker immunitetsproteinet ComM (Johnsborg & Håvarstein, 2009b).

## Innledning

For *S. pneumoniae* er det vist at den lytiske effekten til CbpD alene er nok for å lysere sensitive målceller, men at lyseringen blir mer effektiv ved tilstedeværelsen av autolysinene LytA og LytC hos målcellene (Eldholm, Johnsborg, Haugen, Ohnstad, & Håvarstein, 2009). LytA og LytC kan ikke alene føre til cellelysering, men bidrar til å akselerere lysering av målcellene. LytC blir aktiv først etter at CbpD har gjort skade på celleveggen. LytA, derimot, befinner seg vanligvis intracellulært, hvor den ikke skader cella. Etter at CbpD, alene eller ved hjelp av LytC til en viss grad lyserer målcella, slippes LytA ut ekstracellulært hvor det har lytisk aktivitet (Eldholm et al., 2009). I tillegg til LytA og LytC er det vist at bakteriosinene CibAB er med på å bidra til lysering av målceller når cellene vokser på blodagarskåler (Guiral, Mitchell, Martin, & Claverys, 2005). Av ukjent grunn er ikke dette tilfellet når cellene vokser i flytende vekstmedium (Håvarstein, Martin, Johnsborg, Granadel, & Claverys, 2006).

### 1.4.1 Oppbygging av CbpD og andre fratrisiner hos streptokokker

CbpD består av et muralytisk N-terminalt CHAP (cystein, histidin-avhengig amidohydrolase/peptidase)-domene, ett eller to SH3b (Src homolog 3b)-domener og et C-terminalt kolinbindende domene (CBD) som har fire kolinbindende motiv (Figur 1.6A) (Eldholm et al., 2010). CHAP-domener er katalytiske domener som fungerer som amidaser eller peptidaser, og kutter i stempeptider i peptidoglykanet hos bakterier (se seksjon 1.5.1 for beskrivelse av peptidoglykan). Det finnes mange ulike proteiner med kjente CHAP-domener (Bateman & Rawlings, 2003). Amidasen SkI inneholder et CHAP-domene med kjent kuttesete som kutter i den bakterielle celleveggen. SkI, som produseres av *S. mitis*, har ukjent funksjon, men kutter bindingen mellom N-acetylmuraminsyre (NAM) og L-Alanin (Figur 1.6B) (se seksjon 1.5.1) (Llull, López, & García, 2006). Bakteriofagen B30, som infiserer *S. agalactiae*, har et gen som koder for et lysin med et CHAP-domene. For å frigjøre nye bakteriofager kløyver dette lysinet sannsynligvis bindingen mellom L-Alanin og D-Alanin i stempeptidet i peptidoglykanet hos flere streptokokkarter (Figur 1.6B) (se seksjon 1.5.1) (Pritchard, Dong, Baker, & Engler, 2004).



**Figur 1.6 Oppbygning av ulike CbpDer og CbpD-liknende proteiner, og kutteseter for andre proteiner med CHAP-domener.** A) Alle kjente CbpDer og CbpD-liknende proteiner har et katalytisk CHAP-domene som er konservert. SH3b-omenene finnes oftest i CbpDer fra streptokokker i mitis-gruppen og pyogenic-gruppen, mens det repeterende kolinbindende setet bare er å finne i CbpDene fra streptokokker i mitis-gruppen. CbpD som produseres av *S. pneumoniae* og de kommensale artene *S. mitis* og *S. oralis* er svært like. Kompetente streptokokker som ikke produserer CbpD, produserer LytF som også inneholder et CHAP-domene (Hentet fra (Berg, Ohnstad, & Håvarstein, 2012)). B) Andre proteiner som har CHAP-domener med kjente kutteseter, som kan kutte i peptidoglykanet i celleveggen til *S. pneumoniae*. De røde pilene indikerer hvor i peptidoglykanet to ulike proteiner med CHAP-domener kan kutte. Det ene CHAP-proteinet er et lysin som kodes for av et gen i bakteriofagen B30, som infiserer *S. agalactiae*, og kutter sannsynligvis bindingen mellom L-Ala og D-Ala i peptidoglykanets kryssbinding (Pritchard et al., 2004). Det andre CHAP-proteinet produseres av *S. mitis*, og kutter bindingen mellom NAM og L-Ala i celleveggen (Lull et al., 2006).

## Innledning

Proteiner med CHAP-domener har vanligvis også andre domener som regulerer eller er med på å bestemme substratspesifisiteten til enzymet (Bateman & Rawlings, 2003). Den lytiske aktiviteten til CbpD er helt avhengig av både SH3b-domenene og CBD *in vivo*. Funksjonen til SH3b-domenene er ikke fullstendig forstått, men de er vist å binde til peptidoglykan. Det antas at SH3b-domenene er viktige for å posisjonere CHAP-domenet riktig mot sitt substrat i peptidoglykanet. CBD-domenet sørger for at CbpD binder til de kolinrepeterte områdene på målcellens teikoinsyrer. Mutasjonsstudier har vist at et funksjonelt CBD er essensielt for å posisjonere CbpD i septum hos målcellene (Eldholm et al., 2010). Nøyaktig hva CbpD kutter i celleveggen er ukjent, men siden det har et CHAP-domene er det sannsynlig at CbpD kløyver peptidbindinger i peptidoglykanet (Figur 1.6B) (se seksjon 1.5.1). Om den septale delen av celleveggen inneholder spesifikke peptidbroer som er bedre substrat for CbpD, er ikke kjent. Det er også en mulighet at CbpD kutter i den septale regionen fordi dette antas å være et svakt punkt i celleveggen (Eldholm et al., 2009; Eldholm et al., 2010).

Andre streptokokkarter syntetiserer også CbpD eller CbpD-liknende proteiner (Figur 1.6A). *S. pneumoniae* CbpD er svært lik CbpD fra de kommensale artene *S. mitis* og *S. oralis*. Det muralytiske domenet CHAP er høyt konservert i alle CbpDer eller CbpD-liknende proteiner, mens de celleveggsbindende domener har stor diversitet (Berg, Biørnstad, et al., 2012). Likevel er det ikke alle naturlig transformerbare streptokokker som har gener som koder for CbpD eller CbpD-liknende proteiner. Dette er streptokokkarter som *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* og *Streptococcus mutans*. Nesten alle streptokokkartene dette gjelder, uttrykker i stedet fratrisinet LytF under kompetanse. LytF er en CbpD-analog som består av et konservert CHAP-domene og celleveggsbindende Bsp-domener (Figur 1.6A). På grunn av at streptokokkene som produserer LytF har en annen type peptidoglykan enn de som produserer CbpD, binder de celleveggsbindende domener til andre komponenter i celleveggen enn kolin. LytF binder trolig til septum av cellene, men eksakt hvilke celleveggskomponenter det binder er fremdeles ikke kjent. I likhet med CbpD binder LytF kun til en rekke nært beslektede streptokokker (Berg, Ohnstad, et al., 2012).

### 1.4.2 ComM gir immunitet mot CbpD

ComM er et integralt membranprotein som kodes for av et tidlig *com*-gen. ComM beskytter *S. pneumoniae* mot å bli lysert av sitt eget CbpD under fratrisid (Håvarstein et al., 2006; Straume, Stamsås, Salehian, & Håvarstein, 2017). Maksimal ekspresjon av ComM oppnås mellom fem og ti minutter etter kompetanseinduksjon, slik at cellene oppnår immunitet før produksjonen av

CbpD starter. ComM blir deretter raskt fjernet fra cella (Peterson et al., 2004; Straume et al., 2017). Straume et al. (2017) har vist at mesteparten av ComM var degradert før produksjonen av CbpD tiltar (cirka 15-20 minutter etter kompetanseinduksjon). Basert på dette resultatet ser det ut til at ComM ikke nødvendigvis må være tilstede i cella samtidig som CbpD for å gi immunitet.

Hvilke cellulære prosesser ComM påvirker er fremdeles ukjente, men siden ComM er et integralt membranprotein, mens CbpD binder celleveggen fra utsiden, er det lite sannsynlig at immunitetsmekanismen involverer direkte kontakt mellom ComM og CbpD. En hypotese er at ComM beskytter cellene ved å modifisere celleveggen i septum siden det er vist at CbpD binder til og angriper denne delen hos sensitive målceller (Eldholm et al., 2010). En annen hypotese tar utgangspunkt i det faktum at ComM bremser celledelingsprosessen (Straume et al., 2017). Det er vist at overuttrykk av ComM har en betydelig veksthemmende effekt på *S. pneumoniae*, og kan i tillegg føre til morfologiske feil i cellene. De morfologiske feilene som er tydeligst under overuttrykk av ComM er forlenging av cellene og dannelse av flere septa som ikke fullføres (Bergé et al., 2017; Straume et al., 2017). En hypotese om hvorfor ComM bremser celledelingsprosessen baserer seg på antagelsen om at CbpD kun angriper celler i aktiv deling, mens celler som ikke deler seg er immune. Siden kompetanse slås på under stress, kan det tenkes at det å kun angripe aktivt voksende celler forsikrer de kompetente cellene at det bare frigjøres homologt DNA fra andre celler som klarer å takle miljøstresset. På denne måten vil kompetente celler erverve de samme egenskapene som er fordelaktige i det gitte miljøet. Om CbpD kun angriper celler i aktiv deling, og om immunitetsmekanismen til ComM er å hemme celledeling slik at CbpD ikke skal kunne lysere cellene som ikke er i aktiv deling, gjenstår å verifisere eksperimentelt. Nylig ble det publisert at ComM forsinket cellesyklusen for å ivareta kromosomintegriteten under transformasjon og homolog rekombinasjon, slik at ikke kromosomet skal havne i klem og dermed ødelegges når skilleveggen syntetiseres (Bergé et al., 2017). Derfor spekuleres det i om ComMs immunitetsfunksjon er en sideeffekt av ComMs egentlige rolle under kompetanse.

### **1.4.3 Biologiske effekter av fratrisidmekanismen**

Siden CbpD produseres av kompetente streptokokker for å lysere sensitive naboceller, er en av hovedhypotesene at dette enzymet spiller en nøkkelrolle i å øke tilgjengeligheten av homologt DNA til de kompetente cellene. Celleveggen til *S. pneumoniae* er ulik celleveggen til andre Gram-positive bakterier (se seksjon 1.5.2) og derfor binder CbpD seg bare på celleveggen til

## Innledning

nært beslektede bakterier (andre pneumokokker og flere av de andre artene innenfor mitis-gruppen, som for eksempel *S. mitis* og *S. oralis*) (Berg, Biørnstad, et al., 2012). Når bakteriene lyserer, øker konsentrasjonen av homologt DNA i omgivelsene, som streptokokkene kan ta opp. Når streptokokker utsettes for eksterne seleksjonspress, som eksponering for antibiotika, øker opptaket av nye gener muligheten for streptokokkene å overleve.

Flere stammer av de kommensale artene *S. mitis* og *S. oralis* er kjente for å kunne ha gener som koder for penicillinbindende proteiner med lav affinitet for beta-laktamer (gener for penicillinresistens). Når *S. mitis* eller *S. oralis* med disse genene lyseres av CbpD, kan resistensgenene overføres til pneumokokker via naturlig genetisk transformasjon, slik at også disse blir penicillinresistente (Chi, Nolte, Bergmann, Ip, & Hakenbeck, 2007; Dowson, Coffey, Kell, & Whiley, 1993; Sibold et al., 1994). Seleksjonspress vil også kunne forårsakes av vaksinasjon. Dette vil gjøre at pneumokokkene kan ta opp gener for kapselbytte, og dermed vil vaksinasjon kunne miste noe av sin effekt. Siden genene som koder for kapselproduksjon ligger i nærheten av gener som koder for penicillinbindende proteiner på genomet til streptokokker, ser man at spredning av resistensgener kan skje parallelt med kapselbytte (Straume et al., 2015). Dermed kan pneumokokkene i verste fall utvikle penicillinresistens i tillegg til å skifte serotype til en variant som ikke er inkludert i dagens vaksiner (Brueggemann, Pai, Crook, & Beall, 2007; Moffitt & Malley, 2011). Selv om det er god dokumentasjon for at CbpD og fratrisid spiller en stor rolle i å gi streptokokker nye egenskaper, skal det ikke utelukkes at CbpD kan ha andre funksjoner. Det er også mulig at CbpDs oppgave er å utrydde andre konkurrerende streptokokker, eller å bidra til dannelsen av biofilm (Berg, Biørnstad, et al., 2012).

*S. pneumoniae* er ofte å finne i biofilmer hvor de lever i samspill med andre bakterier (Berg, Biørnstad, et al., 2012). Biofilmen gir næring til bakteriene som lever der. I tillegg gir den beskyttelse mot blant annet antibiotika og vertens immunforsvar. For at en biofilm skal ha god mekanisk stabilitet er det flere komponenter som er viktige: polysakkarider, proteiner, lipider og nukleinsyrer (Flemming & Wingender, 2010). Ved tilsetning av DNaser hemmes dannelsen av streptokokk-biofilmer (Hall-Stoodley et al., 2008; Moscoso, García, & López, 2006), noe som gjenspeiler at eksogent DNA er en viktig del av biofilmdannelsen. Selv om streptokokker *in vivo* lever i biofilmer sammen med mange andre bakterier, er det likevel grunn til å tro at biofilmdannelse kun er en liten del av CbpDs funksjon, og at den viktigste oppgaven til CbpD faktisk er å gi tilgang til nytt DNA som kan inkorporeres i streptokokkens genom (Berg, Biørnstad, et al., 2012).



## 1.5 Celleveggstruktur og celledeling hos *S. pneumoniae*

Som nevnt ovenfor binder CbpD til celleoverflaten (septum) hos sensitive målceller og kløyver mest sannsynlig spesifikke bånd i celleveggen, som fører til at cellene lyserer og frigjør DNA. CbpD har begrenset spesifisitet for hvilke bakteriearter den kan lysere, som oftest arter nært beslektet med CbpD-produsenten (Johnsborg & Håvarstein, 2009b). Dette betyr at målcellene har bestemte egenskaper på celleoverflaten og/eller i celleveggen som gjenkjennes av CbpD. Man vet med sikkerhet at CbpD benytter kolin på teikoinsyrene i celleveggen hos målcellene (se seksjon 1.4.1) for å feste seg til celleoverflaten, men i tillegg må SH3b-domenene til CbpD gjenkjenne andre spesifikke celleveggstrukturer før CHAP-domenet kan kutte bindinger i peptidoglykanet. Hverken hva SH3b-domenene binder, eller hvilke(n) binding(er) CbpD kutter i peptidoglykanet hos målcellene, er kjent.

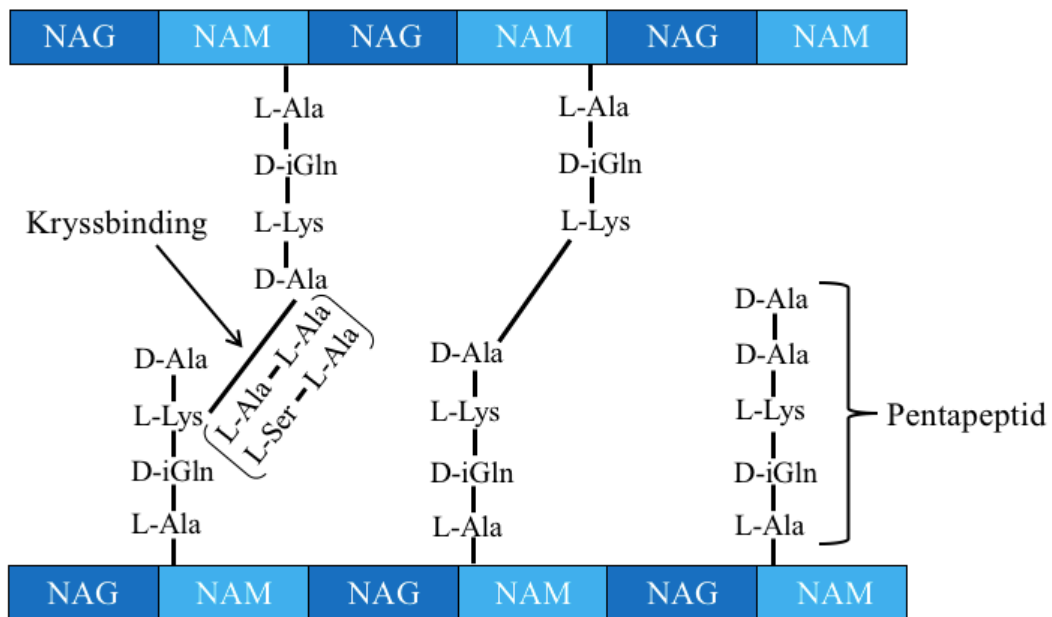
### 1.5.1 Oppbygging av celleveggen til *S. pneumoniae*

Celleveggen hos Gram-positive bakterier er 20-80 nm tykk og mangler en yttermembran som man finner hos Gram-negative bakterier. Celleveggen omslutter cellemembranen og har som funksjon å opprettholde cellas form og beskytte cella mot osmotisk trykk. I tillegg inneholder celleveggen en rekke proteiner, som blant annet er viktige for cellevekst og celledeling, og for interaksjon med bakteriens omgivelser, andre bakterier og cellene hos en vertsorganisme (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005; Vollmer, Blanot, & De Pedro, 2008).

Celleveggen til *S. pneumoniae* består hovedsakelig av peptidoglykan, også kalt *murein*, og teikoinsyrer (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005). Peptidoglykan er et makromolekylært nettverk, som består av lange glykankjeder som er kryssbundet via interpeptidbroer. En glykankjede består av annenhver N-acetylglukosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM) bundet til hverandre via  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4 bindinger (Vollmer et al., 2008). Modifisering av glykankjedene kan gi resistens mot ulike celleveggshydrolaser. For eksempel gir både deacetylering av NAG (Vollmer & Tomasz, 2000) og O-acetylering av NAM (Crisóstomo et al., 2006) resistens mot lysozym, et enzym som kløyver glykosidbindingen mellom NAM og NAG. Til hver NAM er det bundet et pentapeptid som hos *S. pneumoniae* består av fem følgende aminosyrer: L-Alanin – D( $\gamma$ )-isoGlutamin – L-Lysin – D-Alanin – D-Alanin. Karboksylgruppen til D-Alanin i posisjon fire til et pentapeptid og/eller aminogruppen til L-Lysin i posisjon tre til et annet pentapeptid kan danne en kryssbinding (interpeptidbro) som binder glykankjedene sammen. Denne kryssbindingen er enten direkte via D-Ala og L-Lys, eller dannes via et dipeptid, som

## Innledning

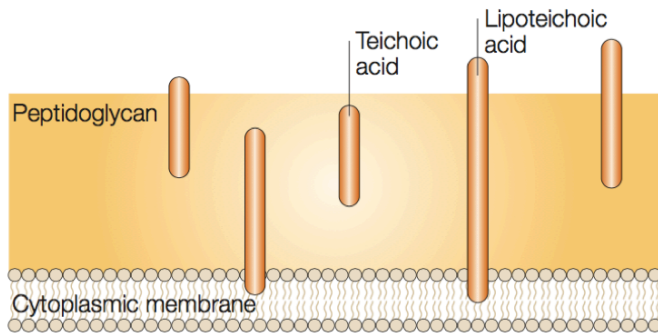
enten består av L-Ala og L-Ala eller L-Ala og L-Ser. Det dannes enten dimeriske, trimeriske eller tetrameriske strukturer (Figur 1.7) (se seksjon 1.5.3 for beskrivelse av peptidoglykansyntese). En samlet betegnelse for både kryssbundet og ikke-kryssbundet peptider i peptidoglykan er stempeptider (Bui et al., 2012; Garcia-Bustos, Chait, & Tomasz, 1987).



**Figur 1.7 Oppbygging av peptidoglykan hos *S. pneumoniae*.** Glykankjedene i peptidoglykanet består av annenhver NAG og NAM. Interpeptidbroer binder glykankjedene sammen via karboksylgruppen til D-Ala i posisjon fire til et pentapeptid og aminogruppen til L-Lys i posisjon tre til et annet pentapeptid. Hos *S. pneumoniae* er kryssbindingene enten direkte, eller bestående av et dipeptid (L-Ala – L-Ala eller L-Ser – L-Ala). De ulike interpeptidbroene (monomerer eller oligomerer) i peptidoglykan finnes i over førti ulike kombinasjoner (Garcia-Bustos et al., 1987).

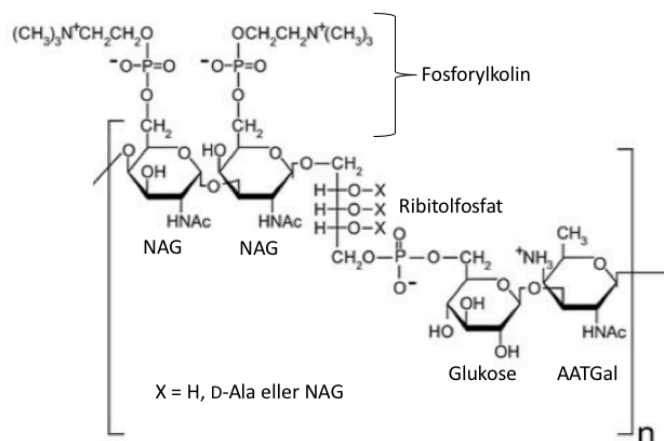
### 1.5.2 Teikoinsyrer i celleveggen til *S. pneumoniae*

Celleveggen til *S. pneumoniae* inneholder vegg-teikoinsyrer (WTA) og lipoteikoinsyrer (LTA), hvor WTA er bundet til NAM i peptidoglykan, mens LTA er kovalent bundet til lipider i cellemembranen (Figur 1.8) (Fischer, Behr, Hartmann, Peter-Katalinić, & Egge, 1993; Scheffers & Pinho, 2005). Teikoinsyrene består av repeterende enheter av glyserolfosfat og ribitolfosfat, og karbohydrater som er bundet til hverandre via fosfodiesterbindinger (Figur 1.9) (Gisch et al., 2013). Teikoinsyrene er essensielle for Gram-positive bakterier. De er viktige for blant annet binding av overflateproteiner (Ton-That, Marraffini, & Schneewind, 2004), interaksjoner med verten og for resistens mot antimikrobielle peptider (Neuhaus & Baddiley, 2003; Weidenmaier & Peschel, 2008).



**Figur 1.8** Skjematisk fremstilling av celleveggen hos pneumokokker. Celleveggen består av et tykt lag med peptidoglykan på utsiden av cellemembranen, og inneholder veggteikoinsyrer og lipoteikoinsyrer. Lipoteikoinsyrene danner kovalente bindinger med lipider i cellemembranen (Hentet fra (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005)).

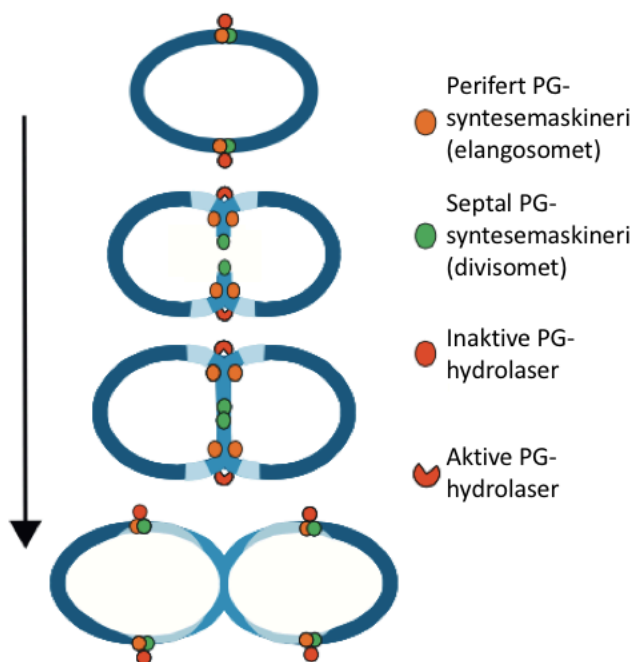
LTA og WTA har vanligvis ulik struktur hos en Gram-positiv bakterie, mens hos *S. pneumoniae* er derimot LTA strukturelt lik WTA (Bui et al., 2012; Fischer et al., 1993). LTA og WTA hos *S. pneumoniae* er bygd opp av repeterende enheter bestående av to NAG-molekyler, ribitolfosfat, glukose og det uvanlige sukkeret 2-acetoamido-4-amino-2,4,6-trideoksey-D-galaktose (AATGal) (Figur 1.9) (Behr, Fischer, Peter-Katalinić, & Egge, 1992; Jennings, Lugowski, & Young, 1980). I tillegg inneholder teikoinsyrene en eller to fosforylkolinmolekyler som er bundet til NAG (Figur 1.9) (Brundish & Baddiley, 1968). Fosforylkolin er funnet kun i teikoinsyrer hos pneumokokker, samt noen andre arter i mitis-gruppen (se seksjon 1.1.1), som for eksempel *S. mitis* og *S. oralis*. Disse kolindekkede teikoinsyrene fungerer som ligander for kolinbindende proteiner, som CbpD (se seksjon 1.4.1) (Hakenbeck, Madhour, Denapaite, & Brückner, 2009).



**Figur 1.9** Den repeterende enheten i teikoinsyrer hos *S. pneumoniae*. Et teikoinsyremolekyl består av  $n$  antall repeterende enheter av to NAG-molekyler, ribitolfosfat, glukose og 2-acetoamido-4-amino-2,4,6-trideoksey-D-galaktose (AATGal). Til NAG-molekylene er det bundet fosforylkolin, som fungerer som ligander for kolinbindende proteiner (Hentet fra (Denapaite et al., 2012)).

### 1.5.3 Peptidoglykansyntese og celledeling hos *S. pneumoniae*

For at *S. pneumoniae* skal få sin karakteristiske ovoide form syntetiserer bakterien peptidoglykan både i lengderetning og ved å lage en skillevegg («kryssvegg») som separerer de to dattercellene. Syntesen av peptidoglykan involverer en rekke enzymer, transportere og cytoskjelett-proteiner som er svært nøye regulert gjennom cellesyklusen (Zapun, Vernet, & Pinho, 2008). Mye tyder på at celleelongering og skilleveggen syntetiseres av to separate proteinkomplekser som kalles henholdsvis elangosomet og divisomet (Figur 1.10) (Massidda, Nováková, & Vollmer, 2013). Ny celledeling initieres når elangosomet og divisomet lokaliserer til cellens ekvator ved å binde til en såkalt celledelingsring som består av den bakterielle tubulinhomologen FtsZ og det adenosin trifosfat (ATP)-bindende proteinet FtsA (Erickson, Anderson, & Osawa, 2010; Lara et al., 2005). Nylig ble det vist at FtsZ/A-filamenter beveger seg sirkulært rundt delingssonen, og fører dermed elangosomet og divisomet rundt delingssonen. Slik fungerer FtsZ/A-ringen som en veiviser for syntesemaskineriene som setter inn nytt celleveggsmateriale i den eksisterende celleveggen (Bisson-Filho et al., 2017; Yang et al., 2017). Elangosomet syntetiserer ny cellevegg mellom den fremtidige dattercellens ekvator og den påbegynte skilleveggen, slik at cella vokser i lengden. Etter at elangosomet har initiert lateral celleveggsyntese, starter divisomet syntesen av skilleveggen (Pinho, Kjos, & Veening, 2013; Zapun, Vernet, et al., 2008). Mens cella vokser lateralt, dannes det snart to nye ekvatorringer (FtsZ/FtsA) på hver sin side av den originale ringen. Disse blir fremtidige divisjonsseter i de to nye dattercellene. Når skilleveggen er ferdig syntetisert, kløyves den av spesifikke peptidoglykan-hydrolaser slik at de to dattercellene skilles fra hverandre (Bartual et al., 2014; Massidda et al., 2013).



**Figur 1.10 Peptidoglykansyntese hos *S. pneumoniae*.** To maskinerier er ansvarlige for peptidoglykansyntesen hos pneumokokker. Det perifere peptidoglykan (PG)-syntesemaskineriet (oransje prikker) gjør at cellen vokser i lengderetning (elanosomet), mens det septale PG-syntesemaskineriet (grønne prikker) danner en skillevegg i ekvator av cella, og gjør at cella kan dele seg til to nye datterceller (divisomet). Når skilleveggen er ferdig syntetisert, aktiveres PG-hydrolaser (røde prikker; «Pac-Man»), og kløyver skilleveggen slik at de to dattercellene adskilles (Hentet fra (Sham, Tsui, Land, Barendt, & Winkler, 2012), men modifisert fra (Land & Winkler, 2011) og (Zapun, Vernet, et al., 2008)).

Enzymene som katalyserer inkorporeringen av nytt peptidoglykan i den eksisterende celleveggen kalles penicillinbindende proteiner (PBPer) (Massidda et al., 2013). PBPer katalyserer to reaksjoner for å syntetisere nytt peptidoglykan: (i) De utfører transglykosyleringsreaksjonen som resulterer i dannelsen av glykankjedene og (ii) de utfører transpeptideringsreaksjonen som kryssbinder glykankjedene inn i det eksisterende peptidoglykanet via interpeptidbroer. På den måten settes nye biter med peptidoglykan inn i den eksisterende celleveggen. PBPer kan inndeles i to hovedtyper, klasse A PBPer og klasse B PBPer. Klasse A PBPer har både glykosyltransferase-aktivitet, som betyr at de katalyserer bindinger mellom NAG og NAM, og transpeptidase-aktivitet, som betyr at de syntetiserer peptidbroene som kryssbinder glykankjedene. Klasse B PBPer har kun transpeptidase-aktivitet. Det er PBPer som er målet til  $\beta$ -laktam antibiotika, som for eksempel penicillin (Zapun, Contreras-Martel, & Vernet, 2008; Zapun, Vernet, et al., 2008).

*S. pneumoniae* uttrykker seks PBPer. Spesifikke PBPer deltar i de to maskineriene for peptidoglykansyntese (Figur 1.10). I elanosomet er det PBP2b (klasse B), mens det er PBP1a (klasse A) og PBP2x (klasse B) i divisomet. Om PBP2a (klasse A) og PBP1b (klasse A) bidrar

## Innledning

mest i elangosomet, divisomet eller begge er ikke kjent. I tillegg står PBP3 for siste del av syntesen. PBP3 er en karboksypeptidase som kløyver av den C-terminale D-Ala-residuen i pentapeptider, slik at disse ikke kan benyttes av de andre PBPene for å danne interpeptidbroer. På denne måten kan PBP3 regulere antall interpeptidbroer i celleveggen (Pinho et al., 2013; Zapun, Vernet, et al., 2008).

### 1.6 Oppgavens målsetting

Alle streptokokkarter man kjenner til har gener som koder for fratrisiner. Fratrisidmekanismen virker derfor å være særdeles viktig for streptokokkers evolusjonære utvikling, og for opptak av gener for penicillinresistens og virulensfaktorer (Johnsborg & Håvarstein, 2009b; Straume et al., 2015). *S. pneumoniae* forårsaker mange dødsfall hvert år på grunn av dens virulente egenskaper (Hardie & Whiley, 1997). Med tanke på at antall penicillinresistente isolater øker dramatisk, er det viktig å få en fundamental forståelse av hvordan disse resistensgenene spres blant streptokokker og andre bakterier. Siden fratrisid øker tilgjengeligheten på gener, og siden CbpD er en essensiell komponent i denne mekanismen, er det ønskelig å vite mer om de biokjemiske egenskapene til CbpD, samt å undersøke målgruppen for dette enzymet. I dette arbeidet er det derfor fokusert på følgende:

- Overuttrykke CbpD i en løselig form.
- Finne en metode for å rense CbpD, i tillegg til en god oppbevaringsmetode for å holde proteinet stabilt.
- Teste aktiviteten til CbpD mot ulike streptokokkarter.
- Bestemme hvilke(n) binding(er) i peptidoglykanet som CbpD kutter.
- Rense CbpD for krystallisering og strukturbestemmelse.

## 2. Materialer

### 2.1 Bakteriestammer og plasmider

**Tabell 2.1 Bakteriestammer og plasmider.** Oversikt over stammer av streptokokker og *E. coli*, samt plasmider som er benyttet i dette arbeidet.

Stamme	Genotype/karakteristikk	Referanse/kilde
<i>S. pneumoniae</i>		
D39	Villtype, har kapsel	(Slager, Aprianto, & Veening, 2018)
ds177	RH422, men $\Delta$ Janus::CbpD <sup>B6</sup>	Dr. Daniel Straume
ds180	ds177, men $\Delta$ comM::Janus	Dr. Daniel Straume
MK185	D39, men $\Delta$ cpsE::kan <sup>R</sup>	Dr. Morten Kjos
R6	Villtype	
R704	R6 derivat, men $\Delta$ comA::Ery <sup>R</sup>	Gave fra Prof. Jean-Pierre Claverys
RH1	R704, men $\Delta$ egb::spc, Ery <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	(Johnsborg et al., 2008)
RH14	RH1, men $\Delta$ lytA::kan, Ery <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Eldholm et al., 2009)
RH17	RH1, men $\Delta$ cbpD::kan, Ery <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Johnsborg et al., 2008)
RH421	RH1, men Sm-resistent ved transformasjon av CP1200 kromosomalt DNA, Ery <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	(Eldholm et al., 2009)
RH422	RH421, men $\Delta$ cbpD::Janus, Ery <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Eldholm et al., 2009)
RH425	R704, men Sm <sup>R</sup>	(Johnsborg & Håvarstein, 2009a)
SPH158	$\Delta$ comA P <sub>1</sub> ::P <sub>comR</sub> P <sub>comX</sub> ::p <sub>bp2b</sub> $\Delta$ p <sub>bp2b</sub> <sub>wt</sub> $\Delta$ lytA::Spc <sup>f</sup> Ery <sup>f</sup> Sm <sup>f</sup> Spc <sup>f</sup>	(Berg, Stamsås, Straume, & Håvarstein, 2013)
<i>S. mitis</i>		
B6	Villtype	Prof. Regine Hakenbeck
Sk142	Villtype	Prof. Mogens Kilian

## Materialer

<b>Stamme</b>	<b>Genotype/karakteristikk</b>	<b>Referanse/kilde</b>
<u><i>S. oralis</i></u>		
Sk610	Villtype	Prof. Mogens Kilian
Uo5	Villtype	Prof. Mogens Kilian
<u><i>S. thermophilus</i></u>		
LMG18311	Villtype	Dr. Truls Johan Bjørnstad
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5 $\alpha$	Kloningsvert	Invitrogen™
3SO	DH5 $\alpha$ , men med pRSET A-CbpD <sup>B6</sup>	Dette arbeidet
4SO	DH5 $\alpha$ , men med pRSET A-CbpD <sup>Uo5</sup>	Dette arbeidet
BL21	Ekspresjonsvert	Invitrogen™
7SO	BL21, men med pRSET A-cbpD <sup>B6</sup>	Dette arbeidet
8SO	BL21, men med pRSET A-cbpD <sup>Uo5</sup>	Dette arbeidet
<u>Plasmid</u>		
pRSET A		Invitrogen™
pRSET A-cbpD <sup>B6</sup>		Dette arbeidet
pRSET A-cbpD <sup>Uo5</sup>		Dette arbeidet

## 2.2 Peptidferomon

Tabell 2.2 Peptidferomon. Peptidferomon som er benyttet i dette arbeidet.

<b>Peptidferomon</b>	<b>Aminosyresekvens (N→C)</b>	<b>Produsent</b>
CSP-1	EMRLSKFFRDFILQRKK	Research Genetics, Inc



## 2.3 Primere

**Tabell 2.3 Primere.** Primere som ble benyttet til polymerase kjedereaksjon (PCR) i dette arbeidet, inkludert beskrivelse og korresponderende oligonukleotidesequenser (5' - 3'). Alle primerne ble konstruert i dette arbeidet.

Primernavn	Oligonukleotidesequens (5' - 3')	Beskrivelse
SO1 F	tacg <u>TCTAGAAATAATTTTGTTTAACT</u> <u>TTAAGAAGGAGATATACAT</u> atgTATT CTGGAGGAAATGGATCGATTG	Binder oppstrøms for <i>cbpdD<sup>B6</sup></i> , men har overlapp til pRSET A (understreket skrift) *. Har kuttesete for XbaI (fet skrift).
SO2 R	tacgAAGCTTCTATACTCGTTCTCCAT CACTG	Binder nedstrøms for <i>cbpdD<sup>B6</sup></i> . Har kuttesete for HindIII (fet skrift).
SO3 F	tacg <u>TCTAGAAATAATTTTGTTTACTT</u> <u>TAAGAAGGAGATATACAT</u> atgTCTGG AGGGAATGGATCGTTTG	Binder oppstrøms for <i>cbpdD<sup>Uo5</sup></i> , men har overlapp til pRSET A (understreket skrift)*. Har kuttesete for XbaI (fet skrift).
SO4 R	tacgAAGCTTCTAGATTCTAGCTCGTT ACTATC	Binder nedstrøms for <i>cbpdD<sup>Uo5</sup></i> . Har kuttesete for HindIII (fet skrift).

\*Inkluderer ribosomalt bindesete.

## 2.4 Sekvenseringsprimere

**Tabell 2.4 Sekvenseringsprimere.** Primere som ble benyttet til sekvensering i dette arbeidet, inkludert beskrivelse og korresponderende oligonukleotidesequenser (5' - 3').

Primernavn	Oligonukleotidesequens (5' - 3')	Beskrivelse	Referanse
168_pRSETF	AATACGACTCACTATAGGGAGA	Binder oppstrøms for T7 promoter i pRSET.	Invitrogen™
169_pRSETR	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	Binder nedstrøms for pRSET «reverse priming site».	Invitrogen™

## 2.5 Antibiotika

**Tabell 2.5 Antibiotika.** Antibiotikum som er benyttet i dette arbeidet og dets startkonsentrasjon.

Antibiotikum	Startløsning	Produsent	Produktnummer
Ampicillin	100 mg/ml	Sigma-Aldrich	A-9518

## 2.6 Vekstmedier

### Brain Heart Infusion (BHI)-medium

37 g buljong (Oxoid) i 1 L dH<sub>2</sub>O

### Pre C-medium

0,045 g Cystein HCl

8 g Natriumacetat

20 g Bacto™ Casitone

0,024 g L-Tryptofan

34 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Fyll dH<sub>2</sub>O opp til 4 L totalvolum.

### **C-medium**

Til 150 ml pre C-medium tilsettes:

150 µl MnCl<sub>2</sub> 0,4 mM

1,5 ml Glukose 20 %

3,75 ml ADAMS III

110 µl Glutamin 3 %

2,25 ml Natrium pyruvat 2 %

95 µl Sukrose 1,5 M

1,5 ml Uridin adenosin 2 mg/ml

1,5 ml Albumin/BSA 8 %

3,75 ml Gjærekstrakt

Løsningen er holdbar en dag, og oppbevares ved 4°C.

### **Lysogeny broth (Lb)-medium**

10 g Bakto Trypton

5 g Gjærekstrakt

10 g NaCl

Fyll dH<sub>2</sub>O opp til 1 L totalvolum.

### **Lb-agar**

15 g agar i 1 L dH<sub>2</sub>O

### **Todd Hewitt (TH)-medium**

30 g TH buljong (Becton, Dickinson and Company) i 1 L dH<sub>2</sub>O

### **Soc-medium**

2 g Bakto Trypton

0,5 g Bakto gjærekstrakt

0,2 ml 5 M NaCl

0,25 ml 1 M KCl

1 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

2 ml 1 M glukose

Fyll dH<sub>2</sub>O opp til 100 ml totalvolum.

## 2.7 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører

Tabell 2.6 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører.

Navn	Start-konsentrasjon	Produsent	Produktnummer
1 kb DNA ladder	500 µg/ml	New England BioLabs	N3232L
dATP	100 mM	TaKaRa	4026
dGTP	100 mM	TaKaRa	4027
dCTP	100 mM	TaKaRa	4028
dTTP	100 mM	TaKaRa	4029
Color Prestained Protein Ladder, Broad Range (11-245 kDa)		BioLabs	P7712S
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/µl	New England BioLabs	M0530
One Taq® DNA polymerase	5 U/µl	New England BioLabs	M0273
Deoksyribonuklease I fra pankreas hos storfe	10 mg/ml	Sigma-Aldrich®	DN25-100MG
Ribonuklease A fra pankreas hos storfe	10 mg/ml	Sigma-Aldrich®	R4875-1G
Quick T4 DNA Ligase		New England BioLabs	M2200L
T4 DNA Ligase	400 000 U/ml	New England BioLabs	M0202L
CbpD <sup>B6/Uo5</sup>		Fremstilt og renset i dette arbeidet.	
LytA		Fremstilt og renset av Dr. Daniel Straume.	

## 2.8 Buffere og løsninger

### 2.8.1 Løsninger for tillaging av C-medium

#### Gjærekstrakt

40 g gjærekstrakt

360 ml dH<sub>2</sub>O

6 ml 12 N/37 % HCl

16 g aktivt kull

Tillaging: 40 g gjærekstrakt ble løst i 360 ml dH<sub>2</sub>O og pH ble justert til pH 3,0 med HCl. Det ble tilsatt 16 g aktivt kull. Løsningen ble blandet i ti minutter på magnetrører og deretter oppbevart ved 4°C i to timer. Løsningen ble filtrert over natt gjennom en kolonne pakket med glassull og celitt. Løsningens pH ble så justert til pH 7,8 med høymolar NaOH, og sluttvolumet justert til 400 ml. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved - 80°C i 15 ml nunc-rør á 4 ml.

#### ADAMS I

0,15 ml 0,5 mg/ml Biotin

75 mg Nikotinsyre

87,5 mg Pyridoxine hydroklorid

300 mg Kalsium panthothenate

80 mg Thiamin hydroklorid

35 mg Riboflavin

Løsningen ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 0,5 L og pH ble justert til 7,0. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C.

#### ADAMS II (10 x)

500 mg Jernsulfat heptahydrat

500 mg Kobbersulfat pentahydrat

500 mg Sink sulfat heptahydrat

200 mg Mangan(II)-klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert HCl

Løsningen ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 100 ml. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C.

## Materialer

### **ADAMS III**

128 ml ADAMS I

3,2 ml ADAMS II (10 x)

1,6 ml Aspargin monohydrate

0,16 g Kolinklorid

0,4 g Kalsiumklorid dehydrert

16 g Magnesiumklorid hexahydrat

Løsningen ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 800 ml og pH ble justert til 7,6. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C.

### **2.8.2 Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese**

#### **50 x TAE (Tris-Acetate-EDTA)**

242 g Tris-base

57,1 ml Glasial eddiksyre

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

Løsningen ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 1 L, og oppbevart ved romtemperatur.

#### **6 x DNA loading buffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

40 % Sukrose

0,01 % Bromfenolblå

#### **1 kB DNA ladder (50 ng/ml)**

50 µl 1 kb ladder (Invitrogen)

200 µl 10 x loadingbuffer

750 µl autoklavert dH<sub>2</sub>O

Løsningen oppbevares ved 4°C.

### **2.8.3 Buffere og løsninger til SDS-PAGE**

#### **10 x Tris-glycin Runningbuffer**

30 g Tris-base (0,25 M)

144 g Glysin (1,92 M)

50 ml 20 % SDS (1 % v/v)

Løsningen ble justert til et sluttvolum på 1 L, og oppbevart ved romtemperatur.

### 2 x SDS sample buffer

0,125 M Tris-HCl, pH 6,8

4 % SDS

0,30 M (2 %)  $\beta$ -2-merkaptoetanol (0,2 M DTT)

20 % Glyserol

0,01 % Bromfenolblå

### Oppskrift på separasjonsgeler (2 stk.)

	8 %	10 %	12 %	15 %	18 %
ddH <sub>2</sub> O	5,3 ml	4,78 ml	4,3 ml	3,55 ml	2,8 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
40 % akrylamid+0,8 % bis-akrylamid	2 ml	3 ml	3 ml	3,75 ml	4,5 ml
10 % APS*	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml
Sluttvolum	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

\*APS-løsning har begrenset holdbarhet, og ble derfor laget fersk før bruk.

### Oppskrift på stackinggeler (2 stk.)

	4 %
ddH <sub>2</sub> O	3,15 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	0,05 ml
40 % akrylamid+0,8 % bis-akrylamid	0,5 ml
Bromfenolblå	0,05 ml
10 % APS*	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
Sluttvolum	5 ml

\*APS-løsning har begrenset holdbarhet, og ble derfor laget fersk før bruk.

Materialer

### **Løsninger til Coomassie-farging av SDS-PAGE**

#### ***Fargeløsning (0,5 L)***

0,5 g Coomassie Brilliant Blue (0,1 % w/v)

200 ml metanol (40 % v/v)

50 ml eddiksyre (10 % v/v)

250 ml dH<sub>2</sub>O

#### ***Avfargingsløsning (0,5 L)***

50 ml eddiksyre

50 ml metanol

400 ml dH<sub>2</sub>O

### **Refoldingsbuffer til zymografi**

50 mM NaCl

20 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 % Triton

20 mM Tris-HCl, pH 7,4

### **2.8.4 Buffere og løsninger for rensing av proteiner**

#### **1 M Tris-HCl, pH 7,4 (250 ml)**

30,3 g Tris-base ble løst i 200 ml dH<sub>2</sub>O. pH ble justert ved tilsetning av HCl til pH 7,4, og dH<sub>2</sub>O ble fylt opp til totalvolum 250 ml.

Denne løsningen ble brukt som startløsning til en rekke andre løsninger.

#### *2.8.4.1 Løsninger til DEAE-cellulose*

#### **Tris-bufret salin (TBS)-buffer: 25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl (0,5 L)**

Det ble tilsatt 4,4 g NaCl til 12,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4. Løsningen ble fortynnet med dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 25 mM Tris-HCl og et totalvolum på 0,5 L.

#### **10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl (250 ml)**

Det ble tilsatt 21,9 g NaCl til 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4. Løsningen ble fortynnet med dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 10 mM Tris-HCl og et totalvolum på 250 ml.



**10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl; 0,14 M kolin (30 ml)**

Det ble tilsatt 2,6 g NaCl og 0,59 g kolinklorid til 300  $\mu$ l 1 M Tris-HCl, pH 7,4. Løsningen ble fortynnet med dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 10 mM Tris-HCl og et totalvolum på 30 ml.

Denne løsningen ble laget fersk før bruk.

*2.8.4.2 Løsninger til dialyse***10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl (1 L)**

10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 ble fortynnet med dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 10 mM Tris-HCl og et totalvolum på 1 L.

*2.8.4.3 Løsninger til gelfiltrering***10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl (1 L)**

Det ble tilsatt 8,8 g NaCl til 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4. Løsningen ble fortynnet med dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 10 mM Tris-HCl og et totalvolum på 1 L.

**2.8.5 Buffere og løsninger for HPLC****Oppskrift for 0,1 M Natriumfosfat buffer (100 ml) til preparering av HPLC-prøver**

pH	Volum av 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Volum av 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5,8	7,9 ml	92,1 ml
7,0	57,7 ml	42,3 ml
8,0	93,2 ml	6,8 ml

**0,05 % Trifluoroacetic acid (TFA) (0,5 L)**

250  $\mu$ l TFA ble fortynnet med dH<sub>2</sub>O til en sluttkonsentrasjon på 0,05 % TFA og et sluttvolum på 0,5 L.

**0,05 % TFA; 15 % Acetonitril (ACN) (0,5 L)**

250  $\mu$ l TFA

75 ml ACN

Løsningen ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 0,5 L.

## Materialer

### 2.8.6 Andre buffere og løsninger

#### 0,5 M Etylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8,0

18,6 g EDTA ble løst i 100 ml dH<sub>2</sub>O. pH ble justert ved tilsetning av NaOH.

#### 1 M Tris-HCl pH 8,0

15,15 g Tris-base ble løst i 100 ml dH<sub>2</sub>O. pH ble justert ved tilsetning av NaOH til pH 8,0.

#### 1 M Tris-HCl pH 6,8

15,15 g Tris-base ble løst i 100 ml dH<sub>2</sub>O. pH ble justert ved tilsetning av HCl til pH 6,8.

## 2.9 Kjemikalier

For en alfabetisk oversikt over kjemikalier benyttet i dette arbeidet, se Vedlegg A.

### 2.10 Kit

**Tabell 2.7 Kit.** Kit som er benyttet i dette arbeidet, samt deres bruksområder.

Navn	Bruksområde	Produsent	Produkt-nummer
E.Z.N.A. plasmid DNA mini kit 1	Ekstraksjon og rensing av plasmid-DNA fra <i>E. coli</i>	Omega bio-tek	D6943-02
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit	Rensing av PCR-produkter og DNA fra agarose gel.	Macherey-Nagel	740609.250

## 2.11 Instrumenter

**Tabell 2.8 Instrumenter.** Instrumenter som er benyttet i dette arbeidet. Annet vanlig laboratorieutstyr er også brukt, men ikke nevnt i denne listen.

<b>Instrument</b>	<b>Modell</b>	<b>Leverandør</b>
Celleknuser	FastPrep <sup>®</sup> -24	MP <sub>TM</sub> Biomedicals
Mikroplateleser	Synergy H1 Hybrid Reader	BioTek <sup>®</sup>
PCR-maskin	ProFlex PCR systems	Applied Biosystems
UHPLC-maskin	Dionex UltiMate 3000	Thermo Scientific
Proteinrenser	Äktaprime plus	GE Healthcare Life Sciences

## 3. Metoder

### 3.1 Dyrkning og lagring av bakterier

#### 3.1.1 Dyrkning av *E. coli*

Stammer av *E. coli* ble dyrket aerobt ved 37°C i Lb-medium, enten i flytende form eller på Lb-agarskåler. De flytende kulturene ble inkubert i risteinkubator ved 200 rpm. *E. coli*-kloner som inneholdt plasmidet pRSET A ble dyrket med 100 µg/ml ampicillin i vekstmediet.

#### 3.1.2 Dyrkning av streptokokker

Arter av streptokokker ble dyrket ved 37°C uten risting. De ble dyrket anaerobt i flytende dagsferskt C-medium (Lacks & Hotchkiss, 1960), BHI-medium eller TH-medium.

#### 3.1.3 Lagring av bakterier

Det ble laget startkulturer og frysestocks av bakterier i eksponentiell vekstfase ( $OD_{550} = \sim 0,3$ ). Startkulturene og frysestockene ble blandet med glyserol til en sluttkonsentrasjon på  $\sim 15\%$ , for deretter og fryses ned til  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Transformasjon av *E. coli*

1. Kjemisk kompetente *E. coli* ble tint på is.
2. Til 50 µl kjemisk kompetente *E. coli* ble det tilsatt plasmid.
  - 10 µl for plasmidligeringer og 10-50 ng for rensset plasmid.
3. Røret med celler og plasmid ble blandet forsiktig, og deretter inkubert på is i 1 time.
4. Det ble utført varmesjokk ved å inkubere prøven på vannbad ved 42°C i 30 sekunder.
5. Prøven ble satt på is i 1 minutt og det ble tilsatt 450 µl Soc-medium.
6. Prøven ble inkubert 1 time i risteinkubator (200 rpm) ved 37°C.
7. Ved plasmidligeringer ble cellene spunnet ned ved 13 000 rpm i 1 minutt og hele cellevolumet ble platet ut på Lb-skål med passende antibiotikum. Ved transformasjon med rensset plasmid, ble 100 µl av kulturvolumet platet ut.
8. Skålen ble inkubert aerobt ved 37°C over natt.
9. Transformanter ble verifisert ved bruk av PCR. Hvis PCR-produktene hadde rett størrelse, indikerte dette at cellene hadde tatt opp plasmid med insert.
10. Transformantene ble dyrket i Lb-medium med 100 µg/ml ampicillin ved 37°C i risteinkubator (200 rpm) til  $OD_{600} = 0,4-0,8$ .

11. Sekvensen på insert i plasmid ble til slutt verifisert ved Sanger sekvensering av GATC Biotech.

### 3.3 Prinsippet bak Sanger sekvensering

DNA-sekvensering er en metode for å bestemme basesekvensen i et DNA-templat. I dag benyttes mye nestegenerasjons sekvenseringsmetoder (NGS), som Illumina sekvensering. NGS gjør det mulig å sekvensere store mengder DNA, og blir stadig bedre og billigere (Shendure & Ji, 2008). Likevel benyttes det fortsatt mye av den klassiske sekvenseringsmetoden Sanger sekvensering, som fungerer bra for korte DNA-templater og for verifisering av DNA-konstrukter til molekylær kloning.

Sanger sekvensering er en sekvenseringsmetode utviklet av Frederick Sanger, og baserer seg på syntese av et korresponderende DNA-templat med tilsetning av kjedetermineringsinhibitorer. Til en reaksjon tilsettes det både deoksyribonukleotider (dNTPer) og dideoksyribonukleotider (ddNTPer), DNA-templat, DNA-polymerase og en primer som hybridiserer til en del av DNAet som skal sekvenseres. ddNTPer har et hydrogenatom på 3' karbonet i stedet for en hydroksylgruppe, noe som hindrer polymeriseringen av DNA-tråden. Under sekvensering dannes det DNA-tråder av ulike lengder, siden ddNTP inkorporeres tilfeldig på DNA-templatet. ddNTPene er merket med forskjellige fluorescerende farger som fluorescerer ved ulike bølgelengder. Dette gjør det mulig å bestemme DNA-templatets sekvens (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977).

I dette arbeidet ble plasmider som skulle sekvenseres sendt til sekvenseringsfirmaet GATC Biotech, som benytter Sanger sekvensering. Det ble laget to separate løsninger, en med forward primer og en med revers primer, som bestod av 200 ng plasmid, 10 pmol sekvenseringsprimer og dH<sub>2</sub>O til et totalvolum på 10 µl.

### 3.4 Prinsippet bak polymerase kjedereaksjon

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode som brukes for å amplifisere bestemte områder av DNA *in vitro*. For PCR trengs det primere, som er korte oligonukleotider, vanligvis 15-25 basepar lange, og et DNA-templat. Primerne må være komplementære til en del av DNAet som skal amplifiseres, slik at primerne hybridiserer til riktig plass på DNA-templatet. I tillegg trengs det en varmestabil DNA-polymerase, frie deoksyribonukleotider (dNTPer) og PCR-buffer med magnesiumioner (Freeland, Kirk, & Petersen, 2011).

En PCR-syklus består av tre trinn, der DNAet først denatureres fra dobbeltrådet til enkelttrådet DNA, for så at primerne hybridiserer og deretter forlenges. For å få nok DNA, gjentas disse trinnene 25-35 ganger. For å oppnå optimale forhold i reaksjonen er det viktig med riktig temperatur i de ulike trinnene. Denatureringstemperaturen og lengden på denatureringen avhenger av lengden og sekvensen på DNA-tråden, og temperaturen pleier å være på omtrent 95°C. Temperaturen senkes til et sted mellom 50 og 65°C når primerne skal hybridisere, og økes til 68-72°C når det skal syntetiseres en ny komplementær DNA-tråd (elongering). Den eksakte elongeringstemperaturen avhenger av hvilken DNA-polymerase som brukes. Det er DNA-polymerasen som syntetiserer ny DNA-tråd ved å forlenge primerne på 3' enden. Så lenge forholdene er optimale, dobles mengden produkt for hver syklus, noe som gir en eksponentiell økning av produkt i denne perioden (Freeland et al., 2011; Kubista et al., 2006).

Hvilken DNA-polymerase som ble benyttet i dette arbeidet var avhengig av om PCR ble benyttet for å screene transformanter eller for kloningsarbeid. For screening ble det brukt One *Taq*<sup>®</sup> (New England BioLabs) DNA-polymerase og når PCR-produktet skulle brukes i videre kloningsarbeid ble det brukt Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity (New England BioLabs) DNA polymerase. One *Taq*<sup>®</sup> DNA-polymerase har en elongeringstid på ~ 1 minutt for hver 1 kb (New England BioLabs) og har en mindre nøyaktighet enn Phusion<sup>®</sup> DNA polymerase. Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA polymerase, derimot, har en elongeringstid på bare ~ 30 sekunder per 1 kb (for genomisk DNA), og fungerer bra også på lange DNA-templater (New England BioLabs).

### 3.4.1 PCR-protokoll for 50 µl PCR-miks med Phusion® High-Fidelity (New England BioLabs) DNA-polymerase

I dette arbeidet ble Phusion® PCR brukt til amplifisering av *cbpD* fra streptokokker.

Følgende reagenser ble blandet i PCR-rør på is:

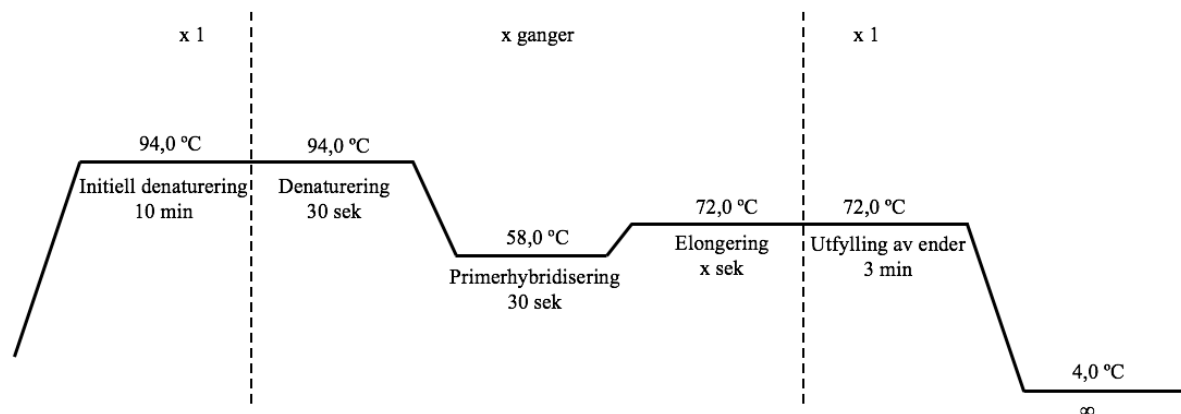
---

2,5 µl Forward primer (10 µM)
2,5 µl Reverse primer (10 µM)
1 µl 10 mM dNTPs
1 µl Templat-DNA (20-100 ng)
10 µl 5x Phusion® reaksjonsbuffer
0,5 µl Phusion® High-Fidelity DNA-polymerase (2 U/µl)
32,5 µl dH <sub>2</sub> O

---

50 µl Totalvolum

PCR-reaksjonene ble utført i en PCR-maskinen med programmet som vises i Figur 3.1. Elongeringstiden varierer etter hvor langt PCR-produktet er.



**Figur 3.1 PCR-program ved bruk av Phusion® High-Fidelity.** PCR-program som ble benyttet i dette arbeidet for DNA-amplifisering ved bruk av Phusion® High-Fidelity (New England BioLabs) DNA-polymerase. Elongeringstiden varierte ut i fra hvor langt PCR-produktet var. Phusion® DNA-polymerase bruker cirka 30 sekunder for hver 1 kb ved amplifisering av genomisk DNA (New England BioLabs).

### 3.4.2 PCR-protokoll for 20 µl PCR-miks med One *Taq*<sup>®</sup> (New England BioLabs) DNA-polymerase

I dette arbeidet ble PCR med One *Taq*<sup>®</sup> DNA-polymerase brukt for å verifisere transformanter. Etter PCR ble produktet verifisert ved bruk av agarose gelelektroforese (se seksjon 3.5.1).

Følgende reagenser ble blandet i PCR-rør på is:

---

1 µl Forward primer (10 µM)
1 µl Reverse primer (10 µM)
0,5 µl 10 mM dNTPs
1 µl Templat-DNA (20-100 ng)
4 µl 5x One <i>Taq</i> reaksjonsbuffer
0,125 µl One <i>Taq</i> <sup>®</sup> DNA-polymerase (5 U/µl)
12,375 µl dH <sub>2</sub> O
<hr/>
20 µl Totalvolum

Programmet som ble brukt er nesten likt som ved Phusion<sup>®</sup> PCR (Figur 3.1), men har en lenger elongeringstid siden One *Taq*<sup>®</sup> DNA-polymerase bruker lenger tid på å syntetisere DNAet enn Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-polymerase.

### 3.4.3 Primerdesign

I dette arbeidet ble det designet primere for å amplifisere *cbpD* fra *S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5 (Tabell 2.3). Primerne ble laget slik at de i tillegg til korrespondanse til start eller slutt av *cbpD*-genet, inkluderte kuttsete for passende restriksjonsenzym (XbaI eller Hind III) (seksjon 3.6.3) og fire tilfeldige basepar i 5'ende av primerne for å kutte mer effektivt (personlig kommunikasjon med veileder). Forward primere inneholdt i tillegg ribosomalt bindesete for effektiv translasjon av *cbpD*-genet (seksjon 3.6.2.1). Alle primerne avsluttes med guanin (G) eller cytosin (C) i 3' ende og ble designet til en smeltetemperatur på cirka 60°C.



### 3.5 Agarose gelelektroforese

En gelelektroforese separerer molekyler basert på deres størrelse og elektriske ladning. Gelen består av en polymer, som brukes for å separere DNA-molekyler. Agarose er en lineær polymer som benyttes i gelelektroforese, og som består av annenhver D- og L-galaktoser bundet til hverandre via  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) og  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindinger. Agarosegelen plasseres i et elektroforesekar som har en negativ elektrode (katode) og en positiv elektrode (anode). Ved nøytral pH har DNA en negativt ladet fosfatgruppe, som gjør at DNAet vandrer mot den positive polen i gelens elektriske felt. Det er porer i agarosegelen som gjør at korte DNA-fragmenter vandrer raskere gjennom gelen enn lange DNA-fragmenter, slik at DNAet blir separert basert på størrelse (Sambrook & Russell, 2001a). I dette arbeidet er agarose gelelektroforese brukt for å analysere og rense PCR-produkter og plasmider.

#### 3.5.1 Protokoll for agarose gelelektroforese

1. For å lage 1 % agarose gel ble 0,5 g agarose pulver tilsatt til 50 ml 1x TAE-buffer. Løsningen ble varmet på full styrke i mikrobølgeovn til agarosepulveret var helt løst.
2. Løsningen ble avkjølt til  $\sim 60^{\circ}\text{C}$  og deretter tilsatt 1  $\mu\text{l}$  peqGREEN (peqlab, VWR).
3. Løsningen ble helt i støpekar (Bio-Rad), og det ble satt i brønner (Bio-Rad).
4. Når gelen var stivnet ble den satt i et elektroforesekar (Bio-Rad). Brønnene ble fjernet og det ble tilsatt 1x TAE-buffer til gelen var dekket med væske.
5. Det ble tilsatt 6  $\mu\text{l}$  1 kb DNA størrelsesladder (New England BioLabs) i den første brønnen, og prøver tilsatt loadingbuffer (6x) til de andre brønnene.
6. Elektroforesen ble utført på 90 V til DNAet var tilstrekkelig separert ( $\sim 30$  minutter).
7. Siden peqGREEN fluorescerer i UV-lys når det er bundet til dobbeltrådet DNA, ble DNA i gelen visualisert ved å eksponere den for UV-lys i en Gel Doc-1000 (Bio-Rad).

#### 3.5.2 Rensing av PCR-produkter fra agarosegel

Etter separasjon ved agarose gelelektroforese ble PCR-produktene som skulle renses, kuttet ut av gelen og ekstrahert ved bruk av Nucleospin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel), som beskrevet av produsenten. Gelbitene med DNA-fragment ble først løst i 200  $\mu\text{l}$  NT1 bindingsbuffer per 100 mg gel ved  $50^{\circ}\text{C}$ . Den oppløste gelen med DNA ble overført til en Nucleospin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up kolonne (Macherey-Nagel) plassert oppi et 2 ml oppsamlingsrør. Røret ble sentrifugert i 30 sekunder ved 11 000 x g og filtratet ble kastet. Det ble så tilsatt 700  $\mu\text{l}$  NT3 vaskebuffer og røret ble sentrifugert i 30 sekunder ved 11 000 x g. Vaskesteget ble gjentatt. For å fjerne eventuelle rester av vaskebufferen ble røret spunnet i 1

## Metoder

minutt ved 11 000 x g. Kolonnen ble deretter plassert i et nytt eppendorfrør og DNAet ble eluert ved å tilsette 30 µl NE elueringsbuffer, etterfulgt av 1 minutt inkubering ved romtemperatur, og ved til slutt å sentrifugere i 1 minutt ved 11 000 x g. For å verifisere at rensing av DNA-fragmentet var vellykket, ble det analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese.

### 3.5.3 Måling av DNA-konsentrasjon ved bruk av Nanodrop 2000

Ved å tilsette 2 µl fra en prøve med isolert DNA til spektrofotometeret NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) finner man prøvens DNA-konsentrasjon og renhet. Mengden lys som absorberes viser hvor mye DNA prøven inneholder. Før måling av DNA-konsentrasjon må spektrofotometeret initieres og deretter nullstilles med 2 µl elueringsbuffer, som ble brukt for eluering av DNA. For å finne prøvens renhet, måles forholdet mellom absorbansen ved 260 nanometer og 280 nanometer (260/280), og ved en verdi på 1,8, er DNAet helt rent. Hvis 260/280 er høy, kan dette tyde på at det er RNA i prøven, mens en lav 260/280-verdi viser at prøven inneholder proteiner (Thermo Fisher Scientific, 2009).

## 3.6 Overuttrykk av CbpD i transformerte *E. coli* BL21

### 3.6.1 Preparering av kjemisk kompetente *E. coli* DH5α og *E. coli* BL21

*E. coli* DH5α og *E. coli* BL21 ble dyrket i 40 ml Lb-medium til en  $OD_{600} = \sim 0,4$ . Cellene ble høstet ved 4000 x g i fem minutter ved 4°C. Cellene ble deretter resuspendert i 20 ml (ett halvt kulturvolum) 0,1 M iskald CaCl<sub>2</sub> og inkubert på is i 2 timer, så høstet ved 4000 x g ved 4°C, og resuspendert i 4 ml (ett tiendedels kulturvolum) iskald 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Til slutt ble cellene tilsatt iskald glyserol til en sluttkonsentrasjon på 15 % (v/v), og lagret ved - 80°C.

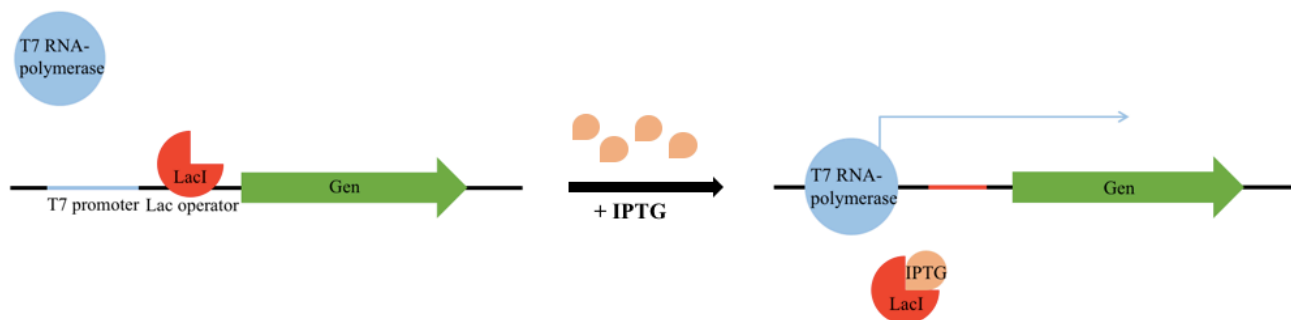
### 3.6.2 Rensing av plasmider fra *E. coli* DH5α

Plasmid ble rensert fra 4 ml overnattekultur av relevante *E. coli*-stammer ved hjelp av plasmidrensekitet E.Z.N.A plasmid DNA mini kit 1 (Omega bio-tek) som beskrevet av produsenten. Kulturen ble sentrifugert ved 5000 x g i 1 minutt ved romtemperatur. Til pelleten ble det tilsatt 250 µl av løsning I blandet med RNase A. For å lysere cellene, ble celsuspensjon tilsatt 250 µl av løsning II. Røret ble invertert 5-6 ganger til løsningen var klar i fargen. Det ble tilsatt 350 µl av løsning III og røret ble vendt opp og ned 4-5 ganger før sentrifugering ved 11 000 x g i 10 minutter. Supernatanten ble overført til HiBind® DNA minikolonne (Omega bio-tek) plassert i et 2 ml oppsamlingsrør, og sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt. Kolonnen ble deretter vasket med 500 µl HBC-vaskebuffer fortynnet med isopropanol og 700 µl DNA

vaskebuffer fortdynnet med etanol. Kolonnen ble tørket ved å sentrifugere den i 2 minutter ved 11 000 x g. Minikolonne ble flyttet til et nytt 1,5 ml rør og DNAet bundet til silicakolonne ble eluert ved tilsetning av 50 µl elueringsbuffer, inkubert ved romtemperatur i 1 minutt og sentrifugert i 1 minutt ved 11 000 x g. Det eluerte plasmid DNAet ble lagret ved - 20°C.

### 3.6.2.1 Plasmidet pRSET A

pRSET A (Invitrogen™) er et plasmid som er designet for å overuttrykke gener i *E. coli*. Ekspresjonssystemet er basert på to komponenter fra bakteriofagen T7, en T7 RNA-polymerase og en T7 promoter. T7 RNA-polymerasen uttrykkes fra et bakteriofag T7 gen, som er satt inn i kromosomet til *E. coli*. T7 promoteren befinner seg på pRSET A og inneholder et lac-operatorsete som *E. coli* sin endogene LacI-repressor kan binde til. Genet man ønsker å overuttrykke, klones inn rett nedstrøms T7 lac-promoter. T7 RNA-polymerasen hindres vanligvis av repressoren LacI som binder lac-operatorsetet. For å starte transkripsjonen tilsettes Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG). IPTG er en laktoseanalog, som ikke blir metabolsk nedbrutt av cella, og som binder til LacI-repressoren. Ved binding av IPTG skjer det en konformasjonsendring i LacI som gjør at LacI slipper lac-operatoren. Dermed får T7 RNA-polymerasen fri tilgang til transkripsjon av genet som er klonet inn i pRSET A (Figur 3.2) (Sambrook & Russell, 2001b).



**Figur 3.2 Prinsippet bak bakteriofag T7 ekspresjonssystem.** En LacI-repressor blokkerer for transkripsjon av gen som er klonet inn i ekspresjonsvektor pRSET A. Ved tilsetning av IPTG, som binder til LacI, gjennomgår LacI en konformasjonsendring og slipper DNA. Dermed kan T7 RNA-polymerasen transkriperer gen.

### 3.6.3 Kloning av *cbpD<sup>B6</sup>* og *cbpD<sup>Uo5</sup>* inn i pRSET A

For å overuttrykke CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> i *E. coli* ble *cbpD*-genene i genomet til disse streptokokkene klonet inn i pRSET A. Først ble *cbpD*, som er cirka 1100 basepar langt, amplifisert fra genomet til *S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5 ved bruk av PCR (seksjon 3.4.1). PCR-produktene ble separert på agarose gel (seksjon 3.5.1), kuttet ut av gelen og ekstrahert ved bruk av Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) (seksjon 3.5.2).

Amplikonene med *cbpD*-genene, samt pRSET A ble kuttet med XbaI og HindIII. Til hver restriksjonskutttemix ble det tilsatt 1 µL XbaI, 1 µL Hind III, 3 µL 10 x buffer (NEBuffer 2.1) og 23 µL DNA. Reaksjonen ble inkubert på 37°C vannbad i to timer. Etter en times inkubasjon ble det tilsatt CIAP (alkalisk fosfatase isolert fra kalv) i reaksjonen med pRSET A. CIAP kutter av 5' fosfat-grupper på det kuttete plasmidet. Dette reduserer sjansen for at plasmidet religerer uten insert i ligeringsreaksjonen. Likevel er det lite sannsynlig at dette skjer siden det er brukt to forskjellige restriksjonsenzymmer. Restriksjonskuttet pRSET A, *cbpD<sup>B6</sup>* og *cbpD<sup>Uo5</sup>* ble separert på agarose gelelektroforese (seksjon 3.5.1) og rensset fra gel ved bruk av Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) (seksjon 3.5.2).

*CbpD<sup>B6</sup>/cbpD<sup>Uo5</sup>* ble ligert inn i pRSET A ved bruk av Quick ligase (New England BioLabs). I noen tilfeller hvor det ikke fungerte, ble det brukt T4 ligase (New England BioLabs). I begge tilfellene tilsettes det cirka tre ganger så mye insert (*cbpD*) som plasmid.

20 µl ligeringsmix ved bruk av Quick ligase:	20 µl ligeringsmix ved bruk av T4 ligase:
25-50 ng Plasmid	25-50 ng Plasmid
100 ng Insert	100 ng Insert
10 µl 2 x Quick DNA ligase buffer	2 µl 10 x T4 DNA ligase buffer (400 000 U/ml)
1 µl Quick ligase	1 µl T4 ligase
x µl dH <sub>2</sub> O	x µl dH <sub>2</sub> O

Ligering med Quick DNA ligase ble inkubert ved romtemperatur i fem minutter, mens ligering med T4 DNA ligase ble inkubert ved romtemperatur i to timer.

Plasmidene med inserts (pRSET A-*cbpD<sup>B6</sup>* og pRSET A-*cbpD<sup>Uo5</sup>*) ble transformert inn i *E. coli* DH5α, som beskrevet i seksjon 3.2.. *E. coli* DH5α er en kloningsvert og replikerer dermed

mange plasmider (når plasmidet har replikasjonsorigo kompatibelt med replikasjonssystemet i *E. coli*) (Invitrogen™). pRSET A-cbpD<sup>B6</sup> og pRSET A-cbpD<sup>U05</sup> ble rensset fra transformantene ved bruk av E.Z.N.A plasmid DNA mini kit 1 (Omega bio-tek) (se seksjon 3.6.2).

### 3.6.4 Overekspresjon av CbpD i *E. coli* BL21

*E. coli* BL21 ble transformert med rensede pRSET A-cbpD<sup>B6</sup> og pRSET A-cbpD<sup>U05</sup> som beskrevet i seksjon 3.2. Transformantene ble dyrket i 1 liter Lb-medium med 100 µg/ml ampicillin ved 37°C i risteinkubator (200 rpm). Ved OD<sub>600</sub> = ~ 0,3 - 0,4 ble cellekulturen induisert med IPTG til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mM IPTG (se seksjon 3.6.2.1) og inkubert i fire timer ved 20°C og risting (150 rpm). Cellene ble høstet ved 7000 x g i 10 minutter. Cellene ble deretter mekanisk lysert med syrevaskede glasskuler (Sigma-Aldrich) på ≤ 106 µm i en FastPrep®-24 (MP Biomedicals) celleknuser ved en hastighet på 6,5 m/sek. Cellene ble knust i 3 pulser av 20 sekunder. Ved et veldig stort cellevolum ble cellene knust ved bruk av French Press (Carver) med et trykk på 15 000 psi. Cellerester og proteinaggregater ble fjernet ved å sentrifugere lysatet i 30 minutter ved 20 000 x g.

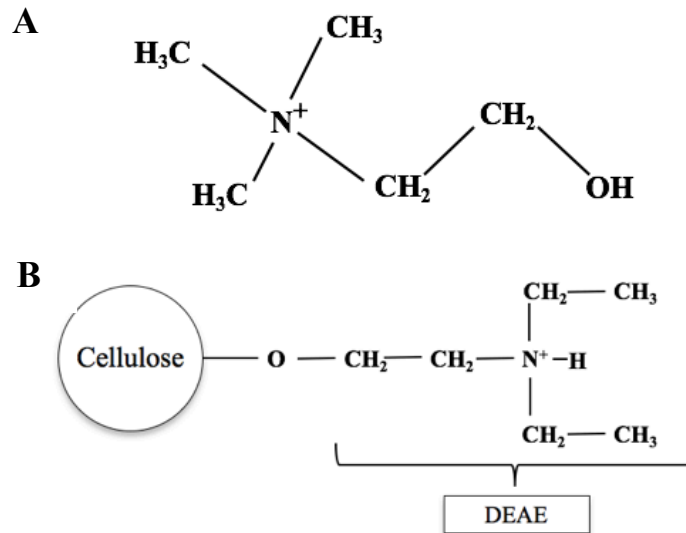
## 3.7 Rensing av CbpD ved bruk av diethylaminoethyl-cellulose affinitetskromatografi

Affinitetskromatografi er en rensemetode som utnytter et proteins eller en komponents affinitet for en spesifikk ligand. Et protein med affinitet for komponent X kan bli rensset fra et komplekst proteinekstrakt ved å la ekstraktet gå gjennom en kolonne pakket med X. Målproteinet binder til X, mens resten av proteinene vaskes ut av kolonnen. Til slutt kan målproteinet elueres. Affinitetskromatografi gir vanligvis høyt utbytte av rent protein (Moks et al., 1987; Sanchez-Puelles, Sanz, Garcia, & Garcia, 1992).

For å rense CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup>, overuttrykt i *E. coli* BL21, ble diethylaminoethyl (DEAE) cellulose affinitetskromatografi benyttet, som beskrevet av Sanchez-Puelles *et al.* (Sanchez-Puelles et al., 1992). DEAE er en kolinanalog (Figur 3.3), og det kolinbindende domenet på CbpD binder til DEAE med høy affinitet (Sanz, Lopez, & Garcia, 1988). *E. coli* har ingen kolinbindende proteiner. Likevel binder negativt ladede proteiner til DEAE, som er positivt ladet. Disse proteinene vaskes bort med en buffer som har høy konsentrasjon av NaCl, hvor Cl<sup>-</sup> utkonkurrerer de negativt ladede proteinene. For å eluere CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> tilsettes en buffer

## Metoder

som inneholder overskudd av kolin fordi kolin binder CbpD med høyere affinitet enn DEAE (Sanchez-Puelles et al., 1992; Sanz et al., 1988).



**Figur 3.3 Kolin og DEAE.** A) Kolin og B) DEAE er strukturelt like. De er begge positivt ladete og binder reversibelt til de kolinbindende motivene i CbpD. I realiteten er det bundet mange DEAE-molekyler til ett cellulosemolekyl.

### 3.7.1 Protokoll for DEAE-cellulose affinitetskromatografi

1. Det ble tilsatt ~ 1,5 ml DEAE-cellulosepulver blandet med ~ 7,5 ml Tris-bufret salin (TBS)-buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl) til Econa-Pac-kolonne (Bio-Rad).
2. DEAE-cellulosen fikk ~ 20 minutter på å sedimentere i kolonnen, før et 3 MM Whatman<sup>®</sup>-filter (VWR<sup>®</sup>) ble plassert på toppen av det pakkede DEAE-cellulosematerialet.
3. Overskudd av TBS over filteret ble fjernet ved å åpne kolonnen i bunnen.
4. Proteinekstraktet med CbpD fra *E. coli* BL21 ble presset gjennom kolonnen med en hastighet på 1-2 ml/minutt.
5. Kolonnen ble vasket fire ganger med 10 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl. I dette trinnet vaskes negativt ladete proteiner bort.
6. CbpD ble eluert ved tilsetning av fersk elueringsbuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl; 0,14 M kolin. Det ble eluert i 5-10 rør av 2 ml fraksjoner.
7. For å sjekke fraksjonenes innhold av CbpD, ble de analysert ved hjelp av SDS-PAGE (se seksjon 3.9).

### 3.7.2 Dialyse av CbpD<sup>B6</sup>

Renset CbpD<sup>B6</sup> ble dialysert for å fjerne kolin og salter. CbpD<sup>B6</sup> ble overført til en dialyseslange av typen Spectra/Por (Spectrum<sup>®</sup>) på 12 000-14 000 MW «cut-off», som på forhånd var rehydrert. Spectra/Por-membranposen med CbpD ble plassert i 1 liter med 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 på en magnetrører i 1-2 timer.

### 3.8 Videre rensing av CbpD<sup>B6</sup> ved bruk av gelfiltrering

Gelfiltrering er en metode som brukes for å separere molekyler, som for eksempel proteiner, basert på deres størrelse. Kolonnen er pakket med gelpartikler formet som kuler med tilpasset porestørrelse, avhengig av størrelsen på molekylene som skal separeres. Små partikler vil bevege seg inn og ut av porene til gelpartiklene og blir dermed forsinket, mens større partikler går utenfor gelpartiklene uten å bli forsinket. Store partikler blir dermed eluert raskere enn de små molekylene (Amersham Pharmacia Biotech).

I dette arbeidet ble gelfiltrering brukt for å separere CbpD<sup>B6</sup> fra et mindre protein som også ble eluert under DEAE affinitetskromatografi. I tillegg til gelfiltrering ble det også forsøkt å skille de to proteinene fra hverandre ved bruk av ionebyttekromatografi (IEC) og hydrofob interaksjonskromatografi (HIC). IEC separerer molekyler basert på deres elektrostatiske binding til det ladde materialet i kolonnen (Amersham Pharmacia Biotech), og HIC separerer molekyler basert på deres hydrofobisitet (GE Healthcare Life Sciences, 2012).

#### 3.8.1 Protokoll for gelfiltrering

1. Siden en gelfiltreringskolonne har begrenset prøvevolumskapasitet, ble proteinløsningen først oppkonsentrert i et sentrifugefilter (Merck Millipore) på 10 000 MW «cut-off». Sentrifugefilteret med proteinløsning ble sentrifugert ved 4000 x g til volumet var redusert til 0,75 - 1,5 ml.
2. Den oppkonsentrerte proteinløsningen ble overført til en Superdex<sup>™</sup> 75 10/300 GL kolonne (GE Healthcare Life Sciences). Kolonnen var på forhånd vasket med dH<sub>2</sub>O og ekvilibrert med 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl.
3. Kolonnen ble koblet til Äktaprime plus (GE Healthcare Life Sciences). Proteinene ble kjørt gjennom kolonnen med en hastighet på 0,3 ml/min, og eluert med en fraksjonsstørrelse på 0,5 ml i hvert rør.

4. Fraksjonene som så ut til å inneholde CbpD<sup>B6</sup> ble verifisert ved bruk av SDS-PAGE (se seksjon 3.9).

### 3.9 SDS-PAGE

Sodium dodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) er en metode som separerer proteiner basert på størrelse, og kan dermed være til hjelp ved identifisering av proteiner. I dette arbeidet ble SDS-PAGE brukt til å verifisere og analysere renheten til CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup>. Ved preparering av prøver som skal analyseres på polyakrylamidgelen, tilsettes SDS sample buffer. Denne inneholder blant annet SDS, en detergent som binder til og denaturerer proteiners tredimensjonale struktur. SDS legger seg som en kappe rundt proteinet og gir proteinet negativ ladning. Dette fører til at proteinet vandrer mot den positive polen i elektroforesen. SDS vil derimot kunne danne sfæriske miceller (interaksjoner av flere SDS-molekyler) og dermed ikke danne interaksjoner med proteinet. For å unngå dette blir prøvene varmebehandlet ved koking. Både tilsetning av SDS og  $\beta$ -2-merkaptøetanol (reduktant), i tillegg til koking, denaturerer proteinene slik at de blir lineære. Proteinene separeres derfor ut fra størrelse i elektroforesen. For å bestemme størrelsen til proteinet i prøven benyttes en molekylvektsstandard som inneholder en rekke proteiner med kjente størrelser (Weber & Osborn, 1969).

#### 3.9.1 Protokoll for støping og farging av SDS-PAGE

1. To glassplater (Bio-Rad) ble montert i støperammer (Bio-Rad) og plassert i et støpestativ (Bio-Rad). Det ble kontrollert for lekkasje ved tilsetning av dH<sub>2</sub>O.
2. Reagenser til separasjonsgeler på 12 % ble godt blandet i et begerglass (for oppskrift, se seksjon 2.8.3). 10 % APS og TEMED ble tilsatt til slutt. 3,2 ml av separasjonsgel-løsningen ble applisert til rommet mellom de to glassplatene. For å få en rett og fin separasjonsgel, ble det applisert dH<sub>2</sub>O på toppen, som etter polymerisering av separasjonsgelen ble helt av.
3. Når separasjonsgelen var polymerisert ble det laget 4 % stackinggeler (for oppskrift, se seksjon 2.8.3). Reagensene ble blandet godt i et begerglass. 10 % APS og TEMED ble tilsatt til slutt. ~ 1 ml av stackinggel-løsningen ble applisert på toppen av den polymeriserte separasjonsgelen, før en brønnkam ble satt forsiktig ned.
4. Glassplatene med polymerisert gel ble overført til et gelkar, hvor brønnkammene ble fjernet og det ble fylt opp med elektroforesebuffer i det indre kammeret. Hvis ingen



lekkasje, ble det også fylt på med elektroforesebuffer i det ytre kammeret opp til nedre del av gelen.

5. Størrelsesladder, Color Prestained Protein Ladder (BioLabs), og ferdigpreparerte prøver (seksjon 3.9.2) ble applisert i brønnene.
6. Prøvene ble separert på 200 V i ~ 40 - 45 minutter til bromfenolblå-fargen i prøvebufferen hadde nådd bunnen av gelen.
7. SDS-polyakrylamidgelene ble farget med enten Coomassie Blue eller InstantBlue™ (expedion).
  - *Farging med Coomassie Blue*: Gelen ble dekket med Coomassie Blue og gitt et lite oppkok i en mikrobølgeovn. Gelen ble deretter stående på vippe i ~ 20 minutter. Coomassiefargen ble helt av, gelen ble skylt med dH<sub>2</sub>O og det ble tilsatt avfargingsløsning. Avfargingsløsningen ble helt av når gelen var tilstrekkelig avfarget, og gelen ble vasket med dH<sub>2</sub>O.
  - *Farging med InstantBlue™ (expedion)*: Gelen ble tildekket av InstantBlue og inkubert på vippe til proteinbåndene var tydelige. Gelen ble deretter skylt med dH<sub>2</sub>O.

### 3.9.2 Protokoll for preparering av prøver til SDS-PAGE

1. Proteinprøvene ble blandet med 2 x SDS sample buffer i et forhold på 1:1.
2. Før applisering på gel ble prøvene kokt i 5-10 minutter ved 95°C. Både kokingen og tilsetning av SDS og β-2-merkapttoetanol gjør at proteiner denaturerer, blir lineære og får en netto negativ ladning, slik at separasjonen i gelen baserer seg på størrelsen til proteinene, og ikke deres native nettoladning og tredimensjonale struktur.

### 3.10 Zymografi

Zymografi er en metode basert på SDS-PAGE, hvor celler er støpt inn i gelen som substrat for enzymer. Zymografi kan brukes for å detektere aktiviteten til celleveggshydrolaser. Det tilsettes celleveggshydrolaser til brønnene i gelen, som separeres i gelen under denaturerende forhold. Ved inkubasjon av gelen i refoldingsbuffer (som inneholder 0,5 % Triton X-100) fjernes SDS, og celleveggshydrolasene renatureres. Celleveggshydrolasene blir dermed aktive, og kan degradere celleveggsmaterialet i gelen. Aktiviteten til celleveggshydrolasene bestemmes ut i fra klare soner i gelen (Leclerc & Asselin, 1989). I dette arbeidet ble zymografi utført for å detektere aktiviteten til CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> mot ulike stammer av streptokokker.

#### 3.10.1 Protokoll for zymografi

1. Et kulturvolum på 300 ml ble dyrket ved 37°C til OD<sub>550</sub> = ~ 0,2, og høstet ved sentrifugering ved 7000 x g i 5 minutter. Cellene ble resuspendert i 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. For å inaktivere cellene ble de varmet ved 95°C i 10 minutter.
2. Cellene ble støpt inn i en 10 % SDS-polyakrylamid separasjonsgel. Stackinggelen var 4 %.
3. 1,0 µg, 0,1 µg og 0,01 µg av både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> ble applisert til brønnene.
4. Elektroforesen ble utført på 200 V til blåfargen hadde migrert ut av gelen.
5. Gelene ble vasket i 2 x 30 minutter i dH<sub>2</sub>O ved romtemperatur på vippe, og det ble deretter tilsatt refoldingsbuffer. Refoldingsbufferen inneholder Triton X-100 som fjerner SDS fra polypeptidkjeden til CbpD, og proteinet refolder i gelen slik at det blir aktivt igjen og kan kutte cellevegg. Zymogrammet ble inkubert i refoldingsbufferen til de eventuelle lytiske sonene var klare.

### 3.11 Vekstforsøk ved tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

For å undersøke streptokokkers sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> ble streptokokker dyrket i mikrotiterplater (Corning) i mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®). CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>Uo5</sup> ble tilsatt streptokokkene i eksponentiell vekstfase. Ved induksjon av kompetanse ble CSP-1 tilsatt før CbpD. Ved måling av OD (bakterietetthet) får man en indikasjon på hvor sensitive streptokokkene er for CbpD.

#### 3.11.1 Protokoll for mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader

1. 280 µl av relevante streptokokker ble tilsatt til brønner i en 96-brønners mikrotiterplate (Corning).
2. Mikrotiterplaten ble inkubert i mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®) ved 37°C og risting, ved avlesning av OD<sub>550</sub> og fluorescens hvert 3-5 minutt.
3. Da streptokokkenes OD<sub>550</sub> var ~ 0,2 ble det tilsatt CbpD<sup>B6/Uo5</sup> (ulike konsentrasjoner) eller CSP-1 (75 ng) til brønnene med streptokokker.
4. Mikrotiterplaten ble videre inkubert i mikroplateleseren utover i streptokokkenes stasjonære vekstfase.

### 3.12 Ulike oppbevaringsmetoder for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

Etter rensing av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> (se seksjon 3.7 og 3.8) ble det testet ulike oppbevaringsmetoder for proteinene. Det er viktig at proteinene blir oppbevart riktig for at de skal holde seg aktive og for å kunne bruke dem i videre arbeid. Både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> ble oppbevart ved følgende betingelser:

- 4°C
- - 20°C
- - 20°C og 20 % glyserol
- - 20°C, 20 % glyserol og 1 mM DTT
- - 80°C
- - 80°C og 20 % glyserol
- - 80°C, 20 % glyserol og 1 mM DTT

Reduktanten dithiothreitol (DTT) ble inkludert i noen av CbpD-prøvene fordi det i tidligere arbeid med CbpD fra *S. pneumoniae* i gruppen til Prof. Håvarstein er vist at cystein-residuen i det aktive setet til CHAP-domenet lett oksideres, og CbpD blir inaktivert (upublisert data, Dr.

Daniel Straume). Etter oppbevaring ved de ulike betingelsene ble lytisk aktivitet av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> testet mot *S. pneumoniae* RH425 ved bruk av mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®). Dette ble utført som beskrevet i seksjon 3.11.1.

### 3.13 Isolering av peptidoglykan

Det var ønskelig å finne ut hvor i peptidoglykanet CbpD kutter. For å kunne utføre analysen var det nødvendig å isolere peptidoglykan fra *S. pneumoniae* som videre skulle brukes som substrat for CbpD. Protokollen som er brukt er en modifikasjon av en protokoll beskrevet av Vollmer (2007). Den består av gradvis å fjerne andre cellekomponenter, som cellemembran, proteiner og nukleinsyrer.

#### 3.13.1 Protokoll for isolering av cellevegg fra *S. pneumoniae*

1. *S. pneumoniae* RH425 ble dyrket i 1 L C-medium til  $OD_{550} = \sim 0,4$ .
2. Cellene ble sentrifugert ved  $10\ 000 \times g$  i 10 minutter, og resuspendert i 40 ml iskald 50 mM Tris-HCl, pH 7,0.
3. Løsningen med celler ble tilsatt dråpevis til 120 ml kokende 5 % SDS-løsning på magnetrører. Løsningen ble videre kokt i 15 minutter og deretter nedkjølt til romtemperatur.
4. Løsningen ble sentrifugert ved  $12\ 000 \times g$  i 10 minutter ved romtemperatur. Pelleten ble stegvis vasket fri for SDS ved sentrifugering og resuspending: først to ganger med 20 ml 1 M NaCl, og deretter fire ganger med 20 ml dH<sub>2</sub>O.
5. Etter siste vaskesteg ble pelleten resuspendert i 2 ml dH<sub>2</sub>O og overført til FastPrep®-rør med  $\sim 0,5$  g syrevaskede glasskuler (Sigma-Aldrich) på  $\leq 106 \mu\text{m}$ . Celleveggen ble mekanisk fragmentert i celleknuseren FastPrep®-24 (MP Biomedicals) ved 6,5 m/sek i 20 sekunder, som ble gjentatt seks ganger. Mellom hver gang ble FastPrep®-rørene satt på is i 5 minutter.
6. Væsken ble overført til et nytt rør, og volumet ble justert til 25 ml med dH<sub>2</sub>O. Eventuelle uknuste celler og gjenværende glasskuler ble fjernet ved sentrifugering på lav hastighet ( $2000 \times g$ ) i 5 minutter.
7. Cellevegg ble sedimentert ved sentrifugering ved  $25\ 000 \times g$  i 15 minutter ved romtemperatur.
8. Pelleten ble resuspendert i 4 ml 100 mM Tris-HCl pH 7,4, med 20 mM MgSO<sub>4</sub>. Det ble deretter tilsatt DNase I (Sigma-Aldrich®) til en konsentrasjon på 10  $\mu\text{g/ml}$  og RNase A

- (Sigma-Aldrich®) til en konsentrasjon på 50 µg/ml. Løsningen ble så inkubert ved 37°C i risteinkubator (150 rpm) i to timer.
9. Etter to timers inkubasjon ble det tilsatt CaCl<sub>2</sub> til en konsentrasjon på 10 mM og trypsin til en konsentrasjon på 100 µg/ml. Løsningen ble videre inkubert ved 37°C i risteinkubator (150 rpm) over natt.
  10. Etter inkubasjon over natt ble det tilsatt SDS fra en 8 % startløsning til en endelig konsentrasjon på 1 %. Prøven ble inkubert ved 80°C i 15 minutter og deretter ble volumet justert til 20 ml med dH<sub>2</sub>O. Prøven ble så sentrifugert 13 000 x g i 30 minutter ved romtemperatur, for å pelletere cellevegg.
  11. Pelleten ble resuspendert i 10 ml 8 M LiCl og inkubert ved 37°C i 15 minutter, og cellevegg ble på nytt pelletert.
  12. Pelleten ble resuspendert i 10 ml 100 mM EDTA, pH 7,0, og inkubert ved 37°C i 15 minutter. Cellevegg ble igjen pelletert.
  13. Pelleten ble vasket ved sentrifugering og resuspending tre ganger: først med 20 ml dH<sub>2</sub>O, deretter med 20 ml aceton og til slutt med 20 ml dH<sub>2</sub>O.
  14. Etter siste vask ble pelleten resuspendert i 1,5 ml dH<sub>2</sub>O og deretter overført til 1,5 ml eppendorfrør. Pelleten ble spunnet ned og avdampet ved bruk av vakuomtørker (Savant).
  15. Isolert cellevegg ble resuspendert i dH<sub>2</sub>O til en konsentrasjon på 50 mg/ml og deretter lagret på - 80°C.

### 3.14 High Performance Liquid Chromatography

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) er en type kromatografi som separerer, identifiserer og måler mengden av, eller størrelsen til ulike komponenter i en løsning. Metoden blir blant annet brukt for å måle konsentrasjonen av peptider, aminosyrer, vitaminer og ioner i ulike typer prøver (Mansoor, 2015). HPLC består av to faser, mobilfase og stasjonærfase. Mobilfasen består av buffere som transporterer prøven gjennom stasjonærfasen i en kolonne, gjennom en detektor og til slutt ut av systemet i en avfallsbeholder. Transporten skjer ved hjelp av trykket fra ei pumpe. Stasjonærfasen er i fast form og dens oppgave er å holde igjen de ulike komponentene i prøven når mobilfasen strømmer gjennom den. De forskjellige stoffene i prøven har ulik størrelse og polaritet, og beveger seg dermed med ulik hastighet grunnet forskjell i affinitet til stasjonærfasen. Tiden det tar til de ulike stoffene elueres kalles retensjonstiden. Retensjonstiden til de ulike prøvekomponentene gir en indikasjon på hvilke

## Metoder

komponenter som befinner seg i prøven (Greibrokk, Lundanes, & Rasmussen, 1994). For å analysere enkeltkomponenter av peptidoglykan, ble det i dette arbeidet benyttet reversfase HPLC.

### 3.14.1 Preparering av prøver til HPLC og HPLC-program

1. En mengde på 100 µg rensset cellevegg ble kuttet med CbpD<sup>B6</sup> og/eller LytA, enten over natt eller i 1 time ved 37°C.
2. Prøvene ble deretter varmet ved 95°C i 20 minutter, for å felle ut enzymet.
3. Prøvene ble sentrifugert i 10 minutter ved 20 000 x g, og supernatant ble overført til nye rør.
4. Prøvenes pH ble justert til ~ pH 2,5 ved tilsetning av 20 % fosforsyre.
5. Prøvene ble deretter overført til 0,3 ml HPLC-rør (VWR).
6. Det ble benyttet en Vydac 218TP C18 5u kolonne (Grace) (stasjonærfase) som ble ekvilibrert i 0,05 % trifluoredikksyre (TFA). Peptidene ble eluert fra kolonnen ved å tilsette økende mengde med acetonitril (ACN) (mobilfase) i en lineær gradient fra 0 - 15 % over en eller to timer.
7. Da det skulle isoleres stempeptider fra cellevegg kuttet med LytA, ble det benyttet en fraksjonssamler (Gilson) for å samle opp de ulike stempeptidene separat.

## 4. Resultater

CbpD er et nøkkelenzym for fratrisidmekanismen hos kompetente streptokokker. Dette enzymet skilles ut under kompetanse og lyserer ikke-kompetente streptokokker som befinner seg i nærheten. Det er vist at CbpD fra *S. pneumoniae* (CbpD<sup>Spn</sup>) har muralytisk aktivitet mot andre pneumokokker og nært beslektede streptokokker (*S. mitis* og *S. oralis*), og man antar at dette er en mekanisme bakteriene har for å få tilgang på homologt DNA som så kan tas opp og inkorporeres i deres eget genom (Johnsborg & Håvarstein, 2009b; Straume et al., 2015). For å få en bedre forståelse av denne mekanismen, ønsket vi å utføre biokjemiske analyser av aktiviteten til CbpD, samt løse dets proteinstruktur. Slike studier avhenger av at man har et helt rent protein og høy konsentrasjon av proteinet. I Prof. Håvarsteins gruppe er det tidligere gjort flere forsøk på å overuttrykke og rense CbpD<sup>Spn</sup>, men dette har vist seg å være svært utfordrende. Overuttrykk av CbpD<sup>Spn</sup> i både *E. coli* og den Gram-positive bakterien *Lactococcus lactis* resulterte i uløselig og degradert protein (upublisert data, Dr. Daniel Straume). For å løse dette problemet, ønsket vi å teste om det var enklere å rense CbpD-homologer fra andre streptokokkarter. Det er vist i flere andre studier at proteinhomologer med små forskjeller i aminosyresekvens kan være mye enklere å overuttrykke i løselig form. Eksempler på dette er arbeidet med å løse strukturen til FtsX (regulator for celledeling hos bakterier) (Mavrici et al., 2014) og strukturen til Ste24p, en CAAX-protease i gjær med homologer i humane celler (Pryor et al., 2013).

Vi valgte å overuttrykke og rense CbpD fra *S. mitis* B6 og CbpD fra *S. oralis* Uo5, som begge er nært beslektet med *S. pneumoniae*. Aminosyresammenstillingen av CbpD fra *S. mitis* B6, *S. oralis* Uo5 og *S. pneumoniae* R6 viser at de har svært like CHAP- og CBD-domener (Figur 4.1), mens SH3b-domenene er mindre like. CbpD<sup>Spn</sup> har to SH3b-domener, mens CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> kun har ett. De første 24 aminosyrene av SH3b-domenet til CbpD<sup>B6</sup> har mest homologi med det første av SH3b-domenene til CbpD<sup>Spn</sup>, og SH3b-domenet til CbpD<sup>Uo5</sup> er homologt med det andre SH3b-domenet til CbpD<sup>Spn</sup>. I tillegg til forskjell i SH3b-domenene er det enkelte andre små ulikheter mellom de tre CbpDene (enkelte aminosyrer). Siden CHAP-domenet er veldig konservert hos de tre CbpDene, vil et resultat om hvor i celleveggen eventuelt CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>Uo5</sup> kutter, mest sannsynlig også gjelde for CbpD<sup>Spn</sup>.

## Resultater

```

R6      MKILPFIARGTSYYLKMSVKKLVFPLVVGMLAAGDSVYAYSRGNNGSIARGDDYPAYYKN
B6      MKVLPFKVTETGFSRLRKSVKKVVFPFLVVGMLAASDSVYAYSGGNNGSIARGDDYPAYYKN
Uo5     MKISPFTVTETGVSFRRKSVKKVVPFLAVGLMLVAGDSVYAYSGGNNGSFARGDDYPLHYKN
      **: ** . * . :: **:****:****.*****.*.***** ***:*****:***

R6      GSQEIDQWRMYSRQCTSFVAFRLSNVNGFEI PAAYGNANEWGHRARREGYRVDNTPTIGS
B6      GSQEIDQWRMYSRQCTSFVAFRLSNVNGFEI PRAYGNANEWGHRARREGYRVDNTPTIGS
Uo5     GSVEIDQWRMYSRQCTSFVAFRLSSVNGFEI PPGYGNANEWGYRARREGYRVDNSKPEVGS
      ** *****.*****.***** .*****:*****.* **

R6      ITWSTAGTYGHVAVVSNVMGDQIEIEEYNYGYTESYNKRVIKANTMTGFIHFKDLDSGSV
B6      IAWSTAGTYGHVAVVSNVMGDQIEIEEYNYGYTEAYNKRIKANTMTGFIHFKDLAGGSV
Uo5     IAWSTEDYYGHVAVVSNVMGDQIEIEEYNYGVRERYNRRIVKASSMTGFIHFKDLVGNDS
      *:*** . ***** * **:*:**.:***** ..

R6      GN---SQS[SASTGGTHYFKTKSAIKTEPLVSATVIDYYPGKEKVHYDQILEKDGKWLST]
B6      GN---SQT[SASTGGTHYFKSKAAIKNQPLASA]-----
Uo5     RTGSPIESGLAS-----
      .      ::. ::

R6      TAYNGSYRYVQL[EAVNKNPLGNSVLS]STGGTHYFKIKSAIKTEPLVSATVIDYYPGKEK
B6      -----TAIDYYPGKEK
Uo5     -----SGTHTFTQKSAIRNQPSSSTAQVIDYYPGENV
      .*****:*

R6      HYDQILEKDGKWLSTYAYNGSRRYIQ[IEGVTSSQNYQNQSGNISSYGSNNSSTVGVKKI]
B6      HYDQILEKDGKWLSTYAYNGSRRYIQ[IEGVTSSQNYQNQSGNISSYGSNNSSTVGVKKI]
Uo5     SYDQIVEKDGKWLSTYLSYSGSRRYVQ[YE]TETESVENGWRKQNGIWNYLENGKLATGVKKI
      ***:***** :*.*****:* . * :* :...* .* .*.. :.*****

R6      NGSWYHFKSNKSTGWLKDGSSWYYLKLKSGEMQTGWLKENGSWYYLGSSGAMKT-GWYQ
B6      NGSWYHFKSNKSTGWLKDGSSWYYLKLKSGEMQTGWLKENGSWYYLDSSGAMKT-GWYQ
Uo5     NGSWYHFKDNGTMSTGWVKDGSYWYYLKASGEMQTGWLNENGTWYYLESSGAMKSSQWFO
      *****.*: ***:****.***** ***** *****:***:**** *****: *:*

R6      VSGEWYYSYSSGALAINTTVDGYRVNSDGERV
B6      VSGKWYYSYSSGVLAVNTTVDGYRVNSDGERV
Uo5     VGGKYYYVNASGALAVNTTVDGYRVDSNGARI
      *.*:.* :*.**:******:*.* *

```

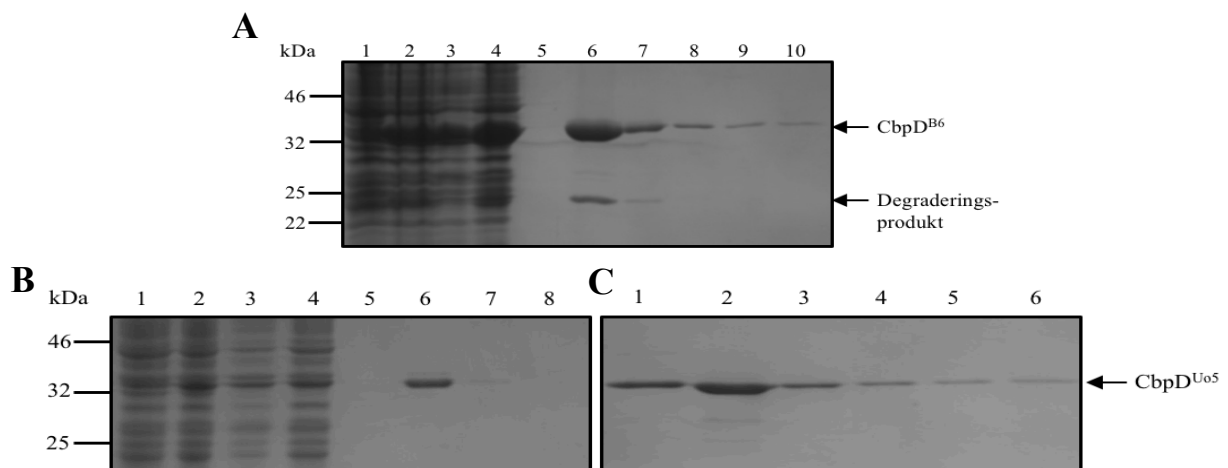
**Figur 4.1** Multipel aminosyresammenstilling av CbpD<sup>SpnR6</sup>, CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. Aminosyresekvensen av CbpD fra *S. pneumoniae* R6, *S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5 er sammenstilt ved hjelp av ClustalW (Larkin et al., 2007). Identiske aminosyreresiduer som er konservert i alle tre CbpDene er indikert med «\*». «>» indikerer aminosyreresiduer med svært like egenskaper og «<» indikerer aminosyreresiduer som har til dels like egenskaper. Sekvens til signalpeptid er indikert i cyan. CHAP- og CBD-domenene er indikert i rosa og grått, respektivt. SH3b-domenene i CbpD<sup>Spn</sup> er indikerte med grønn og gul farge.

### 4.1 Overuttrykk og rensing av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

For å overuttrykke CbpD ble *cbpD*-genet (uten signalpeptidkodende sekvens) fra *S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5 klonet inn i en IPTG-induserbar vektor kalt pRSET A, som videre ble transformert inn i *E. coli* BL21 celler. Tidligere forsøk har vist at CbpD<sup>Spn</sup> danner uløselige aggregater når det overuttrykkes i *E. coli* (upublisert data, Dr. Daniel Straume). For å øke sannsynligheten for at de rekombinante proteinene uttrykkes i løselig form, ble CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> uttrykt ved å bruke en tiendedels konsentrasjon av IPTG-induser (0,1 mM) og ved lavere dyrkningstemperatur (20°C) enn hva som gir høyest proteinkonsentrasjon med pRSET-systemet (Invitrogen™). Etter fire timer induksjon ble total proteinfraksjon, i tillegg til uløselig



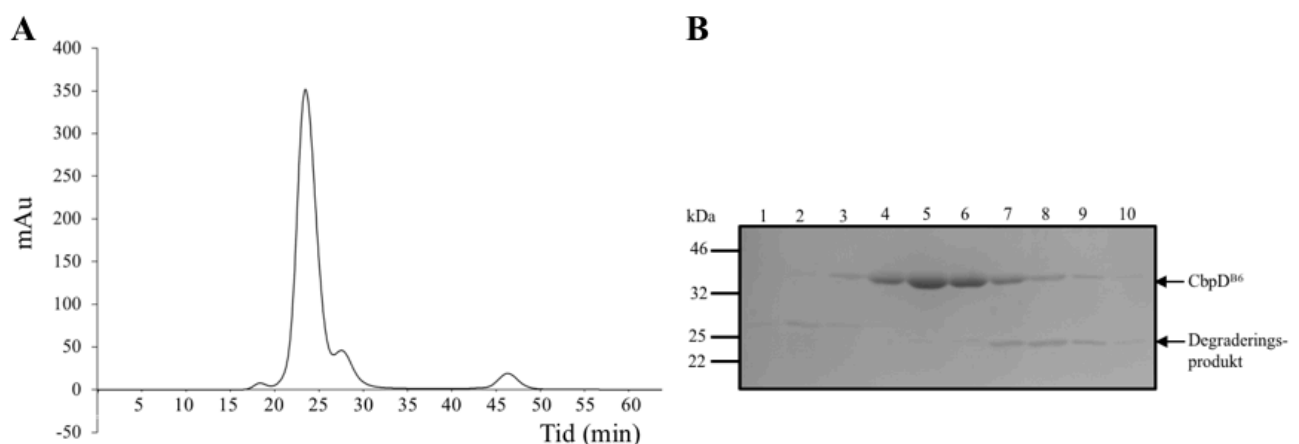
og løselig proteinfraksjon fra uinduserte og induserte celler, analysert ved hjelp av SDS-PAGE for å undersøke om CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> var blitt overuttrykt (Figur 4.2). Proteingelene viser at begge CbpD-proteinene var blitt overuttrykt i *E. coli* BL21. I tillegg viser resultatet at det finnes mye CbpD<sup>B6</sup> også i den løselige proteinfraksjonen. CbpD-proteinene ble rensert fra den løselige proteinfraksjonen ved bruk av DEAE-cellulose affinitetskromatografi (se seksjon 3.7). CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> ble eluert i 5-10 rør av 2 ml fraksjoner, og hver fraksjon ble undersøkt for innhold av CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>U05</sup> ved hjelp av SDS-PAGE. Det var mye CbpD<sup>B6</sup> i fraksjon 2 og 3, men også noe i fraksjon 4 - 6 (Figur 4.2A). Figur 4.1B og C viser CbpD<sup>U05</sup> rensert ved to anledninger. Etter førstegangs rensing var det mye CbpD<sup>U05</sup> i fraksjon 2 (Figur 4.2B), og etter andregangs rensing var det mye CbpD<sup>U05</sup> i fraksjon 1 - 3 (Figur 4.2C). Fra en liter *E. coli* cellekultur ble proteinutbyttet for CbpD<sup>B6</sup> etter DEAE-cellulose affinitetskromatografi cirka 5 mg og for CbpD<sup>U05</sup> cirka 4 mg. Fraksjonene med CbpD<sup>B6</sup> og fraksjonene med CbpD<sup>U05</sup> ble slått sammen hver for seg og dialysert for å fjerne salter og kolin. Tilstedeværelse av kolin i prøvene kan nemlig påvirke hvor effektivt CbpD binder sensitive målceller og dermed effektiviteten av lysering (Eldholm et al., 2009; Eldholm et al., 2010). For mye fritt kolin vil titrere CbpD av celleoverflaten til målceller. Å fjerne kolin fungerte ikke for CbpD<sup>U05</sup>, fordi proteinet felte ut etter dialyse. Videre analyser av dette proteinet måtte derfor gjøres med kolin tilstede, og dette må man ha i bakhodet når resultatene fra CbpD<sup>U05</sup> evalueres. Siden det ikke lot seg gjøre å fjerne kolin og salter i CbpD<sup>U05</sup>, ble proteinet fortynnet 1:10 i C-medium før tilsetning til streptokokker i eksponentiell vekstfase i vekstforsøkene (seksjon 4.3, 4.4, 4.5 og 4.6).



**Figur 4.2 Overuttrykk og rensing av rekombinant CbpD ved bruk av DEAE-cellulose affinitetskromatografi. A)** Overuttrykk og rensing av CbpD<sup>B6</sup>: 1) total mengde proteiner fra *E. coli* BL21 før induksjon med IPTG, 2) total mengde proteiner fra *E. coli* BL21 etter induksjon med IPTG, 3 og 4) uløselig og løselig proteinfraksjon fra induserte celler, 5 - 10) Renset CbpD<sup>B6</sup> (~ 37 kDa) eluert fra DEAE-cellulose affinitetskromatografi, fraksjon 1 - 6. **B)** Overuttrykk og rensing av CbpD<sup>U05</sup>: 1) total mengde proteiner fra *E. coli* BL21 før induksjon med IPTG, 2) total mengde proteiner fra *E. coli* BL21 etter induksjon med IPTG, 3 og 4) uløselig og løselig proteinfraksjon fra induserte celler, 5 - 8) Renset CbpD<sup>U05</sup> (~ 38 kDa) eluert fra DEAE-cellulose affinitetskromatografi, fraksjon 1 - 4. **C)** Renset CbpD<sup>U05</sup> eluert fra DEAE-cellulose affinitetskromatografi (separat forsøk fra B).

## Resultater

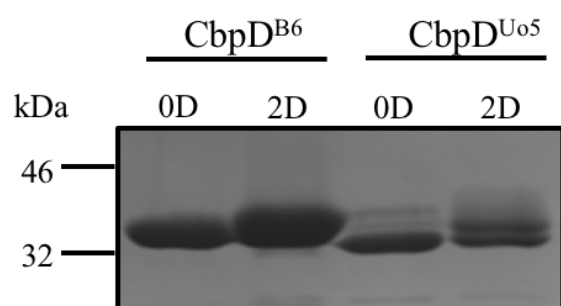
I elueringsfraksjon to og tre for CbpD<sup>B6</sup> (~ 37 kDa) var det også et annet protein på cirka 24 kDa (Figur 4.2A), som sannsynligvis er et degraderingsprodukt av CbpD<sup>B6</sup>. Dette proteinet kunne være ødeleggende for videre analyser, og derfor var det ønskelig å få rensset det bort. Degraderingsproduktet ble forsøkt rensset bort fra CbpD<sup>B6</sup> ved bruk av både ionebyttekromatografi (IEC) og hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) (Vedlegg B). Hverken IEC eller HIC egnert seg til å separere degraderingsproduktet fra fullengde CbpD<sup>B6</sup>. Siden det er 13 kDa forskjell i størrelse mellom disse proteinene, ble proteinene forsøkt rensset fra hverandre ved bruk av gelfiltrering (GF), en metode som separerer molekyler basert på størrelse (Amersham Pharmacia Biotech). GF-kromatogrammet (Figur 4.3A) viser en tydelig hovedtopp etter cirka 24 minutter, men også to mindre toppler ved ~ 27 og ~ 47 minutter. For å verifisere at toppen ved 27 minutter inneholdt degraderingsproduktet som var delvis separert fra CbpD<sup>B6</sup>, ble GF-fraksjonene fra tid 20 - 29 minutter analysert ved hjelp av SDS-PAGE (Figur 4.3B). Som forventet inneholdt fraksjonene fra tid 22 - 28 minutter fullengde CbpD<sup>B6</sup>, mens degraderingsproduktet ble eluert ved tid 26 - 29 minutter. Fraksjonene etter 23 - 25 minutter med rene CbpD<sup>B6</sup> ble sammenslått og lagret ved - 80°C for senere bruk. Gelfiltreringstrinnet gjør at vi mister cirka 50 % av fullengde CbpD<sup>B6</sup>. Det ble også sendt ~ 5 mg rensset CbpD<sup>B6</sup> til Prof. Juan Hermoso sin forskningsgruppe i Madrid, for å finne proteinets 3D-struktur ved krystallisering. I løpet av perioden arbeidet med denne oppgaven har pågått, er strukturen til CbpD<sup>B6</sup> fremdeles ikke løst, men arbeidet med å finne strukturen vil fortsette.



**Figur 4.3 Gelfiltrering av CbpD<sup>B6</sup>.** **A)** GF-kromatogram hvor den store toppen fra ~ 20 - 26 minutter er CbpD<sup>B6</sup> og hvor den lille toppen fra ~ 26 - 30 minutter sannsynligvis er degraderingsproduktet. **B)** Analyse av GF-fraksjoner (20 - 29 minutter) bestående av CbpD<sup>B6</sup> ved bruk av 12 % SDS-PAGE. Fraksjonene i brønn 4 - 6 (23 - 25 minutter) inneholder CbpD<sup>B6</sup> uten degraderingsprodukt.

## 4.2 Stabilitet og lagring av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup>

Det er viktig at CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> holder seg stabile under lagring for å lette videre arbeid med aktivitets- og strukturanalyser. Derfor ønsket vi å finne den lagringsmetoden som egnet seg best for disse proteinene. Renset CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> ble lagret ved 4°C i to døgn for å undersøke hvor stabile proteinene er i løsning over tid. For å sjekke stabiliteten til de to proteinene etter lagring, ble de analysert ved hjelp av SDS-PAGE (Figur 4.4). Både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> var stabile etter lagring ved 4°C i to døgn, men for CbpD<sup>U05</sup> dukket det opp et ekstra bånd med større størrelse.



**Figur 4.4 Stabiliteten til CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> etter lagring ved 4°C.** Begge CbpDene er sammenlignet rett etter DEAE-cellulose affinitetskromatografi (null døgn; 0D) og etter lagring ved 4°C i to døgn (2D) før fjerning av kolin og salt (dialyse). CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> er begge stabile etter to døgn i kjøleskap, men CbpD<sup>U05</sup> har fått et ekstra bånd med større masse.

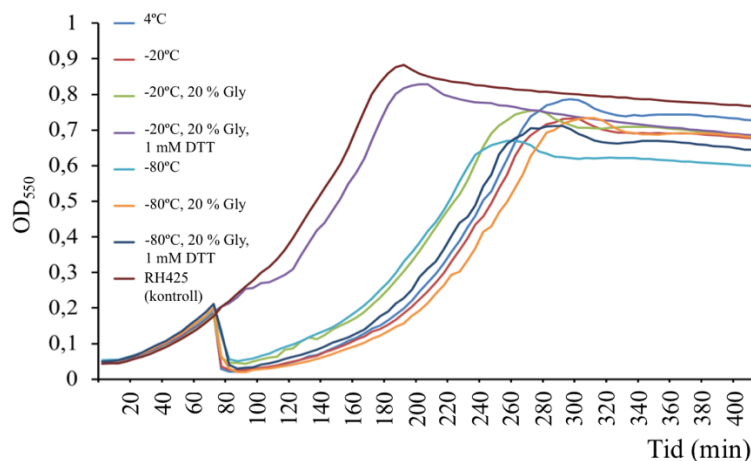
Siden CbpD<sup>B6</sup> både håndterte at kolin ble fjernet ved dialyse og at det oppførte seg mer stabilt ved 4°C over tid, valgte vi å fokusere mest på dette proteinet med tanke på langtidslagring for videre analyser og strukturbestemmelse (Prof. Juan Hermoso, Madrid). CbpD<sup>B6</sup> ble videre oppbevart ved følgende betingelser (for langtid oppbevaring):

- 4°C
- - 20°C
- - 20°C og 20 % glyserol
- - 20°C, 20 % glyserol og 1 mM DTT
- - 80°C
- - 80°C og 20 % glyserol
- - 80°C, 20 % glyserol og 1 mM DTT

Fra tidligere arbeid med CbpD<sup>Spn</sup> i gruppen til Prof. Håvarstein vet man at cystein-residuen i det aktive setet til CHAP-domenet lett oksideres, og CbpD blir inaktivert. DTT ble derfor inkludert for å se om dette ville bevare aktiviteten til CbpD<sup>B6</sup> bedre. Man vet også at protein kan felle ut etter frysing, og derfor ble også glyserol inkludert (upublisert data, Dr. Daniel

## Resultater

Straume). For å teste aktiviteten til CbpD<sup>B6</sup> oppbevart under ulike betingelser, ble enzymets evne til å lysere *S. pneumoniae* RH425 analysert ved å tilsette CbpD<sup>B6</sup> til eksponentielt voksende celler. Aktivt enzym ble observert som reduksjon av celletetthet ved hjelp av mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®) (Figur 4.5). CbpD<sup>B6</sup> var fortsatt aktiv etter lagring ved alle betingelsene, utenom ved -20°C og tilsetning av glyserol og DTT.

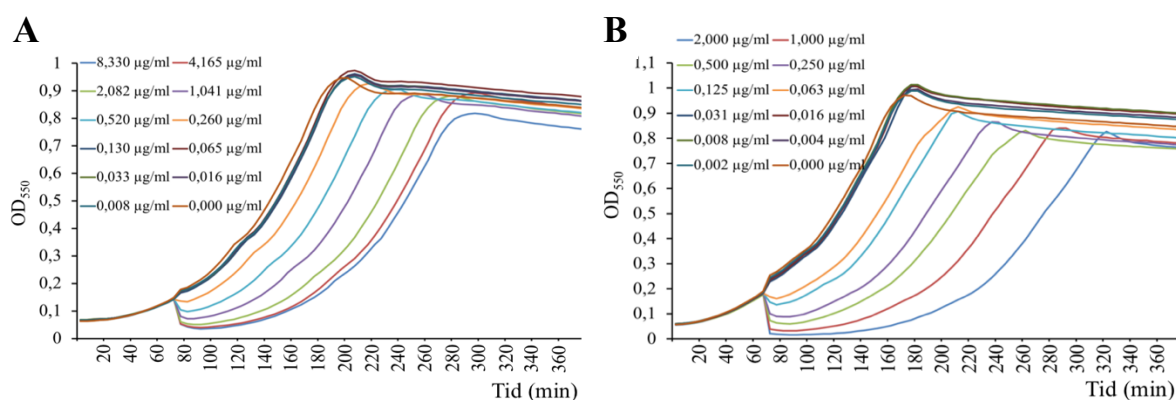


**Figur 4.5 CbpD<sup>B6</sup> oppbevart ved ulike betingelser.** CbpD<sup>B6</sup> sin lytiske aktivitet mot *S. pneumoniae* RH425, etter å ha blitt oppbevart ved ulike betingelser. 1 µg CbpD<sup>B6</sup> ble tilsatt ved OD<sub>550</sub> = ~ 0,2. Ved alle betingelsene, utenom ved -20°C med 20 % glyserol og 1 mM DTT, har CbpD<sup>B6</sup> bevart sin muralytiske aktivitet. Gly = Glyserol. **Merk:** Forsøket ble utført i paralleller og kurvene viser gjennomsnitt av disse, men siden standardavvik var vanskelig å se tydelig i kurvene var det ikke hensiktsmessig å ta dem med.

### 4.3 *S. pneumoniae* - immunitet mot CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

ComM er et protein som uttrykkes tidlig under kompetanse, og gir cellene immunitet mot sitt eget CbpD (Håvarstein et al., 2006). Tidligere er det vist at hos *S. pneumoniae* blir ekspresjon av ComM raskt nedregulert etter induksjon av kompetanse, og proteinet er knapt tilstede i cellene 20 minutter etter kompetanseinduksjon (se seksjon 1.4.2) (Straume et al., 2017). Siden vi nå hadde muligheten til å tilsette spesifikke mengder rent CbpD til kompetente celler, ønsket vi å undersøke hvor lenge *S. pneumoniae* er immune mot CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> etter kompetanseinduksjon. I tillegg til om ComM hos *S. pneumoniae* i det hele tatt danner immunitet mot CbpD fra andre streptokokkarter. Til dette formålet ble det brukt en stamme av *S. pneumoniae* hvor *cbpD* er knokket ut (*S. pneumoniae* RH17,  $\Delta cbpD$ ), slik at ikke dens eget CbpD skulle påvirke resultater i forsøket. Først undersøkte vi hvor høy konsentrasjon av både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> som skal til for å lysere *S. pneumoniae* RH17 (Figur 4.6) ved å lage tofoldsfortynninger av begge CbpDene. CbpD<sup>B6/Uo5</sup> av ulike konsentrasjoner ble tilsatt *S. pneumoniae* RH17 i eksponentiell vekstfase (OD<sub>550</sub> = ~ 0,2) ved 37°C i mikroplateleseren

Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®). Både lysering med CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> stoppet opp relativt tidlig i fortynningsrekke. Fra og med en konsentrasjon på 0,130 µg/ml og nedover hadde CbpD<sup>B6</sup> ingen lytisk effekt på cellene (Figur 4.6A), mens for CbpD<sup>Uo5</sup> forsvant den lytiske effekten ved en konsentrasjon på 0,031 µg/ml eller lavere (Figur 4.6B). Dette viser også at CbpD<sup>Uo5</sup> er mer effektiv enn CbpD<sup>B6</sup>. Ved videre lyseringsforsøk ble det tatt i bruk konsentrasjoner av CbpD som gir maksimal cellelysering (8,330 µg/ml for CbpD<sup>B6</sup> og 2,000 µg/ml for CbpD<sup>Uo5</sup>) og som gir ~ 30 % cellelysering (0,260 µg/ml for CbpD<sup>B6</sup> og 0,125 µg/ml for CbpD<sup>Uo5</sup>). Grunnen til at vi også valgte mengder CbpD<sup>B6/Uo5</sup> som lyserer cirka 30 % av cellene er fordi det tidligere er vist at *S. pneumoniae* under kompetanse produserer en mengde CbpD<sup>Spn</sup> som lyserer 20-30 % av cellene (Eldholm et al., 2009; Johnsborg et al., 2008).



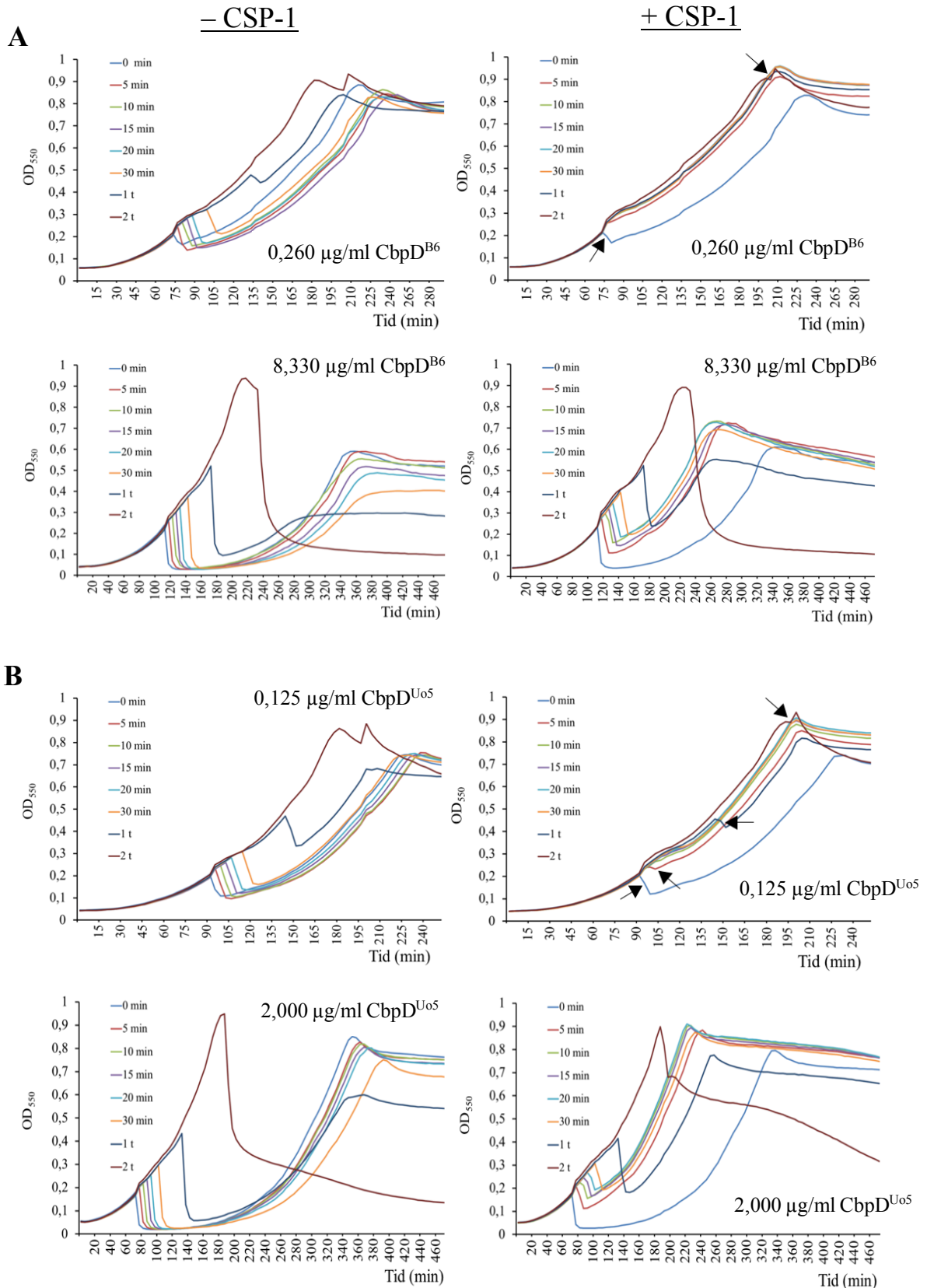
**Figur 4.6** Titreringskurver av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. Tofoldsfortynninger av **A**) CbpD<sup>B6</sup> og **B**) CbpD<sup>Uo5</sup> mot *S. pneumoniae* RH17 ( $\Delta cbpD$ ). CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> av ulike konsentrasjoner er tilsatt cellene ved OD<sub>550</sub> ~ 0,2 for å undersøke hvor mye CbpD som skulle til for å lysere dem. **Merk:** Forsøkene ble utført i triplikater og kurvene viser gjennomsnitt av disse, men siden standardavvik var vanskelig å se tydelig i kurvene var det ikke hensiktsmessig å ta dem med.

For å undersøke hvor lenge *S. pneumoniae* RH17 er immun mot CbpD<sup>B6/Uo5</sup> ble det tilsatt CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> ved ulike tidspunkter etter kompetanseinduksjon. Det ble tilsatt mengder CbpD<sup>B6/Uo5</sup> som gir både maksimal lysering og som gir ~ 30 % lysering av pneumokokkene, hvor konsentrasjonene ble bestemt ut i fra titreringskurvene (Figur 4.6). *S. pneumoniae* RH17 ble induert til kompetanse ved tilsetning av 250 ng/ml CSP-1 ved OD<sub>550</sub> ~ 0,2. CbpD<sup>B6/Uo5</sup> ble deretter tilsatt ved ulike tidspunkter (0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 og 120 minutter) etter kompetanseinduksjon. Ikke-kompetente celler ble brukt som kontroll på CbpD-sensitive celler (Figur 4.7). Ved tilsetning av mengden CbpD<sup>B6</sup> som gir ~ 30 % lysering (0,260 µg/ml) (Figur 4.7A) er de kompetente pneumokokkene immune fra og med fem minutter etter kompetanseinduksjon. Selv to timer etter kompetanseinduksjon er cellene nesten 100 % immune mot CbpD<sup>B6</sup>. Ved tilsetning av mengden CbpD<sup>B6</sup> som gir maksimal lysering (8,330 µg/ml) er de kompetente pneumokokkene immune fra og med fem minutter etter kompetanseinduksjon. Selv to timer etter kompetanseinduksjon er cellene nesten 100 % immune mot CbpD<sup>B6</sup>.

## Resultater

$\mu\text{g/ml}$ ) (Figur 4.7A) blir cellene aldri helt immune, men grad av lysering er likevel redusert sammenlignet med sensitive (ikke-kompetente) pneumokokker.

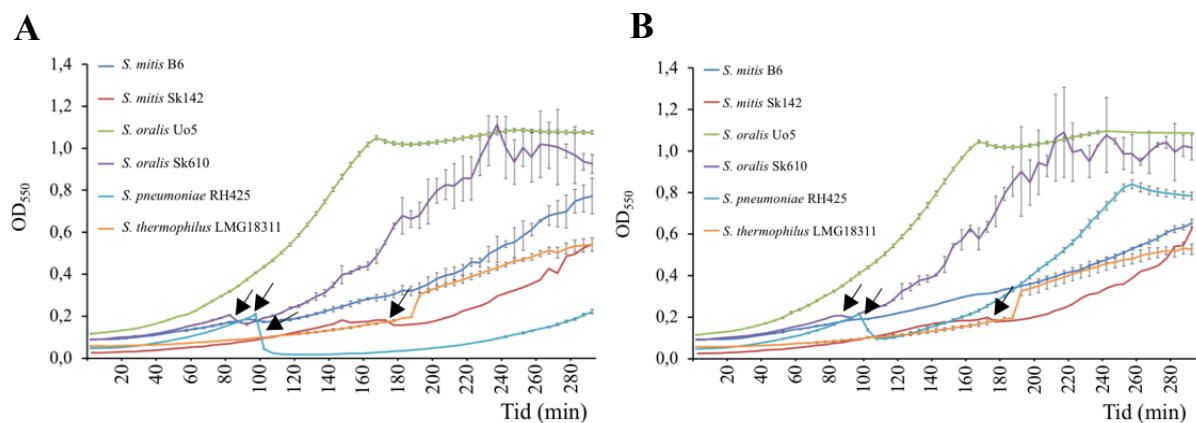
Kompetente celler ble også helt immune mot CbpD<sup>U05</sup> ved en enzymkonsentrasjon som gir  $\sim 30\%$  lysering av sensitive celler ( $0,125\ \mu\text{g/ml}$ ) (Figur 4.7B). CbpD<sup>U05</sup> hadde ulik effektivitet sammenlignet med CbpD<sup>B6</sup>, siden pneumokokkene ikke var helt immune mot CbpD<sup>U05</sup> før ti minutter etter kompetanseinduksjon, og at immuniteten delvis forsvant en time etter kompetanseinduksjon. Likevel er pneumokokkene fremdeles litt immune mot CbpD<sup>U05</sup> to timer etter kompetanseinduksjon. Ved tilsetning av en mengde CbpD<sup>U05</sup> som gir maksimal lysering ( $2\ \mu\text{g/ml}$ ) (Figur 4.7A) ble pneumokokkene aldri helt immune, men lysering var uansett betydelig redusert hos de kompetanseinduserte pneumokokkene. Resultatene i disse forsøkene viser at ComM hos *S. pneumoniae* gir immunitet mot CbpD fra både *S. mitis* og *S. oralis*, og at cellene beholder immuniteten gjennom flere generasjoner (en generasjon =  $\sim 30$  minutter).



**Figur 4.7 Kompetanseinduserte pneumokokkers immunitet mot CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>.** *S. pneumoniae* RH17 ble indusert til kompetanse ved tilsetning av 250 ng/ml CSP-1 ved OD<sub>550</sub> ~ 0,2 (grafene til høyre, + CSP). **A)** CbpD<sup>B6</sup> ble tilsatt cellekulturene til en sluttkonsentrasjon på 0,26 eller 8,33 µg/ml ved ulike tidspunkter etter kompetanseinduksjon. **B)** På samme måte ble CbpD<sup>Uo5</sup> tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,125 og 2 µg/ml. Til grafene hvor det er tilsatt lavest konsentrasjon av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> er lysring av de kompetanseinduserte cellene indikert med sorte piler. Som kontroll ble CbpD<sup>B6/Uo5</sup> tilsatt som beskrevet ovenfor til *S. pneumoniae* RH17 som ikke var kompetanseinduserte (grafene til venstre, - CSP). **Merk:** Forsøkene ble utført i triplikater og kurvene viser gjennomsnitt av disse, men siden standardavvik var vanskelig å se tydelig i kurvene var det ikke hensiktsmessig å ta dem med.

#### 4.4 Ulike streptokokkarters sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

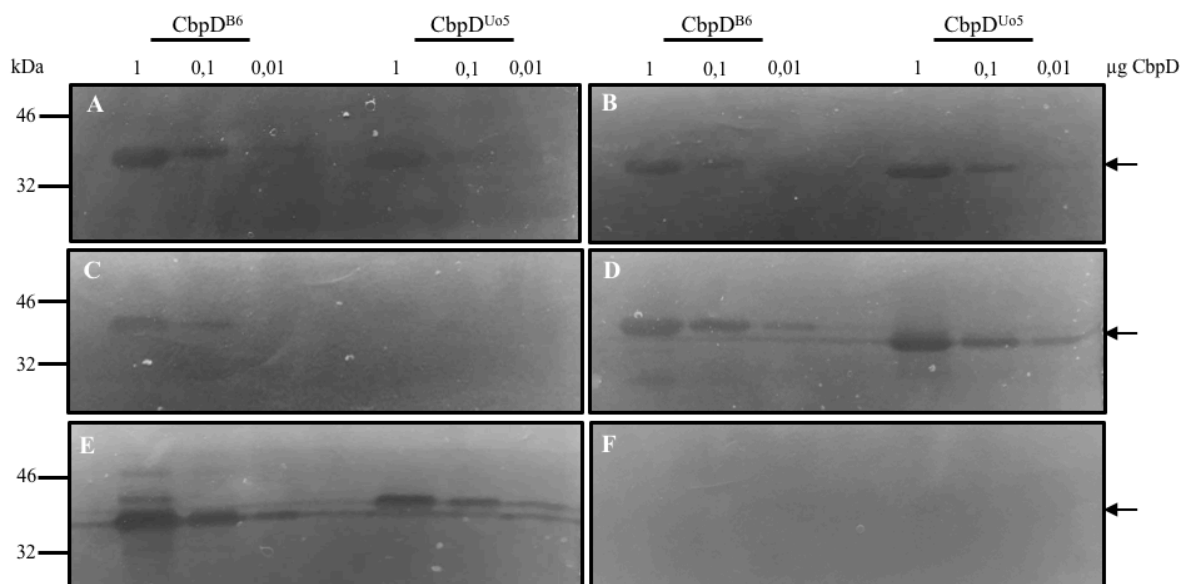
CbpD<sup>Spn</sup> binder til celleveggen og lyserer andre ikke-kompetente pneumokokker, men det er i tillegg sett at proteinet binder til og lyserer andre nært beslektede streptokokker (Eldholm et al., 2009; Johnsborg et al., 2008; Straume et al., 2015). Vi ønsket derfor å teste om det samme gjelder for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> som uttrykkes av henholdsvis *S. mitis* og *S. oralis*. Kan disse CbpDene lysere sine egne produsentceller i tillegg til andre streptokokkarter? Spesifisiteten til CbpD<sup>B6/Uo5</sup> ble testet ved å tilsette enzymene til flytende kulturer av andre streptokokkarter (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae* og *S. thermophilus*) (Figur 4.8). Konsentrasjonen av CbpD<sup>B6/Uo5</sup> som ga maksimal lysing hos pneumokokker (8,33 µg/ml for CbpD<sup>B6</sup> og 2 µg/ml for CbpD<sup>Uo5</sup>) (Figur 4.6) ble tilsatt. Sensitivitet for CbpD observeres som reduksjon i OD<sub>550</sub>-verdier eller en forbigående reduksjon i veksthastighet. Vekstkurvene i Figur 4.8 viser at *S. mitis* B6 er noe sensitiv for CbpD<sup>B6</sup>, men ikke sensitiv for CbpD<sup>Uo5</sup>. *S. mitis* Sk142 er også svært lite sensitiv for både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. *S. oralis* Uo5 er hverken sensitiv for CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>Uo5</sup>, mens *S. oralis* Sk610 er litt sensitiv for både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. For *S. pneumoniae* RH425 cellene, lyserer cirka 100 % av CbpD<sup>B6</sup> og cirka 50 % av CbpD<sup>Uo5</sup>. I tidligere forsøk hvor aktiviteten til CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> ble testet mot *S. pneumoniae* celler (Figur 4.6), var CbpD<sup>Uo5</sup> mer aktiv enn CbpD<sup>B6</sup>, og derfor kan det se ut til at CbpD<sup>Uo5</sup> har mistet noe av sin aktivitet etter frysing ved -80°C. *S. thermophilus* LMG18311 er derimot ikke sensitiv for noen av CbpDene.



**Figur 4.8** Ulike streptokokkarters sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. Tilsetning av **A)** CbpD<sup>B6</sup> (8,330 µg/ml) og **B)** CbpD<sup>Uo5</sup> (2,000 µg/ml) til ulike streptokokkarter ved OD<sub>550</sub> ~ 0,2 (eksponentiell vekstfase). Kurvene viser streptokokkenes sensitivitet for CbpD<sup>B6/Uo5</sup>, og lysing indikeres av de sorte pilene. Forsøkene er utført i triplikater (med unntak av *S. mitis* Sk142 på grunn av dårlig vekst), og kurvene viser gjennomsnittsverdiene til disse, inkludert standardavvik. Noen av bakteriene ble dyrket lenger på forhånd av forsøket, på grunn av at de vokste saktere, og start-OD var dermed høyere for disse. Enkelte av grafene er «hakkete» og har høye standardavvik utover i stasjonærphase, og grunnen til dette er at cellene vokser i lange kjeder og klumper seg i stasjonærphase.



For å bekrefte streptokokkartenes sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> (Figur 4.8), ble det også utført zymografi (se seksjon 3.10). Det ble benyttet 1,0; 0,1; og 0,01 µg av begge typene CbpD i hvert zymogram. Følgende celler ble brukt som substrat i zymogrammene: *S. mitis* B6, *S. mitis* Sk142, *S. oralis* Uo5, *S. oralis* Sk610, *S. pneumoniae* RH14 (ΔLytA<sup>1</sup>) og *S. thermophilus* LMG18311 (Figur 4.9). Når bakteriene støpes inn i gelene vil gelen fremstå gråhvit mot en sort bakgrunn. Lytisk aktivitet fra CbpD vil bryte ned celleveggene til bakteriene i gelen, og klarningsoner vises som mørke bånd mot den sorte bakgrunnen (Figur 4.9). Både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> gir klare soner i zymogrammene hvor *S. mitis* Sk142 (Figur 4.9B), *S. oralis* Sk610 (Figur 4.9D) og *S. pneumoniae* RH14 (Figur 4.9E) er benyttet som substrater. CbpD<sup>B6</sup> gir noe klare soner i zymogrammene med *S. mitis* B6 (Figur 4.9A) og *S. oralis* Uo5 (Figur 4.9C) som substrat, mens CbpD<sup>Uo5</sup> har lite eller ingen lytisk aktivitet mot disse. Mot *S. thermophilus* LMG18311 gir hverken CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>Uo5</sup> klare soner (Figur 4.9F).



**Figur 4.9 Streptokokkers sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>.** Zymogramanalyser av ulike streptokokkarters sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> (~ 37 kDa) og CbpD<sup>Uo5</sup> (~ 38 kDa). CbpD sin muralytiske aktivitet vises som mørke bånd i zymogrammene. I hvert zymogram er det tilsatt 1 µg, 0.1 µg 0.01 µg av både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. Gelene inneholdt varmeinaktiverte streptokokker av artene **A)** *S. mitis* B6, **B)** *S. mitis* Sk142, **C)** *S. oralis* Uo5, **D)** *S. oralis* Sk610, **E)** *S. pneumoniae* RH14 og **F)** *S. thermophilus* LMG18311 som substrat.

<sup>1</sup> Det er brukt *S. pneumoniae* RH14 som mangler LytA fordi LytA ville forårsaket lysering av alle cellene, og dermed ført til klare soner over hele zymogrammet. Dermed ville man ikke kunne sett resultater av CbpDs lytiske aktivitet.

## Resultater

Resultatene fra vekstforsøkene (Figur 4.8) og zymogrammene (Figur 4.9) samstemmer relativt bra, men gir likevel noe ulike resultater av streptokokkartenes sensitivitet for CbpD. Tabell 4.1 viser en samlet oversikt over anslagsvis mengde lysering av streptokokkene. Det ser ut til at både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> gir mer lysering i zymogrammene enn i vekstkurvene fra mikroplateleseren.

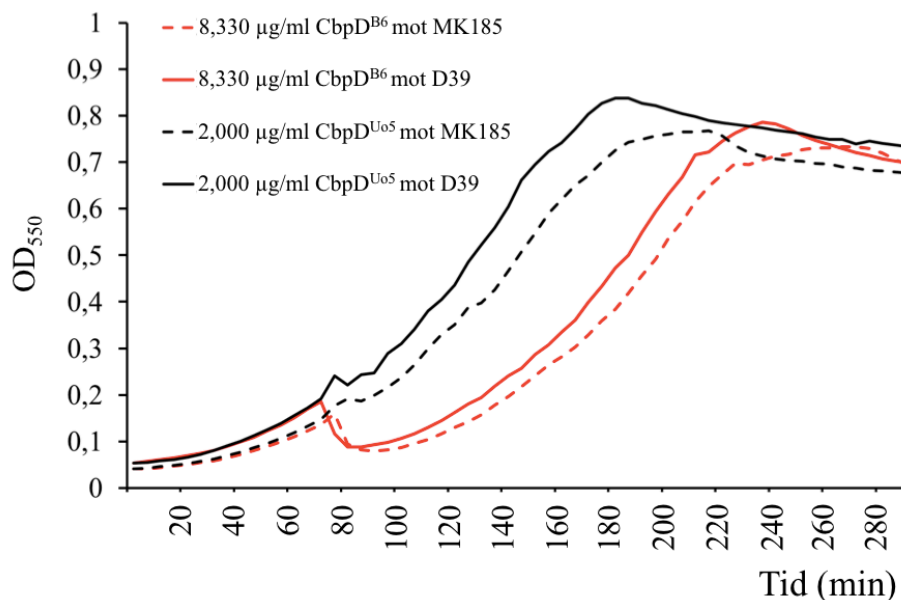
**Tabell 4.1 En oversikt over streptokokkenes sensitivitet for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup>.** Anslagsvis mengde lysering av de ulike stammene streptokokker ved eksponering for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> basert på målinger i mikroplateleseren Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek®) og zymografi. «-» indikerer ingen lysering, «+» indikerer veldig lite lysering, «++» indikerer lite lysering og «+++» indikerer mye lysering.

	CbpD <sup>B6</sup>	CbpD <sup>U05</sup>
<i>S. mitis</i> B6	++	+
<i>S. mitis</i> Sk142	++	++
<i>S. oralis</i> Uo5	+	-
<i>S. oralis</i> Sk610	++	++
<i>S. pneumoniae</i> RH425/RH14	+++	+++
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	-	-

## 4.5 Polysakkaridkapselens betydning for CbpD-sensitivitet hos pneumokokker

Mange stammer av *S. pneumoniae* omslutes av en polysakkaridkapsel, som beskytter pneumokokken mot vertens immunforsvar og er essensiell for kolonisering av verten (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). Polysakkaridkapselen er vist å ha negativ effekt på aktiviteten til autolysinet LytA hos *S. pneumoniae* (Fernebro et al., 2004), og derfor ønsket vi å undersøke om dette også gjelder for CbpD. Siden CbpD binder til celleveggen hos pneumokokker (Straume et al., 2015), ønsket vi å finne ut om polysakkaridkapsel hos målcellen til dels blokkerer CbpDs tilgang til celleveggen, og dermed har betydning for målcellens CbpD-sensitivitet. For å undersøke dette ble både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> testet mot *S. pneumoniae* D39, en pneumokokkstamme med polysakkaridkapsel. Som kontroll ble det brukt *S. pneumoniae* MK185, en stamme av *S. pneumoniae* D39 som mangler polysakkaridkapsel. Det ble tilsatt konsentrasjoner av CbpD<sup>B6/U05</sup> som gir maksimal lysering hos *S. pneumoniae* RH17 (se seksjon 4.4; Figur 4.6); 8,330 µg/ml CbpD<sup>B6</sup> og 2,000 µg/ml CbpD<sup>U05</sup>. Det var ikke store forskjeller i lysering hos *S. pneumoniae* D39 og *S. pneumoniae* MK185 (Figur 4.10), og derfor ser det ikke

ut til at kapselen er av betydning for CbpD-sensitivitet hos *S. pneumoniae*. Som nevnt i seksjon 4.4 ser det også her ut til at CbpD<sup>U05</sup> har mistet noe av sin aktivitet etter frysing ved - 80°C.



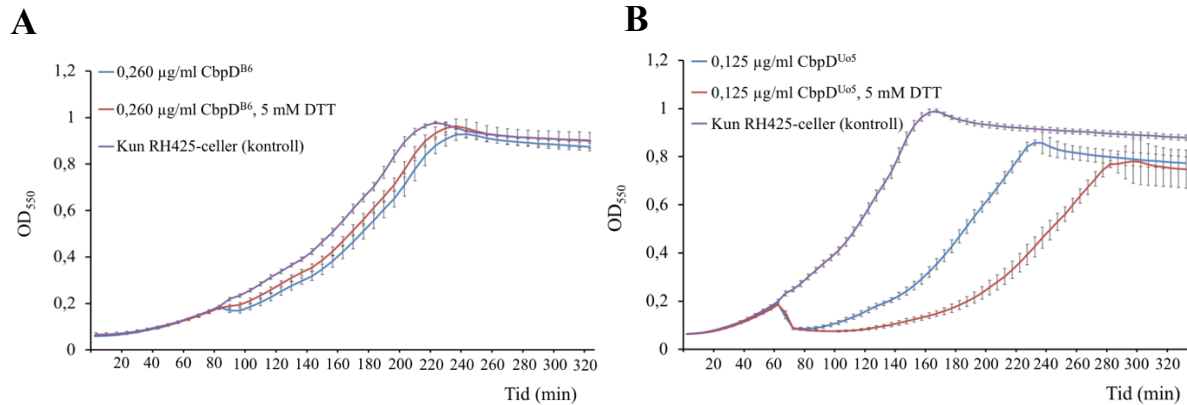
**Figur 4.10 Polysakkaridkapselens betydning i CbpD-sensitivitet.** Maksimale mengder CbpD<sup>B6/U05</sup> mot *S. pneumoniae* MK185 (uten polysakkaridkapsel) og *S. pneumoniae* D39 (med polysakkaridkapsel). Der hvor OD<sub>550</sub> synker er det tilsatt CbpD<sup>B6/U05</sup>, som gjør at det forekommer lysering av cellene. **Merk:** Forsøket ble utført i triplikater og kurvene viser gjennomsnitt av disse, men siden standardavvik var vanskelig å se tydelig i kurvene var det ikke hensiktsmessig å ta dem med.

#### 4.6 Virker CbpD bedre under reduserende betingelser?

Som nevnt ovenfor vet man fra tidligere studier av CbpD<sup>Spn</sup> i gruppen til Prof. Håvarstein at cystein-residuen i det aktive setet til CHAP-domenet lett oksideres, og CbpD blir dermed inaktivert (upublisert data, Dr. Daniel Straume). Da det ble laget en tofoldsfortynning av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> (se seksjon 4.3) stoppet lyseringen tidligere enn forventet i fortynningsrekka (Figur 4.6), og en mulig årsak til dette kan være at cystein-residuen i CHAP-domenet er oksidert. Derfor ble reduktanten DTT tilsatt til både CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> for å se om dette utgjorde en forskjell i lysering av *S. pneumoniae* RH425. DTT reduserer eventuelle oksiderte hydroksylgrupper i cystein-residuer, som er en essensiell aminosyre i det aktive setet til CHAP-domener (Bateman & Rawlings, 2003). DTT ble tilsatt til CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>U05</sup> til en sluttkonsentrasjon på 5 mM DTT. Aktiviteten til DTT-redusert CbpD<sup>B6/U05</sup> ble sammenlignet med korresponderende mengder enzym som ikke var behandlet med DTT. For å kunne se eventuelle forskjeller mellom redusert og ikke-redusert CbpD, ble det benyttet en konsentrasjon av CbpD<sup>B6/U05</sup> som normalt gir ~ 30 % lysering (Figur 4.11). Resultatet viste at ved tilsetning

## Resultater

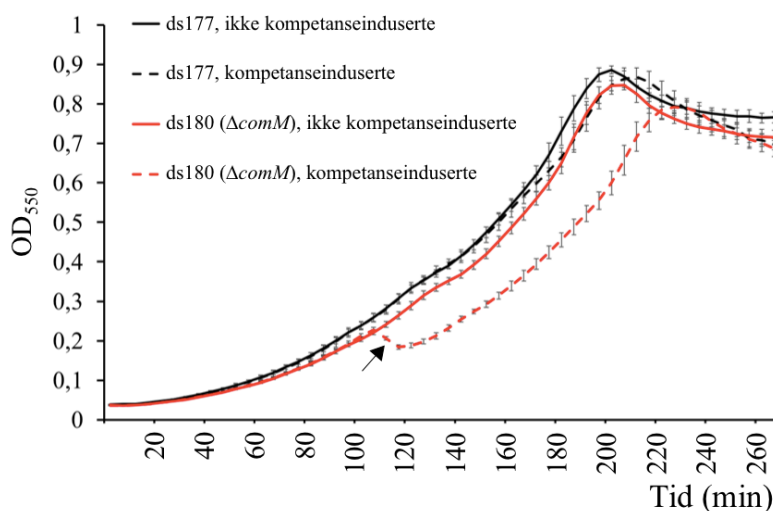
av CbpD<sup>Uo5</sup> med 5 mM DTT og CbpD<sup>Uo5</sup> uten DTT til *S. pneumoniae* RH425 var mengde lysering lik, men det tok lenger tid for overlevende bakterier å vokse opp etter tilsetning av CbpD<sup>Uo5</sup> med DTT. CbpD<sup>B6</sup> med og uten 5 mM DTT utgjorde ingen forskjell i lysering av *S. pneumoniae* RH425.



**Figur 4.11 CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> sin lytiske aktivitet ved tilsetning av 5 mM DTT.** Til *S. pneumoniae* RH425 i eksponentiell vekstfase ( $OD_{550} = \sim 0,2$ ) ble det tilsatt **A**) CbpD<sup>B6</sup> både med og uten 5 mM DTT og **B**) CbpD<sup>Uo5</sup> med og uten 5 mM DTT. Forsøkene ble utført i triplikater, og kurvene viser gjennomsnitt av disse, samt standardavvik.

## 4.7 CbpD<sup>B6</sup> kan substituere for CbpD<sup>Spn</sup> *in vivo* i *S. pneumoniae*

I dette arbeidet er det utført en rekke analyser hvor rensert CbpD<sup>B6/Uo5</sup> har blitt tilsatt ekstracellulært til streptokokker i eksponentiell vekstfase. Resultatene viste tydelig at begge enzymene kan lysere pneumokokker ved konsentrasjoner på minimum 0,26 og 0,063 µg/ml for henholdsvis CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. For å få et bedre bilde av aktiviteten til disse CbpDene mot *S. pneumoniae*, valgte vi å bytte ut det native *cbpD<sup>Spn</sup>*-genet i *S. pneumoniae* med *cbpD<sup>B6</sup>* eller *cbpD<sup>Uo5</sup>*. Å introdusere *cbpD<sup>B6</sup>* i det native *cbpD<sup>Spn</sup>*-loket i genomet til *S. pneumoniae* gikk bra, men bakterien aksepterte ikke å få satt inn *cbpD<sup>Uo5</sup>* i dette lokuset. Gjentatte forsøk på å lage denne mutanten feilet, og derfor er det kun *S. pneumoniae* som uttrykker CbpD<sup>B6</sup> som ble testet i dette arbeidet. For å undersøke om CbpD<sup>B6</sup> var i stand til å lysere *S. pneumoniae in vivo* under kompetanse, ble stammene ds180 ( $\Delta$ Janus::CbpD<sup>B6</sup>,  $\Delta$ comM::Janus) og ds177 ( $\Delta$ Janus::CbpD<sup>B6</sup>) indusert til kompetanse ved  $OD_{550} = \sim 0,2$  (Figur 4.12). Stamme ds180 mangler *comM* og blir ikke immun mot CbpD under kompetanse, mens ds177 er immun mot CbpD<sup>Spn</sup>. Resultatet viste at *S. pneumoniae* som uttrykker ComM under kompetanse ble immun mot CbpD<sup>B6</sup> som produseres *in vivo*, mens  $\sim 30\%$  av kompetente ikke-immune celler (ds180) lyserte som følge av egenprodusert CbpD<sup>B6</sup>.



**Figur 4.12** Produksjon av, og lytisk aktivitet forårsaket av CbpD<sup>B6</sup> *in vivo* hos *S. pneumoniae*. *S. pneumoniae* ds177 ( $\Delta$ Janus::CbpD<sup>B6</sup>) og *S. pneumoniae* ds180 ( $\Delta$ Janus::CbpD<sup>B6</sup>,  $\Delta$ acomM::Janus) induisert til kompetanse ved OD<sub>550</sub> ~ 0,2, inkludert kontroller av begge stammene som ikke er kompetanseinduserte. Den sorte pilen indikerer lysering av kompetanseinduserte *S. pneumoniae* ds180. Forsøkene ble utført i triplikater, og kurvene viser gjennomsnitt av disse. Standardavvik er indikert.

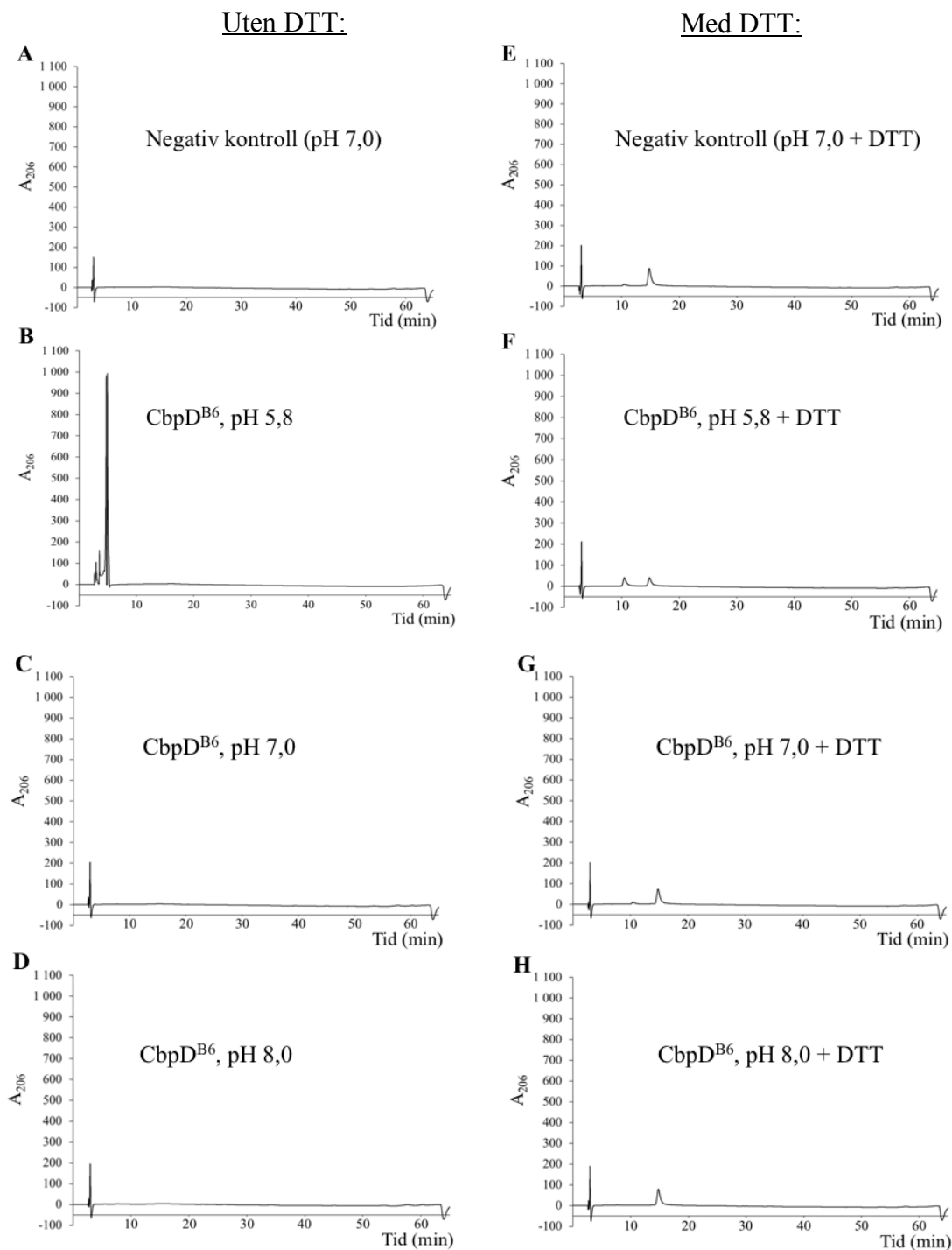
#### 4.8 CbpDs kutteseite i peptidoglykanet

I dette arbeidet ønsket vi å finne ut hvilke(n) binding(er) i peptidoglykanet som kuttes av CbpD. Peptidoglykanet består av lange glykankjeder, som er kryssbundet via interpeptidbroer (Vollmer et al., 2008). Siden andre proteiner med CHAP-domener er vist å kutte bånd i disse interpeptidbroene, eller båndet mellom NAM og stempeptidet, i peptidoglykanet hos bakterier (Bateman & Rawlings, 2003), er det stor grunn til å tro at dette også gjelder CbpD.

For å finne CbpDs kutteseite, ble rensset cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 (villtype) inkubert med CbpD<sup>B6</sup> (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l) ved 37°C, både med og uten 1 mM DTT, over natt. Idéen bak dette forsøket var at hvis CbpD kutter spesifikke bånd i peptidoglykanet, så ville deler av eller flere varianter av interpeptidbroene bli kuttet løs fra peptidoglykanet. For å identifisere peptider som kunne ha blitt frigjort fra peptidoglykanet, ble prøvene analysert ved bruk av reversfase HPLC. Aktiviteten til enzymer kan variere avhengig av pH (Lesk, 2016), og enzymreaksjonene ble derfor inkubert ved ulike pH-verdier: pH 5,8; pH 7,0; pH 8,0. Hvis det har forekommet kutt i celleveggen, vil man kunne se nye toppen eller forflytning av toppene i HPLC-kromatogrammet. Kromatogrammene vises i Figur 4.13, hvor de til venstre viser prøver uten DTT og de til høyre viser prøver tilsatt DTT (for å redusere eventuelle oksiderte cysteinresiduer) til en sluttkonsentrasjon på 1 mM. Kromatogrammene som viser prøver uten DTT (Figur 4.13B-D) har ingen elueringsstopper. Dette indikerer at CbpD<sup>B6</sup> ikke har kuttet løs noen

## Resultater

peptider fra peptidoglykanet. Kromatogrammene for prøvene som ble inkubert med 1 mM DTT (Figur 4.13F-H) har en eller to elueringsstopper, men disse var også tilstede i negativ kontroll uten tilsatt enzym (Figur 4.13E). Disse toppene er derfor ikke stempeptider som er kuttet løs fra celleveggen som resultat av enzymatisk CbpD-aktivitet. Forsøket ble gjentatt med en inkubasjonstid på en time i stedet for over natt (resultater vises ikke), noe som heller ikke resulterte i frigjøring av stempeptider fra celleveggen. Cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 ble også inkubert med CbpD<sup>U05</sup> over natt ved 37°C og pH 7,0, både med og uten 1 mM DTT (Vedlegg C), men heller ikke her ble det sett noen forskjell mellom prøve med CbpD<sup>U05</sup>/CbpD<sup>U05</sup> + DTT og negative kontroller.

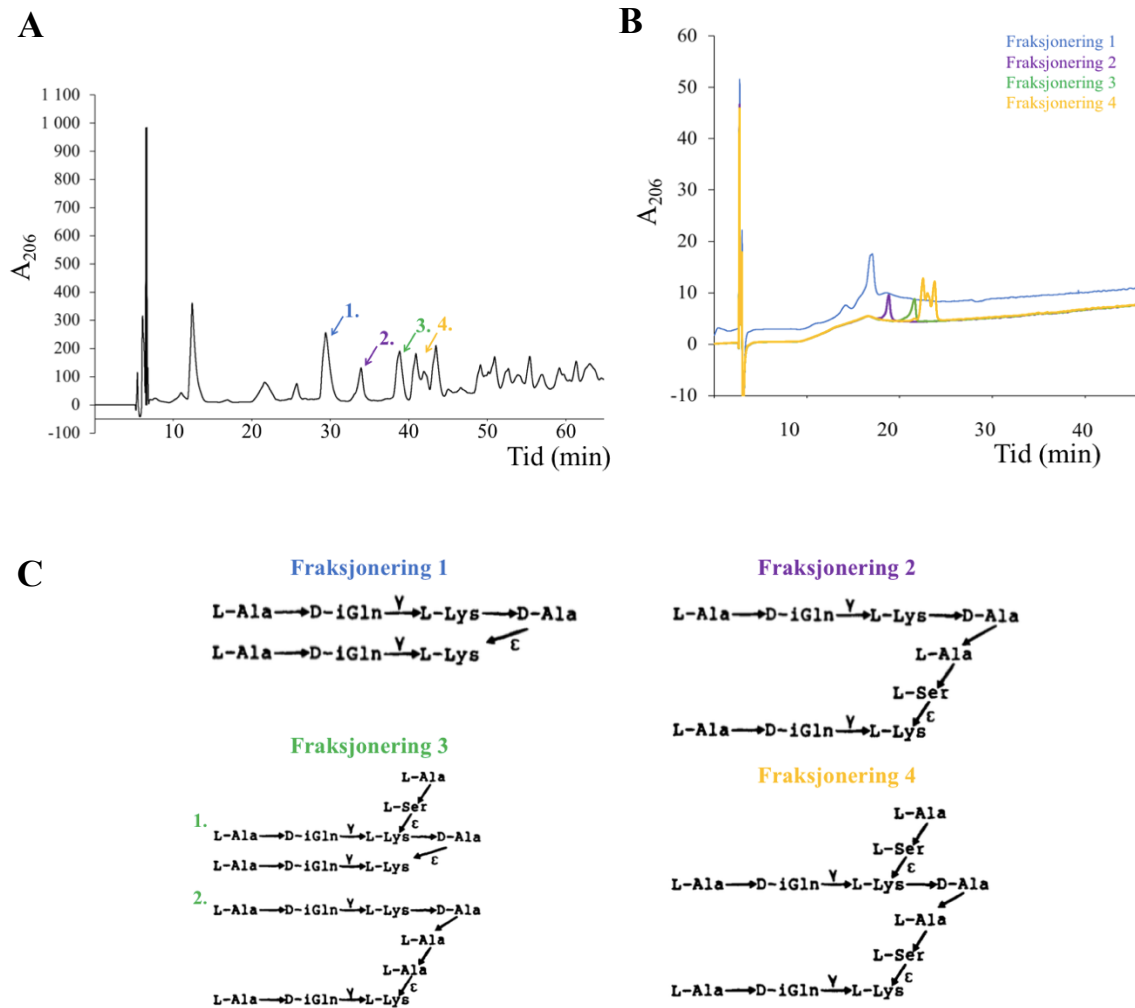


**Figur 4.13 Peptidoglykan inkubert med CbpD<sup>B6</sup>.** HPLC-kromatogrammer som viser prøver med rensset cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 inkubert med 0,05 µg/µl CbpD fra *S. mitis* B6. Prøvene ble inkubert ved ulike pH-verdier. Prøve A) – D) inneholdt ikke DTT, mens E) – H) inneholdt 1 mM DTT. I kromatogram E) – H) er det en eller to toppene, som antakeligvis skyldes tilsetning av DTT siden toppene også er å se i kontrollen. Kromatogrammene viser prøver med følgende pH-verdier: **A)** kontroll ved pH 7,0 hvor det ikke ble tilsatt CbpD<sup>B6</sup>, **B)** tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> inkubert ved pH 5,8, **C)** tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> inkubert ved pH 7,0, **D)** tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> inkubert ved pH 8,0, **E)** kontroll ved pH 7,0 med DTT hvor det ikke ble tilsatt CbpD<sup>B6</sup>, **F)** tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> med 1 mM DTT inkubert ved pH 5,8, **G)** tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> med 1 mM DTT inkubert ved pH 7,0, **H)** tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> med 1 mM DTT inkubert ved pH 8,0.

## Resultater

Siden inkubering med CbpD alene ikke resulterte i at hele eller deler av stempeptider ble kuttet løs fra rensset cellevegg, ville vi teste om årsaken til dette var at CbpD kun kutter ett bånd i interpeptidbroene (endopeptidaseaktivitet). Hvis tilfellet, ville ikke CbpD alene være i stand til å kutte løs peptidfragmenter fra celleveggen. For å teste dette, måtte ulike stempeptider isoleres, for så å bli brukt som substrat for CbpD. Vi benyttet oss av enzymet LytA for å frigjøre alle stempeptidene fra celleveggen. LytA er en amidase som kutter bindingen mellom NAM og L-Alanin i peptidoglykanet hos *S. pneumoniae* (se seksjon 1.5.1) (Howard & Gooder, 1974). Cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 ble inkubert med LytA (0,0085 µg/µl) ved 37°C over natt. Ved å separere stempeptidene ved hjelp av reversfase HPLC (Figur 4.14A), kan de isoleres og deretter brukes individuelt som substrater for CbpD. Etter inkubasjon med CbpD, kan peptidene igjen analyseres ved hjelp av reversfase HPLC for å se om CbpD har innført kutt i peptidene. Stempeptidene som kuttet løs av LytA er av ulike størrelser (Garcia-Bustos et al., 1987), og basert på deres hydrofobisitet, elueres de ved ulike tidspunkter under reversfase HPLC (se seksjon 3.14). Elueringstoppene i kromatogrammet i Figur 4.14A representerer ulike stempeptider. Seks stempeptider ble samlet opp (en fraksjon inneholdt en blanding av tre ulike stempeptider), for senere å kuttet med CbpD<sup>B6</sup>. Renheten til de rensede stempeptidene ble verifisert ved bruk av reversfase HPLC før de ble benyttet som substrat for CbpD<sup>B6</sup> (Figur 4.14B). Figur 4.14C viser strukturene til stempeptidene som ble isolert.

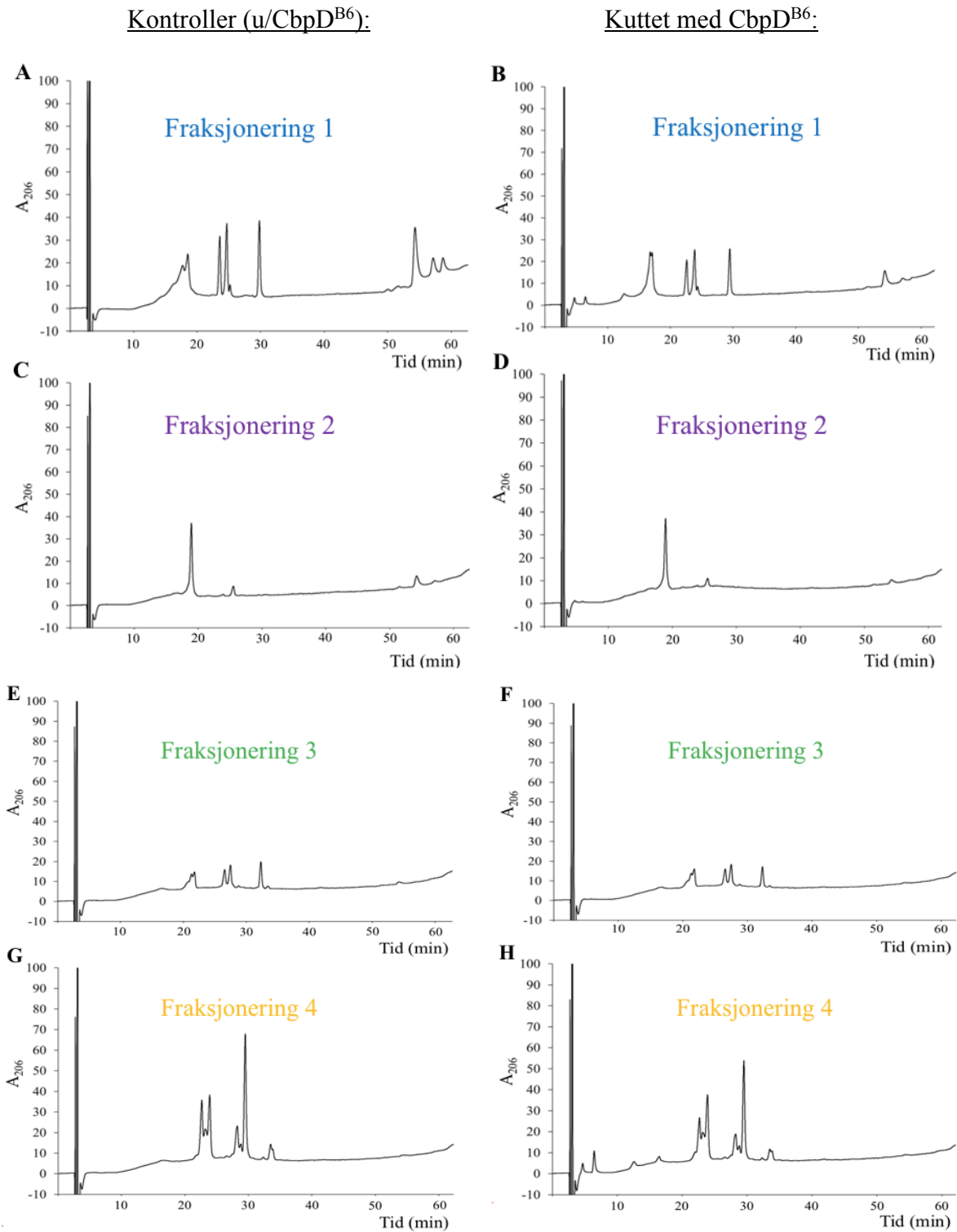




**Figur 4.14** Peptidoglykan fra *S. pneumoniae* RH425 kuttet med LytA. **A)** HPLC-kromatogrammer som viser cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 kuttet med LytA, hvor stempeptidene vi plukket ut er indikert med piler. **B)** Seks stempeptider (den ene fraksjonen inneholdt en blanding av tre stempeptider) ble plukket ut og verifisert. **C)** Strukturene til stempeptidene i de fire fraksjoneringene, hvor fraksjonering 3 inneholder to ulike stempeptider. Fraksjonering 4 inneholder tre forskjellige stempeptider da vi ikke klarte å separere dem via reversfase HPLC. Ett av de tre stempeptidene i fraksjonering 4 er trolig det som vises strukturen til. Stempeptidstrukturene er hentet fra (Garcia-Bustos et al., 1987).

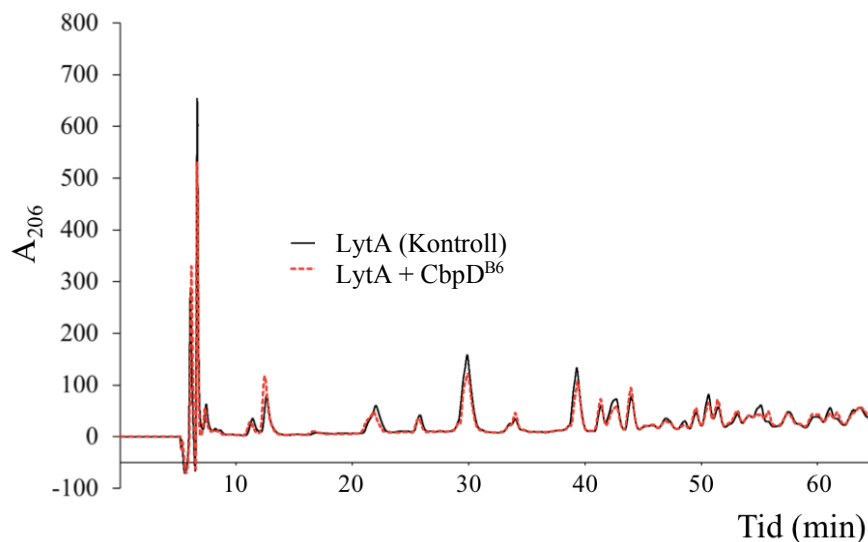
De seks isolerte stempeptidene ble inkubert med CbpD<sup>B6</sup> (0,05 µg/µl) over natt ved pH 7,0 og 37°C. Rensede peptider inkubert uten CbpD ble brukt som negative kontroller (Figur 4.15). HPLC av stempeptid nummer 1, 3 og 4-6 (fraksjonering 1, 3 og 4) ga flere elueringsstopper etter inkubering med CbpD<sup>B6</sup>, men siden de samme elueringsstoppene også var tilstede i prøvene som ikke var behandlet med CbpD<sup>B6</sup> (kontrollene) skyldtes de ikke et resultat av CbpD<sup>B6</sup>-aktivitet. Stempeptid nummer 2 (fraksjonering 2) var uforandret etter inkubasjon med CbpD<sup>B6</sup>. Vi mistenkte at de ekstra elueringsstoppene funnet for stempeptid nummer 1, 3 og 4 - 6 kunne være et resultat av peptidaggregering eller -degradering, og gjentok forsøket, men denne gangen ved å inkubere stempeptidene i en time med CbpD<sup>B6</sup>, i stedet for over natt. Resultatet fra dette forsøket ble likt som for prøvene inkubert over natt (resultater vises ikke).

## Resultater



**Figur 4.15** Rensede stempeptider inkubert med CbpD<sup>B6</sup>. HPLC-kromatogrammer som viser stempeptider (fraksjoner) fra peptidoglykanet hos *S. pneumoniae* RH425 (Figur 4.14), inkubert med CbpD<sup>B6</sup> over natt ved pH 7,0 og 37°C. HPLC-kromatogrammene til venstre er negative kontroller hvor det ikke er tilsatt CbpD<sup>B6</sup>, mens HPLC-kromatogrammene til høyre viser stempeptider inkubert med CbpD<sup>B6</sup>. Kromatogrammene inneholder følgende stempeptider inkubert/ikke inkubert med CbpD<sup>B6</sup> (se Figur 4.14B): **A)-B)** Stempeptid 1 (fraksjonering 1), **C)-D)** Stempeptid 2 (fraksjonering 2), **E)-F)** Stempeptid 3 (fraksjonering 3), **G)-H)** Stempeptid 4-6 (fraksjonering 4).

Siden vi ikke klarte å detektere CbpD<sup>B6</sup>-hydrolyse av de spesifikke stempeptidene vi renset, valgte vi å teste om CbpD<sup>B6</sup> kunne kutte renset cellevegg med hjelp fra LytA. Renset cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 ble inkubert med både LytA og CbpD<sup>B6</sup>. To prøver med cellevegg ble først inkubert med LytA (0,0035 µg/µl) ved pH 7,0 og 37°C over natt. LytA ble så fjernet ved koking og sentrifugering (20 000 x g). Etter nedkjøling av prøvene ble det tilsatt CbpD<sup>B6</sup> (0,05 µg/µl) til den ene prøven, og prøvene ble inkubert i en time ved pH 7,0 og 37°C. Den andre prøven som ikke ble tilsatt CbpD<sup>B6</sup> ble kun kuttet med LytA, og fungerer dermed som en negativ kontroll. Prøvene ble analysert ved bruk av reversfase HPLC (Figur 4.16). Resultatet viste at HPLC-kromatogrammene til begge prøvene var like, og vi kunne ikke identifisere substratet til CbpD<sup>B6</sup> i dette forsøket.

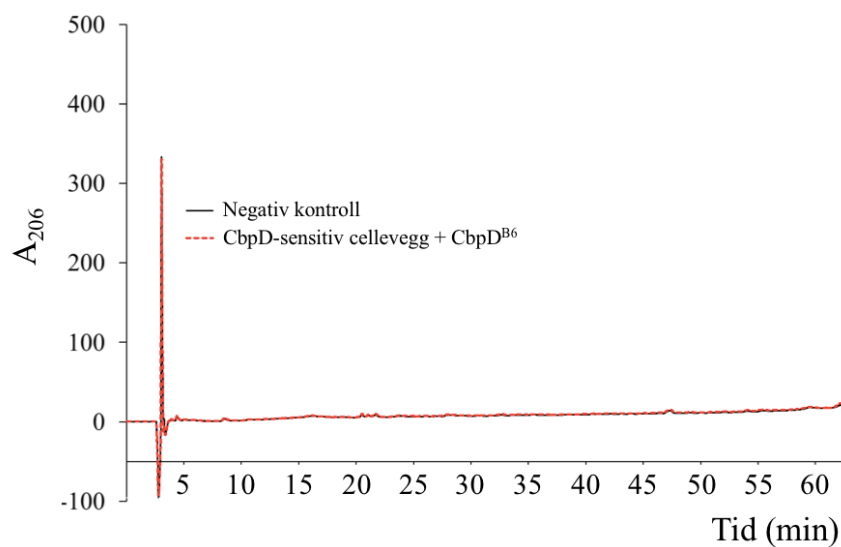


**Figur 4.16** Kuttetekombinasjon med LytA og CbpD<sup>B6</sup> av cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425. HPLC-kromatogram som viser cellevegg fra *S. pneumoniae* RH425 inkubert med en kombinasjon av LytA og CbpD<sup>B6</sup> (rød stipledd linje). I kontrollen (sort heltrukket linje) er *S. pneumoniae* RH425 cellevegg kun kuttet med LytA.

Hverken inkubering med kun CbpD<sup>B6</sup> av hel cellevegg, isolerte stempeptider eller en kombinasjon av CbpD<sup>B6</sup> og LytA, viste detekterbar enzymaktivitet av CbpD<sup>B6</sup>. En grunn til dette kan være at CbpD bare kan kutte et fåtall av stempeptidene som finnes i celleveggen. Man vet fra før at CbpD kun angriper septum hos sensitive celler (Eldholm et al., 2010). En slik smalspektret aktivitet kan være vanskelig å oppdage ved hjelp av HPLC, fordi mengden av peptidene som eventuelt frigjøres kan ligge under deteksjonsgrensen. Derfor forsøkte vi å inkubere CbpD<sup>B6</sup> med cellevegg isolert fra PBP2b-depletet *S. pneumoniae* SPH158. Disse cellene er vist å være ekstremt sensitive for både LytA og CbpD, og de har en annen

## Resultater

komposisjon av stempeptider enn villtype celler (større grad av trimere og tetramere stempeptider) (Berg et al., 2013). Vi tenkte at denne celleveggen kunne være et bedre substrat for CbpD<sup>B6</sup>, og at sjansen for å detektere stempeptider kuttet løs fra denne celleveggen var høyere enn for celleveggen fra villtype-celler. Cellevegg fra PBP2b-depletede celler ble inkubert med CbpD<sup>B6</sup> og analysert som beskrevet over. Sammenlignet med kontroll (PBP2b-depletede cellevegg uten CbpD<sup>B6</sup>) klarte vi heller ikke i denne type cellevegg å påvise kutt forårsaket av CbpD<sup>B6</sup> (Figur 4.17). Forsøket ble også utført ved inkubasjon av PBP2b-depletede cellevegg og CbpD<sup>B6</sup> i en time ved 37°C, men heller ikke her kunne vi påvise kutt (resultater vises ikke).



**Figur 4.17 CbpD-høysensitiv cellevegg inkubert med CbpD<sup>B6</sup>.** PBP2b-depletede cellevegg fra *S. pneumoniae* SPH158, som er høysensitiv for CbpD, inkubert med CbpD<sup>B6</sup> over natt (rød stiplet linje), inkludert kontroll med PBP2b-depletede cellevegg fra *S. pneumoniae* som ikke er tilsatt CbpD<sup>B6</sup> (sort heltrukken linje).

## 5. Diskusjon

Fratrisidmekanismen hos *S. pneumoniae* er nært knyttet til naturlig genetisk transformasjon hos denne bakteriearten. Som beskrevet i seksjon 1.4 gjør fratrisid det mulig for pneumokokker å erverve seg nye egenskaper ved aktivt å lysere andre streptokokker, for så å ta opp DNAet som blir tilgjengeliggjort. Siden fratrisid er kompetanseregulert, antar man at denne mekanismens hovedfunksjon er knyttet opp mot DNA-opptak, og at den er en viktig drivkraft i spredning av gener for virulens og antibiotikaresistens (Johnsborg & Håvarstein, 2009b; Straume et al., 2015). For å kunne utvikle strategier som bremser den dramatiske økningen av penicillinresistente isolater, er det viktig å få en fundamental forståelse av hvordan spredning av resistensgener spres blant streptokokker. Mureinhydrolasen CbpD er et nøkkelenzym i fratrisidmekanismen hos *S. pneumoniae* og mange andre streptokokkarter. Dette enzymet binder til celleveggen og lyserer andre ikke-kompetente celler av samme art. For pneumokokker er det også vist at CbpD kan lysere nært beslektede streptokokker (Johnsborg & Håvarstein, 2009b). Hvor i celleveggen CbpD kutter, og effektiviteten til dette enzymet mot andre streptokokkarter enn CbpD-produsenten, er ikke kjent. Derfor er det ønskelig å vite mer om de biokjemiske egenskapene til CbpD, samt målgruppen for dette enzymet. Spekteret av streptokokkarter CbpD kan lysere, vil gi oss et inntrykk av hvor stor diversitet av gener kompetente streptokokker har tilgjengelig ved å utføre fratrisid.

Siden det tidligere er vist at CbpD rensset fra *S. pneumoniae* er utfordrende å arbeide med (upublisert data, Dr. Daniel Straume), ble det i dette arbeidet rensset to CbpD<sup>Spn</sup>-homologer: CbpD fra *S. mitis* B6 og CbpD fra *S. oralis* Uo5. CbpD<sup>Spn</sup>, CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> er svært konserverte, særlig i det katalytiske CHAP-domenet (Figur 4.1), og derfor vil eventuelle resultater om hvor i celleveggen CbpD<sup>B6/Uo5</sup> kutter, sannsynligvis også gjelde for CbpD<sup>Spn</sup>. Etter rensing av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> ble de to enzymene studert med hensyn på enzymaktivitet og aktivitetsspekter.

### 5.1 Overuttrykk, rensing og oppbevaring av CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

Overuttrykk av CbpD<sup>B6/Uo5</sup> i *E. coli* resulterte i løselig protein som kunne renses ved hjelp av DEAE-cellulose affinitetskromatografi. Fra en liter cellekultur ble utbyttet cirka 5 mg for CbpD<sup>B6</sup> og cirka 4 mg for CbpD<sup>Uo5</sup>. For å overuttrykke rekombinant CbpD i *E. coli* ble det benyttet en tiendedels konsentrasjon av IPTG-induser, i tillegg til en lavere

## Diskusjon

dyrkningstemperatur (20°C) enn hva som gir høyest proteinekspresjon med pRSET-systemet (Invitrogen™). Dette var for å forsikre oss om at proteinet skulle bli uttrykt i løselig form, og ikke danne uløselige aggregater. Likevel kunne man forsøkt å øke konsentrasjonen av IPTG-induser og/eller dyrkningstemperaturen noe, og kanskje fått et enda høyere proteinutbytte som fortsatt er løselig. Dette er noe som kan testes i videre forsøk for å effektivisere rensemetoden.

Etter eluering fra kolonnen brukt i DEAE-cellulose affinitetskromatografi, inneholdt fraksjonene med CbpD<sup>B6</sup> et ekstra protein som er cirka 13 kDa mindre enn fullengde CbpD<sup>B6</sup> (~ 37 kDa) (Figur 4.2A). Basert på at dette kontaminerende proteinet også bandt til DEAE-molekylene og ble eluert med kolin, er det stor sannsynlighet for at det er et degraderingsprodukt av CbpD<sup>B6</sup>, som fremdeles inneholder det kolinbindende domenet. Størrelsen på degraderingsproduktet tyder på at dette proteinet mangler CHAP-domenet (12,7 kDa). Stabilitetstesten av rensed CbpD<sup>B6</sup> (se seksjon 4.2) viste at det ikke degraderes i stor grad, og derfor er degraderingsproduktet mest sannsynligvis et resultat av proteolytisk aktivitet i *E. coli* cellene ved overekspresjon av proteinet. Siden teoretisk isoelektrisk punkt<sup>2</sup> (pI) av fullengde CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>B6</sup> uten CHAP-domenet nesten er likt (8,99 og 9,21), var det umulig å skille disse ved hjelp av ionebyttekromatografi. I tillegg var de hydrofobiske egenskapene til disse to proteinene relativt like, siden hydrofob interaksjonskromatografi heller ikke var egnet for å skille dem (Vedlegg B; Figur B.1). Forskjellen i størrelse gjorde det likevel mulig å delvis skille fullengde CbpD<sup>B6</sup> fra degraderingsproduktet ved hjelp av gelfiltrering (Figur 4.3). Ulempen med denne metoden var at vi kun satt igjen med cirka halvparten av fullengde CbpD<sup>B6</sup> med >90 % renhet (basert på resultater fra SDS-PAGE). For å forbedre dette, kan det benyttes en lenger kolonne, eller en kolonne med bedre separasjonsegenskaper.

CbpD<sup>U05</sup> ble eluert med >90 % renhet fra DEAE-cellulosekolonnen, men felte ut da kolin fra elueringsbufferen ble fjernet ved dialyse. Grunnen til utfelling kan være at kolin har hjulpet enzymet med å opprettholde riktig folding. Når kolin fjernes, blir strukturen til det kolinbindende domenet mer ustabil, og hydrofobe deler eksponeres. Proteinene blir dermed uløselig. En annen årsak til utfelling kan ha med det isoelektriske punktet til CbpD<sup>U05</sup> å gjøre. CbpD<sup>U05</sup> har en teoretisk pI på 7,14, mens CbpD<sup>B6</sup> har en teoretisk pI på 8,99. Begge proteinene ble dialysert mot en buffer med pH 7,4. For CbpD<sup>U05</sup> kan dette ha vært for nært pI til dette proteinet, og det har fått en nettoladning tilnærmet lik null, noe som kan ha bidratt til utfelling.

---

<sup>2</sup> Teoretiske isoelektriske punkter (pI) er funnet ved bruk av ProtParam, expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Det ville derfor være naturlig å teste om CbpD<sup>Uo5</sup> holdt seg løselig uten kolin i bufferen ved å dialysere bort kolin mot en buffer med pH-verdier over eller under 7. Dette er noe som kan testes i fremtidige eksperimenter.

Det er tidligere forsøkt å rense CbpD<sup>Spn</sup> i Prof. Håvarsteins gruppe. I arbeidet med CbpD<sup>Spn</sup> felte proteinet lett ut. Med tanke på at CbpD<sup>Spn</sup> har to SH3b-domener, mens CbpD fra andre streptokokkarter kun har ett (Figur 1.6A og 4.1), kunne det være interessant heller å rense CbpD fra en eller flere andre arter. Slik vil man kunne få en indikasjon på om det faktisk er det ekstra SH3b-domenet som hindrer CbpD<sup>Spn</sup> i å holde seg løselig. I tillegg til utfelling av CbpD<sup>Spn</sup>, ble cystein-residuen i det aktive setet til CHAP-domenet i CbpD<sup>Spn</sup> oksidert slik at enzymaktiviteten ble svekket. For å redusere problemene med oksidasjon av cystein, samt utfelling av proteinet, ble det tilsatt DTT og glyserol til CbpD<sup>Spn</sup> (upublisert data, Dr. Daniel Straume). I vårt arbeid testet vi derfor ulike oppbevaringsmetoder for rensert CbpD<sup>B6</sup> etter fjerning av kolin og salter. I motsetning til CbpD<sup>Spn</sup>, så det ikke ut til at tilsetning av hverken glyserol eller DTT hadde betydning for stabiliteten og aktiviteten til CbpD<sup>B6</sup> (Figur 4.5). CbpD<sup>Uo5</sup>, derimot, felte delvis ut etter fjerning av kolin og salter, og det ble ikke testet ulike oppbevaringsmetoder for dette proteinet. I tillegg dukket det opp et ekstra bånd i CbpD<sup>Uo5</sup> etter to dagers oppbevaring ved 4°C (Figur 4.4). Grunnen til dette er uklar, men kanskje kan det ha med at oksidasjon av cystein-residuen i det aktive setet til CbpD<sup>Uo5</sup> kan endre vandringslengde i gelen. I tillegg indikerte aktivitetstester gjort med CbpD<sup>Uo5</sup> at dette enzymet mistet aktiviteten over tid ved - 80°C (Figur 4.6, 4.8 og 4.10).

## 5.2 Cellelysering forårsaket av CbpD er doseavhengig

Før trodde man at tilsetning av høye konsentrasjoner av CbpD ikke hadde betydning for mengde cellelysering. Man trodde at cirka 30 % lysering var det maksimalt oppnåelige, uansett om mengde CbpD ble økt over det som normalt blir produsert av angripercellene (Eldholm et al., 2010; Johnsborg et al., 2008). Dette ble også sett da Dr. Daniel Straume (upublisert data) testet effektiviteten av rensert CbpD<sup>Spn</sup> (1 µg/ml) mot celler av pneumokokker. Da vi derimot i dette arbeidet utførte vekstforsøk hvor det ble tilsatt ulike mengder CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>, så man at mengde cellelysering er avhengig av konsentrasjon CbpD som tilsettes. Den tidligere teorien om at lysering forårsaket av CbpD ikke er doseavhengig, kunne dermed avkreftes.

## Diskusjon

Det ble laget tofoldsfortynninger av rensset CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> for å teste mengde enzym som skulle til for å lysere *S. pneumoniae* RH17 (Figur 4.6). For å lysere cirka 100 % av pneumokokkene ble det tilsatt 8,330 µg/ml CbpD<sup>B6</sup> og 2,000 µg/ml CbpD<sup>Uo5</sup>. For å lysere cirka 30 % av pneumokokkene ble det tilsatt 0,260 µg/ml CbpD<sup>B6</sup> og 0,125 µg/ml CbpD<sup>Uo5</sup>. Det trengs altså mindre CbpD<sup>Uo5</sup> enn CbpD<sup>B6</sup> for å oppnå lik mengde lysering av *S. pneumoniae* RH17, og dermed er CbpD<sup>Uo5</sup> mer effektiv enn CbpD<sup>B6</sup> mot denne stammen. En årsak til dette kan være at CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> har ganske ulike SH3b-domener (for en aminosyresammenstilling av disse CbpDene, se Figur 4.1). SH3b-domenet til CbpD<sup>B6</sup> er mest homologt med det første av SH3b-domenene til CbpD<sup>Spn</sup>, mens SH3b-domenet til CbpD<sup>Uo5</sup> har mest homologi med det andre SH3b-domenet til CbpD<sup>Spn</sup>. En annen årsak til at CbpD<sup>Uo5</sup> var mer effektiv enn CbpD<sup>B6</sup>, kan være proteinets innhold av kolin. Siden CbpD<sup>Uo5</sup> felte ut under dialyse, måtte vi beholde kolin i proteinløsningen. Tilstedeværelsen av kolin kan ha titrert bort andre kolinbindende proteiner fra celleoverflaten, slik at CbpD<sup>Uo5</sup> fikk en lettere tilgang til teikoinsyrene i peptidoglykanet hos streptokokkene.

I løpet av tiden dette arbeidet har pågått, så vi imidlertid at aktiviteten til CbpD<sup>Uo5</sup> ble svekket. Da vi først utførte titreringsforsøk med CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>, hadde CbpD<sup>Uo5</sup> størst lyseringseffektivitet mot *S. pneumoniae* av de to enzymene (Figur 4.6). Da vi testet aktiviteten til de to enzymene ved senere anledninger (Figur 4.8 og 4.10), var det imidlertid CbpD<sup>B6</sup> som hadde best lyseringsevne mot *S. pneumoniae*. Dette kan tyde på at CbpD<sup>Uo5</sup> sin aktivitet svekkes ved lagring over tid, slik som med CbpD<sup>Spn</sup> (upublisert data, Dr. Daniel Straume). Grunnen til at det svekkes over tid, er sannsynligvis fordi at proteinet ikke tåler langtids frysing grunnet oksidering av cystein i det aktive setet, som nevnt ovenfor.

### 5.3 *S. pneumoniae* sin immunitetsdannelse mot CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>

Det er kjent at CbpD<sup>Spn</sup> lyserer ikke-kompetente pneumokokker og andre nært beslektede streptokokker, som *S. mitis* og *S. oralis* (Eldholm et al., 2010; Johnsborg et al., 2008; Steinmoen, Teigen, & Håvarstein, 2003). Pneumokokken som produserer CbpD er immun mot sitt eget CbpD fordi den uttrykker immunitetsproteinene ComM. Det er vist at maksimal ekspresjon av ComM oppnås mellom fem og ti minutter etter kompetanseinduksjon. Dermed oppnår de kompetente cellene immunitet før produksjon av CbpD starter (Peterson et al., 2004; Straume et al., 2017). I dette arbeidet viste vi at ComM som *S. pneumoniae* uttrykker under kompetanse, gir immunitet mot CbpD fra både *S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5 (Figur 4.7). Dette



viser at spesifisiteten til ComM ikke er smalspektret ved kun å gi immunitet mot CbpD fra *S. pneumoniae*, men at proteinet også gir immunitet og beskytter pneumokokkene mot CbpD fra andre arter. ComM er lokalisert i cellemembranen, mens CbpD binder til celleoverflaten (peptidoglykanet) (Eldholm et al., 2010). Dette indikerer at ComM ikke gir immunitet ved direkte å interagere med CbpD, men heller ved for eksempel å innføre modifikasjoner i peptidoglykanet på en måte som gjør at CbpD ikke lenger kan lage kutt i celleveggen. Siden ComM fra *S. pneumoniae* beskytter mot CbpD fra andre arter (som vist i Figur 4.7), kan det se ut til at denne immunitetsmekanismen er konservert blant streptokokker som produserer liknende CbpDer. Vanligvis lever disse streptokokkene i biofilmer i munn og svelg hos mennesker og dyr (Kilian et al., 2008), og resultatet i dette arbeidet viser at ulike streptokokkarter som lever i nærheten av hverandre, og som er kompetente, kan bli immune mot andre arters CbpDer.

I tillegg ønsket vi å finne ut hvor lenge pneumokokkene er immune etter kompetanseinduksjon. Vi induserte *S. pneumoniae* RH17 ( $\Delta cbpD^{Spn}$ ) til kompetanse og tilsatte CbpD<sup>B6/Uo5</sup> ved ulike tidspunkter etter kompetanseinduksjon (Figur 4.7). Ved tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> som gir cirka 30 % lysering, er de kompetanseinduserte cellene som forventet helt immune etter fem minutter. Til vår overraskelse var cellene også immune en time etter kompetanseinduksjon, og til og med litt immune etter to timer. Ved tilsetning av CbpD<sup>Uo5</sup> som gir cirka 30 % lysering, er cellene helt immune fra ti til tretti minutter etter kompetanseinduksjon. I tillegg er de fremdeles ganske immune en og to timer etter kompetanseinduksjon. Da det tidligere ble vist at nedbryting av immunitetsproteinene ComM starter ti minutter etter kompetanseinduksjon, altså før produksjon av CbpD har nådd sin topp, ble det spekulert i om ComM ikke nødvendigvis må være tilstede i cellene for at de skal være immune mot CbpD (Straume et al., 2017). Resultatene i dette arbeidet bekrefter denne teorien da *S. pneumoniae* fremdeles er noe immune mot CbpD oppimot to timer etter kompetanseinduksjon (Figur 4.7). Dette er altså mer enn en og en halv timer etter at alt ComM er borte i cellene. Som Straume et al. (2017) diskuterte, er det mulig at ComM modifierer nysyntetisert peptidoglykan i septum, fordi det er vist at CbpD kutter her hos sensitive celler. Som nevnt ovenfor er ComM et integralt membranprotein (Eldholm et al., 2010), og siden CbpD angriper celleveggen til streptokokker fra utsiden, er også dette med på å indikere at disse to proteinene aldri har fysisk kontakt. Ut i fra resultatene i dette arbeidet kan det se ut til at disse eventuelle modifikasjonene som ComM fører til, varer utover i stasjonærfase (Figur 4.7).

## Diskusjon

Ved tilsetning av CbpD<sup>B6/Uo5</sup>-konsentrasjoner som gir cirka 100 % lysering hos ikke-kompetente pneumokokker, derimot, klarte cellene aldri å oppnå full immunitet. Likevel var lysering oppimot halvert mellom ti minutter og to timer hos de kompetanseinduserte cellene. Disse resultatene taler i mot hypotesen om at ComM modifierer celleveggen, siden immuniteten varer en og en halv timer etter at ComM er fjernet fra cellene. Det spekuleres derfor i om immunitetsmekanismen kan bestå av å frigjøre CbpD-hemmende komponenter til omgivelsene (for eksempel teikoinsyrer eller proteaser som degraderer CbpD), slik at CbpD ikke binder til celleoverflaten og får mulighet til å drepe cellen. Når det blir tilsatt store mengder CbpD-molekyler, klarer imidlertid ikke de immune cellene å produsere nok CbpD-hemmende komponenter, og noen av CbpD-molekylene binder til celleoverflaten. CbpD<sup>B6/Uo5</sup>-konsentrasjoner som resulterer i ~ 100 % lyseringsevne er derimot mye høyere enn det som produseres *in vivo* (Eldholm et al., 2009; Johnsborg et al., 2008), og det kan se ut til at pneumokokkene har utviklet en immunitetsmekanisme som bare gir immunitet mot akkurat mengde CbpD som produseres *in vivo*. Det at ~ 30 % av pneumokokkene lyserer ved eksponering for CbpD *in vivo*, vises også i Figur 4.12. Om det er CbpD-hemmende komponenter i mediet som gjør at cellene er immune under kompetanse, kan imidlertid undersøkes ved utbytting av vekstmediet. Hvis cellene fremdeles er immune etter utbytting av media, så tyder dette på at det ikke er noe i mediet som skaper immunitet, men at det er modifikasjoner i celleveggen.

Hvis det er modifikasjoner i peptidoglykanet som skaper immunitet, er det imidlertid forventet at immunitet ikke er avhengig av konsentrasjoner CbpD som tilsettes. Siden resultatene i dette arbeidet viser at immunitet avhenger av konsentrasjoner CbpD (Figur 4.7), står hypotesen om at det er CbpD-hemmende komponenter i vekstmediet som beskytter pneumokokkene mot CbpD sterkere enn hypotesen om modifikasjoner i peptidoglykanet. Likevel gjenstår det å verifisere denne immunitetsmekanismen eksperimentelt.

ComM bremser celledelingsprosessen (Straume et al., 2017), og en teori om hvorfor, er at CbpD kun angriper celler i aktiv deling. Siden kompetanse slås på under stress (Moreno-Gamez et al., 2016), kan det å angripe celler i aktiv deling forsikre de kompetente cellene at det kun frigjøres homologt DNA med gener som er fordelaktige i det stressende miljøet (som for eksempel gener for antibiotikaresistens ved eksponering for antibiotika). I dette arbeidet var pneumokokkene i starten av stasjonærfase da vi tilsatte CbpD<sup>B6/Uo5</sup> to timer etter kompetanseinduksjon. To timer etter kompetanseinduksjon er cellene fremdeles til dels immune mot CbpD<sup>B6/Uo5</sup>, mens cellene

som ikke er kompetanseinduserte lyserer betydelig mer (Figur 4.7). Dette svekker dermed teorien om at CbpD kun angriper celler i aktiv deling.

### 5.3.1 Har polysakkaridkapsel hos målcellen betydning for immunitet mot CbpD?

De fleste stammer av *S. pneumoniae* har en polysakkaridkapsel som omslutter cellen, og som ofte er assosiert med virulente stammer av streptokokker (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). Siden polysakkaridkapselen befinner seg på utsiden av celleveggen, ønsket vi å undersøke om kapselen har betydning for hvor effektivt CbpD lyserer ikke-kompetente celler. CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> ble dermed tilsatt til stammer av *S. pneumoniae* både med og uten polysakkaridkapsel, men det var ingen forskjell i lysering (Figur 4.10). Ut i fra våre resultater ser det derfor ikke ut til at polysakkaridkapselen hindrer CbpD i å nå sine substrater i celleveggen. Den biologiske effekten av dette er at kapsel-gener spres like lett som andre gener blant stammer av *S. pneumoniae*, noe som kan være utfordrende når det kommer til vaksinasjon mot *S. pneumoniae* (se seksjon 1.1.2) (Straume et al., 2015).

### 5.4 CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> sine lyseringsevner mot ulike streptokokkarter

CbpD fra *S. pneumoniae* lyserer andre nært beslektede streptokokker, i tillegg til ikke-kompetente pneumokokker (Johnsborg et al., 2008). Vi ønsket å teste om dette også gjaldt for CbpD rensset fra *S. mitis* og *S. oralis*. Vi undersøkte aktiviteten til CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> mot ulike streptokokkarter både ved vekstforsøk *in vitro* og ved zymografi. Sensitivitet for CbpD<sup>B6/Uo5</sup> ble testet for følgende stammer: *S. mitis* B6, *S. mitis* Sk142, *S. oralis* Uo5, *S. oralis* Sk610, *S. pneumoniae* RH425/RH14 og *S. thermophilus* LMG18311.

Målceller har bestemte komponenter på celleoverflaten og/eller i celleveggen som gjenkjennes av CbpD. Man vet at CbpD binder til kolin på teikoinesyrene i celleveggen hos målcellene, for å feste seg til celleoverflaten (Eldholm et al., 2010), og at det bare er et lite antall arter som har teikoin syrer dekket med fosforylkolin. Flere streptokokker i den fylogenetiske gruppen mitis, som *S. mitis* og *S. oralis* samt *S. pneumoniae*, har kolindekkede teikoin syrer (Denapaite et al., 2012). Siden det er vist før at CbpD<sup>Spn</sup> binder til og lyserer *S. mitis* og *S. oralis* (Johnsborg et al., 2008), testet vi CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> mot to stammer av *S. mitis* og to stammer av *S. oralis*. I tillegg visste vi at CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> binder til og lyserer *S. pneumoniae* (Figur 4.5, 4.6 og 4.7), og derfor brukte vi denne som en positiv kontroll i forsøkene. På grunn av at *S.*

## Diskusjon

*thermophilus* ikke har kolindekkede teikoinsyrer i celleveggen, samt er mindre beslektet med *S. pneumoniae*, *S. mitis* og *S. oralis*, brukte vi denne som negativ kontroll.

I vekstforsøkene (Figur 4.8) var både *S. mitis* Sk142 og *S. oralis* Sk610 litt sensitive for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>. *S. mitis* B6 var kun sensitiv for CbpD<sup>B6</sup>, og *S. oralis* Uo5 var ikke sensitiv for noen av CbpDene. Det betyr at den ikke er sensitiv for sitt eget CbpD. *S. oralis* Uo5 uttrykker imidlertid to CbpD-paraloger (Gisch et al., 2015), og kanskje den andre CbpDen, som vi ikke har rensset, ville fungert bedre for å lysere *S. oralis* Uo5. Av *S. pneumoniae* RH425 lyserte cirka 100 % av cellene ved eksponering for CbpD<sup>B6</sup>, og cirka 50 % av cellene ved eksponering for CbpD<sup>Uo5</sup>. Som forventet, lyserte ingen av *S. thermophilus* cellene ved tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>Uo5</sup>. Grunnen til at CbpD<sup>B6</sup> var mer effektiv mot noen av streptokokkartene enn CbpD<sup>Uo5</sup> (spesielt mot *S. pneumoniae* RH425), kan være at CbpD<sup>Uo5</sup> tilsettes i en lavere konsentrasjon enn CbpD<sup>B6</sup> (CbpD<sup>Uo5</sup>, maks. = 2 µg/ml; CbpD<sup>B6</sup>, maks. = 8,33 µg/ml). I de første vekstforsøkene som ble utført i dette arbeidet, observerte vi likevel at CbpD<sup>Uo5</sup> lyserte flere *S. pneumoniae* celler enn CbpD<sup>B6</sup> gjorde, til tross for at CbpD<sup>Uo5</sup> hadde en lavere konsentrasjon (Figur 4.6). Derfor kan det se ut til at den egentlige grunnen til at CbpD<sup>Uo5</sup> er mindre effektiv enn CbpD<sup>B6</sup> mot noen av streptokokkartene, er at dens aktivitet er blitt svekket ved lagring over tid (se seksjon 5.2, hvor dette diskuteres).

Ut i fra zymogrammene (Figur 4.9) er både *S. pneumoniae* RH14, *S. mitis* Sk142, *S. mitis* B6 og *S. oralis* Sk610 sensitive for CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup>, mens *S. oralis* Uo5 kun var sensitiv for CbpD<sup>B6</sup>. *S. pneumoniae* RH14 og *S. oralis* Sk610 så ut til å være mest sensitiv for begge CbpDene, etterfulgt av *S. mitis* Sk142 og *S. mitis* B6. Siden det i zymogrammene ble tilsatt like konsentrasjoner av begge CbpDene, bekrefter dette at CbpD<sup>Uo5</sup> sin aktivitet er svekket ved lagring over tid (se ovenfor). Som forventet lyserte ingen av *S. thermophilus* cellene ved tilsetning av CbpD<sup>B6</sup> eller CbpD<sup>Uo5</sup>.

*S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5 er begge høyresistente for penicillin, mens *S. mitis* Sk142 og *S. oralis* Sk610 er lavresistente for penicillin (Sauerbier, Maurer, Rieger, & Hakenbeck, 2012; Todorova et al., 2015). Kanskje kan dette ha noe med å gjøre at de to penicillinsensitive stammene også er mer sensitive for CbpD<sup>B6/Uo5</sup> på grunn av at de lavaffinitets PBPene gir en annerledes cellevegg (Zapun, Contreras-Martel, et al., 2008). Dette er kun spekulasjoner, og for å undersøke dette nærmere bør det testes for mange flere stammer av streptokokker.

Hvilke streptokokkarter som er sensitive for CbpD<sup>B6/Uo5</sup> samstemmer bra i de to metodene som er brukt (vekstforsøk og zymografi), men det ser ut til at det forekommer mer lysing ved bruk av zymografi enn ved vekstforsøk *in vitro*. En grunn til dette kan være at CbpD blir oppkonsentrert i spesifikke bånd i zymogrammene. I tillegg får CbpD<sup>B6/Uo5</sup> virke på døde celler over lang tid i zymogrammene, i motsetning til vekstforsøkene hvor enzym blir tilsatt levende celler som har mulighet til å vokse videre ved subletale konsentrasjoner av CbpD. Likevel er det vanskelig å sammenligne de to metodene da lysing i zymogrammene kun blir inpsisert visuelt (Leclerc & Asselin, 1989), mens det i vekstforsøk ved bruk av mikroplateleser blir målt celletetthet ved 550 nm (se seksjon 3.11).

I dette arbeidet bekreftet vi at fratrisid er en mekanisme som *S. pneumoniae* og andre streptokokker kan bruke for også å lysere andre streptokokkarter, i tillegg til streptokokker av egen art, for å få tilgang til homologt DNA. Ved tilgang til nytt homologt DNA, vil *S. pneumoniae* for eksempel kunne bli penicillinresistente. Dette er en stor fordel for pneumokokkene ved overlevelse under eksponering for antibiotika (Straume et al., 2015).

## 5.5 Identifikasjon av CbpDs kuttsete i peptidoglykanet

I mange år er det forsøkt å finne ut hvor i celleveggen til *S. pneumoniae* CbpD kutter, men kuttsetet er fremdeles ikke identifisert. Basert på den lytiske effekten CbpD har på sensitive målceller (både i biofilmer, i zymogrammer og i flytende cellekulturer), og at det er kjent at en rekke andre proteiner med CHAP-domener kutter i peptidkryssbindinger i peptidoglykanet hos bakterier (Bateman & Rawlings, 2003), tror man at dette også gjelder CbpD. I dette arbeidet klarte man for første gang å rense store mengder aktivt CbpD, og vi ønsket derfor å benytte dette enzymet til å identifisere hvilke(t) bånd i celleveggen som CbpD kutter.

Cellevegg fra *S. pneumoniae* (villtype) ble rensset, og deretter inkubert med rensset CbpD<sup>B6</sup> under ulike reaksjonsbetingelser (ulike pH-verdier med eller uten reduktanten DTT). Deteksjon av komponenter som CbpD<sup>B6</sup> eventuelt hadde kuttet ut fra celleveggen ble gjort ved bruk av HPLC (Figur 4.13). Hvis det har forekommet kutt i celleveggen vil man kunne se nye toppen eller forflytning av toppene i HPLC-kromatogrammene. Dette så vi ikke i noen av kromatogrammene, og det kan derfor se ut til at CbpD<sup>B6</sup> ikke har kuttet ut noen komponenter fra celleveggen. Likevel kan det hende vi ikke klarte å påvise kutt ved bruk av HPLC, fordi metoden ikke er sensitiv nok. I cellevegg hvor det var tilsatt DTT var det kommet to toppen i

## Diskusjon

HPLC-kromatogrammene, men disse toppene var også å se i kontrollen, og er av uvisst grunn forårsaket av DTT, og ikke på grunn av celleveggskutt.

Siden vi ikke klarte å detektere kutt i cellevegg ved inkubasjon med CbpD<sup>B6</sup>, mistenkte vi CbpD for å ha endopeptidaseaktivitet. Hvis dette stemmer, vil ikke CbpD kutte ut biter fra peptidoglykanet, som lar seg påvise ved bruk av HPLC. For å verifisere om CbpD har endopeptidaseaktivitet, forsøkte vi å teste aktiviteten til CbpD mot rensede stempeptider (Figur 4.14 og 4.15). Som for forsøkene med cellevegg, klarte vi heller ikke i de utvalgte stempeptidene å detektere kutt forårsaket av CbpD<sup>B6</sup>. En årsak til dette, kan være at CbpD<sup>B6</sup> ikke klarer å binde seg til stempeptidene når resten av celleveggen er borte. For at CHAP-domenet skal kunne posisjoneres riktig i forhold til sitt kuttsete i peptidoglykanet, trenger trolig SH3b-domenet og CBD å binde til komponenter i celleveggen. Tidligere er det nemlig vist at CHAP-domenet hos proteinet PcsB (protein som er viktig i celledeling hos *S. pneumoniae*) ligger gjemt mellom andre domener i proteinet for ikke å kunne kutte ukontrollert i celleveggen (Bartual et al., 2014). Det kan derfor tenkes at CbpD sitt CHAP-domene også er foldet inn mot midten av proteinet, og må gjennomgå en konformasjonsendring for å utføre sin enzymatiske aktivitet. Kanskje er CbpD sitt CHAP-domene avhengig av at SH3b-domenet(ene) og CBD binder til sine celleveggskomponenter for at det skal skje en konformasjonsendring i proteinet, som dermed aktiverer CHAP. Et mulig forsøk som kunne vært testet er å rense CHAP-domenet alene, for å inkubere dette med de ulike stempeptidene. Et annet forsøk som kan gjøres er å inkubere CbpD sammen med både rensset peptidoglykan og rensede stempeptider. Da ville kanskje CbpD binde til teikoinisyrene i peptidoglykanet slik at enzymet kan aktiveres, og det «frie» CHAP-domenet deretter kan kutte de rensede stempeptidene som er tilsatt i reaksjonen.

Grunnen til at vi ikke klarte å detektere kutt i cellevegg av CbpD<sup>B6</sup> kan også være at vi benyttet feil inkubasjonsbetingelser, som pH og temperatur, eller at vi valgte ut feil stempeptider. Stempeptidene i peptidoglykanet hos *S. pneumoniae* finnes i mange ulike kombinasjoner (Garcia-Bustos et al., 1987). Hvis CbpD er veldig spesifikk og kutter en binding i ett eller få stempeptider, kan det være at proteinet kutter i andre stempeptider enn de seks vi valgte oss ut. Det kan også være at CbpD kutter av såpass lite av stempeptidene, som for eksempel kun en aminosyre i et lite utvalg stempeptider, og at man dermed ikke klarer å detektere dette ved bruk av HPLC. Selv om det er lite sannsynlig, kan en annen forklaring være at ikke CbpD kutter i stempeptidene i peptidoglykanet hos *S. pneumoniae*. Hvis dette stemmer, kan det tenkes at

CbpD heller kutter essensielle proteiner i celleveggen, og at det er dette som gjør at cellene lyserer. Likevel er dette usannsynlig da mange andre proteiner med CHAP-domener kutter bindinger i interpeptidbroer i peptidoglykanet hos bakterier (Bateman & Rawlings, 2003).

## 6. Konklusjon og fremtidige perspektiver

Fratrisidmekanismen gjør det mulig for *S. pneumoniae* å få bedre tilgang på homologt DNA som den kan ta opp for å etablere nye egenskaper i form av for eksempel penicillinresistens og virulensfaktorer (Berg, Bjørnstad, et al., 2012). Strategier for å begrense spredning av disse genene er ønskelig, men for å få idéer som kan bidra til dette, trenger man grunnleggende forståelse av hvordan denne mekanismen foregår. Siden CbpD er et nøkkelenzym i fratrisidmekanismen hos *S. pneumoniae* (Eldholm et al., 2010), ønsket vi i dette arbeidet å overuttrykke og rense CbpD i en løselig form, noe som tidligere ikke er blitt gjort. Ettersom CbpD fra *S. pneumoniae* er vanskelig å rense og å arbeide med, renset vi i stedet to CbpD<sup>Spn</sup>-homologer: CbpD fra *S. mitis* B6 og CbpD fra *S. oralis* Uo5. Dette fordi proteinhomologer med små forskjeller i aminosyresekvens i mange tilfeller kan være lettere å rense (se resultatdelen).

I dette arbeidet har vi klart å overuttrykke og rense CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> i en løselig form, samt funnet optimale oppbevaringsmetoder for CbpD<sup>B6</sup>. Gode oppbevaringsmetoder er viktig for langtidslagring av protein slik at man ikke skal måtte rense protein på nytt for hver gang det skal brukes i analyser. Tidligere forsøk i å rense store mengder CbpD<sup>Spn</sup> har vært mislykkede (upublisert data, Dr. Daniel Straume). At vi i dette arbeidet har klart å rense store mengder (mg) CbpD er et stort fremskritt for forskning på CbpD og fratrisidmekanismen hos *S. pneumoniae* og andre streptokokker.

I tillegg til at vi har renset løselige og funksjonelle CbpD-proteiner, har vi i dette arbeidet vist at *S. pneumoniae* sitt immunitetsprotein, ComM, gir immunitet mot CbpD fra andre streptokokkarter (*S. mitis* B6 og *S. oralis* Uo5), samt at immunitet varer lenger enn man tidligere har trodd (Straume et al., 2017). For å verifisere om det er CbpD-hemmende komponenter som frigjøres til vekstmediet av ComM (for eksempel proteaser eller teikoinsyrer som kan binde til CbpD utenfor celleoverflaten), kunne man i videre forsøk byttet ut mediet til cellene i løpet av vekstforsøkene. Hvis pneumokokkene fremdeles er immune etter utbytting av mediet, tyder dette på at det er ComM-modifikasjoner i celleveggen som er årsaken til at CbpD ikke klarer å lysere cellene. I dette arbeidet har vi også vist at CbpD<sup>B6</sup> og CbpD<sup>Uo5</sup> lyserer flere ulike streptokokkarter, som betyr at gener kan overføres mellom ulike streptokokkarter, og ikke bare mellom streptokokker av samme art. Det er tidligere også vist at dette gjelder CbpD fra *S. pneumoniae* (Eldholm et al., 2009; Eldholm et al., 2010).



Det vi derimot ikke klarte å løse i dette arbeidet, var å identifisere kuttet til CbpD i peptidoglykanet hos *S. pneumoniae*. Som nevnt i diskusjonsdelen kan årsaken til at vi ikke klarte å kutte isolerte stempeptider med CbpD<sup>B6</sup> være fordi det katalytiske CHAP-domenet kun aktiveres når SH3b-domenet og CBD binder til sine celleveggskomponenter. Siden ikke disse er tilstede i de rensede stempeptidene klarer enzymet dermed ikke å kutte. I fremtidige eksperimenter kan man derfor forsøke å rense kun CHAP-domenet fra CbpD<sup>B6/U05</sup>, og inkubere dette med de ulike stempeptidene. Siden SH3b-domenet og CBD da er fjernet, vil ikke disse domenene hindre CHAP-domenet i å kunne binde seg. En annen mulig forklaring på at vi ikke klarer å detektere kutt i peptidoglykan hos *S. pneumoniae* med CbpD<sup>B6</sup>, kan være at CbpD ikke kutter i peptidoglykanet som vi tror. Det kan være at CbpD kløyver bindinger i essensielle celleveggsproteiner, som resulterer i lysing av cellene. I videre forsøk kunne det derfor også være aktuelt å isolere slike celleveggsproteiner for å inkubere dem med CbpD.

I løpet av tiden dette arbeidet har pågått, har vi heller ikke klart å løse krystallstrukturen til CbpD<sup>B6</sup>. Krystallstrukturen til proteinet kunne vist oss om CHAP-domenet er gjemt mellom de andre domenene i CbpD, og vært avgjørende for mulige substrater som kan testes videre biokjemisk. Det å løse krystallstrukturen til CbpD<sup>B6</sup> vil altså være et enormt fremskritt i forskningen på dette enzymet, og arbeidet med å løse strukturen vil dermed fortsette i tiden fremover.

## Referanser

- Alhamdi, Y., Neill, D. R., Abrams, S. T., Malak, H. A., Yahya, R., Barrett-Jolley, R., . . . Toh, C.-H. (2015). Circulating pneumolysin is a potent inducer of cardiac injury during pneumococcal infection. *PLoS Pathog*, *11*(5), e1004836.
- Amersham Pharmacia Biotech. *Gel filtration, principles and methods*. Uppsala, Sweden.
- Amersham Pharmacia Biotech. *Ion exchange chromatography, principles and methods*. Sweden.
- Attaiech, L., Olivier, A., Mortier-Barrière, I., Soulet, A.-L., Granadel, C., Martin, B., . . . Claverys, J.-P. (2011). Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: Maintenance of a reservoir for genetic plasticity. *PLoS genetics*, *7*(6), e1002156.
- Austrian, R. (1981). Pneumococcus: The first one hundred years. *Reviews of infectious diseases*, *3*(2), 183-189.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of experimental medicine*, *79*(2), 137-158.
- Bartual, S. G., Straume, D., Stamsås, G. A., Muñoz, I. G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., . . . Hermoso, J. A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature communications*, *5*, 3842.
- Bateman, A., & Rawlings, N. D. (2003). The CHAP domain: A large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends in biochemical sciences*, *28*(5), 234-237.
- Behr, T., Fischer, W., Peter-Katalinić, J., & Egge, H. (1992). The structure of pneumococcal lipoteichoic acid. *The FEBS Journal*, *207*(3), 1063-1075.
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., & Veening, J.-W. (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(15), E905-E913.
- 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., Ohnstad, H. S., & Håvarstein, L. S. (2012). LytF, a novel competence-regulated murein hydrolase in the genus *Streptococcus*. *Journal of bacteriology*, *194*(3), 627-635.
- 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.
- Bergé, M. J., Mercy, C., Mortier-Barrière, I., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Grangeasse, C., . . . Campo, N. (2017). A programmed cell division delay preserves genome integrity during natural genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature communications*, *8*(1), 1621.
- Bisson-Filho, A. W., Hsu, Y.-P., Squyres, G. R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., . . . VanNieuwenhze, M. S. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, *355*(6326), 739-743.

- Bogaert, D., de Groot, R., & Hermans, P. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *The Lancet infectious diseases*, 4(3), 144-154.
- Brueggemann, A. B., Pai, R., Crook, D. W., & Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the united states. *PLoS Pathogens*, 3(11), e168.
- Brundish, D., & Baddiley, J. (1968). Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochemical Journal*, 110(3), 573-582.
- Bui, N. K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., . . . Vollmer, W. (2012). Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Analytical biochemistry*, 421(2), 657-666.
- Cabeen, M. T., & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 601-610.
- Cassone, M., Gagne, A. L., Spruce, L. A., Seeholzer, S. H., & Seibert, M. E. (2012). The HtrA protease from *Streptococcus pneumoniae* digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38449-38459.
- Chi, F., Nolte, O., Bergmann, C., Ip, M., & Hakenbeck, R. (2007). Crossing the barrier: Evolution and spread of a major class of mosaic PBP2x in *Streptococcus pneumoniae*, s. Mitis and s. Oralis. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(7), 503-512.
- Crisóstomo, M. I., Vollmer, W., Kharat, A. S., Inhülsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S., & Tomasz, A. (2006). Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 61(6), 1497-1509.
- Dawson, M. H., & Sia, R. H. (1931). *In vitro* transformation of pneumococcal types: I. A technique for inducing transformation of pneumococcal types *in vitro*. *The Journal of experimental medicine*, 54(5), 681.
- 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.
- Dowson, C. G., Coffey, T. J., Kell, C., & Whiley, R. A. (1993). Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2b in *S. pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 9(3), 635-643.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H. S., & Håvarstein, L. S. (2009). Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: Contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology*, 155(7), 2223-2234.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H. S., Berg, K. H., Hermoso, J. A., & Håvarstein, L. S. (2010). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Molecular microbiology*, 76(4), 905-917.
- Erickson, H. P., Anderson, D. E., & Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: Cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 504-528.
- Fernebro, J., Andersson, I., Sublett, J., Morfeldt, E., Novak, R., Tuomanen, E., . . . Normark, B. H. (2004). Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects

- spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. *The Journal of infectious diseases*, 189(2), 328-338.
- Fischer, W., Behr, T., Hartmann, R., Peter-Katalinić, J., & Egge, H. (1993). Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. *The FEBS Journal*, 215(3), 851-857.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., . . . Soufi, B. (2014). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs divIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS genetics*, 10(4), e1004275.
- Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. D. (2011). *Molecular ecology*. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Garcia-Bustos, J., Chait, B. T., & Tomasz, A. (1987). Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 262(32), 15400-15405.
- GE Healthcare Life Sciences. (2012). Hydrophobic interaction chromatography (HIC) - selection guide. Uppsala, Sverige: General Electric Company.
- Gisch, N., Kohler, T., Ulmer, A. J., Müthing, J., Pribyl, T., Fischer, K., . . . Zähringer, U. (2013). Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *Journal of biological chemistry*, 288(22), 15654-15667.
- Gisch, N., Schwudke, D., Thomsen, S., Heß, N., Hakenbeck, R., & Denapaite, D. (2015). Lipoteichoic acid of *Streptococcus oralis* Uo5: A novel biochemical structure comprising an unusual phosphorylcholine substitution pattern compared to *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific reports*, 5, 16718.
- Golubchik, T., Brueggemann, A. B., Street, T., Gertz Jr, R. E., Spencer, C. C., Ho, T., . . . Beall, B. (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nature genetics*, 44(3), 352-355.
- Greibrokk, T., Lundanes, E., & Rasmussen, K. E. (1994). *Kromatografi*. Oslo: Universitetsforlaget.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *Epidemiology & Infection*, 27(2), 113-159.
- Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., & Claverys, J.-P. (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: Genetic requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8710-8715.
- Hackel, M., Lascols, C., Bouchillon, S., Hilton, B., Morgenstern, D., & Purdy, J. (2013). Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine*, 31(42), 4881-4887.
- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D., & Brückner, R. (2009). Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS microbiology reviews*, 33(3), 572-586.
- Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W. J., . . . Ehrlich, G. D. (2008). Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase

- treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC microbiology*, 8(1), 173.
- Hardie, J., & Whiley, R. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 83(S1).
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(7), a010215.
- Hoskins, J., Alborn, W. E., Arnold, J., Blaszczyk, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., . . . Fuller, W. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of bacteriology*, 183(19), 5709-5717.
- Howard, L. V., & Gooder, H. (1974). Specificity of the autolysin of *Streptococcus* (diplococcus) *pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 117(2), 796-804.
- Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F., & Morrison, D. A. (1996). Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Molecular microbiology*, 21(4), 863-869.
- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., & Claverys, J. P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: Relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Molecular microbiology*, 59(4), 1297-1037.
- Jennings, H. J., Lugowski, C., & Young, N. M. (1980). Structure of the complex polysaccharide C-substance from *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Biochemistry*, 19(20), 4712-4719.
- Jensen, A., Scholz, C. F., & Kilian, M. (2016). Re-evaluation of the taxonomy of the mitis group of the genus *Streptococcus* based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of *Streptococcus dentisani* as *Streptococcus oralis* subsp. *Dentisani* comb. Nov., *Streptococcus tigurinus* as *Streptococcus oralis* subsp. *Tigurinus* comb. Nov., and *Streptococcus oligofermentans* as a later synonym of *Streptococcus cristatus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4803-4820.
- 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.
- 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.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L. S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H., & Sørensen, U. B. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PloS one*, 3(7), e2683.

- Kilian, M., Riley, D. R., Jensen, A., Brüggemann, H., & Tettelin, H. (2014). Parallel evolution of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* to pathogenic and mutualistic lifestyles. *MBio*, 5(4), e01490-01414.
- Klugman, K. P. (2011). Contribution of vaccines to our understanding of pneumococcal disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1579), 2790-2798.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., . . . Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2), 95-125.
- Lacks, S., & Hotchkiss, R. D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *Biochimica et biophysica acta*, 39(3), 508-518.
- Land, A. D., & Winkler, M. E. (2011). The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *Journal of bacteriology*, 193(16), 4166-4179.
- Lara, B., Rico, A. I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., . . . Massidda, O. (2005). Cell division in cocci: Localization and properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA protein. *Molecular microbiology*, 55(3), 699-711.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- 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 pathogens*, 9(6), e1003473.
- Leclerc, D., & Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Canadian journal of microbiology*, 35(8), 749-753.
- Lesk, A. M. (2016). *Introduction to protein science*. Oxford: Oxford University Press.
- Llull, D., López, R., & García, E. (2006). SkI, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS letters*, 580(8), 1959-1964.
- Mansoor, M. A. (2015). Liquid chromatography. *eLS*, 1-7.
- Massidda, O., Nováková, L., & Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: How much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environmental microbiology*, 15(12), 3133-3157.
- Mavrici, D., Marakalala, M. J., Holton, J. M., Prigozhin, D. M., Gee, C. L., Zhang, Y. J., . . . Alber, T. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* FtsX extracellular domain activates the peptidoglycan hydrolase, RipC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(22), 8037-8042.
- McCullers, J. A., & Tuomanen, E. I. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci*, 6, D877-D889.
- Mirouze, N., Bergé, M. A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., . . . Polard, P. (2013). Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(11), E1035-E1044.

- Moffitt, K. L., & Malley, R. (2011). Next generation pneumococcal vaccines. *Current opinion in immunology*, 23(3), 407-413.
- Moks, T., Abrahmsén, L., Österlöf, B., Josephson, S., Östling, M., Enfors, S.-O., . . . Uhlén, M. (1987). Large-scale affinity purification of human insulin-like growth factor I from culture medium of *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 5(4), 379.
- Moreno-Gamez, S., Sorg, R., Kjos, M., Weissing, F., van Doorn, G. S., & Veening, J.-W. (2016). Quorum sensing integrates environmental cues, cell density and cell history to control bacterial competence. *bioRxiv*, 075762.
- Mortier-Barrière, I., De Saizieu, A., Claverys, J. P., & Martin, B. (1998). Competence-specific induction of RecA is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 27(1), 159-170.
- Moscoso, M., García, E., & López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: Role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of bacteriology*, 188(22), 7785-7795.
- 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.
- New England BioLabs. *PCR protocol for OneTaq® DNA polymerase*. Hentet 10.01.18, fra <https://www.neb.com/protocols/2012/10/11/onetaqdnapolymerasem0480>
- New England BioLabs. *PCR protocol for Phusion® High-Fidelity DNA polymerase*. Hentet 10.01.18, fra <https://www.neb.com/protocols/1/01/01/pcr-protocol-m0530>
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *nature*, 405(6784), 299.
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., . . . Tsegaye, G. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Molecular microbiology*, 51(4), 1051-1070.
- 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.
- Pritchard, D. G., Dong, S., Baker, J. R., & Engler, J. A. (2004). The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 150(7), 2079-2087.
- Pryor, E. E., Horanyi, P. S., Clark, K. M., Fedoriw, N., Connelly, S. M., Koszelak-Rosenblum, M., . . . Dumont, M. E. (2013). Structure of the integral membrane protein CAAX protease Ste24p. *Science*, 339(6127), 1600-1604.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001a). Protocol 1, agarose gel electrophoresis. I N. Irwin & K. A. Janssen (Red.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3 utg., Vol. 1, s. 5.4-5.13). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001b). Protocol 2, expression of cloned genes in *E. coli* using the bacteriophage T7 promoter. I N. Irwin & K. A. Janssen (Red.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3 utg., Vol. 3, s. 15.20-15.24). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez-Puelles, J. M., Sanz, J. M., Garcia, J. L., & Garcia, E. (1992). Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *The FEBS Journal*, 203(1-2), 153-159.
- 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.
- Sanz, J. M., Lopez, R., & Garcia, J. L. (1988). Structural requirements of choline derivatives for 'conversion' of pneumococcal amidase a new single-step procedure for purification of this autolysin. *FEBS letters*, 232(2), 308-312.
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., & Branny, P. (2007). Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 189(11), 4168-4179.
- Sauerbier, J., Maurer, P., Rieger, M., & Hakenbeck, R. (2012). *Streptococcus pneumoniae* R6 interspecies transformation: Genetic analysis of penicillin resistance determinants and genome-wide recombination events. *Molecular microbiology*, 86(3), 692-706.
- Scheffers, D.-J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 585-607.
- Sham, L.-T., Tsui, H.-C. T., Land, A. D., Barendt, S. M., & Winkler, M. E. (2012). Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Current opinion in microbiology*, 15(2), 194-203.
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135.
- Sibold, C., Henrichsen, J., König, A., Martin, C., Chalkley, L., & Hakenbeck, R. (1994). Mosaic PBPx genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from PBPx genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Molecular microbiology*, 12(6), 1013-1023.
- Slager, J., Aprianto, R., & Veening, J.-W. (2018). Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae* D39. *bioRxiv*, 283663.
- Steinmoen, H., Teigen, A., & Håvarstein, L. S. (2003). Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *Journal of bacteriology*, 185(24), 7176-7183.
- Stevens, K. E., Chang, D., Zwack, E. E., & Sebert, M. E. (2011). Competence in *Streptococcus pneumoniae* is regulated by the rate of ribosomal decoding errors. *MBio*, 2(5), e00071-00011.
- 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.
- Sung, C. K., & Morrison, D. A. (2005). Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 187(9), 3052-3061.
- Thermo Fisher Scientific. (2009). *Nanodrop 2000/2000c spectrophotometers - user manual*. Hentet 11.11.17, 2017, fra <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000>



- Todorova, K., Maurer, P., Rieger, M., Becker, T., Bui, N. K., Gray, J., . . . Hakenbeck, R. (2015). Transfer of penicillin resistance from *Streptococcus oralis* to *Streptococcus pneumoniae* identifies murE as resistance determinant. *Molecular microbiology*, 97(5), 866-880.
- Ton-That, H., Marraffini, L. A., & Schneewind, O. (2004). Protein sorting to the cell wall envelope of gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1-3), 269-278.
- Tovpeko, Y., Bai, J., & Morrison, D. A. (2016). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Mutations in  $\sigma^a$  bypass the ComW requirement for late gene expression. *Journal of bacteriology*, 198(17), 2370-2378.
- Tuomanen, E. I. (2000). Pathogenesis of pneumococcal inflammation: Otitis media. *Vaccine*, 19, S38-S40.
- van der Poll, T., & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet*, 374(9700), 1543-1556.
- Vollmer, W. (2007). Preparation and analysis of pneumococcal murein (peptidoglycan). I R. Hakenbeck & S. Chhatwal (Red.), *Molecular biology of streptococci* (s. 531-536). Wymondham, Norfolk U.K.: Horizon Bioscience.
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 149-167.
- Vollmer, W., & Tomasz, A. (2000). The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20496-20501.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., . . . Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The firmicutes*. Springer Science & Business Media.
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406-4412.
- Ween, O., Gaustad, P., & Håvarstein, L. S. (1999). Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 33(4), 817-827.
- 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.
- World Health Organization. (2016). *Pneumonia*. Hentet 02.01.18, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>
- Wyres, K. L., Lambertsen, L. M., Croucher, N. J., McGee, L., von Gottberg, A., Liñares, J., . . . Klugman, K. P. (2013). Pneumococcal capsular switching: A historical perspective. *Journal of Infectious Diseases*, 207(3), 439-449.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K. C., & Xiao, J. (2017). GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science*, 355(6326), 744-747.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 361-385.

## Referanser

Zapun, A., Vernet, T., & Pinho, M. G. (2008). The different shapes of cocci. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 345-360.

# Vedlegg

## Vedleggsinnhold

<b>Vedlegg A:</b> Kjemikalieliste.....	<b>I</b>
<b>Vedlegg B:</b> Ionebyttekromatografi og hydrofob interaksjons-kromatografi for rensing av CbpD <sup>B6</sup> .....	<b>IV</b>
<b>Vedlegg C:</b> Peptidoglykan isolert fra <i>S. pneumoniae</i> inkubert med CbpD <sup>U05</sup> .....	<b>V</b>
<b>Vedlegg D:</b> Forkortelser.....	<b>VI</b>

## Vedlegg A: Kjemikalieliste

**Tabell A.1 Kjemikalier.** Alfabetisk oversikt over kjemikalier som er benyttet i dette arbeidet, samt deres kjemiske formel, leverandør og produktnummer.

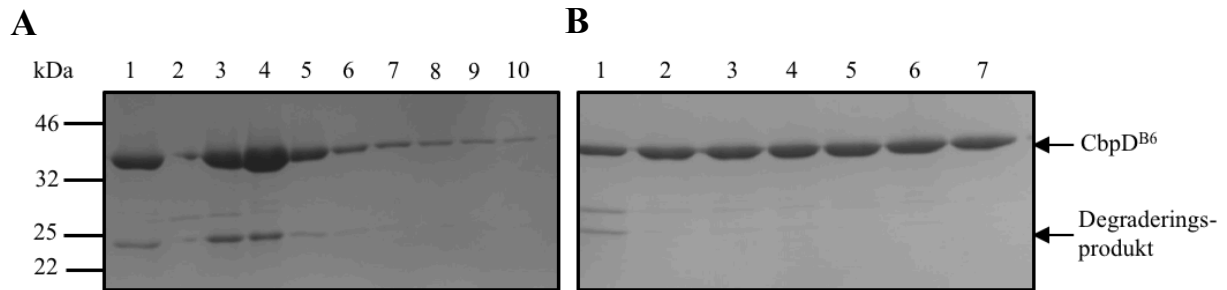
Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produkt- nummer
Acetonitril (ACN)	$C_2H_3N$	Sigma-Aldrich	34998
Agarose		VWR	20767.298
Akrylamid 4x (40 %) 37,5 : 1	$C_3H_5NO$	Saveen Werner	BIAC41
Aktivt kull	C	Merck	1.02184.1000
Albumin		Sigma-Aldrich	A7906
Ammonium persulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma-Aldrich	A3678
Bacto™ Casitone		BD Diagnostic Systems	225930
Bacto™ Tryptone		Oxoid	LP0042
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma-Aldrich	19606
Brilliant Blue	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9$ $S_3$	Sigma-Aldrich	B-7920
Bromfenolblå (3',3'',5',5''- Tetrabromophenolsulfonephthalei n)	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Sigma-Aldrich	B-5525
DEAE(diethylaminoethyl)- cellulose		Sigma-Aldrich	D3764
D(+)-Glukose	$C_6H_{12}O_6$	VWR	101176K
Di-Kaliumhydrogenfosfat	$K_2HPO_4$	Merck	1.05104.1000
Dinatriumhydrogenfosfat	$Na_2HPO_4$	Merck	1.06580.1000
DTT (DL-Dithiothreitol)	$C_4H_{10}O_2S_2$	Sigma-Aldrich	D0632-10G
Eddiksyre	$CH_3COOH$	Merck	1.00063.2500
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) dinatriumsalt dihydrat	$C_{10}H_{16}N_2Na_2O_8 \cdot$ $2H_2O$	VWR	20 296.360
Fosforsyre	$H_3PO_4$	Merck	749K02794373
Gjærekstrakt		Merck	1.03753.0500

Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produkt-nummer
Glysin	$C_2H_5NO_2$	Merck	1.04201.1000
Jernsulfat heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka	44970
Kaliumklorid	KCl	Merck	1.04936.1000
Kalsiumklorid dehydret	$CaCl_2$	Fluka	21075
Kalsium panthothenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma-Aldrich	C8731
Kobbersulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka	61240
Kolinklorid	$C_5H_{14}NO \cdot Cl$	Sigma-Aldrich	C1879
L-Aspargin monohydrate	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	A4284-100G
L-Cystein hydrogenklorid monohydrat	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka	30130
L-Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	Fluka	49419
Litiumklorid	LiCl	Sigma-Aldrich	62476
L-Tryptofan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Fluka	93660
Magnesiumklorid hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Fluka	63072
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Sigma-Aldrich	M2643
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Riedel-de Haën	31422
Metanol	$CH_2OH$	Merck	603-001-00-x
Natriumacetat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma-Aldrich	P8574
Natriumdihydrogenfosfat	$NaH_2PO_4$		
Natriumhydroksid	NaOH	Merck	1.06469.1000
Natriumklorid	NaCl	Merck	1.06404.1000
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma-Aldrich	P8574
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	Fluka	72309
peqGREEN		Saveen Werner	PEQL37-501
Pyridoxine hydroklorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Fluka	95180
Rektifisert sprit	$H_3CCH_2OH$	VWR	20824.365
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich	R-7649
Saltsyre	HCl	Riedel-de Haën	30721
SDS (sodium dodecyl sulfate)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	Fluka	05030
Sink sulfat heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka	96500
Sukrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	BHD	1027455C

## Vedlegg A

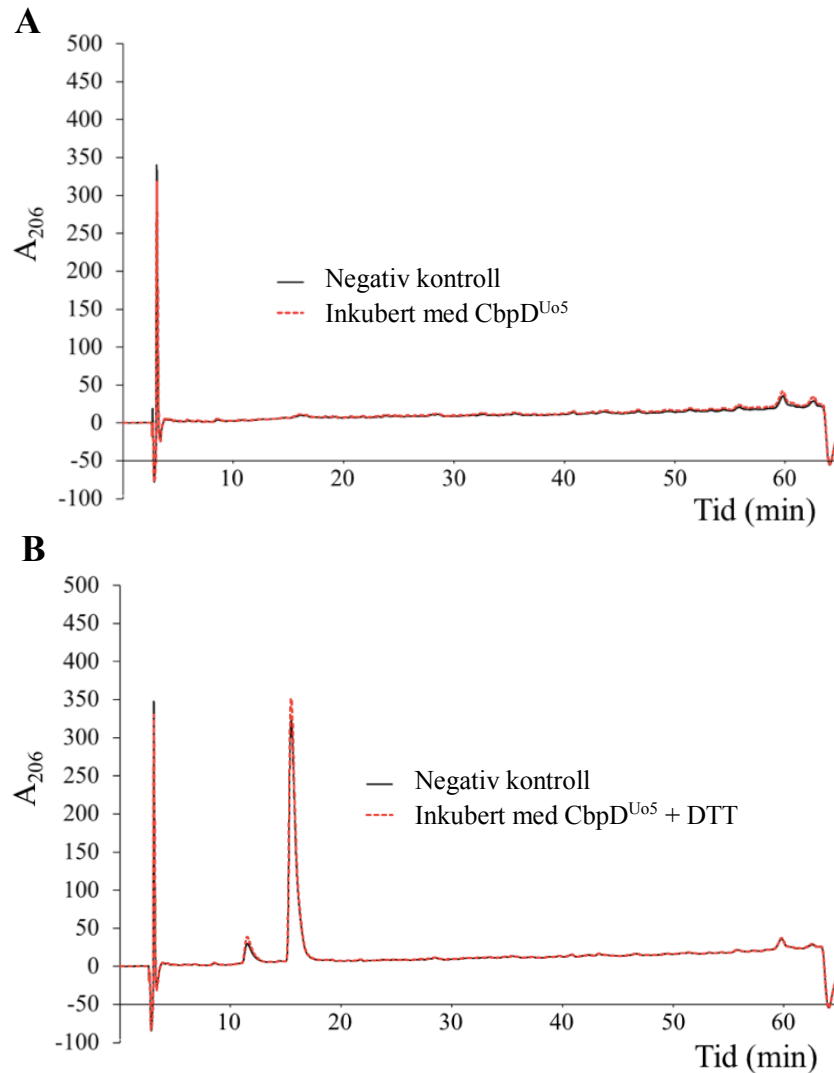
Navn	Kjemisk formel	Produsent	Produkt- nummer
Sytox™Green		Invitrogen	S7020
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	T9281
Tiamin hydroklorid	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS. HCl	Sigma-Aldrich	67038
Trifluoracetic acid (TFA)	C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	302031
Triton® X-100	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) )n (n = 9-10)	Sigma-Aldrich	X100
Trizma® base, minimum 99,9 % titration	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	T1503
Trypsin		BioChemika	93615
Uridin, Minimum 99 %	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich	U6381

## Vedlegg B: Ionebyttekromatografi og hydrofob interaksjonskromatografi for rensing av CbpD<sup>B6</sup>



**Figur B.1 Ionebyttekromatografi og hydrofob interaksjonskromatografi for å separere CbpD<sup>B6</sup> og degraderingsprodukt av CbpD<sup>B6</sup>.** **A)** Ionebyttekromatografi (IEC) for å forsøke og rens CbpD<sup>B6</sup> fra degraderingsproduktet: 1) CbpD<sup>B6</sup> før fjerning av kolin og salt og før IEC. 2) «Flowthrough» IEC. 3 - 10) Fraksjon 9 - 16 fra IEC. **B)** Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) for å forsøke og rens CbpD<sup>B6</sup> fra degraderingsproduktet: 1) «Flowthrough» ved loading av kolonnen. 2 - 8) Fraksjon 29 - 34 fra HIC.

## Vedlegg C: Peptidoglykan isolert fra *S. pneumoniae* inkubert med CbpD<sup>U05</sup>



**Figur C.1** Peptidoglykan isolert fra villtype *S. pneumoniae* inkubert med CbpD<sup>U05</sup>. HPLC-kromatogrammer som viser peptidoglykan inkubert med CbpD<sup>U05</sup> over natt ved 37°C og pH 7,0, både med (A) og uten 1 mM DTT (B).



## Vedlegg D: Forkortelser

**Tabell D.1 Forkortelser.** Liste over forkortelser som er mye benyttet i oppgaven.

CBD	Kolinbindende domene
CbpD	Kolinbindende protein D
CbpD <sup>B6</sup>	CbpD fra <i>S. mitis</i> B6
CbpD <sup>Spn</sup>	CbpD fra <i>S. pneumoniae</i>
CbpD <sup>Uo5</sup>	CbpD fra <i>S. oralis</i> Uo5
CHAP	Cystein, histidin-avhengig amidohydrolase/peptidase
SH3b	Src homologi 3b







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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway