



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020 30 stp**

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Celleveggankring av *Mycobacterium tuberculosis*- antigener på overflaten til *Lactobacillus plantarum***

Cell Wall Anchoring of *Mycobacterium tuberculosis*  
Antigens to the Surface of *Lactobacillus plantarum*

**Hanne Berggreen**

Master i Teknologi (siv.ing.) – Kjemi og bioteknologi



## **Forord**

Arbeidet som er presentert i denne oppgaven ble utført ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet med forsker Geir Mathiesen og professor Vincent Eijsink som veiledere.

Jeg vil takke alle som har hjulpet meg i arbeidet med denne oppgaven. Først og fremst vil jeg takke hovedveilederen min, Geir Mathiesen. Geir, din kunnskap og entusiasme for prosjektet har vært svært motiverende og til stor hjelp. Jeg vil også takke avdelingsingeniør Kamilla Wiull. Kamilla, en spesiell takk for din hjelp og veiledning på laboratoriet, for at du til enhver tid har vært tilgjengelig for å svare på mine spørsmål. Jeg vil videre takke resten av PEP-gruppen, og spesielt mine medstudenter Lene og Solveig for godt selskap på laboratoriet.

Jeg ønsker også å takke kjæreste og familie for støtte under hele studiet, noe jeg setter utrolig stor pris på. Spesielt takk til bestefar Harald for hjelp med korrekturlesing av oppgaven.

Oslo, mai, 2020

Hanne Berggreen

## Sammendrag

Denne oppgaven er en del av et større forskningsprosjekt hvor det langsiktige målet er å utvikle en slimhinnevaksine mot tuberkulose, hvor melkesyrebakterier benyttes som leveringsvektor av antigener. Melkesyrebakterier er attraktive kandidater for leveringsvektor av vaksineantigener, da de anses som trygge å konsumere av mennesker, og noen hevdes å ha adjuvansegenskaper. *Lactobacillus plantarum* er spesielt interessant som leveringsvektor av antigener på grunn av sin evne til å overleve i mage-tarmkanalen i opp mot en uke. Ulike ankringsmetoder av antigen på celleoverflaten til *L. plantarum* har tidligere blitt benyttet, blant annet kovalent, C-terminalt LPxTG-celleveggankring. Tidligere bruk av celleveggankeret cwa2 for ankring av tuberkuloseantigener har gitt immunorespons i mus ved bruk som internasjonal boostervaksine av BCG. Cwa2 har derimot vist å hemme veksten til verten betydelig. Denne masteroppgaven beskriver studier der *L. plantarum* modifiseres til å produsere *M. tuberculosis*-antigen som ankres til celleoverflaten ved bruk av nye LPxTG celleveggankre, og studier som karakteriserer av de rekombinante bakteriene.

Det ble utført en *in silico* analyse av subcellulære proteiner i *L. plantarum* WCFS1, for å identifisere LPxTG celleveggankre. Basert på analysen ble syv celleveggankersekvenser med ulike egenskaper valgt. De valgte ankersekvensene ble fusjonert C-terminalt til hybridantigenet Ag85B-ESAT6. Det ble vist en generell hemming av veksten til de rekombinante *L. plantarum* med celleveggankret hybridantigen. Videre karakterisering ga indikasjoner på noe varierende grad av sekresjon og overflateankring av hybridantigenet, samt reduksjon i levedyktigheten til de ulike stammene med celleveggankre. Stammene med cellevegganker viste indikasjoner på varierende grad av stressrespons. Det ble funnet tegn på forskjeller i transkripsjonsnivået av hybridantigenet i stammene, men disse var ikke signifikante. Resultatet tyder på at variasjonen i stressnivå skyldes faktorer senere i prosessen, etter transkripsjon, som for eksempel translokasjon og ankring.

Ankersekvensen hentet fra genet *lp\_3001* viste mest lovende resultater, sammenlignet med det originale ankeret cwa2. Imidlertid viste analysene at alle de utvalgte celleveggankrene førte til betydelig stress for verten. Videre analyser for nærmere å identifisere årsaker til stress, og optimalisering av cellevegganker, er nødvendig før cellevegganker kan benyttes i en vaksine mot tuberkulose.

## Abstract

This study is part of a larger research project where the long-term goal is to develop a mucosal vaccine against tuberculosis, with lactic acid bacteria (LAB) as delivery vectors of antigens. LAB are good candidates for this purpose, as they are regarded as safe to consume by humans and some are claimed to have adjuvant properties. *Lactobacillus plantarum* is particularly interesting as delivery vectors of antigens because they can survive in the gastrointestinal tract for up to one week. Different methods of anchoring antigens to the surface of *L. plantarum* has been used before, among them C-terminal LPxTG cell wall anchors. A construct using the cell wall anchor cwa2 to anchor tuberculosis antigens has been shown to give an immune response in mouse when used as a booster vaccine to BCG. Cwa2 has been shown to significantly inhibit the growth of the host. This thesis describes studies where *L. plantarum* is modified to produce *M. tuberculosis* antigens anchored to the surface by new LPxTG cell wall anchors, and studies that characterise of the recombinant bacteria.

An *in silico* analysis of the subcellular proteins in *L. plantarum* WCFS1 was performed to identify LPxTG cell wall anchors. Based on the analysis seven cell wall anchors with different properties were elected. The chosen anchor sequences were then fused C-terminal to the hybrid antigen Ag85B-ESAT6. A general inhibition of growth was shown for the recombinant *L. plantarum* with cell wall anchored hybrid antigen. Further characterisation indicated some variation in the amount of hybrid antigen secreted and anchored to the surface, as well as a reduction in the viability of the different strains with cell wall anchors. The results indicate varying degrees of stress response in the strains. Signs of variation in transcription levels were found, but not significant. The results point to that variation in stress levels are due to steps later in the production process, for example translocation and anchoring of the hybrid antigen.

The anchor sequence from the *lp\_3001* gene showed most promise, compared to the original anchor cwa2. However, the analysis showed that use of the cell wall anchors all led to considerable stress for the host. Further research is required to identify the source of stress, and to optimise the cell wall anchors if the anchors are to be used in a vaccine against tuberculosis.

## Forkortelser

ATP	Adenosintrifosfat
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BHI	“Brain-heart-infusion”
BSA	Bovint serumalbumin
cDNA	Kopi DNA
CFU	“Colony forming units”
CWSS	Celleveggsorteringssignal
DC	Dendrittisk cellebindende
DC-pep	Dendrittisk cellebindende peptid
ddPCR	Droplet digital PCR
DTT	Ditiotreitol
FITC	“Fluorochrome fluorescein isothiocyanate”
gDNA	Genomisk DNA
GRAS	“Generally regarded as safe”
HK	Histidin-proteinkinase
LDS	Litium dodecylsulfat
MDR-TB	Multiresistent tuberkulose
MRS	«De Man, Rogosa and Sharpe”
NICE	“Nisin controlled expression”
OFA	Oncofetal antigen
PCR	“Polymerase chain reaction”
qPCR	Kvantitativ PCR
RR	Responsregulator
RT	Revers transkripsjon
SDS-page	“Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis”
Sec	“Secretion”
SP	Signalpeptidase
SRP	“Signal recognition particle”
TB	Tuberkulose

# Innhold

1. Introduksjon.....	1
1.1 Melkesyrebakterier.....	1
1.1.1 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	2
1.2 Bakterier som leveringsvektor for antigener.....	3
1.3 Induserbar genekspressjon i melkesyrebakterier.....	3
1.4 Sekresjon.....	5
1.4.1 Sekresjon av proteiner med Sec-translokasjon.....	6
1.5 Ankring av proteiner på overflaten av melkesyrebakterier.....	8
1.5.1 LPxTG celleveggankrede proteiner.....	8
1.6 Tuberkulose.....	10
1.6.1 Vaksiner mot tuberkulose.....	10
1.7 Målet med dette arbeidet.....	12
2. Materialer.....	13
2.1 Laboratorieutstyr.....	13
2.2 Kjemikalier.....	14
2.3 Kits.....	15
2.4 Agar og medier.....	16
2.5 Buffere.....	17
2.6 Proteiner og enzymer.....	17
2.7 DNA.....	18
2.9 Primere.....	18
2.10 Plasmider og bakteriestammer.....	19
3. Metode.....	20
3.1 <i>In silico</i> analyse av subcellulære proteiner i <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1.....	20
3.2 Dyrking av bakterier.....	20
3.3 Langtidslagring av bakterier.....	20
3.4 Plasmidisolering.....	21
3.5 Bestemmelse av DNA- og RNA-konsentrasjon.....	21
3.6 Kutting av DNA med restriksjonsenzymer.....	21
3.7 Polymerasekjedereaksjon (PCR).....	22
3.7.1 PCR-reaksjon ved bruk av Q5-High-Fidelity 2x Master Mix.....	22
3.7.2 PCR-reaksjon ved bruk av VWR Red Taq DNA polymerase Master Mix.....	22
3.8 Agarose gelelektroforese.....	23
3.9 Ekstraksjon av DNA-fragmenter og rensing av DNA fra agarosegel.....	24
3.10 Ligering In-Fusion kloning.....	24

3.11	Tillaging av elektrokompetente <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 .....	25
3.12	Transformering .....	26
3.12.1	Transformering av kjemisk kompetente <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.12.2	Transformering av elektrokompetente <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	26
3.13	Sekvensering av isolert plasmid .....	27
3.14	Forarbeid av prøver for analyse av genprodukt i <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	27
3.14.1	Kultivering og høsting av <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	27
3.14.2	Preparering av cellelysate ved bruk av glasskuler .....	27
3.15	Vekstkurve .....	28
3.16	Flowcytometri .....	29
3.17	Konfokal laserskanning-mikroskopi .....	30
3.18	Bestemmelse av CFU .....	30
3.19	Gelelektroforese av proteiner .....	31
3.20	Western blot .....	32
3.20.1	Blotting med eBlot™ Fast Transfer System .....	32
3.20.1	SNAP i.d.® immunodeteksjon .....	33
3.20.3	Deteksjon av proteiner med kjemiluminescens .....	34
3.21	Transkripsjonsanalyse .....	35
3.21.1	Isolering av RNA .....	35
3.21.2	Fjerning av genomisk DNA .....	35
3.21.3	Revers transkripsjon .....	36
3.21.4	Droplet digital PCR .....	37
4.	Resultater .....	39
4.1	<i>In silico</i> analyse av subcellulære proteiner i <i>L. plantarum</i> WCFS1 .....	40
4.1.1	Design av ankersekvenser .....	43
4.2	Konstruksjon av plasmid for celleveggankring av antigen .....	44
4.3	Vekstkurve .....	47
4.4	Proteindeteksjon med Western blot .....	49
4.5	Proteindeteksjon med flowcytometri .....	51
4.6	Proteindeteksjon med konfokal laserskanning-mikroskopi .....	53
4.7	Analyse av levedyktighet .....	57
4.8	Transkripsjonsanalyse .....	58
5.	Diskusjon .....	60
5.1	Design av LPxTG celleveggankre .....	60
5.2	Konstruksjon av plasmider .....	61
5.3	Vekst hos rekombinante <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	62



5.4 Analyse av antigenproduksjon .....	63
5.5 Karakterisering av overflateankrede antigener.....	64
5.6 Levedyktighet til rekombinante <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	66
5.7 Transkripsjonsanalyse med ddPCR.....	67
5.8 Konklusjoner og fremtidige perspektiver .....	68
6. Referanser.....	70
Vedlegg .....	I

### 1. Introduksjon

Melkesyrebakterier anses som trygge å konsumere for mennesker. Mange av bakteriene overlever i mage-tarmkanalen til mennesker, og noen arter har i tillegg adjuvanseffekter. Dette gjør melkesyrebakterier til lovende kandidater som leveringsvektor av antigener. Rekombinante melkesyrebakterier kan produsere heterologe proteiner med ulik plassering i og utenpå cellen. Bruk av melkesyrebakterier som leveringsvektor for tuberkuloseantigener er blitt forsket på som en mulig ny vaksine mot tuberkulose. Melkesyrebakterien *Lactobacillus plantarum* blir i dette arbeidet modifisert til å produsere celleveggankrede *Mycobacterium tuberculosis* hybridantigen, for bruk som leveringsvektor i en potensiell vaksine mot tuberkulose (TB).

*M. tuberculosis* er en gram-positiv bakterie som forårsaker de fleste tilfellene av TB. Bakterien spres ved dråpesmitte. TB kan manifesteres på mange måter, men smitte fører som oftest til lungesykdom. Sykdommen er mulig å behandle, og det finnes en vaksine, BCG, som gir utbredt beskyttelse hos barn. På tross av dette er TB en av de ti mest dødelige sykdommene i verden, og stansing av TB epidemien er en del av FNs bærekraftsmål.

#### 1.1 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er gram-positive bakterier, som under fermentering av karbohydrater danner melkesyre som et viktig sluttprodukt. Bakteriene er formet som staver eller kokker, har et lavt GC-innhold, er aerotolerante og de danner ikke sporer. Melkesyrebakterier opptrer naturlig i mange habitater, for eksempel i ulike matvarer og på slimhinner i tynntarmen, tykk-tarmen og vagina til dyr og mennesker (Makarova et al., 2006). Majoriteten av melkesyrebakteriene er motstandsdyktige mot lav pH og galle, og er i stand til å overleve og enkelte av dem kan kolonisere i tarmen.

Melkesyrebakterier er lovende kandidater som leveringsvektorer for slimhinnevaksiner (Wyszyńska et al., 2015). Melkesyrebakterier har status som «Generally regarded as safe» (GRAS), noe som betyr at de ikke er patogene og de er trygge å innta for mennesker og dyr. I tillegg antas noen typer melkesyrebakterier å være probiotiske med positiv helseeffekt på bakteriefloraen i mage-tarmkanalen når de blir konsumert i tilstrekkelige mengder (Hotel & Cordoba, 2001; Wyszyńska et al., 2015). For å være regnet som probiotisk må

melkesyrebakterien ha evnen til å overleve i mage-tarmkanalen. Overlevelsestiden til melkesyrebakterier i mage-tarmkanalen varierer, for eksempel overlever *Lactococcus lactis* kun i et par timer, mens noen laktobasiller kan overleve i opptil 7 dager, mens andre igjen kan kolonisere tarmen (Michon et al., 2016). I tillegg har noen adjuvansegenskaper som kan føre til økt opptak av antigen, som er ønskelig for en leveringsvektor (Mohamadzadeh et al., 2005). Celleveggen til melkesyrebakterier inneholder ikke lipopolysakkarider, noe som er en stor fordel da det fjerner risikoen for endotoksisk sjokk som gram-negative bakterier kan utgjøre (Szatraj et al., 2017). Arter av melkesyrebakterier som har adhesive egenskaper og effektivt koloniserer verten, er spesielt egnet som vaksinevektor da forlenget tid i verten kan gi økt antigenpresentasjon til immunsystemet (Szatraj et al., 2017).

### **1.1.1 *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* er en stavformet melkesyrebakterie med mange naturlige habitater som er trygg å konsumere for mennesker, og noen stammer hevdes å ha probiotiske egenskaper (De Vries et al., 2006). Stammer har blitt isolert fra meieriprodukter, fermenterte matprodukter og kjøtt. *L. plantarum* har i tillegg utviklet seg til å overleve i det harde miljøet i mage-tarmkanalen (Ahrne et al., 1998). Det antas at *L. plantarum* passerer gjennom mage-tarmkanalen til mennesker uten å kolonisere (Derrien & van Hylckama Vlieg, 2015). *L. plantarum* har i tillegg adjuvansegenskaper som kan fordelaktig i bruk som leveringsvektor (Bloksma et al., 1979). Det er flere studier som tyder på at *L. plantarum* forbedrer slimhinnens immunrespons ved å aktivere dendrittske celler (DC) uten negativ innflytelse på immunsystemets homeostase (Bron et al., 2012; Kuczkowska et al., 2017; Øverland, 2013).

Genomet til *L. plantarum* WCFS1 ble tidlig sekvensert, og flere gode systemer for genmodifisering av arten har blitt utviklet (Kleerebezem et al., 2003). Mange gen for predikerte ekstracellulære proteiner ble identifisert i *L. plantarum* WCFS1. Flere av proteinene antas å være bundet til celleoverflaten og noen til å ha adhesive egenskaper.

Ettersom *L. plantarum* er lett og trygg å bruke i produksjon, overlever passeringen gjennom mage-tarmkanalen, og antas å ha probiotiske- og adjuvansegenskaper, er bakterien en attraktiv leveringsvektorkandidat som leveringsvektor av antigener.

### **1.2 Bakterier som leveringsvektor for antigener**

Vaksiner stimulerer immunsystemet til å skape beskyttelse mot den aktuelle sykdommen det vaksineres mot. Immuniteten dannet fra vaksiner er spesifikk, og i prinsippet den samme som man ofte kan oppnå etter gjennomgått smitte (Siegrist, 2008). Bakterier som leveringsvektor for antigener er en lovende strategi for vaksineutvikling (Kuczkowska et al., 2019; Medina & Guzmán, 2001; Wyszynska et al., 2015). Bakterier kan modifiseres til å produsere og ankre antigen på celleoverflaten, for å skjerme antigenene i møte med tøffe forhold slik at de kommer intakt frem til immuncellene (De Ruyter et al., 1996; Mathiesen et al., 2008; Medina & Guzmán, 2001; Sørvig et al., 2003). Dette medfører at leveringsvektoren kan gi økt immunologisk effekt i forhold til om løselige antigen blir levert alene (Medina & Guzmán, 2001).

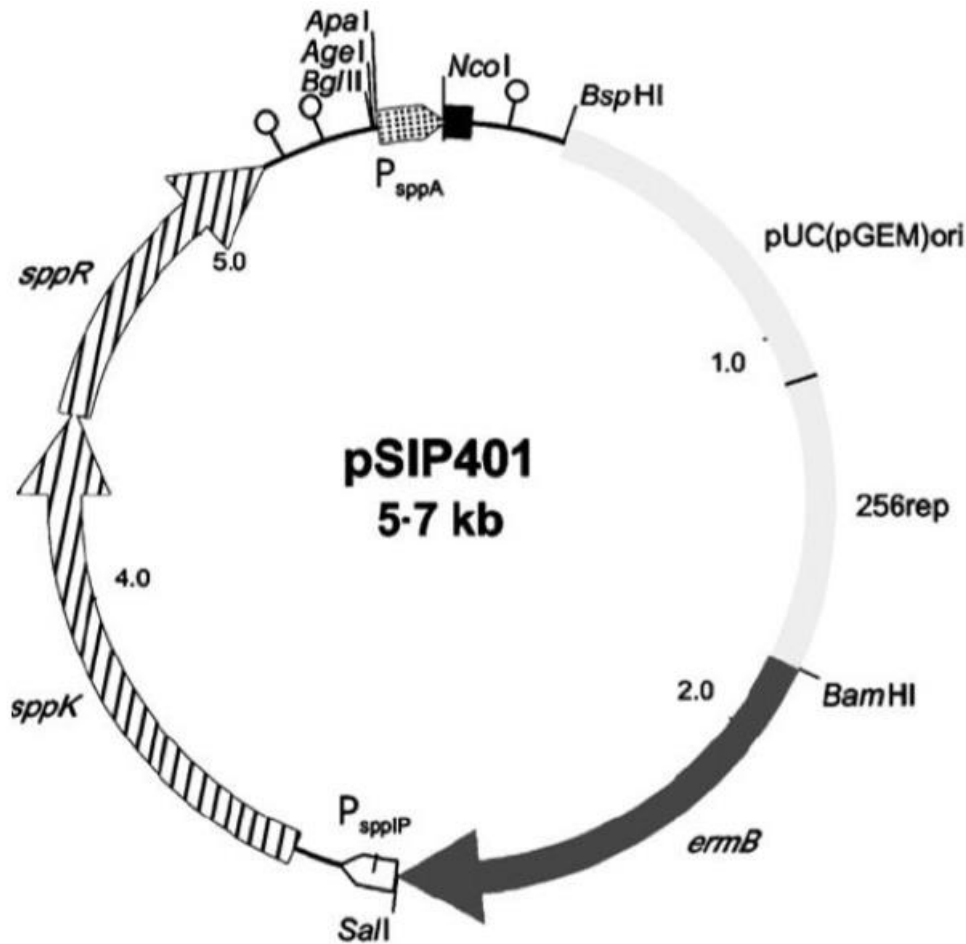
De fleste vaksiner i dag settes ved injeksjoner. En fordel med en injeksjon er at mengden antigener eller antigen-bærende bakterier som injiseres er kjent, og det er mulig å måle mengden spesifikke antistoffer og andre immunceller i blodet. Vaksiner som administreres oralt, nasalt, rektalt eller vaginalt kan gi mer effektiv og beskyttende immunrespons på slimhinner. Dette er en fordel da de fleste patogene mikroorganismer enten er begrenset til slimhinnene eller trenger å passere dem tidlig i infeksjonstiden (Levine et al., 1983; Medina & Guzmán, 2001). En utfordring med slimhinnevaksiner er at antigenet møter tøffere forhold, blant annet lav pH og proteaser (Medina & Guzmán, 2001). I tillegg kan slimsekretet føre til begravning eller utvanning av antigenet. For å møte disse utfordringene kan vaksiner tilsettes adjuvanter for å øke immuneffekten til vaksinen, eller det kan benyttes en bakterie med adjuvante egenskaper som leveringsvektor (Neutra & Kozlowski, 2006). Det er enda ikke en vaksine på markedet som benytter seg av rekombinante bakterier som leveringsvektor for antigener.

### **1.3 Induserbar genekspressjon i melkesyrebakterier**

Det har blitt utviklet flere genekspressjonssystemer for *Lactobacillus*. Systemene kan benyttes for å produsere ulike proteiner eller enzymer i bakteriene. Mange melkesyrebakterier kan produsere peptider kalt bakteriosiner, som sekreteres og dreper andre bakterier (Klaenhammer, 1988). Genene som regulerer produksjonen av bakteriosiner har blitt benyttet til å konstruere induserbare ekspressjonssystemer i melkesyrebakterier. Heterologt uttrykk av celleveggankrede proteiner eller antigener kan føre til redusert viabilitet og økt stress for verten og/eller resultere i proteolytisk nedbrytning av målproteinet (Michon et al., 2016).

Et av de første genekspresjonssystemene som ble utviklet, var det såkalte NICE-systemet som opprinnelig ble utviklet for bruk i *Lactococcus lactis*, men som senere har blitt videreutviklet for bruk i laktobasiller (De Ruyter et al., 1996; Kleerebezem et al., 1997). En ulempe med systemet er at det består av to plasmider, hvor ett er regulerende og det andre inneholder målgener kontrollert av en promotor. Det har i tillegg blitt vist at systemet har basal genekspresjon uten nisin induksjon i *Lactobacillus* og derfor gjør systemet lite egnet for bruk i denne slekten (Sørvig et al., 2003). Det er ønskelig å ha så lite basalaktivitet i et induserbart system som mulig, da produksjon av protein som lekkasjen forårsaker kan føre til økt stress for bakterien og fordi et tett system er bedre egnet til å produsere toksiske proteiner.

Systemet som er utviklet for kontrollert genekspresjon i *L. plantarum* og *Lactobacillus sakei*, det såkalte pSIP-systemet, baserer seg på gener involvert i produksjon av bakteriosinene sakacin A og P (Sørvig et al., 2003). Fordelen med pSIP-systemet er at det kun består av et plasmid, og er enkelt å modifisere. Systemet er bygget opp av genkassetter med restriksjonssteder som muliggjør lett utbytting av de enkelte delene ved bruk av restriksjonsenzymmer og ligering. I naturlig produksjon kontrolleres tre gener og en induserbar promotor ( $P_{\text{sppIP}}$ ). Genene koder for transmembran histidin-proteinkinase (HK), responsregulator (RR) og et induser-peptid (SppIP). Et pSIP-system, pSIP401, som benytter promotorer og gener for naturlig produksjon av sakacin P, er vist i figur 1.1. I pSIP-systemet er genet for SppIP ikke inkludert, transkripsjon av genene for HK (*sppK*) og RR (*sppR*) kan dermed kontrolleres ved tilsetning av ekstracellulær SppIP. Tilsetning av SppIP fører til fosforylering av HK, som videre overfører fosfatgruppen til RR. Fosforylert RR binder til de induserbare promotorene  $P_{\text{sppIP}}$  og  $P_{\text{sppA}}$ . Induseringen av  $P_{\text{sppIP}}$  fører til en massiv produksjon av HK og RR, noe som gir en selvgående induksjonsloop og indusering av  $P_{\text{sppIA}}$  som igjen fører til eksplosiv transkripsjon av målgenet.



**Figur 1.1. Skjematisk illustrasjon av pSIP401.** Lysegrått område representerer replikon uUC(qGEM)ori fra *E. coli* og 256rep fra *L. plantarum*. Mørkegrått område marker Erythromycin-resistensgenet (*ermB*). Hvitt område representer inducible promoter,  $P_{sppIP}$ . Område markert med striper, inneholder gener for histidin-kinase (*sppK*) og responsregulator (*sppR*). Prikket område representere den inducible promotoren,  $P_{sppA}$ . Den svarte boksen er et multippelt kloningssete (*NcoI*). Mål gen blir klonet inn nedstrøms for  $P_{sppA}$  ved bruk av *NcoI*. Figuren er hentet fra Sørvig et al. (2005).

pSIP-systemet har senere blitt modifisert for sekresjon av heterologe proteiner (Mathiesen et al., 2008). Modifiseringen bestod av utbytting av *NcoI* med *NdeI*, fjerning av *Sall* i promotoren og innsetting av *Sall* i området mellom signalpeptidet og målgenet. I motsetning til *NcoI*, tillater *NdeI* fusjon uten endring av det andre kodonet i målgenet. Systemet har også blitt modifisert for å ankre heterologe proteiner til celleoverflaten, enten til cellemembranen eller celleveggen (Fredriksen et al., 2010; Fredriksen et al., 2012; Kuczkowska et al., 2017).

## 1.4 Sekresjon

Gram-positive bakterier har et tykt lag av peptidoglykan som omslutter den cytoplasmiske membranen. I tillegg til peptidoglykan består celleveggen av teikosyrer, kapselpolysakkarider, overflateproteiner og fosfolipider (Rajagopal & Walker, 2015). Alle proteiner som produseres

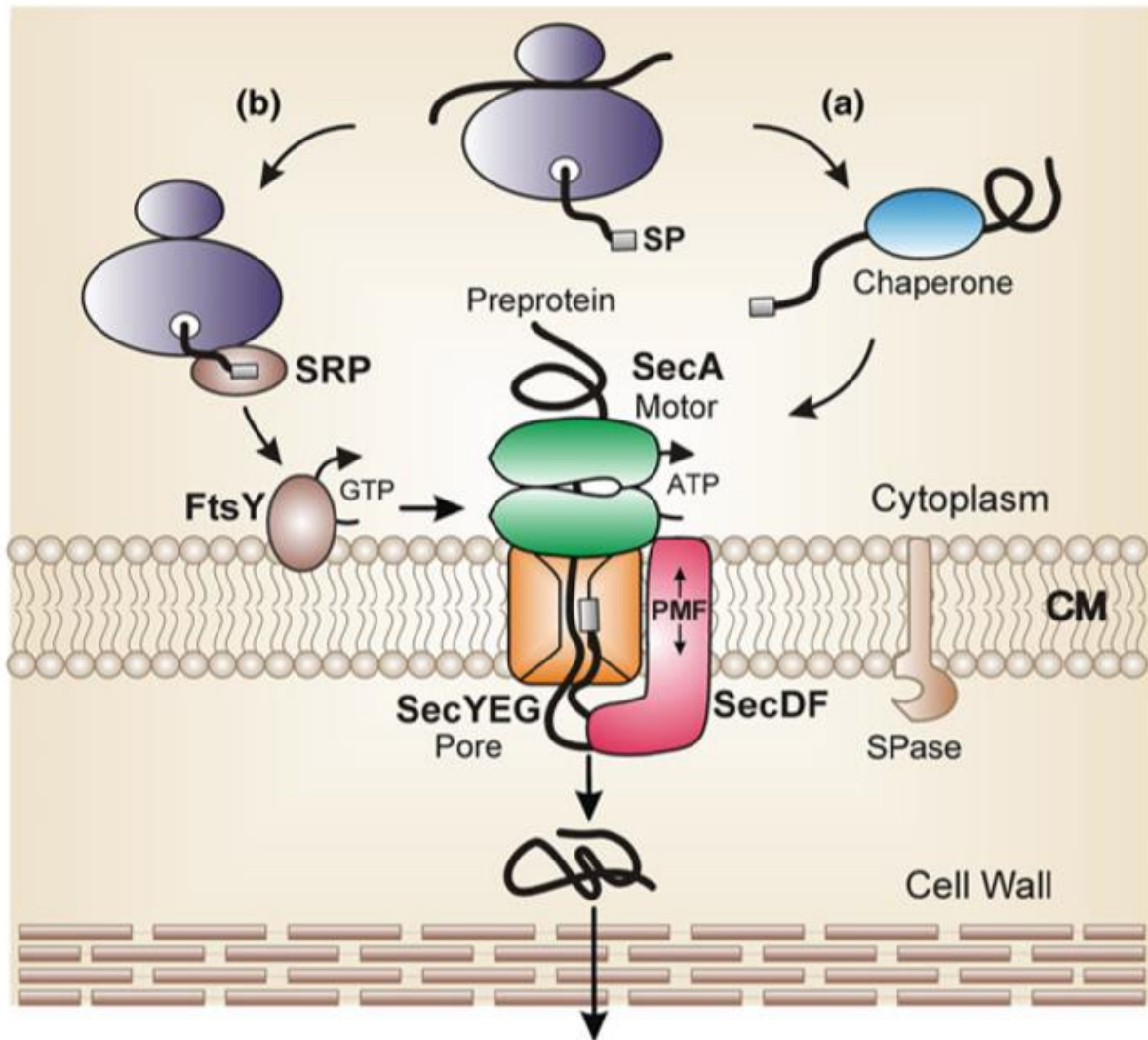
av cellen blir syntetisert ved ribosomene inne i cellen. De fleste proteiner som skal ut av cellen har en N-terminal signalsekvens, som fører til at proteinet translokiseres over cellemembranen (von Heijne, 1990).

I gram-positive bakterier er det identifisert syv metoder for proteinsekresjon (Kleerebezem et al., 2010); Sec («secretion»), Tat («twin-argining translocation»), FEA («flagella export apparatus»), FPE («fimbriilin-protein exporter»), Holin (poredannende), ABC-transportører («peptide-efflux ABC transporters») og Wss («WXG100 secretion system»).

### **1.4.1 Sekresjon av proteiner med Sec-translokasjon**

Sec-translokasjon er det viktigste sekresjonssystemet i gram-positive bakterier (Prabudiansyah & Driessen, 2016). Proteiner som skal gjennom Sec-systemet, blir syntetisert av ribosomer som ikke-foldede preproteiner. Preproteinenes N-terminale signalpeptid er viktig for målretting av proteinene til translokasjonsstedet ved membranen (Driessen & Nouwen, 2008).

Figur 1.2 viser en skjematisk oversikt over Sec-systemet i gram-positive bakterier. Hovedsakelig blir preproteinene ført til translokasjonsstedet ved hjelp av et chaperon etter translasjon («post-translational targeting») (figur 1.2a). Chaperonet fører preproteinet til membranen hvor det overføres til SecA motordomenet. ATP binding og hydrolyse, utført av SecA, fører til en stegvis translokasjon av preproteinet gjennom SecYEG kanalen. Et annet membranprotein, SecDFayjC, stimulerer translokasjonen ved bruk av elektrontransportkraft («proton motive force») (Prabudiansyah & Driessen, 2016). I noen få tilfeller forblir preproteinet bundet til ribosomet («co-translational targeting»), og føres til translokasjonsstedet av GTP-aser i stedet for av et chaperon.



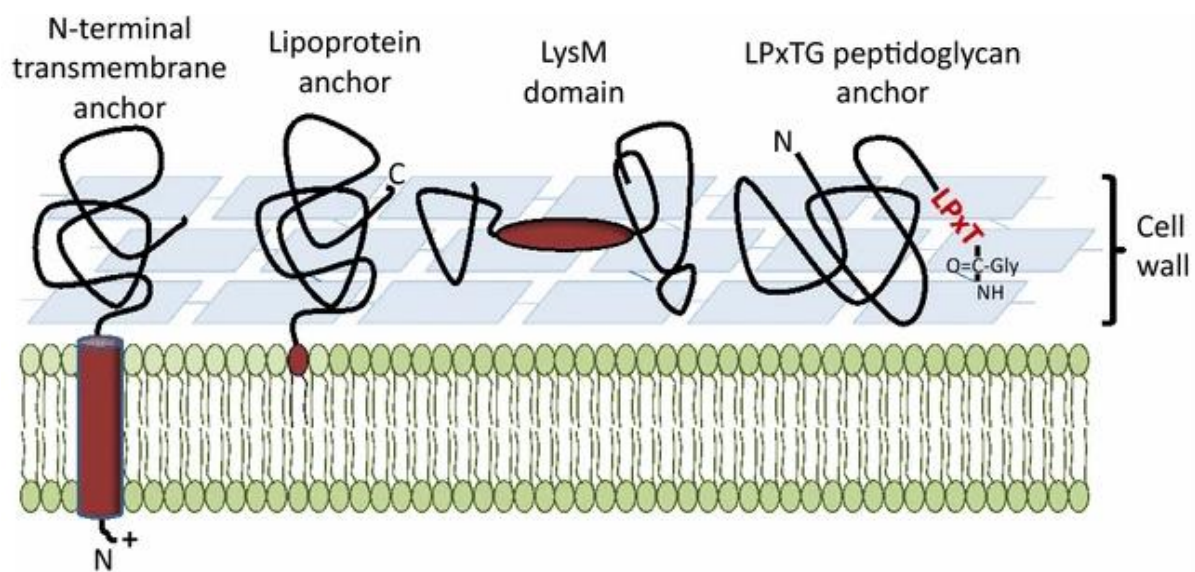
**Figur 1.2. Skjematisk oversikt over Sec-systemet i gram-positive bakterier. A) Post-translasjonsmålretting:** Preprotein syntetiseres ved ribosomene (lilla) og fanges opp av et chaperon (blå) i ufoldet tilstand. Det sendes til SecA (grønn) som er bundet til SecYEG kanalen (oransje) i den cytoplasmatiske membranen (CM). SecA skyver forløperproteinet gjennom SecYEG kanalen på en ATP-avhengig måte. I tillegg bruker SecDFyajC (rød) elektrontransportkraft til å dra forløperproteinet inn i periplasmen. Etter translokasjon kutter signalpeptidase (Spase) av signalpeptidet, og et modent protein frigjøres. **B) I ko-translasjonsmålretting** blir preproteinet ført til translokasjonsstedet som et ribosombegynnende kjedekompleks (RNC), av SRP og FtsY (brun). Proteinsyntese vil starte og involvere SecA og ATP. Figuren er hentet fra Prabudiansyah & Driessen, (2016).

En signalpeptidase kutter av signalpeptidet til preproteinet underveis eller rett etter translokasjon. Kuttasetet avgjør om proteinet sekreteres eller blir forankret i cellemembranen. Signalpeptider med kuttsete A-X-A blir kuttet med signalpeptidase type I (SPI), disse proteinene blir frigjort fra membranen (van Roosmalen et al., 2004). Signalpeptider med kuttsete L-X-X-C (lipoboks) blir kuttet med Signalpeptidase type II (SPII), disse blir forankret i cellemembranen etter translokasjonen (Sutcliffe & Harrington, 2002). Proteiner som kuttes med SPI kan bli holdt tilbake i celleoverflaten ved ulike typer proteinankring.



## 1.5 Ankring av proteiner på overflaten av melkesyrebakterier

Sekreterte proteiner kan ankres kovalent eller ikke-kovalent til cellemembranen eller celleveggkomponenter (Michon et al., 2016). Ankermetodene i gram-positive bakterier kan deles inn i fire ulike kategorier; transmembranankring, lipoproteinankring, LPxTG-ankring og ikke-kovalent binding (LysM) av proteiner til celleveggen. Figur 1.3 viser en skjematisk fremstilling av de mest brukte ankermekanismene i *Lactobacillus*. Alle ankermekanismene har til en viss grad blitt implementert i pSIP systemet (Cortes-Perez et al., 2005; Fredriksen et al., 2010; Fredriksen et al., 2012).



**Figur 1.3** Skjematisk fremstilling av de mest brukte ankermekanismene i *Lactobacillus*. Ankermetodene er basert på kovalente eller ikke-kovalente interaksjoner med komponenter i cellemembranen eller celleveggen. Ankerdomene/motivene (rødt) er koblet med proteinet som skal være tilgjengelig på overflaten. Figuren er hentet fra Michon et al., (2016).

### 1.5.1 LPxTG celleveggankrede proteiner

I gram-positive bakterier kan sekreterte proteiner bli kovalent bundet til celleveggen ved et LPxTG-motiv. LPxTG celleveggankring krever at preproteinet inneholder et N-terminalt signalpeptid og et C-terminalt celleveggsorteringssignal (CWSS). CWSS starter med et LPxTG motiv, etterfulgt av et hydrofobisk domene og en hale med noen få positivt ladede residuer. Direkte oppstrøms for LPxTG-motivet er det vanligvis en lavkompleks linkerregion på omtrent 50-150 residuer, området er ofte rikt på prolin/glysin og/eller treonin/serin residuer. Den ladede halen og det hydrofobiske domenet er antatt å ha en midlertidig stopp funksjon for å plassere LPxTG-motivet i den posisjonen som kreves for korrekt kutting av motivet (Leenhouts et al., 1999).

Signalpeptidet fører preproteinet gjennom cellemembranen via Sec translokasjon, hovedsakelig med «post-translational targeting» (Michon et al., 2016). Etter sekresjon kutter signalpeptidase av signalpeptidet, og proteinet foldes. Proteinene bindes til celleveggen ved at et enzym med transpeptidaseaktivitet, kalt sortase, kutter mellom treonin og glysin i LPxTG-motivet. For å oppnå celleveggankring følger en krysslinking av treoninresiduet i det kuttete produktet med aminogruppen til peptidoglykansk stammepeptid (Siegel et al., 2016).

Sortase deles inn i seks klasser, SrtA-F, hvor av fem utfører celleveggankringsfunksjoner og en (SrtC) omdanner pilin-motiv og CWSS til pili og fimbriae (Siegel et al., 2016). SrtA gjenkjenner LPxTG-motivet, og antas å ankre et stort antall proteiner til celleveggen (Ton-That & Schneewind, 2004). I *L. plantarum* har det blitt identifisert en enkelt sortase (SrtA) for kutting av C-terminalt LPxTG-type ankere og kobling til peptidoglykan. (Kleerebezem et al., 2003). LPxTG motivet i *L. plantarum* har konsensussekvensen LPQTxE. Den høye konserveringen av motivet kan tyde på at sortasen i *L. plantarum* har høy spesifisitet.

LPxTG celleveggankere kan benyttes til ankring av heterologe proteiner uttrykt ved bruk av genespresjonssystemer. Det er indikasjoner på at lengden på området mellom LPxTG-motivet og målproteinet i celleveggankeret, kalt linkerregionene, er viktig for overflateeksponering og stabiliteten til antigenet. I en studie, hvor 37 kD onkofetal antigen (OFA) ble celleveggankret med LPxTG-ankere hentet fra *lp\_2578* genet hos *L. plantarum*, ble det testet tre ulike lengder (644, 194 og 128 residuer) på linkerregionen (Fredriksen et al., 2010). Forfatterne viste at antigenet ble produsert og ankret med alle sekvensene, men lengden på linkerregionen påvirket mengde protein ankret og nedbrytningen av proteinet før ankring. Ankeret med best resultat, *cwa2*, hadde en linkerregion på 194 residuer som korresponderte med en predikert prolin-rik region oppstrøms for LPxTG-motivet i *lp\_2578* genet.

## 1.6 Tuberkulose

TB er et av verdens store helseproblemer. Ifølge verdens helseorganisasjon (WHO) var TB en av de ti mest dødelige sykdommene i verden i 2018. Totalt 1,5 millioner mennesker døde av TB i 2018, og det blir årlig diagnostisert 10 millioner nye TB tilfeller i verden. Antall tuberkulosestilfeller er høyest i utviklingsland, hvor åtte land stod for 66% av de nye tilfellene i 2018. For å sikre god helse og livskvalitet globalt er stansing av TB-epidemien med i ett av delmålene under «God helse», mål 3.3 i FNs bærekraftsmål (United Nations, 2020).

TB forårsakes av bakterien *Mycobacterium tuberculosis*. I voksne oppstår sykdommen oftest i lungene, men den kan også utvikle seg i andre organer. Personer med ubehandlet lungetuberkulose kan smitte andre mennesker via dråpesmitte, men sykdommen er lite smittsom sammenlignet med andre sykdommer. Ved smitte vil 60% av tilfellene føre til en asymptomatisk latent infeksjon (Parrish et al., 1998; Szatraj et al., 2017). Latent TB kan sitte dypt i vevet i flere tiår uten at sykdommen aktiveres. Ved HIV-infeksjon øker faren for at latent TB utvikles til aktiv sykdom (Bruchfeld et al., 2015).

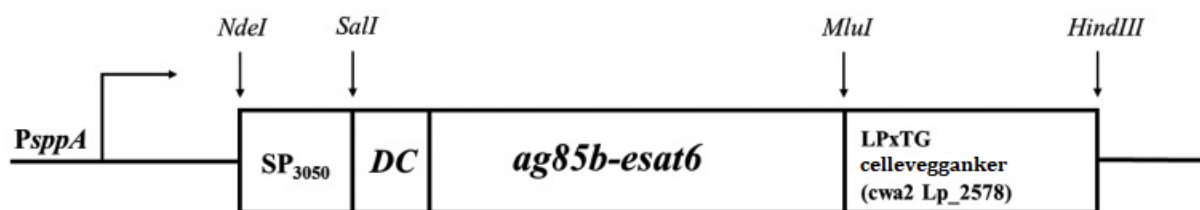
TB er mulig å behandle og kurere, vanligvis med en 6 måneders antibiotikakur. I 2017 var suksessraten på behandling av personer nylig diagnostisert med TB på 85% (World Health Organization, 2019). Imidlertid er multiresistent TB (MDR-TB) en økende utfordring. Behandling av MDR-TB er mulig, men den er dyrere, og behandlingen kan ta inntil to år. I noen tilfeller, med utvidet multiresistent TB, er bakteriene så resistente at behandling av pasientene ikke er mulig (World Health Organization, 2020). Derfor er vaksiner et av de viktigste midlene for å stanse TB epidemien i verden.

### 1.6.1 Vaksiner mot tuberkulose

BCG er, per dags dato, den eneste tilgjengelig vaksine for tuberkulose på markedet. Vaksinen består av svekkede *Mycobacterium bovis* bakterier, kalt Bacille Calmette Guérin. BCG har vist seg å være 70-80% effektiv mot de fleste alvorlige former for TB hos barn i de første 10 årene, men effekten av vaksinen utover 10 år er usikker (Tverdahl & Funnemark, 1988). BCG bør ikke gis til personer med HIV infeksjon eller andre immunkompromitterte pasienter (Crum-Cianflone & Sullivan, 2017). På bakgrunn av dette er det et stort behov for ny vaksine mot TB.

Ifølge WHO var det fjorten vaksinekandidater for tuberkulose i kliniske forsøk i 2019, hvor tre av kandidatene var i fase tre (Méndez-Samperio, 2018). I tillegg til vaksinekandidatene i kliniske forsøk har det blitt forsket på bruk av melkesyrebakterier som vektor for levering av antigener som boostervaksine mot TB (Kuczkowska et al., 2017; Kuczkowska et al., 2019).

*L. plantarum* ble modifisert til å produsere overflateankret *M. tuberculosis* antigen, dette induerte immunrespons i mus både intranasalt og oralt administrert (Kuczkowska et al., 2017). Antigenet som ble benyttet var et hybrid av Ag85B og ESAT6 fusjonert til et peptid som spesifikt binder DC (DC-pep). Hybridantigenet ble ankret til celleoverflaten på to ulike måter; lipoproteinanker og et kovalent cellevegganker. Figur 1.4 viser ekspresjonskassetene benyttet for celleveggankring av hybridantigenet. DC-pep ble koblet til antigenene for å gi økt immunrespons, som følge av at DC'er stimulerer adaptivt immunforsvar og påfølgende immunologisk hukommelse (Guermontprez et al., 2002). Rekombinert *L. plantarum* med cellevegganker hadde en positiv effekt når den ble benyttet som internasal boostervaksine av BCG, ved at mengden mykobakterier i lungene til mus ble redusert sammenlignet med uvaksinerte mus når de ble smittet med *M tuberculosis*. Veksthastighet til bakterien var veldig dårlig sammenlignet med villtypen, noe som tyder på at det var veldig stressende for bakterien å sekretere og ankre antigenet til celleveggen. At veksten av verten ofte hemmes, gjør det vanskelig å benytte LPxTG ankeret antigen i vaksineproduksjon, siden en trenger å produsere mye biomasse for dette formålet.



**Figur 1.4.** Ekspresjonskassetter for produksjon av celleveggankret Ag85B-ESAT6. C-terminal ankring til celleveggen oppnås ved fusjon av N-terminal antigen til signalpeptid fra Lp\_3050 og C-terminal til cellevegganker fra Lp\_2578 (cwa2). Figuren er modifisert fra Kuczkowska et al. (2017).

### 1.7 Målet med dette arbeidet

Dette arbeidet er del av et større forskningsprosjekt, hvor målet er å utvikle en melkesyrebasert slimhinnevaksine mot *M. tuberculosis*. LPxTG celleveggankeret cwa2, har tidligere blitt benyttet for å ankre tuberkuloseantigenet på *L. plantarum*. Ankeret har ført til produksjon og ankring av antigenet, men bakterieveksten har blitt hemmet. Dårlig vekst er en utfordring når målet er å bruke bakterien i vaksineproduksjon. Det er ikke kjent om hemming av vekst er spesifikt for cwa2 ankeret eller generelt for LPxTG celleveggankere.

Det langsiktige målet med dette arbeidet er å designe et LPxTG cellevegganker som gir god antigenproduksjon i rekombinert *L. plantarum*, hvor veksten til verten ikke hemmes av produksjonen. Dersom hemming av veksten til verten er et generelt problem med celleveggankre, er det et mål å finne ut hva som forårsaker hemmingen.

Det ble systematisk arbeidet for å oppnå det langsiktige målet ved (1) å identifisere LPxTG-ankersekvenser i *L. plantarum* WCFS1 genomet ved å utføre en *in silico* analyse og velge gode ankersekvenser basert på analysen, (2) å modifisere *L. plantarum* til å uttrykke hybridantigenet Ag85B\_ESAT6 fusjonert med et DC-pep, og ankre det med de valgte LPxTG celleveggankrene og (3) å karakterisere produksjonen og ankringen av *M. tuberculosis* hybridantigenet.

Det eksperimentelle arbeidet for å undersøke de nevnte målsetningene ble utført etter følgende trinn:

1. *In silico* analyse og design av nye LPxTG celleveggankre.
2. Konstruksjon av induserbare vektorer for uttrykk og ankring av Ag85B\_ESAT6 gjennom ulike celleveggankre.
3. Karakterisering av de rekombinante *L. plantarum* ved analyse av bakterievekst og levedyktighet. Analyse av produksjon og overflateplassering av antigenene ved bruk av flowcytometri, konfokal laserskanningmikroskopi og western blot.
4. Transkripsjonsanalyse av *Ag85E* gen ved bruk av droplet digital PCR.

## 2. Materialer

### 2.1 Laboratorieutstyr

#### Laboratorieutstyr

Cryorør, 1.5 mL  
Diverse glassutstyr  
DG8™ Cartridges  
DG8™ Gaskets  
Elektroporeringskyvetter, Gene Pulser®, 0.2 cm  
Engangskyvetter, 1.5 mL  
1 mm kyvette  
Eppendorfrør, 1.5 og 2.0 mL  
Falcon 2059 Polypropylene Round Bottom tube, 14 mL  
FastPrep® tuber og lokk  
Glasskuler  
Gjennomtrengelige folievarmeforseglinger  
Lysing matrix 2 tuber, 2 mL  
Microwell plater, 96 brønner  
Multipipette 8 kanaler  
Multiplate Unskirted 96-brønn PCR plate  
Nunc-rør, 15 og 50 mL  
Objektglass og dekkglass, Menzel-gläser  
PCR-rør, 0.2 mL  
Pipetboy comfort  
Serologiske pipetter, 5, 10 og 25 mL  
Sprøyter, 10-60 mL  
Sterilfilter, 0.20 µm i porestørrelse  
Vannbad  
Tellemaskinen CFU

#### Leverandør

Sarstedt  
  
Bio-Rad  
Bio-Rad  
Bio-Rad  
Brand  
Bio-Rad  
Axygen  
Becton Dickinson  
Fisher Scientific  
Sigma  
Bio-Rad  
MP Biomedicals  
Thermo Scientific  
Thermo Scientific  
Bio-Rad  
Nunc  
Thermo Scientific  
Axygen  
Integra  
Sarstedt  
Plastipark  
Sarstedt  
Julaba  
TeknoLab

#### Instrumenter

Azure c400  
BioPhotometer D30  
CertoClav  
Electrophoresis electricity supplier  
FastPrep® - 24 Tissues and Cell homogenizer  
GelDoc EZ imager  
Gene Pulser II  
Inkubator/varmeskap  
Inverted Light Microscope  
Leica TCS SP5 Confocal laser scanning microscope  
MacsQuant® Analyser  
Multiskan FC  
PCR-maskin  
    Mastercycler gradient  
    SimpliAmp Thermal Cycler  
Pulse Controller Plus  
PXI™ PCR-Plate sealer

#### Leverandør

Azure biosystems  
Eppendorf  
OneMed  
Bio-Rad  
MP Biomedical  
Bio-Rad  
Bio-Rad  
Termaks  
Leica Microsystems  
Leica Microsystems  
Miltenyi Biotec  
Thermo Scientific  
  
Eppendorf  
Applied Biosystems  
Bio-Rad  
Bio-Rad

Qubit® Fluorometer  
 QX200 Droplet Generator  
 QX200 Droplet Reader  
 Sentrifuger  
     Eppendorf centrifuge 5418R  
     Heraeus Pico 21 centrifuge  
     Heraeus Multifuge X1R  
     Mikrosentrifuge MiniStar silverline  
 SNAP i.d Protein Detection System  
 Ultraspec 10 Cell Density Meter

Invitrogen  
 Bio-Rad  
 Bio-Rad  
  
 Eppendorf  
 Thermo Scientific  
 Thermo Scientific  
 VWR  
 Millipore  
 Amersham Biosciences

### Programvare

ATGme  
 AzureSpot Analysis Software  
 BioEdit  
 BLAST  
 CLC DNA Main Workbench 7  
 FlowJo  
 ImageJ  
 LocateP v2  
 MacsQuantify™ Software  
 Microbesonline  
 pDRAM32  
 Pfam 32.0  
 QuantaSoft Software  
 SignalP-5.0  
 TMHMM v. 2.0.

### Leverandør

<http://atgme.org>  
 Azure Biosystems  
<https://bioedit.software.informer.com/>  
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>  
 Qiagen  
  
 Fiji  
[http://bamics2.cmbi.ru.nl/websoftware/locatep2/locatep2\\_start.php](http://bamics2.cmbi.ru.nl/websoftware/locatep2/locatep2_start.php)  
 Miltenyi Biotec  
<http://www.microbesonline.org/>  
[www.acaclone.com](http://www.acaclone.com)  
<https://pfam.xfam.org/>  
 Bio-Rad  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>  
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

## 2.2 Kjemikalier

### Kjemikalier

Bacteria Protect  
 Brain-Heart Infusion (BHI)  
 De Man, Rogosa, Sharpe (MRS)  
 Dithiothreitol (DTT), C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>  
 Droplet generation Oil for EvaGreen  
 EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
 Erytromycin, C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>13</sub>  
 Etanol  
 Fosfatbufret saltvann (PBS)  
 Glycerol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>  
 Glysin, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>  
 Kaliumklorid, KCl  
 Kaliumdihydrogenfosfat, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 Magnesiumklorid, MgCl<sub>2</sub>  
 β-mercaptoethanol  
 Natriumklorid, NaCl

### Leverandør

Qiagen  
 Oxoid  
 Oxoid  
 Sigma-Aldrich  
 Bio-Rad  
 Merch  
 Merck  
 Sigmna-Aldrich  
 Sigma-Aldrich  
 Merck  
 Duchefa Biochemie  
 Merck  
 Merck  
 Merck  
 Merck  
 Sigma-Aldrick  
 Merck

Natriumdihydrofenfosfat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
PeqGreen	Peqlab
Polyethylen glycol, PEG <sub>1450</sub>	Aldrick
SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	Lonza
Sukrose, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	VWR Chemicals
Super Optimal broth with Catabolite Repression (S. O. C.)	Invitrogen
Tris-base, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma
Tween-20	Sigma-Aldrick

## 2.3 Kits

### Kit

	<u>Leverandør</u>
eBlot <sup>™</sup> L1 Fast Wet Transfer System	GenScript
eBlot L1	
eBlot L1 NC Membrane	
eBlot L1 NC Membrane Transfer Buffer (5x)	
eBlot L1 NC Membrane Equilibration Buffer (10x)	
eBlot L1 NC Transfer Sponge	
Heat&Run gDNA removal kit	ArcticZymes
10X reaction Buffer	
HL-dsDNase	
In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning kit	Clontech
5X In-Fusion <sup>®</sup> HD Enzyme Premix	
iScript <sup>™</sup> Reverse Transcription Supermix	Bio-Rad
Novex <sup>®</sup> NuPAGE <sup>®</sup> SDS-PAGE Gel system	Invitrogen
NuPAGE <sup>®</sup> Novex Bis-Tris gels 8 cm x 8 cm x 1 mm, 10 wells	
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Sample Buffer (4X)	
NuPAGE <sup>®</sup> Reducing agent (10X)	
The NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
The NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up columns	
Collections Tubes, 2 mL	
Binding Buffer NTI	
Wash Buffer NT3	
Elution Buffer NE	
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid	Macherey-Nagel
Buffer A1	
Buffer A2	
Buffer A3	
Buffer A4	
Elution Buffer AE	
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid/Plasmid (NoLid) column	
Collection Tubes, 2 mL	
Qubit <sup>®</sup> dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen



Qubit® Assay Tubes	
Qubit® dsDNA BR buffer	
Qubit® dsDNA BR reagent	
Qubit® dsDNA BR standard 1 and 2	
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	NEB
2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix	Bio-Rad
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Spin Columns (pink)	
Collection Tubes (1.5 ml)	
Collection Tubes (2 ml)	
Buffer RLT	
Buffer RW1	
Buffer RPE	
RNase-Free Water	
SNAP i.d. ® Protein Detection System	Millipore
SNAP i.d. ® Single Well Blot Holder	
SNAP i.d. ® Spacer	
SNAP i.d. ® Blot roller	
Filter paper	
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Luminol/Enhancer	
Stable Peroxide Buffer	

## 2.4 Agar og medier

### Medium

#### Brain-Heart-Infusion (BHI)

Medium: 37 g BHI løst i 1 L dH<sub>2</sub>O.  
 Sterilisert i en CertoClav ved 115 °C i 15 min.  
Agar: BHI-medium med 1,5 % (w/v) agar.  
 Etter sterilisering ble medium nedkjølt til omtrent 60 °C før  
 aktuelt antibiotikum ble tilsatt, og mediet ble fordelt i petriskåler.

#### De Man, Rogosa, Shape (MRS)

Medium: 52 g MRS løst i 1 L dH<sub>2</sub>O.  
 Sterilisert i en CertoClav ved 115 °C i 15 min.  
Agar: MRS-medium med 1,5 % (w/v) agar.  
 Etter sterilisering ble medium nedkjølt til omtrent 60 °C før  
 aktuelt antibiotikum ble tilsatt, og mediet ble fordelt i petriskåler.

#### MRSSM-medium

5,2 g MRS  
 17,1 g sukrose (0,5 M)  
 2,0 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,1 M)

Leverandør

Oxoid

Oxoid

## MATERIALER

---

dH<sub>2</sub>O til 100 ml  
Løsningen ble steriltfiltrert (0,2 µm porestørrelse på filteret)

S.O.C medium

Invitrogen

Ferdiglaget og klar til bruk fra leverandør

### 2.5 Buffere

#### Buffere

Fosfatbufret saltvann (PBS)

Sigma-Aldrich

Ferdiglaget og klar til bruk fra leverandør

Tris-acetate/EDTA (TAE) 50x

242 g Tris base  
57,1 mL eddiksyre  
100 mL 0,5 M EDTA, pH8  
dH<sub>2</sub>O til 1 liter

Trisbuffret saltvann (TBS)

150 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl, pH8

TTBS

TBS  
0,1 % (w/v) Tween-20

### 2.6 Proteiner og enzymer

#### Protein/Enzym

#### Leverandør

Antistoffer

Anti-Mouse IgG-FITC  
ESAT6 Mouse mcAb (ab26246)  
HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG

Sigma  
Abcam  
Invitrogen

The BenchMark® Protein Ladder  
Bovine serumalbumin (BSA)  
FastDigest® Green Buffer  
FastDigest® Restriksjonsenzymer

Invitrogen  
Sigma  
Thermo Scientific  
Thermo Scientific

HindIII  
MluI

Inducer peptid (SppIP)  
MagicMark® XP Western Protein Standard  
RED Taq DNA Polymerase Master Mix

CASLO  
Invitrogen  
VWR

## 2.7 DNA

### DNA

### Leverandør

#### DNA-standarder

GeneRuler™ 1 kb DNA ladder  
100 bp DNA ladder

Fermentas  
NEB

## 2.9 Primere

Primere er oligonukleotider som ble benyttet i PCR-reaksjoner (seksjon i 3.7) og sekvensering (seksjon i 3.13). In-fusion primere ble designet for hvert plasmid som beskrevet i protokoll for In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual. Primere benyttet i dette arbeidet er presentert i tabell 2.1.

**Tabell 2.1. Sekvenser og beskrivelse av primere benyttet i dette arbeidet.** Restriksjonssete er markert med understrek i sekvens.

Ologonavn	Sekvens	Restriksjons- enzym	TM u/hale	TM m/hale	Beskrivelse
3001cwa_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> GCCACTGCCG ACGGTACA	MluI	65	76	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_3001
3001cwa_R	CTGTAATTTGA <u>AAGCTT</u> CTAGGCGCGT CGCTTCC	HindIII	63	70	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_3001
1643cwa_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> ACGCAAACCG TACATTATCA	MluI	56	70	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_1643
1643cwa_R	CTGTAATTTGA <u>AAGCTT</u> CTAATTATGAC GTTTCTTCAAAATTGCA	HindIII	56	64	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_1643
1643cwa_short_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> AAGCCAACCG CGGCTC	MluI	62	76	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_1643_short
1643cwa_long_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> TTGACTGGTG ACTATCAGAC	MluI	56	70	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_1643_long
2940cwa_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> GCGGGTACTC AAGATCAGGT	MluI	61	74	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_2940
2940cwa_R	CTGTAATTTGA <u>AAGCTT</u> TTAATCAGTTG TTTTATGGCGC	HindIII	55	63	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_2940
0373cwa_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> GGTTATGCGT GGGCAGCT	MluI	64	75	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_0373
0373cwa_R	CTGTAATTTGA <u>AAGCTT</u> TTAGTCACGCC CTCGTTTC	HindIII	58	66	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_0373
msa-cwa_F	CATGTTTGCA <u>ACGCGT</u> CAATTTGCGG CCGTGGATA	MluI	61	73	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_msa
msa-cwa_R	CTGTAATTTGA <u>AAGCTT</u> CTACTCTTTGT GCTGTCCG	HindIII	58	66	In-Fusion primer. Amplifisering av cwa_msa
SeqR	CCTTATGGGATTATCTTCCTTATTCT C		57		Revers sekvenseringsprimer for pSIP-vektorer
Ag85_F	GGGATATTAACACGCCAGCT				ddPCR primer. Amplifisering av antigen Ag85
Ag85_R	CCCGATTGGCTGATAACCAT				ddPCR primer. Amplifisering av antigen Ag85

## 2.10 Plasmider og bakteriestammer

Plasmider benyttet i dette arbeidet er presentert i tabell 2.2.

**Tabell 2.2. Plasmider benyttet i dette arbeidet.** Beskrivelse av plasmidene er gitt.

Plasmid	Beskrivelse	Kilde
pEV	Tom vektor. pSIP401 derivat uten målgen.	Fredriksen et al. (2012)
pLp_1261_Ag85B_E6_DC	Et derivat av pSIP401 der signalsekvensen Lp_1261 for lipoproteinanker er festet til Ag85B-E6-DC.	Øverland (2013)
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2	Et derivat av sSIP4+1 for produksjon av DC-Ag85B-E6. Lp_3050 er signalsekvensen for celleveggankring.	Øverland (2013)
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa0373	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa0373 har erstattet cwa2.	Dette arbeidet
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1229	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa1229 har erstattet cwa2.	Dette arbeidet
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1643M	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa1643M har erstattet cwa2.	Dette arbeidet
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1643S	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa1643S har erstattet cwa2.	Dette arbeidet
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1643L	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa1643L har erstattet cwa2.	Dette arbeidet
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2940	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa2940 har erstattet cwa2.	Dette arbeidet
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa3001	Et derivat av pLp_3050_DC_Ag85D_E6_cwa2 der cwa3001 har erstattet cwa2.	Dette arbeidet

Bakteriestammer benyttet i dette arbeidet er presentert i tabell 2.3.

**Tabell 2.3. Bakteriestammer benyttet i dette arbeidet.**

Stammer	Kilde
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Kleerebezem et al. (2003)

### 3. Metode

#### 3.1 *In silico* analyse av subcellulære proteiner i *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Subcellulær plassering av proteinene i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (NC\_004567 – Chromosome) ble predikert ved hjelp av LocateP v2 (Zhou et al., 2008). Proteiner predikert med LPxTG cellevegganker ble videre analysert. Nukleotidsekvensene ble kjørt i protein BLAST (Altschul et al., 1997) for å identifisere tilhørende gen, samt predikert proteinfunksjon. Signalpeptid på gensekvensene ble predikert med SignalP-5.0 (Krogh et al., 2001).

Microbesonline (<http://www.microbesonline.org/>) ble benyttet for nærmere å undersøke predikert proteinfunksjon. Pfam 32.0 (Bateman et al., 2002) sekvenssøk ble brukt for å predikere plassering på potensielle domener i sekvensene. Prediksjon av transmembraneliks i ankerdel av sekvensene ble utført med TMHMM v. 2.0 (Krogh et al., 2001). ATGme (Daniel et al., 2015) ble benyttet for å identifisere bruk av sjeldne kodon i de utvalgte ankersekvensene.

#### 3.2 Dyrking av bakterier

Bakteriene ble dyrket i enten flytende medium eller på agarplater. pSIP systemet brukt i dette arbeidet inneholdt et gen for antibiotikaresistens mot antibiotikumet erythromycin. *Escherichia coli* ble dyrket i «brain-heart-infusion» (BHI) medium på 37°C. I flytende medium ble kulturen dyrket over natt på risting. Kulturer på BHI-agar ble dyrket over to døgn. *E. coli* med pSIP ble selektert ved å tilsette erythromycin i BHI til konsentrasjon 200 µg/mL. *Lactobacillus plantarum* ble dyrket i «De Man, Rogosa and Sharpe» (MRS) medium på 37 °C. Kultur i flytende medium og i MRS-agar ble dyrket over natt. *L. plantarum* med pSIP ble selektert ved tilsetting av erythromycin i MRS til en konsentrasjon på 5-10 µg/mL.

#### 3.3 Langtidslagring av bakterier

For langvarig lagring av bakterier ble en bakteriekultur tilsatt glycerol, og lagret ved -80°C. Glycerol beskytter cellene mot skade når de lagres på lave temperaturer. Bakteriekulturen ble laget ved overnattdyrking i 10 mL vekstmedium (seksjon 3.2). 1 mL av bakteriekultur ble tilsatt 300 µL steril 87% glycerol i et cryorør. Røret ble vendt noen ganger før det ble lagret ved -80°C. For senere kultivering av bakterier fra glycerolstock ble det brukt en tannpirker for å plukke ut en liten mengde frossen glycerolstock som ble overført til et rør med aktuelt vekstmedium og antibiotikum.

### 3.4 Plasmidisolering

NukleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) kitt fra Macherey-Nagel ble benyttet for å isolere plasmid. Protokoll 5.1 isolering av høykopi plasmid DNA fra leverandøren ble fulgt.

### 3.5 Bestemmelse av DNA- og RNA-konsentrasjon

Bestemmelse av DNA-konsentrasjon ble utført med Qubit™ ds BR Assay Kit og Qubit fluorometer fra Invitrogen. Qubit® ds BR reagent ble fortynnet til 1:200 i Qubit® dsDNA BR buffer for å lage en arbeidsløsning. 2 µL av prøven med DNA ble blandet med 198 µL av arbeidsløsningen. DNA-konsentrasjon ble bestemt ved bruk av Qubit fluorometer.

Bestemmelse av RNA-konsentrasjon ble utført med BioPhotometer D30 og en 1 mm kyvette. 2 µL prøve med RNA ble plassert på kyvetten og plassert i BioPhotometer D30. Absorbans ble målt ved 260 nm.

### 3.6 Kutting av DNA med restriksjonszymer

DNA ble kuttet med FastDigest restriksjonszymer. Restriksjonszymer spalter dsDNA ved eller nær en spesifikk sekvens. Enzymene virker optimalt ved 37 °C i en universal buffer, og flere enzymer kan derfor benyttes samtidig.

#### Materialer

FastDigest restriksjonszymer

DNA

10x FastDigest Green Buffer

DH<sub>2</sub>O

#### Prosedyre

1. Komponentene i tabell 3.1 ble blandet i et eppendorfrør (1,5 mL).
2. Løsningen ble inkubert i 1,5 time på 37 °C.
3. Røret ble oppbevart på is til videre bruk eller lagret på – 20 °C for senere bruk.

**Tabell 3.1. Komponenter i reaksjon for kutting av DNA med restriksjonszymer.**

Komponenter	Volum (µL)
Restriksjonsenzym*	5
10X FastDigest Green Buffer	5
DNA	Variabelt (1 µg)
dH <sub>2</sub> O	Til 50

\*) Totalt 5 µL av restriksjonszymer.

### **3.7 Polymerasekjedereaksjon (PCR)**

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en metode for amplifisering av bestemte DNA-sekvenser. PCR baserer seg på DNA-polymerase sin evne til å sette inn nukleotider ved å benytte templat DNA. Metoden krever spesifikke primere, templat DNA, varmestabil DNA-polymerase, og de fire deoksyribonukleotidtrifosfatene (dNTPer).

De generelle stegene i PCR-reaksjon er denaturering, annealing og forlenging. I denaturering separeres eller denatureres DNA-trådene ved høy varme (95 - 98 °C). I annealingssteget senkes temperaturen (50 – 72 °C) til optimal temperatur for binding av primere til deres komplementære sekvens på enkelt trådet templat DNA. Under forlengingen syntetiseres en ny DNA-tråd ved forlenging av primeren, dette skjer ved 72 °C. Designede primere og tilhørende temperatur ved annealingssteg står i tabell 2.1.

#### **3.7.1 PCR-reaksjon ved bruk av Q5-High-Fidelity 2x Master Mix**

PCR reaksjoner ble utført som beskrevet i protokoll for Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix fra leverandør. Det ble utført 50 µL reaksjoner. Etter PCR amplifisering ble PCR produktet isolert etter bruk av gelelektroforese slik som beskrevet i seksjon 3.6.1.

#### **3.7.2 PCR-reaksjon ved bruk av VWR Red Taq DNA polymerase Master Mix**

Metoden ble hovedsakelig benyttet for å kontrollere om bakterier inneholdt ønskelig plasmid etter transformering, kalt koloni PCR. PCR-reaksjonen ble utført som beskrevet i protokoll fra leverandøren for VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix. Det ble utført 50 µL reaksjoner.

Ved koloni PCR ble templat DNA overført fra en koloni på agarskål, med tannpirker, til et PCR-rør. For identifisering av plasmid DNA transformert til *L. plantarum* ble bakteriene lysert i mikroovn, på full styrke, i 1 minutt før resterende komponenter ble tilsatt PCR-røret. Bakteriene ble ikke lysert når plasmidet var transformert til *E. coli*.

### **3.8 Agarose gelelektroforese**

Gelelektroforese er en metode som benyttes for å separere og identifisere DNA, RNA eller proteiner. I agarose gelelektroforese separeres DNA-fragmenter basert på deres størrelse. De negativt ladde fragmentene føres gjennom en agarosegel, mot en positiv pol. Agarosegelen består av porer som fører til at små fragmenter beveger seg raskere gjennom gelen enn lengre fragmenter.

#### Materialer

SeaKem® LE Agarose

1 x TAE-buffer

peqGREEN

Loading dye

DNA størrelsesstandard

GelDoc EZ imager

#### Prosedyre

1. 12 g av SeaKem® LE Agarose ble løst i 1 L TAE-buffer for å lage en 1,2% stockløsning av agarose. Stockløsningen ble autoklavert ved 115 °C i 15 minutter og oppbevart ved 60 °C inntil bruk.
2. En gel ble støpt ved å tilsette 2,5 µL peqGREEN til 60 mL stockløsning, og overføre løsningen til et støpekammer med kam for brønner.
3. Etter 30 minutter var gelen stiv, og kammen ble fjernet. Gelen ble deretter overført til et elektroforesekammer og dekket med TEA-buffer.
4. DNA-prøver ble tilsatt 5 µL Fast Digest green buffer 10X.
5. DNA størrelsesstandard (15 µL) og farget DNA-prøver (opptil 50 µL) ble applisert på gel. Gel ble kjørt i 30-50 minutter på 90 V.
6. GelDoc EZ imager ble brukt for å ta bilde av gel.
7. Ved videre bruk av DNA-fragment ble UV-lys benyttet for utskjæring av DNA-fragmenter med ønsket lengde.

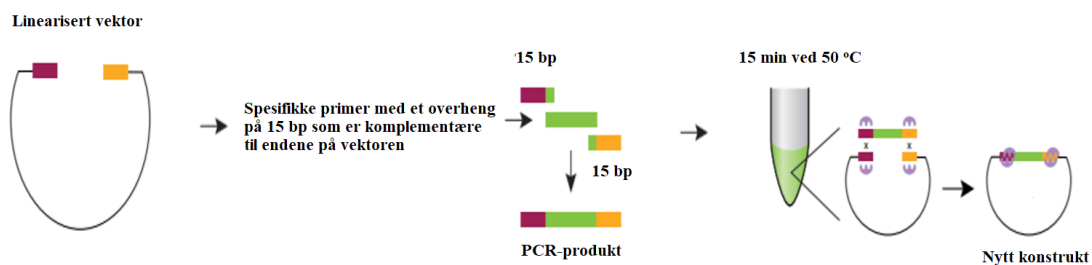


### 3.9 Ekstraksjon av DNA-fragmenter og rensing av DNA fra agarosegel

NukleoSpin® Gel and PCR Clean-up, fra MACHEREY-NAGEL ble brukt for ekstrahering av DNA-fragmenter og rensing av DNA amplifisert av PCR fra agarosegel. Protokoll 5.2 «DNA extraction from agarose gels» fra leverandøren ble fulgt. Etter rensing av isolerte fragmenter ble DNA-konsentrasjonen bestemt, prosedyre beskrevet i 3.5.

### 3.10 Ligering In-Fusion kloning

In-Fusion HD cloning ble benyttet for å klonere gener inn i en linearisert vektor. In-Fusion HD cloning kit inneholder enzymer som gjenkjenner et 15 bp overheng på hver ende av PCR-fragmentet, som er komplementær til endene av den lineariserte vektoren (Figur 3.1). Overhengen er en del av primerne (seksjon 2.9) benyttet i PCR-reaksjonen som produserte DNA-fragmentet.



**Figur 3.1. Illustrasjon av forenklet In-Fusion kloning prosedyre.** En linearisert vektor ble først laget ved hjelp av kutting med restriksjonsenzymmer. Genspesifikke primere med et 15 bp overheng (røde og gule blokker) som er komplementær til endene på vektoren, ble laget. Primerne ble brukt for å produsere PCR-produkt, som ble blandet med linearisert vektor og enzymløsning. Illustrasjonen er en modifisert versjon av originalen fra In-Fusion® Cloning Kit User Manual.

#### Materialer

5X In-Fusion HD Enzyme Prefix

Vektor

PCR-produkt

#### Prosedyre

1. In-Fusion® Molar Calculator (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>.) ble brukt for å bestemme mengde linearisert vektor og renset PCR-produkt benyttet i hver reaksjon. Renset PCR-produkt ble tilsatt i en 2-ganger-molart overskudd i forhold til vektoren.

2. 2  $\mu\text{L}$  5X In-Fusion HD Enzyme Prefix, vektor og PCR-produkt ble blandet i et eppendorfrør. Totalvolum ble justert med  $\text{dH}_2\text{O}$  til 10  $\mu\text{L}$ .
3. Løsningen ble inkubert i 15 minutter på  $50^\circ\text{C}$ , og deretter plassert på is.
4. Ligeringsproduktet ble brukt videre i transformering eller lagret på  $-20^\circ\text{C}$  til senere bruk.

### 3.11 Tillaging av elektrokompetente *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Kompetente bakterieceller har evnen å ta opp fritt, ekstracellulært genetisk materiale ved å bli transformert. Elektrokompetente *Lactobacillus plantarum* tar til seg genetisk materiale når de utsettes for elektrisk puls, som gjør celleveggen mer gjennomtrengelig. For å lage elektrokompetente *L. plantarum* WCFS1 ble cellene dyrket i MRS-medium med glysin. Under vekst vil glysin erstatte L-alanin i celleveggen, dette fører til at celleveggen blir lettere gjennomtrengelig slik at den kan ta opp plasmid. Prosedyren er basert på prosedyren først beskrevet i Aukrust et al., 1995.

#### Materialer

MRS-medium

MRS-medium + 1% glycin

30% w/v PEG<sub>1450</sub>

MRSSM (MRS + 0,5 M sucrose + 0,1 M  $\text{Mg Cl}_2$ )

#### Prosedyre

1. 1 mL av *L. plantarum* overnattekultur ble benyttet for å lage en seriefortynning ( $10^{-1}$  –  $10^{-10}$ ) i MRS + 1% glycin. Kulturene ble inkubert over natt på  $37^\circ\text{C}$ .
2. 1 mL av kulturen med en  $\text{OD}_{600}$  på  $2,5 \pm 0,5$  ble videre fortynnet i forvarmet ( $37^\circ\text{C}$ ) 20 mL MRS + 1% glycin. Kulturen ble videre dyrket til den nådde logaritmisk fase ( $\text{OD}_{600}$  på  $0,7 \pm 0,07$ ). Deretter plassert på is i 10 minutter.
3. Kulturen ble sentrifugert på  $5000 \times g$  i 5-10 minutter ved  $4^\circ\text{C}$ , og supernatant ble fjernet.
4. Pelleten ble umiddelbart resuspendert i 5 mL iskald 30% PEG<sub>1450</sub>, porsjonert på 40  $\mu\text{L}$  prøver i eppendorfrør og fryst ved  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.12 Transformering

#### 3.12.1 Transformering av kjemisk kompetente *Escherichia coli*

One Shot® TOP10 Chemically Competente *E. coli* fra Thermo Fisher ble benyttet for å utføre transformering av kompetente *E. coli* med ligeringsprodukt (seksjon 3.10). Protokoll fra leverandøren ble fulgt.

#### 3.12.2 Transformering av elektrokompetente *Lactobacillus plantarum*

##### Materialer

Elektrokompetente *L. plantarum* WCFS1 (seksjon 3.12)

Plasmid

MRSSM-medium

MRS-agar med erythromycin (10 µg/mL)

GenePulser® Electroporation kyvette 0,2 cm på is

Bio-Rad GenePulser® II

Bio-Rad Pulse controller plus

MRS-agar skåler

##### Prosedyre

1. Elektrokompetente *L. plantarum* WCFS1 ble tint på is og tilsatt 5 µL plasmid. Løsningen ble hurtig overført til en nedkjølt elektroporingskyvette. Det ble kontrollert at løsningen ikke inneholdt luftbobler.
2. Kyvetten ble plassert i en elektroporator (GenePulser® II), innstilt på 1,5 kV spenning, 25 µF kapasitans og 400Ω resistans. Kyvetten ble så utsatt for en spenningspuls.
3. Løsningen i kyvetten ble tilsatt 950 µL kald MRSSM og blandet ved resuspending. De transformerte cellene ble overført til et sterilt eppendorfrør.
4. Cellene ble inkubert ved 37°C i over 2 timer før 100 µL ble spredd på MRS-agar med erythromycin (10 µg/mL). Skålene ble inkubert ved 37°C i et døgn.

### 3.13 Sekvensering av isolert plasmid

Isolert plasmid fra vellykket transformerte kolonier, påvist ved koloni PCR (seksjon 3.7.2) ble sendt til sekvensering hos Eurofins Genomics. I et eppendorfrør ble plasmidet (400-500 ng) blandet med 25 pmol primer og dH<sub>2</sub>O til totalvolum 11 µL. Primere benyttet i sekvenseringene var SekR og designet forward og revers primer for innsatt ankersekvens (tabell 2.1). Returnert sanger-sekvensering ble analysert ved bruk av CLC DNA Main Workbench 7.

### 3.14 Forarbeid av prøver for analyse av genprodukt i *Lactobacillus plantarum*

#### 3.14.1 Kultivering og høsting av *Lactobacillus plantarum*

##### Materialer

MRS-medium

Erythromycin 10 mg/mL

Induserpeptid SppIP 0,1 mg/mL

##### Prosedyre

1. Overnattskultur av *L. plantarum* ble overført til 15-50 mL forvarmet (37 °C) MRS med erythromycin (10 µg/mL), til OD<sub>600</sub> rundt 0,1 – 0,15.
2. Kulturen ble inkubert i 37°C til OD<sub>600</sub> lik 0,28 – 0,33. Induseringspeptid (SppIP) ble tilsatt konsentrasjon 25 ng/µL, og røret ble snudd en gang for blanding.
3. Kulturen ble inkubert i 3 timer ved 37°C. Deretter ble den satt på is for å stanse bakterieveksten.
4. Cellene ble høstet ved sentrifugering på 5000 x g i 5 minutter ved 4 °C. Supernatant ble fjernet.

#### 3.14.2 Preparering av cellelysate ved bruk av glasskuler

##### Materialer

FastPrep-rør

Glasskuler

FastPrep® - 24 Tissue and Cell Homogenizer

PBS

##### Prosedyre

1. Bakterier ble høstet etter beskrivelsen i seksjon 3.15.1.
2. Pellet ble vasket 3 ganger i 10 mL kald PBS. Sentrifugering på 5000 x g i 5 minutter ved -4 °C. Ved behov ble pelleten fryst ved -20 °C for senere bruk.
3. Pellet ble resuspendert i 1 mL kald PBS. Suspensjonen ble overført til et FastPrep-rør med omtrent 1,5 g glasskuler
4. FastPrep-rør ble plassert i FastPrep® - 24 Tissue and Cell Homogenizer og ristet ved 6,5 m/ i 45 sekunder. Etter risting ble tuben satt på is i 5 minutter. Dette ble gjentatt 3 ganger.
5. Rørene ble sentrifugert ved 16,000 x g i 1 minutt ved 4 °C. Supernatant ble overført til nytt eppendorfrør.
6. Prøven ble sentrifugert ved 16,000 x g i 1 minutt ved 4 °C for å fjerne resterende glasskuler.
7. Proteinekstrakt ble overført til nytt eppendorfrør som ble oppbevart ved -20 °C.

### **3.15 Vekstkurve**

#### Materialer

96-brønners plate

Forseglingsplast

Plateleser

SkaniRE 6.0.1

#### Prosedyre

1. 200 µL av induerte prøver fra steg 2 i seksjon 3.14.1 ble overført til en steril 96-brønners plate. Ved analyse av uindusert prøve ble 200 µL overført til platen umiddelbart før induering av resten av prøven. Platen ble forseglet og plassert i plateleser.
2. Vekstkurve ble laget med programmet SkaniRE 6.0.1.

### 3.16 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode som kan benyttes til å undersøke om et spesifikt protein finnes på utsiden av cellene. Målproteiner detekteres ved at bakterier passerer en laserstråle, en etter en. Celler med antigenet på overflaten detekteres ved at sekundærantistoffet gir et fluoriserende signal som registreres.

#### Materialer

PBS

PBS/2% BSA

Primærantistoff anti-ESAT6 (abcam ref ab26246) 1:1000

Sekundærantistoff (Anti-Mouse IgG-FITC)

#### Prosedyre

1. Bakterier ble høstet etter beskrivelsen i seksjon 3.14.1. Det ble høstet 500  $\mu\text{L}$  av kultur med  $\text{OD}_{600}$  lik 1.
2. Kulturen ble sentrifugert ved 5000 x g i 2-3 minutter, og supernatant ble kastet. Pellet ble vasket med 500-1000  $\mu\text{L}$  PBS, og sentrifugert ved 5000 x g i 3 minutter.
3. En PBS/2% BSA-løsning med primærantistoff ble laget, med 50  $\mu\text{L}$  av PBS/2% BSA og 0,2  $\mu\text{L}$  primærantistoff for hver prøve.
4. Pellet ble resuspendert i 50  $\mu\text{L}$  PBS/2% BSA med primærantistoff. Inkubert i 30 minutter ved romtemperatur.
5. Prøven ble sentrifugert ved 5000 x g i 1 minutt og supernatant ble pipettert ut. Bakteriene ble vasket tre ganger med 600  $\mu\text{L}$  PBS/2% BSA, og sentrifugert ved 5000 x g i 2 minutter.
6. En PBS/2% BSA-løsning med sekundærantistoff ble laget, med 50  $\mu\text{L}$  av PBS/2% BSA og 0,3  $\mu\text{L}$  FITC konjugert sekundærantistoff for hver prøve.
7. Pellet ble resuspendert i 50  $\mu\text{L}$  PBS/2% BSA med sekundærantistoff. Prøven ble dekket til med aluminiumsfolie og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur.
8. Prøven ble sentrifugert ved 5000 x g i 1 minutt, og supernatant ble pipettert ut. Bakteriene ble vasket fire ganger med 600  $\mu\text{L}$  PBS/2% BSA. Sentrifugert ved 5000 x g i 2 minutter. Cellene ble resuspendert i 1 mL av PBS.
9. 100  $\mu\text{L}$  prøve ble fortynnet i 900  $\mu\text{L}$  PBS i et rent reagensglass før analysen på Flow cytometeret ble startet.

### 3.17 Konfokal laserskanning-mikroskopi

Deteksjon av antigener på overflaten av bakteriene følger samme prinsipp som i flowcytometri (seksjon 3.16). Analysen ble utført med Zeiss LSM 700 Confocal Microscope og bruk av Zen programvare.

### 3.18 Bestemmelse av CFU

#### Materialer

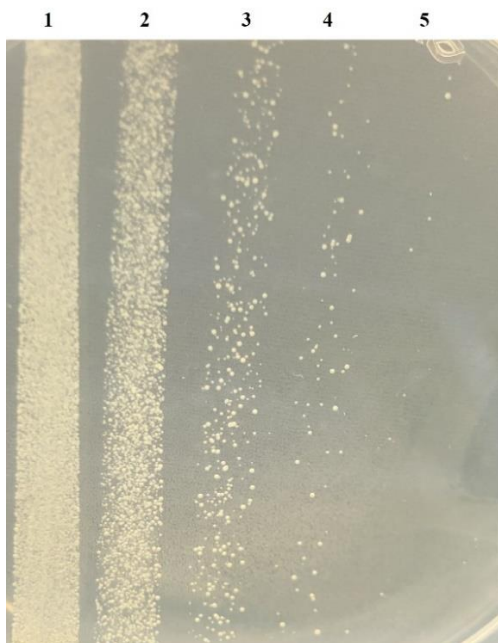
Ringers

MRS-agar skåler

Multipipette

#### Prosedyre

1. 20  $\mu\text{L}$  pipettert ut av en prøve (seksjon 3.14.1 steg 3) 3 timer etter inkubering ble fortynnet i 180  $\mu\text{L}$  Ringers i en mikrotitterplate. Prøven ble videre fortynnet ( $10^{-1}$  til  $10^{-6}$ ).
2. 20  $\mu\text{L}$  av de fortynnede prøvene ble spredt i striper på MRS-skåler (Figur 3.2), med 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  erythromycin.
3. Skålene ble inkubert i  $37^{\circ}\text{C}$  over natt. Kolonier ble telt i stripen, med passende koloniantall.



**Figur 3.2.** Fortynningsrekke av *L. plantarum* med pLp\_3050\_DC\_Ag85B\_E6\_cwa1643, spredt 3 timer etter indusering. 1) Fortynning  $5 \cdot 10^{-3}$ , 2) Fortynning  $5 \cdot 10^{-4}$ , 3) Fortynning  $5 \cdot 10^{-5}$ , 4) Fortynning  $5 \cdot 10^{-6}$  og 5) Fortynning  $5 \cdot 10^{-7}$ . Beregning av CFU, se formel under figur.

Beregning av CFU/mL ble bestemt med formelen:

$$\begin{aligned} \text{koloniantall} * \frac{1\ 000\mu\text{L}}{20\mu\text{L}} * \frac{200\mu\text{L}}{20\mu\text{L}} * \frac{200\mu\text{L}}{20\mu\text{L}} * \text{fortynningsgrad} \\ = \text{koloniantall} * 5\ 000 * \text{fortynningsgrad} \end{aligned}$$

### 3.19 Gelelektroforese av proteiner

I gelelektroforese av proteiner, utført med metoden «Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electroforesis» (SDS-page), blir denaturerte proteiner separert etter deres størrelse. SDS-page er en hurtig og trygg metode for analysering og visualisering av proteinprøver. For å denaturere proteinene blir prøvene tilsatt litium dodecylsulfat (LDS; SDS analog) og ditiotreitol (DTT), og kokt. Disulfidbroer i proteiner brytes med DTT. LDS bryter ikke-kovaletene bindinger, og binder seg til proteinet slik at det forblir denaturert. Proteinene får en netto negativ ladning etter denatureringen, som benyttes for å separere proteinene i et spenningsfelt. Polyakrylamidgelen har en porestruktur som gjør at lette proteiner vandrer lengre enn tyngre proteiner. Størrelsen på molekylene, i form av molekylær vekt (kDa), bestemmes ved bruk av en proteinstandard.

#### Materialer

NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels

NuPAGE® LDS Sampler Buffer (4x)

NuPAGE® Reduction Agent (10 x)

TGS-buffer

Magic Marx XP Western Protein Standard (10 µL på gel)

Celleekstrakt

#### Prosedyre

1. 7,5 µL LDS Sample Buffer (4 x), 3 µL Reduction Agent (ditiotreitol (DTT)) (10 x) og 20 µL prøver ble blandet sammen til totalvolum 35 µL.
2. Prøven ble inkubert i kokende vannbad i 10 minutter.
3. Gel ble montert i elektroforesekammeret som ble fylt med TGS-buffer.
4. De opparbeidede prøvene og størrelsesstandard ble applisert på en gel. Mengde prøve ble regulert etter OD fra høstede bakterier ved behov. Gel ble kjørt i 20 minutter på 280V.
5. Gelen ble deretter plassert i 10% etanol i 5-10 minutter for kalibrering før videre analyse.

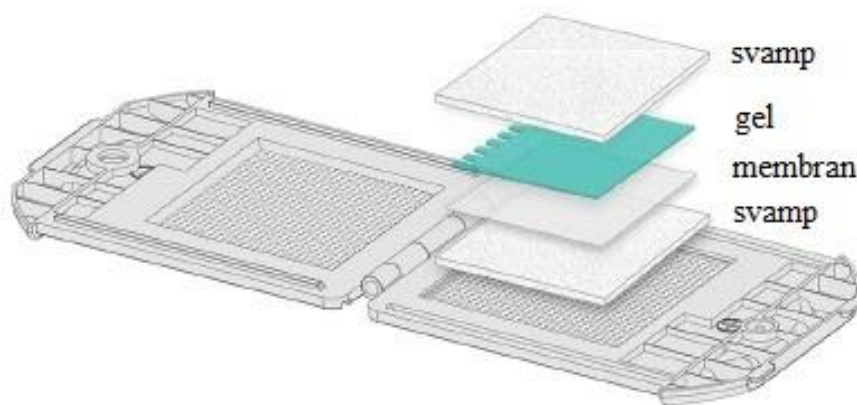


### 3.20 Western blot

Western blot er en metode som benyttes for deteksjon av proteiner ved bruk av antistoff-hybridisering. Proteiner blir først separert på SDS-PAGE gel elektroforese, før de videre blir overført fra gelen til en membran ved bruk av elektronblotting. Membranen behandles med en blokkeringsløsning, som inneholder bovine serum albumin (BSA). Blokkeringsløsningen hindrer uspesifikke interaksjoner med antigen. Membranen blir videre inkubert i primærantistoff som binder til antigenet. Primærantistoffet som ikke binder blir vasket bort før membranen blir inkubert i sekundærantistoff, som binder til primærantistoff. Sekundærantstoffet er konjugert med et enzym, pepperrot peroksidase («horseradish peroxidase», HRP), som oksiderer luminol. Oksideringen av luminol sender ut et detekterbart lys som muliggjør visualisering av antigen.

#### 3.20.1 Blotting med eBlot™ Fast Transfer System

Proteinene ble blottet fra SDS-gel til PVDF membran ved bruk av eBlot™ Fast Transfer system. Komponentene brukt i blottingen ble montert som vist i figur 3.2.



**Figur 3.3. Montering av komponenter i eBlot™ Fast Transfer System.** Kassetten ble åpnet og en svamp ble plassert på siden markert med «+». Membranen ble plassert på svampen, og gelen fra SDS-page ble plassert på toppen. En ny svamp ble lagt på før kassetten ble lukket og plassert i eBlot L1 maskinen.

#### Materialer

eBlot® L1 Fast Wet Transfer System (seksjon

10% etanol

100% etanol

dH<sub>2</sub>O

### Prosedyre

1. Gel fra «Gelelektroforese av proteiner» seksjon 3.19 ble plassert i destillert vann.
2. PVDF-membranen ble aktivert i 100% etanol før den ble bløtlagt i likevektsbuffer (equilibration buffer).
3. I en overføringskassett ble det plassert to svamper med kalibrert membran og gel mellom dem, som vist i figur 3.3.
4. Kassetten ble plassert i eBlot® L1 ast Wet Transfer System, og instrumentet ble kjørt.
5. Membranen ble rensert i destillert vann før videre analyse.

#### **3.20.1 SNAP i.d.® immunodeteksjon**

SNAP i.d.(R) immunodeteksjon-systemet ble brukt for å hybridisere antistoffer til proteinene på membranen. Systemet bruker vakuum til å dra løsningene gjennom membranen. Dette gjør at metoden er raskere enn tradisjonelle metoder.

### Materialer

SNAP i.d.® Protein detection system

TTBS (TBS + 0,1 % v/v tween-20 = 100 µL tween-10 I 100 µL)

TTBS/3% BSA

Primærantistoff anti-ESAT6 (abcam ref ab26246) 1:1000

Sekundærantistoff HRP-rabbit anti-mouse IgG (I litteraturen: 1:20000 fra Sigma)

### Prosedyre

1. Blotholder ble åpnet og vætet med destillert vann før membranen ble lagt inn i holderen med proteinsiden vendt ned.
2. Et filterpapir ble lagt over membranen, og luftbobler ble fjernet. Blotholderen ble lukket og plassert i immunodeteksjonssystemet, slik at proteinsiden vendte opp.
3. Blokkeringsløsningen ble helt over beholderen, 10 mL av gangen, og vakuum ble satt på til all blokkingsløsning var forsvunnet.
4. 3 mL TTBS/3% BSA ble tilsatt 3 µL primærantistoff og vortexet. Løsningen ble helt over beholderen og inkubert i 10 minutter i romtemperatur. Vakuum ble satt på til løsningen var forsvunnet.
5. 10 mL TTBS ble tilsatt 3 ganger samtidig som vakuomet stod på. Vakuum ble slått av når væsken var forsvunnet.

6. 3 mL TTBS/3% BSA ble tilsatt 0,15  $\mu$ L sekundærtstoff og vortexet. Løsningen ble helt over beholderen og inkubert i 10 minutter i romtemperatur. Vakuum ble satt på til løsningen var forsvunnet.
7. 10 mL TTBS ble tilsatt 3 ganger samtidig som vakuomet stod på. Vakuum ble slått av når væsken var forsvunnet.
8. Membranen ble fjernet fra blotholderen og var klar for deteksjon av målprotein.

### **3.20.3 Deteksjon av proteiner med kjemiluminescens**

#### Material

SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate

Lumino/Enhancer

Stable Peroxide Buffer

#### Prosedyre

1. Substratløsning ble laget ved å blande 10 mL Luminol/Enhancer og 10 mL Stable Peroxide Buffer. Membran ble inkubert i substratløsningen i 5 minutter uten lys-eksponering.
2. Azure c400 ble benyttet for visualisering av protein på membran.

### **3.21 Transkripsjonsanalyse**

Droplet digital PCR (ddPCR) ble benyttet for å kvantifisere mRNA nivået av Ag85B. For å utføre transkripsjonsanalysen ble RNA isolert og rensset. Genomisk DNA i prøvene kan påvirke kvantifiseringen av RNA senere i prosessen. Derfor ble resterende genomisk DNA (gDNA), etter rensing, nedbrutt med DNase. RNA i prøvene ble revers transkribert til komplementær DNA (cDNA), som er mer stabil enn RNA. cDNA ble videre analysert med ddPCR for å bestemme antall kopier av antigenet per ng RNA i prøvene.

#### **3.21.1 Isolering av RNA**

For transkripsjonsanalyse ble bakteriekultur høstet 3 og 17 timer etter indusering. Bakterien ble høstet som forklart i seksjon 3.15.1 til steg 3. Etter inkubering ble 2 mL av bakteriekulturen tilsatt 4 mL av RNAProtect Bacteria, for å stabilisere RNA i prøvene. Løsningen ble vortexet og inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. Cellene ble høstet med sentrifugering ved 5000x g i 10 minutter i romtemperatur.

RNA fra høstet bakteriekulturer ble isolert ved bruk av RNeasy Mini Kit fra Qiagen. Protokoll «Mechanical disruption of Bacteria» fra leverandøren ble brukt, samt «Purification of Total RNA from Bacterial Lysate Using the RNeasy Mini Kit».

#### **3.21.2 Fjerning av genomisk DNA**

##### Materialer

RNA

Heat&Run removal kit

##### Prosedyre

1. 8-50 µL av prøven med isolert RNA ble overført til Eppendorfrør på is.
2. For hver 10 µL av RNA ble 1 µL av 10X reaction Buffer tilsatt. Videre ble 1 µL av HL-dsDNase tilsatt løsningen, og blandet lett.
3. Løsningen ble inkubert ved 37°C i 10 minutter. Enzymene ble deaktivert ved inkubering av løsningen ved 58°C i 5 minutter.
4. Konsentrasjon av RNA ble bestemt ved bruk av BioPhotometer (seksjon 2.5).

### 3.21.3 Revers transkripsjon

Revers transkripsjon (RT) ble utført med en supermiks som inneholder alle nødvendige komponenter for revers transkribering, med unntak av templat RNA. Det ble også utført en negativ kontroll for å kontrollere mengde gDNA i hver prøve. Negativ kontroll ble utført med en kontroll supermiks (No-RT), som inneholdt det samme som RT supermiksen med unntak av revers transtriptase.

#### Materialer

iScript™ Reverse Transcription Supermix

iScript™ No-RT Control Supermix

Templat

#### Prosedyre

1. Komponentene i tabell x ble blandet i 0,2 mL PCR-rør på is. Negativ kontroll ble laget med iScript™ No-RT Control Supermix, i stedet for RT supermiks.

**Tabell 3.3. Komponenter i reaksjon for revers transkripsjon av RNA til cDNA**

Komponenter	Volum per reaksjon (µL)
iScript™ Reverse Transcription Supermix	4
Templat RNA	Variabel (1 µg -1 pg total RNA)
Nuklease-fritt vann	Til 20

2. PCR-rørene ble plassert i PCR-maskinen. Maskinen stilles inn etter programmet beskrevet i tabell 3.4.

**Tabell 3.4. Innstillinger i PCR for reaksjon for revers transkripsjon av RNA til cDNA**

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minutt)
Priming	25	5
Revers transkripsjon	46	20
Revers transkripsjon inaktivering	95	1

3. cDNA prøven ble brukt videre eller lagret på -20°C til senere bruk.

### 3.21.4 Droplet digital PCR

ddPCR er en metode som kan benyttes for absolutt kvantifisering av DNA. I ddPCR blir opp mot 20 000 dråper av prøven analysert individuelt. Noen av dråpene inneholder templatet, mens andre dråper vil mangle templatet. Templatet i dråpene amplifiseres ved kvantitativ PCR (qPCR). Etter amplifiseringen vil dråper som inneholder templatet binde til EvaGreen i ddPCR supermiksen. Antall av positive og negative dråper blir målt for hver prøve ved bruk av fluorescens. Absolutt kvantifisering av målsekvensens kopier blir gjort på bakgrunn av antall positive dråper. Absolutt konsentrasjon kalkuleres ved bruk av den statistiske poisson-modellen. I motsetning til andre qPCR metoder krever ikke ddPCR-metoden en standardkurve for å beregne absolutt konsentrasjon. Metoden er mer sensitiv og nøyaktig enn andre qPCR (Hindson et al., 2011; Li et al., 2018).

#### Materialer

Primere

Templat

Nukleasefritt vann

2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix

Droplet generation Oil for EvaGreen

DG8™ Cartidges

QX200 Droplet Generator

Thermal cycler

QX200 Droplet Reader

QuantaSoft programvare

#### Prosedyre

1. En testkjøring ble utført med fortytning (10x til 100,000x) av cDNA prøver for å bestemme fortytningen som gir mest nøyaktig analyse. Nøyaktighet ble bestemt ved å se på ratio mellom positive og totalt antall dråper.
2. cDNA ble fortynnet til optimal fortytning, her 10,000x fortytning.
3. Komponentene i tabell 3.5 ble blandet. 20 µL av EvaGreen ddPCR reaksjonsblandingen for hver prøve ble overført til 8-strips rør, uten å danne bobler.

**Tabell 3.5. Komponenter i EvaGreen ddPCR reaksjonsblanding**

Komponent	Volum per reaksjon (µL)	Sluttkonsentrasjon
2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix	11	1x
2 µL Ag85_F (Tabell 2.1)	1	10 nM
2 µL Ag85_R (Tabell 2.1)	1	10 nM
RNase/DNase-fritt vann	7	-

4. 2 µL av cDNA templat (opptil 100 ng) ble tilsatt reaksjonsblandingen.

5. 20 µL av løsningen ble overført til en prøvebrønn på DG8™ Cartidges. Videre ble 70 µL av QX200 Droplet generation Oil tilført oljebraønnene.
6. DG8™ Cartidges ble plassert i QX200 Droplet Generator, og maskinen ble startet.
7. 40 µL av dråpe-suspensjonen ble overført til en 96-brønn PCR-plate. Platen ble forseglet med en PX1 plateforsegler.
8. PCR-platen ble plassert i en PCR-maskin. Maskinen ble stilt inn etter programmet beskrevet i tabell 3.6.

**Tabell 3.6. Innstilling for PCR syklus for 2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix**

Steg	Syklus	Temperatur (°C)	Tid
<b>Enzymaktivering</b>	1	95	5 minutter
<b>Denaturering</b>	40	95	30 sekunder
<b>Anneling/forlenging</b>	40	60	1 minutt
	1	4	5 minutter
<b>Signalstabilisering</b>	1	90	5 minutter
<b>Oppbevaring</b>	1	4	

9. PCR-platen ble plassert i QX200 Droplet Reader for analyse av dråpene. Resultatet ble videre analysert ved bruk av QuantaSoft programvare.

Resultat fra analyse med QuantaSoft ble omgjort til konsentrasjon (kopier/ng RNA) ved bruk av formelen:

$$\frac{(kopier * \mu L) * fortynningsfaktor}{mengde RNA i revers transkripsjon (ng)} = \frac{(kopier * \mu L) * 10000}{100} = kopier * 100/ngRNA$$

## 4. Resultater

I dette arbeidet ble syv LPxTG celleveggankre, designet basert på gener predikert til å kode for celleveggankrede proteiner i *L. plantarum* WCFS1. Celleveggankrene ble benyttet for å ankre *M. tuberculosis* antigen på celleoverflaten til *L. plantarum*. For å konstruere rekombinante *L. plantarum* ble pSIP-systemet benyttet (seksjon 1.3). Utgangspunktet for alle vektorene i dette arbeidet var et derivat av pSIP401 vektoren (Fredriksen et al., 2010; Kuczkowska et al., 2017; Sørvig et al., 2003), som inneholdt blant annet hybridantigenet Ag85B\_ESAT6 og et dedrittisk cellebindende peptid (DC-pep). Signalpeptidet benyttet i vektorene er fra *L. plantarum* WCFS1 proteinet Lp\_3050, siden dette har vist seg å føre til effektiv sekresjon i en analyse av signalsekvenser i *L. plantarum* (Mathiesen et al., 2009). Samme signalpeptid og hybridantigen ble benyttet i alle vektorene for å muliggjøre en klar sammenligning av ankersekvensene, uten påvirkning fra andre faktorer.

I tidligere forsøk med celleveggankring i *L. plantarum* har en celleveggankersekvens fra lp\_2578 blitt benyttet, kalt cwa2 (Fredriksen et al., 2010). Konstrukt med cwa2 benyttet for celleveggankring av tuberkuloseantigen i *L. plantarum* har vist positiv immunrespons når benyttet som booster vaksine av BCG i mus (Kuczkowska et al., 2019). Cwa2 har imidlertid blitt vist å hemme veksten til verten.

Antigenproduksjon i rekombinerte *L. plantarum* ble indusert ved tilsetning av induserpeptid, SppIP. Induserte bakterier ble høstet, deretter ble antigenproduksjon og bakterievekst analysert. Vekstkurver ble benyttet for å undersøke vekten til bakteriene etter indusering. Levedyktigheten til bakteriene tre timer etter indusering ble undersøkt med bestemmelse av kolonidannende bakterier (CFU/mL). Western blot ble utført for å undersøke produksjon av antigenet i cellene. For å bestemme lokasjon og antydde mengde av hybridantigenet på celleoverflaten ble det utført flowcytometri og konfokal laserskanningsmikroskopi. Droplet digital PCR (ddPCR) ble brukt for å utføre transkripsjonsanalyse av hybridantigenet. De syv nye celleveggankrene ble sammenlignet med originalankeret cwa2.



#### 4.1 *In silico* analyse av subcellulære proteiner i *L. plantarum* WCFS1

Subcellulær plassering av proteiner i LPxTG ble predikert ved bruk av LocateP (Zhou et al., 2008). LocateP pipelinen identifiserer subcellulære preproteiner (SCL) og skiller mellom 7 ulike SCLer, blant annet LPxTG celleveggankrede preproteiner, i gram-positive bakterier (Zhou et al., 2008). Analysen med LocateP av *Lactobacillus plantarum* WCFS1 resulterte i 32 proteiner med LPxTG celleveggankre. Disse proteinene ble videre analysert for å kontrollere at de oppfyller definisjonen på et LPxTG cellevegganker:

*LPxTG celleveggankring krever at preproteinet inneholder et N-terminalt signalpeptid og et C-terminalt celleveggsorteringssignal (CWSS). CWSS starter med et LPxTG-motiv, etterfulgt av et hydrofobisk domene og en hale med positivt ladede aminosyrer. Direkte oppstrøms for LPxTG-motivet er det vanligvis en lavkompleks linkerregion på omtrent 50-150 aminosyrer som er rik på prolin/glysin og/eller treonin/serin-aminosyrer (Siegel et al., 2016).*

Det ble benyttet to metoder, Microbesonline (<http://www.microbesonline.org/>) og BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), for å predikere egenskapene til de 32 proteinene, funnet med LocateP (tabell V-1). Predikerte egenskaper funnet med BLAST er vist i tabell 4.1. Flertallet av proteinene, 17 av 32, ble kun predikert til å være celleoverflate-preproteiner (cell surface protein precursor). Seks av proteinene ble predikert til å være slimbindende preproteiner. Ett protein ble predikert til å ha mannosespesifikk adhesjon, ett protein predikert til å ha celleoverflatehydrolase, og to fikk predikert kollagenbindende domener. Fire av proteinene ble predikert til å være CscD proteiner. Proteiner i CscD-familien er antatt å spille en rolle i anskaffelse av karbon (Siezen et al., 2006). Syv av proteinene ble ikke predikert til å ha et LPxTG celleveggankerdomene av microbesonline, det betyr at disse ikke oppfyller definisjonen på å være LPxTG celleveggankret.

Programmet TMHMM (Krogh et al., 2001) predikerer transmembranhelikser og ble benyttet for å kontrollere at proteinene hadde predikert transmembran i ankerdelen av proteinet. Tabell 4.1 viser at 25 av de 32 proteinene fikk predikert transmembran i ankerdelen. De syv proteinene uten predikert transmembran oppfyller ikke definisjonen på å være LPxTG celleveggankret.

Gen som koder for LPxTG celleveggankrede proteiner forventes å bruke Sec translokasjon med signalpeptidase type I (Sec/SPI). SignalP (Krogh et al., 2001) ble benyttet for å predikere

signalpeptid lengde og type på de 32 genene. Tabell 4.1 viser at alle fikk predikert SEC/SPI, med unntak av ett gen. *Lp\_3454* fikk ikke predikert et signalpeptid og oppfyller dermed ikke kravene for å være LPxTG celleveggankret. *Lp\_1447* ble predikert til å bruke signalpeptidase type II (Sec/SPII), men ved analyse med LipoP ble det predikert som Sec/SPI.

*In silico* analyse av subcellulære proteiner i *L. plantarum* resulterte i 18 proteiner som oppfylte definisjonen på LPxTG celleveggankring. Fullstendig tabell fra analysen er lagt ved i vedlegg, tabell V-1.

## RESULTATER

**Tabell 4.1. Resultat fra *in silico* analyse av LPxTG celleveggankret gen i *L. plantarum*.** Fullstendig tabell er vist i vedlegg, tabell V-1. Predikert funksjon vist her er funnet med BLAST.

Gen	LPxTG-motiv	Lengde uten SP	Predikert funksjon	Predikert PS type	Predikert TM	Oppfyller LPxTG-ankerdef.
lp_0197	LPQTSE	978	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_0373	LPKTNS	1192	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_0800	LPQTGE	2100	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_0923	LPQTDE	778	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_0946	LPQTDE	1151	mucus-binding protein, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_1124	LPQTDE	856	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_1229	LPQTNE	965	mannose-specific adhesin, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_1447	LPQTNE	102	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI*	ja	x
lp_1643	LPQTND	2170	mucus-binding protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2486	LPQTDE	876	mucus-binding protein, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2578	LPQTSE	677	cell surface adherence protein, collagen-binding domain, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2588	LPQTNE	542	cell surface adherence protein, collagen-binding domain, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2795	LPQTGE	1003	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2796	LPQTSE	981	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2925	LPQTDE	797	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2940	LPQTGE	392	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2958	LPQTNE	586	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_2976	LPQTGV	100	cell surface protein precursor, CscD family, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_2977	NQDTV D	321	cell surface protein precursor.	Sec/SPI	ja	
lp_3001	LPQTGE	1048	cell surface protein precursor, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_3059	LPQTDE	1321	adherence-associated mucus-binding protein, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_3065	LPQTSE	117	cell surface protein precursor, CscD family, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_3066	YNQASV	327	cell surface protein precursor	Sec/SPI	ja	
lp_3072	LNKTAV	318	cell surface protein precursor	Sec/SPI	ja	
lp_3074	LPQTSE	92	cell surface protein precursor, CscD family, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_3114	LPQTGE	1985	mucus-binding protein, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	nei	
lp_3115	LNKTAV	325	cell surface protein precursor	Sec/SPI	ja	
lp_3127	LPQTSE	1152	mucus-binding protein, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x
lp_3413	VGATDA	315	cell surface protein precursor	Sec/SPI	ja	
lp_3451	LNDTAV	312	cell surface protein precursor	Sec/SPI	ja	
lp_3454	LPQMNG	92 (med SP)	cell surface protein precursor	Other**	ja	
lp_3677	LPQTDE	87	cell surface protein precursor, CscD family, LPxTG anchor domain	Sec/SPI	ja	x

\*) SignalP predikerte Sec/SPII. LipoP 1.0 ble benyttet for kontroll, og predikerte Sec/SPI.

\*\*\*) Predikasjon av signalpeptid med SignalP ga ikke resultat.

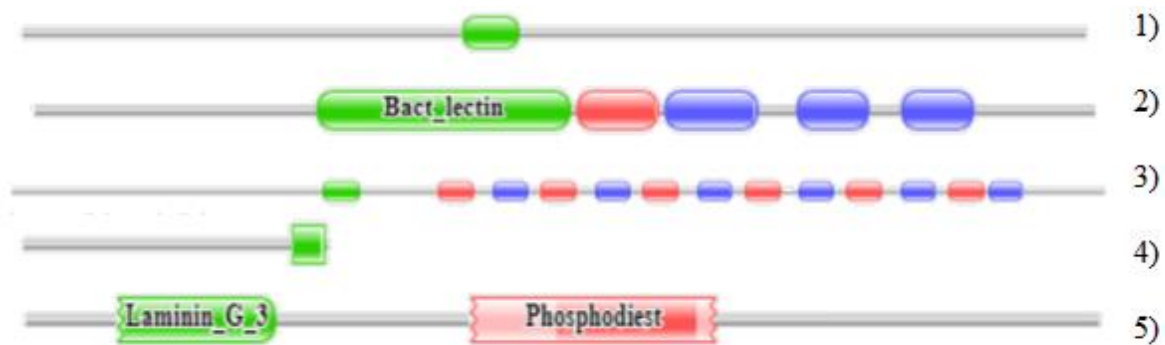
Konsensus LPxTG-motivet fra de 18 proteinene som oppfyller LPxTG celleveggankring, ble funnet og er vist i figur 4.1 (se figur V-1 for utvidet motivsøk). Konsensusmotivet, LPQTxE, stemmer overens med litteraturen hvor konsensus LPxTG-motiv i *L. plantarum* har blitt funnet til å være LPQTxE (Boekhorst et al., 2005). Motivet er sterkt konservert, noe som tyder på høy spesifisitet på den ene sortasen i *L. plantarum*.



**Figur 4.1. Konsensus LPxTG-motiv i *L. plantarum*.** Motivet er basert på 18 LPxTG-motiver fra søk i LocateP etter LPxTG-lignende celleveggankrede gen i *L. plantarum*.

#### 4.1.1 Design av ankersekvenser

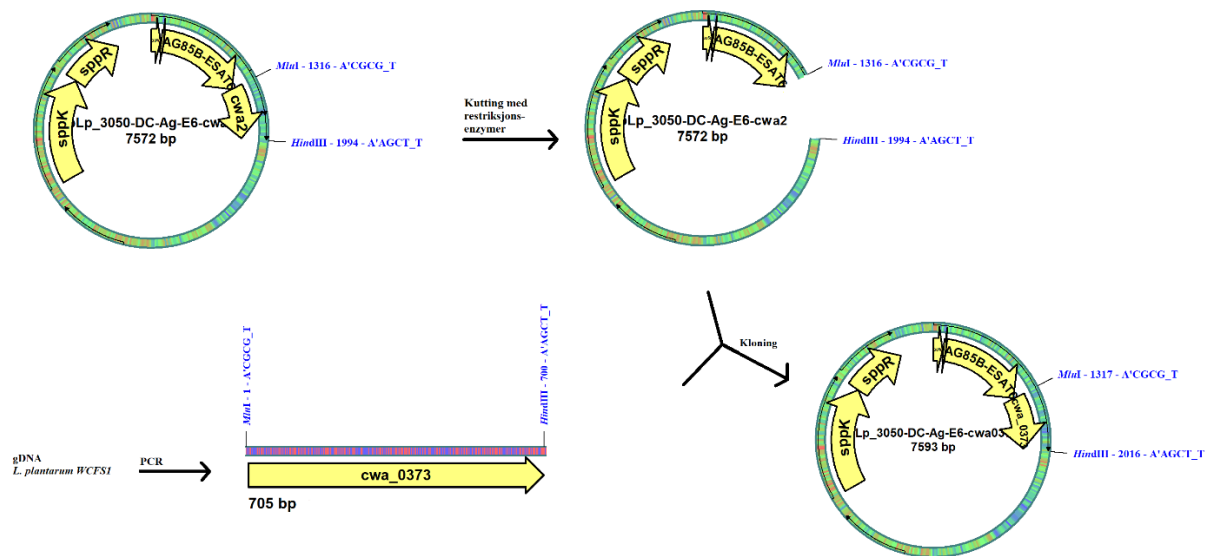
For å oppnå en forståelse av hvilke egenskaper som påvirker effekten av LPxTG cellevegganker var det ønskelig å designe og analysere ankersekvenser med ulike egenskaper. På grunn av begrenset tid ble ikke alle 18 LPxTG celleveggankrede proteiner benyttet for å designe ankersekvenser. På bakgrunn av *in silico* analysen ble det valgt fem gener (*lp\_0373*, *lp\_1229*, *lp\_1643*, *lp\_2940* og *lp\_3001*) som viste variasjon i lengde, LPxTG-motiv og predikert funksjon. Figur 4.2 viser predikerte domener i de utvalgte genene, funnet med Pfam (Bateman et al., 2002). I tillegg til fem ankersekvenser fra de utvalgte genene ble det designet to ankersekvenser med ulik ankerlengde basert på *lp\_1643*. Tabell V-2 viser antall sjeldne kodon benyttet i ankersekvensene, identifisert med ATGme (Daniel et al., 2015).



**Figur 4.2. Pfam-familier i utvalgte LPxTG celleveggankrede proteiner.** 1) lp\_0373 har et predikert MucBP-domene (grønt). 2) lp\_1229 har et predikert bakterielt lektindomene (grønt), et mucBP-domene (rødt) og tre Mub B2-lignende domener (blå). 3) lp\_1643 har et predikert MBG-domene (grønt) og flere alternerende, predikerte mucinbindende domener (rødt) og Mub B2-lignende domener (blå). 4) lp\_2940 har ingen predikerte domener. Den grønne boksen representerer LPxTG-motivet. 5) lp\_3001 har et predikert lamin\_G\_3-domene (grønt) og et fosfodiesterdomene (rødt).

#### 4.2 Konstruksjon av plasmid for celleveggankring av antigen

Strategien for å konstruere plasmid med cwa0373-anker er illustrert i figur 4.3. Designet ankersekvens fra lp\_0373 (figur V-3) ble amplifisert med Q5 PCR (seksjon 3.7.1) ved bruk av spesifikke primere (tabell 2.1) og genomisk DNA fra *L. plantarum* WCFS1 som templat. Primerne bestod av en generell del som ble benyttet i In-fusion kloning og en spesifikk del som bandt til målsekvensen på lp\_0373 under amplifiseringen. Det ble satt inn kuttasetet til *MluI* og *HindIII*, henholdsvis N- og C-terminalt, i ankersekvensen. Ekspresjonsvektoren pLp\_3050\_DC\_Ag85B\_E6\_cwa2 ble renset fra *E. coli* (seksjon 3.4). Vektoren ble kuttet med restriksjonsenzymene *MluI* og *HindIII* (seksjon 3.6) for å isolere ekspresjonsvektoren uten ankersekvensen cwa2. PCR-produktet med ankersekvensen ble klonet inn i ekspresjonsvektoren ved bruk av In-fusion kloning (seksjon 2.10), dette resulterte i plasmidet pLp\_3050\_DC\_Ag85B\_E6\_cwa0373.



**Figur 4.3. Strategi for å konstruere pLp\_3050\_DC\_Ag85B\_E6\_cwa0373.**

pLp\_3050\_DC\_Ag85B\_E6\_cwa0373 er ryggraden i det konstruerte plasmidet og inneholder genene for histidinproteinkinase (sppK) og reseptorregulering (sppR). Oppstrøms for hybridantigen Ag85B-ESAT6 finnes en 12 aminosyresekvens (DC) som binder til dendritiske celler (Curiel et al., 2004) fusjonert til en signalsekvens tatt fra genet *Lp\_3050*.

Samme metode og strategi, som illustrert i figur 4.3, ble benyttet for å lage alle plasmidene vist i tabell 4.2. Egenskapene til ankersekvensene klonet inn i plasmid og kallenavnet på de nye plasmidene er vist i tabell 4.2. Kallenavn på plasmidene ble basert på hvilke ankersekvenser de inneholder, da det kun er ankerdelen som er ulik i plasmidene konstruert i dette arbeidet. I starten av arbeidet ble det laget fem plasmid (cwa0373, cwa1229, cwa1643, cwa2940 og cwa3001). På et senere tidspunkt ble to nye ankersekvenser basert på *lp\_1643* genet konstruert, med varierende lengde på linkerregion lengde.

Tabell 4.2. Oversikt over plasmider konstruert i dette arbeidet.

Plasmid	Kallenavn	Egenskaper til ankersekvens
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa0373	pCwa0373	Ankerlengde på 235 aa. Linkerlengde på 194 aminosyrer (aa). Motiv er LPKTNS. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Ser (29,38%), Ala (18,04%) og Thr (12,37%).
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1229	pCwa1229	Ankerlengde på 138 aa. Linkerlengde på 95 aa. Motiv er LPQTNE. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Thr (16,84%), Pro (12,63%) og Ser/Lys (9,47%). Inneholder deler av et Mub B2-lignende domene.
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1643S	pCwa1643S	Ankerlengde på 57 aa. Linkerlengde på 15 aa. Motiv er LPQTND. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Thr (20,00%) Ala (26,67%) og His/Lys/Gln (13,33%).
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1643	pCwa1643M	Ankerlengde på 236 aa. Linkerlengde på 194 aa. Motiv er LPQTND. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Thr (20,10%), Val (12,89) og Ala (10,82%). Inneholder et Mub B2-lignende domene.
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa1643L	pCwa1643L	Ankerlengde på 301 aa. Linkerlengde på 259 aa. Motiv er LPQTND. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Thr (18,92%) Val (12,36%) og Ala (10,04%). Inneholder et Mub B2-lignende domene og et mucin bindende domene.
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa2940	pCwa2940	Ankerlengde på 172 aa. Linkerlengde på 128 aa. Motiv er LPQTGE. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Thr (22,66%), Ala (15,63%) og Gln (10,16 %).
pLp_3050_DC_Ag85B_E6_cwa3001	pCwa3001	Ankerlengde på 234 aa. Linkerlengde på 194 aa. Motiv er LPQTGE. Hyppigste aminosyrer i linkerregionen: Thr (20,62%), Gly (13,92%) og Ser (11,34%).

Bekreftelse av riktig plasmidkonstruksjon ble utført med koloni PCR (seksjon 3.7.2) ved bruk av designet forward og revers primer for innsatt ankersekvens (tabell 2.1). PCR-produktet ble kjørt på gelelektroforese (seksjon 3.8) hvor størrelsen på produktet ble sammenlignet med forventet lengde på ankersekvens (se tabell 4.2). Plasmid med vellykket deteksjon ved koloni PCR ble sendt til sekvensering hos Eurofins Genomics (seksjon 3.13).

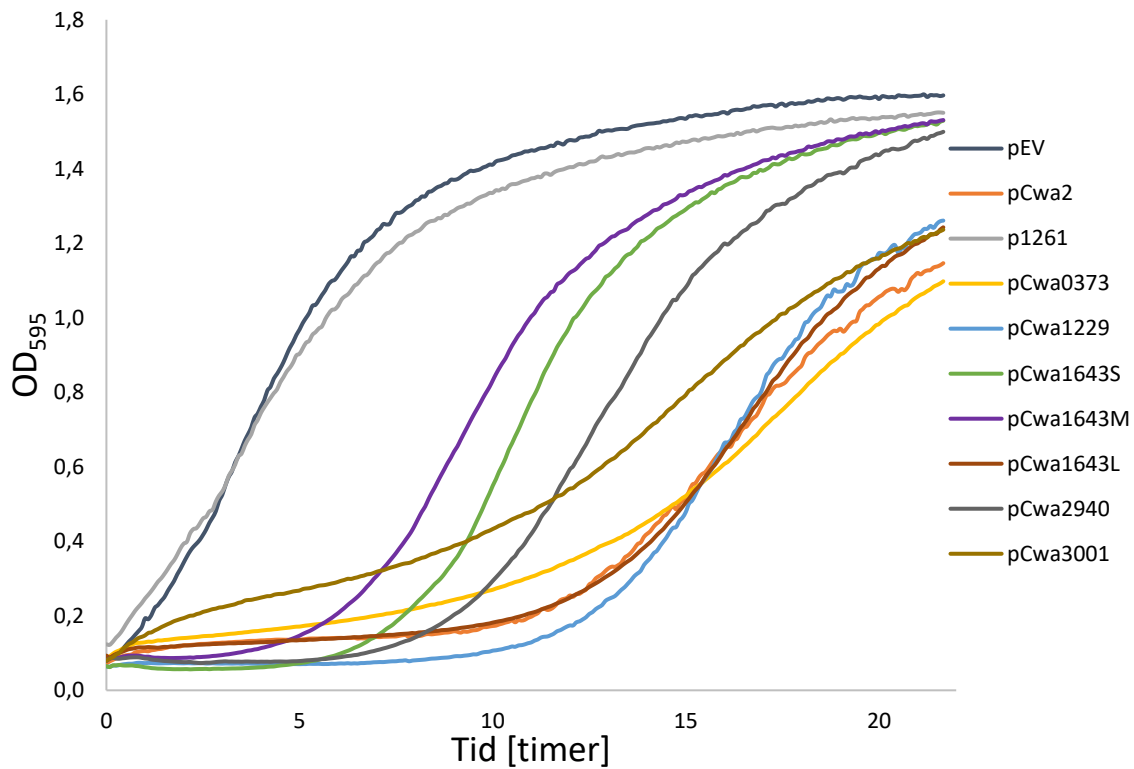
Amplifisering av cwa1229 og cwa1643L resulterte i kortere PCR-produkt enn forventet. Plasmidene ble sendt til sekvensering. Resultatet fra sekvenseringen viste at designet forward primer bandt nedstrøms av forventet bindingssete. Dette resulterte i kortere ankersekvens enn forventet. Forwardprimeren til cwa1229 ble designet til å binde til en repetitivsekvens, men forwardprimeren til cwa1643L bandt til en sekvens som avvik fra primeren med to aminosyrer. Plasmidene ble brukt videre i analysen, og informasjonen vist i tabell 4.2 gjelder for plasmidene brukt i analysene.

### 4.3 Vekstkurve

I tidligere forsøk er det vist at produksjon av heterologe proteiner kan føre til redusert veksthastighet for bakterier, på grunn av stress (Bolhuis et al., 1999; Lulko et al., 2007). Det er tidligere vist at veksten til *L. plantarum* som produserer celleveggankret *M. tuberculosis* antigen med *cwa2*, ble hemmet (Kuczkowska et al., 2017). Veksthastigheten til *L. plantarum* med de ulike plasmidene produsert i dette arbeidet ble undersøkt med vekstkurveanalyse (seksjon 3.15). Fra induseringstidspunktet ble OD<sub>595</sub> målt hvert 5 minutt i 22 timer ved bruk av en plateleser.

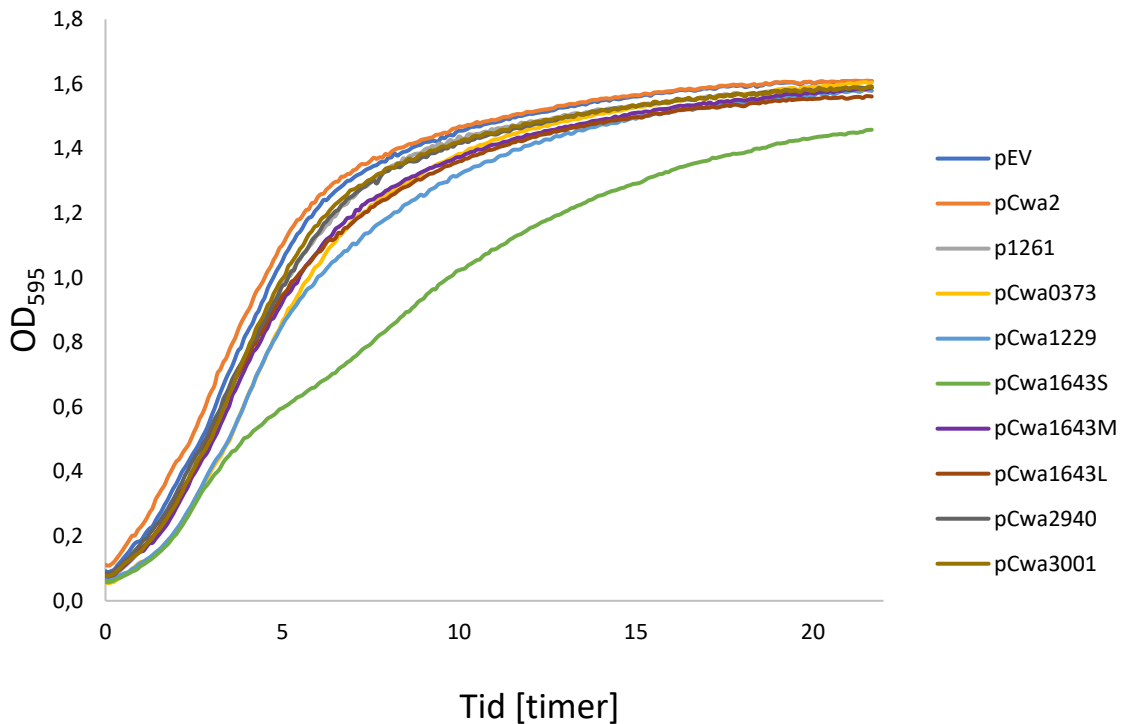
Figur 4.4 viser vekstkurven til rekombinante *L. plantarum* med plasmidene vist i tabell 4.2. Det ble utført to uavhengige forsøk, hvor begge viste samme trend. Resultater fra et av forsøkene er vist i figur 4.4. *L. plantarum* med plasmid uten målgenet (pEV) ble inkludert i analysen da den forventes å ha en normal vekstkurve. *L. plantarum* med pLp\_1261\_Ag85B\_E6\_DC (p1261) plasmid ble brukt for å sammenligne effekten av celleveggankring med lipoproteinankring (se seksjon 1.5). Figur 4.4 viser at *L. plantarum* med pEV og p1261 vokser betydelig bedre enn stammene med celleveggankrede antigen. Alle bakteriene med celleveggankrede antigen viser en forskjøvet vekstfase. Vekstfasen til pCwa1643M, pCwa1643S og pCwa2940 startet etter 6-7 timer, mens de resterende stammene startet å vokse etter 10 timer. Vekstkurven til pCwa3001 følger ikke samme mønster som de andre vekstkurvene. pCwa3001 vokser i de tre første timene etter indusering før hastigheten reduseres og stammen får en slakk vekstfase. I tidligere forsøk hvor *L. plantarum* og pSIP-systemet har blitt benyttet for vaksineproduksjon, har bakteriene blitt høstet tre timer etter indusering (Kuczkowska et al., 2017; Kuczkowska et al., 2019).





**Figur 4.4. Vekstkurve for *L. plantarum*.** Bakteriene ble induisert med SppIP (OD<sub>600</sub> mellom 0.28-0.33) ved tidspunkt 0. OD<sub>595</sub> ble målt hvert 5 minutt i 22 timer.

Det har i tidligere forsøk blitt vist at systemet kan ha lekkasjer, hvor målgenet blir produsert uten indusering (Sørvig et al., 2003; Wiull, 2018). En liten lekkasje kan føre til stress for bakterien, dersom produktet er toksisk, noe som videre kan påvirke veksthastigheten. Det ble utført en vekstkurveanalyse av alle stammene uten indusering. For pCwa1643S og pCwa1643L ble det utført to paralleller som viste samme trend. For de resterende stammene ble det kun utført en parallell. Figur 4.5 viser at de uinduserte stammene vokser relativt likt, med unntak av pCwa1643S som etter omtrent tre timer viser redusert veksthastighet.

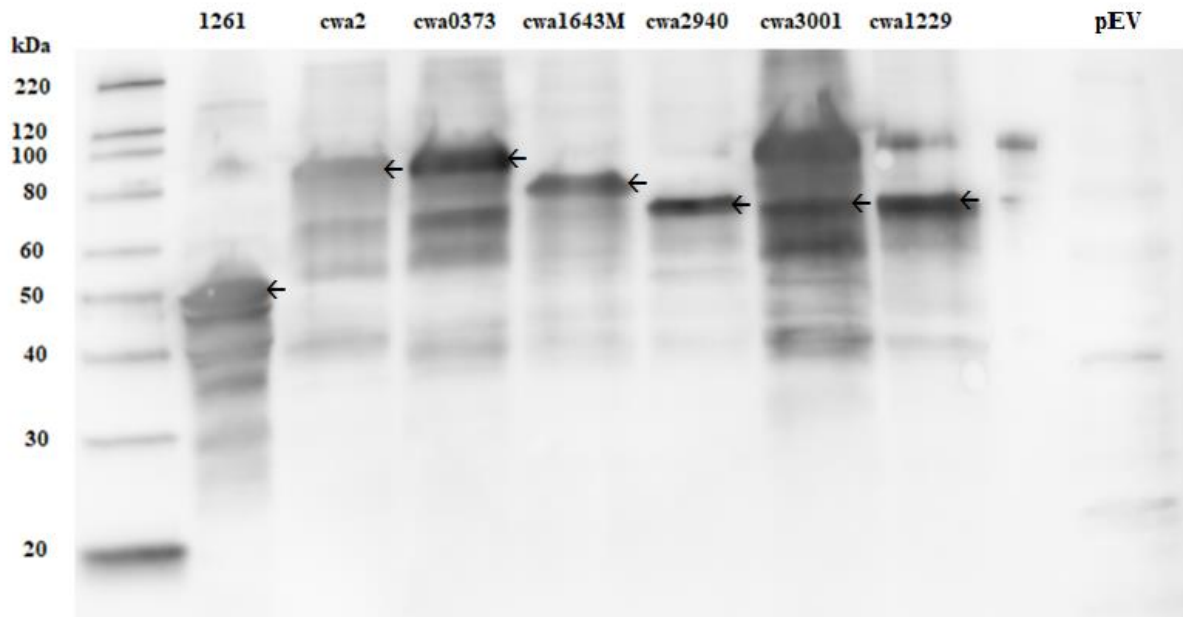


Figur 4.5. Vekstkurve for uindusert *L. plantarum*. OD<sub>595</sub> ble målt hvert 5 minutt i 22 timer.

#### 4.4 Proteindeteksjon med Western blot

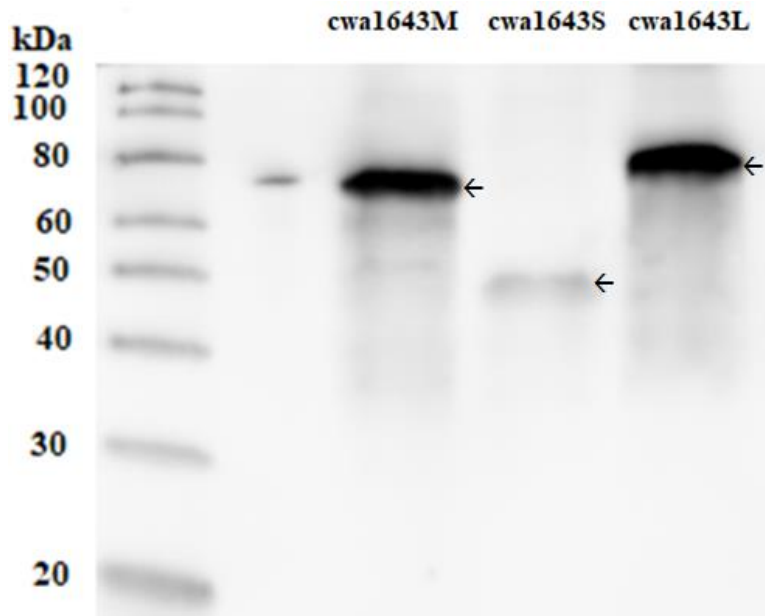
Western blot ble benyttet for å analysere produksjonen av antigenet i *L. plantarum* (seksjon 3.20). Bakteriekulturene ble høstet 3 timer etter induksjon. Cellene ble mekanisk lysert ved bruk av glasskuler (seksjon 3.14.2). OD<sub>600</sub> til kulturene ble brukt for å bestemme mengde proteinekstrakt benyttet i analysen.

Figur 4.6 viser Western blot av proteinekstrakt fra *L. plantarum* med pCwa0373, pCwa1643M, pCwa2940, pCwa3001 og pCwa1229. Proteinekstrakt fra *L. plantarum* med pEV ble benyttet som negativ kontroll. Proteinekstrakt fra *L. plantarum* med pCwa2 og p1261 ble benyttet som positiv kontroll. Fra tidligere forsøk er det vist at heterologe proteiner celleveggankret med pCwa2 er større enn forventet, noe som kan skyldes den kovalente bindingen til peptidoglykan (Fredriksen et al., 2010; Kuczkowska et al., 2017). Resultatet fra de positive kontrollene og den negative kontrollen var som forventet. Hybridantigenet ble suksessfullt produsert av alle bakteriestammene. Figur 4.6 viser at alle celleveggankrede antigen har større molekylvekt enn forventet. Antigenet celleveggankret med pCwa1643M, pCwa2940 og pCwa3001 var nærmest den forventede molekylvekten.



**Figur 4.6. Western blot ble utført for å undersøke antigenproduksjon i *L. plantarum* med plasmider for antigen (ESAT6) med cellevegganker.** MagicMark® XP Western Protein Standard ble brukt som proteinstandard. Teoretisk molekylvekt av målprotein er gitt i parentes; p1261 (48 kDa), pCwa2 (65 kDa), pCwa0373 (66 kDa), pCwa1643M (68 kDa), pCwa2940 (60 kDa), pCwa3001 (66 kDa) og pCwa1229 (56 kDa).

Figur 4.7 viser Western blot av proteinekstrakt fra *L. plantarum* med pCwa1643S og pCwa1643L. Proteinekstrakt fra *L. plantarum* med pEV ble benyttet som negativ kontroll, og cwa1643M ble benyttet som positiv kontroll. Analysen ble kun kjørt en gang. Resultatet fra den positive og negative kontrollen var som forventet. Molekylvekten til antigenet fra pCwa1643L er noe større enn forventet, mens vekten på pCwa1643S er som forventet. Intensiteten på proteinbåndet for pCwa1643S er mye svakere enn båndet for pCwa1643M og pCwa1643L. Dette kan være en indikasjon på mindre produksjon av antigen i pCwa1643S.



**Figur 4.7. Western blot ble utført for å undersøke antigenproduksjon i *L. plantarum* med plasmider for antigen (ESAT6) med cellevegganker.** MagicMark® XP Western Protein Standard ble brukt som proteinstandard. Teoretisk molekylvekt av målprotein er gitt i parentes: cwa1643M (68 kDa), cwa1643S (48 kDa) og cwa1643L (75 kDa).

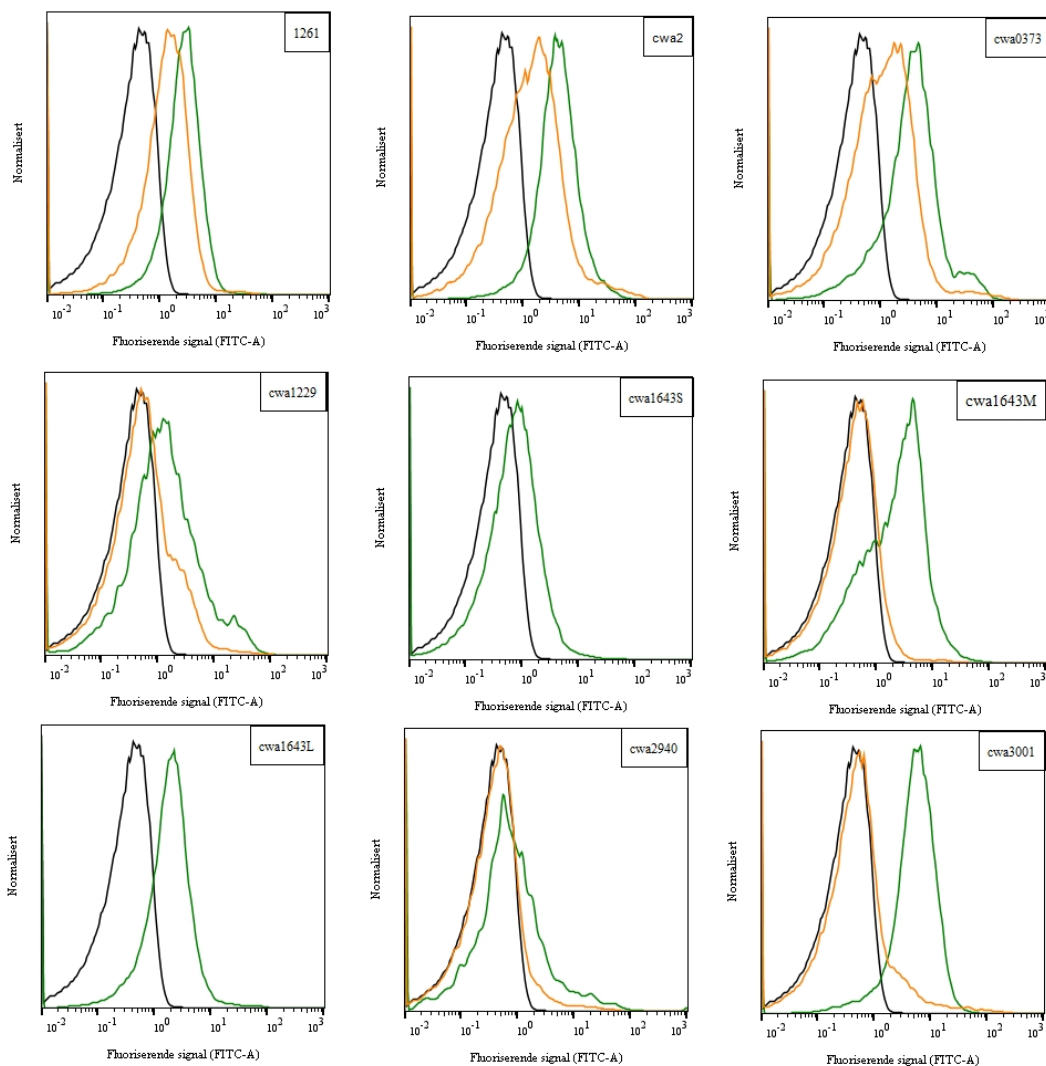
#### 4.5 Proteindeteksjon med flowcytometri

Flowcytometri ble benyttet for å analysere overflateplassering av antigen på *L. plantarum* (seksjon 3.16). Bakteriene ble høstet 3 timer etter indusering. For å detektere antigenet ble bakteriene inkubert med primærantistoff rettet mot ESAT6. Videre ble bakteriene inkubert i sekundærantistoff som binder til primærantistoffet. Overflatelokalisererte antigen ble detektert ved fluoriserende signal (FITC-A) fra sekundærantistoffet.

Fluoriserende signal fra hver bakteriestamme er vist i form av histogrammer i figur 4.8. Fluoriserende signal (x-aksen) er plottet mot et normalisert antall av fluoriserende bakterieceller (y-aksen). Høyere intensitet på fluoriserende signal indikeres ved forskyving av kurven mot høyre. Bakteriestammene ble høstet ved to tidspunkter, 3 (grønne kurver) og 17 (oransje kurver) timer etter indusering, med unntak av pCwa1643S og pCwa1643L som kun ble høstet 3 timer etter indusering. Det ble utført to uavhengige forsøk for bakteriestammene, med unntak av pCwa1643S og pCwa1643L hvor det ble utført et forsøk med to paralleller. En bakteriestamme med p1261 plasmid ble benyttet for å sammenligne effekten av celleveggankring med lipoproteinankring. Ved høsting ble det tatt høyde for forskjell i OD<sub>600</sub>. Antall celler høstet for pCwa2940 og pCwa1229 er lavere enn forventet. Det lave celleantallet fører til lavere kurver i histogrammene, selv etter normalisering.

Det ble ikke registrert fluoriserende signal for den negative kontrollen pEV. Alle bakteriestammene høstet 3 timer etter indusering viser en forskyvning i kurven i forhold til pEV. *L. plantarum* med pCwa1643S, pCwa2940 og pCwa1229 viste lavere signal enn bakteriestammen med p1261. Bakteriestammene med pCwa0373, pCwa1643M og pCwa1643L viste høyere signal enn p1261 og lavere signal enn pCwa2. *L. plantarum* med pCwa3001 viste sterkest intensitet på signalet, av alle.

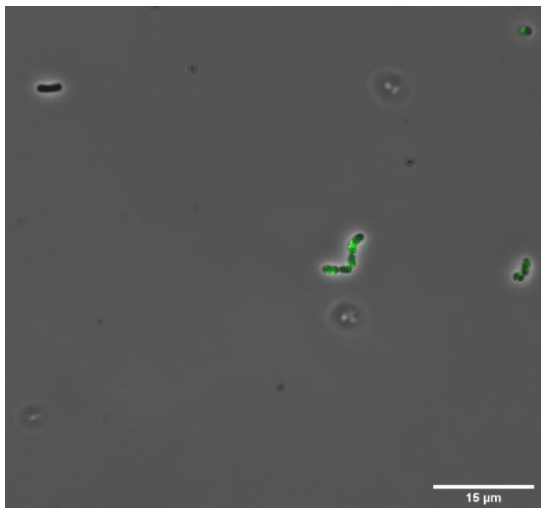
Bakteriestammene høstet 17 timer etter indusering viste generelt lavere signal enn bakteriestammene høstet 3 timer etter indusering. *L. plantarum* med p1261, pCwa0373 og pCwa2 viste noe høyere signal enn pEV. p1261 viste den minste reduksjonen i intensitet 14 timer etter første høsting.



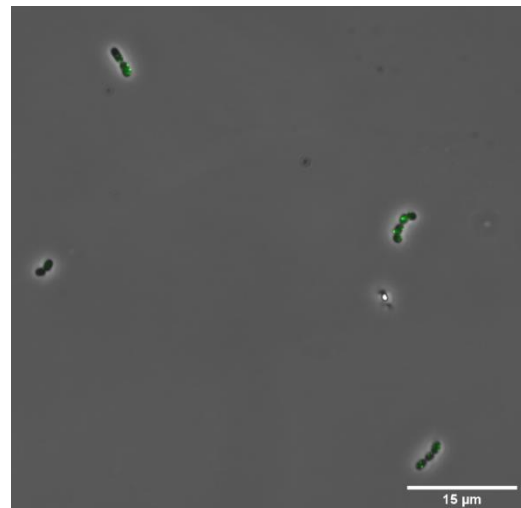
**Figur 4.8. Flowcytometri av *L. plantarum*, høstet 3 timer (grønt) og 17 timer (oransje) etter induksjon.** Flowcytometri ble utført for å undersøke om antigenet var lokalisert på overflaten av bakterien.

#### 4.6 Proteindeteksjon med konfokal laserskanning-mikroskopi

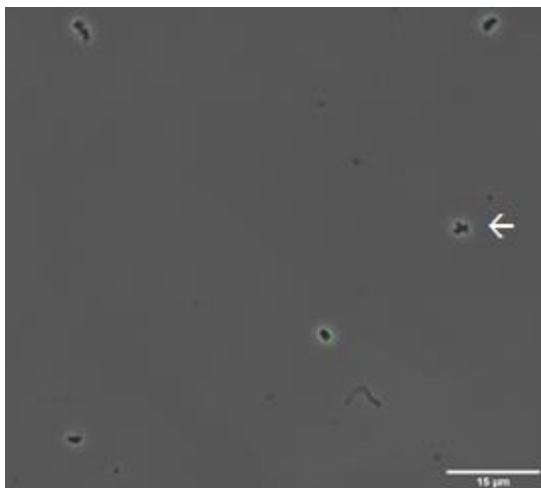
For videre analyse av overflateplassering av antigener på *L. plantarum* ble konfokal laserskanning-mikroskopi benyttet (seksjon 3.17). Bakteriekulturene høstet for flowcytometri ble benyttet videre i denne analysen. *L. plantarum* med cwa1643S og cwa1643L ble ikke analysert da de ble konstruert på et senere tidspunkt. Figur 4.9 viser *L. plantarum* høstet 3 timer etter indusering. Fluoriserende signal stemmer overens med resultat fra flowcytometri. Det ble ikke registrert fluoriserende signal fra pEV. Under analysen ble det registrert objekter med signal som ikke var stavformet, markert med pil i bildet for pCwa2940 i figur 4.9.



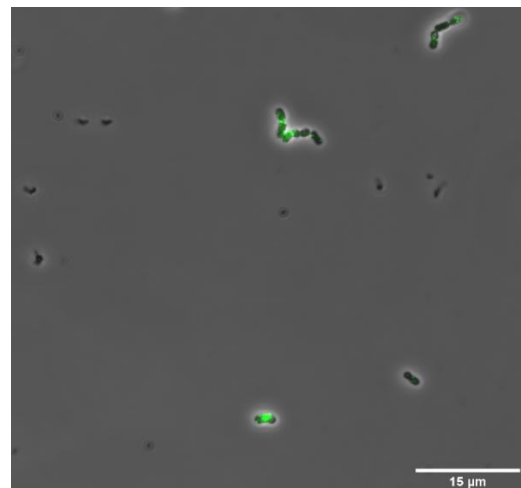
pCwa0373



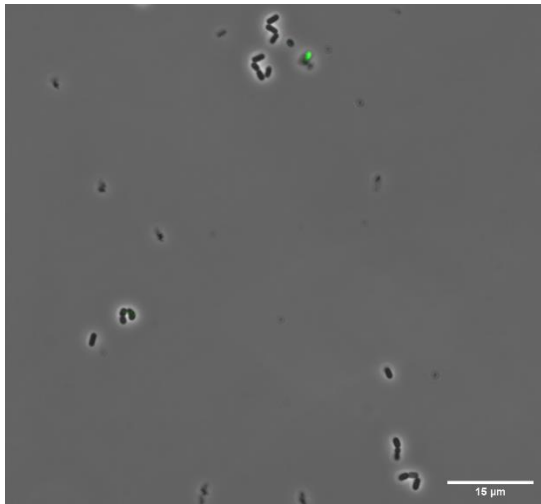
pCwa1643M



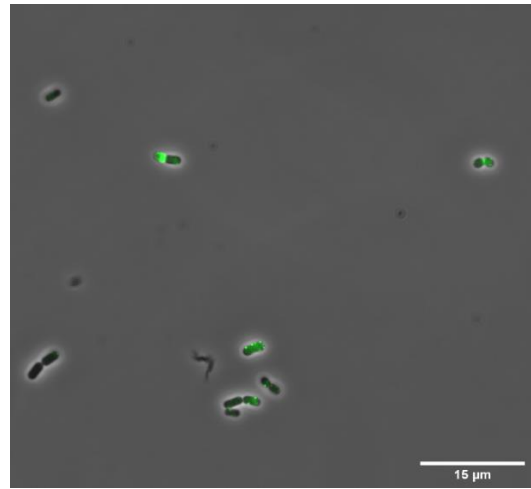
pCwa2940



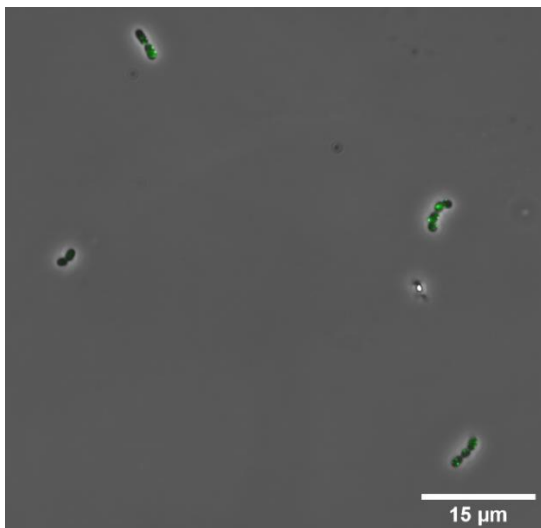
pCwa3001



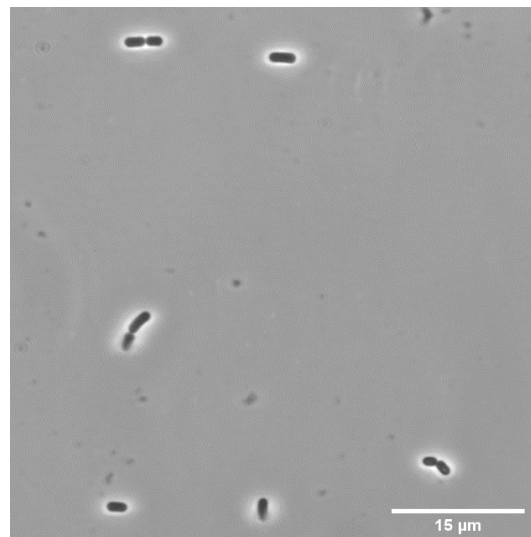
pCwa1229



pCwa2



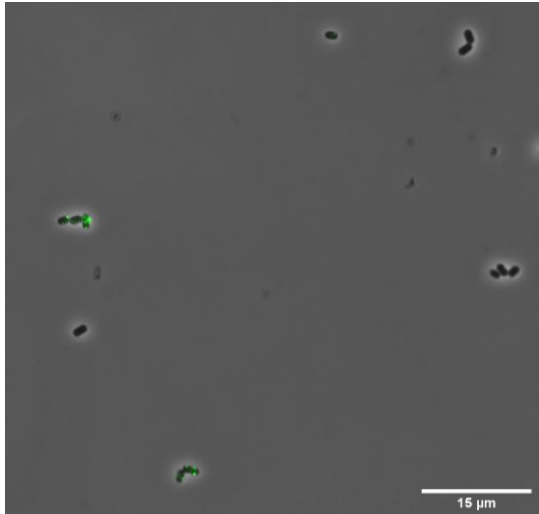
p1261



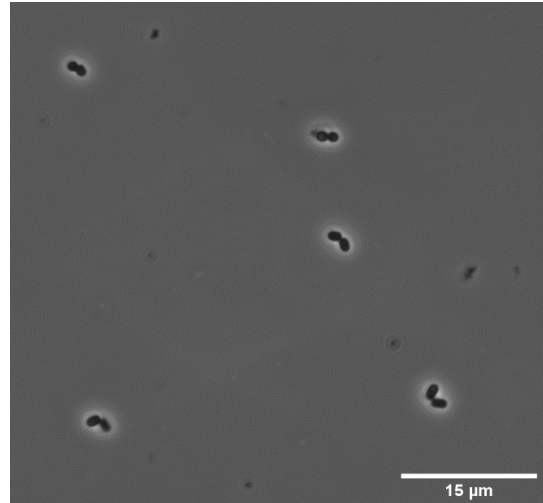
pEV

**Figur 4.9. Mikroskopi av *L. plantarum* høstet 3 timer etter indusering.** Overflatelokalisererte antigener, ESAT6, ble farget med FITC-A. Navn på konstruktene transformert i bakterien er angitt under hvert bilde.

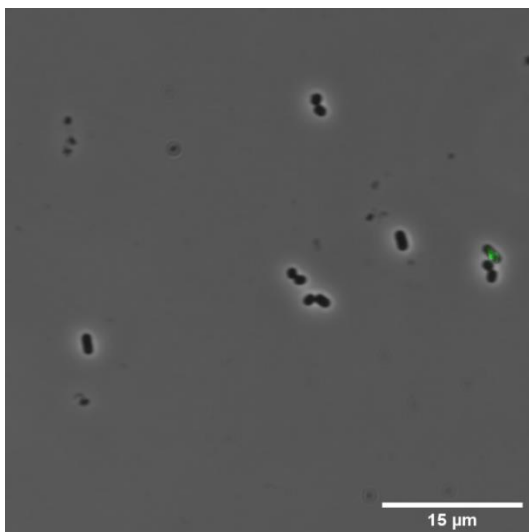
Figur 4.10 viser *L. plantarum* høstet 17 timer etter indusering. Fluoriserende signal stemmer overens med resultat fra flowcytometri. Fluoriserende signal var tydelig redusert i alle bakteriestammene, med unntak av 1261. I bakteriestammer med celleveggankret antigen er det flere bakterieceller uten antigen på overflaten enn i stammen med p1261.



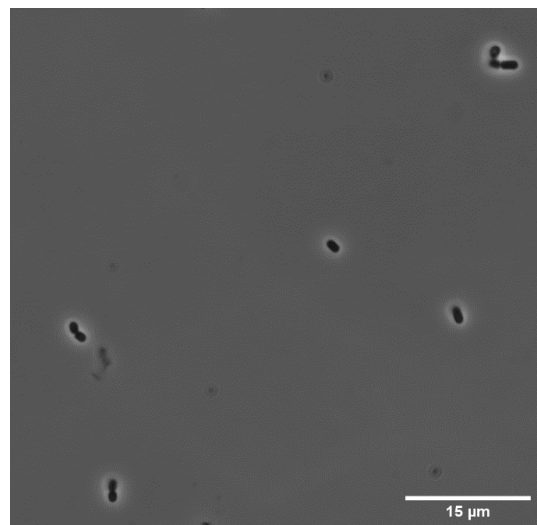
pCwa373



pCwa1643M

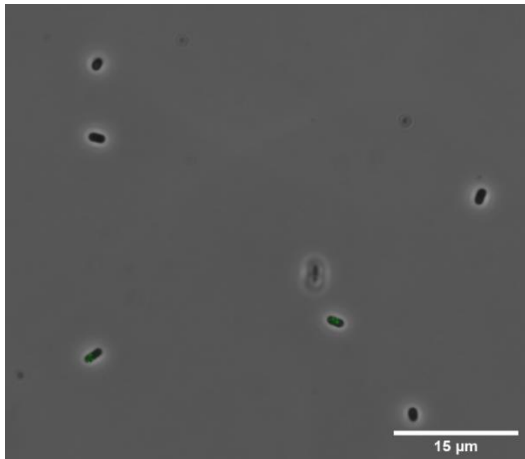


pCwa2940

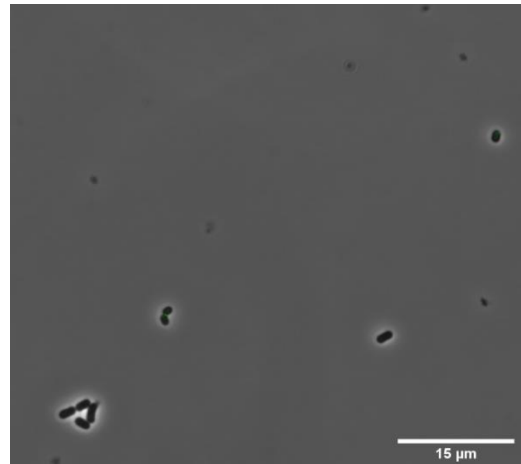


pCwa3001

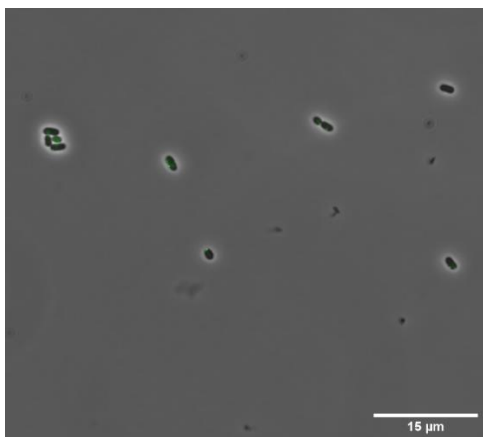




pCwa1229



pCwa2



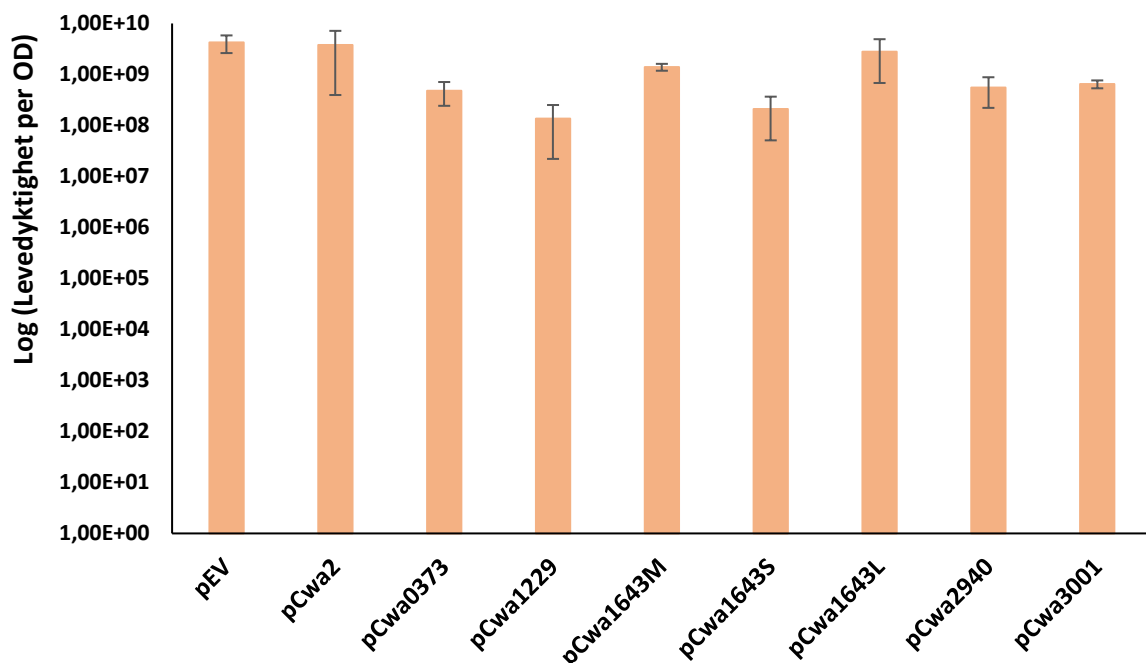
p1261

**Figur 4.10. Mikroskopi av *L. plantarum* høstet 17 timer etter indusering.** Overflatelokalisererte antigener, ESAT6, ble farget med FITC-A. Navn på konstruktene transformert i bakterien er angitt under hvert bilde.

#### 4.7 Analyse av levedyktighet

Levedyktigheten til *L. plantarum* ble undersøkt etter funn som tydet på stressede celler med konfokal laserskanning-mikroskopi. Levedyktigheten til bakteriene ble undersøkt ved bestemmelse av «colony forming unit» per mL (CFU/mL) (seksjon 3.18). Bakteriene ble kultivert i henhold til seksjon 3.14.1. Tre timer etter indusering ble det laget en fortynningsrekke av bakteriene i Ringers løsning (figur 3.2 i seksjon 3.18). Videre ble 20  $\mu$ L av de seks fortyningene spredd på MRS-agar, og inkubert på 37 °C over natt. Antall kolonier ble registrert, og CFU/mL ble beregnet. Det ble tatt hensyn til forskjell i OD<sub>600</sub> målt før fortytning. Figur 4.11 viser beregnet levedyktighet per OD basert på tre paralleller. Tabell V-3 i vedlegg viser CFU/mL for hver parallell og OD<sub>600</sub> for prøvene før fortytning.

Resultatet i figur 4.11 indikerer at levedyktigheten til bakteriestammene påvirkes noe av innsetting av plasmid med ulike celleveggankre, signifikant forskjell ved  $p < 0,05$ . P-verdi mellom pEV og seks av de nye celleveggankrene ble funnet til å være: cwa0373 ( $p = 0,007$ ), cwa1229 ( $p = 0,008$ ) cwa1643M ( $p = 0,008$ ), cwa1643S ( $p = 0,004$ ), cwa2940 ( $p = 0,002$ ) og cwa3001 ( $p = 0,008$ ). Resultatet fra originalankeret cwa2 er ikke signifikant forskjellig fra de nye celleveggankrene.

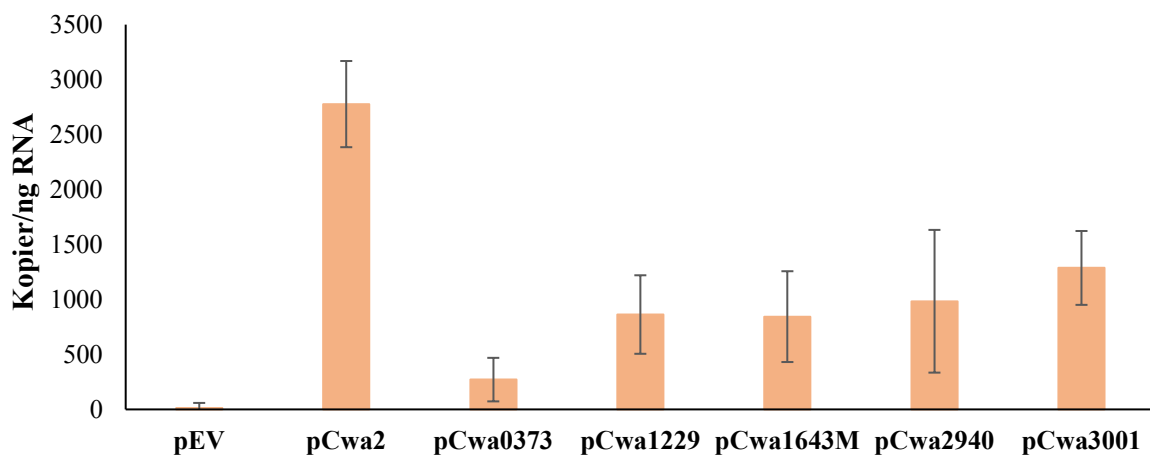


**Figur 4.11. Levedyktighet til *L. plantarum*.** Figuren viser levedyktigheten per OD til bakterier spredd 3 timer etter indusering med SppIP. Verdier for beregning av levedyktighet per OD er vist i tabell V-3.

#### 4.8 Transkripsjonsanalyse

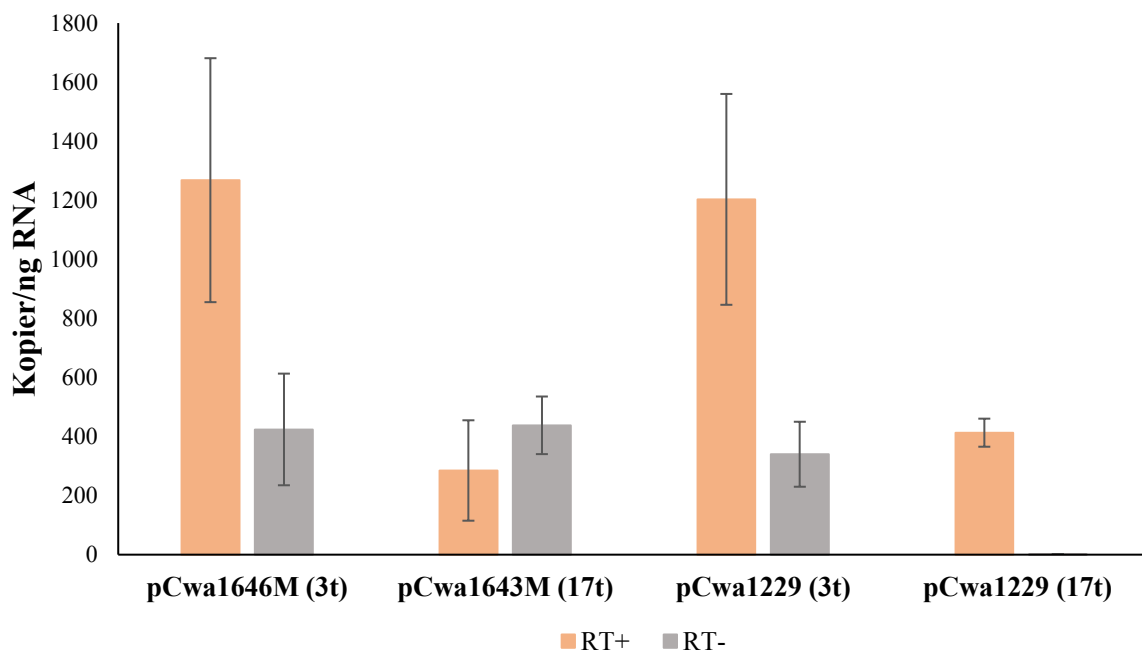
For å øke forståelsen og for å undersøke om antigenet ble uttrykt i lik mengde på mRNA-nivå ved bruk av de ulike ankersekvensene, ble det utført en transkripsjonsanalyse. Antall RNA-kopier av Ag85B antigenet ble bestemt ved bruk av «droplet digital PCR» (ddPCR) (seksjon 3.21). RNA ble høstet og isolert fra *L. plantarum* 3 timer etter indusering (seksjon 3.21.1). Rester av genomisk DNA (gDNA) i prøvene ble fjernet for sikre at gDNA ikke ble inkludert i kvantifiseringen av RNA (seksjon 3.21.2). RNA degraderes fort og er derfor ustabil å jobbe med. RNA ble derfor revers transkribert til kopi DNA (cDNA), som er mer stabilt (seksjon 3.21.3). Negativ kontroll var en parallell av prøvene som ikke ble utsatt for revers transkribering. De negative kontrollene gir et bilde på mengden gDNA i prøvene. Direkte kvantifisering av DNA i prøvene ble utført med ddPCR. Dråper med Ag85E-templat ble registrert som positive, og absolutt konsentrasjon ble beregnet ved bruk av poisson-modellen. Student t-test ble utført for å bestemme p-verdier. *L. plantarum* med cwa1643S og cwa1643S ble ikke inkludert i analysen da de ble konstruert på et senere tidspunkt.

Figur 4.12 viser transkripsjonsnivået, i form av antall kopier av Ag85E per ng RNA, i *L. plantarum*. Resultatet i figur 4.12 viser gjennomsnittet av tre biologiske prøver, med to tekniske prøver for hver biologisk prøve. I figur 4.12 og i beregning av p-verdi er resultatet fra negative kontroller blitt trukket fra. Figur V-3. viser stolpene uten negativ kontroll trukket fra. Det er ingen signifikant forskjell på transkripsjonsnivå mellom cwa2 og de nye celleveggankrene: pCwa0373 ( $p = 0,079$ ), pCwa1229 ( $p = 0,068$ ), pCwa1643M ( $p = 0,075$ ), pCwa2940 ( $p = 0,097$ ) og pCwa3001 ( $p = 0,065$ ).



**Figur 4.12. Viser antall kopier av antigen Ag85B *L. plantarum* per ng RNA.** Figuren viser antall transkript i cDNA, hvor rest-DNA er trukket fra. Resultat uten rest-DNA trukket fra er vist i figur V-2. Standardavvik er basert på biologiske prøver.

For å undersøke endring i transkripsjon over tid ble bakteriene også høstet 17 timer etter indusering. På grunn av begrensede ressurser ble transkripsjonsanalysen kun utført for to av ankrene. Figur 4.13 viser resultatet for *L. plantarum* med cwa1643M og cwa1229 høstet 3 og 17 timer etter indusering. Resultat fra negativ kontroll er tatt med. Resultatet for prøvene høstet 3 timer etter indusering er gjennomsnittet av tre biologiske prøver, med to tekniske prøver for hver biologisk prøve. Resultatet for prøvene høstet 17 timer etter indusering er gjennomsnittet av to tekniske prøver fra en biologisk prøve. Resultatet kan tyde på en reduksjon i transkripsjon av Ag85B-antigen 14 timer etter første høsting, men datagrunnlaget er ikke tilstrekkelig til å utføre student t-test.



**Figur 4.13. Viser antall kopier av antigenet Ag85B i *L. plantarum* høstet 3 eller 17 timer etter indusering.** Det ble kjørt tre biologiske prøver høstet 3 timer etter induksjon, mens det ble kjørt en biologisk prøve høstet 17 timer etter induksjon. Standardavvik for prøver høstet etter 17 timer er basert på to tekniske prøver. Standardavvik for prøver høstet etter 3 timer er basert på biologiske prøver.

## 5. Diskusjon

### 5.1 Design av LPxTG celleveggankre

Bruk av celleveggankeret *cwa2* (Fredriksen et al., 2010) til ankring av antigener til *Lactobacillus plantarum* hemmer veksten til verten, noe som er en utfordring i vaksineproduksjon da det er ønskelig med høy biomasse (Kuczkowska et al., 2017; Myrbråten, 2016). I dette arbeidet ble det designet syv nye LPxTG-celleveggankre. Målet var å designe et cellevegganker som gir god produksjon av målprotein med vellykket celleveggankring, uten hemming av vertens vekst.

I arbeidet med å designe LPxTG-celleveggankre ble det utført en *in silico* analyse av subcellulære proteiner i *L. plantarum* WCFS1 (tabell 4.1). Proteiner predikert til å være celleveggankret er potensielle templatere for celleveggankre, som kan benyttes for å ankre målproteiner til celleveggen. Den originale celleveggankersekvensen, *cwa2*, ble designet med utgangspunkt i *L. plantarum* WCFS1 genet *lp\_2578*. I *in silico* analysen ble først 32 gener predikert til å kode for celleveggankrede proteiner ved hjelp av LocateP (Zhou et al., 2008). Videre dybdeanalyse av genene ble utført for bedre å verifisere prediksjonen om celleveggankring. Kun gener med predikert signalpeptidtype Sec/SPI, transmembran i ankerdel og LPxTG celleveggankerdomene (fra BLAST) ble ansett som potensielle templatkandidater i dette arbeidet. Det ble satt en streng definisjon for å øke sjansen for å designe funksjonelle ankersekvenser. Av de 32 genene oppfylte 18 gener den strenge definisjonen på LPxTG celleveggankrede proteiner (tabell 4.1).

Det er ukjent hvilke egenskaper hos ankersekvensene som påvirker stressnivået til verten. De utvalgte genene (*lp\_0373*, *lp\_1229*, *lp\_1643*, *lp\_2940* og *lp\_3001*) ble valgt til å være templat for ankersekvenser, på grunn av variasjon i enten predikert proteinfunksjon, LPxTG-motiv og/eller lengden på genet. Lengden på linkerregionen (området mellom LPxTG-motiv og målprotein) er antatt å ha en påvirkning på ankerproduksjon og stress på verten (Fredriksen et al., 2010). Det ble derfor designet tre ankersekvenser basert på samme gen (*lp\_1643*), med varierende lengde på linkerregionen. I *in silico* analysen ble majoriteten av de 32 genene, deriblant tre av de utvalgte genene (*lp\_0373*, *lp\_2940* og *lp\_3001*), predikert til å kode for proteiner med celleoverflateplassering med et LPxTG ankerdomene, uten en kjent funksjon. Pfam ble benyttet for å predikere domener i de fem utvalgte genene (figur 4.2). Fire av de fem

genene ble predikert til å ha domener, hvor to av dem hadde ukjent funksjon i *in silico* analysen. Resultatet fra Pfam kan tyde på at flere av genene i *in silico* analysen uten predikert eller kjent funksjon kan inneholde domener. Tre av ankersekvensene (cwa1229, cwa1643M og cwa1643L) inneholder predikerte domener. Disse inneholder alle ett, eller deler av ett Mub B2-lignende domene, som kan være involvert i mucin-binding (MacKenzie et al., 2009), og cwa1643L inneholder i tillegg et mucin-bindende domene. Begge disse domenene kan tenkes å ha en effekt på bindingen av hybridantigenet til slimhinner. Konsensus LPxTG-motivet i *L. plantarum* WCFS1 ble i dette arbeidet funnet til å være LPQTxE (figur 4.1), resultatet stemmer overens med litteraturen (Boekhorst et al., 2005). Sortasen i *L. plantarum* er forventet å ha høy spesifisitet, grunnet den høye konserveringen av motivet (Boekhorst et al., 2005). To av de utvalgte genene, *lp\_0373* (LPKTNS) og *lp\_1643* (LPQTND), har celleveggankermotiv som ikke følger konsensus LPxTG-motivet.

Ett av de utvalgte genene, *lp\_2940*, har tidligere blitt benyttet som templat for å designe et cellevegganker. Ankeret ble brukt til å ankre E7-antigen fra humant papillomavirus type-16 i *L. plantarum* og *Lactococcus lactis* (Cortes-Perez et al., 2005). E7 ble vellykket ankret på celleoverflaten til begge bakteriene, noe som tyder på at sortase i *L. lactis* gjenkjenner LPQTGE motivet i *lp\_2940*. Bakterievekst ble ikke diskutert i artikkelen, det er derfor ukjent om ankeret hemmet veksten til *L. plantarum* eller *L. lactis*. Lengden på cwa2940 designet i dette arbeidet er lengre enn ankerlengden benyttet i forsøket med E7 antigen.

## 5.2 Konstruksjon av plasmider

I tidligere forsøk har det blitt vist at *M. tuberculosis* hybridantigenet Ag85B\_ESAT6 med et DC-peptid celleveggankret med cwa2 i *L. plantarum* har ført til positiv immunrespons når benyttet som internasal boostervaksine av BCG i mus (Kuczkowska et al., 2017). Det er derfor av interesse å bruke konstruktet (pLp\_3050\_DC\_Ag85B\_ESAT6\_cwa2) (Øverland, 2013) videre i utviklingen av en vaksine mot tuberkulose. Som tidligere nevnt, hemmer cwa2 veksten til verten. I dette arbeidet ble derfor ankersekvensen cwa2 erstattet med syv nye celleveggankre, som ble valgt på bakgrunn av *in silico* analysen (cwa0373, cwa1229, cwa1643S, cwa1643M, cwa1643L, cwa2940 og cwa3001) (tabell 4.2).

### 5.3 Vekst hos rekombinante *Lactobacillus plantarum*

Ifølge litteraturen er redusert veksthastighet en utfordring ved produksjon av heterologe proteiner, som skyldes økt stress i bakterien grunnet proteinproduksjonen (Bolhuis et al., 1999; Kuczkowska et al., 2017; Lulko et al., 2007; Mathiesen et al., 2008). Heterologt uttrykk av celleveggankrede proteiner er vist å kunne føre til redusert viabilitet og økt stress for verten (Michon et al., 2016). For å undersøke om de nye celleveggankrene (tabell 4.2) hemmer veksten til *L. plantarum*, ble det utført en vekstkurveanalyse (Figur 4.4) (seksjon 3.15). Rekombinante *L. plantarum* med pEV (Fredriksen et al., 2012), pLp\_1261\_Ag85B\_E6\_DC (p1261) (Øverland, 2013) og pCwa2 ble inkludert i analysen som kontroll og for å sammenligne vekst. Alle plasmidene med cellevegganker medførte sterk hemming av veksten til verten, sammenlignet med pEV (figur 4.4). Stammene med celleveggankret hybridantigen startet å vokse betydelig først etter 5-13 timer etter indusering av antigenproduksjon. Stammen med pCwa3001 skiller seg ut ved å ha noe vekst de første timene, i forhold til stammene med de andre celleveggankrene. Stammen med pCwa3001 ser derfor ut til å ha en liten fordel når det kommer til vaksineproduksjon, da den vil resultere i noe mer biomasse ved høsting av bakterier tre timer etter indusering. Fordelen krever at stammen med pCwa3001 har god antigenproduksjon og oppnår vellykket ankring av hybridantigenet på celleoverflaten.

Ut fra vekstkurvene til stammene med cellevegganker kan det antas at induseringen av antigenproduksjon slutter 6-7 timer etter induksjon (figur 4.4). Produksjon av antigen påfører bakteriene stress, som hemmer normal vekst. Ved stopp av proteinproduksjon reduseres stresset påført bakteriene, og stammene forventes å nå normal vekst. Vekstfasen til stammene med pCwa1643M, pCwa1643S og pCwa2940 starter 6-7 timer etter indusering, og indikerer at induseringseffekten stopper rundt dette tidspunktet (figur 4.4). Dette har ikke tidligere blitt vist, men det er naturlig å anta at induserpeptidet brytes ned etter en periode, noe som vil føre til stopp i induseringseffekten. For stammene med pCwa0373, pCwa1229, pCwa1643L og pCwa2 starter veksten først etter omtrent 10 timer. Det kan tenkes at disse stammene har blitt utsatt for et høyere stressnivå og/eller at stresset har ført til mer varige utfordringer for bakteriene. Det er ingen grunn til å anta at induksjonseffekten skal stoppe ved ulike tidspunkt i de forskjellige stammene, da verten og ekspresjonssystemet er felles for alle stammene.

Fra tidligere forsøk er det kjent at promotorene involvert i pSIP-systemet ikke er helt tette, noe som fører til en liten bakgrunnsproduksjon av målgenet selv uten indusering (Sørvig et al.,

2003; Wiull, 2018). Vekskurvene til uinduserte rekombinante *L. plantarum* (figur 4.5) viser normal vekst, med unntak av stammen med pCwa1643S hvor det er tegn på hemming av vekst. Resultatet fra figur 4.5 kan indikere at det er noe produksjon av hybridantigen uten indusering. Det kan spekuleres i om produktet av antigenproduksjonen i stammen med pCwa1643S kan være toksisk slik at selv en liten lekkasje fører til hemming av vekst, selv uindusert. Av ukjent årsak påvirkes ikke de andre stammene i samme grad som stammen med pCwa1643S av antigenproduksjonen, dersom det er en lekkasje.

#### **5.4 Analyse av antigenproduksjon**

Produksjonen av hybridantigenet i de rekombinante bakteriene ble undersøkt ved bruk av Western blot (seksjon 3.20). De syv rekombinante *L. plantarum* konstruert i dette arbeidet (tabell 4.2) produserte hybridantigenet (Figur 4.6 og 4.7). Molekylvekten til flere av de celleveggankrede antigenene, observert på SDS-gelen, er høyere enn beregnet teoretisk molekylvekt. I tidligere forsøk har det blitt observert at celleveggankrede proteiner viser høyere molekylvekt enn teoretisk beregnet (Fredriksen et al., 2010; Myrbråten, 2016; Øverland, 2013). I en studie hvor celleveggankeret *cwa3* (sekvens fra *lp\_2578* genet i *L. plantarum* WCFS1) ble benyttet for ankring av onkofetal antigen (OFA) i *L. plantarum* ble det observert et bånd på omtrent dobbel masse av forventet. Båndet kan indikere en dimerisering av målproteinet OFA (Fredriksen et al., 2010). I en annen studie, hvor M6-protein ble celleveggankret i ulike melkesyrebakterier, ble det foreslått at økt molekylvekt kan skyldes at celleveggfragmenter som er kovalent bundet til antigenet, ble tatt med i analysen (Piard et al., 1997). I dette arbeidet viser resultatet for stammene med pCwa3001 og pCwa1229 antydninger til bånd på omtrent dobbel størrelse, som kan ha oppstått ved dimerisering. Kun ett av de celleveggankrede antigenene, pCwa1643S, viste molekylvekt tilsvarende beregnet molekylvekt. De resterende celleveggankrene medførte økt molekylvekt av antigenet, som trolig skyldes celleveggfragmenter. En hypotese kan være at molekylvekten til pCwa1643S skyldes at plasmidet ikke oppnår vellykket ankring til celleveggen. Det kunne derfor vært interessant å undersøke om hybridantigenet ble frigitt til omgivelsene ved å analysere supernatanten.

I studiet med celleveggankret OFA ble det, i tillegg til dimerisering, vist tendenser til proteolytisk nedbrytning av antigenene ved bruk av pCwa2 (Fredriksen et al., 2010). Figur 4.6 i denne oppgaven viser den samme tendensen for stammene med pCwa0373 og pCwa3001, som for pCwa2. Graden på nedbrytningen ser ut til å være noe varierende, hvor stammen med



pCwa3001 viser tydeligst tegn på nedbrytning. I et forsøk hvor målproteinet nucA ble celleveggankret i *L. lactis* ble det foreslått at begrenset mengde sortase i cellen førte til at proteinene forble assosiert til membranen (Dieye et al., 2001). Treghet i sortaseprosessen kan dermed føre til begrenset ankring, og proteinene blir mer mottakelige for proteolyse, og kanskje også stress for vertsbakterien. *L. plantarum* har kun en kjent sortase, noe som kan tenkes å påvirke mengden sortase tilgjengelig. Treghet i sortaseprosessen er derfor en sannsynlig årsak til nedbrytning av målprotein i *L. plantarum*. Det kan spekuleres i om forskjellene i nedbrytningsgrad for de ulike stammene skyldes sortasens evne til å gjenkjenne de forskjellige LPxTG-motivene i ankersekvensene eller at hybridantigenet er mer tilgjengelig for proteaseaktivitet i noen av stammene.

I dette arbeidet ble det ikke utført semi-kvantitativ western blot, mengden hybridantigen produsert er derfor ikke kjent, men mengden proteinekstrakt benyttet ble justert i forhold til OD. Figur 4.7 indikerer en lavere produksjon av hybridantigenet i stammen med pCwa1643S. Utførelse av semi-kvantitativ western blot ville vært av interesse for bekreftelse av forskjell i antigenproduksjon mellom stammene. Det kunne i tillegg vært interessant å benytte semi-kvantitativ western blot for å undersøke forskjell i antigenmengde intracellulært og i supernatant. Stor mengde antigen på innsiden av cellen, i forhold til utsiden, vil antyde utfordringer med translokasjon av antigen over cellemembranen. Utfordringer med translokasjon kan også tenkes å gi en lavere grad av nedbrytning, da målproteinet blir beskyttet mot proteaseaktiviteten på celleoverflaten.

### **5.5 Karakterisering av overflateankrede antigener**

Det ble undersøkt om de rekombinante *L. plantarum* vellykket sekreterer og ankrer hybridantigenet til cellemembranen, ved bruk av flowcytometri (seksjon 3.16) og konfokal laserskanning-mikroskopi (seksjon 3.17). Mindre antigen på celleoverflaten enn forventet kan indikere utfordringer med translokasjon eller ankring av antigenet til celleveggen, som kan være en mulig kilde til stress. I tidligere forsøk med rekombinant *L. plantarum* med pCwa2 er det vist at målgenet blir sekretert og ankret til celleveggen (Fredriksen et al., 2010; Kuczkowska et al., 2017; Myrbråten, 2016).

De rekombinante *L. plantarum* høstet 3 timer etter indusering viste varierende styrke på fluoriserende signal fra flowcytometri, som indikerer ulik mengde antigen tilgjengelig på celleoverflaten (figur 4.8). I grafene vist i figur 4.8 er *L. plantarum* med pEV (svart kurve) uten antigen på celleoverflaten, benyttet som en negativ kontroll. Et sterkt signal fra FITC indikerer en stor mengde antigen tilgjengelig på celleoverflaten, i figuren blir økt signal representert ved forskyvning av kurven mot høyre på x-aksen. Stammen med pEV ga ikke fluoriserende signal, altså binder ikke primær- og sekundærtstoff uspesifikt til andre proteiner på celleoverflaten til *L. plantarum*. Stammen med pCwa3001 og pCwa2 ga sterkest fluoriserende signaler, som kommer av vellykket sekretering og ankring av antigenet til celleoverflaten. Stammen med pCwa3001 viste noe sterkere signal enn stammen med pCwa2. Stammen med lipoproteinanker p1261 var forventet å gi noe svakere fluoriserende signal enn stammene med celleveggankring. Dette skyldes trolig at ved bruk av lipoproteinankring til cellemembran blir antigenet begravd i celleveggen som resulterer i svakere signal ved flowcytometri (Nygaard, 2011; Øverland, 2013). Signalstyrken fra stammene med pCwa0373, pCwa1643M og pCwa1643L lå på et nivå mellom signalstyrken fra stammen med pCwa2 og p1261. Det fluoriserende signalet fra disse stammene indiker vellykket sekretering og ankring av antigenet, men stammene har trolig noe mindre antigen på celleoverflaten enn stammene med pCwa3001 og pCwa2. Årsaken til at akkurat disse stammene får noe lavere signal på flowcytometri er ukjent, men det kan tenkes at ankersekvensene har egenskaper som påvirker deres evne til å sekretere og/eller ankre antigen til celleoverflaten. En mulig forklaring kan være at LPxTG-motivet i ankersekvensene avviker fra konsensusmotivet (LPQTxE), som kan påvirke ankringsprosessen med sortase (Kleerebezem et al., 2003). For stammene med pCwa1643M og pCwa1643L kan det i tillegg spekuleres i om de predikerte domene i ankersekvens påvirker strukturen til hybridantigenet. En hypotese kan være at domenene ga ankersekvensen mer struktur (MacKenzie et al., 2009), som førte til en mer gjemt plassering av antigen på celleoverflaten. Figur 4.8 viser i tillegg at stammene med pCwa1229, pCwa1643S og pCwa2940 gir svært lavt fluoriserende signal, lavere enn stammen med p1261. Det lave signalet indikerer lite antigen ankret til celleoverflaten, som kan være forårsaket av problemer med produksjon, sekresjon eller ankring. Felles for disse tre stammene er kort linkerregion i ankersekvensene. Korte linkerregioner kan tenkes å ha ført til en skjult plassering av antigenet i celleveggen, men en skjult plassering er også tilfelle for p1261, som ga et sterkere signal. Sett i sammenheng med western blot (figur 4.7) resultatet kan det svake fluoriserende signalet for stammen med pCwa1643S også skyldes lav produksjon av antigenet.

I dette arbeidet ble stammene høstet 3 og 17 timer etter induksjon av antigenproduksjonen for å undersøke endringer i overflaterrepresentasjon av antigen over tid. Under konfokal laserskanning-mikroskopi av stammene høstet 17 timer etter indusering ble det observert en høyere andel *L. plantarum* celler uten fluoriserende signal for stammene med cellevegganker, enn i stammen med lipoproteinanker (figur 4.10). En hypotese kan være at forskjellen i andel celler uten fluoriserende signal skyldes at noen celler er dannet etter stans i antigenproduksjon. Hypotesen støttes av resultatene i vekstkurveanalysen (figur 4.4) og flowcytometri (figur 4.8). Konfokal laserskanning-mikroskopi viser også at noen stammer inneholder bakterieceller med unormal morfologi ved høsting 3 timer etter induksjon (figur 4.9). Disse stammene har bakterieceller med mer naturlig form ved høsting 17 timer etter indusering (figur 4.10). Stans i antigenproduksjon ser dermed ut til å redusere stressnivået i vertene, og morfologien blir mer lik pEV (figur 4.9). De to stammene (pCwa1229 og pCwa2940) som viste tydeligst tegn på strukturell endring ved høsting 3 timer etter indusering, gav også lavt fluoriserende signal på flowcytometri, og bakteriene var utfordrende å høste. De strukturelle endringene på celleoverflaten kan tenkes å føre til svakere binding av bakteriecellene til hverandre, noe som kan ha gitt en mer porøs pellet. Stammen med pCwa1643S, som også hadde lavt fluoriserende signal, var derimot lett å høste. Fordi stammene med pCwa1643S og pCwa1643L ble konstruert på et senere tidspunkt enn de andre stammene, ble de ikke analysert med konfokal laserskanning-mikroskopi, men det ville vært interessant å inkludere dem i analysen.

### **5.6 Levedyktighet til rekombinante *Lactobacillus plantarum***

I vekstkurveanalysen og konfokal laserskanning-mikroskopi viste de rekombinante *L. plantarum* tegn på stress ved ekspresjon av celleveggankrede antigener. Resultatene tyder på at stammene ble utsatt for ulikt stressnivå under produksjonen av antigenet, som fører til hemmet vekst for verten og i noen tilfeller lite hybridantigen på celleoverflaten og unormal morfologi. Det kan tenkes at et høyt stressnivå påvirker levedyktigheten til den rekombinante bakterien. Levedyktigheten til bakteriene ved høstingstidpunktet for vaksineproduksjon (3 timer etter indusering) ble derfor undersøkt (seksjon 3.18). Analysen av levedyktighet viser en signifikant reduksjon i levedyktigheten ved bruk av 6 av de 7 nye ankersekvensene, i forhold til *L. plantarum* med pEV (figur 4.11). For stammene med pCwa2 og pCwa1643L ble det ikke funnet signifikant reduksjon, i forhold til stammen med pEV. Det ble ikke funnet en kobling mellom

hvilke stammer som viser en signifikant reduksjon i levedyktighet og resultatene i vekstkurveanalysen eller flowcytometri.

I vaksineproduksjon må rekombinante bakterier kunne oppbevares, f. eks ved frysetørking. I Frysetørkingsprosessen er det viktig at bakterien bevarer sin levedyktighet. I tidligere forsøk har det blitt vist at bakterier utsatt for subletalt stress kan utvikle en motstandsdyktighet mot nye stressfaktorer (Desmond et al., 2004; Myrbråten, 2016; Zotta et al., 2012). Det kan tenkes at levedyktigheten etter en frysetørkingsprosess til rekombinante *L. plantarum* med celleveggankrede antigen påvirkes av stresset stammen utsettes for ved antigenproduksjon. Det hadde derfor vært interessant å undersøke om levedyktigheten til de ulike stammene med celleveggankrede antigen varierer etter frysetørking på grunn av stresset påført cellene under antigenproduksjonen.

### **5.7 Transkripsjonsanalyse med ddPCR**

En mulig årsak til varierende stressnivå i de rekombinante *L. plantarum* med cellevegganker kan være forskjeller i mengden hybridantigen produsert, trolig forårsaket av ulikt transkripsjonsnivå. I dette arbeidet er det kun ankersekvensen som endres, noe som ikke forventes å ha en stor påvirkning på transkripsjonsnivået. Likevel er det indikasjoner fra western blot som tilsier at stammen med pCwa1632S har enn lavere produksjon av antigener, i forhold til de andre stammene med cellevegganker. En transkripsjonsanalyse ble utført hvor absolutt kvantifisering av mRNA ble bestemt ved bruk av droplet digital PCR (ddPCR) (seksjon 3.21), metoden er kjent for høy presisjon i forhold til real-time PCR-metoder (Hindson et al., 2011; Li et al., 2018). Ut fra funn i vekstkurveanalysen, som indikerte stans i antigenproduksjonen 6-7 timer etter indusering (figur 4.4), ble stammene høstet 3 og 17 timer etter indusering for å undersøke endring i transkripsjonsnivå over tid. Grunnet begrensede ressurser ble kun to av stammene (pCwa1229 og pCwa1643M) høstet 17 timer etter indusering analysert. Stammene med pCwa1643S og pCwa1643L ble konstruert på et senere tidspunkt i det eksperimentelle arbeidet, og ble derfor ikke inkludert i analysen. Stammen med pCwa1632S har vist indikasjoner på lav antigenproduksjon ved western blot og liten mengde antigen på celleoverflaten ved flowcytometri og konfokal laserskanning-mikroskopi. Ut fra disse funnene kan det spekuleres i at stammen har et lavt transkripsjonsnivå, i forhold til de andre stammene. Det ville derfor vært interessant å inkludere stammen med pCwa1643S i analysen.

Det ble funnet noe variasjon i transkripsjonsnivået av hybridantigenet i stammen høstet 3 timer etter indusering, men forskjellene var ikke signifikante (figur 4.12). I figur 4.12 har resultatet fra negativ kontroll (RT-) blitt trukket fra resultatet fra prøvene utsatt for revers transkribering (RT+). Genomisk DNA (gDNA) i prøvene ble forsøkt fjernet før revers transkribering, men resultatet fra RT- prøvene viser at det fortsatt er spor av gDNA i prøvene (figur V-3). Rest-DNA i prøvene gjør resultatet fra analysen mindre pålitelig. På tross av dette tyder resultatet på at noe antigen transkriberes i alle stammen ved høsting 3 timer etter indusering. Etter fjerning av RT- resultatet ble det ikke funnet en signifikant forskjell mellom transkripsjonsnivået i pCwa2 og stammene med de nye celleveggankrene. Det var, som tidligere nevnt, ikke forventet å finne forskjell i transkripsjonsnivå mellom stammene. Forskjellene i transkripsjonsnivå (figur 4.12) samsvarer ikke med resultatet fra vekstkurveanalysen (figur 4.4) og flowcytometri (figur 4.8). Dette manglende samsvaret kan skyldes forskjeller i translasjon av hybridantigen-mRNA i de ulike stammene. Forskjellene kan være forårsaket av sjeldne eller svært sjeldne kodon i ankersekvensen. Ut fra tabell V-2, som viser antall sjeldne og svært sjeldne kodon i ankersekvensene, er det ikke lett å påvise at translasjon er årsaken til forskjellene.

Forskjell i transkripsjonsnivå ved høsting 3 og 17 timer etter indusering, for stammene med pCwa1229 og pCwa1643M, indikerer en reduksjon i transkripsjonsnivå over tid (figur 4.13). Resultatet fra RT- er tatt med i figuren for å vise at stammen med pCwa1643M høstet etter 17 timer har høyere transkripsjonsnivå i RT- enn i RT+. I denne prøven var det derfor ikke mulig å bekrefte transkripsjon av hybridantigenet i prøvene. I prøven høstet 17 timer etter indusering for stammen med pCwa1229 ble det observert noe transkript av hybridantigenet. Transkriptet kan være mRNA ikke er brutt ned enda etter stans i transkripsjon, eller det kan skyldes en lekkasje i ekspresjonssystemet. Det kunne derfor vært interessant å benytte ddPCR for å analysere stammene uten indusering, for å undersøke om transkripsjonen skyldes en lekkasje. Det har blitt gjort tidligere, og det ble vist at pSIP-systemet har noe lekkasje (Wiull, 2018)

## **5.8 Konklusjoner og fremtidige perspektiver**

I dette arbeidet ble det designet syv nye LPxTG celleveggankre som ble benyttet til å celleveggankre hybridantigenet Ag85B-ESAT6 i *L. plantarum* (Øverland, 2013). Rekombinante *L. plantarum* laget i dette arbeidet produserte hybridantigenet med varierende grad av ankring til celleveggen. Det ble funnet tegn på sammenhenger mellom egenskaper i

ankersekvensen og stammens evne til å oppnå vellykket celleveggankring. Sekresjon og ankring av heterologe proteiner kan føre til økt stress for verten som videre kan redusere veksthastigheten og levedyktigheten til verten, og føre til nedbrytning av målprotein (Michon et al., 2016). Vekskurveanalyser av de rekombinante *L. plantarum* designet i dette arbeidet viser at betydelig hemming av veksten til verten er en generell utfordring ved bruk av celleveggankre. Flertallet (6 av 7) av celleveggankrene ble vist å føre til signifikant reduksjon i levedyktighet, i forhold til stammen med pEV. Det ble også funnet tydelig tegn på nedbrytning av hybridantigenet i to av stammene (pCwa0373 og pCwa3001). Resultatene for de ulike stammene tyder på at celleveggankre generelt fører til et betydelig stressnivå i verten under antigenproduksjon. Noe variasjon i stressnivået til de forskjellige stammene ble også observert. Det ble funnet tegn på forskjeller i transkripsjonsnivået av hybridantigenet i stammene som kan tenkes å påvirke stressnivået, men disse var ikke signifikante. Resultatet indikerer at variasjonen i stressnivå skyldes faktorer senere i prosessen, etter transkripsjon, som for eksempel translokasjon og ankring.

Videre analyser kan utføres for nærmere å identifisere årsaker for det høye, noe varierende stressnivået i stammene med celleveggankre. Analyse av intracellulære proteiner i stammene kan utføres for å undersøke om antigenet forblir inne i cellen etter produksjon, noe som kan tyde på problemer med translokasjon. Det kunne også vært interessant å analysere supernatanten for å undersøke om hybridantigenet blir frigitt til omgivelsene, noe som kan indikere problemer med ankring. Videre kunne det vært interessant å øke mengden sortase produsert i verten for å se om dette fører til økt mengde målprotein ankret til cellevegg og redusert grad av nedbrytning.

Basert på dette arbeidet er cwa3001-ankersekvensen den mest lovende kandidaten for videre utvikling av en vaksine mot tuberkulose. Stammen med pCwa3001 har vist god produksjon og vellykket ankring av hybridantigenet på celleoverflaten. Veksten til stammen er bedre ved høstingstidspunktet (3 timer etter indusering) enn stammen med originalankersekvensen. Videre optimalisering av celleveggankeret kreves, da verten vokser dårlig sammenlignet med bruk av andre ankertyper, og hybridantigenet viser tegn på nedbrytning. Bruk av andre signalpeptider, ulike lengder på linkerregionen og økt sortase i verten bør undersøkes. Det er fortsatt et stort forbedringspotensial når det kommer til bruken av cellevegganker i vaksineutvikling.

## 6. Referanser

- Ahrne, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A. & Molin, G. (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of applied microbiology*, 85 (1): 88-94.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25 (17): 3389-3402.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Ewinger, L., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Howe, K. L., Marshall, M. & Sonnhammer, E. L. (2002). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 30 (1): 276-280.
- Bloksma, N., De Heer, E., Van Dijk, H. & Willers, J. (1979). Adjuvanticity of lactobacilli. I. Differential effects of viable and killed bacteria. *Clinical and experimental immunology*, 37 (2): 367.
- Boekhorst, J., de Been, M. W., Kleerebezem, M. & Siezen, R. J. (2005). Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *Journal of bacteriology*, 187 (14): 4928-4934.
- Bolhuis, A., Tjalsma, H., Smith, H. E., De Jong, A., Meima, R., Venema, G., Bron, S. & Van Dijk, J. M. (1999). Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (7): 2934-2941.
- Bron, P. A., Van Baarlen, P. & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10 (1): 66-78.
- Bruchfeld, J., Correia-Neves, M. & Källenius, G. (2015). Tuberculosis and HIV coinfection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5 (7): a017871.
- Cortes-Perez, N. G., Azevedo, V., Alcocer-González, J. M., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R. S., Corthier, G., Gruss, A., Langella, P. & Bermúdez-Humarán, L. G. (2005). Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type-16 in *Lactococcus lactis* and in *Lactobacillus plantarum* using a new cell-wall anchor from lactobacilli. *Journal of drug targeting*, 13 (2): 89-98.
- Crum-Cianflone, N. F. & Sullivan, E. (2017). Vaccinations for the HIV-infected adult: a review of the current recommendations, part II. *Infectious diseases and therapy*, 6 (3): 333-361.
- Curiel, T. J., Morris, C., Brumlik, M., Landry, S. J., Finstad, K., Nelson, A., Joshi, V., Hawkins, C., Alarez, X. & Lackner, A. (2004). Peptides identified through phage display direct immunogenic antigen to dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 172 (12): 7425-7431.
- Daniel, E., Onwukwe, G. U., Wierenga, R. K., Quaggin, S. E., Vainio, S. J. & Krause, M. (2015). ATGme: Open-source web application for rare codon identification and custom DNA sequence optimization. *BMC bioinformatics*, 16 (1): 303.
- De Ruyter, P., Kuipers, O. P. & De Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (10): 3662-3667.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16 (9): 1018-1028.
- Derrien, M. & van Hylckama Vlieg, J. E. (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 23 (6): 354-366.
- Desmond, C., Fitzgerald, G., Stanton, C. & Ross, R. (2004). Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (10): 5929-5936.
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A. & Piard, J.-C. (2001). Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183 (14): 4157-4166.

- Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, 77: 643-667.
- Fredriksen, L., Mathiesen, G., Sioud, M. & Eijsink, V. G. (2010). Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (21): 7359-7362.
- Fredriksen, L., Kleiveland, C. R., Hult, L. T. O., Lea, T., Nygaard, C. S., Eijsink, V. G. & Mathiesen, G. (2012). Surface display of N-terminally anchored invasins by *Lactobacillus plantarum* activates NF- $\kappa$ B in monocytes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (16): 5864-5871.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. & Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology*, 20 (1): 621-667.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L. & Legler, T. C. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, 83 (22): 8604-8610.
- Hotel, A. C. P. & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5 (1): 1-10.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70 (3): 337-349.
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. & Kuipers, O. P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (11): 4581-4584.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M. & Fiers, M. W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (4): 1990-1995.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J. & Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS microbiology reviews*, 34 (2): 199-230.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305 (3): 567-580.
- Kuczkowska, K., Kleiveland, C. R., Minic, R., Moen, L. F., Øverland, L., Tjøland, R., Carlsen, H., Lea, T., Mathiesen, G. & Eijsink, V. G. (2017). Immunogenic properties of *Lactobacillus plantarum* producing surface-displayed *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83 (2): e02782-16.
- Kuczkowska, K., Copland, A., Øverland, L., Mathiesen, G., Tran, A. C., Paul, M. J., Eijsink, V. G. & Reljic, R. (2019). Inactivated *Lactobacillus plantarum* Carrying a Surface-Displayed Ag85B-ESAT-6 Fusion Antigen as a Booster Vaccine Against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Frontiers in immunology*, 10.
- Leenhouts, K., Buist, G. & Kok, J. (1999). Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76 (1-4): 367-376.
- Levine, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E. & Clements, M. L. (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiological reviews*, 47 (4): 510.
- Li, H., Bai, R., Zhao, Z., Tao, L., Ma, M., Ji, Z., Jian, M., Ding, Z., Dai, X. & Bao, F. (2018). Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Bioscience reports*, 38 (6).
- Lulko, A. T., Veening, J.-W., Buist, G., Smits, W. K., Blom, E. J., Beekman, A. C., Bron, S. & Kuipers, O. P. (2007). Production and secretion stress caused by overexpression of heterologous  $\alpha$ -amylase leads to inhibition of sporulation and a prolonged motile phase in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (16): 5354-5362.
- MacKenzie, D. A., Tailford, L. E., Hemmings, A. M. & Juge, N. (2009). Crystal structure of a mucus-binding protein repeat reveals an unexpected functional immunoglobulin binding activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (47): 32444-32453.



- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V. & Polouchine, N. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (42): 15611-15616.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Piard, J. C., Axelsson, L. & Eijsink, V. (2008). Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *Journal of applied microbiology*, 105 (1): 215-226.
- Mathiesen, G., Sveen, A., Brurberg, M. B., Fredriksen, L., Axelsson, L. & Eijsink, V. G. (2009). Genome-wide analysis of signal peptide functionality in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC genomics*, 10 (1): 425.
- Medina, E. & Guzmán, C. A. (2001). Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 19 (13-14): 1573-1580.
- Méndez-Samperio, P. (2018). Development of tuberculosis vaccines in clinical trials: Current status. *Scandinavian journal of immunology*, 88 (4): e12710.
- Michon, C., Langella, P., Eijsink, V., Mathiesen, G. & Chatel, J. (2016). Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microbial cell factories*, 15 (1): 70.
- Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L., Bavari, S. & Klaenhammer, T. R. (2005). Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (8): 2880-2885.
- Myrbråten, I. (2016). *Ankring av Chlamydia trachomatis antigener på overflaten av Lactobacillus plantarum*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Neutra, M. R. & Kozlowski, P. A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews immunology*, 6 (2): 148-158.
- Nygaard, C. S. (2011). *Secretion and anchoring of invasin from Yersinia pseudotuberculosis in Lactobacillus plantarum*.
- Parrish, N. M., Dick, J. D. & Bishai, W. R. (1998). Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*, 6 (3): 107-112.
- Piard, J., Hautefort, I., Fischetti, V., Ehrlich, S., Fons, M. & Gruss, A. (1997). Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 179 (9): 3068-3072.
- Prabudiansyah, I. & Driessen, A. J. (2016). The canonical and accessory Sec system of Gram-positive bacteria. I: *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria*, s. 45-67: Springer.
- Rajagopal, M. & Walker, S. (2015). Envelope structures of Gram-positive bacteria. I: *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria*, s. 1-44: Springer.
- Siegel, S. D., Reardon, M. E. & Ton-That, H. (2016). Anchoring of LPXTG-like proteins to the gram-positive cell wall envelope. I: *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria*, s. 159-175: Springer.
- Siegrist, C.-A. (2008). Vaccine immunology. *Vaccines*, 5 (1): 17-36.
- Siezen, R., Boekhorst, J., Muscariello, L., Molenaar, D., Renckens, B. & Kleerebezem, M. (2006). *Lactobacillus plantarum* gene clusters encoding putative cell-surface protein complexes for carbohydrate utilization are conserved in specific gram-positive bacteria. *BMC genomics*, 7 (1): 126.
- Sutcliffe, I. C. & Harrington, D. J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, 148 (7): 2065-2077.
- Sztraj, K., Szczepankowska, A. K. & Chmielewska-Jeznach, M. (2017). Lactic acid bacteria—promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *Journal of applied microbiology*, 123 (2): 325-339.
- Sørvig, E., Grönqvist, S., Naterstad, K., Mathiesen, G., Eijsink, V. G. & Axelsson, L. (2003). Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS microbiology letters*, 229 (1): 119-126.

- Ton-That, H. & Schneewind, O. (2004). Assembly of pili in Gram-positive bacteria. *Trends in microbiology*, 12 (5): 228-234.
- Tverdal, A. & Funnemark, E. (1988). Protective effect of BCG vaccination in Norway 1956–1973. *Tubercle*, 69 (2): 119-123.
- United Nations. (2020). *Goal 3: Ensure healthy lives and promote well-being for all at all ages*. Tilgjengelig fra: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/health/>.
- van Roosmalen, M. L., Geukens, N., Jongbloed, J. D., Tjalsma, H., Dubois, J.-Y. F., Bron, S., van Dijk, J. M. & Anné, J. (2004). Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694 (1-3): 279-297.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *The Journal of membrane biology*, 115 (3): 195-201.
- Wiull, K. (2018). *Implementation of a two-plasmid CRISPR/Cas9 system in Lactobacillus plantarum : a new approach in the development of a novel vaccine against Mycobacterium tuberculosis*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- World Health Organization. (2019). *Global tuberculosis report 2019*.
- World Health Organization. (2020). *Tuberculosis*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
- Wyszyńska, A., Kobińska, P., Bardowski, J. & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2015). Lactic acid bacteria— 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied microbiology and biotechnology*, 99 (7): 2967-2977.
- Zhou, M., Boekhorst, J., Francke, C. & Siezen, R. J. (2008). LocateP: genome-scale subcellular-location predictor for bacterial proteins. *BMC bioinformatics*, 9 (1): 173.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Guidone, A., Sacco, M., Muscariello, L., Mazzeo, M. F., Cacace, G. & Parente, E. (2012). Inactivation of ccpA and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in Lactobacillus plantarum WCFS1. *International journal of food microbiology*, 155 (1-2): 51-59.
- Øverland, L. (2013). *Secretion and anchoring of proteins in Lactobacillus plantarum: Studies of a dendritic cell-targeted Mycobacterium tuberculosis antigen*: Norwegian University of Life Sciences, Ås.

## Vedlegg

**Tabell V-1. *In silico* analyse, fullstendig tabell.** Gener ble identifisert ved bruk av LocateP. Funksjonen til genene ble predikert med BLAST og microbesonline. Signalpeptid ble analysert med SignalP. Transmembran ble analysert med TMHMM. Se seksjon 4.1 for streng definisjon på LPxTG-anker.

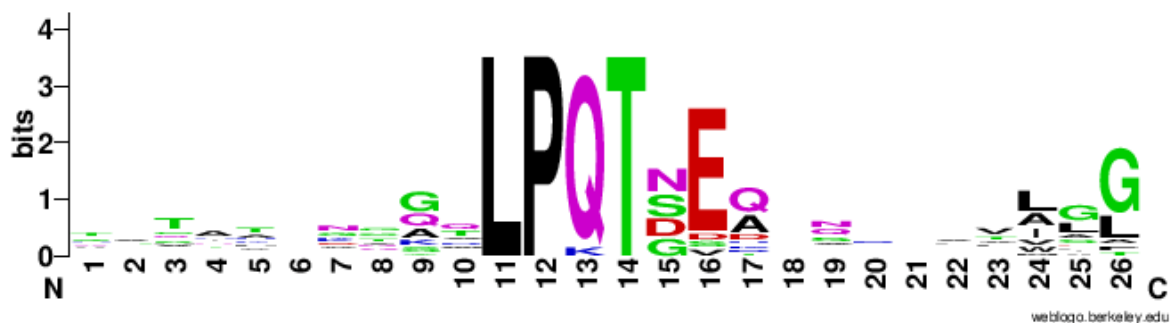
Gennavn	LPxTG motiv	Genlengde med SP	Genlengde uten SP	HMM score	Funksjon predikert (BLAST)	Funksjon predikert (microbesonline)
lp_0197	LPQTSE	1006	978	14,4	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_0373	LPKTNS	1231	1192	17,7	cell surface protein precursor,	cell surface protein precursor (putative)
lp_0800	LPQTGE	2139	2100	18,8	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_0923	LPQTDE	806	778	22	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_0946	LPQTDE	1189	1151	18,2	mucus-binding protein	cell surface protein precursor, GY family
lp_1124	LPQTDE	901	856	26,6	cell surface hydrolase	cell surface hydrolase
lp_1229	LPQTNE	1010	965	23,7	mannose-specific adhesin	cell surface protein precursor
lp_1447	LPQTNE	123	102	24,8	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_1643	LPQTND	2219	2170	22,1	mucus-binding protein precursor	cell surface protein precursor
lp_2486	LPQTDE	924	876	28,6	mucus-binding protein	cell surface protein precursor, GY family
lp_2578	LPQTSE	705	677	19,7	cell surface adherence protein, collagen-binding domain	cell surface protein precursor, collagen-binding, fibrogen-binding
lp_2588	LPQTNE	570	542	28,8	cell surface adherence protein, collagen-binding domain	cell surface protein precursor, collagen binding, fibrogen-binding
lp_2795	LPQTGE	1039	1003	15,2	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_2796	LPQTSE	1038	981	22,2	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_2925	LPQTDE	833	797	19,7	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_2940	LPQTGE	419	392	33,2	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor
lp_2958	LPQTNE	617	586	5,9	cell surface protein precursor	cell surface protein precursor, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_2976	LPQTGE	125	100	20,6	cell surface protein precursor, CscD family	cell surface protein precursor (putative)
lp_2977	NQDTVD	347	321	5,1	<b>cell surface protein precursor IKKE LPXTG anker</b>	cell surface protein precursor, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3001	LPQTGE	1074	1048	28,5	cell surface protein precursor,	cell surface protein precursor (putative), calcium ion binding, carbohydrate binding, hydrolase activity
Lp_3059	LPQTDE	1356	1321	20,8	adherence-associated mucus-binding protein	cell surface protein precursor
lp_3065	LPQTSE	141	117	20,7	cell surface protein precursor, CscD family,	cell surface protein precursor
lp_3066	YNQASV	354	327	7,8	<b>cell surface protein precursor IKKE LPXTG anker</b>	cell surface protein precursor, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3072	LNKTAV	347	318	6	<b>cell surface protein precursor IKKE LPXTG anker</b>	cell surface protein precursor, glykolsis, zinc ion binding, fruktose-bisphosphate aldolase activity, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3074	LPQTSE	123	92	18,6	cell surface protein precursor, CscD family	cell surface protein precursor
lp_3114	LPQTGE	2032	1985	27,8	mucus-binding protein,	cell surface protein precursor
lp_3115	LNKTAV	353	325	8,6	<b>cell surface protein precursor IKKE LPXTG anker</b>	cell surface protein precursor, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3127	LPQTSE	1189	1152	27,4	mucus-binding protein	cell surface protein precursor, GY family
lp_3413	VGATDA	344	315	10,4	<b>cell surface protein precursor, IKKE LPXTG anker</b>	cell surface protein precursor, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3451	LNDTAV	337	312	14,8	<b>cell surface protein precursor IKKE LPXTG anker</b>	cell surface protein precursor, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3454	LPQMNG	92		15,5	<b>cell surface protein (putative) IKKE LPXTG anker</b>	ukjent, ikke LPXTG-motif call wall anchor
lp_3677	LPQTDE	113	87	11,8	cell surface protein precursor, CscD family,	cell surface protein precursor

Gennavn	Predikert SP-type (SignalP)	Sannsynlighet for SP-type	SP kløyvingssted (KS)	Sannsynlighet for KS	Predikert SP-type (LipoP)	Aminosyresekvens av SP (inkludert 2 aminosyrer nedstrøms for kløyvingssted)
lp_0197	Sec/SPI	0.988	pos. 28 and 29: VSA-AD	0.8909		MRLIDFKTWIMGTAAMLTLIVTNTQTVSA-AD
lp_0373	Sec/SPI	0.7703	pos. 39 and 40: VDA-SS	0.6350		MYTENTGKHHRNGLPVWLLPLLVVISFWGVSNIMVVDA-SS
lp_0800	Sec/SPI	0.9578	pos. 39 and 40: SRA-DT	0.8105		MNRFITSKQHYKMYKGRFWVFAGITVATFTLNPLISRA-DT
lp_0923	Sec/SPI	0.991	pos. 28 and 29: AQA-DT	0.9503		MNKKLLYTSITTAALFVGTQLGVNNAQA-DT
lp_0946	Sec/SPI	0.9836	pos. 38 and 39: AAA-AD	0.7122		MKPNNVNNQNKRHQSRWVITATAMILTTLTASQAAA-AD
lp_1124	Sec/SPI	0.7884	pos. 45 and 46: ALA-AT	0.4823		MKRNSQQSTTVVDHYKMFKDGGKHVVYAGITVAGLSTLMLTTNALA-AT
lp_1229	Sec/SPI	0.9723	pos. 45 and 46: AAA-AD	0.7771		MLKKDNFGEHKTHYKLYKCGKNWAIMGITVLSLGVGTVTMTRAAA-AD
lp_1447	Sec/SPII	0.7299	pos. 21 and 22: AGG-CR	0.7285	SPI: pos 29 and 30	MAKFRRLLVLSLGLALAGGCCRSPDALA-AT
lp_1643	Sec/SPI	0.8163	pos. 49 and 50: VKA-AT	0.8251		MRNRLNRLGLESKSHYKLYKSGRRVVAASITVFSVIGLTFVSQVEQVKA-AT
lp_2486	Sec/SPI	0.8282	pos. 48 and 49: ASA-DT	0.5946		MSKDNQKMTGDSVYRVKMYKGRVWYAGATTLALAAGLVFANVNASADT
lp_2578	Sec/SPI	0.9966	pos. 28 and 29: AHA-KE	0.9879		MRRKLVGYMLSMLTVILALFMLGSTAHA-KE
lp_2588	Sec/SPI	0.991	pos. 28 and 29: SQA-RN	0.8349		MRKKWRWLLLALTGIFFLMFGPPLVLSQA-RN
lp_2795	Sec/SPI	0.907	pos. 36 and 37: GRA-DE	0.7179		MEQVKKRYKMYKSGKMWLFAGITLVTLNMNVVTGRA-DE
lp_2796	Sec/SPI	0.8211	pos. 57 and 58: AHA-DE	0.8370		MRLIVRSVRLFLKKWGITINYRESEVKCYKMYKSGKMWLLASASLLLTQLLTAHA-DE
lp_2925	Sec/SPI	0.9548	pos. 36 and 37: ARA-DD	0.9488		MERKRTNFKMYKIGRRWAFACAVILTMGTTLVARA-DD
lp_2940	Sec/SPI	0.9538	pos. 27 and 28: VHA-AE	0.9229		MSKALKIVMGITMLTGGIMAQKMTVHA-AE
lp_2958	Sec/SPI	0.9847	pos. 31 and 32: AQA-AT	0.9728		MKLSKRGLFWLLGLVFAILLLFSQPLGAQA-AT
lp_2976	Sec/SPI	0.8341	pos. 25 and 26: GAA-QT	0.3320		MMRWLLIRGLLGLLIGLGPISIGGAA-QT
lp_2977	Sec/SPI	0.9915	pos. 26 and 27: AQA-TN	0.9383		MKKMMRWLGAILVMISGLSAVVPQA-TN
lp_3001	Sec/SPI	0.9868	pos. 26 and 27: AVA-AV	0.6202		MIKPRVLTLLVCSAILTTVTPAVA-AV
lp_3059	Sec/SPI	0.969	pos. 35 and 36: AQA-SE	0.8297		MRYTRGKWRVTNPKVWLFSSVLLGWRIVPTVAQA-SE
lp_3065	Sec/SPI	0.9817	pos. 24 and 25: VRA-AT	0.8356		MPNKWWRLILGVMLVLSWAIPVRA-AT
lp_3066	Sec/SPI	0.8957	pos. 27 and 28: GLA-AS	0.2597		MQLLKRIMVIVGTLILGLQVSSVSGLA-AS
lp_3072	Sec/SPI	0.8329	pos. 29 and 30: GSA-NT	0.5083		MMLTKRWWQLGIGLLVGLVLSWGRGTGSA-NT
lp_3074	Sec/SPI	0.9298	pos. 31 and 32: STA-ES	0.3150		MKRLGFITIAISTLLCWGWSAPIIGVASTA-ES
lp_3114	Sec/SPI	0.8769	pos. 47 and 48: GRA-DT	0.8210		MQRRRLQRAQLTEKRTYKMYKKGRLWLIAGLSTFTLGASLLPMTGRA-DT
lp_3115	Sec/SPI	0.9918	pos. 28 and 29: ASA-DQ	0.8812		MQRLRLSLGMLLAVVASLLMMQVASA-DQ
lp_3127	Sec/SPI	0.9746	pos. 37 and 38: AFA-AT	0.9545		MNKRKIITNPPKWHLITGIAATILASIIITNQDAFA-AT
lp_3413	Sec/SPI	0.9898	pos. 29 and 30: GHA-AD	0.8824		MNGWNNKLLLGMLTLMITLLAGMTVIGHA-AD
lp_3451	Sec/SPI	0.9973	pos. 25 and 26: ARA-DD	0.9891		MKKIFWQLIAVVSIVMAGLMTTARA-DD
lp_3454	Other	0.9199	ingen funnet			
lp_3677	Sec/SPI	0.7358	pos. 26 and 27: VAA-VG	0.3691		MVQRFSVCVATILISLIMLTITGVAA-VG

VEDLEGG

Gennavn	Predikert transmembran i anker (TMHMM)	Lengde på TM	Oppfyller LPxTG-anker (streng def.)
lp_0197	nei		
lp_0373	ja	5	x
lp_0800	nei		
lp_0923	nei		
lp_0946	ja	4	x
lp_1124	nei		
lp_1229	ja	22	x
lp_1447	ja	19	x
lp_1643	ja	22	x
lp_2486	ja	22	x
lp_2578	ja	19	x
lp_2588	ja	22	x
lp_2795	ja	19	x
lp_2796	ja	19	x
lp_2925	ja	19	x
lp_2940	ja	17	x
lp_2958	nei		
lp_2976	ja	19	x
lp_2977	ja	22	
lp_3001	ja	19	x
Lp_3059	nei		
lp_3065	ja	22	x
lp_3066	ja	22	
lp_3072	ja	22	
lp_3074	ja	22	x
lp_3114	nei		
lp_3115	ja	22	
lp_3127	ja	22	x
lp_3413	ja	12	
lp_3451	ja	22	
lp_3454	ja	22	
lp_3677	ja	22	x

**Figur V-1. Utvidet motivsøk for LPxTG-motiv i *L. plantarum*.** For å kontrollere at LPxTG-motivet i *L. plantarum* består av seks aminosyrer ble 10 aminosyrer på hver side av det forventet motiv inkludert i et utvidet motivsøk.



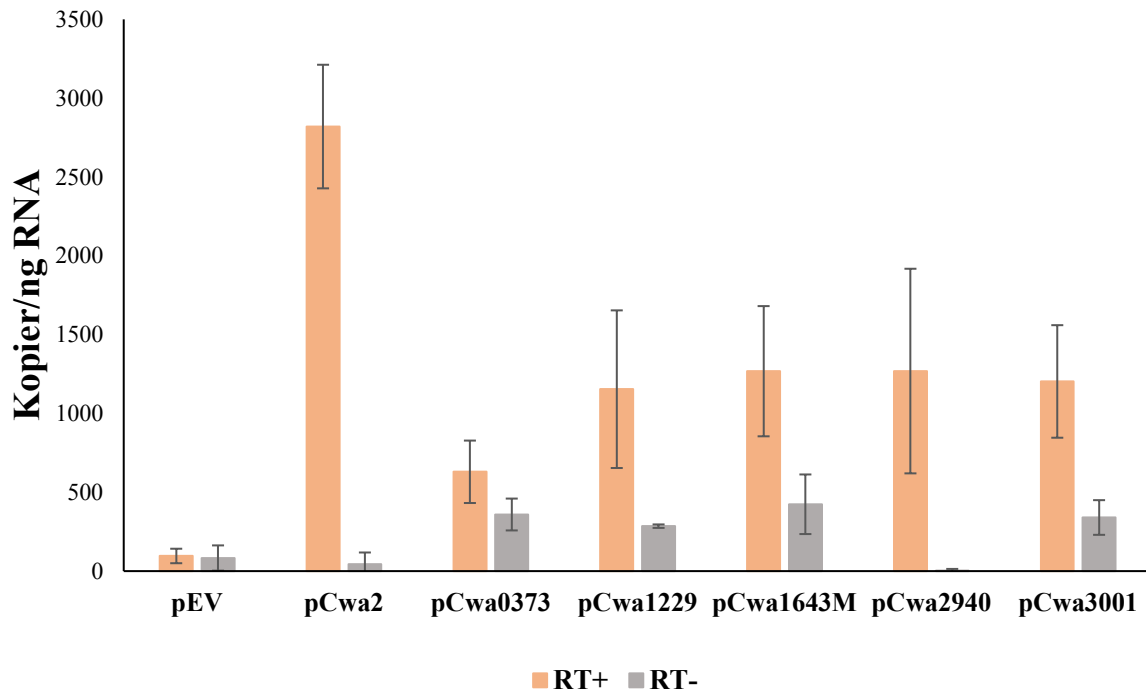
**Tabell V-2. Oversikt over antall sjeldne kodon i ankersekvensene.** Sjeldne kodon defineres som kodon med lavere frekvens enn 5-10 %. Svært sjeldne kodon har frekvens på < 5%.

Ankersekvens	Antall sjeldne kodon	Antall svært sjeldne kodon
cwa_0373	33	1
cwa_1229	14	3
cwa_1643S	2	1
cwa_1643M	19	3
cwa_1643L	28	3
cwa_2940	18	1
cwa_3001	21	1
Cwa2	28	1

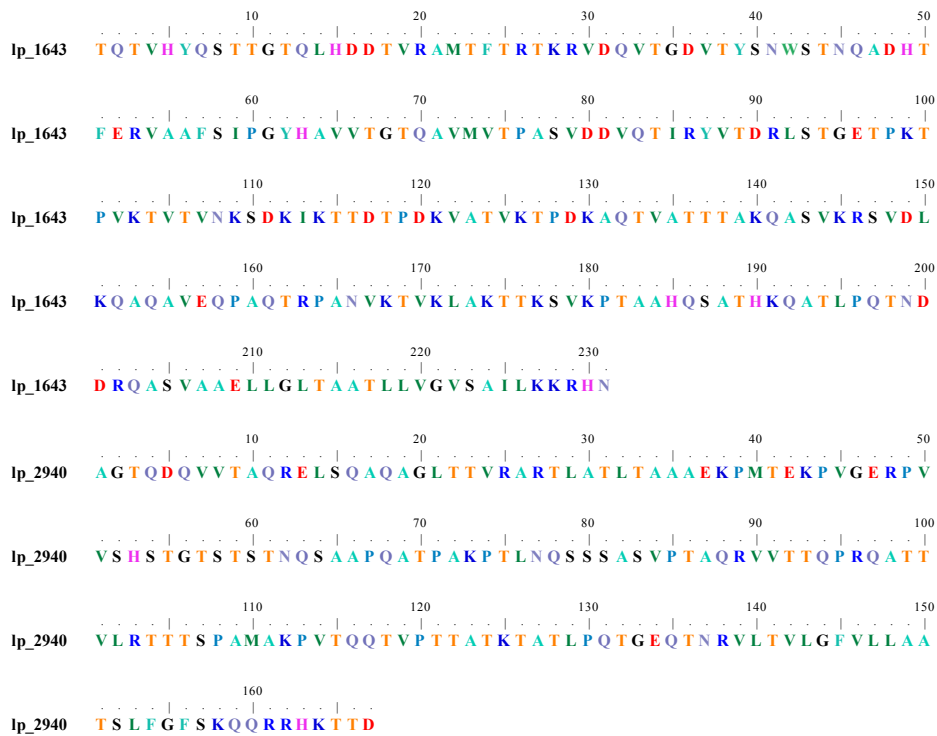
**Tabell V-3. Fullstendig tabell av CFU/mL og OD<sub>600</sub> for *L. plantarum* høstet 3 timer etter indusering.**

Ankertype	Parallell 1 (CFU/mL)	Parallell 2 (CFU/mL)	Parallell 3 (CFU/mL)	OD	Levedyktighet per OD*
pEV	1,09E+09	1,43E+10	1,42E+10	3,1	3,18E+09
cwa2	6,50E+08	3,05E+08	2,90E+09	0,34	3,78E+09
cwa_0373	4,40E+07	1,43E+08	6,20E+07	0,42	1,98E+08
cwa_1643M	7,90E+08	8,20E+08	5,68E+08	0,52	1,40E+09
cwa_1643S	1,61E+07	8,20E+07	2,09E+07	0,19	2,09E+08
cwa_1643L	1,33E+09	1,59E+08	2,80E+09	0,51	2,80E+09
cwa_2940	1,09E+08	8,25E+07	3,05E+08	0,3	5,52E+08
cwa_3001	5,20E+08	4,70E+08	3,35E+08	0,68	6,50E+08
cwa_1229	4,54E+07	2,50E+07	4,90E+07	0,29	1,37E+08

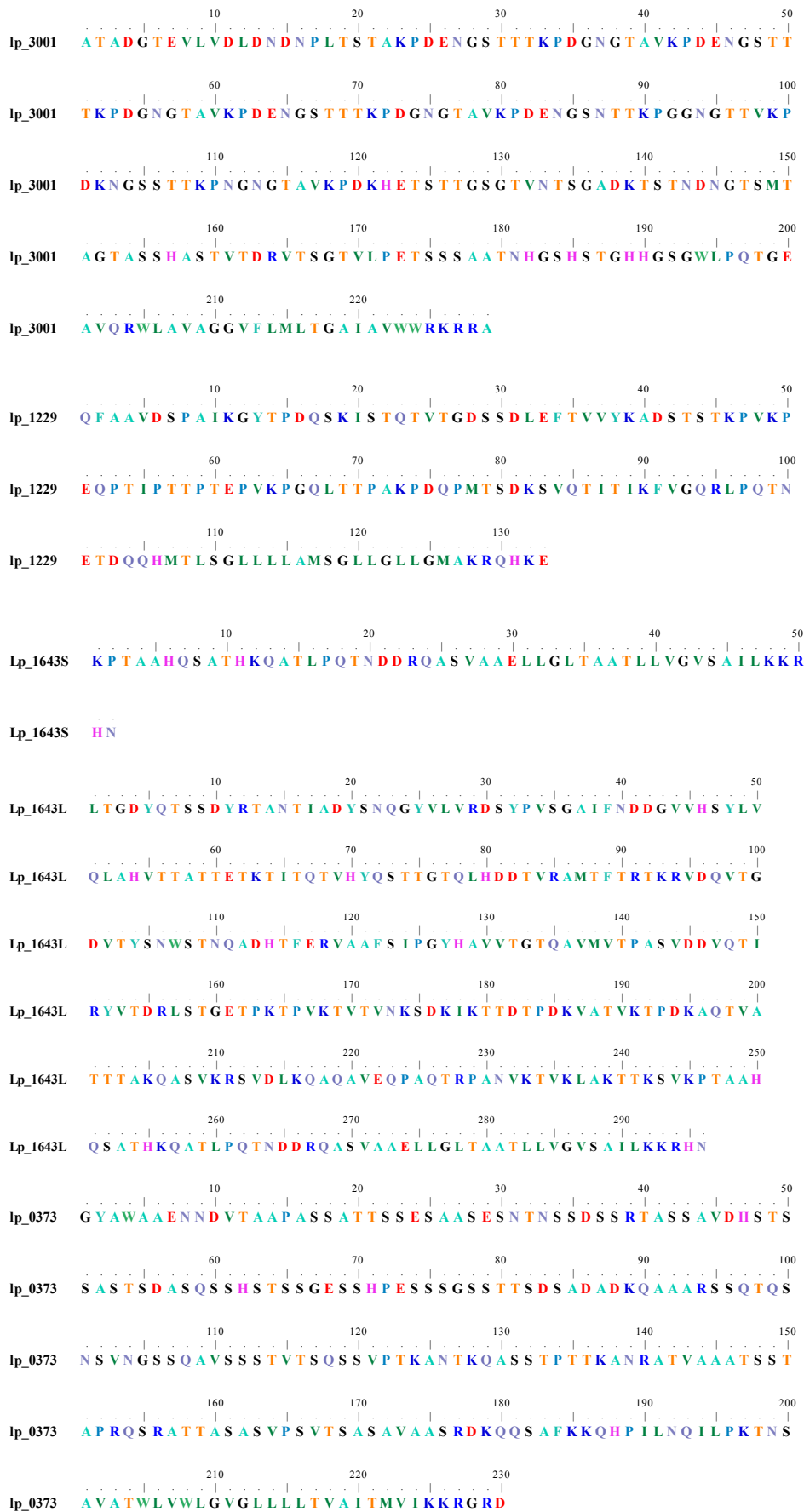
\*) Levedyktighet per OD = totalantall levende bakterier per OD enhet = gjennomsnitt av forholdet mellom CFU/mL og OD<sub>600</sub>.



**Figur V-2. Transkripsjonsnivå av antigen i *L. plantarum*.** RT+ er resultat fra prøver utsatt for revers transkriptase for å omgjøre RNA til cDNA. RT- er kontrollprøver, uten revers transkriptase.







Figur V-3. Ankersekvenser hentet fra utvalgte gen i *L. plantarum* WCFS1.



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway