



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Morten Kjos

Bruk av CRISPR-interferens til å identifisere gener involvert i toleranse mot antibiotika i *Staphylococcus aureus*

Use of CRISPR interference to identify genes involved in tolerance to antibiotics in *Staphylococcus aureus*

Anette Heidal Frøynes

Bioteknologi

Førord

Denne masteroppgaven ble gjennomført som en del av det toårige masterstudiet i bioteknologi ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet. Arbeidet er utført i molekylær mikrobiologisk forskningsgruppe ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap i perioden august 2019 til juni 2020.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder Dr. Morten Kjos. Tusen takk for alt du har lært meg gjennom dette skoleåret, og for at du alltid tok deg tid til å besvare mine spørsmål. Takk for alle timene du har lagt ned for å gi meg best mulig opplæring og veiledning, både i det praktiske arbeidet på laboratoriet og i skriveprosessen.

I tillegg ønsker jeg å takke resten av laboratorieguppen for et morsomt, inspirerende og lærerikt år i et supert arbeidsmiljø. Jeg setter stor pris på alle spørsmål dere har hjulpet meg med underveis. Spesielt vil jeg takke Zhian Salehian for å alltid gi en hjelpende hånd ved vanskelige PCR-reaksjoner og annet praktisk laboratoriearbeid, i tillegg til Maria Victoria Heggenhougen og Xue Liu (Universitetet i Lausanne) for hjelp med CRISPRi-biblioteket.

En stor takk rettes også til mine medstudenter Marita, Ingvild og Jeanette, for et innholdsrikt og fint år på laboratoriet og moralsk støtte gjennom oppgaven.

Til slutt ønsker jeg å takke familie, venner og ikke minst Sven Ove for all støtte og motivasjon gjennom studiene mine.

Anette Heidal Frøynes

Ås, mai 2020

Sammendrag

Staphylococcus aureus, ofte kalt gule stafylokokker, er en svært viktig human bakteriell patogen. Bakterien forårsaker en rekke humane kliniske sykdommer som strekker seg fra lokaliserte, avgrensede hud- og bløtvevsinfeksjoner til bakteriemi, infeksjøs endokarditt og toksisk sjokksyndrom. I behandlingen av *S. aureus*-infeksjoner benyttes det i dag flere ulike antibiotika, hvor glykopeptidantibiotika benyttes i behandlingen av livstruende infeksjoner forårsaket av multiresistente *S. aureus*. Glykopeptider fungerer ved å inhibere bakteriell celleveggsyntese via blokkering av peptidoglykansyntesen, men derivater av glykopeptider kan også ha andre virkningsmekanismer som er lite karakterisert.

Antibiotikaresistens gjør behandling av *S. aureus*-infeksjoner problematisk, og det knyttes spesielt utfordringer til methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) og vancomycin (glykopeptid)-resistente *S. aureus* (VISA og VRSA). For å kunne bekjempe dette er det avgjørende å øke kunnskapsnivået rundt gener involvert i antibiotikaresistens og toleranse hos *S. aureus*. For dette trengs det nye forskningsverktøy som kan brukes til dette formålet. For *S. aureus* ble det nylig utviklet et CRISPR interferenssystem (CRISPRi), som gjør det mulig å spesifikt nedregulere genekspresjon hos målgener. I denne oppgaven var et av hovedmålene å finne ut om CRISPRi-systemet og et hel-genom-CRISPRi-deplesjonsbibliotek kunne benyttes til å identifisere gener som er involvert i toleranse mot antibiotika, og da spesifikt transkripsjonshemmeren rifampicin og lipoglykopeptidet dalbavancin. CRISPRi viste seg å fungere dårlig til å studere rifampicinresistens. Derimot ved Illuminasekvensering av CRISPRi-deplesjonsbiblioteket (CRISPRi-sek) før og etter dalbavancinbehandling ble det i dette arbeidet identifisert flere gener involvert i toleranse for dalbavancin. Flere av de identifiserte genene er allerede kjent for å være involvert i toleranse for glykopeptider og lipopeptider, som for eksempel genene *ezrA*, *vraF* og SAOUHSC_00678. I tillegg ble *kapB* identifisert som et nytt gen som både ved depleksjon og deleksjon gjorde cellen mer sensitiv for dalbavancin. Videre ble også CRISPRi-biblioteket benyttet for å selektere frem mutanter med økt dalbavancintoleranse, og identifiserte med dette *sagB* og *aroB*. *sagB* er allerede kjent for å være involvert i glykopeptidtoleranse. Også depleksjon av genet *aroB* førte til økt dalbavancinresistens hos cellen, og dette ledet til oppdagelsen av at nedregulering av gener i chorismate-biosyntesen førte til resistensøkning. Generelt viste denne oppgaven at CRISPRi-deplesjonsbiblioteket kan brukes til å identifisere gener involvert i antibiotikatoleranse, og førte spesifikt til identifisering av kjente og ukjente gener som er involvert i toleranse for dalbavancin i *S. aureus* som legger grunnlaget for videre mekanismestudier.

Abstract

Staphylococcus aureus, is a very important human bacterial pathogen. The bacterium causes a wide range of human clinical illnesses from localized skin- and soft tissue infections to bacteremia, infectious endocarditis and toxic shock syndrome. Several antibiotics are used in the treatment of *S. aureus*-infections, whereas glycopeptide antibiotics are used in the treatment of life-threatening infections caused by multi-resistant *S. aureus*. Glycopeptides work by inhibiting bacterial cell wall synthesis by blocking the peptidoglycan synthesis, however, some glycopeptides may also work by other modes of action that are less well known.

Resistance to antibiotics is problematic for treating infections caused by *S. aureus*, and there are particularly challenges associated with methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and vancomycin (glycopeptide) resistant *S. aureus* (VISA and VRSA). To deal with this problem, it is crucial to increase the level of knowledge about genes involved in antibiotic resistance- and tolerance in *S. aureus*. This requires new research tools that can be used for this purpose. A CRISPR interference system (CRISPRi) was recently developed for *S. aureus*, making it possible to specifically downregulate target gene expression. One of the main goals of this thesis was to investigate whether the CRISPRi-system and a whole-genome-CRISPRi-depletion library could be used to identify genes involved in tolerance to antibiotics by studying the transcription inhibitor rifampicin and the lipoglycopeptide dalbavancin. CRISPRi worked poorly in the study of rifampicin resistance. In contrast, by Illumina sequencing the CRISPRi depletion library (CRISPRi-seq) before and after dalbavancin treatment, we identified several genes involved in tolerance to dalbavancin. Several of the genes identified were already known to be involved in tolerance to glycopeptides and lipopeptides, including the genes *ezrA*, *vraF* and SAOUHSC_00678. *kapB* was also identified as a new gene that made the cell more sensitive to dalbavancin both by depletion and deletion. Moreover, the CRISPRi library was used to select mutants with higher tolerance to dalbavancin, leading to the identification of *sagB* and *aroB*. *sagB* is already known to be involved in tolerance to glycopeptide antibiotics. Also, depletion of the *aroB* gene made the cell more resistant to dalbavancin, which further led to the discovery that downregulation of genes in the chorismate biosynthesis causes increased resistance. In general, the results in this work shows that the CRISPRi depletion library is useful for identifying genes involved in tolerance to antibiotics. Specifically, known and unknown genes involved in tolerance to dalbavancin in *S. aureus* were identified and this provides the basis for further mechanism studies.

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|-----------|
| 1 Introduksjon | 1 |
| 1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 |
| 1.1.1 To-komponentsystemer hos <i>S. aureus</i> | 3 |
| 1.1.2 Celleveggsyntese hos <i>S. aureus</i> | 6 |
| 1.2 Antibiotika og antibiotikaresistens | 7 |
| 1.2.1 Antibiotikaresistens er et globalt problem | 7 |
| 1.2.2 Utviklingen av antibiotika og antibiotikaresistens hos <i>S. aureus</i> | 8 |
| 1.2.3 Rifampicin - virkningsmekanisme og resistens | 10 |
| 1.3 Glykopeptidantibiotika | 11 |
| 1.3.1 Vancomycin | 11 |
| 1.3.2 Dalbavancin | 12 |
| 1.3.3 Glykopeptidens virkningsmekanisme og påvirkning av celleveggsyntese | 13 |
| 1.3.4 Kjente gener involvert i resistensutvikling mot vancomycin og andre glykopeptider | 13 |
| 1.4 CRISPR-interferens for kontroll av genekspresjon | 16 |
| 1.4.1 CRISPRi | 16 |
| 1.4.2 CRISPRi-systemet i <i>S. aureus</i> | 17 |
| 1.4.3 Genome-wide CRISPRi-bibliotek i <i>S. aureus</i> | 19 |
| 1.5 Oppgavens mål | 19 |
| 2 Materialer | 21 |
| 2.1 Bakteriestammer og plasmid | 21 |
| 2.2 Antibiotika | 21 |
| 2.3 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører | 22 |
| 2.4 Kit | 22 |
| 2.5 Instrumenter og utstyr | 22 |
| 2.6 Kjemikalier | 23 |
| 2.7 Vekstmedier og buffere | 23 |
| 2.7.1 Brain Heart Infusion (BHI) medium | 23 |
| 2.7.2 Brain Heart Infusion (BHI) agar | 24 |
| 2.7.3 Lysogeny broth (LB) medium | 24 |
| 2.7.4 Lysogeny broth (LB) agar | 24 |
| 2.7.5 Tryptic Soy Broth (TSB) medium | 24 |
| 2.7.6 Tryptic Soy Broth (TSB) agar | 24 |
| 2.7.7 Tryptic Soy Broth (TSB) medium med 0.5 M sukrose | 24 |
| 2.7.8 Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium | 24 |
| 2.7.9 Buffere og løsninger for agarose gel elektroforese | 24 |
| 2.7.10 Øvrige buffere og løsninger | 25 |
| 3 Metoder | 26 |
| 3.1 Dyrking og lagring av bakterier | 26 |
| 3.1.1 Dyrking av <i>E. coli</i> | 26 |
| 3.1.2 Dyrking av <i>S. aureus</i> | 26 |
| 3.1.3 Lagring av bakterier | 26 |
| 3.2 DNA- og plasmidisolering | 26 |
| 3.2.1 Isolering av plasmid fra <i>E. coli</i> ved bruk av E.Z.N.A Plasmid DNA Kit | 26 |
| 3.2.2 Isolering av plasmid fra <i>S. aureus</i> | 27 |
| 3.2.3 QIAGEN MIDI-prep plasmidisolering | 27 |
| 3.2.4 DNA-isolering ved bruk av Fast-Prep og MINIPREP-kolonner | 28 |
| 3.3 NanoDrop | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)..... | 28 |
| 3.4.1 PCR-protokoll for Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase | 29 |
| 3.4.2 PCR-protokoll for Phusion® High-Fidelity DNA polymerase..... | 30 |
| 3.4.3 PCR-screening ved bruk av RedTaq® DNA polymerase..... | 31 |
| 3.5 Sekvensering..... | 32 |
| 3.5.1 Sangersekvensering..... | 32 |
| 3.5.2 Illuminasekvensering | 32 |
| 3.6 Gelelektroforese..... | 33 |
| 3.6.1 Agarose gelelektroforese..... | 33 |
| 3.6.2 Rensing av PCR-produkt fra gel | 34 |
| 3.7 Mikrotiterassay for minimal inhibitory concentration (MIC)-bestemmelse av antibiotika | 35 |
| 3.8 Populasjonsanalyseprofil | 35 |
| 3.9 Transformasjon i kjemisk kompetente <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.9.1 Tillaging av kompetente <i>E. coli</i> -celler (CaCl ₂ -metoden)..... | 35 |
| 3.10 Transformering ved elektroporering i <i>S. aureus</i> | 36 |
| 3.10.1 Tillaging av kompetente <i>S. aureus</i> -celler | 36 |
| 3.10.2 Elektroporering av <i>S. aureus</i> | 36 |
| 3.11 Golden Gate-kloning og konstruksjon av CRISPRi-stammer og delesjonsstammer i <i>S. aureus</i> | 37 |
| 3.11.1 Tillaging av sgRNA-konstrukt og CRISPRi-stammer i <i>S. aureus</i> | 38 |
| 3.11.2 Tillaging av delesjonsstammer for <i>kapB</i> og <i>aroC</i> i <i>S. aureus</i> NCTC8325-4 | 40 |
| 3.12 Antibiotikaseleksjonsforsøk med CRISPRi-bibliotek | 43 |
| 3.12.1 CRISPRi-biblioteket | 43 |
| 3.12.2 Rifampicintoleransescreen med CRISPRi-bibliotek på agarskål | 43 |
| 3.12.3 CRISPRi-sek: Bestemmelse av gen-fitness ved eksponering av <i>S. aureus</i> CRISPRi-bibliotek for subletale mengder dalbavancin etterfulgt av Illuminasekvensering | 44 |
| 3.12.4 Dalbavancintoleransescreen med CRISPRi-bibliotek på agarskål | 46 |
| 3.12.5 Dalbavancintoleransescreen med CRISPRi-bibliotek ved mikrotiterassay | 47 |
| 3.13 Mikroskopi..... | 48 |
| 3.13.1 Fasekontrast- og fluorescencemikroskopi..... | 48 |
| 3.13.2 Time-lapse-mikroskopering ved bruk av CellASIC® ONIX B04A-03 Microfluidic Bacteria Plates..... | 49 |
| 4 Resultater | 51 |
| 4.1 Identifisering av gener involvert i toleranse mot rifampicin i <i>S. aureus</i> ved seleksjon på agarskåler..... | 51 |
| 4.1.1 Bestemmelse av MIC for rifampicin for <i>S. aureus</i> | 51 |
| 4.1.2 Seleksjon og verifisering av rifampicinresistente kolonier..... | 51 |
| 4.1.3 Identifisering og sekvensering av sgRNA-targetgen og <i>rpoB</i> for stammer med økt resistens mot rifampicin | 53 |
| 4.2 <i>S. aureus</i> er sensitiv for dalbavancin | 53 |
| 4.2.1 Bestemmelse av MIC for dalbavancin for <i>S. aureus</i> | 54 |
| 4.2.2 Time-lapse-mikroskopering av <i>S. aureus</i> NCTC8325-4 tilsatt dalbavancin | 54 |
| 4.3 Involvering av ulike to-komponentsystemer i toleranse mot dalbavancin | 55 |
| 4.4 Genomskala-forsøk for å identifisere gener som er involvert i toleranse mot dalbavancin i <i>S. aureus</i> | 57 |
| 4.4.1 CRISPRi-sek for bestemmelse av over-, - og underrepresenterte gener i CRISPRi-biblioteket etter dalbavancinbehandling | 57 |
| 4.4.2 Verifisering av gener involvert i dalbavancintoleranse | 59 |
| 4.4.3 <i>kapB</i> koder for et lipopeptid som påvirker dalbavancinsensitiviteten | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5 Seleksjon av dalbavancinresistente stammer på agarskål..... | 60 |
| 4.5.1 SAOUHSC_02658 påvirker sensitivitet mot dalbavancin i to av tre ulike <i>S. aureus</i> -stammer..... | 62 |
| 4.5.2 SAOUHSC_02658 er viktig for korrekt celledeling i <i>S. aureus</i> | 63 |
| 4.6 Identifisering av gener involvert i toleranse mot dalbavancin ved seleksjon med mikrotiterassay..... | 64 |
| 4.6.1 Populasjonsanalyseprofil viser at <i>aroB</i> -knockdown gir økt toleranse for dalbavancin | 65 |
| 4.6.2 Dalbavancintoleransen øker ved depleksjon av gener involvert i chorismate-biosyntese | 66 |
| 4.6.3 Deleksjon av <i>aroC</i> | 68 |
| 5 Diskusjon..... | 69 |
| 5.1 Økt rifampicinresistens skyldes mutasjoner i <i>rpoB</i> -genet..... | 69 |
| 5.2 <i>S. aureus</i> er sensitiv for dalbavancin: MIC-verdier og time-lapse-mikroskopi | 70 |
| 5.3 Depleksjon av <i>graXRS</i> og <i>walRK</i> ga økt dalbavancinsensitivitet hos <i>S. aureus</i> | 71 |
| 5.4 CRISPRi-sek fører til identifikasjon av kjente og ukjente gener involvert i dalbavancintoleranse | 73 |
| 5.5 Seleksjon av dalbavancinresistente stammer på agarskål fungerte ikke for å identifisere gener involvert i dalbavancinresistens..... | 77 |
| 5.6 Depleksjon av SAOUHSC_02658 gir økt sensitivitet for dalbavancin i <i>S. aureus</i> NCTC8325-4 og Newman..... | 77 |
| 5.7 Gener involvert i dalbavancinresistens ble identifisert ved seleksjon av CRISPRi-biblioteket ved mikrotiterassay..... | 78 |
| 5.8 Intakt chorismate-biosyntese ser ut til å være viktig for sensitivitet for dalbavancin | 79 |
| 6. Konklusjon og fremtidige perspektiver | 82 |
| Referanser | 84 |
| Vedlegg | I |

1 Introduksjon

1.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus, ofte kalt gule stafylokokker, er en svært viktig human bakteriell patogen. Omtrent 30 % av alle mennesker er kolonisert med bakterien, som opptrer både som en kommensal bakterie (bakterie som lever på eller i en vert som ikke blir påvirket) i nesen og i huden hos mennesker, men også som en opportunistisk patogen (Matuszewska et al., 2020, Tong et al., 2015). Dette innebærer at den normalt er tilstede uten å skade verten, men kan gi sykdom hos individer med svekket immunforsvar. Friske bærere av *S. aureus* har selv større sjanse å få bli infisert, og regnes som en viktig kilde for videre spredning av bakterien til andre mennesker (Chambers and Deleo, 2009).

S. aureus forårsaker en rekke humane kliniske sykdommer som strekker seg fra lokaliserte, avgrensede hud- og bløtvevsinfeksjoner til bakterieemi, infeksiøs endokarditt og toksisk sjokksyndrom (Matuszewska et al., 2020, Tong et al., 2015). Koloniseringen av *S. aureus* i huden hos mennesker kan forårsake infeksjoner som videre leder til byller, sepsis og lungebetennelse (O'Gara, 2017). I de fleste tilfellene vil bakterieemi oppstå dersom en lokal infeksjon har kommet over i blodbanen, og pasienten kan dermed stå i fare for å utvikle endokarditt (Cheung et al., 2004). Den årlige forekomsten av *S. aureus* bakterieemi (SAB) er mellom 20 og 50 tilfeller per 100 000 mennesker, og av disse dør mellom 10 % og 30 % (van Hal et al., 2012). SAB forårsaker med dette flere dødsfall i året enn både AIDS, viral hepatitt og tuberkulose til sammen (van Hal et al., 2012).

S. aureus er en svært hardfør bakterie som viser en unik evne til å raskt tilpasse seg endringer i miljøet. Bakterien evner å tilpasse seg både tørre, salte og sure tilstander i huden, og tåler med dette både uttørking og en saltkonsentrasjon på 15 % (O'Gara, 2017, Missiakas and Schneewind, 2013). Videre vokser bakterier ved temperaturer mellom 15°C til 45°C, og tåler både aerobe og anaerobe omgivelser (Missiakas and Schneewind, 2013).

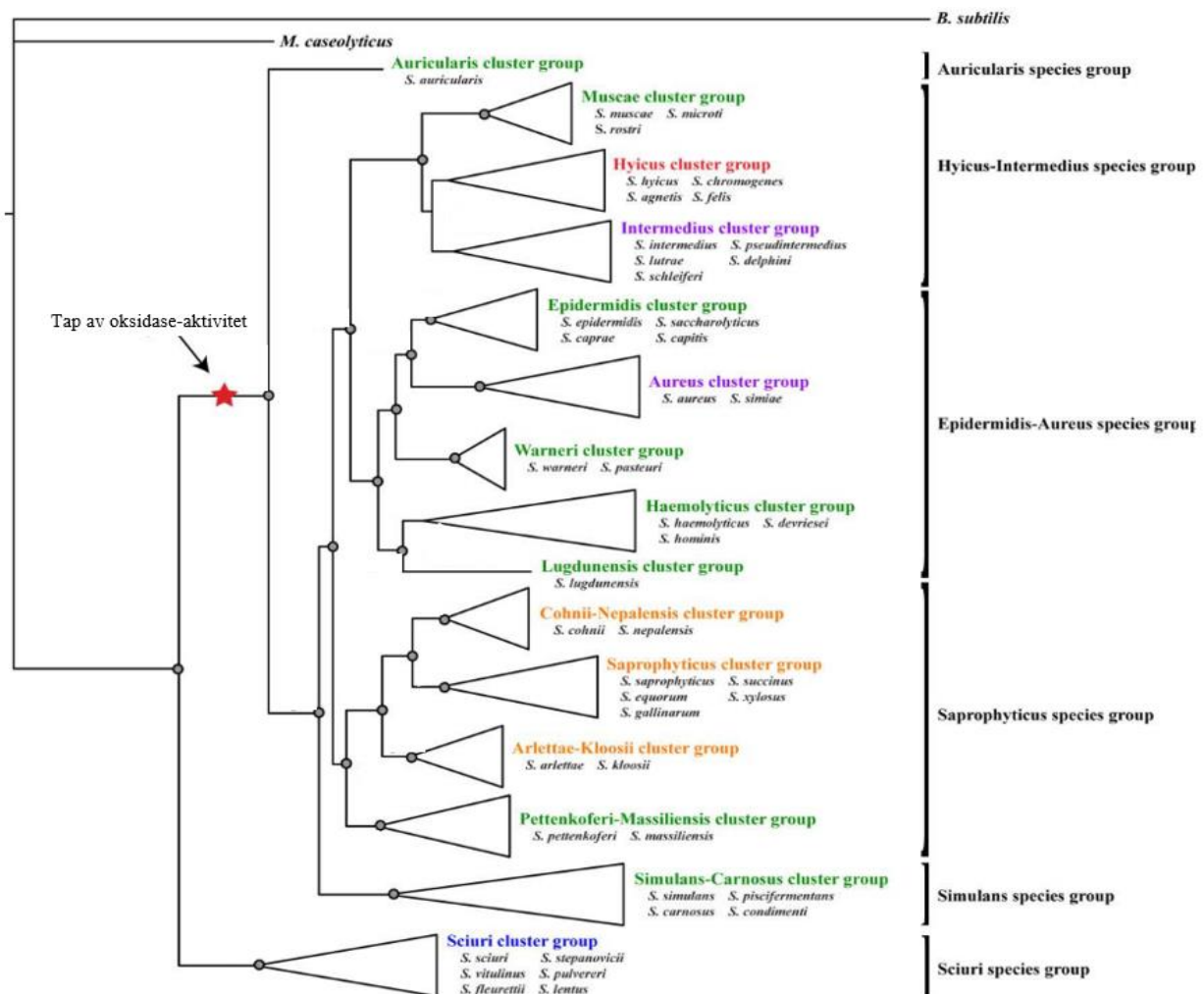
S. aureus tilhører slekten *Staphylococcus*, som består av fakultativt anaerobe, katalase-positive, ubevegelige, ikke-sporulerende, fermentative bakterier. I mikroskop sees de ofte som Gram-positive kokker i klaser og par, men korte kjeder kan også observeres i utstryk fra flytende medier (Lowy, 1998, Carter, 1990). Stafylokokker deles inn i seks artsgrupper; *Auricularis*, *Hyicus-Intermedius*, *Epidermidis-Aureus*, *Saprophyticus*, *Simulans* og *Sciuri* (Lamers et al., 2012). Videre deles artsgruppene inn i 15 underartsgrupper, og disse er listet i Tabell 1.1. (Lamers et al., 2012). Et fylogram som viser slektskapet mellom stafylokokker og hvorvidt

Introduksjon

stammen er koagulase- og oksidasenegativ eller -positiv er vist i Figur 1.1. Koagulase-positive stafylokokker produserer koagulase, et enzym som gjør at fibrin i blodplasma koagulerer (Bonar et al., 2018).

Tabell 1.1 Oversikt over de 15 ulike underartsgruppene av stafylokokker. Underartsgruppen for *S. aureus* er markert med uthevet skrift (Lamers et al., 2012).

| | | |
|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| 1. Auricularis | 6. Aureus | 11. Saprophyticus |
| 2. Muscae | 7. Warneri | 12. Arlettae-Kloosii |
| 3. Hyucus | 8. Haemolyticus | 13. Pettenkoferi-Massiliensis |
| 4. Intermedius | 9. Lugdunensis | 14. Simulans-Carnosus |
| 5. Epidermis | 10. Cohnii-Nepalensis | 15. Sciuri |



Figur 1.1 Stafylokokker kan deles inn i seks artsgrupper og 15 underartsgrupper. Dette fylogrammet representerer grupperingen av stafylokokker. Undergruppene er fargemerket: blå) arter som er koagulase-negativ og oksidase-positiv; grønn) arter som er koagulase-negativ og oksidase-negativ; oransje) arter som er koagulase-negativ og oksidase-negativ; lilla) arter som er koagulase-positiv og oksidase-negativ; og rød) arter som er koagulase-variabel og oksidase-negativ. Unntak fra fargemerking: *S. schleiferi* og *S. simiae* er koagulase negative. Medlemmer av hver underartsgruppe er listet under gruppenavnet. Figur modifisert fra (Lamers et al., 2012).

Introduksjon

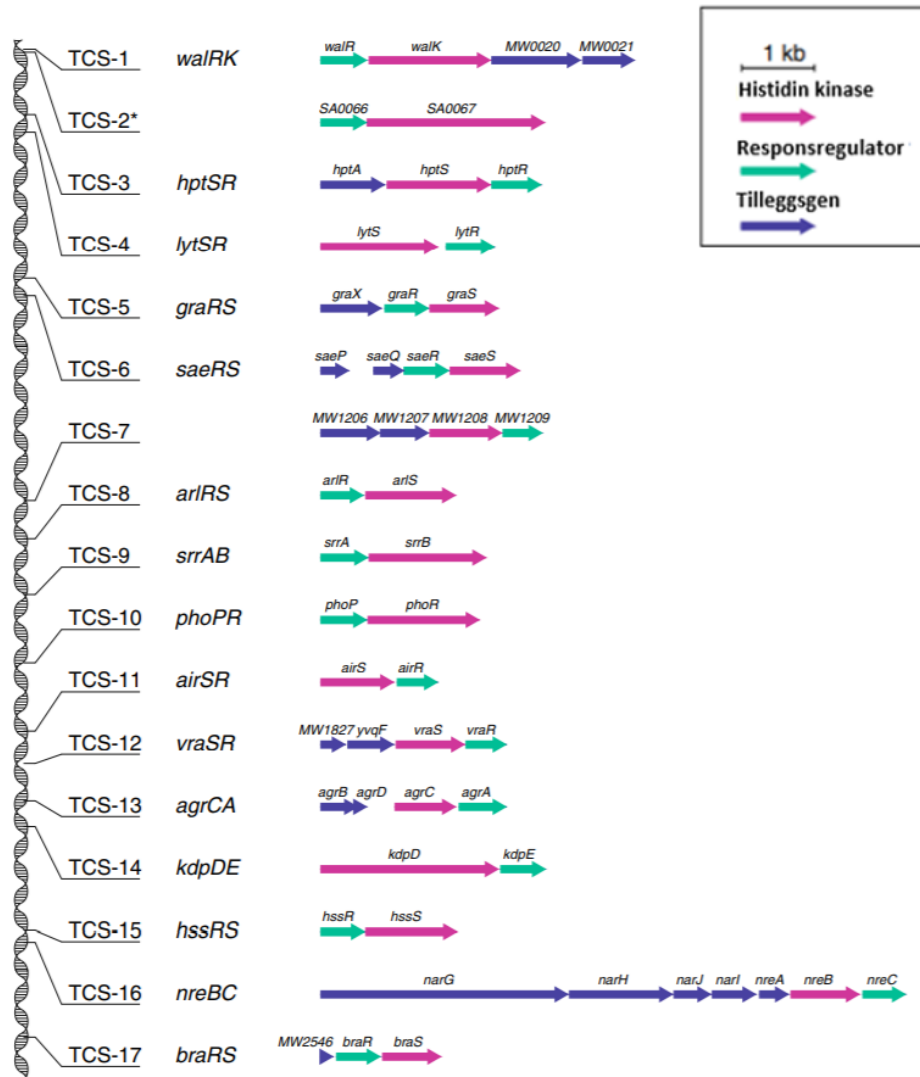
Genomet til *S. aureus* består av et sirkulært kromosom (ca. 3000 bp), samt plasmider. Transposoner, kromosomale kassetter, patogenisitetsøyer og profager utgjør til sammen 15 – 20 % av bakteriens genom (John et al., 2019). Gener knyttet til virulens og antibiotikaresistens er lokalisert både på kromosomet og på plasmider. Disse genene kan overføres mellom stammer og arter av stafylokokker eller andre Gram-positive bakterier via horisontal genoverføring med plasmidkonjugasjon eller bakteriofagtransduksjon (Lindsay, 2010). Gjennom genom- og epidemiologiske studier viser det seg at *S. aureus* gjennom tidene har hatt mange ulike vertsarter. Dette har resultert i ervervelse og tap av vertsspesifikke adaptive gener, som ofte var lokalisert på mobile genetiske elementer (Matuszewska et al., 2020). Samtidig har *S. aureus*, som en respons til skiftende vertsmiljø, opparbeidet seg muligheten til å «skru på» spesifikke gener for å øke sjansen for overlevelse. Denne prosessen er nøye kontrollert av globale regulatoriske elementer (Cheung et al., 2004). Hos *S. aureus* finnes det to hovedgrupper av regulatoriske elementer; to-komponentsystemer (TCS, se avsnitt 1.1.1) og SarA-proteinfamilien (Cheung et al., 2004).

1.1.1 To-komponentsystemer hos *S. aureus*

To-komponentsystemer i bakterier fungerer som sensoriske maskineri hvor stimuli fra miljøet utenfor bakteriecellen utløser en responsmekanisme inni cellen. Dette gjør at bakteriene kan respondere på - og tilpasse seg endringer i miljøet rundt seg, for eksempel tilstedeværelse av antibiotika, noe som kan gi dem en evolusjonær fordel (Stock et al., 2000). Ekspresjon av virulensfaktorene blir også nøye regulert av slike systemer gjennom bakterieveksten, hvor virulensfaktorer som enterotoksiner, hemolysiner, leukocidiner, proteaser, immunmodulerende faktorer og eksfoliative toksiner (Oogai et al., 2011) uttrykkes på forskjellige stadier av infeksjonen (Cheung et al., 2004). To-komponentsystemer består av sensor histidin protein kinase (HK) og et respons-regulatorprotein (RR). HK har en konserverte kinase-kjerne, og vil ved eksterne stimuli autofosforylere i et konserverte regulatorisk domene (Stock et al., 2000, Villanueva et al., 2018). I neste steg vil HK overføre en fosforgruppe til en konserverte aspartat residue på respons-regulatorproteinet. Dette vil videre føre til aktivering av nedstrøms effektordomene som utløser en gitt respons. En slik endring i cellefysiologien kan regulere genuttrykk, protein-interaksjoner eller enzymatisk aktivitet (Stock et al., 2000, Villanueva et al., 2018). De fleste bakteriearter har flere to-komponentsystemer, men antallet er ofte proporsjonalt med genomstørrelse, miljødiversiteten bakteriene befinner seg i, samt kompleksiteten av celledifferensieringen (Villanueva et al., 2018).

Introduksjon

Hos *S. aureus* finnes det 16 ulike TCS. Enkelte MRSA-stammer har i tillegg et ekstra to-komponentsystem som inneholder et element knyttet til methicillin-resistens (stafylokokk-kassett-kromosom mec (SCCmec)) (Villanueva et al., 2018, Haag and Bagnoli, 2017). Oversikt over de ulike to-komponentsystemene i *S. aureus*, samt tilhørende histidin kinase, responsregulator og tilleggsgener er vist i Figur 1.2.



Figur 1.2 To-komponentsystemene i *S. aureus*. TCS-2 finnes hos enkelte *S. aureus*-stammer (MRSA) for uttrykking av methicillinresistens. To-komponentsystemenes histidin kinase, responsregulator og tilleggsgener er også vist. Figur fra Villanueva et al. (2018).

To-komponentsystemene har mange ulike funksjoner i *S. aureus*. En av disse er global regulering av virulensekspresjon, hvor systemene *agrAC* og *saeRS* spiller en sentral rolle. *AgrAC* er opphav til et nokså komplekst regulatorisk system (Novick et al., 1993, Oogai et al., 2011). *AgrAC*-systemet regulerer ekspresjonen av genet *hld* som koder for et lite RNA (RNA III, *hld*). *hld* regulerer igjen ekspresjonen av mange virulensfaktorer hos *S. aureus*, som hemolysiner, leukocidiner og protein A (Novick and Geisinger, 2008, Oogai et al., 2011). Videre bidrar *agr*-systemet til oppregulering av proteiner som skiller ut av cellen, mens

Introduksjon

overflateproteiner nedreguleres (Novick et al., 1993). I tillegg til *agr* er to-komponentsystemene *arl* og *sae*, samt transkripsjonsregulatorene *sar*, *rot* og *mgr* involvert i ekspresjon av virulensfaktorer (Somerville and Proctor, 2009, Oogai et al., 2011).

Videre er to-komponentsystemene *vraRS*, *graXRS* og *braRS* viktig for cellens respons til antimikrobielle forbindelser og celleveggskade. Av disse spiller *vraRS* en sentral rolle i stafylokokkers respons på celleveggskade og celleveggforstyrrende midler. *graXRS* kontrollerer resistens mot kationiske antimikrobielle peptider, og to-komponentsystemet er i tillegg kjent for utvikling av vancomycinresistente stammer. Stammen blir da motstandsdyktig mot antibiotika ved en enkelt punktmutasjon i enten *graS* eller *graR* (Haag and Bagnoli, 2017). *braRS* (også kjent som *nsaSR*) er essensielt for *S. aureus*-stammers resistens mot bacitracin og nicin.

To-komponentsystemene *walRK*, *arlRS* og *lytSR* er nødvendige for celleveggmetabolisme, autolyse og celledød hos *S. aureus*. Av alle to-komponentsystemene i *S. aureus* er *walRK*-systemet det eneste som er essensielt for cellen (Villanueva et al., 2018). Dette systemet påvirker cellevekst, og finnes i Gram-positive bakterier med lavt G/C-innhold (Haag og Bagnoli, 2017). En oversikt over to-komponentsystemenes funksjon er listet i Tabell 1.2.

Tabell 1.2 Oversikt over de ulike to-komponentsystemene i *S. aureus*, samt tilhørende funksjon og lokalisering i cellen (Haag and Bagnoli, 2017).

| TCS nr. | Navn | Funksjon |
|---------|--------------------|---|
| 1 | <i>walRK</i> | Oppbygging av bakteriell cellevegg |
| 2 | TCS-2 ^a | Kdp-lignende, kalium-transport |
| 3 | <i>htpSR</i> | Ukjent funksjon |
| 4 | <i>lytRS</i> | Murein hydrolase-aktivitet |
| 5 | <i>graRS</i> | cAMP-sensing |
| 6 | <i>saeRS</i> | Utskilte faktorer hovedsakelig involvert i unngåelse av immunsystemer |
| 7 | <i>MW1206-9</i> | Spesifikk for stafylokokker, ukjent funksjon |
| 8 | <i>arlRS</i> | Adhesjon, autolysis, multiresistens og virulensgener |
| 9 | <i>srrAB</i> | Aerobisk og anaerobisk respirasjon |
| 10 | <i>phoPR</i> | Fosfatassimilering |
| 11 | <i>airSR</i> | Oksygensensing |
| 12 | <i>vraSR</i> | Cellevegg-biosyntese |
| 13 | <i>agrAC</i> | Exo- og cellevegg-proteinsyntese, quorum sensing |
| 14 | <i>kdpED</i> | Kalium-transport |
| 15 | <i>hssRS</i> | Heme-sensing |
| 16 | <i>nreCBA</i> | Nitrogenassimilering/ oksygen-regulatorisk protein NreC |
| 17 | <i>braRS/nsaRS</i> | Bacitracin utstrømming/innstrømming/sensing |

^a Ikke til stede i alle *S. aureus*-stammer

1.1.2 Celleveggsyntese hos *S. aureus*

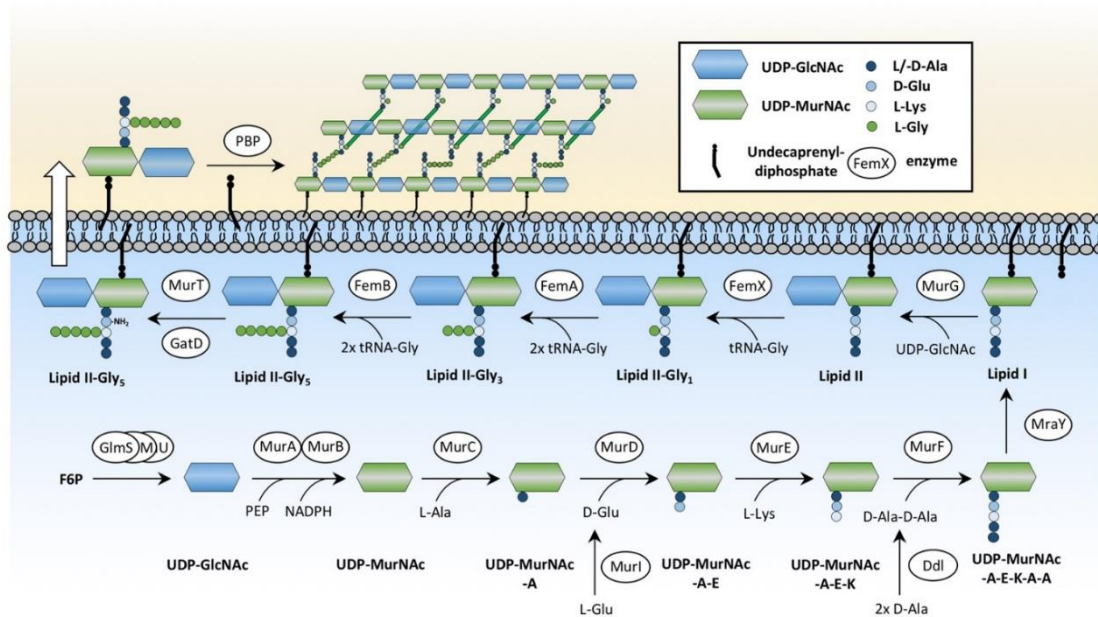
Vancomycin og dalbavancin, som blir studert i dette arbeidet, er glykopeptidantibiotika som virker ved å hemme celleveggsyntesen. Celleveggen til bakterier er essensiell ettersom den danner en barriere mot utvendig stress, bidrar til bakteriens virulens og påvirker antibiotikaresistens. Den danner med dette grunnlaget for bakteriens overlevelse og patogenitet (Jarick et al., 2018). Celleveggen hos Gram-positive bakterier består av et nettverk av kryssbundet peptidoglykan og teikoinsyrer. Gram-positive bakterier har i tillegg et lag av kapsulært polysakkarid (CP) (Rausch et al., 2019). Hos stafylokokker utgjør peptidoglykan 50 % av celleveggens vekt (Lowy, 1998).

Peptidoglykan er satt sammen av repeterende disakkarider av *N*-acetylglukosamin (GlcNAc) og *N*-acetylmuramic syre (MurNAc) bundet sammen med 1,4- β -bindinger (Lowy, 1998). Hos stafylokokker er polysakkaridkjedene av pentapeptidet L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala bundet til MurNAc (Jarick et al., 2018), som gjør at kjeder av peptidoglykan kan kryssbindes via dipeptidbroer mellom pentapeptidsidekjedene.

Selve peptidoglykansyntesen i *S. aureus* er tredelt, og skjematisk fremstilt i Figur 1.3. I første del av syntesen blir nukleotid-sukkeret UDP-MurNAc bundet til pentapeptidet trinnvis dannet. Prosessen starter med glukosamin-6-fosfat (GlcN6P), kjent som en viktig og sentral metabolitt i reguleringen av celleveggsyntese og glykolyse. Fruktose-6-fosfat (F6P) konverteres først til GlcN6P av aminotransferasen GlnS, med glutamin som nitrogenkilde (Jarick et al., 2018). Herfra omdannes GlcN6P til *N*-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) via fosfoglukosamin mutase GlnM og uridyltransferase GlnU (Komatsuzawa et al., 2004). Deretter katalyserer MurA og MurB omdanningen av UDP-GlcNAc til *N*-acetylmuraminsyre (UDP-MurNAc). Aminosyrene L-Ala, D-Glu, og L-Lys samt dipeptidet D-Alanyl-D-Alanin blir så koblet til UDP-MurNAc ved hjelp av Mur-ligasene (MurC-F). Dette resulterer i Park's nukleotid (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) (Jarick et al., 2018).

I andre steg av syntesen overføres den løselige PGN-forløperen til et bærerlipid (undecaprenyl-difosfat) via membran translokase MraY, og resulterer i dannelsen av membranbundet lipid I. Membran glykosyltransferasen MurG kobler deretter sammen lipid I-molekylet med UDP-GlcNAc, og danner lipid II (undecaprenyl-difosfat-GlcNAc-MurNAc-pentapeptid) (Jarick et al., 2018).

Introduksjon



Figur 1.3 Peptidoglykansyntese i *S. aureus*. Oversikt over de ulike intracellulære, membranbundne og ekstracellulære stegene i peptidoglykansyntesen i *S. aureus*. Rød sirkel og pil indikerer bindesete for glykopeptidantibiotika (D-Ala-D-Ala), vancomycin og dalbavancin. Se tekst for detaljer. Figur er hentet fra Jarick et al (2018).

Siste steg av peptidoglykansyntesen starter med modifisering av lipid II, hvor fem glycin-residuer kobles på konstruktet. Denne reaksjonen katalyseres av ikke-ribosomale peptidyl-transferaser (FemX/A/B proteiner), hvor glycyl-tRNA benyttes til inkorporeringen av glycinene til L-Lysin (Kopp et al., 1996). Ved dannelsen av pentaglycinbroen sammenkobler FemX den første glycyl-enheten, FemA de to neste, og FemB de to siste glycylenhetene. Peptidet modifiseres videre ved deaminering av D-Glu via MurT/GatD (Munch et al., 2012). Pentaglycin-lipid II «flippes» til slutt over den cytoplasmiske membranen og inkorporeres i det voksende peptidoglykan-nettverket. Dette skjer hovedsakelig ved hjelp av penicillin-bindende proteiner (PBP) og såkalte SEDS glykosyltransferaser via transglykosylering og transpeptidering (Scheffers and Pinho, 2005, Jarick et al., 2018, Meeske et al., 2016).

1.2 Antibiotika og antibiotikaresistens

1.2.1 Antibiotikaresistens er et globalt problem

Antibiotika er forbindelser som stopper eller hemmer veksten av bakterier og har hatt en uvurderlig betydning for bekjempelse av infeksjonssykdommer. Før introduksjonen av penicillin i 1942 var dødsraten for invasive infeksjoner forårsaket av *S. aureus* over 80 %, men introduksjonen av penicillin bidro til en betydelig forbedring av prognosene (Manara et al., 2018, Ochoa et al., 2020). Kort tid senere oppstod det imidlertid penicillin-resistente stammer. Antibiotikaresistens defineres som bakterier og andre mikroorganismers evne til å motstå effekten av antibiotikum de tidligere var sensitive for. Bakterier som er antibiotikaresistente

Introduksjon

drepes ikke av antibiotika, men kan overleve og vokse ved tilstedeværelse av medikamentet (Ochoa et al., 2020).

Resistente bakterier kan oppstå i alle typer miljø, og det er mange faktorer som påvirker resistensøkningen (Andersson et al., 2020). Den viktigste årsaken er utvilsomt overdreven bruk, da antibiotika bl.a. benyttes både innen medisin, jordbruk og havbruk (Ochoa et al., 2020). Denne overdrevne bruken har medført et seleksjonspress i bakteriemiljøet, og bidrar med dette til utviklingen av antibiotikaresistente bakteriestammer (Ochoa et al., 2020). Hyppigheten av resistente genotyper/fenotyper i bakteriepopulasjonene øker som følge av økt overlevelseskapasitet under selektivt press (Andersson et al., 2020).

Verdens Helseorganisasjon har listet antibiotikaresistens som en av de tre viktigste truslene mot folkehelsen i det 21. århundret, og resistensen estimeres å forårsake ca. 300 millioner dødsfall innen 2050. Dette antas i tillegg å koste den globale økonomien opp mot 100 trillioner USD (WHO, 2014, Munita and Arias, 2016). Hvert år blir mer enn 2.8 millioner amerikanere syke som følge av antibiotikaresistente infeksjoner, og av disse dør over 35.000 mennesker årlig (CDC, 2019a).

Bakterier har med tiden utviklet en rekke resistensmekanismer for å overleve antimikrobielle molekyler, og en bakteriecelle kan være i stand til å bruke flere forskjellige resistensmekanismer for å unngå virkningen av antibiotika (Munita and Arias, 2016). Fra et evolusjonært perspektiv bruker bakterier flere strategier for å tilpasse seg antimikrobielle angrep. Dette inkluderer mutasjoner i gen(er) ofte assosiert med virkningsmekanismen til stoffet og endring i celleoverflaten eller ekspresjon av effluxpumper som gjør at antibiotikumet ikke når målmolekylet (Munita and Arias, 2016). Alternativt kan bakteriene enzymatisk degradere antimikrobielle stoffer eller endre membranpermeabiliteten for antibiotika (Dever and Dermody, 1991). De ulike mekanismene kan føre til ulike grader av resistens, fra en svak økning i toleranse til dramatisk økning i resistens.

1.2.2 Utviklingen av antibiotika og antibiotikaresistens hos *S. aureus*

β -laktam antibiotika er en gruppe antimikrobielle midler som hindrer bakteriell celleveggsyntese ved å inhibere siste steg av peptidoglykansyntesen (Pandey, 2019). Som nevnt over medførte introduksjonen av β -laktam-antibiotikumet penicillin i 1942 en betydelig forbedring av prognosene ved *S. aureus*-infeksjoner (Manara et al., 2018, Ochoa et al., 2020). Kort tid senere oppstod det penicillin-resistente stammer, hvor antibiotikumet ble inaktivert av bakteriens egne enzymer penicillinase/ β -laktamase (Lowy, 1998). Dette har med tiden ført til

Introduksjon

at mer enn 90 % av alle human-assosierte *S. aureus*-isolater er resistente mot penicillin (Lowy, 1998).

I likhet med penicillin oppstod det raskt også methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) etter innføringen av det penicillinase-resistente β -laktamet methicillin (Manara et al., 2018). MRSA-stammer er resistente mot en rekke ulike β -laktamer og har utviklet seg til å bli et stort helseproblem verden over, og utgjør i dag 1,3 % av alle *S. aureus*-infeksjoner (Matuszewska et al., 2020). Store deler av sykehus-assosierte *S. aureus*-infeksjoner er også forårsaket av MRSA, bare i 2017 tok MRSA livet av 10.600 mennesker i USA (CDC, 2019b, Dantes et al., 2013).

MRSA-stammer har oppstått ved at bakterien tar opp et ikke-nativt gen som koder for det penicillin-bindende proteinet PBP2a. Dette proteinet skiller seg fra opprinnelig PBP ved at det har betraktelig lavere affinitet for β -laktamer, og dermed kan bakterien fremdeles opprettholde normal celleveggsyntese (Peacock and Paterson, 2015). Dersom det oppstår nye MRSA-stammer kan spredningen skje svært raskt, noe som igjen vil bidra til ytterligere økning i kliniske infeksjoner forårsaket av *S. aureus* (Matuszewska et al., 2020).

I behandlingen av *S. aureus*-infeksjoner benyttes det i dag flere ulike antibiotika, hvorav valg av medikament avhenger av type *S. aureus*-infeksjon. Ved en alvorlig methicillin-mottakelig *S. aureus*-infeksjon (MSSA) benyttes gjerne penicillinase-resistente penicilliner som flucloxacillin og dicloxacillin. Dersom MSSA-infeksjonen er mindre alvorlig (ofte hud- og bløtveisinfeksjoner eller pasienter med penicillin-hypersensitivitet) benyttes førstegenerasjons cephalosporiner (en type β -laktamer) som cefazolin, cephalothin og cephalexin, samt clindamycin, lincomycin og erytromycin som hemmer proteinsyntesen (Rayner and Munckhof, 2005).

Nosokomiale MRSA-stammer er ofte multiresistente, og behandlingen av disse kan utføres med kombinasjon av to orale antibiotika, ofte rifampicin (se avsnitt 1.2.3) og fusidinsyre. Dette gjøres ettersom bruk av enkeltantibiotikum kan føre til resistens (Rayner and Munckhof, 2005). For alvorlige MRSA-infeksjoner benyttes også en annen type cellevegghemmere, nemlig glykopeptid-antibiotika (se avsnitt 1.3) og da hovedsakelig vancomycin (se avsnitt 1.3.1), alternativt teicoplanin dersom pasienten er allergisk mot førstnevnte (Rayner and Munckhof, 2005). Fra vancomycin finnes også derivatene telavancin, dalbavancin (avsnitt 1.3.2) og oritavancin, som alle har en rask og effektiv antimikrobiell effekt mot *S. aureus in vitro* (Chambers and Deleo, 2009).

Introduksjon

På samme måte som for β -laktamer er *S. aureus* i stand til å oppnå resistens mot resterende typer antibiotika som er i klinisk bruk. Dette inkluderer vancomycin og andre glykopeptidantibiotika (se avsnitt 1.3), samt såkalte last-resort antibiotika som lipopeptidet daptomycin og linezolid, som er antibiotika som benyttes dersom andre antibiotika viser seg å være uten effekt (Manara et al., 2018).

På 1990-tallet ble de første tilfellene av *S. aureus* med økt toleranse for vancomycin oppdaget (McGuinness, 2017). Økningen i toleranse skyldtes ikke opptak av fremmed DNA, men derimot mutasjoner som oppstod hos patogenet under vancomycinbehandling *in vivo* (Gardete and Tomasz, 2014). Vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) fører ofte til vedvarende infeksjoner, samt forlenget vancomycinbehandling og sykehusopphold for pasientene. Typiske fenotypiske trekk hos VISA-stammer er økt tykkelse på cellevegg, redusert kryssbinding av peptidoglykan, endringer i overflateproteiner, redusert autolytisk aktivitet, dysfunksjonelt *agr*-system og endringer i vekst (Boyle-Vavra et al., 2001, McGuinness, 2017, Koehl et al., 2004) (se avsnitt 1.3.4.1 for detaljer).

Til forskjell fra VISA, er vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) fullstendig resistente mot vancomycin. Denne varianten kom noe senere på banen, og ble først oppdaget i USA i 2002 (Cong et al., 2020). Opphavet til VRSA-stammene skyltes overføring av resistensgener fra vancomycin-resistente enterokokker (VRE) til *S. aureus* (se avsnitt 1.3.4.1), og per 2015 hadde alle VRSA-stammer sitt opphav fra MRSA (Zhu et al., 2013, Walters et al., 2015). Behandling av infeksjoner forårsaket av VRSA er utfordrende, men heldigvis sjeldne, med totalt 14 tilfeller i USA frem til 2017 (Walters et al., 2015). Etersom vancomycin i stor grad benyttes i behandlingen av MRSA-infeksjoner, er det bekymringsverdig dersom *S. aureus* også oppnår fullstendig resistens mot vancomycin (McGuinness, 2017). Verdens Helseorganisasjon (WHO) listet i 2017 vancomycin-intermediate og vancomycin-resistente MRSA blant patogenene med høy prioritet for forskning og utvikling av nye antibiotika (Tacconelli et al., 2018). Videre vil det bli fokusert på de tre antibiotikaene som ble benyttet i dette arbeidet: rifampicin, vancomycin og dalbavancin (avsnitt 1.2.3, 1.3.1 og 1.3.2) og hvilke mekanismer som er involvert i resistens mot disse i *S. aureus* (avsnitt 1.3.4).

1.2.3 Rifampicin - virkningsmekanisme og resistens

Rifampicin er et bredspektret semisyntetisk antibiotikum produsert av *Streptomyces mediterranei*, og virker bakteriocidalt på både intracellulære og ekstracellulære organismer (Gilman A., 1996). Rifampicin ble først tatt i bruk i 1967, og har siden den gang vært viktig i

Introduksjon

behandlingen av tuberkulose, AIDS-assosierte mykobakterielle infeksjoner, lepra og MRSA-infeksjoner (Alifano et al., 2015). Antibiotikumet fungerer ved at det danner et stabilt kompleks med bakteriens RNA polymerase, og reagerer spesifikt med β subuniten som kodes for av *rpoB* genet (Aubry-Damon et al., 1998). Dette hindrer enzymets funksjon fordi initieringen av RNA-syntese undertrykkes.

Rifampicinresistens (Rif^r) oppstår som følge av mutasjoner i RNA polymerase β subuniten, og fører til at enzymet har lavere affinitet for antibiotikumet (Aubry-Damon et al., 1998). Rif mutasjoner har nesten utelukkende blitt observert i *rpoB*-genet som koder for β subuniten av RNA polymerase. Antibiotikumet blir nesten alltid brukt i kombinasjon med andre aktive antimikrobielle stoffer for å unngå resistens under behandlingen av tuberkulose og andre sykdommer (Guerillot et al., 2018, Goldstein, 2014).

1.3 Glykopeptidantibiotika

Glykopeptidantibiotika er en type antibiotika som benyttes i behandlingen av livstruende infeksjoner forårsaket av multiresistente Gram-positive patogener som *S. aureus*, *Enterococcus ssp.* og *Clostridium difficile*. Glykopeptidene fungerer ved inhibering av bakteriell celleveggsyntese via blokkering av peptidoglykansyntesen (Binda et al., 2014). Førstegenerasjons glykopeptidantibiotika inkluderer vancomycin, teicoplanin og ramoplanin, og andregenerasjonsantibiotikaene inkluderer dalbavancin, oritavancin og telavancin (NCI). Daptomycin er et annet last-resort antibiotikum som tilhører denne gruppen. I det følgende er en beskrivelse av vancomycin og dalbavancin, de to glykopeptidene benyttet i dette arbeidet, samt en beskrivelse av glykopeptidens mekanisme og påvirkning av celleveggsyntese og kjente gener involvert i resistensutvikling mot glykopeptider.

1.3.1 Vancomycin

Vancomycin ble først oppdaget i 1956, og stammer opprinnelig fra bakterien *Streptomyces orientalis* (Dasgupta, 2012). I tiden etter oppdagelsen ble antibiotikumet raskt forkastet til fordel for andre antibiotika med bedre effekt og lavere toksisitet, men i starten av 1980-tallet oppstod brått en voldsom økning i bruk av medikamentet. Bare i løpet av de påfølgende to tiårene ble det observert en >100-folds økning i bruken av vancomycin (Kirst et al., 1998, Levine, 2006). En av hovedgrunnene til dette var utbredelsen av resistente patogener som MRSA og senere penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* (Kirst et al., 1998).

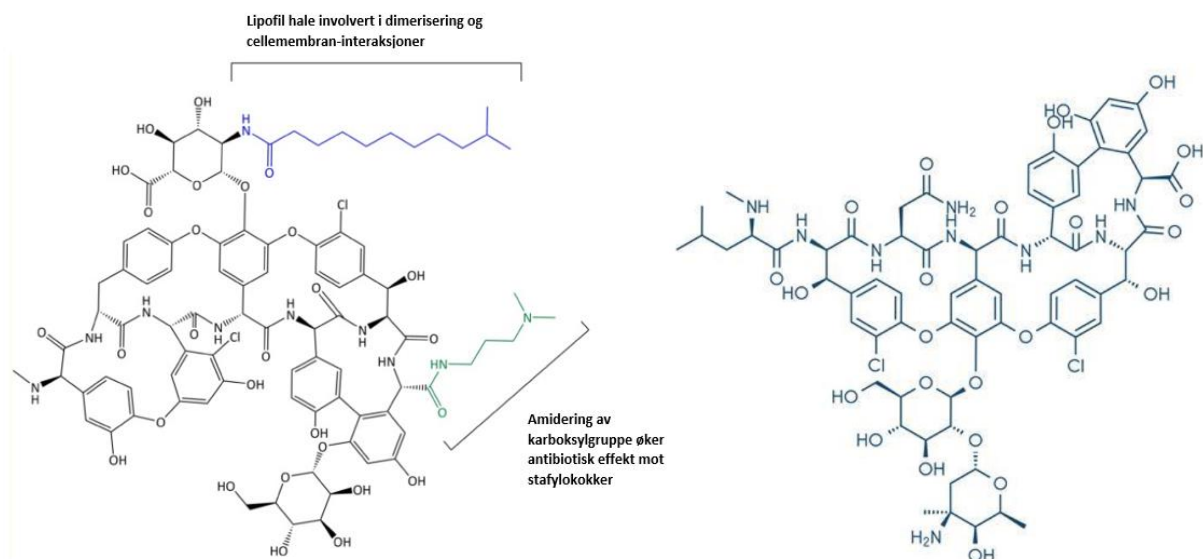
Vancomycin er et glykopeptid som blokkerer celleveggsyntesen hos en rekke Gram-positive bakterier (se avsnitt 1.1.2 og 1.3.3) (Watanakunakorn, 1984). Vancomycin og andre

Introduksjon

glykopeptider benyttes dersom andre antibiotika ikke har vist seg effektive, og blir ofte brukt i behandlingen av alvorlige infeksjoner forårsaket av MRSA, streptokokker og enterokokker (Fookes, 2018). Vancomycin har antimikrobiell effekt mot de fleste arter innen *Actinomyces* og *Lactobacillus*, samt mot *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* og *Streptococcus agalavtia* (drugbank.ca, 2005).

1.3.2 Dalbavancin

Dalbavancin er et derivat av vancomycin og teicoplanin, og har derfor også lignende affinitet og virkemåte (Werth et al., 2018). Antibiotikumet er et bakteriocidalt, semisyntetisk lipoglykopeptid, og fungerer altså som andre glykopeptider ved å hindre peptidoglykansyntese, og dermed også celleveggsyntesen hos Gram-positive bakterier (Chaudhry, 2015, McCurdy et al., 2015) (se avsnitt 1.1.2 og 1.3.3 for detaljer). Til forskjell fra tradisjonelle glykopeptider har dalbavancin en lipofil sidekjede og en amidert karboksyl-sidegruppe, og disse molekulære endringene bidrar til å øke proteinbindingen og halveringstiden for dalbavancin (McCurdy et al., 2015). Etersom antibiotikumet er et lipoglykopeptid kan dalbavancin dimerisere og ankre sin lipofile sidekjede i bakteriemembraner, noe som muligens bidrar til økt affinitet for målet og økt antimikrobiell aktivitet (Chen et al., 2007). Figur 1.4 viser kjemiske strukturer for sammenligning av glykopeptidene dalbavancin og vancomycin.



Figur 1.4 Kjemisk struktur av dalbavancin (venstre) og vancomycin (høyre). Til forskjell fra vancomycin har dalbavancin en lipofil sidekjede som bidrar til forankring i bakteriemembraner, samt en amidert karboksyl-sidegruppe som øker den antimikrobielle effekten mot stafylokokker. Figurer: dalbavancin (Smith et al., 2015) og vancomycin (Cotton, 2010).

Bruksområdet for dalbavancin er hovedsakelig behandling av akutte bakterielle hud- og hudstrukturinfeksjoner forårsaket av mottakelige, Gram-positive bakterier. Antibiotikumet

Introduksjon

benyttes i tillegg mot MSSA- og MRSA-infeksjoner, og har vist seg å ha *in vitro* antimikrobiell effekt mot patogenene *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus anginosus* og *Enterococcus faecium* (Citron et al., 2014, Smith et al., 2015).

1.3.3 Glykopeptiders virkningsmekanisme og påvirkning av celleveggsyntese

Vancomycin og dalbavancin er begge glykopeptid-antibiotika som hindrer celleveggsyntese hos Gram-positive bakterier, og benyttes derfor i behandlingen av infeksjoner forårsaket av *S. aureus* (Chaudhry, 2015, Citron et al., 2014). Disse antibiotikaene fungerer ved å binde til D-Ala-D-Ala på den voksende peptidoglykankjeden, og forhindrer med dette inkorporeringen av GlcNAc og MurNAc til nettverket (Smith et al., 2015, Gardete and Tomasz, 2014). Dette skjer fordi bindingen av vancomycin eller dalbavancin til disse terminale komponentene bidrar til at transpeptidasereaksjonene hemmes. Glykopeptider fører derfor til ødeleggelse av celleveggs integritet, og forårsaker celledød (Zhanel et al., 2010).

Dalbavancin har i tillegg noen ekstra antimikrobielle effekter som er mindre godt karakterisert (Fig. 1.4). En av disse er stoffets lipofile sidekjede som gjør at molekylet kan dimerisere og forankres i lipid II i cellemembranen. Denne forankringen styrker bindingen til D-Ala-D-Ala, forlenger halveringstiden og øker dalbavancins aktivitet sammenlignet med vancomycin. På denne måten deler også dalbavancin noen egenskaper med daptomycin, et lipopeptid som har en kompleks virkningsmekanisme (Miller et al., 2016). I tillegg til god forankring i cellemembranen hos Gram-positive bakterier har dalbavancin også ekstra effekt mot stafylokokker grunnet en amidert karboksyl-sidegruppe, men den eksakte årsaken til dette er ikke kjent (Smith et al., 2015).

1.3.4 Kjente gener involvert i resistensutvikling mot vancomycin og andre glykopeptider

Det finnes flere gener som er svært sentrale i utviklingen av resistens eller toleranse mot vancomycin og andre glykopeptider. Etersom dalbavancin er mindre studert, vil det videre fokuseres på kjente gener som er viktig for utviklingen av resistens mot glykopeptider hos *S. aureus*, med hovedvekt på vancomycinresistens.

1.3.4.1 *van*-gener fra vancomycinresistente enterokokker

Den viktigste og mest kjente årsaken til vancomycinresistens hos *S. aureus* er overføring av *van*-gener fra vancomycinresistente enterokokker (Howden et al., 2008). Per 2009 var det oppdaget syv ulike typer vancomycinresistens hos enterokokker, hvorav hver type korresponderte til et spesifikt operon (*vanA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-G* og *-L*). Disse koder for gener

Introduksjon

som først fjerner det C-terminale dipeptidet D-Ala-D-Ala i pentapeptidet og deretter erstatter dette med et nytt dipeptid, D-Ala-D-Lac eller D-Ala-D-Ser, som har lavere affinitet for glykopeptider (Smith et al., 2015, Perichon and Courvalin, 2009, Chen et al., 2007). Herav er resistenstypene VanA, -B og -D ansvarlige for syntese av D-Ala-D-Lac, og resistenstypene VanC, -E, -G og -L for syntese av D-Ala-D-Ser (Perichon and Courvalin, 2009).

VanA var den første resistenstypen som ble oppdaget, og regnes også som den vanligste. Resistensnivået for glykopeptider, som vancomycin, dalbavancin og teicoplanin, er svært høyt for denne resistenstypen, som har utgangspunkt i enterokokk-transposonet Tn1546 (Perichon and Courvalin, 2009, Sievert et al., 2008). Overføringen av transposonet til *S. aureus* har med tiden ført til fremveksten av VRSA-stammer (Ziasistani et al., 2019). Tilsvarende har det også oppstått MRSA-stammer med fullstendig vancomycinresistens, selv om disse *S. aureus*-variantene er sjeldne (Howden et al., 2008).

Til forskjell fra VRSA-isolater har ikke VISA-stammer *van*-resistensgener for vancomycin, og nivået av resistens er også lavere. Det er derfor flere alternative resistensmekanismer som kan bidra til VISA-fenotypen. For eksempel kan VISA-fenotypen ha oppstått som følge av gradvis endring i peptidoglykansyntesen, ettersom det observeres at VISA-stammer syntetiserer ekstra mengder av synteseforløperen D-Ala-D-Ala, hvilket binder opp glykopeptider og hindrer det i å nå sitt target-område (Sujatha and Praharaj, 2012). Eksempelvis observeres dette i utviklingen av dalbavancin-resistens, hvor det for VISA-isolater oppstår redusert mottakelighet for dalbavancin ved fortykning av celleveggen og økning i bindesetet for D-Ala-D-Ala. Dette vil igjen øke mengden dalbavancin som må bindes til cellen for å oppnå lik effekt (Howden et al., 2010, Smith et al., 2015). I tillegg til disse endringene er det også foreslått at VISA-stammer har defekter i DNA «mismatch»-reparasjonssystemet (Sujatha and Praharaj, 2012), som gjør at flere mutasjoner oppstår.

1.3.4.2 GraRS og VraSR er to-komponentsystemer involvert i vancomycinresistens

Det er i tillegg flere gener som bidrar til økt vancomycinresistens hos *S. aureus*. Et av disse er *graS*, et gen som koder for en to-komponent-regulatorisk sensor. I en studie av Howden et al. (2008) ble det oppdaget at VISA-stammen inneholdt en mutasjon i dette genet, hvorav mutasjonen førte til endringen av en aminosyre fra polar til upolar (T136I). Det ble videre forsøkt å erstatte *graS*-allelet hos den vancomycin-mottakelige foreldrestammen med allelet fra VISA-derivatet. Dette resulterte i økt vancomycinresistens, hvilket bekreftet rollen for GraRS to-komponentsystemet i utviklingen av VISA. Det ble i tillegg foreslått at systemet spiller en

Introduksjon

viktig rolle i utviklingen av klinisk signifikant vancomycin-resistens hos MRSA. To-komponentsystemet *VraSR* kontrollerer ekspresjonen av ABC-transporterne *vraF* og *vraG*, gener som har vist seg å være oppregulert i VISA (Howden et al., 2008).

Også Matsuo et al. (2013) og Kussmann et al. (2018) viser til at mutasjoner i *vraSR* og *graRS*, regulatoriske systemer involvert i stafylokokkers celleveggsyntese, er svært bidragsytende i utviklingen av VISA-stammer og redusert glykopeptid-mottakelighet (Matsuo et al., 2013, Kussmann et al., 2018).

1.3.4.3 To-komponentsystemet *WalRK* er også involvert i vancomycinresistens

Det har blitt vist at punktmutasjoner i to-komponentsystemet *WalRK* fører til økt vancomycin- og daptomycinresistens i *S. aureus* (Cameron, 2016, Matsuo et al., 2013). I en studie gjort av Kuroda et al. (2019) viste det seg imidlertid at VISA-stammer hadde høyere toleranse mot vancomycin ved overuttrykk av *walRK*-operonet. Dette skyldtes fortykninger i celleveggen og overproduksjon av D-Ala-D-Ala bindeseter som “fanget” vancomycin-molekylene. Studien foreslo dessuten at depolarisering av vegg-teikoinisyre, samt den positivt ladde overflaten med lysyl-fosfatidylglyserol bidro til forhøyet toleranse for kationisk daptomycin og vancomycin (Kuroda et al., 2019). Selv om mekanismene fortsatt ikke er helt avklart, viser disse studiene at unormal ekspresjon av *walRK* påvirker toleransen for vancomycin i *S. aureus*.

1.3.4.4 Mutasjoner i RNA-polymerasegenet *rpoB* fører til økt vancomycinresistens

Mutasjoner i *rpoB* har også vist seg å være involvert i fremveksten av VISA-stammer. Dette er noe overraskende ettersom *rpoB*-genet koder for β -subenheten til RNA polymerase (Matsuo et al., 2013, Kussmann et al., 2018). I en studie av Watanabe et al. (2011) ble det observert at 27 av 38 VISA-stammer hadde en eller flere mutasjoner i *rpoB*. Som nevnt over kobles disse mutasjonene ofte mot rifampicinresistens, og i studiet ble det videre observert at ~96 % av rifampicinresistente MRSA-mutanter også hadde økt toleranse for vancomycin (Watanabe et al., 2011). Den eksakte mekanismen som ligger til grunn for *rpoB*-mediert resistens mot vancomycin er ikke kjent, men *rpoB*-mutasjoner har vist seg å være assosiert med økt celleveggykkelse for *S. aureus* (Cui et al., 2010).

1.3.4.5 *sagB* påvirker vancomycinresistens i stafylokokker

Et annet gen som påvirker vancomycinresistens hos *S. aureus* er *sagB*. Dette genet koder for det membran-assosierte enzymet *N*-acetylglukosaminidase, og spiller en viktig rolle i peptidoglykansyntesen. Delesjon av *sagB* i *S. aureus* gir vekst- og cellemorfologiske defekter

Introduksjon

ettersom mutanten har elongerte peptidoglykankjeder. Delesjonen fører med dette også til forstyrrelser i protein-trafikken og defekter i cellevegg-forankring (Chan et al., 2016).

1.3.4.6 Andre gener involvert i resistens mot glykopeptider i *S. aureus*

Også mutasjoner i genene *pbp4*, *cmk*, *pp2c*, *agr*, *orf1* og *tcaRAB* har vist seg å øke toleransen for glykopeptider hos *S. aureus* (Matsuo et al., 2013, Yoo et al., 2013). Av disse er det eksempelvis antatt at endringer i ekspresjonen av *pbp4* (penicillin-bindende protein 4) bidrar til økt andel D-Ala-D-Ala muropeptider, som igjen gir flere vancomycin-bindeseter og skaper forhøyet vancomycinresistens (Finan et al., 2001). Videre koder *cmk* for cytidylat kinase, og det er vist at redusert aktivitet i *cmk*-mutantstammer fører til fortykning av celleveggen og redusert cellevekstrate. Dette vil igjen føre til VISA-fenotype (Matsuo et al., 2013).

1.4 CRISPR-interferens for kontroll av genekspressjon

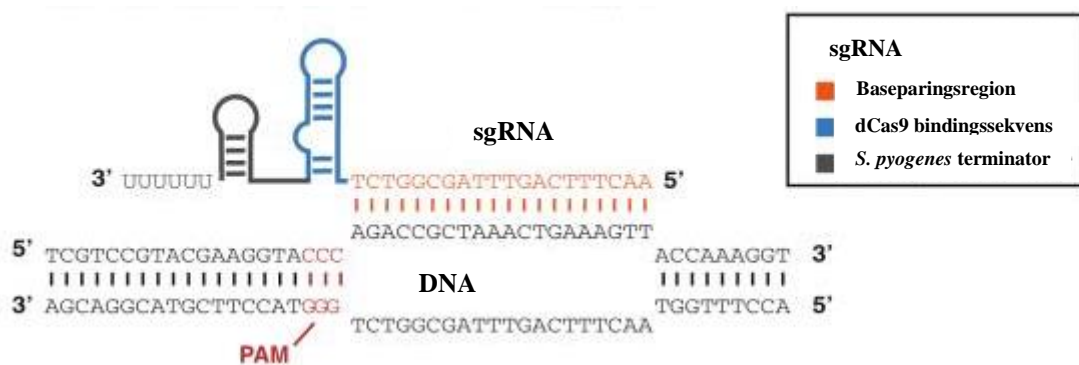
1.4.1 CRISPRi

CRISPR (Clustered regularly interspersed short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated protein 9) ble opprinnelig identifisert som en immunitetsmekanisme visse bakterier bruker for å beskytte seg mot angrep fra bakteriofager (Kick et al., 2017). Denne immunitetsmekanismen går grovt sett ut på at bakterier uttrykker nukleasen Cas9, som sammen med to RNA-molekyler, crRNA og tracrRNA, spesifikt gjenkjenner bakteriofag-DNA som kommer inn i bakterien, Cas9/crRNA/tracrRNA-komplekset inaktiverer deretter bakteriofag-DNA ved å gjøre dobbeltråd-kutt (Kick et al., 2017). Egenskapene til dette systemet har senere blitt utviklet til et kjent og mye brukt verktøy innenfor genetikken. CRISPR/Cas9 er mest kjent som en metode for å gjøre spesifikke endringer i DNA-sekvenser i form av delesjon, insersjoner eller enkeltmutasjoner (Kick et al., 2017). I denne oppgaven blir derimot CRISPR/Cas9 brukt som en metode for å regulere transkripsjon.

CRISPRi (CRISPR interferens) er en teknologi brukt for nedregulering av genekspressjon i bakterieceller (Hawkins et al., 2015). Teknikken baserer seg på sterisk blokkering av transkripsjon av spesifikke gener med et kompleks bestående av et nuklease-inaktivt Cas9-protein (dCas9), og et såkalt single-guide-RNA (sgRNA) (Liu et al., 2017). Normalt Cas9-protein fungerer som en endonuklease som katalyserer dobbeltrådig kutt i målsekvensen. Til forskjell fra normalt Cas9-protein har dCas9-proteinet mutasjoner i nuklease-domenet, hvilket gjør at dCas9 ikke kan kutte i målsekvensen, men kun binde til den og dermed forhindre transkripsjon (Brocken et al., 2018).

Introduksjon

Binding av Cas9 og dCas9 avhenger av RNA-molekyler. sgRNA er en fusjon av tracrRNA og crRNA, de to RNA-molekylene som opprinnelig virker sammen med Cas9. sgRNA-konstruktet består av en 102 nukleotider lang kimerisk ikke-kodende RNA-sekvens. Her finner man en 20-nt lang baseparingsregion, etterfulgt av en 42-nt lang Cas9-bindingssekvens og en transkripsjonsterminator på 40-nt (Hawkins et al., 2015). Hoveddelen av sgRNAet, Cas9-bindingssekvensen og transkripsjonsterminatoren, vil være konstant og uavhengig av hvilken DNA-målsekvens man benytter. Den 20-nt lange baseparingsregionen avgjør DNA-målsekvensen, og modifisering av denne gir stor fleksibilitet med hensyn på utvelgelse av gener for represjon (Hawkins et al., 2015). I tillegg trengs en PAM-sekvens (proto-spacer nærliggende motiv) for å binde DNA, og denne er spesifikk for Cas9 som benyttes. PAM-sekvensen sitter oppstrøms for, og i nærheten av DNA-målsekvensen, og dCas9-sgRNA-komplekset vil kun binde til DNA dersom sekvensen er komplementær med målsekvensen og ligger i rett avstand til PAM-setet (Hawkins et al., 2015). Figur som illustrerer design av sgRNA er vist i Figur 1.5.



Figur 1.5 Design av sgRNA for målrettet genrepresjon, hvor sgRNA binder til målsekvens. sgRNA består av en 20-nt lang baseparingsregion (oransje), etterfulgt av en 42-nt lang dCas9-bindingssekvens (blå) og en transkripsjonsterminator på 40-nt (mørk grå). PAM-sekvensen er farget rød. Figur basert på Hawkins et al. (2015).

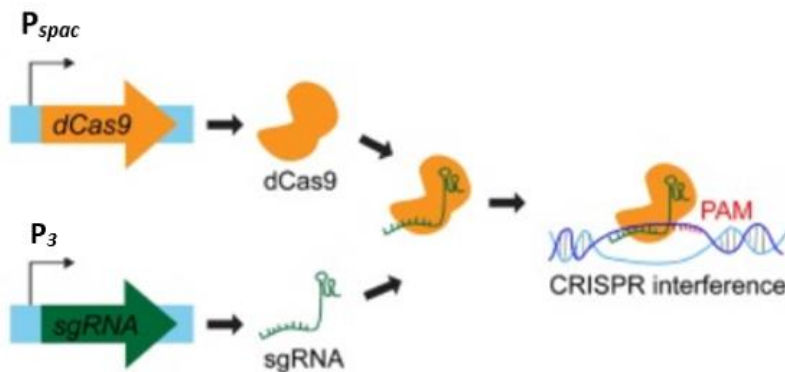
sgRNA er designet for å være komplementær til starten av et ønsket gen. dCas9-sgRNA binder DNA i valgt gen og blokkerer RNA polymerasen og transkripsjonselongeringen. Dette vil dermed forårsake genrepresjon - nedregulering av genuttrykket (Hawkins et al., 2015, Larson et al., 2013, Qi et al., 2013). Baseparing mellom sgRNA-segmentet og DNA-målsekvensen gjør at genet som skal nedreguleres enkelt velges ved å tilpasse sgRNA-sekvensen slik at det binder til starten av genet (Hawkins et al., 2015). Det er også mulig å nedregulere flere gener samtidig dersom man uttrykker flere tilpassede guide-RNAer.

1.4.2 CRISPRi-systemet i *S. aureus*

For at CRISPRi-systemet skal fungere i *S. aureus* kreves altså ekspresjon av dCas9 og sgRNA. For CRISPRi-systemet som ble utviklet for *S. aureus* blir genene som koder for dCas9 og

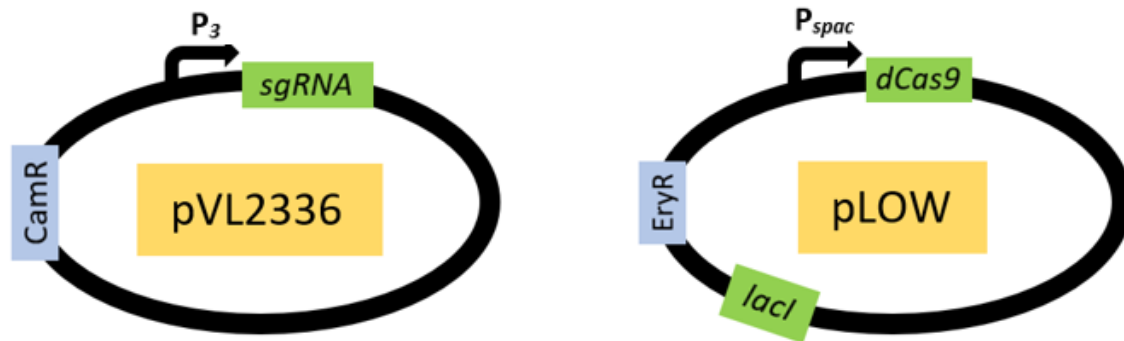
Introduksjon

sgRNA uttrykt på hvert sitt plasmid og har hver sin promotor. sgRNA uttrykkes på plasmidet pVL2336 fra *Escherichia coli* VL2336, og uttrykkes fra den konstitutive promotoren P_3 . Her benyttes i tillegg seleksjon for kloramfenikolresistens (cam^R), for å holde plasmidet inne i cellen. Videre uttrykkes dCas9 på plasmidet pLOW (low-copy-number plasmid), hvor nivået av dCas9 reguleres fra den IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid)-induserbare promotoren P_{spac} (Liew et al., 2011, Do et al., 2019). På pLOW-plasmidet uttrykkes laktoserepressorproteinet LacI, et protein som binder til P_{spac} og dermed i utgangspunktet hindrer all transkripsjon fra promotoren. Ved tilsetning av IPTG hindres derimot LacI i å binde til promotoren, hvilket skyldes at IPTG binder til LacI og endrer proteinets konformasjon. Dette medfører at LacI ikke lenger kan binde til P_{spac} , og transkripsjonen fra promotoren vil derfor starte (Liew et al., 2011). pLOW-plasmidet har i tillegg en seleksjonsmarkør som koder for erytromycinresistens (ery^R). Tilsetning av induseren IPTG i *S. aureus* CRISPRi-stammene leder altså til ekspresjon av dCas9, som sammen med sgRNA danner komplekset dCas9-sgRNA (Stamsas et al., 2018, Bionline, 2019). Dette komplekset hindrer transkripsjon gjennom DNA-målekvensen, hvilket fører til nedregulering av ønsket gen (Stamsas et al., 2018). Figur 1.6 viser hvordan dCas9-sgRNA-systemet blokkerer transkripsjon av DNA-målekvensen. Figur 1.7 gir en oversikt over plasmidene benyttet til uttrykk av sgRNA og dCas9.



Figur 1.6 CRISPRi-systemet fungerer ved at dCas9-proteinet danner et kompleks med sgRNA, deretter vil dCas9-sgRNA-komplekset binde til, - og sterisk hindre transkripsjon av DNA-målekvensen. Modifisert figur fra Tan et al. (Tan et al., 2018).

Introduksjon



Figur 1.7 Plasmidene benyttet for ekspressjon av sgRNA og dCas9. sgRNA uttrykkes konstitutivt på plasmidet pVL2336 av promotoren P_3 . dCas9 uttrykkes på plasmidet pLOW, og reguleres av den induserbare promotoren P_{spac} . I tillegg uttrykkes laktoserepressorproteinet LacI på plasmidet pLOW, og dette proteinet hindrer transkripsjon fra P_{spac} -promotoren. Ved tilsetning av IPTG endres konformasjonen av LacI, hvilket medfører at proteinet ikke lenger kan binde til P_{spac} , og transkripsjonen fra denne promotoren vil starte.

1.4.3 Genome-wide CRISPRi-bibliotek i *S. aureus*

Å forstå hvilke gener i *S. aureus* som ligger til grunn for antibiotikaresistens eller virulens er viktig for å bekjempe infeksjoner. Genomet hos *S. aureus*-stammer består av rundt 3000 gener fordelt på nesten 2000 transkripsjonsenheter/operon. For å kunne identifisere gener som er involvert i interessante egenskaper er det derfor tidligere utviklet transposon-bibliotek for *S. aureus* som dekker hele genomet (Santiago et al., 2015). Det vil si en samling av stammer hvor til sammen alle genene i genomet er inaktivert. Dette er et nyttig verktøy, som kan brukes for seleksjon og identifisering av gener. Slike transposon-bibliotek begrenser seg imidlertid til ikke essensielle-gener, ettersom transposon-inaktivering av essensielle gener ikke er mulig. Det er derfor utviklet CRISPRi-biblioteker for *S. aureus* basert på CRISPRi-systemet beskrevet ovenfor (M. Kjos, personlig kommunikasjon, upubliserte resultater). Biblioteket benyttet i denne oppgaven er laget i *S. aureus*-stammen NCTC8325-4, og består av en sammenslått samling av 1928 stammer med unike sgRNAer. Til sammen kan CRISPRi-biblioteket nedregulere genekspressjonen hos alle genene i denne stammen.

1.5 Oppgavens mål

Antibiotikaresistens er et globalt helseproblem (O'Neill, 2014). Spesielt knyttes det utfordringer til MRSA grunnet bakteriens resistens mot flere antibiotika, hvilket gjør det interessant å øke kunnskapsnivået rundt gener involvert i antibiotikaresistens- og toleranse hos *S. aureus*. For dette trengs det nye forskningsverktøy som kan brukes til dette formålet.

Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke om CRISPRi-systemet og CRISPRi-depleksjonsbiblioteket beskrevet ovenfor kan benyttes til å identifisere gener som er involvert i toleranse mot antibiotika og finne ut om disse verktøyene egner seg i mode-of-action studier for nye antibiotika. De to antibiotikaene som ble valgt ut var den mye studerte

Introduksjon

transkripsjonshemmeren rifampicin og lipoglykopeptidet dalbavancin. For begge disse forventes det å kunne identifisere kjente gener involvert i toleranse fra andres studier, men det er også håp om å finne nye gener som kan gi ny innsikt i virkningsmekanismen. Ulike metoder for å arbeide med CRISPRi-biblioteket var inspirert av tidligere studier med bruk av transposon-biblioteker i ulike bakterier.

- Bestemmelse av hvordan subletale konsentrasjoner av antibiotika påvirker gen-fitness i CRISPRi-biblioteket ved Illuminasekvensering.
- Direkte seleksjon av resistente bibliotekmutanter på agarskål med ulike konsentrasjoner av antibiotika.
- Seleksjon av resistente CRISPRi-bibliotekstammer med mikrotiterassay.

Det andre målet med oppgaven var å få økt innsikt i interaksjonen mellom *S. aureus* og dalbavancin ved bruk av mikroskopstudier og identifisere stafylokokkgener involvert i toleranse for dalbavancin. Vi ønsket også å finne ut om ulike to-komponentsystemer var involvert i sensitivitet for dalbavancin på samme måte som for andre glykopeptidantibiotika.

2 Materialer

Liste over primere som ble benyttet i dette arbeidet finnes i vedlegg A. I vedlegg B finnes tabell med relevante *S. aureus*-stammer konstruert i dette arbeidet.

2.1 Bakteriestammer og plasmid

Tabell 2.1 *E. coli* og *S. aureus*-stammer og plasmider benyttet i dette arbeidet, samt en kort beskrivelse av genotype og karakteristikk.

| Stamme | Genotype og karakteristikk | Referanse |
|-------------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> | | |
| VL2336 | Villtype, Amp ^R | Xue Liu (University of Lausanne), ikke publisert |
| IM08B | Villtype, Amp ^R | (Monk et al., 2016) |
| <i>S. aureus</i> | | |
| MK1465 | NCTC8325-4, pLOW-dCas9, Ery ^R | Stammesamling MolMik, ikke publisert |
| MH225 | NCTC8325-4, pLOW-dCas9_ekstra_lacO, Ery ^R | Stammesamling MolMik, ikke publisert |
| MK14652 G | NCTC8325-4, pLOW-dCas9 + pVL2336-sgRNA-deplesjonsbibliotek, Ery ^R , Cam ^R | Stammesamling MolMik, ikke publisert |
| MH225L-G | NCTC8325-4, pLOW-dCas9_ekstra_lacO + pVL2336-sgRNA-deplesjonsbibliotek, Ery ^R , Cam ^R .. | Stammesamling MolMik, ikke publisert |
| MH266 | Newman, pLOW-dCas9_ekstra_lacO, Ery ^R | Stammesamling MolMik, ikke publisert |
| IM287 | COL MRSA, pLOW-dCas9, Spc ^R | Stammesamling MolMik, ikke publisert |
| SH1000 | Villtype | (Horsburgh et al., 2002) |
| NCTC8325-4 | Villtype | (Horsburgh et al., 2002) |
| Plasmid | | |
| pCN55 | Vektor, Spc ^R | Thermofisher Scientific |
| pMAD | Kloningsvert, Ery ^R (<i>E. coli</i>) eller Spc ^R (<i>S. aureus</i>) | Thermofisher Scientific |

Amp^R = ampicillinresistent, Ery^R = erytromycinresistent, Cam^R = kloramfenikolresistent, Spc^R = spektinomycinresistent

2.2 Antibiotika

Tabell 2.2 Liste over antibiotika som ble benyttet i dette arbeidet, samt tilhørende startkonsentrasjoner.

| Antibiotikum | Startløsning | Produktnummer | Leverandør |
|---------------|--------------|---------------|---------------|
| Ampicillin | 100 mg/ml | A-9518 | Sigma-Aldrich |
| Kloramfenikol | 10 mg/ml | C0378 | Sigma-Aldrich |
| Dalbavancin | 1 mg/ml | SML2378 | Sigma-Aldrich |
| Erytromycin | 5 mg/ml | E6376 | Sigma-Aldrich |
| Rifampicin | 50 mg/ml | R-3501 | Sigma-Aldrich |
| Spektinomycin | 100 mg/ml | S6501 | Sigma-Aldrich |
| Vancomycin | 10 mg/ml | V2002 | Sigma-Aldrich |

Materialer

2.3 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører

Tabell 2.3 Liste over enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører benyttet i dette arbeidet.

| Navn | Startløsning | Produktnummer | Leverandør |
|--|--------------|---------------------|---------------------|
| 1 kb DNA ladder | 500 µg/ml | N3232s | New England BioLabs |
| dATP, dGTP, dCTP, dTTP | 100 mM | 4026/4027/2028/4029 | TaKaRa |
| Phusion® High-Fidelity DNA polymerase | 2 U/µl | M0530 | New England BioLabs |
| Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase | 1 U/µl | P505 | Vazyme biotech |
| REDTaq® Readymix™ | | R2523 | Sigma-Aldrich |
| Lysozym | 40 mg/ml | L2979 | Sigma-Aldrich |
| Lysostaphin | 10 mg/ml | L9043 | Sigma-Aldrich |
| T4 DNA ligase | 400 000 U/ml | M0202L | New England BioLabs |
| BsmBI | | R0580 | New England BioLabs |
| NEB® Golden Gate Assembly Mix (BsaI-HF®v2) | | E1601L | New England BioLabs |

2.4 Kit

Tabell 2.4 Liste over ulike kits som ble benyttet i dette arbeidet.

| Navn | Hensikt | Produktnummer | Leverandør |
|--|--|----------------|----------------|
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up | DNA-ekstraksjon fra agarosegel | 740609.250 | Machnery-Nagel |
| E.Z.N.A.® Plasmid DNA Kit | Ekstraksjon og rensing av plasmid-DNA fra <i>E. coli</i> | D6943-02 | OMEGA Bio-tek |
| QIAGEN® Plasmid Mini, Midi and Maxi kits | Rensing av plasmid-DNA fra celler | 12143 og 12145 | QIAGEN |
| NEB® Golden Gate Assemblerings-kit | Restriksjonskutting og assemblering av inserter | E1601 | BioLabs |

2.5 Instrumenter og utstyr

Tabell 2.5 Liste over instrumenter og utstyr som ble benyttet i dette arbeidet. ^a

| Utstyr/instrument | Modell | Leverandør |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Celleknuser | FastPrep®-24 | MP™ Biomedicals |
| Elektroforesekar | Mini-Sub Cell® GT | BioRad |
| Elektroporeringsapparat | Gene Pulser | BioRad |
| Gel-imager | GelDoc-1000 | BioRad |
| Microfluidic Bacteria Plate | M04S | Merck |
| Mikroskop | LSM700 | Zeiss |
| Mikrotiterplateleser | Synergy H1 Hybrid Reader | BioTek® |
| Mikrotiterplateleser | Hidex Sense | Hidex |
| PCR-maskin | ProFlex PCR systems | Applied Biosystems |
| Spektrofotometer | NanoDrop 2000 | Thermo-Fisher Scientific |

^a Også annet, mer generelt laboratorieutstyr ble benyttet i arbeidet, men er ikke listet her.

Materialer

2.6 Kjemikalier

Tabell 2.6 Alfabetisk liste over de kjemikaliene som ble benyttet i dette arbeidet, samt kjemisk formel, produktnummer og leverandør.

| Kjemikalie | Kjemisk formel | Produktnummer | Leverandør |
|---|--------------------------------------|---------------|---------------------|
| Agarose | | 15510-027 | Invitrogen |
| Bacto™ Agar | | BIAC41 | Saveen Werner |
| Bacto™ Brain Heart Infusion | | 237200 | BD Diagnostics |
| Bacto™ <u>Tryptic Soy Broth</u> | | BD211825 | BD Diagnostics |
| Bacto™ Tryptone | | LP0042 | Oxoid |
| Bromfenolblått | $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$ | B-5525 | Sigma-Aldrich |
| Cetrimoniumbromid (cTAB) | $C_{19}H_{42}BrN$ | H6269 | Sigma-Aldrich |
| DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) | $C_{16}H_{15}N_5$ | D9542 | Sigma-Aldrich |
| Dinatriumhydrogenfosfat | Na_2HPO_4 | 1.06580.1000 | Merck |
| Eddiksyre | CH_3COOH | 1.00063.2500 | Merck |
| EDTA | $C_{10}H_{16}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ | 20 296.360 | VWR |
| Etanol 70% | C_2H_5OH | 20824.365 | VWR |
| Gjærekstrakt | | 1.04086.0250 | Merck |
| Glass-kuler | | G4649 | Sigma-Aldrich |
| Glukose | $C_6H_{12}O_6$ | 10117gK | VWR |
| Glyserol 85% | $C_3H_8O_3$ | 1.04094.1000 | Merck |
| IPTG, Isopropyl- β -D-thiogalactosidase | $C_9H_{18}O_5S$ | A1008.0005 | Applichem |
| Kaliumdihydrogenfosfat | KH_2PO_4 | 26925.295 | VWR |
| Kaliumklorid | KCl | 1.04936.1000 | Merck |
| Kalsiumklorid | $CaCl_2$ | 1.02391.1000 | Merck |
| Loadingbuffer lilla (6x) | | B7025S | New England BioLabs |
| Magnesiumklorid | $MgCl_2$ | M3634 | Sigma |
| Metanol | CH_2OH | 603-001-00-x | Merck |
| Natriumklorid | NaCl | 1.06404.1000 | Merck |
| Nile red | $C_{20}H_{18}N_2O_2$ | 72485 | Sigma-Aldrich |
| peqGREEN | | PEQL37-501 | Saveen Werner |
| SDS (Sodium dodecyl sulfat) | $NaC_{12}H_{25}SO_4$ | 05030 | Fluka |
| Sukrose | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 102745C | BHD |
| Tris | $C_4H_{11}NO_3$ | T1503 | Sigma-Aldrich |
| Tris-HCl | $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ | T3253 | Sigma-Aldrich |
| TWEEN 80 (Polysorbat 80) | $C_{64}H_{124}O_{26}$ | P1754 | Sigma-Aldrich |
| X-GAL | $C_{14}H_{15}BrClNO_6$ | B4252 | Sigma-Aldrich |

2.7 Vekstmedier og buffere

2.7.1 Brain Heart Infusion (BHI) medium

BHI-medium ble tillaget ved å løse opp 37 g BHI-pulver i 1L dH₂O, og deretter sterilisert ved autoklaving.

Materialer

2.7.2 Brain Heart Infusion (BHI) agar

BHI-agar ble tillaget ved å løse opp 37 g BHI-pulver og 15 g (1.5 %) Bacto™ Agar i 1L dH₂O, og deretter sterilisert ved autoklaving.

2.7.3 Lysogeny broth (LB) medium

LB-medium ble tillaget ved å løse opp 10 g NaCl, 10 g trypton (oxid) og 5 g gjærekstrakt i 1L dH₂O, og deretter sterilisert ved autoklaving.

2.7.4 Lysogeny broth (LB) agar

LB-agar ble tillaget ved å løse opp 10 g NaCl, 10 g trypton (oxid), 5 g gjærekstrakt og 15 g (1.5 %) Bacto™ Agar i 1L dH₂O, og deretter sterilisert ved autoklaving.

2.7.5 Tryptic Soy Broth (TSB) medium

TSB-medium ble tillaget ved å løse opp 30 g TSB-pulver i 1L dH₂O, og deretter sterilfiltrert ved autoklaving.

2.7.6 Tryptic Soy Broth (TSB) agar

TSB-agar ble tillaget ved å løse opp 30 g TSB-pulver og 15 g (1.5 %) Bacto™ Agar i 1L dH₂O, og deretter sterilfiltrert ved autoklaving.

2.7.7 Tryptic Soy Broth (TSB) medium med 0.5 M sukrose

TSB-medium ble tillaget ved å løse opp 30 g TSB-pulver i 1L dH₂O. Blandet deretter 50 % 2x TSB og 50 % 2x sukrose (1 M sukrose) for å få en sluttkonsentrasjon på 0.5 M sukrose.

2.7.8 Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium

SOC-medium ble tillaget ved å løse opp 2 g Bacto Tryptone 0.5 g gjærekstrakt, 333.3 µl 3M NaCl og 83.3 µl 3M KCl i 96 ml dH₂O og deretter sterilisert ved autoklaving. Etter autoklaving ble 2 ml 1M MgCl₂ og 1 ml 2M glukose sterilfiltrert med 0.2 filter og tilsatt den varme løsningen.

2.7.9 Buffere og løsninger for agarose gel elektroforese

50x Tris-Acetate-EDTA (TAE)

424 g Tris base, 57.1 ml eddiksyre, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0). Løsningen ble justert til 1L med dH₂O.

6x Loading buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 40 % Sukrose, 0.01 % Bromfenolblått

Materialer

1 kb DNA ladder (50 mg/ml)

50 µl 1 kb ladder (Invitrogen), 200 µl 10x loading buffer, 750 µl dH₂O

1 % Agarose gel

0.5 g Agarose, 50 ml TAE buffer, 1 µl peqGREEN. Løsningen ble kokt til agarosen var fullstendig oppløst, deretter ble 1 µl peqGREEN tilsatt.

2.7.10 Øvrige buffere og løsninger

10x TEN buffer

1 M TrisHCl (pH 8), 0.5 M EDTA (pH 8), 5 M NaCl

10 % glyserol

I autoklavert beholder: 40 ml av 50 % glyserol ble tilsatt 160 ml dH₂O og blandet godt.

10 % glyserol med 0.5 M sukrose

Her ble 10 ml av 50 % glyserol, 25 ml sukrose og 15 ml dH₂O blandet sammen i en autoklavert beholder. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap.

1x Fosfat-buffer saline (PBS)

8 g/L NaCl, 0.201 g/L KCl, 1.7799 g/L Na₂HPO₄, 0.272 g/L KH₂PO₄. Dette ble løst i 900 ml dH₂O, pH ble justert til 7.2 med HCl, og dH₂O ble tilsatt til et sluttvolum på 1L.

PBS med 1.2 % agarose

0.12 g agarose ble tilsatt til 10 ml 1x PBS med pH 7.4. Løsningen ble kokt i mikrobølgeovn.

Lysisbuffer (40 mM NaOH og 0.2 % SDS)

Lysisbuffer bestod av 667 µl 3M NaOH blandet med 1 ml av 10 % SDS og 48.33 ml dH₂O.

1M Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

0.238 g IPTG (238.3 g/mol) ble blandet med 1 ml dH₂O og lagret ved -20°C.

3 Metoder

3.1 Dyrking og lagring av bakterier

3.1.1 Dyrking av *E. coli*

E. coli ble dyrket aerobt ved 37°C i LB-medium eller på LB-agar. Ved dyrking i flytende medium ble kulturene inkubert i risteinkubator ved 200 rpm. For seleksjon ble 100 µg/ml ampicillin tilsatt.

3.1.2 Dyrking av *S. aureus*

S. aureus ble dyrket aerobt ved 37°C i BHI-medium eller på BHI-agar eller TSB-agar. Ved dyrking i flytende medium ble kulturene inkubert i risteinkubator ved 200 rpm. Ved tillaging av delesjonskonstrukt ble *S. aureus* dyrket ved 30°C og 43°C. For seleksjon ble 5 µg/ml erytromycin, 10 µg/ml kloramfenikol eller 100 µg/ml spektinomycin tilsatt. *S. aureus* CRISPRi-stammer (se avsnitt 2.1 og vedlegg B) ble alltid dyrket med 5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol.

3.1.3 Lagring av bakterier

Frysestokker ble laget ved å blande 1000 µl av overnattkultur (i eksponentiell fase) og 250 µl 85 % glyserol. Løsningen ble lagret ved -80°C.

3.2 DNA- og plasmidisolering

3.2.1 Isolering av plasmid fra *E. coli* ved bruk av E.Z.N.A Plasmid DNA Kit

Bakteriekultur (1-5 ml) ble dyrket over natt. Kulturen ble deretter overført til 1.5 ml eppendorfrør og sentrifugert (10 000 x g, 1 min) før supernatanten ble dekantert av. Prosedyren beskrevet av produsenten ble deretter fulgt. Pelleten ble resuspendert i Solution I med RNase A (250 µl). Etter resuspending ble cellene lysert ved tilsetning av Solution II (250 µl). Her ble eppendorfrøret vendt forsiktig noen ganger og inkubert i 2-3 min for å oppnå et klart lysat. Deretter ble nøytraliseringsbufferen Solution III (350 µl) tilsatt, og eppendorfrøret ble umiddelbart vendt flere ganger for utfelling av kromosomalt DNA og proteiner. Løsningen ble så sentrifugert på maks hastighet i 10 min for å samle disse avfallsstoffene til en pellet. Videre ble supernatanten som nå inneholdt plasmid DNA satt på en HiBind DNA mini kolonne som på forhånd var ekvilibrert med 3M NaOH (50 µl).

Kolonnen ble sentrifugert på maks hastighet (60 sek) og filtratet ble fjernet. Videre ble det tilsatt HBC Buffer med isopropanol (500 µl), og sentrifugert på maks hastighet (60 sek) for å binde

Metoder

plasmid til kolonnen. Deretter ble det tilsatt DNA vaskebuffer med etanol (700 µl) for å fjerne kontaminasjoner som salter, metabolitter og cellulære komponenter. Kolonnen ble sentrifugert på maks hastighet (30 sek) før filtratet ble fjernet. Den tomme kolonnen ble videre sentrifugert på maks hastighet (2 min) for å bli kvitt etanolrester og deretter overført til et nukleasefritt 1.5 ml eppendorfrør. Her ble elueringsbuffer tilsatt (30-100 µl), og prøven stod i 60 sek ved romtemperatur før sentrifugering på maks hastighet (60 sek). Eluert DNA ble lagret ved -20 °C.

3.2.2 Isolering av plasmid fra *S. aureus*

Bakteriekultur (4 ml) ble dyrket opp over natt, og deretter sentrifugert (maks hastighet, 2 min) før supernatanten ble dekantert av. Pelleten ble deretter løst i Solution I (500 µl) fra E.Z.N.A Plasmid DNA Kit, før lysozym (20 mg/ml) og lysostaphin (2 µl) ble tilsatt for å bryte ned celleveggen. Egentlig skal lysozym teoretisk ha dårlig effekt på celleveggen til *S. aureus*, men ble benyttet ettersom blanding av lysozym og lysostaphin i noen testforsøk ga bedre lysis enn kun lysostaphin (muntlig kommunikasjon, Morten Kjos). Løsningen ble så inkubert (37°C, 30 min). Videre ble E.Z.N.A Plasmid DNA kit benyttet som normalt (beskrevet i avsnitt 3.2.1), men her ble det tilsatt 500 µl av løsning II og 700 µl av løsning III.

3.2.3 QIAGEN MIDI-prep plasmidisolering

Plasmidisolering med QIAGEN MIDI-prep ble i all hovedsak utført som beskrevet av produsenten (QIAGEN, 2005). Cellene ble høstet ved sentrifugering av 100 ml kultur (4000 x g, 4°C, 10 min). Bakteriepelleten ble deretter resuspendert i Buffer P1 tilsatt RNase A (4 ml). Cellene ble lysert ved tilsetning av lysostaphin (0.2 mg/ml) og lysozym (2 mg/ml) og inkubert ved 37°C i 30 min. Buffer P2 (4 ml) ble tilsatt for alkalisk lysering av cellene, og her ble løsningen blandet ved å forsiktig vende røret 4-6 ganger. Prøven ble så inkubert ved romtemperatur (5 min), og det ble observert et viskøst lysat. Deretter ble Buffer P3 (4 ml) tilsatt, og her ble løsningen godt blandet ved å vende røret 4-6 ganger. Det ble nå observert et hvitt utfall bestående av genomisk DNA, proteiner og cellerester, og lysatet var nå mindre viskøst. Prøven ble så satt på is i 15 min for å effektivisere bunnfellingen. Videre ble prøven sentrifugert (13000 x g, 16°C, 30 min).

Supernatanten som nå inneholdt plasmid DNA, ble overført til en ekvilibrert QIAGEN-tip 100 kolonne. Kolonnen ble stående til all væske hadde rent gjennom, og ble deretter vasket med buffer QC (10 ml) i to omganger. Dette trinnet var nødvendig for å fjerne kontaminasjoner som salter, metabolitter og cellulære komponenter. Deretter ble plasmid-DNA eluert med Buffer QF (5 ml) i et rent 15 ml-rør. For utfelling av DNA ble romtemperert isopropanol (3,5 ml) tilsatt

Metoder

det eluerte DNAet og blandet godt. Dette ble så sentrifugert (13000 x g, 16°C, 30 min), og supernatanten ble forsiktig dekantert av. DNA-pelleten ble videre vasket med romtemperert 70 % etanol (3 ml), sentrifugert (13000 x g, 16°C, 10 min), og supernatanten ble forsiktig dekantert av. Pelleten ble deretter sentrifugert ytterligere en gang (13000 x g, 16°C, 1 min) for å fjerne all etanol. Til slutt ble pelleten lufttørket i 10 min før det rensede plasmid DNA ble løst opp i dH₂O (150 µl).

3.2.4 DNA-isolering ved bruk av Fast-Prep og MINIPREP-kolonner

Cellekultur (1-5 ml) ble overført til eppendorfrør og sentrifugert på maks hastighet (13 000 x g) i 1 min ved romtemperatur. Supernatanten ble deretter dekantert av, før pelleten ble løst opp i Buffer I (350 µl) og overført til et fast-preprør med <106 nm glasskuler (0.5 g). Prøven ble spunnet ned (4 m/s, 3x 20 sek), og supernatanten ble overført til et eppendorfrør. Her ble mengden justert med Buffer I til et totalvolum på 250 µl før resterende protokoll ved bruk av Miniprep (E.Z.N.A Plasmid DNA Kit) fortsatte som normalt. Sluttresultatet var fragmentert genomisk DNA (smear) på gel.

3.3 NanoDrop

DNA-konsentrasjon og renhet ble målt ved spektroskopi ved bruk av NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher Scientific). Her blir absorbansen ved 260 nm brukt til å estimere DNA-konsentrasjon. Buffer NE eller annen elueringsbuffer (OMEGA) ble benyttet som blank løsning. Renheten til DNAet ble bestemt ved å måle absorbansratioen ved 260 og 280 nm. En 260/280-ratio ~1.8 ble regnet som "rent" DNA. En ratio <<1.8 kunne indikere forurensning med proteiner, fenoler eller andre forbindelser som absorberer nært 280 nm. En 260/280-ratio >>1.8 indikerte RNA-kontaminasjon (Scientific, 2009).

3.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en amplifiseringsteknikk hvor man kan generere et høyt antall kopier av et spesifikt DNA-segment ut ifra en liten startmengde (Lorenz, 2012). For å utføre en PCR-reaksjon må følgende komponenter være til stede; templat-DNA, DNA polymerase, primere og nukleotider (Garibyan and Avashia, 2013). Templat-DNA inneholder målsekvensen som skal amplifiseres, DNA polymerase er enzymet som binder sammen nukleotidene i PCR-produktet, primere fungerer som forlengelsespunkt i hver ende av DNA-målsekvensen og nukleotidene er byggesteinene i PCR-produktet. Disse består av deoxynukleotid trifosfatene (dNTPene) dATP, dTTP, dGTP og dCTP (Lorenz, 2012, Garibyan and Avashia, 2013).

Metoder

PCR-syklusen deles generelt inn i 3 trinn: denaturering, hybridisering (annealing) og elongering. Lengden av- og temperaturen i hver syklus beregnes ut ifra størrelsen på templatet og GC-innholdet i DNAet (Lorenz, 2012). I første trinn (denaturering) er hensikten å separere de to komplementære DNA-trådene, og temperaturen økes derfor til 94-98°C, som er over smeltepunktet (T_M) for dobbeltrådet DNA (dsDNA) (Garibyan and Avashia, 2013, Lorenz, 2012). Deretter følger hybridiseringen, hvor temperaturen senkes til 5°C under primernes smeltepunkt (T_M), dette for at primerne skal kunne binde til komplementært område på DNAet. Hybridiseringstemperaturen er typisk mellom 40-65°C, og i denne oppgaven ble primerne designet for å ha en hybridiseringstemperatur på 60°C. I tredje og siste steg (elongering) økes temperaturen til DNA polymerasens optimale temperatur for å forlenge primerne, og er typisk mellom 70-80°C (Lorenz, 2012). I dette steget binder DNA polymerasen de frie dNTPene i reaksjonsblandingen til den voksende 3'OH-enden av primerne. Antall DNA-molekyler doubles for hver runde av PCR-syklusen (Garibyan and Avashia, 2013).

I dette arbeidet ble det benyttet tre ulike PCR-metoder: Phanta® Max Super-Fidelity, Phusion® High-Fidelity og RedTaq®. Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase har en høy amplifikasjonseffektivitet (30-60 sek per kb.), og i tillegg høy fidelitet. DNA polymerasen kunne derfor brukes i de fleste PCR-reaksjoner, og ble brukt når PCR-sluttproduktet skulle sekvenseres eller benyttes videre i kloningseksperimenter (VazymeBiotech, 2015). Phusion® High-Fidelity DNA polymerase egnet seg også godt i kloningsforsøk, og ble benyttet i noen tilfeller. Dersom nøyaktigheten av PCR-sluttproduktet ikke var like viktig, som ved PCR-screening, ble det benyttet RedTaq® DNA polymerase.

3.4.1 PCR-protokoll for Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase

Følgende protokoll ble benyttet for PCR med Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase: en reaksjonsblanding bestående av polymerase, dNTPer, primere, Phanta® Max Super-Fidelity buffer og DNA templat ble mikset på is. Reaksjonsvolumer og konsentrasjoner er listet i Tabell 3.1.

Tabell 3.1 Reaksjonsmiks per PCR-reaksjon med Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase.

| Reagens | Sluttvolum/konsentrasjon |
|---|----------------------------|
| 0.5 µl 1 U/µl Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerase | 0.01 U/µl |
| 1 µl 10 mM dNTP | 0.2 mM |
| 2 µl 10 µM forward primer | 0.4 µM |
| 2 µl 10 µM reverse primer | 0.4 µM |
| 25 µl Phanta® Max Super-Fidelity buffer | |
| x µl DNA templat | ~100 ng/µl |
| x µl dH ₂ O | til et sluttvolum på 50 µl |
| Totalvolum: 50 µl | |

Metoder

PCR-programmet ble justert etter DNA-templatets lengde og kvalitet, samt effektiviteten av DNA polymerasen og primernes smeltepunkt. Programmet benyttet for Phanta® PCR vises i Tabell 3.2.

Tabell 3.2 PCR-program ved bruk av Phanta® Max Super-Fidelity PCR. Annealingstemperaturen ble bestemt av primernes smeltepunkt, og elongeringstiden ble bestemt av lengden på DNA-fragmentet, hvorav Phanta® Max Super-Fidelity DNA polymerasen hadde en replikasjonshastighet på 1 min per 1000 bp.

| Steg | Temperatur | Tid | Repetisjoner |
|-----------------------|------------|----------|--------------|
| Initiell denaturering | 95°C | 10 min | 1x |
| Denaturering | 95°C | 15 sek | |
| Annealing | 57°C | 20 sek | 30x |
| Elongering | 72°C | x sek/bp | |
| Utfylling av ender | 72°C | 5 min | 1x |
| Lagring | 4°C | ∞ | |

3.4.2 PCR-protokoll for Phusion® High-Fidelity DNA polymerase

Reaksjonsvolumer og konsentrasjoner for PCR med Phusion® High-Fidelity DNA polymerase er vist i Tabell 3.3.

Tabell 3.3 Reaksjonsmiks per PCR-reaksjon med Phusion® High-Fidelity DNA polymerase.

| Reagens | Sluttkonsentrasjon/volum |
|---|----------------------------|
| 0.5 µl 2 U/µl Phusion® High-Fidelity DNA polymerase | 0.02 U/µl |
| 1 µl 10 mM dNTP | 0.2 mM |
| 2.5 µl 10 µM forward primer | 0.5 µM |
| 2.5 µl 10 µM reverse primer | 0.5 µM |
| 10 µl 5x Phusion® High-Fidelity buffer | 1x |
| 1 µl DNA templat | ~20-100 ng |
| 32.5 µl dH ₂ O | til et totalvolum på 50 µl |
| Totalvolum: 50 µl | |

PCR-programmet ble justert etter DNA-templatets lengde og kvalitet, samt effektiviteten av DNA polymerasen og primernes smeltepunkt. Programmet benyttet for Phusion® PCR vises i Tabell 3.4.

Tabell 3.4 PCR-program ved bruk av Phusion® High-Fidelity. Annealingstemperaturen ble bestemt av primernes smeltepunkt, og elongeringstiden ble bestemt av lengden på DNA-fragmentet, hvorav Phusion® High-Fidelity DNA polymerasen hadde en replikasjonshastighet på 30 sek per 1000 bp.

| Steg | Temperatur | Tid | Repetisjoner |
|-----------------------|------------|----------|--------------|
| Initiell denaturering | 94°C | 10 min | 1x |
| Denaturering | 94°C | 30 sek | |
| Annealing | 58°C | 30 sek | 30x |
| Elongering | 72°C | x sek/bp | |
| Utfylling av ender | 72°C | 3 min | 1x |
| Lagring | 4°C | ∞ | |

3.4.3 PCR-screening ved bruk av RedTaq® DNA polymerase

RedTaq® DNA polymerase ble benyttet i PCR-reaksjoner for verifisering av potensielle transformanter. Her ble det benyttet primere som hybridiserte til spesifikke DNA-sekvenser som kun var til stede i transformantene. Derfor kunne man forvente at et positivt PCR-resultat var i samsvar med en vellykket transformasjon.

3.4.3.1 Bruk av RedTaq® DNA polymerase for screening av *S. aureus*-transformanter

S. aureus-transformanter ble plukket og dyrket opp over natt i medium med korrekt seleksjonsmarkør. For å verifisere at transformantene var korrekte, ble overnattkultur (2-3 µl) overført til PCR-rør for screening. Hver prøve ble deretter tilsatt 20 µl 40 mM NaOH 0.2 % SDS med 2-3 µl cTAB per 100 µl NaOH 0.2 % SDS. Prøvene ble kokt (98°C, 5 min), og videre satt på is for å lysere cellene. dH₂O (100 µl) ble tilsatt hvert rør. Det ble tillaget en PCR-miks inneholdende 5 µl Red Taq 2x Master Mix (m/ 1.5 mM MgCl₂), 10 µM forward primer (0.2 µl), 10 µM revers primer (0.2 µl) og dH₂O (4.6 µl) til et totalvolum på 10 µl. RedTaq 2x Master Mix inneholdt buffer, polymerase, nukleotider og loading dye. Til PCR-miksen (10 µl) ble det deretter tilsatt cellelysat (1.5 µl). PCR-programmet benyttet for RedTaq® er vist i Tabell 3.5.

Tabell 3.5 RedTaq® PCR-program for verifisering av transformanter ved bruk av RedTaq® DNA polymerase. Totalvolumet var 10 µl, og RedTaq® DNA polymerase hadde en replikasjonshastighet på 1 min per 1000 bp.

| Steg | Temperatur | Tid | Repetisjoner |
|-----------------------|------------|----------|--------------|
| Initiell denaturering | 95°C | 10 min | 1x |
| Denaturering | 95°C | 30 sek | |
| Annealing | 55°C | 30 sek | 30x |
| Elongering | 72°C | x sek/bp | |
| Utfylling av ender | 72°C | 10 min | 1x |
| Lagring | 16°C | ∞ | |

3.4.3.2 Bruk av RedTaq® DNA polymerase for screening av *E. coli*-transformanter

For å verifisere at *E. coli*-transformantene var korrekte, ble de PCR-screenet ved bruk av RedTaq® DNA polymerase. Her ble *E. coli*-koloniene resuspendert i dH₂O (10 µl) i et PCR-rør. Løsningen ble så kokt i mikrobølgeovn på maks styrke i ca. 2 min for å lysere cellene. Her ble det også plassert en beholder med vann for å unngå at PCR-røret åpnet seg under varmebehandlingen. Røret ble så kjølt ned på is (5 min) før tilsetting av 5 µl Red Taq 2x Master Mix (m/ 1.5 mM MgCl₂), 10 µM forward primer (0.2 µl) og 10 µM revers primer (0.2 µl). RedTaq 2x Master Mix inneholdt buffer, polymerase, nukleotider og loadingbuffer. Løsningen ble ikke tilsatt ekstra dH₂O ettersom kolonien allerede var resuspendert i vann. RedTaq® PCR-program (Tabell 3.5) ble benyttet.

3.5 Sekvensering

I dette arbeidet ble Sangersekvensering benyttet for sekvensering av plasmid hos enkeltstammer av *E. coli* og *S. aureus*. Her ble DNA-prøvene sendt til Eurofins Genomics for sekvensering. Illuminasekvensering ble benyttet for sekvensering av alle plasmidene i sgRNA-deplisjonsbiblioteket (se avsnitt 3.12.3), og her ble DNA-prøvene sendt til Universitetet i Lausanne for sekvensering.

3.5.1 Sangersekvensering

Sangersekvensering er en teknikk benyttet for bestemmelse av baserekkefølgen hos DNA, og metoden ble utarbeidet av Dr. Frederick Sanger og hans kolleger i 1977 (Schoales, 2015). Til en sekvenseringsreaksjon tilsettes primer, polymerase, enkelttrådet DNA, deoksyribonukleotrifosfat (dNTP) og di-deoksyribonukleotrifosfat (ddNTP). Teknikken baserer seg på *in vitro* DNA-replikasjon med selektiv inkorporering av terminerende ddNTP-nukleotider ved hjelp av DNA polymerase (Jamuar, 2016). Polymerasen forlenger primeren så lenge de fire ulike dNTPene er til stede i prøven, og komplementært nukleotid tilsettes da den enkelttrådede DNA-templattråden. For å finne den nøyaktige sammensetningen av DNA-sekvensen inkorporeres ddNTP-nukleotider. Disse nukleotidene mangler en hydroksylgruppe (-OH), og ettersom de derfor ikke kan danne fosfodiester-binding til andre nukleotider, blokkeres inkorporeringen av nye dNTP-nukleotider til DNA-sekvensen. De fire ulike ddNTP-nukleotidene er merket med spesifikke fluorescerende farger, og muliggjør med dette identifisering av den terminerende ddNTP-3'-enden av hvert konstrukt, og dermed også sekvensen av DNA-templatet (Schoales, 2015).

For tillaging av DNA-prøver til sekvensering, ble det blandet sammen primer (2 µl, 10 µM), eluat (100-150 ng DNA) og resterende mengde dH₂O til et totalvolum på 10 µl.

3.5.2 Illuminasekvensering

Illuminasekvensering er en neste-generasjons sekvenseringsteknologi (NGS) som ble utarbeidet av Shankar Balasubramanian og David Klenerman (Das and Dash, 2019). Denne teknikken egner seg godt til massiv parallell sekvensering store mengder prøver, og over 90 % av all sekvenseringsdata i verden er anskaffet ved bruk av denne sekvenseringsmetoden (Illumina.com, 2020). Fremgangsmåten baserer seg på inkorporering og identifisering av reversible fargestoffterminatorer, og sekvenseringsprosedyren starter med å binde DNA-molekyler til primere, for så å amplifisere disse opp til lokale klynger (Zhou and Li, 2015). I neste steg tilsettes de fire reversible terminerende nukleotidene (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),

Metoder

hvorav hvert nukleotid er merket med en spesifikk fluorescerende farge (Zhou and Li, 2015). Nukleotidene er i tillegg kjemisk blokkert på 3'-hydroksyl-enden, hvilket hindrer flere enn én enkelt nukleotid i å inkorporeres per syklus. For hver inkorporering vil dNTPene konkurrere om å binde til templat-DNAet som skal sekvenseres, samtidig som ikke-inkorporerte molekyler skylles bort (Zhou and Li, 2015). Den fluorescerende fargen som er spesifikk for den inkorporerte basen vil være detekterbar, og muliggjøre identifisering av sekvensen. En laser vil så fjerne blokkeringen og proben med fluorescerende farge hos nukleotidet. Sekvenseringssyklusen blir gjentatt til hele DNA-molekylet er sekvensert (Zhou and Li, 2015).

I dette arbeidet ble Illuminasekvensering benyttet til å sekvensere CRISPRi-biblioteket med og uten behandling med dalbavancin (se avsnitt 3.12.3). Etter plasmidisolering (se avsnitt 3.2.3) ble prøvepreparering og Illuminasekvenseringen utført ved Universitetet i Lausanne. Analyse av data fra sekvensering ble utført av Xue Liu (Universitetet i Lausanne) og Morten Kjos (NMBU).

3.6 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en metode benyttet til å separere og identifisere proteiner eller fragmenter av DNA eller RNA. Prinsippet bygger på separasjon av makromolekyler basert på størrelse og ladning, hvorav negativt ladde molekyler vandrer i ulik hastighet mot gelens positive pol under elektrisk spenning. Molekylenes vandringshastighet avhenger både av størrelse, spenning over gelen, porestørrelse og konsentrasjon av gelmateriale (UiO, 2011). I dette arbeidet ble det benyttet agarose gelelektroforese for separering av DNA-fragmenter.

3.6.1 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese benyttes for å skille DNA-fragmenter av ulik størrelse, og kan separere fragmenter fra 100 bp opp til iallfall 25 kb (Lee et al., 2012). Oppsettet består av en agarosegel (0.5 - 2.0 % agarose) plassert i et elektroforese-kar. Karet kobles til en spenningskilde, og gelen dekkes med en buffer med god ledningsevne. Agarosegelen består av et nettverk av agarosepolymerer stabilisert av hydrogenbånd, og inneholder små porer som DNA-molekylene kan bevege seg gjennom. Jo høyere agarosekonsentrasjon, jo mindre porestørrelse (Lee et al., 2012, Heggenhougen, 2019).

For separasjon ved bruk av agarose gelelektroforese ble DNAet applisert til pre-støpte brønner i toppen av gelen og spenningen ble slått på. Etersom DNA-molekylet inneholdt negativt ladde fosfat-grupper ved nøytral pH ville den elektriske spenningen føre til at DNAet vandret mot den positivt ladde anoden. DNA-molekylenes vandring gjennom gelen var omvendt

Metoder

proporsjonal med fragmentenes molekylære vekt ettersom DNA har en uniform masse/ladning-ratio. Mindre fragmenter ville med dette bevege seg raskere gjennom gelen enn store fragmenter, og muliggjorde derfor separering av DNA basert på størrelse (Lee et al., 2012). For å visualisere DNA ble det tilsatt et fluoriserende fargestoff til gelen som bandt til- og synliggjorde DNA under UV-lys.

I dette arbeidet ble det benyttet agarose gelelektroforese for analyse av PCR-fragmenter, plasmider og genomisk DNA. Følgende protokoll ble benyttet: 1 % agarosegel ble laget ved å blande agarose (0.5 g) med 50 ml TAE-buffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA). Blandingen ble kokt i mikrobølgeovn til agarosen var fullstendig oppløst, og deretter avkjølt til en temperatur på ca. 60°C. Raskt etter nedkjøling ble løsningen tilsatt 1 µl peqGREEN og helt over i en støpeform. I formen var det også plassert en kam for tillaging av brønnene der DNA skulle appliseres. Gelen lot stivne før den ble flyttet til elektroforese-kammeret. Brønn-kammen ble forsiktig tatt ut, og gelen ble dekket med TAE-buffer. Den første brønnen ble tilsatt 1 kb DNA ladder. Ladderens inneholdt DNA-fragmenter av kjent størrelse, og muliggjorde derfor en omtrentlig størrelsesbestemmelse av fragmentene i prøven. DNA-prøvene ble tilsatt loading buffer til en konsentrasjon på 1x før applisering til brønnene. Dette ble gjort for å enklere kunne applisere prøvene på gelen, da loading bufferen inneholdt glyserol og gjorde prøven mer viskøs. I tillegg inneholdt bufferen et lilla fargestoff. Ved bruk av RedTaq® PCR var ikke tilsetning av loading buffer nødvendig ettersom bufferen allerede fantes i reaksjonsmiksen. Gelelektroforesen ble utført ved 90 V til DNA-fragmentene var tilstrekkelig separert (20-40 min). Fragmentene ble deretter visualisert under UV-lys i Gel Doc-1000 (BioRad).

3.6.2 Rensing av PCR-produkt fra gel

Til rensing av PCR-produkter fra gel ble det benyttet PCR NucleoSpin Gel og PCR Clean-up kit (Machery-Nagel). DNA-fragmentet ble kuttet ut av agarosegelen ved bruk av en steril skalpell. For hver 100 mg av agarosegel ble 200 µl Buffer NTI tilsatt, og gelbiten ble løst opp ved inkubering på vannbad (50°C, 5-10 min), og vortexing hvert 2-3 min. Prøven (700 µl i hver runde) ble overført til en NucleoSpin Gel og PCR Clean-up kolonne. Kolonnen ble så sentrifugert (11 000 x g, 30 sek) og filtratet dekantert av. Dette ble gjentatt til all prøve var sentrifugert. Buffer NT3 (700 µl) ble så tilsatt kolonnen før den ble sentrifugert (11 000 x g, 30 sek). Filtratet ble dekantert av. Vasketrinnet ble gjentatt for å minimalisere chaotropisk saltoverføring og lav A_{260}/A_{230} . Kolonnen ble sentrifugert i (11 000 x g, 1 min) for å fjerne Buffer NT3, før den ble overført til et nytt 1.5 ml eppendorfrør, og Buffer NE (15-30 µl) ble

Metoder

tilsatt. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i 1 min og deretter sentrifugert (11 000 x g, 1 min) for eluering.

3.7 Mikrotiterassay for minimal inhibitory concentration (MIC)-bestemmelse av antibiotika

For bestemmelse av MIC for et valgt antibiotikum for bakteriestammer og enkeltkolonier ble det i dette arbeidet ofte benyttet mikrotiterassay. Tross variasjoner med hensyn på medietilsetning, kulturfortynning og bruk av antibiotikum, ble følgende generelle protokoll benyttet: I første trinn ble 100 µl medium (evt. tilsatt seleksjonsmarkør, IPTG for deplesjon av gener og/eller TWEEN-80 for å redusere binding av dalbavancin til platen i mikrotiterplaten) tilsatt brønn 1-12, og antibiotikum i ønsket konsentrasjon ble tilsatt brønn 1. Medium ble videre tilsatt brønn 1 til et totalvolum på 200 µl. For å lage en to-folds fortynningsrekke av antibiotikumet, ble 100 µl fra brønn 1 overført til brønn 2, hvor fortynningsrekken fortsatte t.o.m. brønn 11. Brønn 12 var kontroll, og ble ikke tilsatt antibiotikum. Bakteriekulturen ble deretter fortynnet (ofte 1:100) i samme medium, og 100 µl ble tilsatt hver brønn. Mikrotiterplaten ble så inkubert over natt ved 37°C i mikrotiterplateleser, hvor OD₆₀₀ ble målt hvert 10. min.

3.8 Populasjonsanalyseprofil

Populasjonsanalyseprofil ble benyttet for å sammenligne vekst av *S. aureus*-stammer på skåler med ulike konsentrasjoner av antibiotika. Til dette ble det først laget overnattkulturer av ønskede stammer i BHI (tilsatt 5 µg/ml erytromycin, 10 µg/ml kloramfenikol og 250 µM IPTG for induksjon av CRISPRi-stammer). Samtidig ble det laget tilsvarende BHI-agarskåler med ulike konsentrasjoner av antibiotika (dalbavancin: 0 µg/ml – 0.2 µg/ml eller vancomycin: 0 µg/ml – 1.75 µg/ml). Fortynningsrekke av overnattkulturene (100 µl av 10⁻⁴, 10⁻⁵ og 10⁻⁶ fortynninger) ble så platet ut. Skålene ble inkubert over natt ved 37°C, og påfølgende dag ble koloniene opptalt for å bestemme antall CFU/ml for ulike konsentrasjoner av antibiotika.

3.9 Transformasjon i kjemisk kompetente *E. coli*

3.9.1 Tillaging av kompetente *E. coli*-celler (CaCl₂-metoden)

En kultur av *E. coli*-stammen (5 ml) ble dyrket over natt i 2x LB-medium. Overnattkulturen ble så fortynnet til OD₆₀₀ = 0.05 i Erlenmeyerkolbe med volum 5-10 ganger større enn kulturvolumet. Cellene ble deretter dyrket til tidlig log-fase (OD₆₀₀ = 0.4), før de ble samlet ved sentrifugering (4000-5000 x g, 4°C, 5 min). I de resterende trinnene ble cellene oppbevart på is. Cellene ble resuspendert i ½ kulturvolum med 0.1 M iskald CaCl₂, før de ble holdt på is i 1-

Metoder

2 timer. Deretter ble de sentrifugert som tidligere, og supernatanten ble dekantert av. Pelleten ble forsiktig resuspendert i 1/10 kulturvolum av 0.1 M CaCl₂. Iskald, steril 10 % glyserol ble tilsatt før frysing ved -80°C.

3.9.1.1 Transformering av ligering inn i *E. coli* IM08B

For transformering av ligering inn i *E. coli* IM08B-celler, ble først kjemisk kompetente *E. coli* IM08B-celler tint på is. Per transformasjon ble det brukt 40 µl kompetente *E. coli*-celler, hvorav cellene ble tilsatt ligeringsreaksjon (15 µl). Deretter ble cellene satt på is (30 min), og videre utsatt for et varmesjokk (42°C, 45-50 sek). Dette ble gjort for å åpne porer i cellemembranen slik at DNA kunne tas opp. Raskt etter at cellene ble utsatt for varmesjokket ble SOC-medium tilsatt (250 µl), før røret ble inokulert i varmeskap på 37°C med risting i én time. Kulturen (50 µl og 200 µl) ble så plattet ut på LB-skåler (100 µg/ml ampicillin), før skålene ble inkubert ved 37°C over natt.

3.10 Transformering ved elektroporering i *S. aureus*

3.10.1 Tillaging av kompetente *S. aureus*-celler

Stammen ble inokulert i BHI (5 ml), og inkubert ved 37°C med risting over natt. Deretter ble kulturen (2 ml) fortynnet i BHI (100 ml) og overført til en 250 ml Erlenmeyerkolbe. Kolben ble inkubert ved 37°C med risting til OD₆₀₀ var 0.4 – 0.5. Cellene ble så overført til 2 x 50 ml Nunc sentrifugerør og satt på is i ca. 10 minutter. Deretter ble cellene sentrifugert (4000 x g, 4°C, 10 min). For de øvrige vaskestegene var 5 minutter sentrifugering tilstrekkelig. Supernatanten ble dekantert av, og cellene ble deretter vasket med iskald dH₂O (35 ml) to ganger. Supernatanten ble igjen dekantert av, og cellene ble vasket med iskald 10 % glyserol (25 ml) tre ganger. Den endelige pelleten ble resuspendert i iskald 10 % glyserol med 0.5 M sukrose (2 ml). Deretter ble cellene alikvotert til eppendorfrør (200 µl) og fryst ved -80 °C.

3.10.2 Elektroporering av *S. aureus*

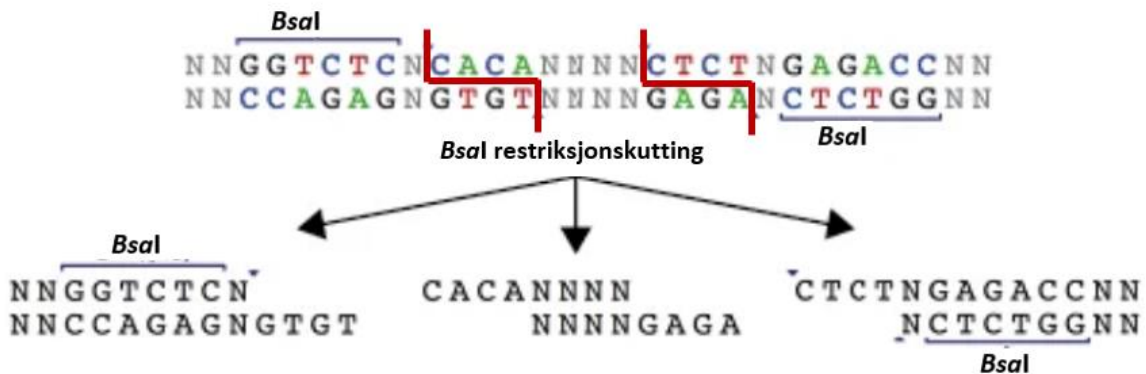
Kompetente *S. aureus*-celler (avsnitt 3.10.1) ble tint på is før 50 µl ble overført til nytt 1.5 ml eppendorfrør og tilsatt plasmid-DNA (750 - 1000 ng plasmid). Dette ble så overført til en 1 mm kyvette. Her var det viktig å unngå luftbobler. Cellene ble deretter elektroporert ved 2.1 volt, 100 ohm og 25 µF i en Gene Pulser (BioRad). Umiddelbart etter elektroporering ble det tilsatt TSB med 0.5 M sukrose (950 µl). Det ble også tilsatt erytromycin (5 µg/ml) i de tilfellene de kompetente cellene allerede inneholdt et plasmid med erytromycinseleksjon. Cellene ble deretter inkubert ved 37°C og med risting i minst 2 timer, før de ble sentrifugert (maks hastighet, 1 min), supernatant (600 µl) ble pipettert av og pelleten ble resuspendert i resterende

Metoder

supernatant. Løsningen (50 µl og 200 µl) ble så platet ut på skåler med BHI og passende konsentrasjon av antibiotika (5 µg/ml erytromycin og/eller 10 µg/ml kloramfenikol).

3.11 Golden Gate-kloning og konstruksjon av CRISPRi-stammer og delesjonsstammer i *S. aureus*

Golden Gate-kloning er en teknikk hvor man kan overføre DNA-fragment til en ekspresjonsvektor ved hjelp av restriksjonsenzymet uten å etterlate sekvenser fra rekombinasjonssetene i det ferdige produktet (Engler et al., 2008). Her benyttes type II restriksjonsenzymet (type IIS) som kutter utenfor gjenkjennelsessekvensen sin, og man unngår dermed de ekstra nukleotidene fra gjenkjennelsessekvensen i det endelige konstruktet. Figur 3.1 illustrerer restriksjonskutting for Golden Gate-kloning.



Figur 3.1 Restriksjonskutting for Golden Gate-kloning. Type II restriksjonsenzymet (eks. BsaI) kutter utenfor gjenkjenningssekvensen sin, og vil derfor ikke etterlate sekvenser fra rekombinasjonssetene i det endelige konstruktet. Den midterste sekvensen er målsekvensen som klones inn i en ekspresjonsvektor. Modifisert figur fra (Geneious).

Bruk av denne metoden gjør derfor at to fragmenter kuttet med samme type II restriksjonsenzym kan limeres til ett produkt uten at det opprinnelige restriksjonssetet følger med (Engler et al., 2008).

Ved bruk av Golden Gate-kloning er det vist at det er mulig å sammenstille opptil ni fragmenter samtidig i et mottakerplasmid. Dette er fordi overheng-sekvensen på de kuttete fragmentene inneholder fire valgfrie nukleotider, og komplementære DNA-fragmenter kan dermed settes sammen lineært (Engler and Marillonnet, 2014). Kloningen gjøres i et enkelt rør ved å pipettere mottakervektor og fragmenter som skal settes inn, i tillegg til type II restriksjonsenzym og ligase, for deretter å inkubere dette i en termosyklus (Engler and Marillonnet, 2014). Under restriksjons-ligeringsreaksjonen vil ikke det ønskede ligerte produktet bli utsatt for ny restriksjonskutting ettersom det ikke lenger inneholder type II restriksjonssetet. Produkter som ikke har blitt kuttet og fremdeles innehar disse restriksjonssetene vil derimot kuttes slik at de riktige komponentene kan limeres. Dannelsen av det ønskede produktet øker med

Metoder

inkubasjonstiden, og gir en høy kloningseffektivitet (Engler and Marillonnet, 2014). Golden Gate-kloningsstrategien muliggjør en effektiv restriksjons-ligeringsreaksjon av plasmidene på 5 min. Derfor er metoden vel så effektiv som tradisjonelt brukte rekombinasjons-kloningsteknikker. En annen fordel er den høye presisjonen, hvorav det rekombinerte plasmidet ikke inneholder uønskede sekvenser (Engler et al., 2008). I dette arbeidet ble Golden Gate benyttet til å lage sgRNA-konstrukt (avsnitt 3.11.1) og til å lage delesjonsvektorer (avsnitt 3.11.2).

3.11.1 Tillaging av sgRNA-konstrukt og CRISPRi-stammer i *S. aureus*

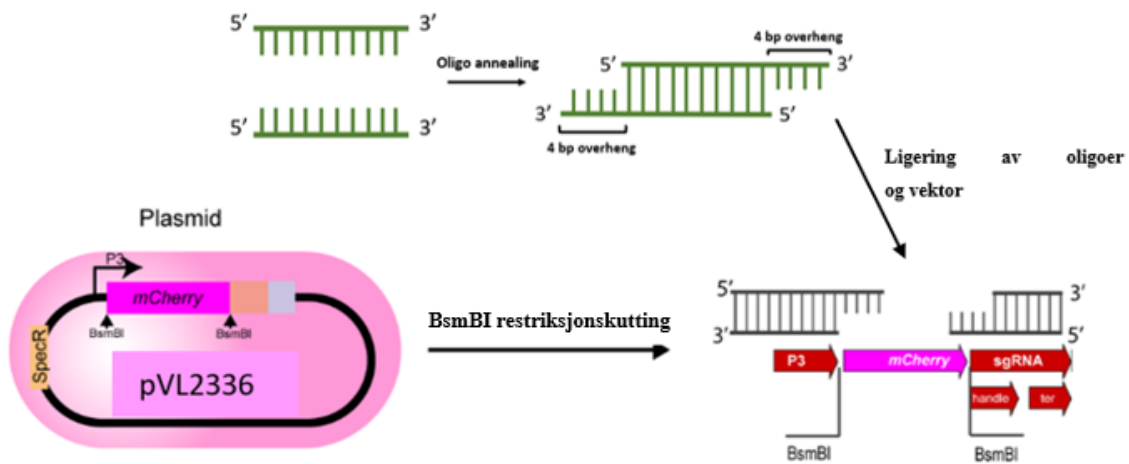
For tillaging av sgRNA-depleksjonskonstrukt i *S. aureus* ved bruk av Golden Gate-kloning, ble det benyttet oligoer som inneholder den spesifikke 20 bp-sekvensen, i tillegg til 4 bp overhangs som er komplementære til sekvenser i målvektorer pVL2336 (Fig. 3.2). Med denne fremgangsmåten trengs altså ikke restriksjonskutting av insertene, siden overhang-sekvensene er designet som en del av oligoene, og restriksjon og ligering ble utført separat. Følgende prosedyre ble benyttet:

3.11.1.1 Oligo annealing av DNA-målesekvens

Oligoer var designet for å introdusere ønsket 20 bp-spesifikk sekvens (se avsnitt 1.4). De to oligoene inneholdt samme 20-bp sekvens og ulike 4-bp overhang som er komplementære med vektoren. I første omgang ble de to oligoene (forward og reverse) annealt sammen (Fig. 3.2). Oligo-F (2.5 µl, 100 µM), Oligo-R (2.5 µl, 100 µM), 10x TEN buffer (5 µl) og ddH₂O (40 µl) ble derfor blandet sammen og inkubert (95°C, 5 min) før løsningen sakte ble avkjølt til romtemperatur.

3.11.1.2 Restriksjonskutting av vektor som skulle benyttes som sgRNA-plasmid

Vektor (pVL2336) ble isolert fra *E. coli* VL2336. Dette plasmidet inneholder genet *mCherry* som normalt gir rosa farge på *E. coli*-kolonier dersom genet er intakt. Dette kan derfor benyttes som en indikasjon på vellykket restriksjonskutting og kloning ved transformasjon i *E. coli*. Restriksjonsenzymet BsmBI (type II) kutter sekvensen utenfor gjenkjennelsessekvensen på hver side av genet, og danner overheng som muliggjør ligering av DNA-målesekvens med vektor (Fig. 3.2).



Figur 3.2 Design av sgRNA-plasmid. Oligoer var designet for å introdusere ønsket 20 bp-spesifikk sekvens, og hadde 4 bp overhangs som er komplementære til sekvenser i målvektorer pVL2336. *mCherry* ble kuttet ut fra pVL2336 ved bruk av restriksjonsenzym BsmBI, og erstattet med den spesifikke 20 bp-sekvensen. Modifisert figur fra Morten Kjos.

Til kuttingsreaksjonen ble det tilsatt plasmid (4 µg), BsmBI (NEB, 10 units), 10x NEB 3.1 buffer (5 µl) og resterende mengde ddH₂O til et totalvolum på 50 µl. Løsningen ble så inkubert (55°C, 2 t). Korrekt restriksjonskutting ble verifisert ved hjelp av agarose gelelektroforese (som beskrevet i avsnitt 3.6.1). Det ble observert et bånd på rundt 6000 bp (5935 bp) som tilsvarte selve plasmidet og et fragment på rundt 700 bp (739 bp) som tilsvarte *mCherry*-fragmentet.

Deretter ble fragmentet på 5935 bp (plasmidet) kuttet ut fra agarosegelen og rensset. Her ble NucleoSpin Gel og PCR Clean-up kittet benyttet (som beskrevet i avsnitt 3.6.2).

3.11.1.3 Ligering og transformasjon

For ligering av ferdig rensset pVL2336-vektor og oligoer (DNA-målsekvensen) ble det blandet sammen vektor (100-200 ng), T4 ligase (1 µl), 10x T4 ligasebuffer (2 µl) og resterende mengde annealingsreaksjon til et totalvolum på 20 µl. Det ble også laget en negativ kontroll med vektor uten DNA-insert. Ligeringsreaksjonen ble inkubert ved 16°C i 5 timer eller over natt. Ligeringsreaksjonen ble transformert inn i *E. coli* IM08B (som beskrevet i avsnitt 3.9.1.1).

3.11.1.4 Sekvensering og plasmidisolering fra transformanter

Påfølgende dag ble transformanter plukket i LB-medium (100 µg/ml ampicillin) og dyrket over natt ved 37°C med risting. Det ble så isolert plasmid fra kulturene ved bruk av E.Z.N.A.® Plasmid DNA Kit (beskrevet i avsnitt 3.2.1), og videre ble plasmidene sendt til sekvensering (Eurofins Genomics) for verifisering av riktig innsatt sgRNA-plasmid med primer MK25.

3.11.1.5 Transformasjon av sgRNA-plasmid inn i *S. aureus*

Plasmid med riktig innsatt sgRNA-sekvens ble deretter elektroporert inn i en *S. aureus*-stamme som allerede inneholdt pLOW-dCas9 eller pLOW-dCas9_ekstra_lacO ved bruk av Gene Pulser (BioRad). Protokoll for elektroporering er beskrevet i avsnitt 3.10.2.

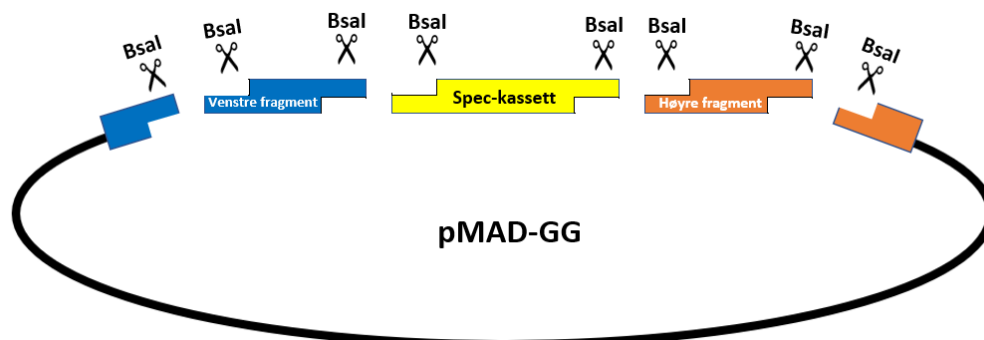
Påfølgende dag ble transformanter plukket i BHI-medium med 5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol og dyrket over natt ved 37°C med risting. Deretter ble det utført PCR-screening av transformantene ved bruk av RedTaq® DNA polymerase, som beskrevet i avsnitt 3.4.3.1. De endelige stammene bærer da på to plasmider: pLOW-dCas9 for induserbart uttrykk av dCas9 og pVL2336-sgRNA (genX) for konstitutivt uttrykk av genspesifikk sgRNA.

3.11.2 Tillaging av delesjonsstammer for *kapB* og *aroC* i *S. aureus* NCTC8325-4

For tillaging av delesjonsstammer for *kapB* og *aroC* i *S. aureus* NCTC8325-4 ble følgende protokoll benyttet:

3.11.2.1 Primerdesign for Golden Gate-kloning

Til dette arbeidet ble det designet primere for to separate delesjoner av genene *kapB* og *aroC* i *S. aureus* NCTC8325-4. Konstruktene ble laget for å kunne erstatte genene med en spektinomykinkassett (allelic replacement med spec-kassett). Det ble benyttet Golden Gate-kloning for å sette delesjonskonstruktet inn i den temperatursensitive delesjonsvektoren pMAD-GG. pMAD-vektoren har et replikon for *E. coli*, et temperatursensitivt replikon for *S. aureus*, et gen som koder for beta-galactosidase for blå/hvit screening og et gen som koder for erytromycinresistens. Primerne ble designet slik at en spec-kassett (spektinomykinkassett fra plasmid pCN55) ble satt sammen med sekvenser på hver side av genet som skulle deleteres, og dette illustreres i Figur 3.3.



Figur 3.3 Sammensetting av fragmenter for Golden Gate-kloning. Spec-kassetten var komplementær til DNA-fragmentene, og disse kunne derfor settes sammen lineært. Ved at begge ytterkantene av insertet, samt pMAD-vektor ble kuttet med samme restriksjonsenzym (*Bsa*I), kunne disse enkelt ligeres ved bruk av Golden Gate-kloning.

3.11.2.2 Amplifisering av ytterfragmenter og spec-kasset

For å amplifisere opp fragmentene fra punkt 1 ble det benyttet Phusion® High-Fidelity PCR (som beskrevet i avsnitt 3.4.2). Genomisk DNA fra *S. aureus* ble benyttet som templat for høyre og venstre fragment, og pCN55 ble benyttet som DNA-templat for spec-kassetten. Det ble satt opp én PCR-reaksjon per fragment. Her ble de forventede produkter på ca. 1 kb for fragmentene på hver side av spec-kassetten, og 1.3 kb for spec-kassetten kuttet ut fra gel og rensset (som beskrevet i avsnitt 3.6.2).

3.11.2.3 Kutting med BsaI restriksjonsenzym og assemblering av inserter

Etter rensing fra gel ble de tre insertene behandlet med BsaI restriksjonsenzym, satt sammen og ligert inn i vektor pMAD ved bruk av NEB® Golden Gate Assembly kit. Reaksjonskonsentrasjoner og volum er vist i Tabell 3.6.

Tabell 3.6 Liste over reagenser og volum benyttet til Golden Gate Assemblering. Her ble preklonede inserter og vektor pMAD kuttet med restriksjonsenzym BsaI og ligert sammen.

| Reagens | Negativ kontroll | Assembleringsreaksjon |
|---|----------------------------|--------------------------------------|
| pMAD, x µg/ml | 2 µl | 2 µl |
| Preklonede inserter | - | 75 ng per plasmid 2:1 molar ratio |
| T4 DNA ligase buffer (10X) | 2 µl | 2 µl |
| NEB® Golden Gate Assembleringsmiks (saI-HF®v2) | 1 µl | 1 µl |
| Nukleasefritt dH ₂ O | til et sluttvolum på 20 µl | til et sluttvolum på 20 µl |

Reaksjonen ble først inkubert ved 37°C i 1 time, deretter ble den inkubert ved 60°C i 5 min.

3.11.2.4 Transformering av pMAD inn i *E. coli*

Etter å ha satt sammen fragmentene inn i pMAD-vektor, ble plasmidet transformert inn i *E. coli* IM08B (som beskrevet i avsnitt 3.9.1.1). Påfølgende dag ble det plukket transformanter i LB-medium (100 µg/ml ampicillin) og inkubert over natt. Det ble så utført PCR-screening av transformantene (RedTaq®), hvorav spec-spesifikke primere ble benyttet for å verifisere at kolonien hadde tatt opp pMAD-plasmidet (avsnitt 3.4.3.2). I tillegg ble det isolert plasmid ved bruk av E.Z.N.A.® Plasmid DNA Kit, og plasmidene ble så sendt til sekvensering (Eurofins Genomics) for å verifisere at riktig insert var satt inn i pMAD-plasmidet.

3.11.2.5 Transformering av pMAD inn i *S. aureus*

Plasmid fra transformant med riktig delesjon ble videre elektroporert inn i *S. aureus* NCTC8325-4, men her var inkuberingssteget på 3.5 timer ved 30°C. Dette skyldtes at pMAD hadde to ulike replikasjonssteder (et for *E. coli* og et for *S. aureus*), og replikasjonsstedet som ble

Metoder

benyttet av pMAD i stafylokokker var temperatursensitivt. Transformeringen ble deretter platet på TSB-agarplater (tilsatt 5 µg/ml erytromycin) med 40 µl X-GAL, og inkubert ved 30°C i 2 døgn. Tilsetning av X-GAL på agarskålen muliggjorde identifisering av kolonier som hadde tatt opp plasmidet ettersom plasmidet bærer et beta-galaktosidasegen som kan spalte X-GAL og danne en blå forbindelse. Etter 2 døgn inkubasjon ble det plukket blå kolonier for PCR-screening (RedTaq®), og her ble spec-spesifikke primere benyttet for å verifisere at kolonien hadde tatt opp pMAD-plasmidet. Dette skulle gi et produkt på ca. 1.3 kb.

3.11.2.6 Integrering av spec-kassett inn i *S. aureus*-genomet og verifisering av delesjonsmutant

Samtidig som koloniene ble PCR-screenet, ble de også re-strøket på TSB-agarplater (5 µg/ml erytromycin) med 40 µl X-GAL. Koloniene ble deretter inkubert ved 30°C i 2 døgn. Herfra ble 2 kolonier fra re-strykningen (som også ga riktig bånd ved PCR-screening) inkubert i TSB-medium i 2 timer ved 30°C med risting, deretter inkubert i 6 timer ved 43°C med risting. Plasmidet kunne fremdeles replikere ved 30°C, men ved høyere temperatur ville ikke lenger replikonet til plasmidet fungere. Ved å inkubere ved 43°C var målet at pMAD-plasmidet ville integrere inn i *S. aureus*-genomet og med overkryssing deletere ønsket gen ved å bytte det ut med spec-kassetten.

Det ble så laget en fortynningsrekke av kulturen i TSB-medium (10^{-1} , 10^{-2} og 10^{-3} fortykning) som videre ble platet ut på TSB-agarplater (tilsatt 100 µg/ml spektinomycin) med 40 µl X-GAL, og inkubert ved 43°C i 2 døgn. Av koloniene som vokste frem på agarskålene indikerte hvite kolonier dobbel overkryssning av spec-kassetten, lyseblå kolonier indikerte enkel overkryssning og blå kolonier indikerte at plasmidet fremdeles var til stede. Hvite kolonier ble re-strøket på TSB-agarplater med 100 µg/ml spektinomycin, samt TSB-agarplater med 5 µg/ml erytromycin. Her ønsket vi at spec-kassetten skulle være integrert i bakteriens genom, og at plasmidet med seleksjonsmarkøren erytromycin ikke var til stede, og derfor ble kolonier som var spektinomycin-resistente og erytromycin-sensitive vurdert videre. Til slutt ble koloniene PCR-screenet (RedTaq®) med følgende primere for å verifisere riktig integrering av spec-kassetten: *kapB* ble PCR-screenet med AHF13 + AHF16 som skulle gi et produkt på 2.3 kb, AHF18 + AHF15 som skulle gi et produkt på 2.3 kb, AHF15 og AHF16 som skulle gi et produkt på 1.3 kb og interne primere som ikke skulle gi produkt. *aroC* ble PCR-screenet med AHF19 og AHF22 som skulle gi et produkt på 2.3 kb, AHF24 og AHF21 som skulle gi et produkt på 2.3 kb, AHF21 og AHF22 som skulle gi et produkt på 1.3 kb og interne primere som ikke skulle gi

Metoder

produkt. Dersom PCR-screeningen ga produkter av riktig størrelse, indikerte dette at mutanten hadde integrert spec-kassett og at ønsket gen var deletert.

3.12 Antibiotikaseleksjonsforsøk med CRISPRi-bibliotek

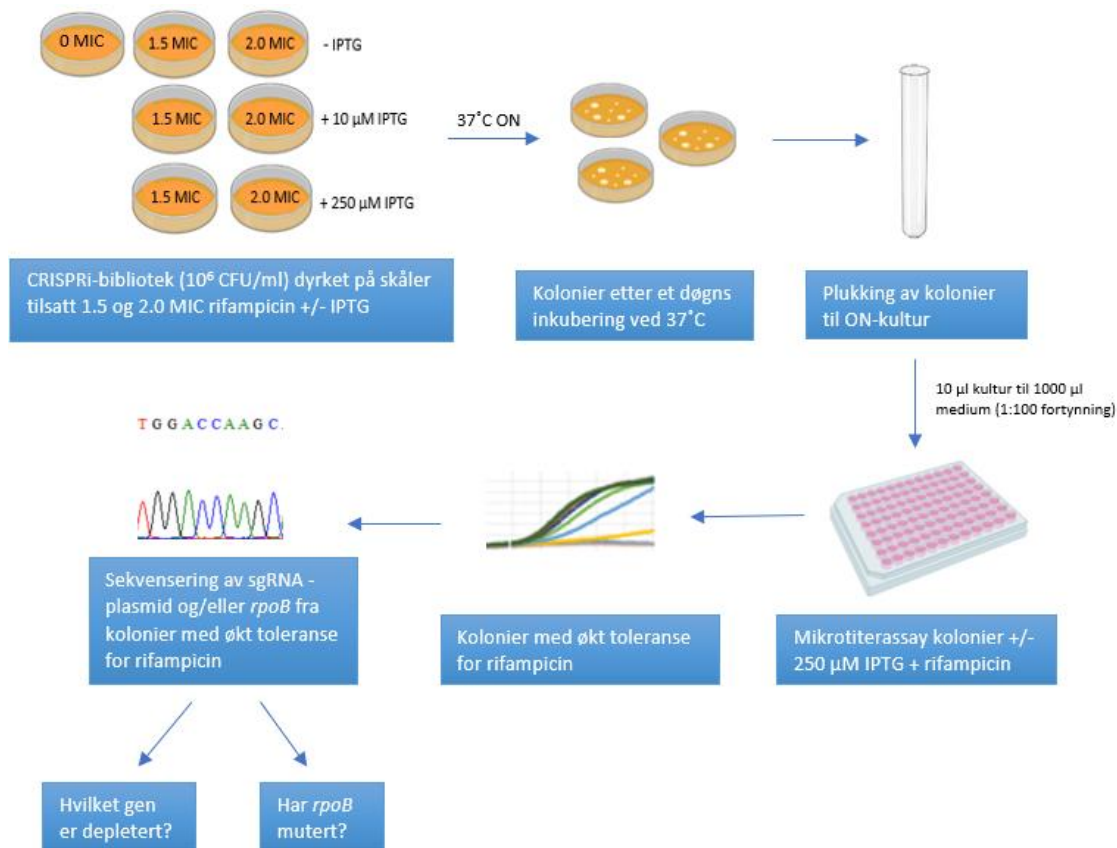
3.12.1 CRISPRi-biblioteket

I dette arbeidet ble det benyttet et samlet CRISPRi-bibliotek («pooled CRISPRi library») fra *S. aureus* som et verktøy til å identifisere gener som er involvert i antibiotikatoleranse i *S. aureus*. Biblioteket er tidligere blitt laget av Maria Heggenhougen (NMBU) and Xue Liu (Universitetet i Lausanne) (ikke publisert). Til sammen 1928 unike sgRNAer ble designet for å kunne nedregulere alle 1928 transkripsjonsenheter i *S. aureus* NCTC8325-4. sgRNAene ble klonet i et samlet oppsett og transformert inn i en *S. aureus* med pLOW-dCas9. Resultatet er et bibliotek med en samling av 1928 unike stammer (dyrket sammen i en kultur) som til sammen har alle transkripsjonsenheter (og altså gener) i genomet som target.

3.12.2 Rifampicintoleransescreen med CRISPRi-bibliotek på agarskål

I dette forsøket ble CRISPRi-depleksjonsbiblioteket benyttet for å selektere stammer med økt rifampicinresistens. Et flytskjema med fremgangsmåten som ble benyttet vises i Figur 3.4. Fra CRISPRi-biblioteket ble 10^6 celler dyrket på TSB-agarplatene med 1.5 MIC eller 2.0 MIC av rifampicin. Her ble IPTG tilsatt til konsentrasjoner på 0 μM , 10 μM eller 250 μM , som tilsvarer uindusert, lav induksjon og høy induksjon av CRISPRi-systemet. Skålene ble inkubert over natt ved 37°C. Antatt resistente kolonier fra skålene ble plukket og dyrket over natt ved 37°C med risting i medium uten rifampicin, og deretter testet for økt resistens ved bruk av mikrotiterassay (beskrevet i avsnitt 3.7). For å identifisere hvilket gen som var target i stammene med økt MIC for rifampicin, ble det isolert plasmid og sgRNA ble sekvensert med primer MK25. Den spesifikke 20 bp-sekvensen i sgRNAet ble brukt til å identifisere targetgen på genomet til *S. aureus* NCTC8325-4. I noen stammer ble *rpoB*-genet også sekvensert. *rpoB* på ca. 3 kb ble amplifisert ved PCR (primer MK422 og MK423) og sekvensert med primerne MK424 – MK427.

Metoder



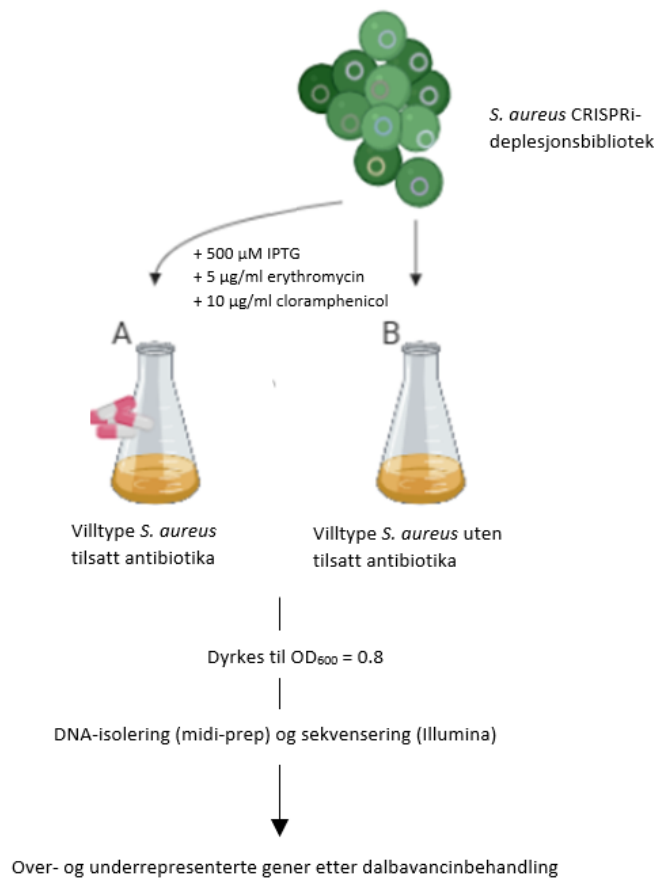
Figur 3.4 Identifisering av gener involvert i toleranse mot rifampicin. Det ble dyrket et CRISPRi-depleksjonsbiblioteket på agarplater med ulike konsentrasjoner av antibiotikumet. Videre ble det laget en overnattkultur av biblioteket som ble platet ut på skåler med eller uten inducer (IPTG). Kolonier dyrkbare \geq MIC rifampicin ble fulgt opp for å bekrefte resistensøkningen. Mikrotiterassay ble deretter benyttet for å sammenligne koloniens vekst +/- IPTG med en kontrollprøve. Koloniene som fremdeles viste økt resistens mot rifampicin ble sekvensert for å bestemme hvilket sgRNA plasmidet inneholdt, og dermed hvilket gen som var nedregulert. Se avsnitt 4.1 for resultater.

3.12.3 CRISPRi-sek: Bestemmelse av gen-fitness ved eksponering av *S. aureus* CRISPRi-bibliotek for subletale mengder dalbavancin etterfulgt av Illuminasekvensering

Målet med dette forsøket var å studere hvordan antibiotikumet påvirket forekomsten av sgRNA-konstruktene i populasjonen. Et flytskjema med fremgangsmåten som ble benyttet vises i Figur 3.5. Det ble først laget to kulturer av CRISPRi-depleksjonsbiblioteket, *S. aureus* NCTC8325-4 (pLOW-dCas9_ekstra_lacO). Begge kulturene inneholdt 100 ml BHI (100 ml), cellekultur (50 µl), erytromycin (5 µg/ml), kloramfenikol (10 µg/ml) og 500 µM IPTG for induksjon av CRISPRi-systemet. Én av kulturene ble så tilsatt subletal konsentrasjon av dalbavancin (0.015 µg/ml), mens den andre kulturen var positiv kontroll uten antibiotikum. Det ble satt opp 4 paralleller av hver av kulturene. Etter dyrking til OD₆₀₀ = 0.8 ved 37°C med risting ble cellene høstet for videre bruk. I neste trinn ble det isolert plasmid fra cellene ved bruk av MIDI-plasmid prep (se avsnitt 3.2.3). Prøvene ble så sekvensert med Illumina MiniSeq (avsnitt 3.5.2), og dataene ble analysert med DeSeq2 for å evaluere sgRNA fitness (se Liu et al. for detaljer) (Liu

Metoder

et al., 2020). Dette ga en oversikt over hvilke sgRNA som hadde høyest og lavest fremkomst i plasmidpopulasjonen.

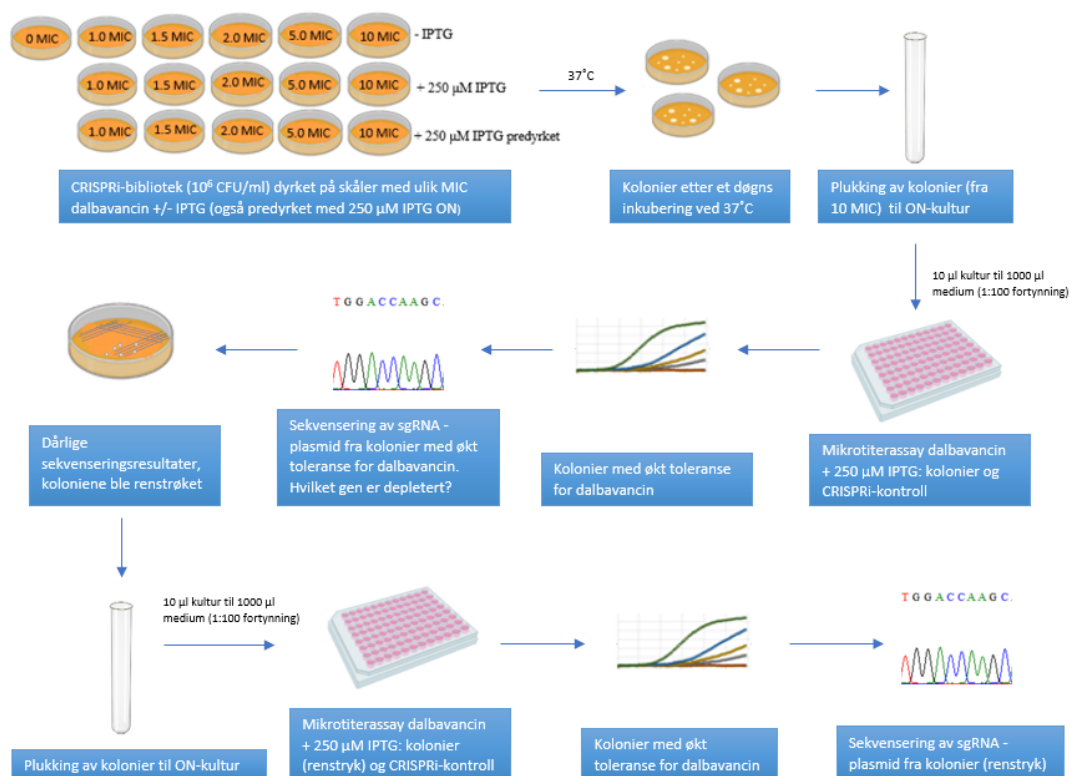


Figur 3.5 Dyrking av CRISPRi-depleksjonsbibliotek og kontrollstamme for bestemmelse av under- og overrepresenterte sgRNA etter dalbavancinbehandling. Det induerte CRISPRi-depleksjonsbiblioteket ble dyrket sammen med og uten subletale konsentrasjoner av dalbavancin for å bestemme hvilke sgRNA som var under- og overrepresentert sammenlignet med en kontrollstamme. Dette ga informasjon om hvilke gener som ved depleksjon trolig gjorde cellen mer sensitiv eller tolerant for dalbavancin ved gitte konsentrasjoner. Se avsnitt 4.4 for resultater.

Etter sekvensering av sgRNA-konstruktene ble det beregnet hvorvidt disse var overrepresentert eller underrepresentert sammenlignet med kontroll-sgRNA. Til dette ble det beregnet Log-(2)-fold change (kontroll/dalbavancin), forkortet Log₂FC, hvor en negativ fold endring indikerte at forekomsten av det enkelte sgRNAet etter dalbavancinbehandling var høyere enn for kontroll-sgRNA. En negativ fold endring tydet derfor på at depleksjon av sgRNA-targetgenet gjorde cellen mer motstandsdyktig mot dalbavancin. Omvendt ville det observeres en positiv fold endring dersom antall celler med kontroll-sgRNA var høyere enn celler med gitt sgRNA etter dalbavancinbehandling, og tydet derfor på at depleksjon av sgRNA-targetgenet gjorde cellen mindre motstandsdyktig mot dalbavancin. Analysen ble utført av Xue Liu (Universitet i Lausanne) og Morten Kjos (NMBU).

3.12.4 Dalbavancintoleransescreen med CRISPRi-bibliotek på agarskål

I dette forsøket ble CRISPRi-deplesjonsbiblioteket benyttet for å direkte selektare kolonier fra biblioteket med økt dalbavancinresistens. Et flytskjema med fremgangsmåten som ble benyttet vises i Figur 3.6, og her finnes også en oversikt over agarplatene brukt i dette forsøket (øverst til venstre). Fra CRISPRi-biblioteket ble 10^6 celler dyrket på TSB-agarplater med 1.0, 1.5, 2.0, 5 og 10 av MIC av dalbavancin, samt kontroll uten antibiotika. Skålene ble tilsatt 0 IPTG (uindusert) eller 250 μ M IPTG for å indusere CRISPRi-systemet i biblioteket. En av parallellene ble også platet ut fra biblioteket predyrket med 250 μ M IPTG over natt ved 37 °C med risting. Skålene ble videre inkubert over natt ved 37°C. Antatt resistente kolonier fra skålene ble plukket og dyrket over natt ved 37°C med risting i medium uten dalbavancin, og deretter testet for økt resistens ved bruk av mikrotiterassay (se avsnitt 3.7 for detaljer). For å identifisere hvilket gen som var targetet i stammene med økt MIC for dalbavancin, ble det isolert plasmid og sgRNA ble sekvensert med primer MK25 (her ble koloniene re-strøket og plasmidene sekvensert på nytt grunnet dårlige sekvenseringsresultater). Den spesifikke 20 bp-sekvensen i sgRNAet ble brukt til å identifisere targetgen på genomet til *S. aureus* NCTC8325-4.

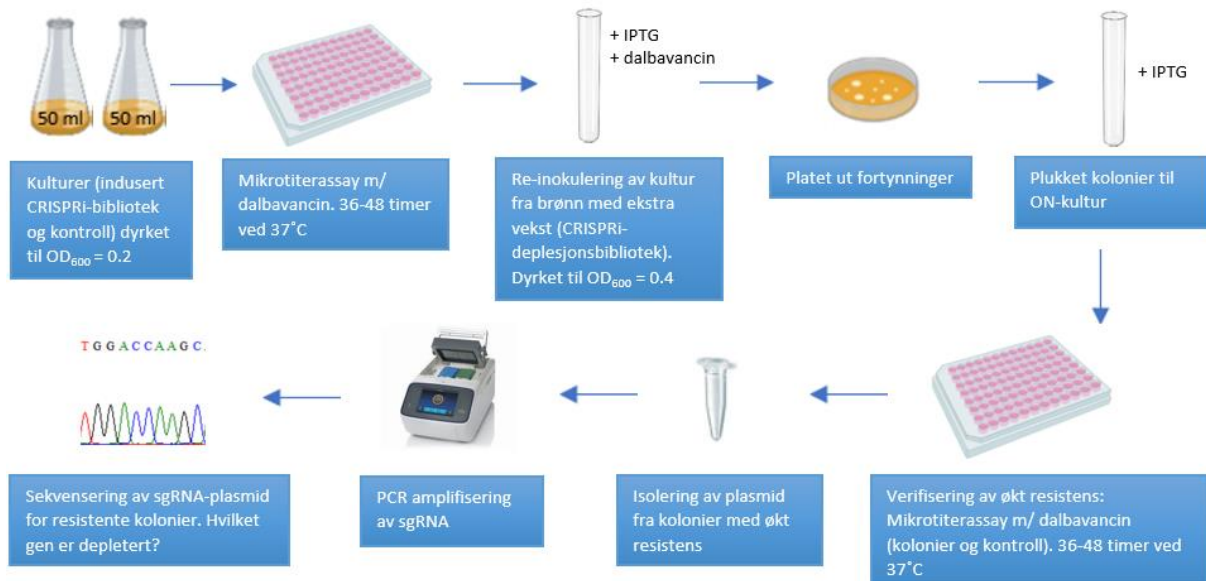


Figur 3.6 Identifisering av gener involvert i toleranse mot dalbavancin. CRISPRi-deplesjonsbiblioteket ble dyrket med eller uten induser (IPTG), og kolonier dyrkbare \geq MIC dalbavancin ble fulgt opp for å bekrefte endring i resistens. Mikrotiterassay ble videre benyttet for å sammenligne koloniens vekst +/- IPTG med en kontrollprøve. Koloniene som fremdeles viste økt resistens mot dalbavancin ble sekvensert for å kartlegge hvilket sgRNA plasmidet inneholdt, og dermed hvilket gen som var nedregulert. Se avsnitt 4.5 for resultater.

3.12.5 Dalbavancintoleransescreen med CRISPRi-bibliotek ved mikrotiterassay

For å videre undersøke hvorvidt CRISPRi-deplesjonsbiblioteket kunne benyttes til å identifisere gener hos *S. aureus* som var involvert i bakteriens toleranse for dalbavancin, ble det også benyttet mikrotiterassay med dalbavancin for å forsøke å selektere celler med økt toleranse fra CRISPRi-deplesjonsbiblioteket. Et flytskjema med fremgangsmåten som ble benyttet vises i Figur 3.7. Her ble CRISPRi-deplesjonsbiblioteket og kontrollstammen for CRISPRi-biblioteket AHF1010 (pLOW-dcas9 og pVL2336-sgRNA (nontarget)) dyrket over natt i BHI-medium (tilsatt 5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol), deretter re-inokulert (1:1000) i BHI-medium (5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol) med 250 µM IPTG for induksjon av CRISPRi-systemet, og dyrket til $OD_{600} = 0.2$. Deretter ble det satt opp et mikrotiterplateforsøk med to-folds fortyning av dalbavancin (0 µg/ml - 4 µg/ml), hvor kulturene ble fortennet 1:250. Platen ble så inkubert ved 37°C i 36-48 timer. Kultur fra brønnen med CRISPRi-deplesjonsbiblioteket med høyest MIC for dalbavancin (antatt resistente) ble reinokulert i BHI (tilsatt 5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol) med 250 µM IPTG og dalbavancin tilsvarende MIC for kontrollstammen. Kulturen ble så dyrket til $OD_{600} = 0.4$. Fra denne kulturen ble ulike fortyninger (10^{-4} til 10^{-7}) platet ut på TSB-agarplater (tilsatt 5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol) for å få enkeltkolonier, og deretter inkubert ved 37°C over natt. Videre ble tilfeldige kolonier plukket i BHI-medium (tilsatt 5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol) og dyrket over natt. For disse koloniene ble mikrotiterassay med dalbavancin gjentatt for å verifisere at koloniene ga økt resistens sammenlignet med kontrollen. For å identifisere hvilket gen som var target i stammene med økt MIC for dalbavancin, ble det først isolert plasmid, sgRNA ble amplifisert ved bruk av PCR med primerne MK25 og MK26, og deretter sekvensert med primer MK25. Den spesifikke 20 bp-sekvensen i sgRNAet ble brukt til å identifisere targetgen på genomet til *S. aureus* NCTC8325-4.

Metoder



Figur 3.7 Identifisering av gener involvert i toleranse mot dalbavancin ved bruk av mikrotiterassay. CRISPRi-depleksjonsbiblioteket og kontrollstammen ble først dyrket med en to-foldsfortynning av dalbavancin i et mikrotiterassay. Kultur fra brønnen med CRISPRi-depleksjonsbiblioteket med høyest MIC for dalbavancin (antatt resistente) ble så reinokulert i medium tilsatt MIC for dalbavancin for kontroll, og fortynninger ble platet på agarplater uten antibiotika. Etter plukking av kolonier ble mikrotiterassay gjentatt for å verifisere økt resistens for dalbavancin. Koloniene som fremdeles viste økt dalbavancin-resistens ble sekvensert for å bestemme hvilket sgRNA plasmidet inneholdt, og dermed hvilket gen som var nedregulert. Se avsnitt 4.6 for resultater. Samarbeid med Zhian Salehian.

3.13 Mikroskopi

I dette arbeidet ble fasekontrastmikroskopi benyttet til å studere cellemorfologi hos knockdown-fenotype for SAOUHSC_02658-genet i *S. aureus* NCTC8325-4. Time-lapse-mikroskopi ble benyttet til å studere cellemorfologi hos villtype *S. aureus* NCTC8325-4 dyrket med og uten tilsatt dalbavancin.

3.13.1 Fasekontrast- og fluorescencemikroskopi

SAOUHSC_02658 CRISPRi-stammen ble dyrket med og uten 250 μ M IPTG. Påfølgende dag ble kulturene re-inokulert i friskt medium fremdeles med eller uten 250 μ M IPTG, og dyrket videre til OD₆₀₀ = 0.2 (eksponentiell fase) ved 37°C og med risting. Videre ble 1 ml fra hver av cellekulturene tilsatt 0.25 μ l DAPI (DNA-bindende fluorescerende forbindelse) og 0.25 μ l Nile Red (membranbindende fluorescerende forbindelse).

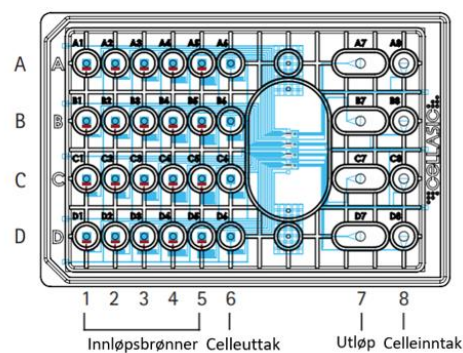
Objektglassene ble vasket med etanol og dH₂O før og etter bruk. Det ble påført et tynt lag agarose (600 μ l av PBS-løsning med 1.2 % agarose) for å hindre at bakteriene flyttet på seg under mikroskopering. Agarosen ble presset ned ved hjelp av et objektglass, og dette lot stivne i 30-60 sek før objektglasset ble fjernet. Til slutt ble cellene spottet til hver sin brønn (0.4 μ l), og dette lot tørke før det ble lagt på dekkglass. Det ble deretter tatt bilder ved bruk av Zeiss AxioObserver. Bildene ble tatt med et ORCA-Flash4.0 V2 Digital CMOS kamera (Hamamatsu

Metoder

Photonics) gjennom et 100x PC-objektiv. For fluorescensmikroskopi ble HPX 120 Illuminator (Zeiss) benyttet som lyskilde (Stamsas et al., 2018). Programmet ImageJ (Fiji) ble benyttet for å lage figurer av bildene.

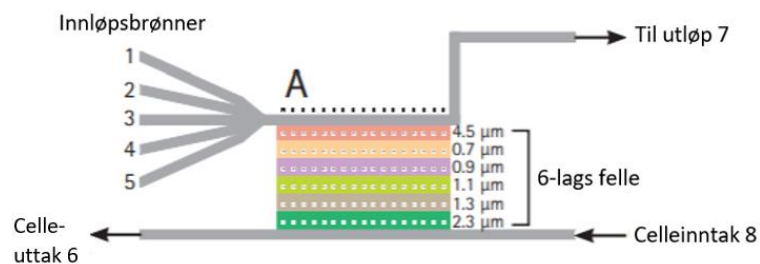
3.13.2 Time-lapse-mikroskopering ved bruk av CellASIC® ONIX B04A-03 Microfluidic Bacteria Plates

I tillegg til fasekontrastmikroskopi ble time-lapse-mikroskopering benyttet i dette arbeidet. Her var hensikten å undersøke vekst og fenotype hos villtype *S. aureus* NCTC8325-4 med økende konsentrasjoner av dalbavancin. Det ble benyttet en CellASIC® ONIX B04A-03 Microfluidic Bacteria Plate, en cellekulturplate som muliggjorde et kontrollert og dynamisk vekstmiljø for cellene. Cellekulturplaten bestod av 4 uavhengige enheter (A-D), hver med 5 innløpsbrønner for tilførsel av medium (1-5), et celleuttak (6), en stor utløpsbrønn (7) og et celleinntak (8) (Merck, 2013). Oppbyggingen av cellekulturplaten er vist i Figur 3.8.



Figur 3.8 CellASIC® ONIX B04A-03 Microfluidic Bacteria Plate. Platen består av 4 uavhengige enheter (A-D), hver med 5 innløpsbrønner (1-5), et celleuttak (6), en stor utløpsbrønn (7) og et celleinntak (8). Figur hentet fra (Merck, 2013).

Hver rad med brønner (A – D) tilhørte samme celleinntakskammer, og kammeret var 2.0×1.2 mm stort med høyder på 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 2.3 and $4.5 \mu\text{m}$ for å fange cellene ved tilsetning (Figur 3.9) (Merck, 2013). Ved å tilføre vekstmedium fra innløpsbrønnene til cellene i kammeret ble det skapt et tilpasset vekstmiljø i cellekulturplaten.



Figur 3.9 Oversikt over celleinntakskammeret på cellekulturplaten. Her ble cellene fanget i en 6-lags felle ved tilsetning. Figur fra (Merck, 2013).

Metoder

For klargjøring av platen og påføring av cellene ble følgende protokoll utført: PBS i innløpsbrønnene (1-5) og celleinntaksbrønnene (8) ble først erstattet med BHI-medium (150 μ l). I tillegg ble innløpsbrønn B (2-4) tilsatt 0.4 μ g/ml dalbavancin (1 MIC), innløpsbrønn C ble tilsatt 4 μ g/ml dalbavancin (10 MIC) og innløpsbrønn D ble tilsatt 40 μ g/ml dalbavancin (100 MIC). I neste trinn ble PBS-løsningen fjernet fra celleuttaks- og utløpsbrønnene (6 og 7). Cellekulturplaten ble så forseglet i henhold til CellASIC® ONIX Microfluidic Platform brukermanual (Merck, 2013). For påføring av cellene ble det først laget en cellekultur på $1-20 \times 10^6$ celler/ml. Løsningen ble så fjernet fra celleinntaksbrønn 8 og det ble overført cellekultur til brønnen (50 μ l). BHI (50 μ l) ble så overført til celleuttaksbrønn 6. Her var det viktig å dekke hele bunnen med væske. Cellekulturplaten ble igjen forseglet i henhold til CellASIC® ONIX Microfluidic Platform brukermanual (Merck, 2013). CellASIC® ONIX FG Software ble videre benyttet til å kontrollere eksperimentet etter anvisninger i brukermanualen for «Bacterial plate B04A». Det ble brukt 2 psi i 15 sek for å pumpe cellene inn i plata, etterfulgt av 4 psi i 15 sek fra brønn 6 og 8 for å fange cellene. Gjennomstrømningen av brønn 6 ble så satt til 1 psi i 30 sek for å rense celleinntakskanalen. Celletettheten ble videre observert i mikroskopet for å påse at påføringen var tilstrekkelig. Celler som ikke hadde blitt fanget opp i løpet av gjennomstrømningen ble fjernet ved å skylle en eller flere ganger med løsning fra innløpsbrønnene i 5 min ved 5 psi. Eksperimentet ble deretter satt opp med gjennomstrømning for brønn 1-5 satt til 2 psi. Cellene ble dyrket i BHI-medium med ulike antibiotikakonsentrasjoner i 5 timer, etterfulgt av ytterligere 3 timers dyrkning i antibiotikafritt BHI-medium.

4 Resultater

4.1 Identifisering av gener involvert i toleranse mot rifampicin i *S. aureus* ved seleksjon på agarskåler

Rifampicin er et antibiotikum som brukes i kombinasjonsterapier for å bekjempe *S. aureus*-infeksjoner. Rifampicin er mye studert og det er godt kjent hvilke gener som er involvert som target reseptor og som påvirker toleranse (avsnitt 1.2.3). For å undersøke om CRISPRi-depleksjonsbiblioteket kunne benyttes til å identifisere gener involvert i toleranse for antibiotika hos *S. aureus*, ble derfor rifampicin valgt i første omgang som et eksempel. Ettersom CRISPRi-depleksjonsbiblioteket ble benyttet, ble det her rettet fokus på å forsøke å identifisere gener hvor nedregulering ga økt resistens.

4.1.1 Bestemmelse av MIC for rifampicin for *S. aureus*

I første omgang ble det benyttet mikrotiterassay for å bestemme MIC for rifampicin for en kontrollstamme av *S. aureus* (sgRNA-kontroll). Kontrollstammen som ble brukt (AHF1010) bærer plasmidene pLOW-dcas9 og pVL2336-sgRNA (nontarget), hvor sistnevnte inneholder en sgRNA-sekvens som ikke har noe target i *S. aureus*-genomet. MIC ble funnet å være 0.008 µg/ml rifampicin.

For videre å bestemme egnet konsentrasjon til seleksjon av rifampicin-resistente mutanter på agarskål, ble det også laget TSB-agarplater med 5 µg/ml erytromycin, 10 µg/ml kloramfenikol (seleksjonsmarkører i CRISPRi plasmidene) inneholdende 0 MIC, 0.5 MIC, 1.0 MIC, 1.5 MIC og 2.0 MIC av rifampicin. På disse agarskålene ble 1/1000-fortynning av sgRNA-kontroll platet ut og dyrket overnatt ved 37°C. Etter et døgns inkubering hadde skålene med 0 MIC, 0.5 MIC og 1.0 MIC rifampicin vekst. Det ble ikke observert vekst ved 1.5 MIC, mens det ved 2.0 MIC rifampicin hadde vokst frem én koloni. 1.5 MIC (= 0.012 µg/ml) og 2.0 MIC (= 0.016 µg/ml) rifampicin ble derfor benyttet for seleksjon videre av rifampicinresistente *S. aureus*-stammer.

4.1.2 Seleksjon og verifisering av rifampicinresistente kolonier

Som vist skjematisk i Fig. 3.4 ble induisert (10 µM eller 250 µM IPTG) og ikke-indusert CRISPRi-bibliotek platet ut på skåler med 1.5 MIC eller 2.0 MIC rifampicin. Antall kolonier på skålene etter 24 timers inkubering er vist i Tabell 4.1.

Resultater

Tabell 4.1. Oversikt over antall kolonier på agarplatene etter et døgn inkubering med 1.5 og 2.0 MIC av rifampicin tilsatt induisert (10 μ M eller 250 μ M IPTG) eller uindusert CRISPRi-bibliotek.

| MIC | Antall kolonier | | |
|-----|-----------------|-----------------|------------------|
| | 0 μ M IPTG | 10 μ M IPTG | 250 μ M IPTG |
| 1.5 | >100 | >100 | >100 |
| 2.0 | 3 | 2 | 0 ^a |

^a Agarplaten tilsatt 1.5 MIC av rifampicin og 250 μ M IPTG ble inkubert i ytterligere ett døgn, hvilket førte til vekst av både gule og hvite kolonier etter 48 t.

For å verifisere at koloniene hadde økt resistens for rifampicin ble koloniene plukket og dyrket over natt ved 37°C og risting i medium uten rifampicin, og deretter ble enkeltkoloniene testet for økt resistens. MIC ble bestemt for samme stamme med og uten induksjon med IPTG, og økt resistens som følge av gennedregulering bør da vise seg som økning i MIC etter induksjon. Resultatene vises i Tabell 4.2 for kolonier plukket fra 1.5 MIC og 2.0 MIC av rifampicin.

Tabell 4.2. Resultater fra MIC-assay av kolonier fra skåler med 1.5 og 2.0 MIC av rifampicin, dyrket over natt i BHI-medium, etterfulgt av dyrking over natt i mikrotiterplate med rifampicin (0 μ g/ml – 0.5 μ g/ml rifampicin) +/- 250 μ M IPTG.

| Koloni | Opphav (fra skål) | MIC (μ g/ml) | |
|--------|--------------------------------------|--------------------|-------------|
| | | + 250 μ M IPTG | - IPTG |
| R1 | 1.5 MIC rifampicin, -IPTG | 0.004-0.008 | 0.002-0.004 |
| R2 | 1.5 MIC rifampicin, -IPTG | >0.5 | >0.5 |
| R3 | 1.5 MIC rifampicin, -IPTG | 0.002 | 0.002 |
| R4 | 1.5 MIC rifampicin, 10 μ M IPTG | 0.03-0.06 | 0.03-0.06 |
| R5 | 2.0 MIC rifampicin, -IPTG | 0.06 | 0.06 |
| R6 | 2.0 MIC rifampicin, -IPTG | >0.5 | >0.5 |
| R7 | 2.0 MIC rifampicin, -IPTG | >0.5 | >0.5 |
| R8 | 2.0 MIC rifampicin, 10 μ M IPTG | 0.002 | 0.002 |
| R9 | 2.0 MIC rifampicin, 10 μ M IPTG | 0.03-0.06 | 0.03-0.06 |
| R10 | 2.0 MIC rifampicin, 250 μ M IPTG | 0.002 | 0.002-0.004 |
| R11 | 2.0 MIC rifampicin, 250 μ M IPTG | 0.002 | 0.002 |

For kolonier plukket fra skål med 1.5 MIC av rifampicin viser Tabell 4.2 at det ikke var noen forskjell i MIC med og uten IPTG-induksjon for noen av koloniene, bortsett fra koloni R1 som viser en 2-folds økning. Koloni R2, R6 og R7 ble ikke hemmet av rifampicin ved de høyeste konsentrasjonene som ble testet.

Sammenligner man resultatene fra Tabell 4.2 med MIC for rifampicin for kontrollstammen (0.008 μ g/ml), ser man også at koloni R2, R4, R5, R6, R7 og R9 viser høyere MIC enn kontrollen både med og uten induksjon med IPTG. Dette kan tyde på at det er andre faktorer enn CRISPRi-systemet som er ansvarlig for resistensen.

4.1.3 Identifisering og sekvensering av sgRNA-targetgen og *rpoB* for stammer med økt resistens mot rifampicin

For å identifisere hvilket gen som var target for CRISPRi-systemet i stammene med økt MIC for rifampicin, ble det isolert plasmid og sgRNA ble sekvensert. Siden noen av koloniene ga stor økning i resistens både med og uten induksjon, ble det også mistenkt at dette, i stedet for CRISPRi-nedreguleringen, kunne skyldes mutasjoner i *rpoB*-genet som er kjent å være ansvarlig for rifampicin-resistens. *rpoB*-genet på ca. 3 kb ble derfor sekvensert. Resultatene fra sekvenseringen av *rpoB* og sgRNA er vist i Tabell 4.3.

Tabell 4.3. Sekvenseringsresultat av sgRNA og *rpoB*, samt relative MIC-verdier for disse stammene.

| Koloni | sgRNA | <i>rpoB</i> (Nukleotidsubstitusjon. Aminosyresubstitusjon) | MIC fold endring ^a |
|--------|--|--|-------------------------------|
| R2 | SAOUHSC_02461. MerR familie transkripsjonell regulator | C1441T. H481Y | >63 |
| R4 | SAOUHSC_02435. Hypotetisk protein, <i>sfnaA</i> | T1397C. L466S | 6 |
| R5 | SAOUHSC_01141. Putativ cysteine ligase <i>BshC</i> | Ingen mutasjoner | 7.5 |
| R6 | SAOUHSC_00351. Hypotetisk protein | Ingen mutasjoner | >63 |
| R7 | SAOUHSC_01044. Hypotetisk protein | C1441G. H481D | >63 |
| R9 | SAOUHSC_02798. Hypotetisk protein, <i>sasG</i> | C1413A. D471E | 6 |

^a Bestemt som MIC(mutant)/MIC(kontroll). Rifampicin MIC for kontrollstammen *S. aureus* NCTC8325-4 var 0.008 µg/ml.

Man kan se av Tabell 4.3 at flesteparten av koloniene hadde mutasjon i *rpoB*-genet, og resistensen skyldes i disse tilfellene derfor trolig dette i stedet for CRISPRi-nedreguleringen.

Koloniene som ikke hadde mutasjon i *rpoB* (koloni R5 og R6) hadde en MIC-økning for rifampicin på hhv. 7.5-fold og >63-fold sammenlignet med kontrollen (Tabell 4.3). For disse stammene var det ingen forskjell med og uten induksjon av CRISPRi-systemet, og det er trolig at den store økningen i MIC skyldes mutasjoner i kromosomet som ikke ble sekvensert. Etersom kromosomale mutasjoner som gir rifampicinresistens (eksempelvis i *rpoB*) viste seg å raskt oppstå ved framgangsmåten benyttet her, er det vanskelig å bruke CRISPRi-systemet for å identifisere gener involvert i toleranse for dette antibiotikumet. Det ble derfor valgt å ikke studere rifampicin videre i disse forsøkene, og heller studere et antibiotikum hvor ikke spontanresistente mutasjoner oppstår på denne måten.

4.2 *S. aureus* er sensitiv for dalbavancin

Dalbavancin er et antibiotikum som benyttes i behandlingen av *S. aureus*-infeksjoner ved å hindre cellevegg syntesen hos Gram-positive bakterier (Chaudhry, 2015, McCurdy et al., 2015). Dalbavancin er et lipoglykopeptid som dermed har egenskaper felles med glykopeptider som vancomycin og andre lipo(glyko)peptider som teicoplanin og daptomycin. Sammenlignet med

Resultater

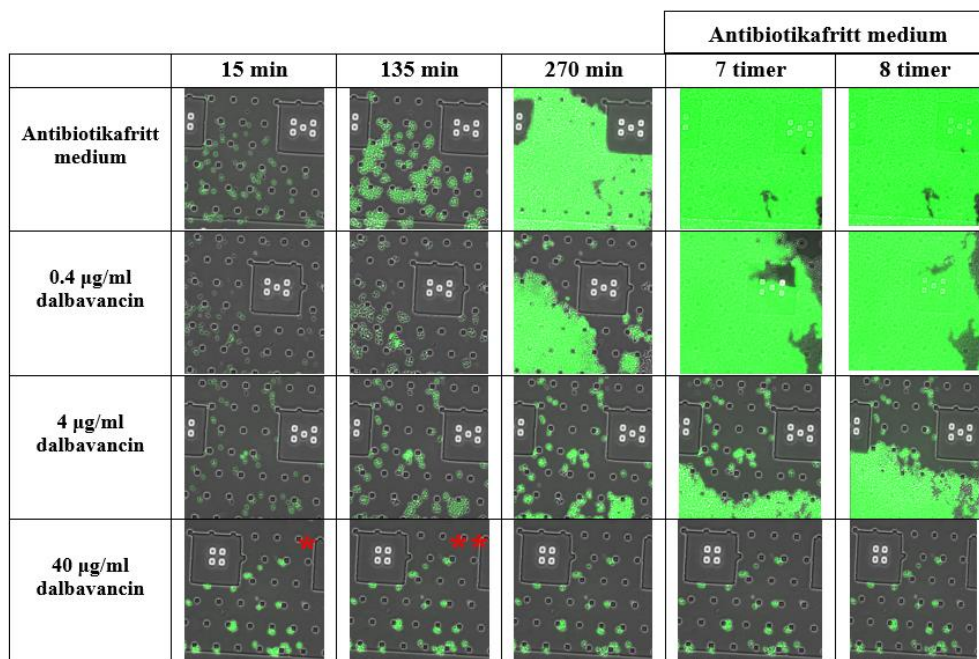
disse antibiotikaene er derimot ikke dalbavancin like godt studert, og ble derfor valgt i det videre arbeidet.

4.2.1 Bestemmelse av MIC for dalbavancin for *S. aureus*

I første omgang ble det benyttet mikrotiterassay for å bestemme MIC for dalbavancin for *S. aureus* kontrollstammen AHF1010 (pLOW-dcas9 og pVL2336-sgRNA(nontarget)). MIC for *S. aureus* kontrollstammen ble bestemt å være 0.06 µg/ml dalbavancin.

4.2.2 Time-lapse-mikroskopering av *S. aureus* NCTC8325-4 tilsatt dalbavancin

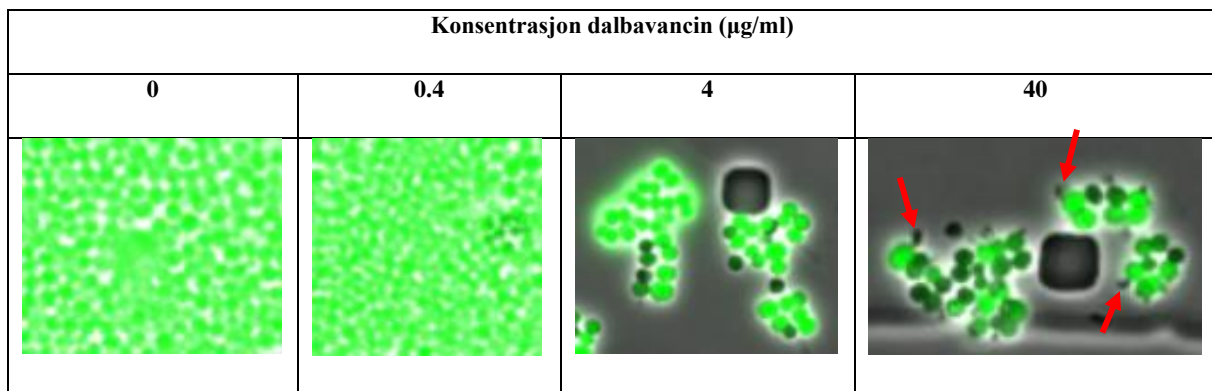
Ettersom dalbavancin er relativt lite studert, ble det først undersøkt hvordan vekst og fenotype hos *S. aureus* NCTC8325-4 påvirkes av økende konsentrasjoner av dalbavancin på enkeltcellenivå ved hjelp av microfluidics time-lapse-mikroskopi. En GFP-positiv variant av *S. aureus* NCTC8325-4 (labsamling) ble benyttet i dette forsøket, hvor bakterien ble dyrket i BHI-medium med ulike antibiotikakonsentrasjoner (0 MIC, 1 MIC, 10 MIC og 100 MIC av dalbavancin) i 5 timer, etterfulgt av ytterligere 3 timers dyrkning i antibiotikafritt BHI-medium. Denne siste inkuberingen ble gjort for å observere hvorvidt høye konsentrasjoner av dalbavancin hadde tatt livet av *S. aureus*-cellene eller om de ville vokse igjen når dalbavancin ble fjernet fra mediet. Det ble benyttet en MIC for dalbavancin på 0.4 µg/ml grunnet variasjoner i MIC-verdier for *S. aureus* kontrollstammen. Årsakene til de ulike MIC-verdiene er diskutert i avsnitt 5.2. Resultatet av time-lapse-mikroskoperingen er vist i Figur 4.1.



Figur 4.1 Time-lapse-mikroskopi av *S. aureus* NCTC8325-4 med og uten dalbavancin. *S. aureus* tilsatt dalbavancin (0 – 40 µg/ml) etter 15 min, 135 min, 270 min, 7 timer og 8 timers inkubering (siste 3 timer i antibiotikafritt medium). Cellene ble dyrket i BHI-medium og farget grønne med GreenDye fluorescens. *90 min inkubering, **210 min inkubering.

Resultater

Figur 4.1 viser, som ventet, at det var raskest og mest vekst hos cellene uten tilsatt antibiotika. For cellene tilsatt 0.4 µg/ml dalbavancin (1 MIC) kunne man observere en marginalt redusert vekst sammenlignet med kontrollen uten tilsatt antibiotika. Cellene hadde fremdeles vekst etter bytte til antibiotikafritt medium. For cellene tilsatt 4 µg/ml dalbavancin (10 MIC) kunne man observere redusert vekst i forhold til 0 MIC og 1 MIC dalbavancin. Etter bytte til antibiotikafritt medium ble det fremdeles observert vekst hos cellene. For cellene tilsatt 40 µg/ml dalbavancin (100 MIC) ble det ikke observert vekst hverken før eller etter bytte til antibiotikafritt medium. Videre viser Figur 4.2 et utsnitt av bakteriecellene etter 270 min inkubering med dalbavancin.



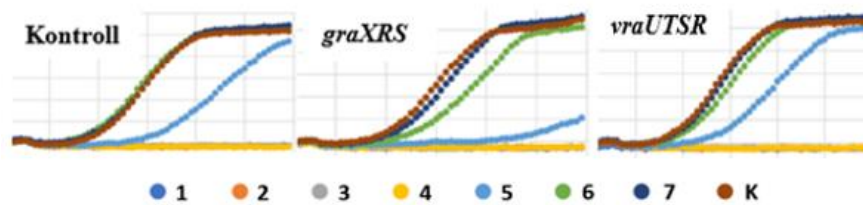
Figur 4.2 Et utsnitt av bakteriecellene etter 270 min inkubering med dalbavancin. Unormale celler er merket med rød pil.

Figur 4.2 viser at det både ved 4 µg/ml og 40 µg/ml dalbavancin ble observert variasjon i cellestørrelse. I tillegg hadde noen av cellene dyrket med 40 µg/ml lysert eller antatt en unormal celleform, og enkelte av disse er merket med rød pil. Årsakene til at relativt høye dalbavancinkonsentrasjoner var nødvendig for å hemme veksten er diskutert i avsnitt 5.2.

4.3 Involvering av ulike to-komponentsystemer i toleranse mot dalbavancin

Flere to-komponentsystemer er kjent for å påvirke toleransen for glykopeptider i *S. aureus*. Dette gjelder *graXRS*, *walRK* og *vraUTSR* (se avsnitt 1.3.4.2 og 1.3.4.3). Det ble derfor antatt at disse kunne påvirke sensitiviteten mot dalbavancin. For å undersøke to-komponentsystemenes rolle innen toleranse mot dalbavancin samt studere hvorvidt CRISPRi-systemet kan fungere for å studere gener involvert i dalbavancintoleranse (før hele CRISPRi-biblioteket ble benyttet), ble det tillaget CRISPRi-stammer for de 16 ulike to-komponentsystemene som finnes hos *S. aureus*. MIC av dalbavancin ble bestemt med og uten induksjon med IPTG for å avgjøre hvorvidt deplasjon av de ulike to-komponentsystemene endret sensitiviteten for dalbavancin. Eksempler på vekstkurver fra mikrotiterassayet er vist i Figur 4.3.

Resultater



Figur 4.3 Vekstkurver ved deplasjon av to-komponentsystemene *graXRS* og *vraUTSR* i *S. aureus* NCTC8325-4 tilsatt 250 µM IPTG. Konsentrasjonen av dalbavancin er to-folds fortynnet fra brønn 1-7. Brønn K er kontroll uten tilsatt antibiotika.

Tabell 4.4 gir en oversikt over den relative MIC for dalbavancin for de ulike to-komponentsystemene (samt tilhørende kontroller) +/- 250 µM IPTG.

Tabell 4.4 Relativ endring i MIC for dalbavancin ved deplasjon av ulike to-komponentsystemer i *S. aureus* NCTC8325-4 +/- 250 µM IPTG.

| To-komponentsystem | MIC-fold endring ^a |
|--------------------|-------------------------------|
| Kontroll | 1 |
| <i>walRK</i> | 0.5 |
| <i>nsaR</i> | 1 |
| <i>nreBC</i> | 1 |
| <i>agrA</i> | 0.66 |
| <i>airS</i> | 1 |
| <i>saeQRS</i> | 1 |
| <i>hssRS</i> | 0.75 |
| <i>kdpD</i> | 0.75 |
| <i>lytSR</i> | 1 |
| <i>arIR</i> | 1 |
| <i>htpASR</i> | 1 |
| <i>graXRS</i> | 0.75 |
| <i>vraUTSR</i> | 1 |
| MW1206-9 | 1 |
| <i>phoP</i> | 1 |
| <i>srrA</i> | 1 |

^a MIC fold endring ble definert som MIC(indusert)/MIC(uindusert). Relativ MIC > 1 vil derfor bety økning i resistens som følge av CRISPRi-induksjon, mens relativ MIC < 1 betyr at stammen ble mer resistent etter induksjon med IPTG.

Deplasjon av to-komponentsystemene *graXRS* og *walRK* ga en økning i sensitivitet sammenlignet med uindusert prøve. I tillegg ble det også observert noe økt sensitivitet mot dalbavancin ved nedregulering av *hssRS*, *kdpD* og *agrA*. De resterende to-komponentsystemene viste ikke tegn til forandring i toleranse for dalbavancin, inkludert *vraUTSR*. Disse forsøkene indikerer at CRISPRi-systemet kan brukes for å studere og identifisere gener involvert i dalbavancintoleranse, selv om CRISPRi-induksjon ga beskjeden økning i sensitivitet. I tillegg ser man at det også er mulighet for falske negative resultater, ettersom det i utgangspunktet var ventet å finne forskjeller for *vraUTSR*.

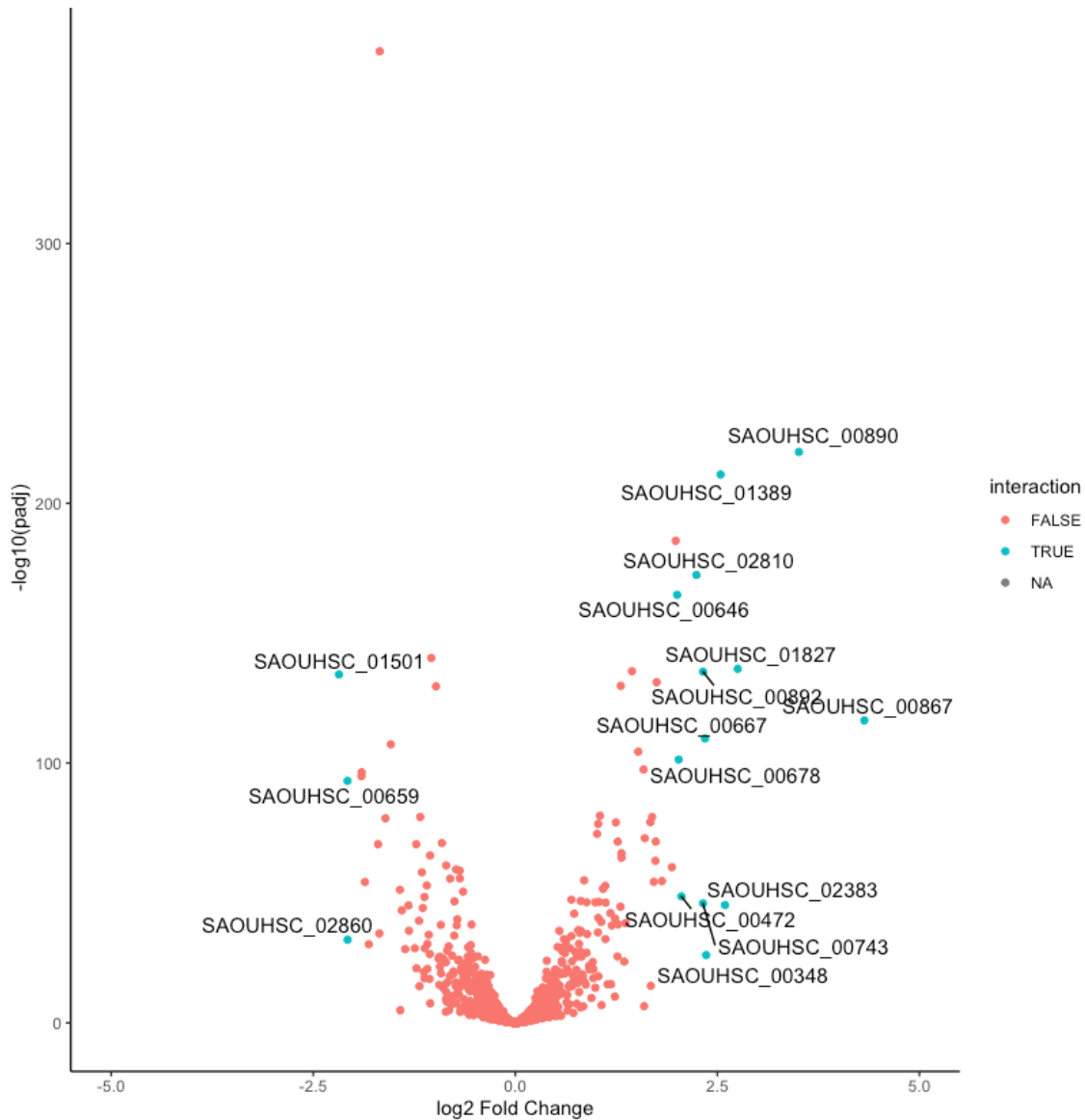
4.4 Genomskala-forsøk for å identifisere gener som er involvert i toleranse mot dalbavancin i *S. aureus*

4.4.1 CRISPRi-sek for bestemmelse av over-, - og underrepresenterte gener i CRISPRi-biblioteket etter dalbavancinbehandling

Med det samlede *S. aureus* CRISPRi-biblioteket (avsnitt 3.12.1) kan knockdown av alle genene i *S. aureus* studeres i samme forsøk. For å få en oversikt over hvilke gener som påvirker hvordan *S. aureus* overlever i tilstedeværelse av dalbavancin (fitness), og identifisere gener som ved depleksjon påvirket sensitiviteten for dalbavancin, ble sekvensering av CRISPRi-biblioteket benyttet (CRISPRi-sek). Som beskrevet i avsnitt 3.12.3 ble det induerte CRISPRi-depleksjonsbiblioteket dyrket med og uten subletale konsentrasjoner av dalbavancin for å bestemme hvordan eksponering for dalbavancin påvirket forekomsten av sgRNA-konstruktene i populasjonen. Fremgangsmåten er skjematisk fremstilt i Figur 3.5.

Etter sekvensering av CRISPRi-bibliotekene ble log(2)-fold change (kontroll/dalbavancin) (forkortet log₂FC) for hvert sgRNA bestemt. Hvert sgRNA tilsvarer et gen/operon. En negativ log₂FC tydet på at depleksjon av sgRNA-targetgenet gjorde cellen mer motstandsdyktig mot dalbavancin, og omvendt ville det observeres en positiv log₂FC dersom depleksjon av sgRNA-targetgenet gjorde cellen mindre motstandsdyktig mot dalbavancin. Figur 4.4 viser et vulkanplott over log₂FC for alle genene i *S. aureus* plottet mot p-verdien (log₁₀(P_{adjusted})).

Resultater



Figur 4.4 Vulkanplott av CRISPRi-sek resultatene. Hver sgRNA representeres av en prikk. Log2FC (kontroll/dalbavancin) er plottet mot sannsynlighet. Gener med $\log_2\text{FC} > 2$ eller < -2 og $\text{Padjusted} < 0.05$ er markert i turkis, og disse ble regnet som signifikant forskjellige. Figuren ble laget av Xue Liu, Universitetet i Lausanne.

Tabell 4.5 viser en oversikt over de 15 genene med høyest log2FC, det vil si de genene som var mest underrepresentert etter dalbavancinbehandling (hvor depleksjon av sgRNA-targetgen ga dårligere vekst med dalbavancin).

Resultater

Tabell 4.5 De 15 gener med høyest log₂FC (kontroll/dalbavancin)>2 fra CRISPRi-sek.

| Lokus tag | Gennavn | Antatt funksjon | log ₂ FC (kontroll/dalb- avancin) | MIC fold endring ^a |
|---------------|--------------|--|--|----------------------------------|
| SAOUHSC_00867 | - | hypotetisk protein | 4.3 | 1 |
| SAOUHSC_00890 | <i>kapB</i> | kinase-assosiert protein B | 3.5 | 0.5 |
| SAOUHSC_00052 | <i>csa1A</i> | <i>staphylococcus</i> tandem lipoproteiner familie protein | 2.9 | 1 |
| SAOUHSC_01827 | <i>ezaA</i> | regulator av septumringdannelse | 2.7 | 0.5 |
| SAOUHSC_02383 | - | EVE domene-inneholdende protein | 2.6 | 0.75 |
| SAOUHSC_01389 | <i>pstS</i> | putative fosfat ABC-transporter | 2.5 | 1 |
| SAOUHSC_00348 | <i>rpsF</i> | 30S ribosomalt protein S6 | 2.3 | 1.25 |
| SAOUHSC_00667 | <i>vraF</i> | ABC-transporter ATP-bindende protein | 2.3 | 0.75 |
| SAOUHSC_00892 | - | RNA-bindende S1 domene-inneholdende protein | 2.3 | Ikke testet |
| SAOUHSC_00743 | <i>nrdF</i> | ribonukleotid-difosfat delenhet beta reduktase | 2.3 | 0.5 |
| SAOUHSC_02810 | - | MerR familie transkripsjonsregulator | 2.2 | 1 |
| SAOUHSC_00472 | <i>prs</i> | ribose-fosfat pyrofosfokinase | 2.1 | 0.75 |
| SAOUHSC_00678 | - | putativ DUF402-inneholdende protein | 2.1 | Ikke testet |
| SAOUHSC_00646 | <i>pbp4</i> | penicillin-bindende protein 4 | 2.1 | 0.75 |
| SAOUHSC_02447 | - | hypotetisk protein | 2.0 | 0.75 |

^a MIC fold endring ble definert som MIC(indusert)/MIC(uindusert). Relativ MIC > 1 vil derfor bety økning i resistens som følge av CRISPRi-induksjon, mens relativ MIC < 1 betyr at stammen ble mer resistent etter induksjon med IPTG.

Videre viser Tabell 4.6 en oversikt over de 3 genene med lavest log₂FC etter dalbavancinbehandlingen (hvor depleksjon av sgRNA-targetgen ga bedre vekst med dalbavancin).

Tabell 4.6 De 3 genene med lavest log₂FC(kontroll/dalbavancin)<-2 fra CRISPRi-sek.

| Lokus tag | Gennavn | Antatt funksjon | MIC fold endring ^a |
|---------------|-------------|--------------------------|----------------------------------|
| SAOUHSC_01501 | <i>ebpS</i> | elastin-bindende protein | -2.1 |
| SAOUHSC_00659 | - | hypotetisk protein | -2.1 |
| SAOUHSC_02860 | <i>mvaS</i> | HMG-CoA syntase | -2.1 |

^a MIC fold endring ble definert som MIC(indusert)/MIC(uindusert). Relativ MIC > 1 vil derfor bety økning i resistens som følge av CRISPRi-induksjon, mens relativ MIC < 1 betyr at stammen ble mer resistent etter induksjon med IPTG.

4.4.2 Verifisering av gener involvert i dalbavancintoleranse

For å forsøke å verifisere resultatene i Tabell 4.5 over, ble det laget CRISPRi-depleksjonsstammer for 13 av de 15 mest underrepresenterte genene etter dalbavancinbehandling. Det ble benyttet mikrotiterassay for å bestemme MIC for dalbavancin for de ulike konstruktene. Resultatet er vist som MIC fold endring i Tabell 4.5.

Resultater

Dersom CRISPRi-sek resultatene skulle bekreftes, ville det forventes en redusert MIC etter CRISPRi-induksjon (MIC fold change < 1). Tabell 4.5 (høyre kolonne) viser at størst økning i sensitivitet ble observert ved depleksjon av *kapB*, *ezrA* og *nrdF*, som ga en halvering av MIC-verdien. En mindre reduksjon i MIC ble også observert for *vraF*, *pbp4*, *prs*, SAOUHSC_02383 og SAOUHSC_02447. For de resterende fem stammene kunne vi ikke verifisere at depleksjon endret toleransen for dalbavancin. Genene med negativ fold endring i CRISPRi-sek ble ikke studert videre i denne omgang.

4.4.3 *kapB* koder for et lipopeptid som påvirker dalbavancinsensitiviteten

Som diskutert senere (avsnitt 5.4) er flere av genene over allerede kjent for å være involvert i toleranse for glykopeptider og lipoglykopeptider. Dette gjelder *ezrA*, *vraF*, *pbp4* og SAOUHSC_00678. Det er derfor ikke overraskende at disse kommer på listen over gener med høyest log₂FC, og dette tyder på at CRISPRi-sek fungerte for å identifisere gener involvert i toleranse for dalbavancin. På grunn av dette er også genene som *kapB* og *nrdF* interessante nye dalbavancintoleransegener. *nrdF* er en ribonukleotid-difosfat reduktase trolig involvert i syntese av pyrimidiner. *kapB* (for kinase assosiert protein B) er et gen som ikke er studert i *S. aureus* tidligere, men basert på homologi med *Bacillus subtilis kapB* koder det for et lipoprotein involvert i endosporedannelse (Dartois et al., 1997). Vi var interessert i å verifisere dette genet videre. *kapB* ble derfor deletert fra genomet til *S. aureus* NCTC8325-4 ved bruk av en temperatursensitiv pMAD delesjonsvektor. I den endelige stammen er *kapB*-genet erstattet med en spektinomycin-resistenskassett ($\Delta kapB::spc$). Vi testet også denne stammen for dalbavancinsensitivitet, og oppdaget at delesjon av *kapB* gjorde cellen en to-fold mer sensitiv for dalbavancin sammenlignet med villtype-kontrollstammen. Dette bekrefter at vi har identifisert et hittil ukjent gen som er involvert i toleranse for lipoglykopeptidet dalbavancin. Forsøket ble gjort i samarbeid med Maria Heggenhougen.

4.5 Seleksjon av dalbavancinresistente stammer på agarskål

CRISPRi-sek ble vist å fungere for å identifisere gener involvert i dalbavancintoleranse. Vi ønsket også å finne ut om en mer direkte seleksjonsmetode kunne fungere for å identifisere dalbavancinresistente mutanter fra CRISPRi-biblioteket, på samme måte som forsøkt for rifampicin tidligere (avsnitt 4.1). Som beskrevet i avsnitt 3.12.4 ble derfor CRISPRi-depleksjonsbiblioteket dyrket over natt (med og uten IPTG) og sådd ut på skåler med ulike konsentrasjoner av dalbavancin og IPTG for induksjon. Forsøksoppsettet for seleksjon av

Resultater

dalbavancinresistente stammer illustreres i Figur 3.6, og her finnes også oversikt over agarskålene som ble benyttet.

Etter inkubering var det overraskende nok svært god vekst (>300 kolonier) på alle skålene med 0-5 MIC av dalbavancin, som tydet på at det ikke var noe seleksjon for dalbavancinresistens i disse skålene. Årsakene til disse konsentrasjonsforskjellene er diskutert under. Oversikt over antall kolonier på skålene med 10 MIC dalbavancin er vist i Tabell 4.7.

Tabell 4.7 Oversikt over antall kolonier på agarplatene etter et døgns inkubering med 10 MIC av dalbavancin tilsatt induisert (250 μ M IPTG), ikke-indusert eller predyrket (250 μ M IPTG) CRISPRi-bibliotek.

| Opphav (fra skål) | Antall kolonier |
|---|-----------------|
| 10 MIC dalbavancin - IPTG | 4 |
| 10 MIC dalbavancin + 250 μ M IPTG | 7 |
| 10 MIC dalbavancin + 250 μ M IPTG predyrket | >300 |

For å verifisere at koloniene hadde økt resistens for dalbavancin samt finne ut hvilket sgRNA de inneholder, ble koloniene plukket og dyrket over natt ved 37°C og risting i medium uten dalbavancin. Deretter ble enkeltkoloniene testet for økt resistens og plasmider ble isolert for sekvensering av sgRNA. Av de ti koloniene som ble plukket, hadde 5 den forventede høyere toleranse for dalbavancin enn kontrollen (data ikke vist).

Det problematiske oppstod imidlertid da plasmidene ble sekvensert for å bestemme hvilket sgRNA koloniene inneholdt. Sekvenseringsresultatene var ikke vellykket eller ga doble sekvenser i kromatogrammet for de fleste av koloniene. Dette kunne tyde på at koloniene som ble plukket ikke var enkeltkolonier. Koloniene som ga økt resistens (D1, D3, D6, D7 og D10) ble derfor renstrøket. Deretter ble det plukket 2 kolonier fra hver renstryking, disse ble dyrket over natt og sensitiviteten for dalbavancin ble igjen testet ved bruk av mikrotiterassay og sgRNA-plasmidet ble sekvensert igjen. Resultatet fra mikrotiterassay og sekvensering er vist i Tabell 4.8.

Resultater

Tabell 4.8 MIC for dalbavancin før og etter renstryking av kolonier plukket fra skåler med 10 MIC dalbavancin, hvor MIC ble bestemt ved bruk av mikrotiterassay. MIC før renstryking ble gjentatt 2 ganger og MIC etter renstryking ble gjentatt 3 ganger. Sekvenseringsresultatene av koloniene er etter renstryking.

| Koloni | Sekvenseringsresultat | MIC fold endring ^a Etter renstryk |
|----------|---|---|
| Kontroll | | 1 |
| D1.1 | SAOUHSC_02914. Hypotetisk protein | 1 |
| D1.2 | Dårlig sekvenseringsresultat | 1 |
| D3.1 | Dårlig sekvenseringsresultat | 1 |
| D3.2 | SAOUHSC_02409. Arginase, <i>rocF</i> | 0.75 |
| D6.1 | SAOUHSC_02658 | 0.5 |
| D6.2 | SAOUHSC_02658 | 0.5 |
| D7.1 | SAOUHSC_01372. Tryptofan syntase subenhet alfa, <i>trpA</i> | 0.75 |
| D7.2 | Dårlig sekvenseringsresultat | 1 |
| D10.1 | SAOUHSC_00220. 2-C-metyl-D-erythritol 4-fosfat cytidyltransferase, <i>tarI'</i> | 1 |
| D10.2 | SAOUHSC_00220. 2-C-metyl-D-erythritol 4-fosfat cytidyltransferase, <i>tarI'</i> | 1 |

^a MIC fold endring er definert som MIC(genX)/MIC(kontroll). Både gen-spesifikk og kontrollstamme ble induert med 250 µM IPTG.

Tabell 4.8 viser at sekvenseringen fremdeles ikke var vellykket for alle koloniene (eg. D1.2 og D1.3), men for minst én representant fra hver koloni. Overraskende, hadde de fleste koloniene omtrentlig samme MIC for dalbavancin som kontrollen.

Ingen av koloniene ved renstryking viste økt resistens mot dalbavancin sammenlignet med kontrollen. Identifisering av gener som ga stabilt, økt toleranse for dalbavancin ved CRISPRi-knockdown var altså ingen suksess med denne fremgangsmåten. I stedet tyder det på at det ikke har skjedd noen seleksjon for stammer med økt toleranse i forsøket, og det ble overraskende nok identifisert et gen, SAOUHSC_02658, som ga halvert MIC ved nedregulering.

4.5.1 SAOUHSC_02658 påvirker sensitivitet mot dalbavancin i to av tre ulike *S. aureus*-stammer

Som vist i Tabell 4.8, ble det altså identifisert et gen som ga økt sensitivitet for dalbavancin ved depleksjon (koloni D6.1 og D6.2). Dette var motsatt av hva som i utgangspunktet var forventet av screeningen. SAOUHSC_02658-genet koder for et hypotetisk protein, muligens for et transporter-protein (ATP-bindende kassett-transporter, ABC-transporter) (AureoWiki). Det ble bestemt å følge opp genet ytterligere for å undersøke hvorvidt depleksjonen ga økt sensitivitet også i andre stammer.

For videre oppfølging av SAOUHSC_02658 ble CRISPRi-stammer laget i tre ulike *S. aureus*-stammer: NCTC8325-4, Newman og COL MRSA. Målet var å undersøke hvorvidt man ved depleksjon av genet også i andre stammer enn NCTC8325-4 ville se økt sensitivitet for dalbavancin. Resultatet er vist i Tabell 4.9. Her vises også resultater fra tilsvarende kontroller.

Resultater

Tabell 4.9 MIC for dalbavancin i stammene NCTC8325-4, Newman og COL MRSA med nedregulert SAOUHSC_02658.

| Stamme | MIC fold endring ^a |
|--------------------------|-------------------------------|
| NCTC8325-4 (sgRNA(2658)) | 0.75 |
| Newman (sgRNA(2658)) | 0.5 |
| COL MRSA (sgRNA(2658)) | 1 |

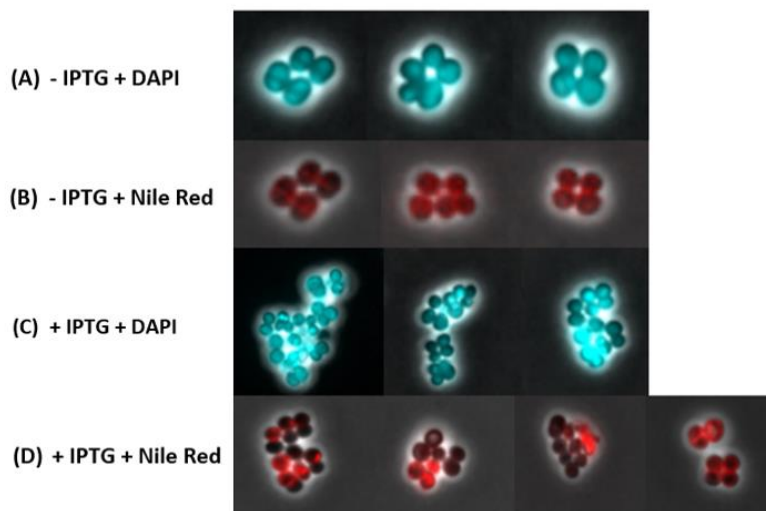
^a MIC fold endring er definert som MIC(genX)/MIC(kontroll). Både gen-spesifikk og kontrollstamme ble indusert med 250 μ M IPTG.

Tabell 4.9 viser at NCTC8325-4 og Newman med depletet SAOUHSC_02658 var noe mer sensitiv for dalbavancin enn tilhørende kontroller. For MRSA-stammen COL var det derimot ingen tydelige forskjeller mellom depleksjon-stammen og kontrollen.

Det ble også undersøkt hvorvidt nedregulering av SAOUHSC_02658 ga økt sensitivitet for vancomycin, et glykopeptid som ligner dalbavancin, men her ble det ikke funnet noen forskjeller mellom stammene.

4.5.2 SAOUHSC_02658 er viktig for korrekt celledeling i *S. aureus*

Nedregulering av SAOUHSC_02658 så ut til å gi marginalt økt sensitivitet for dalbavancin i *S. aureus*, men ingen forskjeller i sensitivitet for vancomycin. Ettersom SAOUHSC_02658 ikke har vært studert tidligere, valgte vi å følge opp denne noe videre og studere fenotypen for nedregulering av SAOUHSC_02658-genet ved mikroskopi. CRISPRi-knockdownstammen ble dyrket med og uten IPTG til OD₆₀₀ ~ 0.2. Cellene ble farget med DAPI og Nile Red, for å visualisere henholdsvis DNA og membranen ved fluorescensmikroskopi. Resultatene fra mikroskoperingen er vist i Figur 4.5.



Figur 4.5 Representative mikrografer av *S. aureus* NCTC8325-4 med eller uten nedregulering av det ukjente genet SAOUHSC_02658. Sammensatt fasekontrast og fluorescensbilder er vist. Stammen ble dyrket overnatt i BHI-medium (5 μ g/ml erytromycin, 10 μ g/ml kloramfenikol) +/- 250 μ M IPTG. Videre ble kulturen re-inokulert og dyrket til OD₆₀₀ ~0.2 før 1 ml celledkultur ble farget med DAPI (0.25 μ l) og Nile Red (0.25 μ l) for å visualisere henholdsvis DNA og membranen ved fluorescensmikroskopi. Fasekontrast (PC)-mikroskopi ble benyttet. (A) Ikke-indusert stamme, hvor DNA er visualisert med DAPI. (B) Ikke-indusert stamme, hvor cellemembranen er visualisert med Nile Red. (C) Induserte celler, hvor DNA er visualisert med DAPI. (D) Induserte celler, hvor cellemembranen er visualisert med Nile Red.

Resultater

Figur 4.5 viser at uinduserte celler, med liten eller ingen depleksjon av SAOUHSC_02658-genet (rad A og B), hadde celler med normal DAPI, - Nile Red-farging, morfologi og størrelse. Her kunne man observere typisk regulære klustere av *S. aureus*-celler. For cellene tilsatt IPTG, hvor SAOUHSC_02658-genet var depletet (rad C og D), ble det observert unormal DAPI- og Nile Red-farging, samt stor variasjon i cellestørrelse og størrelse på klustere. Disse resultatene tyder på at SAOUHSC_02658 er viktig for at *S. aureus* skal vokse og dele seg på korrekt måte, og videre studier vil kunne vise om dette genet har en funksjon direkte relatert til celledeling hos *S. aureus*.

4.6 Identifisering av gener involvert i toleranse mot dalbavancin ved seleksjon med mikrotiterassay

Seleksjon av resistente CRISPRi-mutanter på skål viste seg ikke å være noen suksess (avsnitt 4.5). Som en tredje fremgangsmåte for å bruke CRISPRi-biblioteket til å identifisere gener involvert i dalbavancintoleranse, ble det i denne omgangen benyttet mikrotiterassay med to-folds fortyninger av dalbavancin for å forsøke å selekere celler med økt toleranse fra CRISPRi-depleksjonsbiblioteket (avsnitt 3.12.5). Som vist skjematisk i Figur 3.7 ble CRISPRi-biblioteket og kontrollstammen for CRISPRi-biblioteket dyrket med en to-foldsfortynning av dalbavancin i et mikrotiterassay og kulturene ble inkubert i 36-48 timer. Etter mikrotiterassayet var det én ekstra brønn vekst for CRISPRi-depleksjonsbiblioteket (MIC = 0.12 µg/ml) sammenlignet med kontrollen (MIC = 0.06 µg/ml), noe som kan indikere økt resistens for enkelte av cellene i CRISPRi-depleksjonsbiblioteket. Kulturen fra brønnen med antatt resistente kolonier ble reinokulert i medium med dalbavancin (0.06 µg/ml) og deretter platet ut på TSB-agarplater uten seleksjon. Ti tilfeldige enkeltkolonier ble plukket og et nytt mikrotiterassay ble utført for å finne kolonier med økt resistens for dalbavancin. Her ble det observert at 8 av 10 kolonier ga økt resistens sammenlignet med kontrollen. For å bestemme sgRNA-targetgenet i disse 8 koloniene ble det isolert plasmid, og sgRNAet ble sekvensert. Resultatene vises i Tabell 4.10.

Resultater

Tabell 4.10 MIC fold endring for dalbavancin for kolonier med økt resistens for dalbavancin. MIC ble bestemt ved bruk av mikrotiterassay. Alle koloniene ble dyrket i BHI (5 µg/ml erytromycin og 10 µg/ml kloramfenikol) og 250 µM IPTG. Dalbavancin ble tilsatt (0 µg/ml – 4 µg/ml), og kulturene ble fortynnet 1:250. Mikrotiterplaten ble inkubert over natt ved 37°C.

| Koloni | MIC fold endring ^a | sgRNA, gennavn |
|--------|-------------------------------|-----------------------------|
| B1 | 3 | SAOUHSC_01895, <i>sagB</i> |
| B2 | 3 | SAOUHSC_01895, <i>sagB</i> |
| B3 | 2 | SAOUHSC_01895, <i>sagB</i> |
| B4 | 3 | SAOUHSC_01895, <i>sagB</i> |
| B5 | 2 | SAOUHSC_01482, <i>aroB</i> |
| B6 | 2 | SAOUHSC_01192, <i>vrfAB</i> |
| B7 | 4 | SAOUHSC_01895, <i>sagB</i> |
| B8 | 1 | Ikke aktuelt |
| B9 | 2 | SAOUHSC_01482, <i>aroB</i> |
| B10 | 1 | Ikke aktuelt |

^a MIC fold endring er definert som MIC(genX)/MIC(kontroll). Både gen-spesifikk og kontrollstamme ble indusert med 250 µM IPTG.

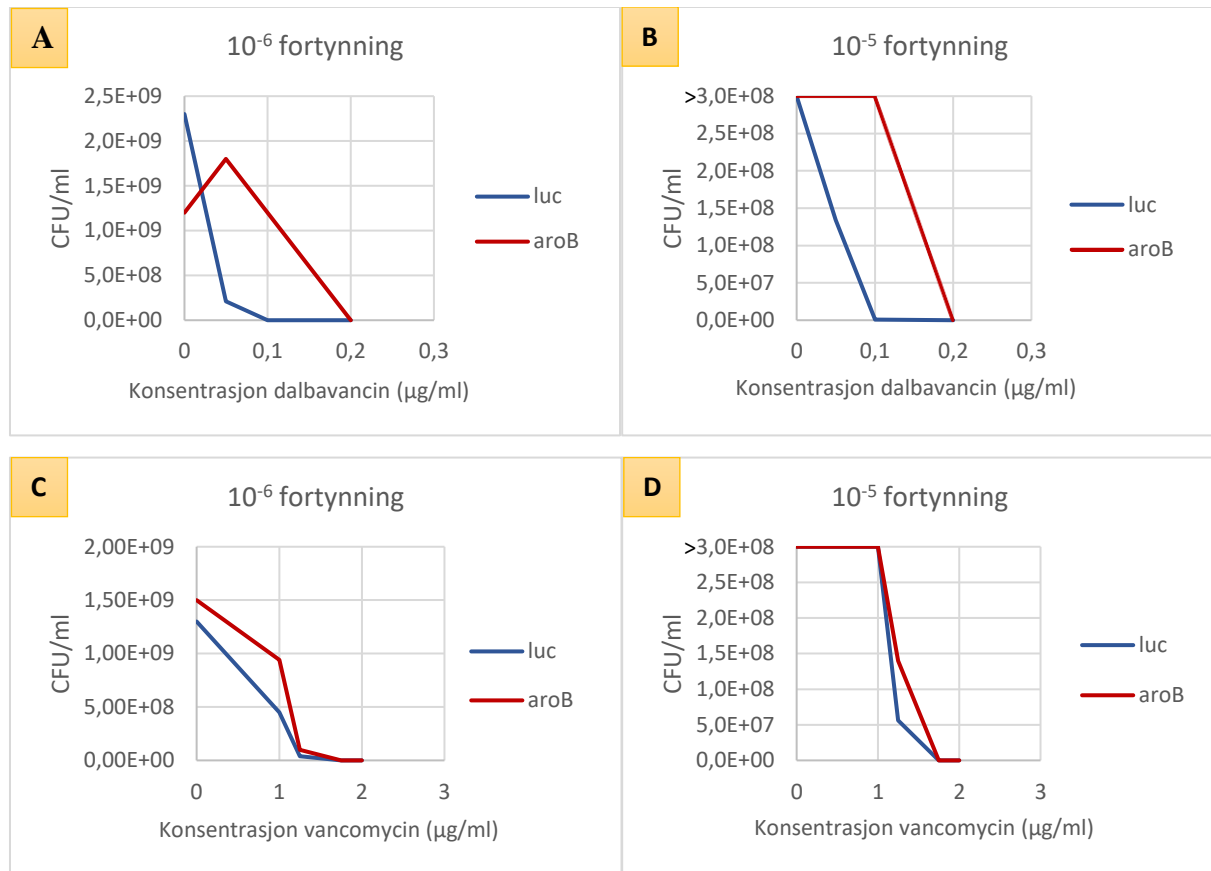
Tabell 4.10 viser at 8 av de 10 koloniene hadde en 2-4 fold høyere toleranse for dalbavancin sammenlignet med kontrollen. De fleste sgRNA hadde targetet i genet *sagB*, men også kolonier med targetet i *aroB* og operonet *vrfAB* ble identifisert. Det er fra tidligere kjent at delesjon av *sagB* bidrar til økt resistens mot vancomycin (Chan et al., 2016), og identifiseringen av dette genet tyder derfor på at framgangsmåten har fungert på en god måte. For å verifisere at økningen i dalbavancinresistens skyldtes depleksjon av *sagB*, og ikke andre endringer i genomet, ble det laget en sgRNA-depleksjonsstamme for *sagB* i *S. aureus* NCTC8325-4. Her ble det igjen vist at depleksjon av *sagB* ga en (tre-fold) økning i dalbavancintoleranse sammenlignet med kontrollen (data ikke vist). Ettersom mekanismen for SagB-mediert toleranse for glykopeptider allerede er karakterisert (se 1.3.4.5 og diskusjon), ble det heller bestemt å følge opp ett av de andre interessante treffene. *vrfAB*-operonet koder for et hypotetisk protein med likhet til Asp23/Gls24 familie envelope stressrespons-protein (UniProt), mens *aroB* koder for enzymet 3-dehydroquinate syntase som er en del av chorismate-biosyntesen. Videre i dette arbeidet ble det fokusert på *aroB*.

4.6.1 Populasjonsanalyseprofil viser at *aroB*-knockdown gir økt toleranse for dalbavancin

Ettersom *aroB*-depleksjonsstammen ble isolert fra et seleksjonsforsøk, er det mulig at det har oppstått sekundære mutasjoner i genomet. For videre oppfølging av genet *aroB* ble det derfor laget en ny CRISPRi-depleksjonsstamme av *aroB* i *S. aureus* NCTC8325-4 for å verifisere at økt resistens i *S. aureus*-stammen NCTC8325-4 sammenlignet med kontrollstammen (AHF1010) skyldtes deplettert *aroB* og ikke var et resultat av eventuelt andre endringer i genomet. I stedet for mikrotiterforsøk ble den såkalte populasjonsanalyseprofilen bestemt, der stammene ble dyrket over natt med IPTG før fortynning og utplating på BHI-agarskåler med

Resultater

IPTG og ulike konsentrasjoner av antibiotika. I tillegg til dalbavancin ble forsøket også utført med vancomycin for å undersøke om effekten var den samme for de to glykopeptidene. Populasjonsanalyseprofilene er vist i Figur 4.6.



Figur 4.6 Populasjonsanalyseprofiler av CRISPRi-depleksjonsstamme *aroB* og CRISPRi-kontrollstamme (*luc* = nontarget). Overnattkultur av konstruktene ble dyrket ved 37°C med 250 μM IPTG. Kulturene ble forfynnet (10^{-5} og 10^{-6}) og 100 μl ble platet ut på BHI-agarskåler med 250 μM IPTG for induksjon og med ulike konsentrasjoner av **A-B**: dalbavancin (0 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ og 0,2 $\mu\text{g/ml}$) eller **C-D**: vancomycin (0 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 1,75 $\mu\text{g/ml}$ og 2 $\mu\text{g/ml}$). Platene ble inkubert over natt ved 37°C. Deretter ble antall CFU/ml beregnet.

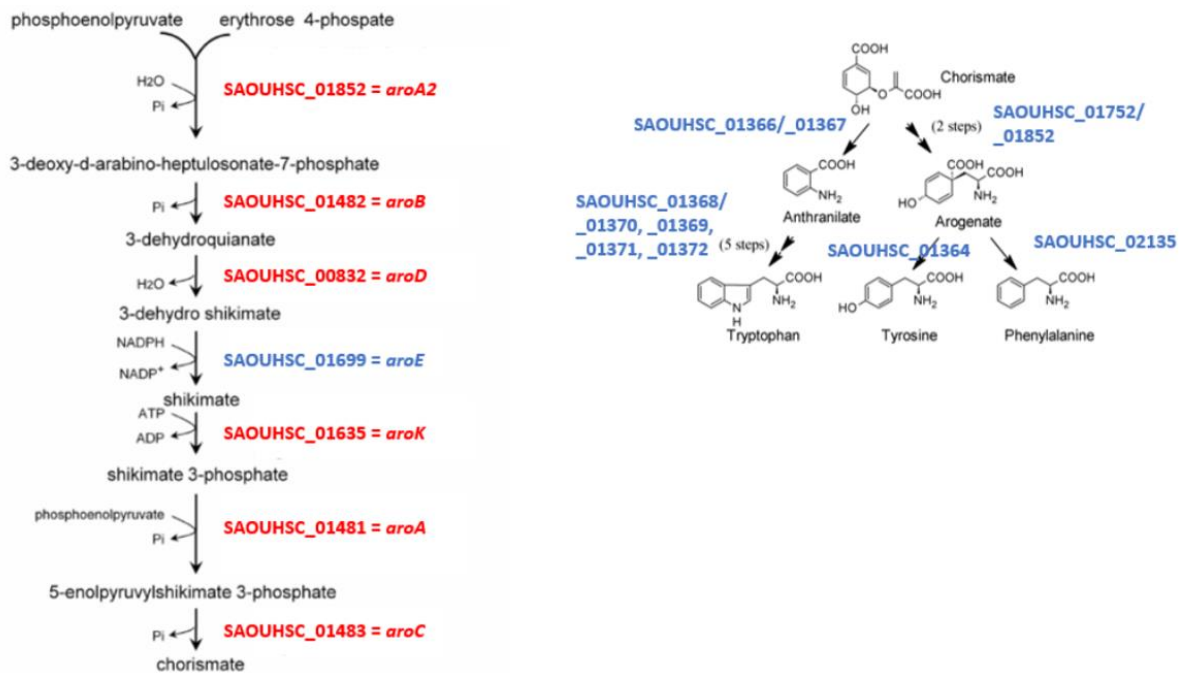
Figur 4.6 viser at depleksjon av *aroB* ga tydelig økt resistens mot dalbavancin (A-B) sammenlignet med kontrollen, ettersom kolonier var i stand til å vokse opp på skåler med høyere dalbavancinkonsentrasjon. Veksten var bare marginalt forskjellig mellom stammene når de ble dyrket på skåler med vancomycin (C-D), hvilket tyder på at nedregulering av *aroB* ikke gir økt vancomycinresistens.

4.6.2 Dalbavancintoleransen øker ved depleksjon av gener involvert i chorismatebiosyntese

I avsnitt 4.6.1 ble det observert at depleksjon av *aroB* økte cellens toleranse for dalbavancin. Ettersom dette genet spiller en sentral rolle i syntesen av aromatiske aminosyrer (Trp, Tyr, Phe) via intermedietet chorismate var det derfor interessant å undersøke hvorvidt andre gener i

Resultater

Samme syntesevei også hadde samme effekt. En skjematisk fremstilling av chorismate-synteseveien er vist i Figur 4.7.



Figur 4.7 Skjematisk fremstilling av chorismate-biosyntesen (venstre) og syntesen av aromatiske aminosyrer (Trp, Tyr og Phe) fra chorismate (høyre), samt oversikt over genene som koder for enzymene involvert i synteseveiene. Gener med negativ \log_2FC (kontroll/dalbavancin) er merket med rødt, og gener med positiv \log_2FC (kontroll/dalbavancin) er merket med blått. Se tekst for detaljer. Figur er lånt av Dr. Morten Kjos.

Interessant nok viste resultater fra CRISPRi-sek assayet (avsnitt 4.4.1) at 6 av 7 gener i chorismate-biosyntesen hadde en negativ \log_2FC , tilsvarende *aroB* (Tabell 4.11). Det ble derfor laget CRISPRi-stammer for å deplere alle genene i chorismate-biosynteseveien i *S. aureus* NCTC8325-4. MIC for dalbavancin ble bestemt ved bruk av mikrotiterassay for alle stammene og MIC fold endring er vist i Tabell 4.11.

Tabell 4.11 \log_2FC (Kontroll/Dalbavancin) og MIC fold endring for dalbavancin for gener involvert i chorismate-biosyntesen.

| Lokus tag | sgRNA-targetgen | \log_2FC (Kontroll/Dalbavancin) ^b | MIC fold endring ^c |
|----------------------------------|-------------------------|--|-------------------------------|
| | Kontroll | | 1 |
| SAOUHSC_01852 | <i>aroA2</i> | -0.47 | 3 |
| SAOUHSC_01482 | <i>aroB</i> | -0.48 | 3 |
| SAOUHSC_00832 | <i>aroD</i> | -0.24 | 3 |
| SAOUHSC_01702 (SAOUHSC_01699) | <i>aroE^a</i> | 0.8 | 1 |
| SAOUHSC_01635 | <i>aroK</i> | -0.42 | 3 |
| SAOUHSC_01481 | <i>aroA</i> | -0.38 | 3 |
| SAOUHSC_01483 | <i>aroC</i> | -1.19 | 3 |

^a *aroE* er del av et 13-geners stort operon

^b fra CRISPRi-sek-eksperimentet

^c MIC fold endring er definert som MIC(genX)/MIC(kontroll). Både gen-spesifikk og kontrollstamme ble indusert med 250 μM IPTG.

Resultater

Tabell 4.11 og Figur 4.7 viser at depleksjon av 6 av 7 gener (*aroA*, *aroA2*, *aroB*, *aroC*, *aroD* og *aroK*) i chorismate-biosynteseveien ga høyere MIC for dalbavancin sammenlignet med kontroll, samt negativ log₂FC (kontroll/dalbavancin) fra CRISPRi-sek. Unntaket var *aroE*, som verken ga økt resistens eller negativ log₂FC. Dette kan trolig forklares med at *aroE* er del av et 13-geners stort operon, i motsetning til de andre genene som er monocistroniske (se diskusjon). Resterende sgRNA viste negativ fold endring og en tre-fold forhøyet MIC sammenlignet med kontroll-sgRNA.

Resultater fra CRISPRi-sek assayet (avsnitt 4.4.1) viste også at enzymene involvert i synteseveien fra chorismate til aromatiske aminosyrer (Trp, Tyr og Phe) hadde en positiv log₂FC (Fig. 4.7). Dette betyr at antall celler med kontroll-sgRNA var høyere enn celler med gitt sgRNA etter dalbavancinbehandling, og at depleksjon av sgRNA-targetgenet gjorde cellen mindre motstandsdyktig mot dalbavancin. Dette kan tyde på at det er selve nedreguleringen av chorismate-biosyntesen, og ikke omdannelsen av chorismate til aromatiske aminosyrer som bidrar til økt dalbavancintoleranse hos *S. aureus*.

4.6.3 Deleksjon av *aroC*

For å følge opp disse resultatene videre ble *aroC*, som koder for det siste enzymet for dannelse av chorismate (Fig. 4.7), deletert i *S. aureus* NCTC8325-4 ved hjelp av det temperatursensitive pMAD-plasmidet, og MIC for dalbavancin ble bestemt for den resulterende stammen (samarbeid med Maria Heggenhougen). I den endelige stammen er *aroC*-genet erstattet med en spektinomycin-resistenskassett (Δ *aroC*::*spc*), og MIC fold endring er definert som MIC(Δ *aroC*::*spc*)/MIC(kontroll). Ettersom depleksjon av *aroC* i *S. aureus* NCTC8325-4 viste en negativ fold endring og en tre-fold forhøyet MIC sammenlignet med kontroll-sgRNA (Tabell 4.11), var det også forventet at deleksjon av *aroC* ville gjøre cellen mer resistent mot dalbavancin. Her ble det overraskende nok observert stor forskjell i MIC fold endring med og uten tilsatt TWEEN-80 (resultater ikke vist). TWEEN-80 blir tilsatt i mikrotiterassayet for å hindre at dalbavancin fester seg til platen i mikrotiterplaten. For prøver uten tilsatt TWEEN-80 ble det observert store forskjeller mellom kontroll og mutant, og MIC fold endring var to til fire fold høyere for Δ *aroC*::*spc*. For prøvene tilsatt TWEEN-80 var derimot MIC fold endring omtrent lik 1, og indikerte derfor ikke forskjell i dalbavancintoleranse ved deleksjon av *aroC*. Dette var ikke som forventet, og den store variasjonen i MIC med og uten TWEEN-80 skapte usikkerhet rundt resultatene. Forsøket burde derfor gjentas og deleksjonsstammen bør kontrolleres ytterligere før man kan trekke for mange slutninger fra dette.

5 Diskusjon

Et av hovedmålene med dette arbeidet var å finne ut om CRISPRi-systemet og CRISPRi-depleksjonsbiblioteket kunne benyttes til å identifisere gener som er involvert i toleranse mot antibiotika, og i det følgende blir det sett på hvilke metoder som egnet seg i mode-of-action studier for dette. Det blir i tillegg gjort en vurdering av de ulike to-komponentsystemenes rolle i dalbavancinsensitivitet, samt diskutert hvordan *S. aureus* påvirkes av dalbavancin ved bruk av mikroskopstudier.

5.1 Økt rifampicinresistens skyldes mutasjoner i *rpoB*-genet

Vi forsøkte først å bruke CRISPRi-biblioteket til å selektere for stammer som oppnådde økt toleranse for rifampicin på grunn av CRISPRi-depleksjon. Det er fra tidligere studier kjent at *S. aureus* som utsettes for rifampicin utvikler mutasjoner og blir resistente (Goldstein, 2014), og dette viste seg å være et problem for forsøksoppsettet vi hadde. Rifampicin fungerer ved å danne et stabilt kompleks med DNA-avhengig RNA-polymerase hos bakterier, og reagerer med β -delenheten av RNA-polymerase som kodes for av *rpoB*-genet (Aubry-Damon et al., 1998). Mutasjoner i *rpoB*-genet kan derfor medføre økt rifampicin-resistens. Disse oppstår raskt, og det er allerede beskrevet over 40 allelvarianter som fører til resistensøkning (Gaustad, 2001). Sekvenseringen av *rpoB*-genet i de rifampicinresistente koloniene vi fikk, viste at den observerte økningen i rifampicinresistens trolig er en konsekvens av mutasjoner i *rpoB*-genet for fire av de seks koloniene med økt resistens vi isolerte (Tabell 4.3).

De fire mutasjonene vi observerte i *rpoB*-genet gir tydelig ulik grad av resistens mot rifampicin. Som vist i Tabell 4.3 ga aminosyresubstitusjonene H481Y og H481D en >63-folds høyere toleranse for rifampicin sammenlignet med kontroll. Dette tyder på at en aminosyresubstitusjon fra histidin i posisjon 481 fører til en mutasjon i *rpoB* som gir en tydelig økning i resistens mot rifampicin. Dette bekreftes i en studie av Wichelhaus et al. (1999) (Wichelhaus et al., 1999). Den samme resistensøkningen bekreftes også i en studie av Gao et al. (2012), hvor det ble oppdaget at mutasjonen H481Y i *rpoB*-genet også forårsaket globale transkripsjonsendringer som førte til oppregulering av kapselproduksjon, endret *agr*-ekspresjon og redusert mottakelighet for antimikrobielle peptider (Gao et al., 2013). I en studie av Albano et al. (2019) ble det også oppdaget at aminosyresubstitusjonen H481D førte til en sterk økning i toleranse for rifampicin (Albano et al., 2019).

Aminosyresubstitusjonene L466S og D471E i *rpoB*-genet ga en mer beskjeden 6-folds økning i toleranse for rifampicin (Tabell 4.3). Dette underbygges i en studie av Guerillot et al., hvor

Diskusjon

det ble vist at *rpoB*-mutasjonen L466S bidro til seleksjon og fiksering av rifampicinresistens (Guerillot et al., 2018). Videre ble det i en studie av Lee et al. (2018) bestemt at *rpoB*-mutasjonen D471E i *Staphylococcus epidermidis* også bidro til resistensøkning for rifampicin (Lee et al., 2018).

I de to øvrige koloniene, uten detektert *rpoB*-mutasjon, ble det observert en 63-folds økning i resistens sammenlignet med kontroll for kolonien med depletet SAOUHSC_00351. Dette genet koder for et ikke-essensielt, kromosomalt hypotetisk protein (AureoWiki, 2016a) . I tillegg ble det observert en 7.5-folds økning i rifampicinresistens sammenlignet med kontroll for kolonien med depletet SAOUHSC_01141. Dette genet koder for putativ cysteine ligase BshC (UniProt, 2009). Heller ikke i disse koloniene er det trolig at CRISPRi-systemet er årsak til resistensøkningen, ettersom vi ikke observerte endringer i MIC-verdi mellom induerte og ikke-induserte CRISPRi-stammer (Tabell 4.2 og 4.3). Resistensøkningen skyldes derfor trolig andre faktorer. Selv om mer enn 95 % av alle rifampicinresistente mutasjoner assosieres med mutasjoner i *rpoB*-genet, er det fremdeles mulig at resistensen skyldes andre mutasjoner i kromosomet (Goldstein, 2014, Zaw et al., 2018). Det er derfor mer sannsynlig at det kan ha oppstått andre mutasjoner i kromosomet som har gjort cellen resistent for rifampicin, men dette ble ikke undersøkt videre. Vi konkluderte derfor med at CRISPRi-biblioteket egnert seg dårlig til å identifisere gener involvert i rifampicintoleranse med denne fremgangsmåten, og valgte å ikke studere dette videre. Resultatet tyder på at CRISPRi muligens egnert seg dårlig i studier med antibiotika hvor resistens oppstår enkelt som følge av enkeltmutasjoner, som observert her i *rpoB*-genet.

5.2 *S. aureus* er sensitiv for dalbavancin: MIC-verdier og time-lapse-mikroskopi

I stedet for rifampicin, valgte vi derfor å fokusere på lipoglykopeptidet dalbavancin. Sammenlignet med andre lipoglykopeptider og glykopeptider som vancomycin, daptomycin og teicoplanin, er effekten av dalbavancin lite studert selv om den trolig virker på lignende måte som disse. Vi benyttet først microfluidics kombinert med time-lapse-mikroskopering for å observere hvordan *S. aureus* responderte på dalbavancin på enkeltcellenivå. Dalbavancin fungerer som nevnt innledningsvis ved å hindre peptidoglykansyntese, og dermed også celleveggsyntesen hos Gram-positive bakterier (Chaudhry, 2015, McCurdy et al., 2015). Ved å dyrke cellene i ulike konsentrasjoner av dalbavancin var det mulig å sammenligne vekst og fenotype, og med dette kunne si noe om hvilken virkning antibiotikumet hadde på cellene. På samme måte som i MIC-assayet, ble veksten av *S. aureus* hemmet av dalbavancin i microfluidics-oppsettet, selv om konsentrasjonen som skulle til for å hemme var markant

Diskusjon

høyere (se under); cellene dyrket med 0.4 µg/ml dalbavancin (1 MIC) vokste minimalt saktere enn kontrollen uten antibiotika (Fig. 4.1). Først ved 4 µg/ml ble det observert klar hemming, mens ved 40 µg/ml var cellene ikke i stand til å vokse. Cellene som ble hemmet av dalbavancin opptar unormale celleformer og cellestørrelser og noen celler lyserer også. Disse observasjonene er som forventet når cellene får svekket cellevegg. I tillegg mister mange av cellene GFP-signalet, noe som tyder på at cellene er døde og ikke har aktivt proteinsyntesemaskineri (Fig. 4.2). I tillegg ble det observert at cellene var i stand til å vokse eller bytte til antibiotikafritt medium for den lave konsentrasjonen, men ikke for den høyeste, noe som indikerer at kun den høyeste konsentrasjonen av dalbavancin tok livet av cellene og som viser hvor viktig det er å bruke høye nok doser dalbavancin ved behandling. I fremtidige eksperimenter vil det være interessant å sammenligne disse fenotypene med hva som observeres for lignende antibiotika som vancomycin og daptomycin.

Bruk av time-lapse-mikroskopering for å studere vekst og fenotype hos *S. aureus* tilsatt dalbavancin gjorde det mulig å observere tydelige forskjeller på celler dyrket i antibiotikafritt medium og celler dyrket med høy konsentrasjon av dalbavancin. Resultatene var likevel noe overraskende ettersom det krevdes langt høyere antibiotikakonsentrasjon enn antatt for å inhibere vekst og påvirke cellenes fenotype. Ved mikrotiterassay ble MIC for dalbavancin 0.4 µg/ml, mens 100x høyere konsentrasjon ble brukt i microfluidics-eksperimentene. Forklaringen til dette er trolig forholdsvis enkel. Dalbavancin har vist seg å binde til plastoverflater (Rennie et al., 2007), og når dalbavancin pumpes gjennom plastrørene støpt inn i microfluidicsplaten (Fig. 3.8 og 3.9) vil trolig mye av molekylene bindes opp av platen slik at den effektive konsentrasjonen av dalbavancin reduseres kraftig. I fremtidige forsøk burde dette trolig kunne løses ved å dyrke i tilstedeværelse av 0.002 % (sluttkonsentrasjon) av TWEEN-80 (polysorbate-80), som er vist å redusere denne bindingen (Rennie et al., 2007). Absorbering av dalbavancin til plast var også et mulig problem i MIC-bestemmelse som ble gjort i plast-mikrotiterplater og ved støping av agarskåler med dalbavancin. Det ble tidvis observert noen variasjoner i MIC-resultater mellom forsøk som ble gjort ulike dager. Slike variasjoner er også observert mellom ulike laboratorier tidligere (Rennie et al., 2007), men ble løst. Derfor gikk vi etter hvert over til å bruke 0.002 % TWEEN i alle forsøk med dalbavancin for å redusere denne effekten.

5.3 Deplesjon av *graXRS* og *walRK* ga økt dalbavancinsensitivitet hos *S. aureus*

To-komponentsystemene *graXRS*, *walRK* og *vraUTSR* er fra tidligere kjent for å påvirke toleransen for glykopeptider i *S. aureus* (Howden et al., 2008, Cameron, 2016), og det ble antatt at dette også ville gjelde dalbavancin. For å undersøke om CRISPRi-systemet kunne brukes til

Diskusjon

å studere gener involvert i dalbavancintoleranse, ble det derfor bestemt å teste om depleksjon av noen av to-komponentsystemene i *S. aureus* påvirket dalbavancintoleransen. De 16 ulike to-komponentsystemene i *S. aureus* ble depletert ved bruk av CRISPRi-systemet og dyrket med varierende mengder dalbavancin (se avsnitt 4.3). Enkelte av resultatene etter depleksjon av to-komponentsystemene var som forventet, hvor man kunne observere en økning i sensitivitet for dalbavancin ved nedregulering av *walRK* og *graXRS* (Tabell 4.4). To-komponentsystemet GraXRS regulerer cellens respons til AMP og celleveggskade, og kontrollerer resistens mot kationiske antimikrobielle peptider (Haag and Bagnoli, 2017). Som nevnt innledningsvis ble det i en studie av Howden et al. (2008) oppdaget at GraXRS to-komponentsystemet spilte en viktig rolle i utviklingen av VISA-stammer, og det var derfor ikke overraskende at depleksjon av dette to-komponentsystemet ville gi en lavere toleranse for dalbavancin. Videre er to-komponentsystemet WalRK essensielt for celleveggmetabolismen hos *S. aureus*, og depleksjon av systemet hemmet derfor celleveksten. Dette gjør det vanskelig å avgjøre hvorvidt depleksjonen faktisk påvirket cellens toleranse for dalbavancin eller om mangelen på det essensielle to-komponentsystemet i seg selv var tilstrekkelig for økningen i sensitivitet. Sannsynligvis vil en unormal celleveggmetabolisme også påvirke toleransen for dalbavancin, ettersom antibiotikumet inhiberer celleveggsyntesen hos *S. aureus* ved å binde til D-Ala-D-Ala-dipeptidet i peptidoglykan. Denne effekten er tidligere vist for vancomycin (Shoji et al., 2011).

Det ble også observert at depleksjon av to-komponentsystemene AgrA, HssRS og KdpD ga en marginal økning i dalbavancinsensitivitet (Tabell 4.4). Årsaken til dette er ikke kjent. To-komponentsystemet AgrAC regulerer ekspresjonen av mange virulensfaktorer hos *S. aureus* (Novick and Geisinger, 2008, Oogai et al., 2011). I tillegg bidrar systemet i et komplekst regulatorisk nettverk som fører til oppregulering av proteiner som skilles ut av cellen, mens overflateproteiner nedreguleres (Novick et al., 1993). Det er kjent at mutasjoner i *agrA* fører til resistens mot daptomycin, et antibiotikum som angriper cellemembranen hos Gram positive bakterier (Song et al., 2013b). Det kan derfor også være mulig å tenke at depleksjon av *agrA* vil ha en effekt på cellemembran eller cellevegg som gjør cellen mindre resistent mot dalbavancin, men dette må følges opp med videre forsøk. Videre regulerer både HssRS og KdpDE cellens metabolisme og opptak av næringsstoffer (Haag and Bagnoli, 2017), hvilket gjør det vanskelig å forstå at disse prosessene er viktige for opprettholdelse av cellens toleranse mot dalbavancin.

I en studie av Song et al. blir det vist at nedregulering av *kdpDE* bidrar til redusert mottakelighet for telavancin i *S. aureus* (Song et al., 2013a), som er motsatt av det som blir observert her for dalbavancin. Det forblir derfor uklart hvorvidt disse resultatene kan forklares i forskjeller

Diskusjon

mellom *S. aureus*-stammer eller mellom telavancin og dalbavancin eller om det finnes andre årsaker til forskjellene.

Det var i tillegg ventet at deplesjon av to-komponentsystemet VraUTSR skulle gjøre cellen mindre resistent mot dalbavancin, men her ble det ikke observert noen forskjell i toleranse (Tabell 4.4). *vraSR* kontrollerer ekspresjon av ABC-transporterne *vraF* og *vraG*, gener som har vist seg å være oppregulert i VISA (Howden et al., 2008). Det er kjent at mutasjoner i *vraUTSR* er involvert i utviklingen av VISA-stammer og fører til redusert glykopeptid-mottakelighet (Galbusera et al., 2011, Matsuo et al., 2013, Kussmann et al., 2018), men resultatene våre tyder på at dette ikke nødvendigvis stemmer for dalbavancin.

Dette forsøket viste at CRISPRi-systemet kunne benyttes til å studere og identifisere gener involvert i dalbavancintoleranse, selv om det ser ut til å kunne være mulighet for falske negative resultater. I tillegg vil videre oppfølging av resultatene være nødvendige.

5.4 CRISPRi-sek fører til identifikasjon av kjente og ukjente gener involvert i dalbavancintoleranse

CRISPRi-biblioteket inneholder stammer med sgRNAer som til sammen har alle genene i *S. aureus* NCTC8325-4 som target. Ved å sekvensere hele populasjonen av sgRNAer i biblioteket før og etter eksponering for et antibiotikum vil det være mulig å finne ut hvordan antibiotikumet påvirker fitness til alle gener i genomet. Dersom nedregulering av et gen gir økt sensitivitet, vil stammen med dette sgRNAet ha lav fitness og bli underrepresentert i populasjonen etter antibiotikaeksponering. Motsatt, vil økt resistens som følge av nedregulering føre til overrepresentasjon av korresponderende sgRNA i populasjonen. En lignende fremgangsmåte har blitt brukt med transposon knockout-biblioteker, for eksempel for å finne gener med daptomycin-resistensdeterminanter i *S. aureus* (Coe et al., 2019).

Her ble sekvensering av CRISPRi-biblioteket (kalt CRISPRi-sek) brukt for å finne gener som er involvert i toleranse mot dalbavancin i *S. aureus*. For disse underrepresenterte sgRNA-ene var det forventet at deplesjonen av genet gjorde cellen mer sensitiv og utsatt for dalbavancin, og at tap av genet påvirket cellens overlevelse. Ved kloning av enkeltstammer av CRISPRi, ble dette i første rekke bekreftet for *ezrA*, *kapB* og *nrdF*, som medførte en to-folds økning i sensitivitet for dalbavancin ved nedregulering (Tabell 4.5). Også deplesjon av SAOUHSC_02383, *vraF*, *prs*, *pbp4* og SAOUHSC_02447 medførte noe økning i sensitivitet for dalbavancin. Her var økningen i sensitivitet dog ikke like stor som for *kapB*, *ezrA* og *nrdF*.

Diskusjon

Interessant nok er det flere av genene som ble identifisert som er kjent for å være involvert i toleranse for glykopeptider, lipopeptider og lipoglykopeptider tidligere, og det er derfor logisk at de ble identifisert i dette screeningsforsøket med lipoglykopeptidet dalbavancin. Dette gjelder genene *ezaA*, *vraF* og SAOUHSC_00678. *ezaA* koder for et protein som regulerer dannelsen av septum og celledelingsmaskineriet til bakterieceller. Det er vist at overfølsomhet for daptomycin assosieres med forstyrrelse av gener som regulerer lipoteikoinisyre og riboflavinbiosyntese, tilsynelatende hvor *ezaA* spiller en sentral rolle (Acton, 2013). I en studie av Blake og O'Neill (2013) ble det også oppdaget at en *ezaA* transposonsmutant medførte en to-folds økning i sensitivitet for daptomycin (Blake and O'Neill, 2013). Videre koder *vraF* for en ABC-transporter ATP-bindende protein (AureoWiki, 2016b). Coe et al. utførte i 2019 et daptomycin-sensitivitetsscreen med transposon-sekvensering i flere *S. aureus*-stammer. Her ble det vist at både *vraFG* og *ezaA* var depletet i alle stammene, og at depleksjon av genene derfor førte til økt daptomycinsensitivitet (Coe et al., 2019). Det har også blitt funnet tidligere at inaktivering av SAOUHSC_00678, som koder for et hypotetisk DUF402-inneholdende protein, gir økt daptomycinsensitivitet (Coe, 2019). Videre er det vist at depleksjon av *pbp4*, som koder for et penicillin-bindende protein 4 i *S. aureus*, resulterer i endringer i peptidoglykanlaget (Berti et al., 2016), og en sammenheng mellom daptomycinsensitivitet og inaktivering av *pbp4* er også rapportert (Coe et al., 2019). Ettersom dalbavancin fungerer ved å inhibere peptidoglykansyntesen, kan endringer i peptidoglykanlaget som følge av depleksjon av *pbp4* muligens forklare økningen i dalbavancinsensitivitet, selv om disse sammenhengene må studeres nærmere. Daptomycin virker ved å påvirke cellemembranen hos målcellene, men den eksakte virkningsmekanismen er fortsatt ikke godt karakterisert (Miller et al., 2016). Resultatene vist her tyder på at dalbavancin kan virke delvis på samme måte som lipopeptidet daptomycin ettersom de samme genene er involvert i toleransen. Dette kan forklares ved at dalbavancinmolekylet også inneholder en lipidgruppe.

Identifiseringen av flere gener som allerede var kjent for å være involvert i toleranse for glykopeptider, lipopeptider og lipoglykopeptider tyder på at CRISPRi-sek fungerte godt for å identifisere gener involvert i toleranse for dalbavancin. Derfor var det interessant å undersøke de andre underrepresenterte genene etter dalbavancinbehandling som også viste økt dalbavancinsensitivitet ved depleksjon. Disse interessante nye dalbavancintoleransegenene inkluderer spesielt *kapB* og *nrdF*, som ved depleksjon viste en to-folds økning av dalbavancinsensitivitet i *S. aureus*. Også depleksjon av *prs*, SAOUHSC_00892, SAOUHSC_2383 og SAOUHSC_2447 viste en marginal økning i dalbavancinsensitivitet. I

Diskusjon

denne oppgaven ble det videre laget en *kapB*-delesjonsmutant for *S. aureus* NCTC8325-4. Her ble det som forventet observert at mutanten hadde en to-folds økning i dalbavancinsensitivitet sammenlignet med villtype-kontrollstamme, tilsvarende som ved deplasjon (Tabell 4.5). Dette verifiserer at *kapB* er involvert i toleranse for dalbavancin i *S. aureus*. *kapB* (kinase-assosiert protein B) er et konservert, men ikke-essensielt gen som ikke er studert i *S. aureus* tidligere. Det homologe *kapB*-genet i *Bacillus subtilis* koder for et lipoprotein involvert i endosporedannelse (35 % identitet og 58 % similaritet mellom KapB i *B. subtilis* og *S. aureus*) (Dartois et al., 1997). I *B. subtilis* har KapB (128 aminosyrer) et signalpeptid for sekresjon og er trolig festet til membranen via et lipidanker, hvor det trolig assosierer med kinasen KinB og er viktig for at KinB skal fungere optimalt. KapB i *S. aureus* er 127 aminosyrer, men mangler et typisk sekresjonssignal og det er vanskelig å predikere funksjonen til KapB basert på resultatene i *B. subtilis*. Dersom KapB skulle være et lipoprotein på overflaten til *S. aureus*, er det likevel mulig å spekulere i at dette proteinet kan være involvert i interaksjoner med dalbavancin direkte eller med andre proteiner som er viktig for mekanismen til dalbavancin. Uansett må funksjonen til KapB i *S. aureus* studeres videre for å forstå dette.

Blant de andre underrepresenterte genene koder *nrdF* for en ribonukleotid-difosfat reduktase, og er trolig involvert i syntese av pyrimidiner (AureoWiki, 2016c). Videre koder *prs* for ribosefosfat pyrofosfokinase, og SAOUHSC_00892 koder for et RNA-bindende S1 domene-inneholdende protein. Alle disse genene er essensielle for *S. aureus*, og dette kan være årsaken til at de ikke tidligere har blitt assosiert med økt sensitivitet med glykopeptider og lipopeptider. Andre studier har for det meste benyttet seg av transposonmutanter, og slike studier vil dermed ikke involvere gener som er essensielle. Dette er potensielt en stor fordel ved bruk av CRISPRi. Igjen må videre studier avgjøre hvorvidt deplasjonene faktisk påvirket cellens toleranse for dalbavancin eller om mangelen på de essensielle genene i seg selv indirekte førte til økningen i sensitivitet. I tillegg ble SAOUHSC_02383 og SAOUHSC_02447 identifisert som underrepresenterte gener etter dalbavancinbehandling, og disse genene koder for to hypotetiske protein. I en studie av Valentino et al. (2014) ble det observert at deplasjon av SAOUHSC_02383 resulterte i signifikant redusert vekst i *S. aureus*, og genet ble derfor antatt å være essensielt for vekst i BHI-medium (Valentino et al., 2014).

For noen av genene som kom ut som underrepresenterte fra CRISPRi-sek ($\log_2FC > 2$), kunne vi overraskende nok ikke verifisere økt dalbavancinsensitivitet ved spesifikk deplasjon (Tabell 4.5). Dette gjelder SAOUHSC_00867, *csaIA*, *pstS*, *rpsF* og SAOUHSC_02810. Ettersom sgRNA-ene for disse genene var underrepresentert ved CRISPRi-sek, ville man også forvente

Diskusjon

at depleksjon av genet gjorde cellen mer sensitiv og utsatt for dalbavancin, hvilket altså ikke var tilfelle her. SAOUHSC_00867 var det genet som hadde høyest log₂FC ved CRISPRi-sek, og hvor sgRNAet var mest underrepresentert. Genet koder for et ikke-essensielt hypotetisk protein, men funksjonen av genet er hittil ikke kjent. Interessant nok er dette genet rett oppstrøm for dlt-operonet, som koder for gener involvert i D-alanylering av teikoin syrer. Dlt-operonet har tidligere vist seg å være involvert i toleranse for en rekke ulike antimikrobielle molekyler inkludert vancomycin og daptomycin (Blake and O'Neill, 2013).

Ved beregning av log₂FC (kontroll/dalbavancin) ble det i tillegg funnet tre gener som hadde log₂FC < -2, og dermed var overrepresentert etter dalbavancinbehandling (Tabell 4.6). Her var det forventet at depleksjonen av genet gjorde cellen mer motstandsdyktig mot antibiotikumet, og at det derfor ville være en større mengde celler med sgRNA for gitt gen. I motsetning til de underrepresenterte genene ble det ikke laget spesifikke CRISPRi-depleksjonskonstrukt med target i disse genene i denne oppgaven, og resultatene må derfor foreløpig anses som preliminare. De tre overrepresenterte genene som ble identifisert ved CRISPRi-sek inkluderer *ebpS*, *mvaS* og SAOUHSC_00659. *ebpS* koder for et elastin-bindende protein, og er et adhesin som er ansvarlig for binding til vertsceller. Dette genet er svært konservert i *S. aureus*, hvilket antyder at EbpS muligens også har andre viktige funksjoner (Nakakido et al., 2014). Videre er *mvaS* et essensielt gen som koder for HMG-CoA syntase, et av fem viktige enzym i mevalonate-biosyntesen (AureoWiki, 2016d). I en studie av Balibar et al. (2009) ble det vist at nedregulering av gener involvert i mevalonate-biosyntesen i *S. aureus* reduserer vekstraten dramatisk (Balibar et al., 2009). Ettersom *mvaS* er essensielt for *S. aureus* er det svært overraskende at depleksjon av dette genet ga cellen bedre overlevelsesegenskaper og høyere toleranse for dalbavancin, og dette bør følges opp videre.

Det siste av de tre overrepresenterte genene som ble identifisert i CRISPRi-sek var SAOUHSC_00659 (Tabell 4.6). Dette genet koder for et ikke-essensielt hypotetisk protein, og i en studie av Sass et al. (2008) ble det vist at genet er involvert i *VraSR*-avhengig stressrespons i celleveggen (Sass et al., 2008). Ettersom det også er kjent at mutasjoner i *vraUTSR* fører til redusert glykopeptid-mottakelighet (Galbusera et al., 2011, Matsuo et al., 2013), er det derfor overraskende dersom SAOUHSC_00659-depleksjon fører til økt dalbavancintoleranse hos *S. aureus*, men i likhet med *mvaS* må dette verifiseres og eventuelt studeres videre for å forstå mekanismen.

Totalt sett viser disse resultatene at CRISPRi-sek har stort potensiale til å identifisere gener involvert i dalbavancintoleranse. Ettersom flere av genene som ble identifisert i screeningen

Diskusjon

allerede er kjent for å være involvert i toleranse mot glykopeptider, lipopeptider og lipoglykopeptider, tyder dette på at metoden fungerte godt. Flere av genene som ble identifisert ved CRISPRi-sek er essensielle for cellen, og dette er gener som ikke kunne blitt identifisert ved for eksempel transposonmutagenese. Det er også en sjanse for falske positive resultater ved bruk av denne metoden, og som vist er det viktig at alle resultater verifiseres og videre studier er nødvendig for å forstå de molekylære mekanismene i detalj.

5.5 Seleksjon av dalbavancinresistente stammer på agarskål fungerte ikke for å identifisere gener involvert i dalbavancinresistens

Det ble videre forsøkt å identifisere dalbavancinresistente mutanter fra CRISPRi-biblioteket ved en mer direkte seleksjonsmetode på agarskål. Dette ble gjort på samme måte som forsøkt for rifampicin (avsnitt 3.12.4 og Figur 3.6). Da CRISPRi-biblioteket ble dyrket på agarskåler tilsatt dalbavancin ble det i første omgang observert overraskende mye vekst på skålene med 0-5 MIC av dalbavancin, hvilket tydet på at det ikke var noe seleksjon for dalbavancinresistens i disse skålene. En mulig årsak til dette kan være at dalbavancin har andre egenskaper når det blandes med agar, eller at den effektive dalbavancinkonsentrasjonen ble redusert på grunn binding til plast i agarskålen.

Ved isolering av CRISPRi-induserte kolonier som vokste ved 10 MIC dalbavancin var det i første omgang flere av koloniene som hadde forhøyet MIC-verdi for dalbavancin sammenlignet med kontrollen (data ikke vist). Etter plasmidisolering og renstryk av koloniene var det imidlertid ingen av koloniene som hadde høyere dalbavancintoleranse enn kontrollen (Tabell 4.8).

Årsaken til dette er fortsatt uviss, men det var tydelig at denne fremgangsmåten for å finne gener som ga stabilt, økt toleranse for dalbavancin ved CRISPRi-knockdown ikke var noen suksess. For å identifisere gener som bidrar til økt dalbavancintoleranse bør derfor andre metoder benyttes.

5.6 Deplesjon av SAOUHSC_02658 gir økt sensitivitet for dalbavancin i *S. aureus* NCTC8325-4 og Newman

Selv om det ved seleksjon på agarskål ikke ble oppdaget gener som ga forhøyet dalbavancinresistens, ble det ved en tilfeldighet observert at kolonier med deplettert SAOUHSC_02658 hadde forhøyet dalbavancinsensitivitet i *S. aureus* NCTC8325-4 (Tabell 4.8). SAOUHSC_02658 koder for et hypotetisk protein, muligens for et transporter-protein (ATP-bindende kassett-transporter, ABC-transporter) (AureoWiki). ABC-transportere er

Diskusjon

integreerte membran-proteiner som sørger for enveistransport av molekylar over cellemembranen. Hos bakterier finnes både import- og eksport-ABC-transportere, og disse sørger for transport av alt fra små uorganiske og organiske molekylar som aminosyrer og nukleotider til større organiske forbindelser som peptider og polysakkarider (Wilkens, 2015). For å undersøke hvorvidt depleksjon av SAOUHSC_02658-genet også ga økt dalbavancin-sensitivitet i andre *S. aureus*-stammer, ble det laget nye CRISPRi-depleksjonskonstrukt for SAOUHSC_02658 i *S. aureus*-stammene NCTC8325-4, Newman og COL. Mens NCTC8325-4 og Newman med deplettert SAOUHSC_02658 var noe mer sensitiv for dalbavancin enn tilhørende kontroller (Tabell 4.9), ble det ikkje observert noen forskjeller for tilsvarende MRSA-stamme COL.

I tillegg ble det undersøkt hvorvidt depleksjon av SAOUHSC_02658-genet påvirket cellens toleranse for vancomycin, hvilket ikkje var tilfellet (data ikkje vist). Muligens skyldes dette dalbavancins spesifikke eigenskapar (Figur 1.4). Til forskjell fra vancomycin har dalbavancin, som nevnt tidlegare, en lipofil sidekjede som bidrar til forankring i bakteriemembraner, samt en amidert karboksyl-sidegruppe som øker den antimikrobielle effekten mot stafylokokker (McCurdy et al., 2015). Disse eigenskapene kan være avgjørende for den observerte økningen i sensitivitet ved depleksjon av SAOUHSC_02658, og med dette forklare hvorfor ikkje vancomycin ga den samme økningen.

Videre ble fenotypen ved nedregulering av SAOUHSC_02658-genet studert ved mikroskopi (Figur 4.5). Det ble observert at celler med liten eller ingen depleksjon av genet hadde normal form og størrelse, samt DAPI- og Nile Red-farging (Fig. 4.5 A-B). Som forventet betyr dette at cellens fenotype er normal når genet er intakt. Ved depleksjon av SAOUHSC_02658-genet så man derimot at både DAPI- og Nile Red-fargingen var unormal (Fig. 4.5 C-D). Cellestørrelsen var varierende og bakterien vokste i store og små klynger. Resultatene viser med dette at SAOUHSC_02658-genet sannsynligvis er viktig for normal vekst og celledeling hos *S. aureus*. Man kan likevel ikkje vite med sikkerhet at genet koder for en funksjonell ABC-transporter, og vidare studier vil kunne vise om dette genet har en funksjon direkte relatert til cellesyklusen hos *S. aureus*.

5.7 Gener involvert i dalbavancinresistens ble identifisert ved seleksjon av CRISPRi-biblioteket ved mikrotiterassay

Ettersom identifisering av gener som ga stabilt, økt toleranse for dalbavancin ved CRISPRi-knockdown og seleksjon på agar-skåler ikkje var noen suksess, ble det også benyttet

Diskusjon

mikrotiterassay med to-folds fortyninger av dalbavancin for å forsøke å selekere celler med økt toleranse fra CRISPRi-depleksjonsbiblioteket (avsnitt 3.12.5). Etter seleksjon av CRISPRi-knockdown-kolonier med økt dalbavancintoleranse ble det identifisert 8 kolonier med en 2-4 fold høyere toleranse for dalbavancin sammenlignet med kontrollen (Tabell 4.10). Av disse koloniene hadde 5 deplettert *sagB*, 2 hadde deplettert *aroB* og 1 koloni hadde deplettert *vrfAB* operon. For å verifisere at økningen i dalbavancinresistens skyldtes depleksjon av *sagB*, og ikke andre endringer i genomet, ble det laget en sgRNA-depleksjonsstamme for *sagB* i *S. aureus* NCTC8325-4. Her ble det igjen vist at depleksjon av *sagB* ga en (tre-fold) økning i dalbavancintoleranse sammenlignet med kontrollen (data ikke vist). I en studie av Chan et al. (2016) ble det oppdaget at stammer med inaktivt *sagB* hadde økt vancomycinresistens hos *S. aureus* (Chan et al., 2016). Dette genet er viktig for bakteriens peptidoglykansyntese ettersom det koder for det membranassosierte enzymet *N*-acetylglukosaminidase. Delesjon av *sagB* i *S. aureus* gir derfor vekst- og cellemorfologiske defekter, og det ble i studien observert elongerte peptidoglykankjeder (Chan et al., 2016). Gitt at vancomycin og dalbavancin har lignende egenskaper er det derfor ikke uventet at også kolonier med deplettert *sagB* viste noen av de samme effektene ved tilsatt dalbavancin i *S. aureus*, og at det også her ble observert en økning i resistens.

Funnet av *sagB* var svært nyttig ettersom det viser at bruk av mikrotiterassay og CRISPRi-depleksjonsbiblioteket for identifisering av gener involvert i dalbavancinresistens har fungert på en bra måte.

I tillegg til *sagB* ble det også observert dalbavancinresistente kolonier med deplettert *vrfAB*-operon (Tabell 4.10). I en studie av Bose et al. (2014) ble det vist at *vfrAB*-operonet (virulensfaktor regulator AB) koder for et ikke-essensielt hypotetisk protein som er konserverv i Gram-positive bakterier. Studien viste at VfrB hadde en sentral rolle innen regulering av hemolyse, og $\Delta vfrAB$ -mutanter viste dramatisk nedgang i hemolytisk aktivitet (Bose et al., 2014). Operonet har i tillegg likhet til Asp23/Gls24 familie envelope stressrespons-protein (UniProt). Det ble heller ikke valgt å følge opp nedreguleringen av dette genet ytterligere, og det er derfor vanskelig å fastslå hvorvidt depleksjonen av operonet medvirket til økt dalbavancinresistens eller om resultatet var falskt positiv.

5.8 Intakt chorismate-biosyntese ser ut til å være viktig for sensitivitet for dalbavancin

Fra mikrotiterassayet (avsnitt 4.6) ble det også observert to kolonier med forhøyet dalbavancinresistens ved depleksjon av *aroB*. *aroB* koder for enzymet 3-dehydroquinate syntase,

Diskusjon

og er en del av chorismate-biosyntesen (Fig. 4.7), som igjen er en forløper til syntese av de aromatiske aminosyrene tryptofan, tyrosin og fenylalanin. For å verifisere at økningen i dalbavancinresistens i *S. aureus* skyldtes deplesjon av *aroB*, og ikke andre endringer i genomet, ble det også her laget en CRISPRi-deplesjonsstamme av *aroB* i *S. aureus* NCTC8325-4. Populasjonsanalyseprofilene viste at deplesjon av *aroB* gir en tydelig økning i dalbavancinresistens sammenlignet med kontroll (Figur 4.6 A-B), hvilket verifiserer at nedregulering av *aroB* gir økt resistens mot dalbavancin. For prøvene med vancomycin ble det ikke observert noen økning i resistens ved deplesjon av *aroB* (Figur 4.6 C-D). Som nevnt i avsnitt 5.6, kan årsaken til de observerte forskjellene i toleranse for dalbavancin og vancomycin skyldes dalbavancins spesifikke egenskaper, som lipofil sidekjede og amidert karboksylsidegruppe (McCurdy et al., 2015).

Ettersom det ble observert at nedregulering av *aroB* ga økt dalbavancintoleranse, var det interessant å også undersøke hvorvidt nedregulering av andre enzymer i chorismate-biosynteseveien også ville gi økt resistens mot dalbavancin. Interessant nok ga alle enzymene i synteseveien (med unntak av *aroE*) økning i dalbavancinresistens (Tabell 4.11). I tillegg hadde deplesjonene en negativ log₂FC fra CRISPRi-sek (Tabell 4.11), som også indikerte at forekomsten av disse sgRNAene etter dalbavancinbehandling var høyere enn for kontroll-sgRNA. Av enzymene i synteseveien skilte deplesjon av *aroE* seg ut med positiv log₂FC. Årsaken til dette er trolig at genet er del av et 13-geners stort operon, og deplesjon av *aroE* kan gi ulike effekter fordi det påvirker ekspresjon av en rekke ulike gener. Dette viser en av svakhetene ved CRISPRi-systemet, ettersom det vil påvirke transkripsjon av alle gener i et operon nedstrøms for targetgenet.

Ettersom deplesjon av hvert enkelt av de resterende enzymene i chorismate-biosynteseveien medførte en 2-4 folds økning i dalbavancintoleranse (Tabell 4.11), antas det at nedregulering av chorismate-synteseveien i seg selv er årsaken til økt dalbavancinresistens hos cellene. Ved å studere Figur 4.7 kan man se at nedreguleringen av påfølgende syntesevei (fra chorismate til de aromatiske aminosyrene Trp, Tyr og Phe) ikke hadde negativ log₂FC. Dette indikerer at den observerte økningen i dalbavancinresistens kun er knyttet til nedregulering av gener involvert i chorismate-biosyntesen, og ikke til påfølgende syntesevei fra chorismate til aromatiske aminosyrer.

Det ble i tillegg valgt å følge opp disse resultatene ved å lage en delesjonsmutant for *aroC* i *S. aureus* NCTC8325-4. *aroC* koder for det siste enzymet i dannelsen av chorismate, og det var derfor interessant å undersøke hvorvidt deplesjon av dette genet ville ha den samme effekten

Diskusjon

på cellens dalbavancintoleranse som sett ved deplesjon. Tabell 4.11 viser at deplesjon av *aroC* ga en tre-fold økning i dalbavancinresistens sammenlignet med kontroll. Til sammenligning var det svært varierende resultater for stammen med deletert *aroC*. Overraskende nok var det kun mutanten uten tilsatt TWEEN-80 som hadde en to-fire folds økning i MIC for dalbavancin sammenlignet med kontrollen. Det ble ikke observert noen forskjell i dalbavancintoleranse mellom mutanten og kontroll i prøvene tilsatt TWEEN-80. Resultatene med delesjonsmutanten er foreløpig preliminare, og gjør at man ikke kan trekke konklusjoner basert på dem. Delesjonsstammen må kontrolleres ytterligere for å være sikker på at *aroC* er deletert på rett måte uten at ytterligere mutasjoner har oppstått. Det bør videre gjøres flere tester for å avgjøre hvorvidt delesjon av *aroC* øker dalbavancinresistens hos *S. aureus*.

6. Konklusjon og fremtidige perspektiver

I dette arbeidet var et av hovedmålene å finne ut om CRISPRi-systemet og CRISPRi-depleksjonsbiblioteket kunne benyttes til å identifisere gener som er involvert i toleranse mot antibiotika, og det ble derfor undersøkt hvilke metoder som egnet seg i mode-of-action studier for dette. Blant metodene som ble brukt er det enkelte som fungerte bedre enn andre. Det viste seg å være vanskelig å arbeide med rifampicin på grunn av mutasjoner i kromosomet som oppstod lett. Fokuset ble derfor i stedet rettet mot lipoglykopeptidet dalbavancin. CRISPRi-sek identifiserte flere gener som er involvert i dalbavancintoleranse, og kan derfor sies å være en suksess. Forsøkene viste imidlertid at det er viktig å følge opp med ekstra eksperimenter for å verifisere resultatene fra CRISPRi-sek. Flere av de identifiserte genene er allerede kjent for å være involvert i toleranse for glykopeptider, lipopeptider og lipoglykopeptider, blant annet genene *ezrA*, *vraF* og SAOUHSC_00678. Det var spesielt interessant å finne at flere av genene som her ble vist å være involvert i dalbavancintoleranse tidligere har blitt vist å være involvert i toleranse for lipopeptidet daptomycin. Dette kan tyde på at virkningsmekanismen til dalbavancin har flere likheter med hvordan daptomycin virker. I tillegg ble *kapB* identifisert som et gen som både ved depleksjon og delesjon gjorde cellen mer sensitiv for dalbavancin. Andre kandidater fra CRISPRi-sek vil også være interessante å følge opp videre. Det er også verdt å merke seg at identifiseringen av flere essensielle gener er en av fordelene ved bruk av CRISPRi-sek.

Av forsøkene med direkte seleksjon, fungerte mikrotiterassay for identifisering av gener involvert i dalbavancintoleranse best og ga pålitelige resultater. Her ble det identifisert flere gener involvert i glykopeptid- og lipoglykopeptidtoleranse, nemlig *sagB* og *aroB*. *aroB* ledet igjen til oppdagelsen av at nedregulering av chorismate-biosyntesen ser ut til å være assosiert med dalbavancinresistens i *S. aureus*. Metoden som var minst egnet var identifisering av gener som ga stabilt, økt toleranse for dalbavancin ved CRISPRi-knockdown og seleksjon på agarskål. Denne fremgangsmåten var ikke noen suksess ettersom det ikke ble oppdaget gener med forhøyet dalbavancinresistens.

Dette arbeidet førte til identifisering av flere gener som påvirker dalbavancintoleranse ved en ukjent mekanisme. I fremtidige eksperimenter vil det for eksempel være spesielt interessant å følge opp genet *kapB* og gener i chorismate-biosyntesen. For å følge opp hvordan chorismate-biosyntesen påvirker dalbavancintoleranse bør for eksempel MIC assays med inaktivert *aroC*-gen gjennomføres i flere ulike stammer i tillegg til å bli repetert i NCTC8325-4 Δ *aroC*::*spc*. Et

Konklusjon og fremtidige perspektiver

annet første naturlige skritt videre vil være å bestemme populasjonsanalyseprofil for delesjonsmutanten med og uten tilsatt chorismate. For oppfølging av hvordan inaktivert *kapB* påvirker cellens toleranse for dalbavancin kan det også være interessant å eksempelvis gjennomføre MIC assays med inaktivert *kapB*-gen i flere ulike stammer, samt populasjonsanalyseprofil. Δ *kapB*-delesjonsmutanten kan i tillegg studeres i mikroskop.

Utviklingen av antibiotikaresistens gjør det interessant å øke kunnskapsnivået rundt gener involvert i resistens og toleranse hos ulike bakterier. Dette gjør utarbeidelse av nye forskningsverktøy til dette formålet til et svært viktig bidrag for å forstå og bekjempe antibiotikaresistens. Resultatene i denne oppgava har vist at CRISPRi kombinert med rett framgangsmåte kan benyttes til å identifisere gener som påvirker fitness og/eller antibiotikaresistens hos *S. aureus*. Resultatene har imidlertid også vist at valg av forsøksoppsett og verifiseringseksperimenter er viktig.

Referanser

- ACTON, Q. A. 2013. *Lipopeptides - Advances in Research and Application* ScholarlyEditions
- ALBANO, M., KARAU, M. J., GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E., OSMON, D. R., ORAVEC, C. P., BERRY, D. J., ABDEL, M. P. & PATEL, R. 2019. *In Vitro* Activity of Rifampin, Rifabutin, Rifapentine, and Rifaximin against Planktonic and Biofilm States of Staphylococci Isolated from Periprosthetic Joint Infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 63.
- ALIFANO, P., PALUMBO, C., PASANISI, D. & TALA, A. 2015. Rifampicin-resistance, *rpoB* polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *J Biotechnol*, 202, 60-77.
- ANDERSSON, D. I., BALABAN, N. Q., BAQUERO, F., COURVALIN, P., GLASER, P., GOPHNA, U., KISHONY, R., MOLIN, S. & TONJUM, T. 2020. Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiol Rev*.
- AUBRY-DAMON, H., SOUSSY, C. J. & COURVALIN, P. 1998. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 2590-2594.
- AUREOWIKI. *Pangenome* [Online]. Available: <https://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SAUPAN005894000> [Accessed 14.02.2020].
- AUREOWIKI. 2016a. *SAOUHSC_00351* [Online]. AureoWiki. Available: https://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SAOUHSC_00351 [Accessed 06.05.2020].
- AUREOWIKI. 2016b. *SAOUHSC_00667* [Online]. AureoWiki. Available: https://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SAOUHSC_00667 [Accessed 19.05.2020].
- AUREOWIKI. 2016c. *SAOUHSC_00743* [Online]. Available: https://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SAOUHSC_00743 [Accessed 19.05.2020].
- AUREOWIKI. 2016d. *SAOUHSC_02860* [Online]. AureoWiki. Available: https://aureowiki.med.uni-greifswald.de/SAOUHSC_02860 [Accessed 19.05.2020].
- BALIBAR, C. J., SHEN, X. & TAO, J. 2009. The mevalonate pathway of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 191, 851-61.
- BERTI, A. D., THEISEN, E., SAUER, J. D., NONEJUJE, P., OLSON, J., POGLIANO, J., SAKOULAS, G., NIZET, V., PROCTOR, R. A. & ROSE, W. E. 2016. Penicillin Binding Protein 1 Is Important in the Compensatory Response of *Staphylococcus aureus* to Daptomycin-Induced Membrane Damage and Is a Potential Target for beta-Lactam-Daptomycin Synergy. *Antimicrob Agents Chemother*, 60, 451-8.
- BINDA, E., MARINELLI, F. & MARCONE, G. L. 2014. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics (Basel)*, 3, 572-94.
- BIOLINE. 2019. *IPTG* [Online]. Available: <https://www.bioline.com/us/iptg.html> [Accessed].
- BLAKE, K. L. & O'NEILL, A. J. 2013. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother*, 68, 12-6.
- BONAR, E., MIĘDZOBRODZKI, J. & WŁADYKA, B. 2018. The Staphylococcal Coagulases. Academic Press
- BOSE, J. L., DALY, S. M., HALL, P. R. & BAYLES, K. W. 2014. Identification of the *Staphylococcus aureus* *vfrAB* operon, a novel virulence factor regulatory locus. *Infect Immun*, 82, 1813-22.
- BOYLE-VAVRA, S., CAREY, R. B. & DAUM, R. S. 2001. Development of vancomycin and lysostaphin resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. *J Antimicrob Chemother*, 48, 617-25.
- BROCKEN, D. J. W., TARK-DAME, M. & DAME, R. T. 2018. dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Curr Issues Mol Biol*, 26, 15-32.
- CAMERON, D., JIANG, J., KOSTOULIAS, X., FOXWELL, D. & PELEG, A., 2016. Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YychI activation of the WalRK essential two-component regulatory system. *Sci Rep*, 6: 30823
- CARTER, G. R. 1990. *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology*.
- CDC 2019a. Antibiotic Resistance Threats In The United States, 2019 Atlanta.

Referanser

- CDC 2019b. Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR). Biggest Threats and Data. 2019 AR Threats Report Centers for Disease Control and Prevention
- CHAMBERS, H. F. & DELEO, F. R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 7, 629-41.
- CHAN, Y. G., FRANKEL, M. B., MISSIAKAS, D. & SCHNEEWIND, O. 2016. SagB Glucosaminidase Is a Determinant of *Staphylococcus aureus* Glycan Chain Length, Antibiotic Susceptibility, and Protein Secretion. *J Bacteriol*, 198, 1123-36.
- CHAUDHRY, S., B 2015. Chapter 26 – Miscellaneous Antibacterial Drugs. *Side Effects of Drugs Annual*, 37, 293-305.
- CHEN, A. Y., ZERVOS, M. J. & VAZQUEZ, J. A. 2007. Dalbavancin: a novel antimicrobial. *Int J Clin Pract*, 61, 853-63.
- CHEUNG, A. L., BAYER, A. S., ZHANG, G., GRESHAM, H. & XIONG, Y.-Q. 2004. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40, 1-9.
- CITRON, D. M., TYRRELL, K. L. & GOLDSTEIN, E. J. 2014. Comparative *in vitro* activities of dalbavancin and seven comparator agents against 41 *Staphylococcus* species cultured from osteomyelitis infections and 18 VISA and hVISA strains. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79, 438-40.
- COE, K. A. 2019. *Using Transposon Sequencing to Identify Vulnerabilities in Staphylococcus aureus*. Doctoral dissertation, Harvard University.
- COE, K. A., LEE, W., STONE, M. C., KOMAZIN-MEREDITH, G., MEREDITH, T. C., GRAD, Y. H. & WALKER, S. 2019. Multi-strain Tn-Seq reveals common daptomycin resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*, 15, e1007862.
- CONG, Y., YANG, S. & RAO, X. 2020. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res*, 21, 169-176.
- COTTON, S. 2010. *Vancomycin* [Online]. Chemistryworld Available: <https://www.chemistryworld.com/podcasts/vancomycin/3005988.article> [Accessed 27.04.2020].
- CUI, L., ISII, T., FUKUDA, M., OCHIAI, T., NEOH, H. M., CAMARGO, I. L., WATANABE, Y., SHOJI, M., HISHINUMA, T. & HIRAMATSU, K. 2010. An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 5222-33.
- DANTES, R., MU, Y., BELFLOWER, R., ARAGON, D., DUMYATI, G., HARRISON, L. H., LESSA, F. C., LYNFIELD, R., NADLE, J., PETIT, S., RAY, S. M., SCHAFFNER, W., TOWNES, J., FRIDKIN, S. & EMERGING INFECTIONS PROGRAM-ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE, M. S. I. 2013. National burden of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, United States, 2011. *JAMA Intern Med*, 173, 1970-8.
- DARTOIS, V., DJAVAKHISHVILI, T. & HOCH, J. A. 1997. KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 26, 1097-1108.
- DAS, S. & DASH, H. R. 2019. *Microbial Diversity in the Genomic Era*.
- DASGUPTA, A. 2012. Advances in antibiotic measurement. *Adv Clin Chem*, 56, 75-104.
- DEVER, L. A. & DERMODY, T. S. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med*, 151, 886-95.
- DO, T., SCHAEFER, K., SANTIAGO, A. G., COE, K. A., FERNANDES, P. B., KAHNE, D., PINHO, M. G. & WALKER, S. 2019. The cell cycle in *Staphylococcus aureus* is regulated by an amidase that controls peptidoglycan synthesis.
- DRUGBANK.CA. 2005. *Vancomycin* [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00512> [Accessed 22.01.2020].
- ENGLER, C., KANDZIA, R. & MARILLONNET, S. 2008. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*, 3, e3647.
- ENGLER, C. & MARILLONNET, S. 2014. Golden Gate cloning. *Methods Mol Biol*, 1116, 119-31.

Referanser

- FINAN, J. E., ARCHER, G. L., PUCCI, M. J. & CLIMO, M. W. 2001. Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 3070-5.
- FOOKES, C. 2018. *Glycopeptide antibiotics* [Online]. Drugs.com. Available: <https://www.drugs.com/drug-class/glycopeptide-antibiotics.html> [Accessed 21.01.2020].
- GALBUSERA, E., RENZONI, A., ANDREY, D. O., MONOD, A., BARRAS, C., TORTORA, P., POLISSI, A. & KELLEY, W. L. 2011. Site-specific mutation of *Staphylococcus aureus* VraS reveals a crucial role for the VraR-VraS sensor in the emergence of glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1008-20.
- GAO, W., CAMERON, D. R., DAVIES, J. K., KOSTOULIAS, X., STEPNELL, J., TUCK, K. L., YEAMAN, M. R., PELEG, A. Y., STINEAR, T. P. & HOWDEN, B. P. 2013. The RpoB H(4)(8)(1)Y rifampicin resistance mutation and an active stringent response reduce virulence and increase resistance to innate immune responses in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 207, 929-39.
- GARDETE, S. & TOMASZ, A. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest*, 124, 2836-40.
- GARIBYAN, L. & AVASHIA, N. 2013. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133, 1-4.
- GAUSTAD, P. 2001. Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier *Tidsskriftet*, 121:3090-4.
- GENEIOUS. *Golden Gate Cloning* [Online]. Available: <https://www.geneious.com/tutorials/golden-gate-cloning/> [Accessed 02.04.2020].
- GILMAN A., G. E. A. 1996. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York.
- GOLDSTEIN, B. P. 2014. Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot (Tokyo)*, 67, 625-30.
- GUERILLOT, R., GONCALVES DA SILVA, A., MONK, I., GIULIERI, S., TOMITA, T., ALISON, E., PORTER, J., PIDOT, S., GAO, W., PELEG, A. Y., SEEMANN, T., STINEAR, T. P. & HOWDEN, B. P. 2018. Convergent Evolution Driven by Rifampin Exacerbates the Global Burden of Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mSphere*, 3.
- HAAG, A. F. & BAGNOLI, F. 2017. The Role of Two-Component Signal Transduction Systems in *Staphylococcus aureus* Virulence Regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 409, 145-198.
- HAWKINS, J. S., WONG, S., PETERS, J. M., ALMEIDA, R. & QI, L. S. 2015. Targeted Transcriptional Repression in Bacteria Using CRISPR Interference (CRISPRi). *Methods Mol Biol*, 1311, 349-62.
- HEGGENHOUGEN, M. 2019. *A penicillin resistant Streptococcus pneumoniae in the making: characterizing resistance development and cell fitness after acquiring low-affinity penicillinbinding proteins and a mosaic MurM*. Master Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet
- HORSBURGH, M. J., AISH, J. L., WHITE, I. J., SHAW, L., LITHGOW, J. K. & FOSTER, S. J. 2002. sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol*, 184, 5457-67.
- HOWDEN, B. P., DAVIES, J. K., JOHNSON, P. D., STINEAR, T. P. & GRAYSON, M. L. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 23, 99-139.
- HOWDEN, B. P., STINEAR, T. P., ALLEN, D. L., JOHNSON, P. D., WARD, P. B. & DAVIES, J. K. 2008. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene *graS* that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 3755-62.
- ILLUMINA.COM. 2020. *Introduction to SBS Technology* [Online]. illumina.com. Available: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html> [Accessed 13.04.2020].
- JAMUAR, S., D'GAMA, A., WALSH, C. 2016. Somatic Mosaicism and Neurological Diseases. *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*.

Referanser

- JARICK, M., BERTSCHE, U., STAHL, M., SCHULTZ, D., METHLING, K., LALK, M., STIGLOHER, C., STEGER, M., SCHLOSSER, A. & OHLSEN, K. 2018. The serine/threonine kinase Stk and the phosphatase Stp regulate cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 8, 13693.
- JOHN, J., GEORGE, S., NORI, S. R. C. & NELSON-SATHI, S. 2019. Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol Evol*, 11, 2917-2926.
- KICK, L., KIRCHNER, M. & SCHNEIDER, S. 2017. CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials. *Bioengineered*, 8, 280-286.
- KIRST, H. A., THOMPSON, D. G. & NICAS, T. I. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 1303-4.
- KOEHL, J. L., MUTHAIYAN, A., JAYASWAL, R. K., EHLERT, K., LABISCHINSKI, H. & WILKINSON, B. J. 2004. Cell wall composition and decreased autolytic activity and lysostaphin susceptibility of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 3749-57.
- KOMATSUZAWA, H., FUJIWARA, T., NISHI, H., YAMADA, S., OHARA, M., MCCALLUM, N., BERGERBACHI, B. & SUGAI, M. 2004. The gate controlling cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 53, 1221-31.
- KOPP, U., ROOS, M., WECKE, J. & LABISCHINSKI, H. 1996. Staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge biosynthesis: a novel antistaphylococcal target? *Microb Drug Resist*, 2, 29-41.
- KURODA, M., SEKIZUKA, T., MATSUI, H., OHSUGA, J., OHSHIMA, T. & HANAOKI, H. 2019. IS256-Mediated Overexpression of the WalkR Two-Component System Regulon Contributes to Reduced Vancomycin Susceptibility in a *Staphylococcus aureus* Clinical Isolate. *Front Microbiol*, 10, 1882.
- KUSSMANN, M., KARER, M., OBERMUELLER, M., SCHMIDT, K., BAROUSCH, W., MOSER, D., NEHR, M., RAMHARTER, M., POEPL, W., MAKRISTATHIS, A., WINKLER, S., THALHAMMER, F., BURGMANN, H. & LAGLER, H. 2018. Emergence of a dalbavancin induced glycopeptide/lipoglycopeptide non-susceptible *Staphylococcus aureus* during treatment of a cardiac device-related endocarditis. *Emerg Microbes Infect*, 7, 202.
- LAMERS, R. P., MUTHUKRISHNAN, G., CASTOE, T. A., TAFUR, S., COLE, A. M. & PARKINSON, C. L. 2012. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. *BMC Evol Biol*, 12, 171.
- LARSON, M. H., GILBERT, L. A., WANG, X., LIM, W. A., WEISSMAN, J. S. & QI, L. S. 2013. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc*, 8, 2180-96.
- LEE, J. Y. H., MONK, I. R., GONCALVES DA SILVA, A., SEEMANN, T., CHUA, K. Y. L., KEARNS, A., HILL, R., WOODFORD, N., BARTELS, M. D., STROMMENDER, B., LAURENT, F., DODEMONT, M., DEPLANO, A., PATEL, R., LARSEN, A. R., KORMAN, T. M., STINEAR, T. P. & HOWDEN, B. P. 2018. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. *Nat Microbiol*, 3, 1175-1185.
- LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, C. Y. & KIM, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*.
- LEVINE, D. P. 2006. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis*, 42 Suppl 1, S5-12.
- LIEW, A. T. F., THEIS, T., JENSEN, S. O., GARCIA-LARA, J., FOSTER, S. J., FIRTH, N., LEWIS, P. J. & HARRY, E. J. 2011. A simple plasmid-based system that allows rapid generation of tightly controlled gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 157, 666-676.
- LINDSAY, J. A. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 300, 98-103.
- LIU, X., GALLAY, C., KJOS, M., DOMENECH, A., SLAGER, J., VAN KESSEL, S. P., KNOOPS, K., SORG, R. A., ZHANG, J. R. & VEENING, J. W. 2017. High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Syst Biol*, 13, 931.
- LIU, X., KIMMEY, J. M., DE BAKKER, V., NIZET, V. & VEENING, J.-W. 2020. Exploration of bacterial bottlenecks and *Streptococcus pneumoniae* pathogenesis by CRISPRi-seq.

- LORENZ, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, e3998.
- LOWY, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339, 520-32.
- MANARA, S., PASOLLI, E., DOLCE, D., RAVENNI, N., CAMPANA, S., ARMANINI, F., ASNICAR, F., MENGONI, A., GALLI, L., MONTAGNANI, C., VENTURINI, E., ROTA-STABELLI, O., GRANDI, G., TACCETTI, G. & SEGATA, N. 2018. Whole-genome epidemiology, characterisation, and phylogenetic reconstruction of *Staphylococcus aureus* strains in a paediatric hospital. *Genome Med*, 10, 82.
- MATSUO, M., CUI, L., KIM, J. & HIRAMATSU, K. 2013. Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 5843-53.
- MATUSZEWSKA, M., MURRAY, G. G. R., HARRISON, E. M., HOLMES, M. A. & WEINERT, L. A. 2020. The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*.
- MCCURDY, S. P., JONES, R. N., MENDES, R. E., PUTTAGUNTA, S. & DUNNE, M. W. 2015. *In Vitro* Activity of Dalbavancin against Drug-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from a Global Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 5007-9.
- MCGUINNESS, W., MALACHOWA, N., DELEO, F. 2017. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med*, 90(2).
- MEESKE, A. J., RILEY, E. P., ROBINS, W. P., UEHARA, T., MEKALANOS, J. J., KAHNE, D., WALKER, S., KRUSE, A. C., BERNHARDT, T. G. & RUDNER, D. Z. 2016. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature*, 537, 634-638.
- MERCK 2013. User Guide, CellASIC® ONIX B04A-03 Microfluidic Bacteria Plates.
- MILLER, W. R., BAYER, A. S. & ARIAS, C. A. 2016. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6.
- MISSIAKAS, D. M. & SCHNEEWIND, O. 2013. Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 9, Unit 9C 1.
- MONK, I. R., TREE, J. J., HOWDEN, B. P., STINEAR, T. P. & FOSTER, T. J. 2016. Erratum for Monk et al., Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *mBio*, 7, e00171.
- MUNCH, D., ROEMER, T., LEE, S. H., ENGESER, M., SAHL, H. G. & SCHNEIDER, T. 2012. Identification and *in vitro* analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*, 8, e1002509.
- MUNITA, J. M. & ARIAS, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4.
- NAKAKIDO, M., AIKAWA, C., NAKAGAWA, I. & TSUMOTO, K. 2014. The staphylococcal elastin-binding protein regulates zinc-dependent growth/biofilm formation. *J Biochem*, 156, 155-62.
- NCI. *Glycopeptide antibiotic* [Online]. National Cancer Institute Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/glycopeptide-antibiotic> [Accessed 27.04.2020].
- NOVICK, R. P. & GEISINGER, E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet*, 42, 541-64.
- NOVICK, R. P., ROSS, H. F., PROJAN, S. J., KORNBLUM, J., KREISWIRTH, B. & MOGHAZEH, S. 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *The EMBO*, 12, 3967-3975.
- O'GARA, J., P. 2017. Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonisation to life-threatening infections. *Environmental Microbiology*, 19, 3823-3833.
- O'NEILL, J. 2014. Review on Antimicrobial Resistance. In: GOVERNMENT, H. (ed.) *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*.
- OCHOA, G., CHRISTIE, L. A., BROWNLEE, A. E. & HOYLE, A. 2020. Multi-objective evolutionary design of antibiotic treatments. *Artif Intell Med*, 102, 101759.
- OOGAI, Y., MATSUO, M., HASHIMOTO, M., KATO, F., SUGAI, M. & KOMATSUZAWA, H. 2011. Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Appl Environ Microbiol*, 77, 8097-105.

Referanser

- PANDEY, N., CASCELLA, M. 2019. Beta Lactam Antibiotics.
- PEACOCK, S. J. & PATERSON, G. K. 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 84, 577-601.
- PERICHON, B. & COURVALIN, P. 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 4580-7.
- QI, L. S., LARSON, M. H., GILBERT, L. A., DOUDNA, J. A., WEISSMAN, J. S., ARKIN, A. P. & LIM, W. A. 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152, 1173-83.
- QIAGEN 2005. QIAGEN® Plasmid Purification Handbook.
- RAUSCH, M., DEISINGER, J. P., ULM, H., MULLER, A., LI, W., HARDT, P., WANG, X., LI, X., SYLVESTER, M., ENGESER, M., VOLLMER, W., MULLER, C. E., SAHL, H. G., LEE, J. C. & SCHNEIDER, T. 2019. Coordination of capsule assembly and cell wall biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun*, 10, 1404.
- RAYNER, C. & MUNCKHOF, W. J. 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Intern Med J*, 35 Suppl 2, S3-16.
- RENNIE, R. P., KOETH, L., JONES, R. N., FRITSCH, T. R., KNAPP, C. C., KILLIAN, S. B. & GOLDSTEIN, B. P. 2007. Factors influencing broth microdilution antimicrobial susceptibility test results for dalbavancin, a new glycopeptide agent. *J Clin Microbiol*, 45, 3151-4.
- SANTIAGO, M., MATANO, L. M., MOUSSA, S. H., GILMORE, M. S., WALKER, S. & MEREDITH, T. C. 2015. A new platform for ultra-high density *Staphylococcus aureus* transposon libraries. *BMC Genomics*, 16, 252.
- SASS, P., JANSEN, A., SZEKAT, C., SASS, V., SAHL, H. G. & BIERBAUM, G. 2008. The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol*, 8, 186.
- SCHEFFERS, D. J. & PINHO, M. G. 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 585-607.
- SCHOALES, J. 2015. *How Does Sanger Sequencing Work?* [Online]. thermofisher.com. Available: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-does-sanger-sequencing-work/> [Accessed 13.04.2020].
- SCIENTIFIC, T. 2009. *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual*
- SHOJI, M., CUI, L., IIZUKA, R., KOMOTO, A., NEOH, H. M., WATANABE, Y., HISHINUMA, T. & HIRAMATSU, K. 2011. *walk* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3870-81.
- SIEVERT, D. M., RUDRIK, J. T., PATEL, J. B., MCDONALD, L. C., WILKINS, M. J. & HAGEMAN, J. C. 2008. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. *Clin Infect Dis*, 46, 668-74.
- SMITH, J. R., ROBERTS, K. D. & RYBAK, M. J. 2015. Dalbavancin: A Novel Lipoglycopeptide Antibiotic with Extended Activity Against Gram-Positive Infections. *Infect Dis Ther*, 4, 245-58.
- SOMERVILLE, G. A. & PROCTOR, R. A. 2009. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73, 233-48.
- SONG, Y., LUNDE, C. S., BENTON, B. M. & WILKINSON, B. J. 2013a. Studies on the mechanism of telavancin decreased susceptibility in a laboratory-derived mutant. *Microb Drug Resist*, 19, 247-55.
- SONG, Y., RUBIO, A., JAYASWAL, R. K., SILVERMAN, J. A. & WILKINSON, B. J. 2013b. Additional routes to *Staphylococcus aureus* daptomycin resistance as revealed by comparative genome sequencing, transcriptional profiling, and phenotypic studies. *PLoS One*, 8, e58469.
- STAMSÅS, G. A., MYRBRÅTEN, I. S., STRAUME, D., SALEHIAN, Z., VEENING, J. W., HÅVARSTEIN, L. S. & KJOS, M. 2018. CozEa and CozEb play overlapping and essential roles in controlling cell division in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 109, 615-632.
- STOCK, A. M., ROBINSON, V. L. & GOUDREAU, P. N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215.

- SUJATHA, S. & PRAHARAJ, I. 2012. Glycopeptide resistance in gram-positive cocci: a review. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2012, 781679.
- TACCONELLI, E., CARRARA, E., SAVOLDI, A., HARBARTH, S., MENDELSON, M., MONNET, D. L., PULCINI, C., KAHLMEYER, G., KLUYTMANS, J., CARMELI, Y., OUELLETTE, M., OUTTERSON, K., PATEL, J., CAVALERI, M., COX, E. M., HOUCHEMS, C. R., GRAYSON, M. L., HANSEN, P., SINGH, N., THEURETZBACHER, U., MAGRINI, N., ABODERIN, A. O., AL-ABRI, S. S., AWANG JALIL, N., BENZONANA, N., BHATTACHARYA, S., BRINK, A. J., BURKERT, F. R., CARS, O., CORNAGLIA, G., DYAR, O. J., FRIEDRICH, A. W., GALES, A. C., GANDRA, S., GISKE, C. G., GOFF, D. A., GOOSSENS, H., GOTTLIEB, T., GUZMAN BLANCO, M., HRYNIEWICZ, W., KATTULA, D., JINKS, T., KANJ, S. S., KERR, L., KIENY, M.-P., KIM, Y. S., KOZLOV, R. S., LABARCA, J., LAXMINARAYAN, R., LEDER, K., LEIBOVICI, L., LEVY-HARA, G., LITTMAN, J., MALHOTRA-KUMAR, S., MANCHANDA, V., MOJA, L., NDOYE, B., PAN, A., PATERSON, D. L., PAUL, M., QIU, H., RAMON-PARDO, P., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., SANGUINETTI, M., SENGUPTA, S., SHARLAND, M., SI-MEHAND, M., SILVER, L. L., SONG, W., STEINBAKK, M., THOMSEN, J., THWAITES, G. E., VAN DER MEER, J. W. M., VAN KINH, N., VEGA, S., VILLEGAS, M. V., WECHSLER-FÖRDÖS, A., WERTHEIM, H. F. L., WESANGULA, E., WOODFORD, N., YILMAZ, F. O. & ZORZET, A. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18, 318-327.
- TAN, S. Z., REISCH, C. R. & PRATHER, K. L. J. 2018. A Robust CRISPR Interference Gene Repression System in *Pseudomonas*. *J Bacteriol*, 200.
- TONG, S. Y., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L. & FOWLER, V. G., JR. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28, 603-61.
- UIO. 2011. *Gelelektroforese* [Online]. Institutt for Biovitenskap Available: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gelelektrofor.html> [Accessed 04.02.2020].
- UNIPROT. *UniProtKB - Q2FZ59 (Q2FZ59_STAA8)* [Online]. UniProt.org Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q2FZ59> [Accessed 28.04.2020].
- UNIPROT. 2009. *P55342 (BSHC_BACSU)* [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/P55342> [Accessed 07.05.2020].
- VALENTINO, M. D., FOULSTON, L., SADAKA, A., KOS, V. N., VILLET, R. A., SANTA MARIA, J., JR., LAZINSKI, D. W., CAMILLI, A., WALKER, S., HOOPER, D. C. & GILMORE, M. S. 2014. Genes contributing to *Staphylococcus aureus* fitness in abscess- and infection-related ecologies. *mBio*, 5, e01729-14.
- VAN HAL, S. J., JENSEN, S. O., VASKA, V. L., ESPEDIDO, B. A., PATERSON, D. L. & GOSBELL, I. B. 2012. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev*, 25, 362-86.
- VAZYMEBIOTECH. 2015. *Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase* [Online]. Vazyme Available: http://www.vazymebiotech.com/products_detail/productId=119.html [Accessed 05.02.2020].
- VILLANUEVA, M., GARCIA, B., VALLE, J., RAPUN, B., RUIZ DE LOS MOZOS, I., SOLANO, C., MARTI, M., PENADES, J. R., TOLEDO-ARANA, A. & LASA, I. 2018. Sensory deprivation in *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun*, 9, 523.
- WALTERS, M. S., EGGERS, P., ALBRECHT, V., TRAVIS, T., LONSWAY, D., HOVAN, G., TAYLOR, D., RASHEED, K., LIMBAGO, B. & KALLEN, A. 2015. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64, 1056.
- WATANABE, Y., CUI, L., KATAYAMA, Y., KOZUE, K. & HIRAMATSU, K. 2011. Impact of *rpoB* mutations on reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 49, 2680-4.
- WATANAKUNAKORN, C. 1984. Mode of action and *in-vitro* activity of vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 14 Suppl D, 7-18.
- WERTH, B. J., JAIN, R., HAHN, A., CUMMINGS, L., WEAVER, T., WAALKES, A., SENGUPTA, D., SALIPANTE, S. J., RAKITA, R. M. & BUTLER-WU, S. M. 2018. Emergence of dalbavancin non-susceptible, vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) after treatment of MRSA central line-

Referanser

- associated bloodstream infection with a dalbavancin- and vancomycin-containing regimen. *Clin Microbiol Infect*, 24, 429.e1-429.e5.
- WHO 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014.
- WICHELHAUS, T. A., SCHAFFER, V., BRADE, V. & BODDINGHAUS, B. 1999. Molecular characterization of *rpoB* mutations conferring cross-resistance to rifamycins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 2813-6.
- WILKENS, S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7, 14.
- YOO, J. I., KIM, J. W., KANG, G. S., KIM, H. S., YOO, J. S. & LEE, Y. S. 2013. Prevalence of amino acid changes in the *yyqF*, *vraSR*, *graSR*, and *tcaRAB* genes from vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol*, 51, 160-5.
- ZAW, M. T., EMRAN, N. A. & LIN, Z. 2018. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Public Health*, 11, 605-610.
- ZHANEL, G. G., CALIC, D., SCHWEIZER, F., ZELENITSKY, S., ADAM, H., LAGACE-WIENS, P. R., RUBINSTEIN, E., GIN, A. S., HOBAN, D. J. & KARLOWSKY, J. A. 2010. New lipoglycopeptides: a comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin. *Drugs*, 70, 859-86.
- ZHOU, X. & LI, Y. 2015. *Atlas of Oral Microbiology. From Healthy Microflora to Disease*, Academic Press, Elsevier Inc.
- ZHU, W., CLARK, N. & PATEL, J. B. 2013. pSK41-like plasmid is necessary for Inc18-like *vanA* plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 212-9.
- ZIASISTANI, M., SHAKIBAIE, M. R. & KALANTAR-NEYESTANAKI, D. 2019. Genetic characterization of two vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Kerman, Iran. *Infect Drug Resist*, 12, 1869-1875.

Vedlegg

Vedlegg A – Primerliste

Liste over primere som ble konstruert/benyttet i dette arbeidet finnes i Tabell A.1.

Tabell A.1 Liste over primere som ble konstruert/benyttet i dette arbeidet, med en kort beskrivelse og oligonukleotidsekvens (5'-3').

| Navn | Beskrivelse | Sekvens | Referanse |
|-------|-------------------|---|----------------|
| AHF13 | kapB_up_F_bsaI | TTGGCAGGTCTCCCTATgccaagcccagaataatgtaat | Dette arbeidet |
| AHF14 | kapB_up_R_bsaI | TTGGCAGGTCTCCGgacgtgtttcttatttaaataacttctg | Dette arbeidet |
| AHF15 | aad9_F_bsaI | TTGGCAGGTCTCGgtcCCCACCTAGGATCGAATCCC | Dette arbeidet |
| AHF16 | aad9_R_bsaI | TTGGCAGGTCTCGgCGAGGCCGCGGTAATAAAC | Dette arbeidet |
| AHF17 | kapB_down_F_bsaI | TTGGCAGGTCTCCTCGcctcccttaaaagtatgtaatatatgtatca | Dette arbeidet |
| AHF18 | kapB_down_R_bsaI | TTGGCAGGTCTCCCTGctaaaaacataaaaagcaacctcaactat | Dette arbeidet |
| AHF19 | aroC_up_F_bsaI | TGTCGAGGTCTCCCTATcatgcatgttgtaatgtagtgatcaa | Dette arbeidet |
| AHF20 | aroC_up_R_bsaI | TGTCGAGGTCTCCATcaacaagaacaattgaggtgtaatcatg | Dette arbeidet |
| AHF21 | aad9_F_bsaI | TGTCGAGGTCTCctgATTGGGCCACCTAGGATCG | Dette arbeidet |
| AHF22 | aad9_R_bsaI | TGTCGAGGTCTCctACTATGCGGCCGCTCG | Dette arbeidet |
| AHF23 | aroC_down_F_bsaI | TGTCGAGGTCTCGAGTcacactcgtcctttcatactt | Dette arbeidet |
| AHF24 | aroC_down_R_bsaI | TGTCGAGGTCTCGCTGCcagcaccagtgttcgcaat | Dette arbeidet |
| MK25 | pCG248_r_check | AAATCTCGAAAATAATAGAGGGA | Morten Kjos |
| MK26 | pCG248_f_up_check | GGATAACCGTATTACCGCCT | Morten Kjos |
| IM156 | pMAD_check_F | AATCTAGCTAATGTTACGTTACA | Ine Myrbråten |
| MK177 | pMAD_check_R | GATGCCCGCGGAAGCGAG | Morten Kjos |
| MK182 | 0948_up_F_check | GCAAATAACGCTGGCACTTC | Morten Kjos |
| MK187 | 0948_down_R_check | CAAACATTTATCGTTGTAATACGT | Morten Kjos |
| MK389 | seq_in_aad_rev | ACCGTTAGCGTTTAAAGTACATC | Morten Kjos |
| MK422 | rpoB_up_F | GTAACCGTAGAACTACGCGAG | Morten Kjos |
| MK423 | rpoB_down_R | CATCAATAAAATTCAGCTTAGTATC | Morten Kjos |
| MK424 | rpoB_seq1 | GAGTGGTTCCTAAGAGAAGG | Morten Kjos |
| MK425 | rpoB_seq2 | TAGCGTTATAGACGAGCCAG | Morten Kjos |
| MK426 | rpoB_seq3 | GTTTCAGCAGCGACAGCATG | Morten Kjos |
| MK427 | rpoB_seq4 | GTGATAAGATGTGTGGTTCGAC | Morten Kjos |

Vedlegg B – Stammeliste

Liste over relevante *S. aureus*-stammer konstruert i dette arbeidet finnes i Tabell B.1.

Tabell B.1 Liste over relevante *S. aureus*-stammer konstruert i dette arbeidet.

| Stamme | Genotype og karakteristik | Referanse |
|---------|--|----------------|
| AHF1008 | MK1465 + pVL2336-sgRNA (htpASR). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF1009 | MK1465 + pVL2336-sgRNA (graXRS). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF1010 | MK1465 + pVL2336-sgRNA (pCG248). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2021 | MH225 + pVL2336-sgRNA (vraUTSR). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2022 | MH225 + pVL2336-sgRNA (MW1206-9). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2023 | MH225 + pVL2336-sgRNA (phoP). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2024 | MH225 + pVL2336-sgRNA (srrA). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2025 | MH225 + pVL2336-sgRNA (saeQRS). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2026 | MH225 + pVL2336-sgRNA (hssRS). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2027 | MH225 + pVL2336-sgRNA (kdpD). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2028 | MH225 + pVL2336-sgRNA (lytSR). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2029 | MH225 + pVL2336-sgRNA (arIR). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2030 | MH225 + pVL2336-sgRNA (airS). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2031 | MH225 + pVL2336-sgRNA (agrA). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2032 | MH225 + pVL2336-sgRNA (nreBC). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2033 | MH225 + pVL2336-sgRNA (nsaR). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2034 | MH225 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_02658). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2035 | MH225 + pVL2336-sgRNA (walRK). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2036 | MH266 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_02658). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2037 | IM287 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_02658). Spc ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2054 | MH225 + pVL2336-sgRNA (kapB). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2055 | MH225 + pVL2336-sgRNA (csa1A). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2056 | MH225 + pVL2336-sgRNA (ezrA). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2057 | MH225 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_02383). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2058 | MH225 + pVL2336-sgRNA (pstS). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2059 | MH225 + pVL2336-sgRNA (rpsF). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2060 | MH225 + pVL2336-sgRNA (vraF). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2061 | MH225 + pVL2336-sgRNA (nrdF). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2062 | MH225 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_02810). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2063 | MH225 + pVL2336-sgRNA (prs). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2064 | MH225 + pVL2336-sgRNA (pbp4). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2065 | MH225 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_02447). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| AHF2066 | MH225 + pVL2336-sgRNA (SAOUHSC_00867). Ery ^R , Cam ^R . | Dette arbeidet |
| MK1718 | NCTC8325-4 Δ kapB::spc. Spc ^R | Dette arbeidet |
| MK1721 | NCTC8325-4 Δ aroC::spc. Spc ^R | Dette arbeidet |

Ery^R = erytromycinresistent, Cam^R = kloramfenikolresistent, Spc^R = spektinomycinresistent

Vedlegg C – Forkortelser

| | |
|---------------------|--|
| ABC-transporter | ATP-bindende kassett-transporter |
| Cas9 | CRISPR-associated protein 9 |
| cAMP | Syklisk AMP |
| CP | Kapsulært polysakkarid |
| CRISPR | Clustered regularly interspersed short palindromic repeats |
| CRISPRi | CRISPR interference |
| CRISPRi-sek | Sekvensering av CRISPRi-biblioteket |
| ddNTP | Di-deoksyribonukleotridfosfat |
| dNTP | Deoksyribonukleotridfosfat |
| F6P | Fruktose-6-fosfat |
| GlcN6P | Glukosamin-6-fosfat |
| GlcNac | <i>N</i> -acetylglukosamin |
| HK | Histidin protein kinase |
| Log ₂ FC | Log-(2)-fold change |
| MIC | Minimum inhibition concentration |
| MRSA | Methicillin-resistent <i>S. aureus</i> |
| MSSA | Methicillin-mottakelig <i>S. aureus</i> |
| MurNAc | <i>N</i> -acetylmuramic |
| NGS | Neste-generasjons sekvenseringsteknologi |
| PAM | Proto-spacer nærliggende motiv |
| PBP | Penicillin-bindende proteiner |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| pLOW | Low-copy-number plasmid |
| RR | Respons-regulator |
| SAB | <i>S. aureus</i> bakteriemi |
| SCCmec | Stafylokokk-kassett kromosom mec |
| sgRNA | Single-guide-RNA |
| TCS | To-komponent system |
| VISA | Vancomycin-intermediær <i>S. aureus</i> |
| VRE | Vancomycin-resistente enterokokker |
| VRSA | Vancomycin-resistent <i>S. aureus</i> |



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway