



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Rensing og karakterisering av colwellicin, et antimikrobielt stoff isolert fra *Shewanella colwelliana***

Purification and characterization of colwellicin, an antimicrobial compound isolated from *Shewanella colwelliana*

Jeanette Stenersen Fonn

Bioteknologi

## **Forord**

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av masterprogrammet ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Arbeidet ble utført i samarbeid med molekylær mikrobiologi gruppen i perioden august 2019 til juni 2020.

Jeg vil takke hovedveileder Prof. Leiv Sigve Håvarstein for mye god hjelp under skriveprosessen, og for nyttige tips og forslag med det praktiske arbeidet. Jeg har satt stor pris på tilbakemeldingene dine. Jeg vil også takke medveileder Dr. Daniel Straume for gode råd, støtte og ikke mist for all hjelpen jeg har fått med laboratoriearbeidet og tips under skriveprosessen. Det har vært til stor nytte og jeg har lært masse.

I tillegg vil jeg takke hele molekylær mikrobiologi gruppen for at de har vært veldig imøtekommende og hjelpsomme. De har bidratt med gode forslag, historier og støtte som jeg har satt stor pris på. Jeg vil også takke mine medmasterstudenter Ingvild Hals Hauge, Anette Heidal Frøynes og Marita Torrissen Mårli for god støtte, morsomme øyeblikk og for at jeg kunne dele spørsmål og svar med dem.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtte og oppmuntring i løpet av studiet.

Jeanette Stenersen Fonn

Ås, juni 2020

## Sammendrag

Da antibiotika ble introdusert på markedet, gav det håp om at infeksjøs sykdommer kunne bli bekjempet en gang for alle. Denne optimismen ble etter hvert overskygget av et økende antibiotikaresistensproblem. Resistensproblemet skyldes i stor grad et stort og ukritisk forbruk av antibiotika, noe som har skapt et selektivt press for resistensutvikling. For å bekjempe resistensproblemet er det viktig å begrense antibiotikaforbruket og å hindre smittespredning. I tillegg er det viktig å utvikle nye antibiotika. En mulig kilde til nye antibiotika kan være marine bakterier. Bakterier som vokser på overflater i marine miljøer har stor biodiversitet og levetilstandene er preget av sterk konkurranse, noe som fører til produksjon av et bredt spektrum av sekundærmetabolitter. Noen av disse kan ha antimikrobiell aktivitet og følgelig være kandidater for nye og effektive antibiotika. I denne oppgaven ble derfor marine bakterier undersøkt som en mulig kilde til nye antibiotika.

Bakterier ble isolert fra prøver tatt i Oslofjorden, og undersøkt for antimikrobiell aktivitet mot det opportunistiske patogenet *S. pneumoniae*. Ett isolat med lovende antimikrobiell aktivitet ble identifisert som *Shewanella colwelliana* ved hjelp av 16S rRNA sekvensering. *S. colwelliana* produserer et antimikrobielt stoff som ble kalt colwellicin.

Colwellicin ble forsøkt rensert til homogenitet med flere ulike metoder, men dette viste seg å være en svært vanskelig oppgave. Det ble derfor utviklet en protokoll for anrikning og delvis rensing av colwellicin. I første trinn av protokollen ble colwellicin adsorbert til Amberlite XAD1180N og deretter eluert med 100% metanol. I neste rensetrinn ble det foretatt en butanolekstraksjon, og til sist ble det benyttet en Oasis kolonne koblet til ÄKTApriime plus kromatografiinstrumentet.

Colwellicin har antimikrobiell aktivitet mot 15 ulike streptokokkarter, og mot *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* og *Staphylococcus aureus*. Det virker derfor som at colwellicin har bredspektret aktivitet mot Gram-positive bakterier. Dessverre har colwellicin også hemolytisk aktivitet, noe som begrenser bruken av stoffet ved behandling av infeksjoner.

Den eksakte virkningsmekanismen til colwellicin ble ikke klarlagt, men forsøk med sytox green og levende/død farging av *S. pneumoniae* RH14 behandlet med colwellicin tyder på at colwellicin angriper cellemembranen. Dette kan skje ved at colwellicin ødelegger integriteten til selve cellemembranen eller angriper essensielle prosesser som foregår i cellemembranen.

Karakteriseringen av colwellicin tyder også på at det antimikrobielle stoffet har surfaktantlignende egenskaper og at colwellicin sannsynligvis danner miceller.

## Abstract

Many believed that infectious diseases would be conquered after the introduction of antibiotics to the market. However, the optimism was dampened when antibiotic resistance became an increasing problem. The antibiotic resistance problem is largely caused by an excessive and uncritical use of antibiotics, which has led to a gradual selection of bacteria with increasing resistance against antibiotics. To fight antibiotic resistance, it is necessary to restrict the use of antibiotics and to minimize the spread of infections. In addition, it is necessary to develop novel antibiotics. Marine bacteria are diverse and are often in fierce competition with each other when growing for instance in biofilms. This has led to the production of a wide range of secondary metabolites, some of which might have antimicrobial activity. Consequently, this work focuses on marine bacteria as a possible source of novel and effective antibiotics.

Bacteria isolated from the Oslo fjord were screened for antimicrobial activity against the opportunistic pathogen *S. pneumoniae*. One of the isolates displayed promising antimicrobial activity against the target bacterium. Using 16S rRNA sequencing this bacterium was identified as *Shewanella colwelliana*. *S. colwelliana* produces an antimicrobial compound that was named colwellicin.

Several different methods were used in an attempt to purify colwellicin to homogeneity. This proved to be a very difficult task, but eventually a partial purification protocol was developed. The protocol begins with enrichment of colwellicin using Amberlite XAD1180N followed by concentration and purification using butanol extraction. As a last step, colwellicin is further purified with an Oasis column connected to an ÄKTAprime plus chromatography system.

Colwellicin has antimicrobial activity against 15 different streptococcal species and against *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* and *Staphylococcus aureus*.

Hence, colwellicin displays a broad spectrum of antimicrobial activity, and might be active against most Gram-positive bacteria. Unfortunately, colwellicin also has hemolytic activity, which limits the use of colwellicin in the treatment of internal infections.

During the current thesis work it was not possible to elucidate the exact mechanism of action of colwellicin, but sytox green and live/dead staining of *S. pneumoniae* RH14 treated with the antimicrobial showed that the cell membrane had been disrupted. This suggests that colwellicin attacks the integrity of the cell membrane to make it leaky or interferes with an

essential physiological process taking place in the cell membrane. Furthermore, the characterization of colwellicin suggests that it functions as a surfactant and probably forms micelles.

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Introduksjon</b> .....	1
1.1 Antibiotikaresistensproblemet og behovet for nye antibiotika.....	1
1.2 Marine bakterier som en mulig kilde til nye antibiotika .....	3
1.2.1 <i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> .....	5
1.2.2 <i>Shewanella colwelliana</i> .....	7
1.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	10
1.4 Antibiotika .....	14
1.4.1 En oversikt over ulike antibiotika .....	14
1.4.2 Resistensmekanismer .....	18
1.5 Målet med oppgaven .....	21
<b>2. Metoder</b> .....	22
2.1 Dyrkning av indikatormikroorganismer, frysestock og startkulturer .....	22
2.1.1 Dyrking av streptokokker på agarplater og i flytende kultur .....	22
2.1.2 Flytende kultur av andre indikatormikroorganismer .....	22
2.1.3 Frysestock og startkultur .....	23
2.2 Screening for bakterier som hemmer vekst av <i>S. pneumoniae</i> .....	23
2.2.1 Renkultur av marine bakterier .....	23
2.2.2 Innstøping av indikatorbakterien <i>S. pneumoniae</i> i softagar .....	23
2.2.3 Tilpasning av toppagarprotokollen til andre indikatorbakterier .....	24
2.3 Identifisering av bakterier .....	24
2.3.1 Ekstraksjon av DNA .....	24
2.3.2 Polymerase chain reaction (PCR) .....	26
2.3.3 Gelelektroforese .....	28
2.3.4 DNA sekvensering .....	29
2.4 Dyrkingsbetingelser for produksjon av antimikrobielt stoff .....	30
2.4.1 Dyrkingsbetingelser for <i>E. oxidotolerans</i> .....	30

2.4.2 Dyrkingsbetingelser for <i>S. colwelliana</i> .....	31
2.5 Rensing av colwellicin.....	31
2.5.1 Amberlite .....	32
2.5.2 Butanolekstraksjon.....	33
2.5.3 High-performance liquid chromatography (HPLC).....	34
2.5.4 Gelfiltrering.....	35
2.5.5 Ionebytterkromatografi .....	36
2.5.6 Hydrofob interaksjonskromatografi og revers fase kromatografi.....	37
2.5.7 Oasis HLB Extraction kolonne .....	39
2.5.8 Oasis og ÄKTAprime plus.....	39
2.5.9 Ammoniumsulfatutfelling.....	40
2.6 Karakterisering av colwellicin.....	41
2.6.1. Behandling av colwellicin med enzymer .....	41
2.6.2 Varmebehandling av colwellicin .....	43
2.6.3 Undersøkelse av effekten av pH på colwellicin.....	43
2.6.4 Behandling av colwellicin med ditiotreitol.....	44
2.6.5 Mikroskopi.....	44
2.6.6 Undersøkelse av colwellicins omtrentlige molekylvekt ved hjelp av filtrering.....	44
2.6.7 Dialyse .....	45
2.7 Karakterisering av colwellicins virkningsmetode .....	46
2.7.1 Relativ minimum inhibitory concentration.....	46
2.7.2 Seleksjon av mutanter med økt resistens mot colwellicin .....	46
2.7.3 Hemolyse .....	47
2.7.4 Sytox green .....	48
2.7.5 Levende/død farging .....	49
2.7.6 Massespektrometri .....	50
<b>3. Resultater .....</b>	<b>51</b>



3.1 Dyrkingsbetingelser og hemmingsaktivitet for <i>Exiguobacterium oxidotolerans</i> .....	51
3.1.1 Optimalisering av dyrkingsbetingelser for produksjon av det antimikrobielle stoffet fra bakteriekolonier .....	51
3.1.2 Produksjon av det antimikrobielle stoffet i flytende medium.....	52
3.1.3 Hemming av ulike indikatorbakterier .....	53
3.2 Screening for bakterier som hemmer vekst av <i>S. pneumoniae</i> .....	54
3.2.1 Hemming av <i>S. pneumoniae</i> .....	54
3.2.2 Identifisering av isolat 13.....	55
3.3 Hemmingsaktiviteten til colwellicin.....	55
3.3.1 Inhibering av streptokokker .....	55
3.3.2 Inhibering av andre mikroorganismer.....	57
3.4 Rensing av colwellicin.....	60
3.4.1 Amberlite XAD1180N og butanolekstraksjon.....	60
3.4.2 Rensing av colwellicin med diverse kromatografiske metoder .....	61
3.4.3 Rensing av colwellicin med Oasis®HLB Extraction Cartridge .....	69
3.5 Karakterisering av colwellicin.....	71
3.5.1 Protease- og acylasebehandlet colwellicin.....	71
3.5.2 Effekten av varmebehandling, DTT og pH på colwellicin .....	72
3.5.3 Undersøkelse av colwellicins omtrentlige molekylvekt med hjelp av filtrering .....	72
3.5.4 Dialyse av colwellicin.....	72
3.5.5 Undersøkelse av om <i>S. colwelliana</i> har nonribosomal peptide syntetases .....	73
3.6 Karakterisering av colwellicins virkningsmekanisme .....	73
3.6.1 Relativ minimum inhibitory concentration for colwellicin .....	73
3.6.2 Hemolyse .....	76
3.6.3 Seleksjon av mutanter med økt resistens mot colwellicin .....	76
3.6.4 Morfologiske forandringer i <i>S. pneumoniae</i> etter behandling med colwellicin.....	78
3.6.5 Deteksjon av cellelysis i <i>S. pneumoniae</i> behandlet med colwellicin.....	79

3.6.6 Levende/død farging av <i>S. pneumoniae</i> behandlet med colwellicin.....	80
3.6.7 Bestemmelse av massen til colwellicin med massespektrometri.....	81
<b>4. Diskusjon</b> .....	<b>83</b>
4.1 Produksjon og hemmingsaktivitet av det antimikrobielle stoffet produsert av <i>Exigobacterium oxidotolerans</i> .....	83
4.2 Colwellicin har bredspektret aktivitet mot Gram-positive bakterier .....	84
4.3 Karakterisering av colwellicin og colwellicins virkningsmekanisme .....	85
4.4 Seleksjon av mutanter med økt resistens mot colwellicin .....	88
4.5 Massen til colwellicin .....	91
4.6 Rensing av colwellicin.....	92
<b>5. Konklusjon</b> .....	<b>95</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>96</b>
<b>Vedlegg</b> .....	<b>105</b>

# 1. Introduksjon

## 1.1 Antibiotikaresistensproblemet og behovet for nye antibiotika

På starten av 1900-tallet var infeksjøs sykdommer en av de vanligste dødsårsakene, men i løpet av de påfølgende tiårene skjedde det store medisinske fremskritt som gav håp om at flere av disse sykdommene kunne bli bekjempet (Conly & Johnston, 2005). Optimismen ble hovedsakelig drevet av oppdagelsen av antibiotika under første halvdel av 1900-tallet, og i tiden etter fulgte en periode med leting etter og utvikling av slike legemidler (D'Costa et al., 2011). Dette resulterte i funnet av flere ulike antibiotikaklasser som var effektive mot mange vanlige patogener, men etter 1970-tallet har utviklingen av nye antibiotika avtatt. Samtidig som at utviklingen av nye antibiotika har avtatt, har antibiotikaresistens blitt et økende problem, og i dag er antibiotikaresistens en global trussel mot behandlingen av en rekke infeksjoner (World Health Organization, 2014).

I 2015 ble det rapportert 671 689 infeksjoner med antibiotikaresistente bakterier i Europa. Disse infeksjonene resulterte i 33 110 dødsfall, der spebarn og voksne på 65 år eller eldre ble hardest rammet. I tillegg gav infeksjonene 170 Disability-adjusted life years (DALYs) per 100 000 innbyggere (Cassini et al., 2019). Globalt dør omtrentlig 700 000 hvert år som følge av infeksjoner med antibiotikaresistente bakterier, og prognoser for 2050 viser at antallet kommer til å øke kraftig. I år 2050 anslås det at 10 millioner vil dø av antibiotikaresistente infeksjoner, og i Europa alene vil antall dødsfall øke fra 33 110 i 2015 til 390 000 dødsfall i 2050 (Dadgostar, 2019). Antibiotikaresistens er også en økonomisk byrde. Det er estimert at det globale økonomiske tapet grunnet resistens i perioden 2015 til 2050 kan bli 85 billioner dollar i bruttonasjonalprodukt (BNP), og innen 2050 kan det i global BNP koste fra 1% til 3,8%, der lav-inntekts land vil bli hardest rammet (Ahmed et al., 2017).

Verdens helseorganisasjon (WHO) har lagd en liste over hvilke antibiotikaresistente bakterier som utgjør den største helsetrusselen. Listen er delt opp i 3 prioriteringsgrader basert på om behovet for nye antibiotika er kritisk, høyt eller middels, og den kan fungere som en slags guide for hvilke bakterier det burde fokuseres på under forskning og utvikling av nye antibiotika. Den fullstendige listen er vist i Tabell 1.1. Multiresistent *Mycobacterium*

*tuberculosis* er ikke med i listen fordi den i lengre tid har blitt prioritert, og bakterien er allerede med i flere dedikerte programmer (Tacconelli et al., 2018).

Tabell 1.1 WHO's prioriteringsliste for forskning og utvikling av nye antibiotika mot antibiotikaresistente bakterier. I tillegg er multiresistent *Mycobacterium tuberculosis* høyt prioritert.

Prioritet	Bakterie	Antibiotikaresistens
1: Kritisk	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Karbapenemresistent
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Karbapenemresistent
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Karbapenemresistent, Tredjegerasjons cefalosporinresistent
2: Høy	<i>Enterococcus faecium</i>	Vankomycinresistent
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillinresistent, Vankomycinresistent
	<i>Helicobacter pylori</i>	Klarithromycinresistent
	<i>Campylobacter spp</i>	Fluorokinolonresistent
	<i>Salmonellae</i>	Fluorokinolonresistent
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tredjegerasjons cefalosporinresistent, Fluorokinolonresistent
3: Middels	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ikke-sensitiv mot penicillin
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillinresistent
	<i>Shigella spp.</i>	Fluorokinolonresistent

Listen inneholder bakterier som fører til infeksjoner både i samfunnet og på sykehus. Et eksempel på en bakterie som vanligvis smitter i samfunnet er *Streptococcus pneumoniae*. Infeksjoner forårsaket av *S. pneumoniae* ble i mange år behandlet med penicillin, og på 1940-tallet, da penicillin ble introdusert på markedet, var bakterien sensitiv for antibiotikumet. Når pneumokokker ble utsatt for antibiotika, som for eksempel penicillin og andre  $\beta$ -laktamer, førte dette til et selektivt press som favoriserte enkeltbakterier som tolererte antibiotikumet bedre enn andre medlemmer av arten. Disse hadde tilfeldige mutasjoner som gjorde dem litt mer resistente enn andre pneumokokker. Når denne seleksjonsprosessen foregår over lang tid og involverer mange pasienter, vil noen pneumokokkstammer til slutt bli høyresistente. Disse resistente stammene fikk etter hvert en global distribusjon, og på slutten av 1970-tallet kom de første rapportene om resistente pneumokokkinfeksjoner (McGee & Klugman, 2017).

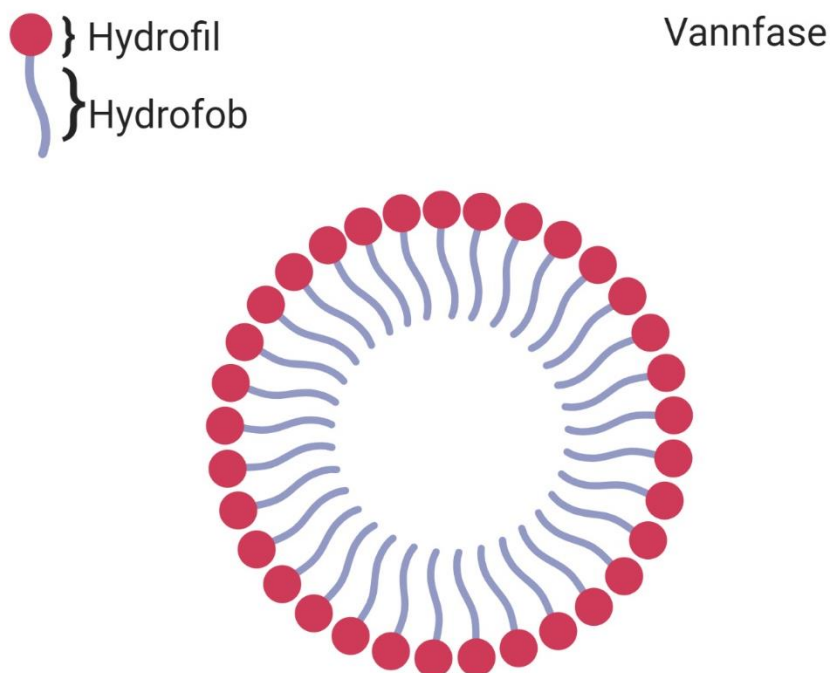
Utviklingen av resistens mot penicillin skjedde ikke ved at pneumokokker tilegnet seg genet som koder for  $\beta$ -laktamase, et enzym som hydrolyserer penicillin, men på en mer omfattende og tidkrevende måte. Penicillin-binding proteins (PBPs) er en gruppe proteiner som er involvert i de siste stegene av peptidoglykansyntesen, men de kjennetegnes også ved at de er målet for penicillin. Penicillinresistens hos *S. pneumoniae* har utviklet seg gjennom en serie mutasjoner med påfølgende horisontale DNA overføringer og genetiske rekombinasjoner, som førte til en ombygging av en eller flere av de fem penicillinbindende proteinene som syntetiserer peptidoglykandelen av celleveggen. De resulterende mosaikkgenene koder for PBPer med en lavere affinitet for penicillin, samtidig som at de har beholdt peptidoglykansyntesefunksjonen. Dette har ført til en trinnvis økning i resistens mot penicillin, som også forklarer hvorfor resistens oppsto relativt sent i pneumokokker, selv om det var et høyt selektivt press (Normark & Normark, 2002). I dag har *S. pneumoniae* utviklet økt resistens mot penicillin og andre  $\beta$ -laktamer, men også mot en rekke andre antibiotika som makrolider, linkosamider, fluorokinoloner, tetrasykliner og trimetoprim-sulfametoxazol (Cherazard et al., 2017).

## **1.2 Marine bakterier som en mulig kilde til nye antibiotika**

Marine bakterier som lever i sedimenter eller biofilmer på overflater av døde eller levende ting har stor biodiversitet, og produserer et bredt spektrum av metabolitter som kan ha biologisk eller farmasøytisk effekt. Leveforholdene er preget av sterk konkurranse mellom ulike bakteriearter, noe som gjør at mange bakterier produserer antimikrobielle stoffer som dreper andre bakterier i samme miljø (López, Cepas, & Soto, 2018). Vårt inntrykk var at marine bakterier er noe mindre undersøkt med hensyn på antibiotikaproduksjon enn terrestriske bakterier, og vi mente derfor at marine bakterier er en mulig kilde til nye og effektive antibiotika.

Flere interessante forbindelser har allerede blitt isolert fra marine bakterier, slik som biosurfaktanter som har vist antimikrobiell, anti-adhesiv og anti-biofilm aktivitet. Biosurfaktanter er amfifile molekyler produsert av mikroorganismer som senker overflatespenningen mellom to faser. Stoffgruppen omfatter flere kjemiske strukturer, og det er mulig å finne biosurfaktanter som glykolipider, lipopeptider, polysakkarid-protein

komplekser, fosfolipider, fettsyrer og nøytrale lipider (Gudiña, Teixeira, & Rodrigues, 2016). Den upolare delen av biosurfaktanten er ofte en hydrokarbonkjede, men den polare delen varierer mer, og kan være anionisk, kationisk, ikke-ioniske eller amfotær (Santos, Rufino, Luna, Santos, & Sarubbo, 2016). Når konsentrasjonen av biosurfaktanter når et visst nivå vil miceller bli dannet. Da vil de amfifile biosurfaktantene orientere seg etter fasene. Det vil si at biosurfaktanter i for eksempel en vannfase vil orientere de polare delene mot vannet, mens de upolare delene vil søke sammen og danne en upolar kjerne (Figur 1.1) (Campos et al., 2013).



Figur 1.1. Dannelse av en micelle i en vannfase. Biosurfaktantene orienterer de hydrofile delene mot vannet, mens de hydrofobe delene søker sammen.

Biosurfaktantproduserende bakterier er utbredt på både land og i vann, men de unike marine habitatene gjør marine bakterier spesielt interessante med tanke på produksjon av ikke tidligere isolerte biosurfaktanter (Gudiña et al., 2016). Bakterier bruker biosurfaktanter til å gjøre svært hydrofobe næringsstoffer mer tilgjengelige, men mange av biosurfaktantene har også en antimikrobiell effekt (Pacwa-Płociniczak, Płaza, Piotrowska-Seget, & Cameotra, 2011). Et eksempel på en slik biosurfaktant er et glykolipid isolert fra *Serratia marcescens*, som består av glukose og palmitinsyre. Glykolipidet inhiberte vekst av patogenene *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Bacillus pumilus*. I tillegg ødela biosurfaktanten

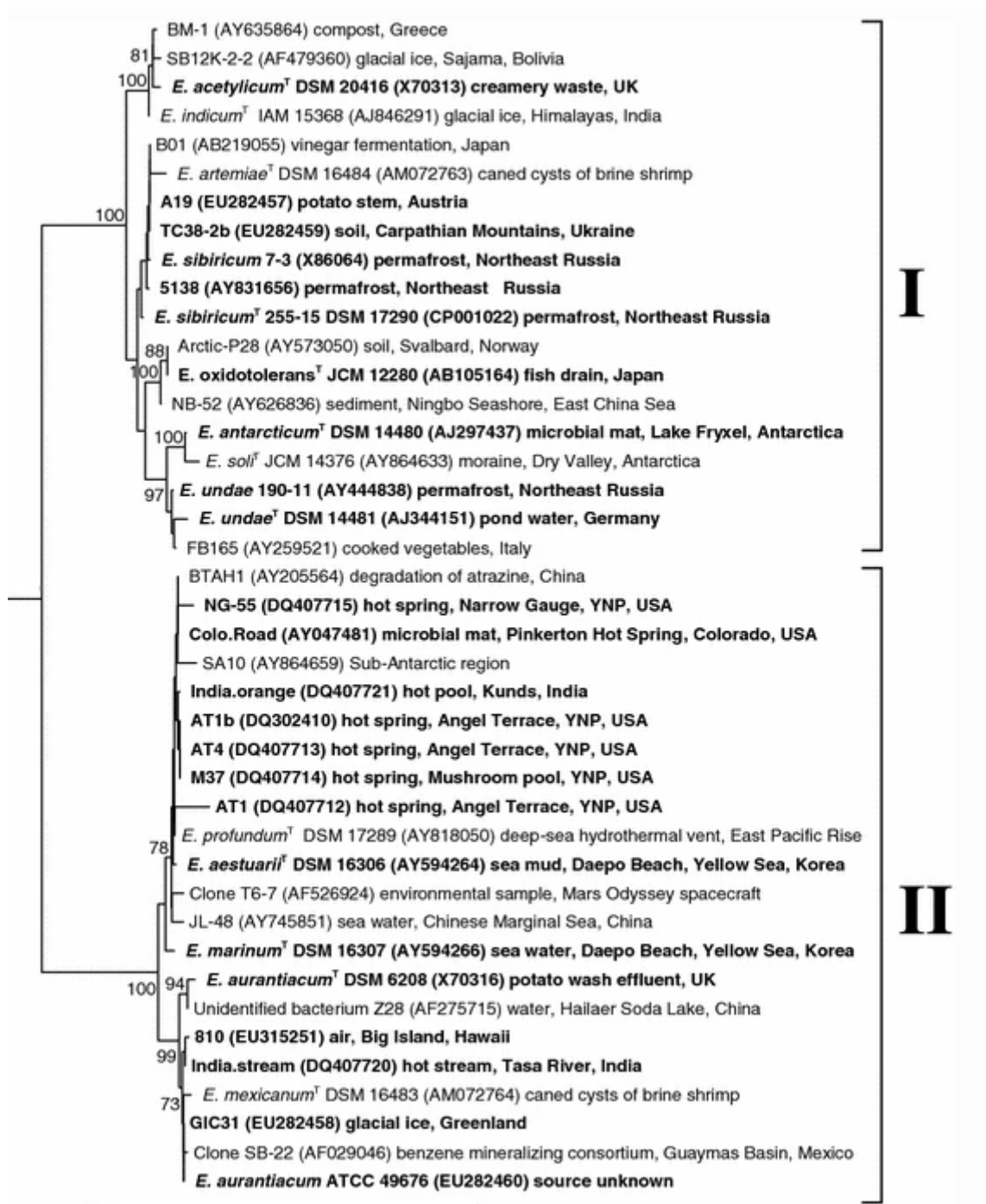
biofilmer som besto av de tre patogene, noe som gjør det til et mulig middel mot biofilmformasjon. Virkningsmekanismen til glykopeptidet er ikke kjent (Dusane et al., 2011).

Det finnes også andre eksempler på forbindelser med antimikrobiell aktivitet som har blitt isolert fra marine bakterier, slik som det antibakterielle proteinet marinocine. Proteinene ble isolert under dødsfasen til en flytende kultur med *Marinomonas mediterranea*. Bakterien er en marin bakterie som produserer melanin og en rekke andre sekundærmetabolitter. Marinocine har bredspektret aktivitet mot flere Gram-negative og Gram-positive bakterier. Dette inkluderer nosokomiale stammer fra *Pseudomonas* sp. og *Staphylococcus aureus*, som er resistente mot mange av de vanligste antibiotikaene (Lucas-Elio, Hernandez, Sanchez-Amat, & Solano, 2005). Nærmere undersøkelser av aktiviteten til marinocine viste at proteinet er en lysin oksidase og oppdagelsen førte til et navnebytte. Marinocine byttet navn til LodA, og ble beskrevet som et enzym som er spesifikk for L-lysin og det katalyserer reaksjonen  $L\text{-lysin} + O_2 + H_2O \rightarrow 2\text{-aminoadipat-6-semialdehyd} + NH_3 + H_2O_2$ . Det er produksjonen av  $H_2O_2$  som gir opphav til den antibakterielle aktiviteten (Lucas-Elío, Gómez, Solano, & Sanchez-Amat, 2006).

### **1.2.1 *Exiguobacterium oxidotolerans***

En av de antibiotikaproduserende marine bakteriene som ble studert i denne oppgaven ble bestemt til å være *Exiguobacterium oxidotolerans*. Bakterier i slekten *Exiguobacterium* er Gram-positive og fakultativt anaerobe. Slekten er en del av klassen *Bacilli* og fylumet *Firmicutes*, som har lavt GC-innhold (Collins, Lund, Farrow, & Schleifer, 1983).

*Exiguobacterium* har stor variasjon og består av psykrofile, mesofile og moderat termofile arter med ulik morfologi som finnes i flere ulike habitat. Det er mulig å finne arter fra slekten i både kalde og varme miljøer, der temperaturen kan variere fra  $-12\text{ °C}$  til  $55\text{ °C}$  (Castro-Severyn et al., 2017; Vishnivetskaya, Kathariou, & Tiedje, 2009). 16S rRNA sekvensering har vist at slekten kan deles inn i to grupper, der gruppe 1 inneholder stammer isolert fra kalde eller tempererte habitat, og gruppe 2 inneholder stammer isolert fra varme kilder eller litt basiske, marine miljøer (Figur 1.2). Det eneste unntaket i gruppe 2 er stammen GIC31, som ble isolert fra en isbre (Vishnivetskaya et al., 2009). En av artene i gruppe 1 er *E. oxidotolerans*, som først ble isolert fra et avløp hos et fiskeforedlingsanlegg i Japan. Den er en alkalifil, stavformet bakterie med peritrikke flageller. Bakterien har et høyt nivå av katalaseaktivitet, noe som er interessant for fjerning av  $H_2O_2$  (Yumoto et al., 2004).



Figur 1.2. Det fylogenetiske forholdet mellom artene i slekten *Exiguobacterium*. Slekten kan deles inn i to grupper etter hvilke habitat stammene har blitt isolert fra (Vishnivetskaya et al., 2009).

Noen arter i slekten *Exiguobacterium* produserer antimikrobielle stoffer, slik som *Exiguobacterium mexicanum*. Fire stoffer ble isolert fra *E. mexicanum* og testet mot fire humanpatogener i familien *Enterobacteriaceae*. Disse humanpatogene var *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia* og *Salmonella enterica*, og to av de isolerte stoffene

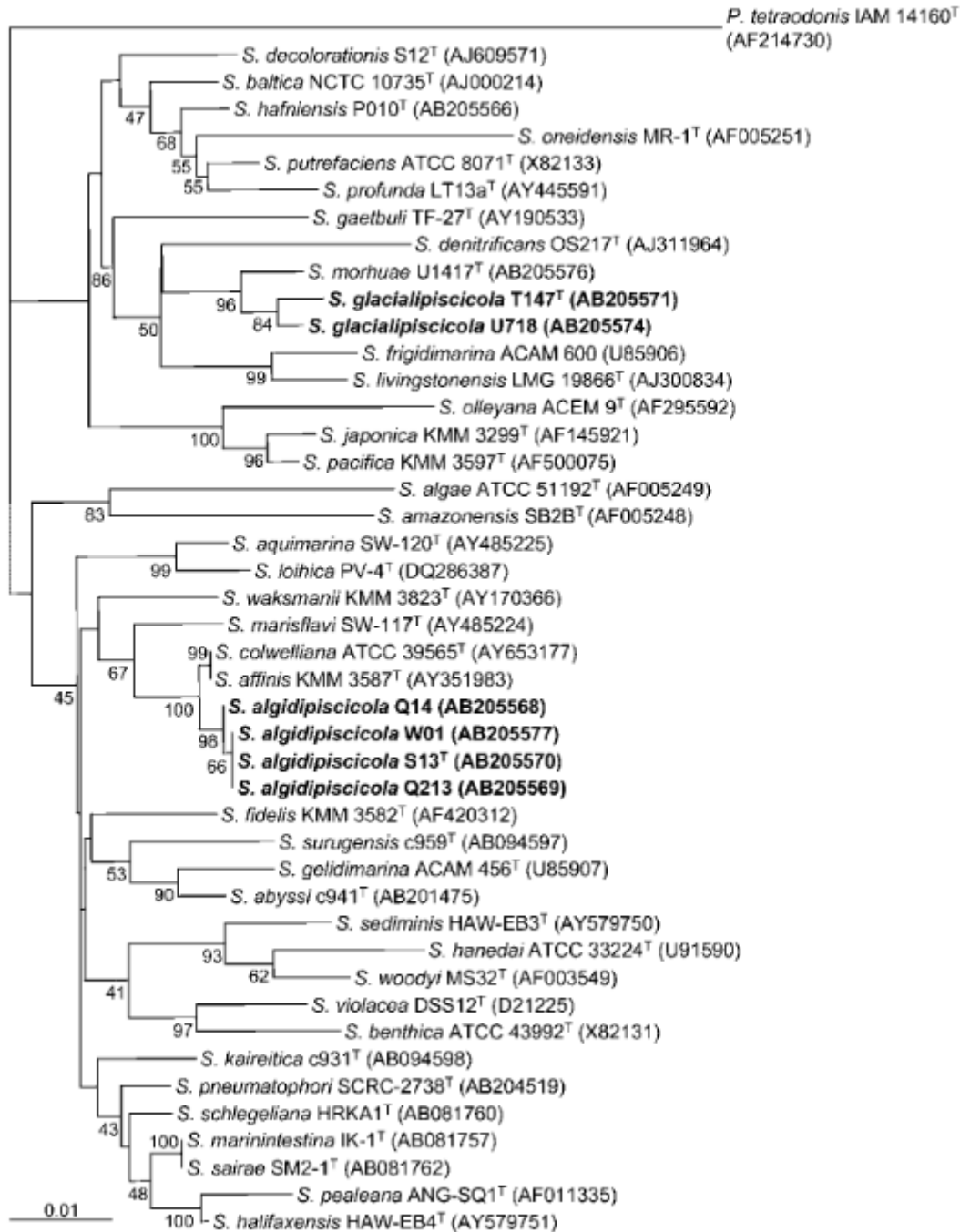


hadde en antimikrobiell effekt mot alle fire patogener. Stoffene refereres til som C3 og C4, og har blitt identifisert som henholdsvis 3,6,18-trion, 9,10-dihydro-12'-hydroksyl-2-metyl-5-(fenyl metyl) (5'-alfa, 10 alfa)-dihydroergotamin og dipropyl-, S-propyl ester (Shanthakumar et al., 2015). Virkningsmekanismen til C3 og C4 er ikke kjent.

Et annet eksempel på en art innen *Exiguobacterium* som produserer stoffer med antimikrobiell aktivitet er *Exiguobacterium acetylicum*. Stoffene hadde tidligere vist at de inhiberer vekst av fire vanlige plantepatogener: *Rhizoctoniasolani solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* og *Fusarium oxysporum* (Selvakumar et al., 2009). I tillegg har stoffene også en antimikrobakteriell effekt mot humanpatogene *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* og *Shigella dysenteriae* (Aliabadi, Ghasemi, & Isazadeh, 2014). Hverken den kjemiske strukturen eller virkningsmekanismen til stoffene er kjent.

### **1.2.2 *Shewanella colwelliana***

Den andre antibiotikaproduserende marine bakterien som ble studert i denne oppgaven ble bestemt til å være *Shewanella colwelliana*, og det antimikrobielle stoffet fikk navnet colwellicin. *Shewanella* er den eneste slekten i familien *Shewanellaceae*, som formelt ble en egen familie i 2004 etter en nærmere gjennomgang av familien *Vibrionaceae* (Figur 1.3). Slekten er medlem av klassen *Gammaproteobacteria*, og består av Gram-negative, fakultativt anaerobe, stavformede bakterier med en polar flagell. De fleste artene kan vokse ved lave temperaturer og arter innen slekten er utbredt i både salt- og ferskvannsmiljøer (Thorell, Meier-Kolthoff, Sjöling, & Martín-Rodríguez, 2019). Slekten er best kjent for sine fysiologiske og metabolske egenskaper, noe som gjør den i stand til å bruke en rekke ulike terminale elektronakseptorer under anaerob respirasjon (Hau & Gralnick, 2007). Dette har gjort det mulig for slekten å overleve i mange ulike habitater, og medlemmer av slekten har blitt funnet i havdypet og i polare områder. I tillegg er noen arter en del av mikrobiotaen til akvatiske dyr, mens andre er patogene, slik som humanpatogene *Shewanella algae* (Thorell et al., 2019).



Figur 1.3. Fylogenetisk tre for slekten *Shewanella* basert på 16S rRNA gensekvenser. *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 14160<sup>T</sup> var inkludert som en utgruppe (Satomi, Vogel, Venkateswaran, & Gram, 2007).

*S. colwelliana* tilhører slekten *Shewanella*, og den ble først isolert fra et brakkvannsanlegg for østers. I 1988 ble bakterien klassifisert som *Alteromonas* og fikk navnet *Alteromonas colwelliana*, men et år senere ble bakterien reklassifisert til *Shewanella* etter en nærmere

gjennomgang av DNA-DNA hybridisering, serologi og 5S rRNA sekvensdata (Coyne et al., 1989; Weiner, Coyne, Brayton, West, & Raiken, 1988). Bakterien ble beskrevet som en aerob havbakterie som gjennomgår en morfologisk forandring mot slutten av den eksponentielle vekstfasen eller i starten av stasjonærfasen. Den går fra å være en bevegelig, stavformet bakterie på ca. 1 µm til en avlang, ubevegelig heliks på 3-40 µm. Det er også mot slutten av vekstfasen at bakterien i større grad fester seg til overflater og starter produksjon av melanin og et surt eksopolysakkarid (EPS) (Sledjeski & Weiner, 1993).

Det er ikke kjent at *S. colwelliana* produserer antimikrobielle stoffer og det er heller ikke kjent at bakterien produserer surfaktanter. Det er derimot kjent at noen arter innen slekten *Shewanella* produserer antimikrobielle stoffer eller surfaktanter. Et eksempel på en slik art er *S. algae* som produserer flyktige organiske forbindelser med antifungal effekt. De flyktige forbindelsene inhiberer vekst av *Aspergillus* patogener. Det har blitt identifisert 15 flyktige forbindelser, der to av dem, dimetyltrisulfid og 2,4-bis(1,1-dimetyletyl)-fenol, viste sterkest antifungal effekt. Dette er allerede kjente antimikrobielle stoffer, der dimetyltrisulfid har blitt isolert fra både planter og andre mikroorganismer, og 2,4-bis(1,1-dimetyletyl)-fenol har blitt identifisert fra *Streptomyces* spp. Den forbindelsen *S. algae* produserte mest av var dimetyltrisulfid. De eksakte virkningsmekanismene til dimetyltrisulfid og 2,4-bis(1,1-dimetyletyl)-fenol er ikke kjent (Gong et al., 2015). I tillegg ble også butylert hydroksytoluen identifisert som et av de flyktige forbindelsene, og det er et stoff som allerede er godkjent som en kommersiell fungicid (Torres, Barros, Palacios, Chulze, & Battilani, 2014). Det har blitt foreslått at virkningsmekanismen til butylert hydroksytoluen er koblet til ødeleggelse av cellemembraner, men virkningsmekanismen er ikke helt forstått (Li et al., 2016).

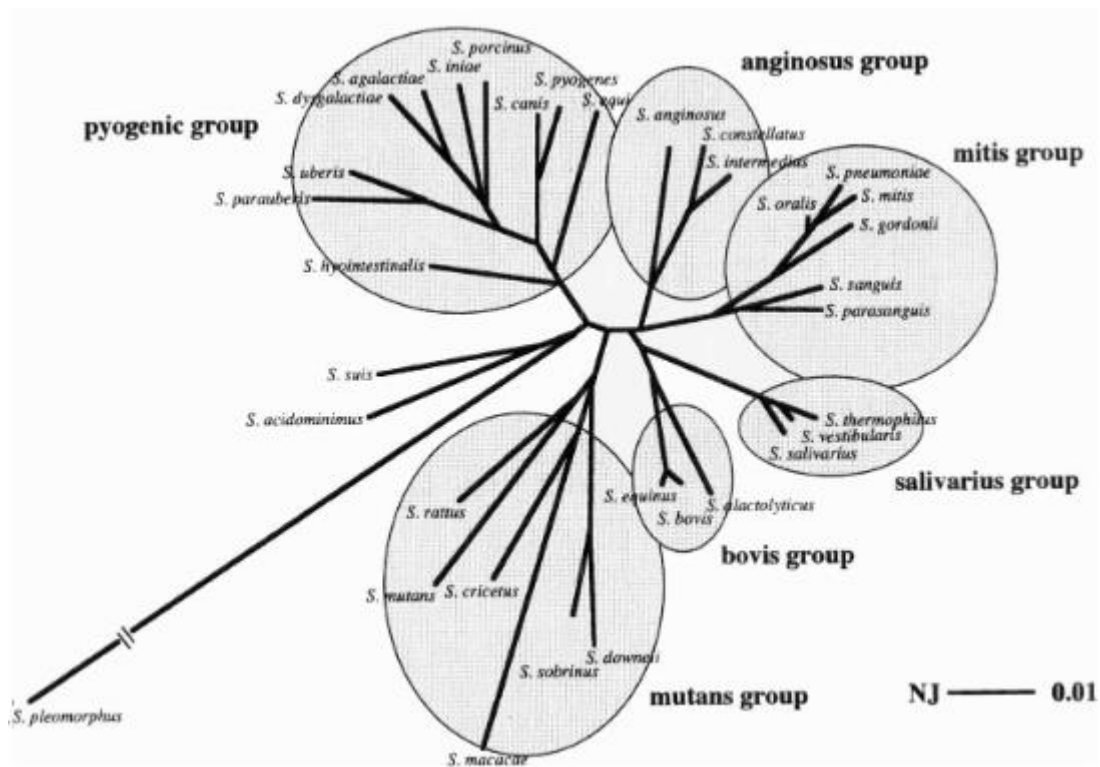
Et annet eksempel på antimikrobiell aktivitet innen slekten *Shewanella* kommer fra en studie som så nærmere på potensialet epifytiske bakterier isolert fra den marine brunalgen, *Bifurcaria bifurcata*, har som mulige produsenter av antioksidanter og antimikrobielle stoffer. Den antimikrobielle aktiviteten ble vurdert mot *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* og *Candida albicans*. Totalt 39 bakterier ble assosiert med *Bifurcaria bifurcata*, og bakteriene fordelte seg på 6 slekter. Av alle bakteriene var det en *Shewanella* sp. som hadde den beste

antimikrobiell effekten, og effekten var størst mot *B. subtilis*. Kjemisk struktur, art og virkningsmekanisme for *Shewanella* sp. er uvisst (Horta et al., 2014).

To eksempler på surfaktantproduserende arter i slekten *Shewanella* er *S. algae* og *Shewanella upenei*. Både *S. algae* og *S. upenei* ble identifisert som biosurfaktantproduserende bakterier under en studie der det ble tatt vannprøver fra Persiabukta. Supernatant fra flytende kulturer med hver av bakteriene gav redusert overflatespenning og en øking i emuleringsaktiviteten. I tillegg hadde supernatantene hemolytisk aktivitet, dvs. lysering av blodceller (Hassanshahian, 2014). Det er kjent fra før at surfaktanter kan føre til hemolyse, noe som kan skje via økning av membranløseligheten eller via osmotisk lysering. Grensen mellom de to metodene er avhengig av surfaktantkonsentrasjonen og er derfor ikke tydelig definert. Generelt skjer osmotisk lysering ved lave konsentrasjoner av surfaktantmonomerene, men konsentrasjoner som er nærmere den kritiske konsentrasjonen for micelledannelse vil føre til hemolyse via en økning av membranløseligheten. Membranløseligheten økes når det skjer en kontinuerlig utbytting mellom surfaktantmonomerer fra miceller og cellemembranen. Lipider eller proteiner i cellemembranen danner da blandete miceller med surfaktantene, noe som til slutt fører til lysis fordi lipidene i membranen har blitt tatt ut og satt inn i miceller. Under osmotisk lysering blir surfaktantmonomerer satt inn i membranen på samme vis som under økning av membranløseligheten. Dette forstyrrer sammensetningen i cellemembranen og kan føre til inntak av vann, noe som fører til svelling og etter hvert lysis (Manaargadoo-Catin, Ali-Cherif, Pognas, & Perrin, 2016).

### **1.3 *Streptococcus pneumoniae***

*S. pneumoniae* ble valgt som målbakterie under undersøkelsene av antimikrobiell aktivitet for stoffene produsert av de marine bakteriene. Nedenfor følger derfor en beskrivelse av en del viktige egenskaper ved denne bakterien. *S. pneumoniae* er en Gram-positiv, katalase-negativ kokk med en diameter på 1  $\mu\text{m}$  som har en tendens til å vokse i par eller i korte kjeder. Den tilhører mitis gruppen i slekten *Streptococcus* og den er fakultativt anaerob (Figur 1.4) (Spellerberg & Brandt, 2015). Bakterien er ikke i stand til å utføre respirasjon, og har i stedet en fermenterende metabolisme. Under fermentering bruker *S. pneumoniae* sukker som hovedenergikilde, og som hos andre bakterier i ordenen Lactobacillales<sub>2</sub> er laktat hovedproduktet. Bakterien er hverken sporedannende eller bevegelig (Leonard & Lalk, 2018).



Figur 1.4. Fylogenetisk forhold mellom 34 streptokokkarter. Slekten *Streptococcus* kan deles inn i 6 grupper, der *S. pneumoniae* er medlem av mitis gruppen (Kawamura, Hou, Sultana, Miura, & Ezaki, 1995).

*S. pneumoniae* er en opportunistisk patogen som koloniserer nasofarynx og orofarynx. Bærere av bakterien er hovedkilden til overføring av smitte fra person til person via nærdråpesmitte, og opp imot 27-65% av barn og mindre enn 10% av voksne er bærere. Koloniseringen er vanligvis asymptomatisk, men bakterien kan bli patogen og forårsake sykdom. Bakterien kan da føre til lungebetennelse, hjernehinnebetennelse, sepsis, bakteriemi og otitis media, og globalt fører den til flere dødsfall enn noen annen infeksjons sykdom (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013; Weiser, Ferreira, & Paton, 2018).

Det er flere kjente virulensfaktorer hos *S. pneumoniae*, slik som polysakkaridkapselen, flere overflateproteiner og toksinet pneumolysin (PLY), men den viktigste virulensfaktoren hos *S. pneumoniae* er antageligvis polysakkaridkapselen (Mitchell & Mitchell, 2010). Kapselen består av kjeder med monosakkarider som omgir bakterien, og rekkefølgen og type

monosakkarid i polysakkaridkjeden og sidekjedene gir opphav til flere ulike serotyper (Hyams, Camberlein, Cohen, Bax, & Brown, 2010). Det finnes ca. 100 ulike serotyper og dette gjør utvikling av vaksiner mot pneumokokkinfeksjoner vanskelig. Grunnen til dette er at vaksinene som eksisterer i dag er basert på polysakkaridkapselen, og det er begrenset hvor mange kapseltyper som kan inkluderes i en enkelt vaksine (Pichichero, Khan, & Xu, 2016). Virulensrollen til kapselen er at den motvirker fagocytose ved at den hindrer både komplementsystemet og interaksjon med fagocytiske celler. I tillegg er kapselen viktig for kolonisering, hindring av mekanisk fjerning via mucus, begrensnings av autolysis og den reduserer hvor utsatt bakterien er for antibiotika (Mitchell & Mitchell, 2010).

En annen virulensfaktor som er viktig for utvikling av pneumokokkinfeksjoner er PLY. Toksinet tilhører en stor gruppe med proteiner kalt kolesterol-dependent cytolysin (CDC), som er en familie med proteiner som angriper celler med kolesterol i cellemembranen (Tilley, Orlova, Gilbert, Andrew, & Saibil, 2005). Kolesterol er en viktig komponent i membraner i dyreceller, men det er uvanlig i bakteriemembraner, og det er ikke en komponent i membranen til *S. pneumoniae* (Huang & London, 2016). PLY blir utskilt av *S. pneumoniae* som løselige monomerer og de danner oligomeriske komplekser i målcellene. Disse kompleksene er ringformede porer som kan være opp mot 350 Å i diameter og hver pore består av 30-50 PLY monomerer. Porene fører til celledød fordi membranintegriteten blir ødelagt, og PLY kan derfor hindre en immunrespons ved å angripe celler som monocytter og nøytrofiler (Tilley et al., 2005). PLY er også viktig for å unngå den fulle effekten av komplementsystemet. Toksinet kan aktivere komplementsystemet i områder der *S. pneumoniae* ikke er, noe som kan redusere komplement i verten og føre til inflammasjon. Dette gir gunstige forhold for overlevelse og videre spredning av bakterien (Alcantara, Preheim, & Gentry-Nielsen, 2001).

I tillegg til PLY og polysakkaridkapselen finnes det mange flere virulensfaktorer. *S. pneumoniae* har blant annet adhesiner som binder bakterien til cellene til verten. Dette er viktig for kolonisering av bakterien og et eksempel på et adhesin er Pneumococcal surface adhesin A (PsaA), som binder til epitelceller i nasofarynx (Rajam et al., 2008). En annen virulensfaktor er immunoglobulin A (IgA) protease. *S. pneumoniae* bindes av sekretorisk IgA og fanges av mucus i luftveiene, slik at det kan transporteres bort via cilieaktivitet. IgA

protease kløyver IgA og hindrer derfor den immunologiske aktiviteten (Proctor & Manning, 1990).

Det finnes to vaksintyper mot pneumokokkinfeksjoner, pneumokokkpolysakkaridvaksinen, som var den første som ble introdusert på markedet, og pneumokokkonjugatvaksinen (Geno et al., 2015). Den eneste tilgjengelige pneumokokkpolysakkaridvaksinen i dag er en 23-valent polysakkaridvaskine (PPV23), som inneholder rensset polysakkarid fra 23 serotyper. PPV23 dekker ca. 70% av serotypene som har ført til infeksjoner i Norge de siste årene, men den har noen svakheter. Den er ikke immunogen for barn under 2 år, vaksinen hindrer ikke kolonisering av øvre luftveier og den induserer ikke en T-cellemediert immunrespons og fører da til en dårlig immunologisk hukommelse. I tillegg har den varierende effekt, og effekten er dårligst for risikogrupper, slik som for de med immunsvekkende sykdommer og hos de eldste (Folkehelseinstituttet, 2015). Dette førte etter hvert til utviklingen av pneumokokkonjugatvaksinen, som har egenskapene PPV23 mangler (Winje et al., 2019). Pneumokokkonjugatvaksinen ble lagd ved å kovalent koble polysakkaridserotypene som oftest fører til sykdom til immunogene bæreprotein. Dette førte til at polysakkaridkapselen ble gjenkjent som et T-celle avhengig antigen, noe som stimulerte en mer effektiv humoral respons (Weiser et al., 2018). En svakhet med pneumokokkonjugatvaksinen er den dekker færre serotyper enn pneumokokkpolysakkaridvaksinen, og derfor anbefales det å bruke begge vaksinerne for å oppnå optimal serotypedekning (Folkehelseinstituttet, 2015).

*S. pneumoniae* har evnen til å forandre genomet sitt gjennom opptak av nakent DNA fra andre pneumokokker eller andre nært beslektede streptokokkarter. Dette har blant annet gjort det mulig for bakterien å tilegne seg antibiotikaresistens og å unngå vaksineindusert immunitet (Weiser et al., 2018). Denne evnen kommer av at *S. pneumoniae* kan bli kompetent for naturlig genetisk transformasjon. Da tar bakterien opp DNA fra omgivelsene og setter det inn i sitt eget genom ved bruk av homolog rekombinasjon. Prosessen er strengt regulert og består av fem hovedproteiner kalt ComABCDE, som fungerer som et quorum-sensing-lignende system. Under forhold som stimulerer kompetanse er det en basal ekspresjon av *comC* som koder for et kompetansestimulerende peptid kalt CSP. CSP blir utskilt av cellen og prosessert til modent CSP av en ABC-transporter (ComA). Flere typer stress fremmer kompetanse hos *S. pneumoniae*, for eksempel feilsyntetiserte proteiner. Når CSP konsentrasjonen når et kritisk

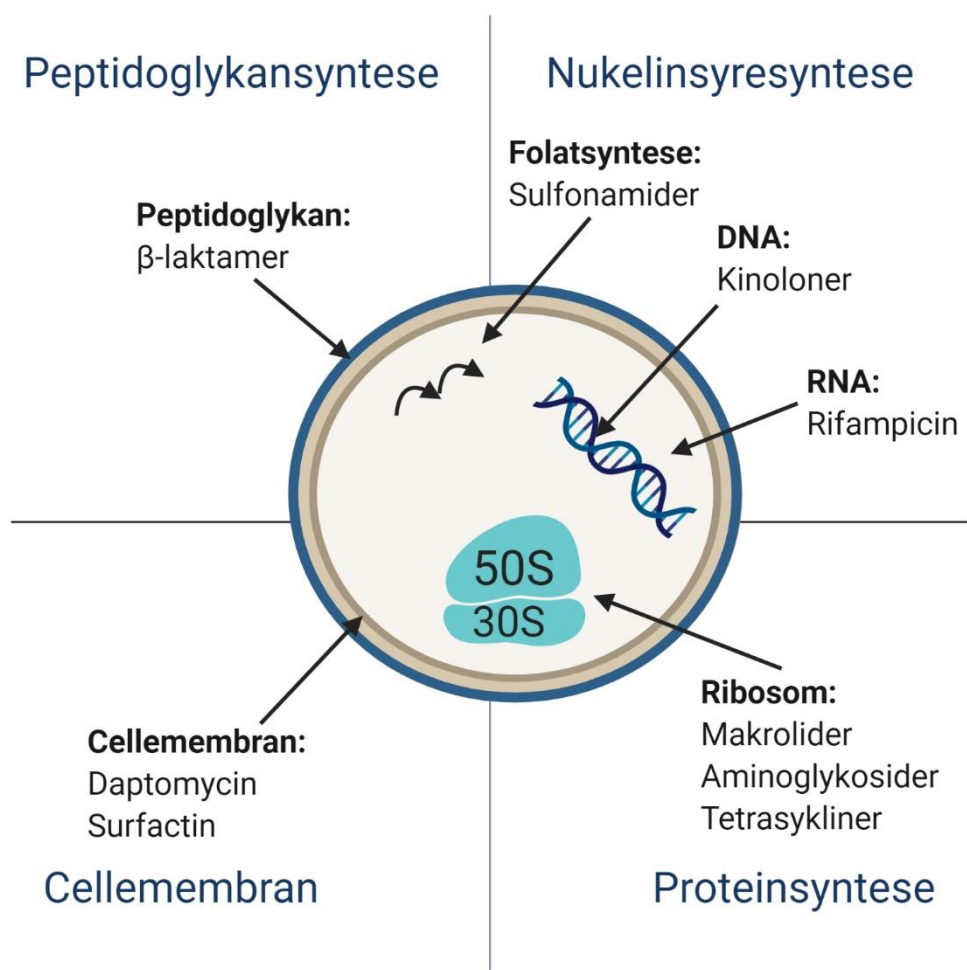
nivå registreres det av en histidin kinase (ComD) som fungerer som en reseptor for CSP (Håvarstein, Gaustad, Nes, & Morrison, 1996). Ved CSP-binding autofosforyleres ComD, og fosforylgruppen overføres deretter fra ComD til ComE. Fosforylert ComE aktiverer transkripsjon av tidlige gener, noe som fører til transkripsjonsaktivering av de sene genene. Resultatet er fratricide, DNA opptak og homolog rekombinasjon (Kausmally, Johnsborg, Lunde, Knutsen, & Håvarstein, 2005; Peterson et al., 2004). Avslutningsvis vil kompetansetilstanden gradvis bli slått av (Mirouze et al., 2013).

## **1.4 Antibiotika**

### **1.4.1 En oversikt over ulike antibiotika**

Antibiotika ble først definert som stoff produsert av mikroorganismer som ved lave konsentrasjoner hemmer vekst av eller er dødelige mot andre mikroorganismer. I nyere tid har definisjonen blitt modifisert og gjelder nå også antimikrobielle stoffer som blir produsert delvis eller helt gjennom syntetiske metoder. Det finnes mange måter å klassifisere antibiotika på, men de vanligste klassifiseringsmetodene er basert på kjemisk struktur, virkningsmekanisme eller virkningsspektrum. Når antibiotika klassifiseres etter virkningsmekanisme så er det tre angrepspunkter som går igjen, nemlig hemming av peptidoglykansyntese, proteinsyntese og nukleinsyresyntese. I tillegg finnes det antibiotika som ødelegger integriteten til cellemembranen eller som blokkerer viktige metabolske veier (Figur 1.5). Alle angrepspunktene kan ha en kraftig bakteriostatisk eller baktericid effekt på bakterien samtidig som at de gir minst mulig skade hos verten (Etebu & Ariekpar, 2016).





Figur 1.5. En oversikt over virkningsmekanismene til ulike antibiotika.

Antibiotika som angriper bakteriell peptidoglykansyntese er effektive fordi dyreceller ikke har peptidoglykan. Et eksempel på en slik antibiotikaklasse er  $\beta$ -laktamer.  $\beta$ -laktamer er den eldste, største og mest brukte klassen av antibiotika og den omfatter blant annet subgruppene penicillin, kefalosporiner og karbapenemer. Alle  $\beta$ -laktamer har en  $\beta$ -laktam-ring, og de hemmer bakteriell celleveggsyntese ved å binde til en eller flere penicillin-bindende proteiner (PBPer). Det fører til at krysskoblingen mellom glykankjedene i celleveggen hemmes, noe som forårsaker autolysis og celledød (Percival, 2017). En vanlig resistensmekanisme mot  $\beta$ -laktamer er produksjon av  $\beta$ -laktamaser, som er enzymer som ødelegger den antimikrobielle effekten ved å hydrolysere  $\beta$ -laktam-ringen (Naas et al., 2017).

Antibiotika kan også angripe cellemembranen, som er et bra mål for antibiotika fordi den er satt sammen på en annen måte enn cellemembranen til pattedyr. En viktig forskjell mellom

cellemembranen til bakterier og cellemembranen til pattedyr er at negativt ladde lipider sitter på overflaten på cellemembranen til bakterier, mens negativt ladde lipider i cellemembranen til pattedyr vender inn mot cytoplasma (Epsand, Walker, Epsand, & Magarvey, 2016).

Daptomycin er et eksempel på et antibiotikum som angriper cellemembranen og peptidoglykansyntesen. Antibiotikumet består av en lipofil hale og et syklisk polypeptid på 13 aminosyrer som danner en hydrofil kjerne (Percival, 2017). Daptomycins eksakte virkningsmekanisme er ikke helt forstått, men det har blitt vist at antibiotikumet er avhengig av kalsium, og at  $\text{Ca}^{2+}$ -daptomycin danner et kompleks med lipid II og den negativt ladde fosfolipiden fosfatidylglyserol. Lipid II er en essensiell forløper for peptidoglykansyntese. Dannelsen av komplekset fører til delokalisering av komponenter i peptidoglykansyntesemaskineriet, og rearrangering av cellemembranen (Grein et al., 2020). Dette påvirker cellen på flere vis, og det er mulig at omorganiseringen fører til brudd i celleveggen og etter hvert cellelysis. I tillegg kan dette påvirke fosfolipidsyntesen, som igjen har en effekt på respirasjon, membranpotensialet og celledeling (Müller et al., 2016). Daptomycin fungerer som et baktericid og det har effekt mot en rekke Gram-positive bakterier. Dette inkluderer bakterier det finnes veldig få alternativer mot, slik som vankomycinresistente enterokokker (VRE), meticillinresistent *S. aureus* (MRSA) og penicillinresistente streptokokker. Det er fortsatt uvanlig med resistens mot daptomycin, men det har vært en økning i antall rapporterte tilfeller (Heidary et al., 2018).

Daptomycin blir syntetisert av tre såkalte «nonribosomal peptide synthetases» (NRPSs), DptA, DptBC, og DptD, og trans-virkende enzymer (Robbel & Marahiel, 2010). NRPS er multienzymkomplekser som lager spesifikke proteintemplater for biosyntese av nukleinsyre-uavhengige peptider, og kan syntetisere blant annet lipopeptider fra en mangfoldig gruppe av forløpere (Marahiel, Stachelhaus, & Mootz, 1997). Et annet eksempel på et syklisk lipopeptid som også syntetiseres med NRPS-er er surfactin. Surfactin er en syklisk lipopeptid biosurfaktant som består av et heptapeptid festet til en fettsyre, og det blir syntetisert med et stort multienzym NRPS kompleks som kalles surfactin syntetase. (Das, Mukherjee, & Sen, 2008). Biosurfaktanten blir produsert av *Bacillus subtilis*, og er en av de mest effektive biosurfaktantene som er tilgjengelig i dag. Dette kommer av en uspesifikk virkningsmekanisme som gjør surfactin effektivt mot en rekke bakterier, virus og sopper. I

tillegg har surfactin anti-adhesiv effekt, kan brukes til bioremediering og det har hemolytisk aktivitet (Chen, Juang, & Wei, 2015). Surfactins virkningsmekanisme er ikke kjent, men det har blitt vist at biosurfaktanten angriper cellemembraner (Heerklotz & Seelig, 2007). Flere mekanismer for hvordan surfactin angriper cellemembranen har blitt foreslått, slik som via innsetting av biosurfaktanten inn i cellemembranen, økt gjennomtrengeligheten via dannelsen av kanaler i membranen, diffusjon av ioner over membranen eller økning av membranløseligheten (Bouffioux et al., 2007).

Et annet mulig angrepspunkt for antibiotika er bakteriell proteinsyntese, som egner seg som et mulig mål fordi ribosomene til bakterier er annerledes enn ribosomene til eukaryoter. Bakterier har blant annet 70S ribosom som består av en 50S subenhet og en 30S subenhet, mens eukaryoter har 80S ribosom som består av en 60S subenhet og en 40S subenhet (Melnikov et al., 2012). Makrolider er en antibiotikaklasse som hemmer proteinsyntesen ved at de binder seg til peptidyltransferase senteret i 50S subenheten i ribosomene til bakterier. De er det vanligste alternativet til  $\beta$ -laktamer, og antibiotika i denne klassen har en laktonring på 14-16 atomer som er bundet til en eller flere deoksysukkerer (Kwon, 2017).

To andre grupper som hemmer proteinsyntesen er aminoglykosider og tetrasykliner. Aminoglykosider er en stor antibiotikaklasse som kjennetegnes av at den inneholder to eller flere aminosukkerer koblet sammen med en glykosidbinding til en aminocyklitol. Antibiotikaklassen angriper bakterier ved at de binder irreversibelt til ribosomer. De blir brukt til å behandle en rekke ulike bakterieinfeksjoner forårsaket av hovedsakelig Gram-negative bakterier i både human- og veterinærmedisin. To eksempler på aminoglykosider er streptomycin og gentamicin. Aminoglykosider metaboliseres ikke og vil derfor skilles ut via urin, noe som kan føre til at de kommer ut i miljøet (Zhu, Liu, Wang, Sasanya, & Cannavan, 2016). Tetrasykliner blir produsert av flere bakterier i slekten *Streptomyces*. I dag finnes det tre generasjoner av antibiotikaklassen, der første generasjon ble lagd ved biosyntese, mens generasjon to og tre er basert på semisyntetiske metoder. Det som er felles for alle tetrasykliner er at de har fire hydrokarbonringer som er bundet sammen (Etebu & Ariekpar, 2016). Tetrasykliner har en bakteriostatisk effekt ved at de angriper bakteriens ribosom og hindrer aminoacyl tRNA i å binde A-setet under proteinsyntesen (McMurry, Petrucci, & Levy, 1980). Før var tetrasykliner kjent for et bredt aktivitetsspekter mot både Gram-negative

og Gram-positive bakterier, men de har blitt mindre brukt i nyere tid på grunn av økt resistens mot antibiotikaklassen (Grossman, 2016).

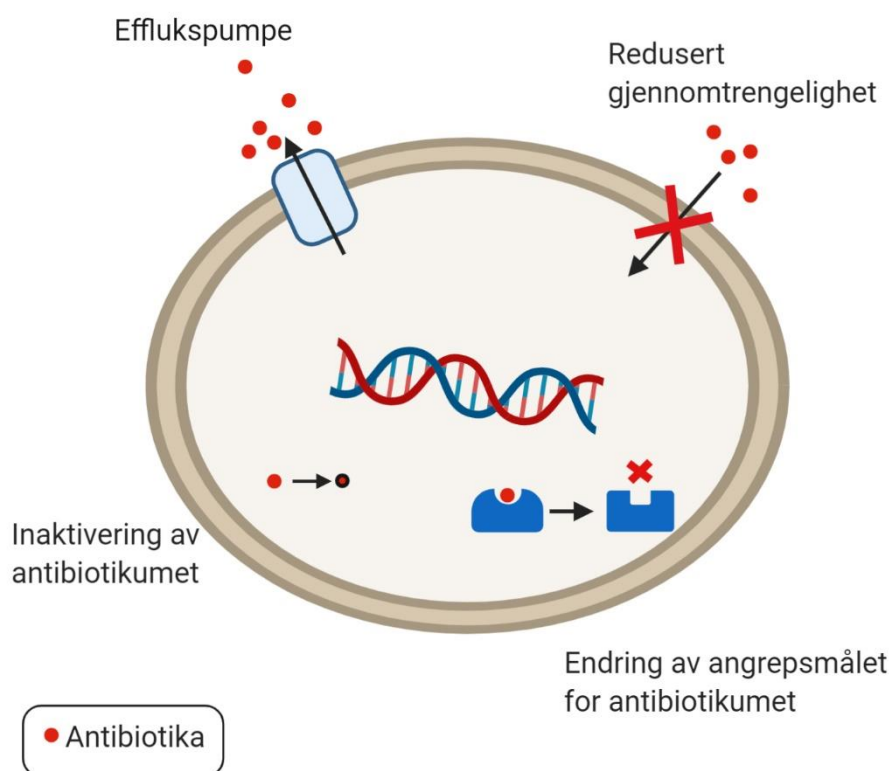
Den siste hovedklassen består av antibiotika som angriper nukleinsyresyntesen, slik som kinoloner og sulfonamider. Kinoloner er bredspektret antibiotika med en bisyklisk kjernestruktur. De hindrer enzymer som tvinner ut DNA, noe som stopper DNA replikasjon og fører til celledød (Pham, Ziora, & Blaskovich, 2019). Sulfonamider hemmer nukleinsyresyntesen på en indirekte måte ved at de stopper folatsyntesen. Antibiotikaklassen fungerer som kompetitive inhibitorer som binder seg til enzym involvert i folatsyntese. Folat er nødvendig for aminosyrestoffskiftet og produksjonen av nukleinsyrer (Dowling, O'Dwyer, & Adley, 2017).

Et annet eksempel på et antibiotikum som angriper nukleinsyntesen er rifampicin. Rifampicin er en RNA polymerase hemmer, og hemmer derfor DNA transkripsjon og bakteriens produksjon av proteiner. Antibiotikumet brukes først og fremst til behandling av tuberkulose, men det kan også brukes i behandlingen av blant annet lepra og brucellose (Shane, 2006). Rifampicin er et derivat av rifamycin som produseres av bakterien *Amycolatopsis rifamycinica*, og brukes ofte i kombinasjon med andre antibiotika fordi bakterier raskt utvikler resistens mot antibiotikumet (Forrest & Tamura, 2010).

### **1.4.2 Resistensmekanismer**

Bakterier kan være naturlig resistente mot antibiotika. Da er bakterien resistent på grunn en iboende struktur eller egenskap, og slik resistens har alltid forekommet hos bakterier (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015). Et eksempel på naturlig resistens er at Gram-positive bakterier er sensitive for daptomycin, men antibiotikumet har ikke en effekt mot Gram-negative bakterier. Grunnen til dette er antageligvis en iboende forskjell i oppbygningen av cellemembranen. Gram-negative har færre negativt ladde fosfolipider enn Gram-positive bakterier, og dette reduserer effektiviteten av den  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengige interaksjonen daptomycin har med cellemembranen (Randall, Mariner, Chopra, & O'Neill, 2013).

En stor og ukritisk bruk av antibiotika innen medisin og landbruk har ført til et selektivt press som er den viktigste grunnen til den høye forekomsten av resistente bakterier. Denne måten å utvikle resistens på kalles ervervet resistens, og det finnes flere ulike mekanismer som gjør det mulig for bakterien å oppnå slik resistens. Resistensmekanismene kan deles inn i de følgende tre hovedkategoriene: 1) reduksjon av den intracellulære antibiotikakonsentrasjonen, 2) endring av angrepsmålet for antibiotikumet og 3) inaktivering av antibiotikumet (Figur 1.6) (Blair et al., 2015).



Figur 1.6. En oversikt over resistensmekanismer mot antibiotika. Resistens kan oppnås via inaktivering av antibiotikumet, endring av angrepsmål og via reduksjon av den intracellulære antibiotikakonsentrasjonen.

Den første hovedkategorien handler om å senke den intracellulære konsentrasjonen av antibiotika, og det kan gjøres ved å redusere gjennomtrengeligheten og ved å pumpe

antibiotika ut av cellen. Mange antibiotika har intracellulære mål, og de må derfor gå gjennom yttermembranen og/eller cellemembranen. Bakterier kan derfor beskytte seg mot antibiotika ved å redusere permeabiliteten, noe som er spesielt viktig for Gram-negative bakterier fordi de kan bruke yttermembranen som et førstelinjeforsvar. Hydrofile molekyler som  $\beta$ -laktamer, tetrasykliner og noen kinoloner blir påvirket av en endring i gjennomtrengeligheten i yttermembranen fordi de bruker poriner til å krysse barrieren (Munita & Arias, 2016). Poriner er vannfylte kanaler som går gjennom membraner og de bidrar til diffusjon av molekyler med lav molekylvekt (Cowan et al., 1992). Den andre måten bakterien kan redusere den intracellulære konsentrasjonen av antibiotika på er ved å pumpe ut antibiotikumet. Det skjer via efflukssystemer, slik som systemet i *E. coli* som pumper tetrasykliner ut av cytoplasmaet. Da blir antibiotikakonsentrasjonen for lav til å drepe bakterien (McMurry et al., 1980). Systemet i *E. coli* kodes for av plasmider med resistensgener kalt *tet* gener og et eksempel på et slikt gen er *tetA* (Olowe, Idris, & Taiwo, 2013).

Den andre mekanismen går ut på å endre angrepsmålet for antibiotikumet enten gjennom mutasjon eller gjennom post-translasjonell modifisering av målet. Det skjer mutasjoner i bakterier kontinuerlig og det kan resultere i en eller annen resistent mutant, men når bakterier utsettes for stress øker mutasjonsfrekvensen. Dette kan være med på å utvikle resistensgener, men det er også mulig for bakterier å tilegne seg resistens ved å ta opp resistensgener gjennom horisontal genoverføring. Dette kan gjøres på tre ulike måter: 1) opptak av nakent DNA av naturlig kompetente bakterier (transformasjon), 2) overføring av DNA fra en bakterie til en annen via bakteriofager (transduksjon) og 3) overføring av plasmid gjennom celle-til-celle kontakt (konjugasjon) (Giguère, Prescott, & Dowling, 2013). De fleste antibiotika har høy affinitet for sine mål og binder spesifikt til dem, og slik hindrer de den normale funksjonen til angrepsmålet. Derfor kan små endringer i angrepsmålet være en effektiv måte å hindre antibiotikabinding på uten at funksjonen til angrepsmålet mistes. Det er ikke bare genetiske forandringer som kan føre til slike endringer, men også post-translasjonelle modifikasjoner. Post-translasjonell modifisering beskytter angrepsmålet og er en viktig resistensmekanisme mot flere antibiotika. Et eksempel på en slik modifisering er metylering av 16S rRNA, noe som fører til forandringer i angrepsmålet og det hindrer binding av makrolider, linkosamider og streptograminer (Blair et al., 2015).

Ved bruk av den tredje resistensmekanismen degraderes eller modifiseres antibiotikumet slik at det blir inaktivt. Dette omfatter blant annet hydrolyse og overføring av kjemiske grupper, men også andre kjemiske strategier. Det best kjente eksemplet på antibiotikainaktivering er kanskje  $\beta$ -laktamaser, som hydrolyserer  $\beta$ -laktam-ringen, men det finnes også andre eksempler på enzymer som hydrolyserer viktige bånd i antibiotika. Estereaser kan for eksempel føre til makrolidresistens og epoksidaser kan gi resistens mot fosfomycin. Inaktivering av antibiotika kan også skje via overføring av kjemiske grupper. Dette involvere mange ulike modifiseringsreaksjoner, der noen av dem er overføring av acylgrupper, fosforylering, glykosylering, ribosylering og overføring av tiolgrupper. Hydrolyse og overføring av kjemiske grupper utgjør mesteparten av metodene for inaktivering av antibiotika, men det finnes også andre alternativ, slik som redoksreaksjoner og lyaser. Et eksempel er enzymet TetX som oksiderer tetrasykliner (Wright, 2005).

### **1.5 Målet med oppgaven**

Antibiotikaresistens er et økende, globalt problem som truer fremskrittene antibiotika førte til innen moderne medisin. Derfor er det viktig at antibiotikabruken reduseres, at bruken av bredspektret antibiotika begrenses og at smittespredning forhindres. I tillegg må nye antibiotika utvikles (Bush et al., 2011). Målet med denne oppgaven var derfor å undersøke om marine bakterier er en mulig kilde til nye antibiotika. Planen var å identifisere og isolere marine bakterier som produserer forbindelser med antimikrobiell aktivitet. Deretter var målet å oppskalere produksjonen av og rense en av disse forbindelsene. I tillegg skulle forbindelsen karakteriseres ved bruk av indikatorbakterier, kjemiske tester og massespektrometri.

## 2. Metoder

### 2.1 Dyrkning av indikatormikroorganismer, frysestock og startkulturer

#### 2.1.1 Dyrking av streptokokker på agarplater og i flytende kultur

Flytende kulturer med streptokokker ble dyrket på vannbad ved 37 °C til  $OD_{550} \approx 0,3$ . Alle stammene ble dyrket i Todd Hewitt (TH) medium, med unntak av *S. pneumoniae* RH425, RH14 og D39, som ble dyrket i C-medium. Ved dyrking på plate ble det brukt TH agarplater for alle stammene og platene ble lagt i en lufttett beholder sammen med en AnaeroGen™ pose. Innholdet i posen absorberer O<sub>2</sub> samtidig som at det produserer CO<sub>2</sub>, noe som gir anaerobe forhold (Oxoid, 2020). De lufttette beholderne ble plassert i varmeskap ved 37 °C.

#### 2.1.2 Flytende kultur av andre indikatormikroorganismer

Tabell 2.1 viser dyrkingsbetingelsene til indikatorbakterier som ikke tilhører slekten *Streptococcus*.

Tabell 2.1 Dyrkingsbetingelser for bakterier som ikke tilhører slekten *Streptococcus*.

Bakterie	Næringsmedium	Temperatur	Risting
<i>Enterococcus faecium</i>	GM17	30 °C	Nei
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	37 °C	Ja
<i>Bacillus subtilis</i>	BHI	30 °C	Ja
<i>Lactococcus lactis</i>	GM17	30 °C	Nei
<i>Escherichia coli</i>	LB	37 °C	Ja
<i>Pseudomonas isolat 33</i>	BHI	Romtemperatur	Nei
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	BHI	37 °C	Ja

I tillegg ble gjæren *Candida krusei* dyrket. Det ble gjort ved 37°C i flytende TH medium og kulturen ble satt på risting. Etter at gjæren hadde vokst opp, ble 100 µl av den flytende kulturen strøket ut med en Drigalski spatel på en TH agarplate og platen ble inkubert aerobt ved 37°C i et døgn.



### **2.1.3 Frysestock og startkultur**

Frysestock og startkultur ble lagd ved å tilsette 50% glyserol til en flytende kultur slik at den totale glyserolkonsentrasjonen ble 15%. Den flytende kulturen hadde vokst til  $OD_{550} \approx 0,3$ . Etter tilsetning av glyserol ble frysestock og startkulturer frosset ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2 Screening for bakterier som hemmer vekst av *S. pneumoniae***

Det ble tatt vannprøver ifra Oslofjorden og bakteriene fra vannprøvene ble sådd ut på både BHI og TH agarplater. De første vannprøvene ble tatt for ca. 20 år siden, mens de andre vannprøvene ble tatt i 2019. Alle vannprøvene ble tatt i strandsonen fra overflaten av steiner eller tang og tare, samt fra muddret på grunt vann. Bakteriene fra de første vannprøvene hadde allerede blitt dyrket og isolert. Derfor ble screeningsarbeidet beskrevet i 2.2 gjort med vannprøvene fra 2019.

### **2.2.1 Renkultur av marine bakterier**

Det ble plukket ut tilfeldige bakteriekolonier med ulik farge og morfologi som ble strøket ut på enten TH agarplater eller BHI agarplater. Valg av næringsmedium var basert på hvilken plate bakteriene hadde vokst på etter den første utsåingen fra vannprøvene. Etter at bakteriene hadde vokst opp, ble det plukket enkeltkolonier fra hver plate som ble overført til glassrør med 5 ml flytende TH eller BHI medium. Deretter ble glassrørene inkubert i romtemperatur. Etter et døgn ble koloniene som ikke hadde vokst opp satt på risting ved  $24^{\circ}\text{C}$  og 150 rpm i et ekstra døgn. Renkultur av bakteriene ble så tilsatt på enten TH eller BHI agarplater etter hvilket medium bakteriene ble dyrket på, og platene ble inkubert i romtemperatur i et døgn.

### **2.2.2 Innstøping av indikatorbakterien *S. pneumoniae* i softagar**

Agarplater med et tynt topplag av softagar ble lagd etter oppskriften angitt i materialer under avsnitt A.7.1. En startkultur ble tint opp, cellene ble sentrifugert i en sentrifuge ved  $4000 \times g$  i 5 minutter og frysemediet ble helt ut. Deretter ble pelleten resuspendert i C-medium og kulturen dyrket til  $OD_{550} \approx 0,3$ . Mens bakteriekulturen vokste opp, ble TH softagar varmet opp til den ble flytende, og volumer på 5 ml ble overført til autoklaverte glassrør. Glassrørene ble oppbevart ved  $45^{\circ}\text{C}$ , slik at softagaren ikke stivnet og temperaturen ble for varm for bakteriene. Deretter ble 100  $\mu\text{l}$  bakteriekultur ( $OD_{550} \approx 0,3$ ) tilsatt hvert rør med 5 ml softagar.

Blandingen ble vortexet og helt ut over en agarplate. Laget med softagar ble enten lagt over en bakteriekoloni som hadde vokst oppå agarplaten, eller så ble 3 µl av en løsning med antimikrobiell aktivitet tilsatt oppå dette laget. Platene ble inkubert anaerobt i et døgn ved 37°C. Hemmingssonen rundt en koloni ble målt som en rett linje fra kanten av kolonien til kanten av hemmingssonen på grunn av varierende størrelse på koloniene. I denne oppgaven ble 3 ulike stammer av *S. pneumoniae* brukt som indikatorbakterie: RH425, RH14 og D39. RH425 er streptomycinresistent og mangler *comA*-genet, D39 er et villtypeisolat med polysakkaridkapsel og RH14 er en mutant uten autolysinet LytA (se materialer, avsnitt A.1). Innstøping av en indikatorbakterie i softagar og påfølgende testing kalles for «overlay assay» på engelsk. Det finnes ikke et tilsvarende norsk begrep. I mangelen på et godt norsk uttrykk vil derfor overlay assay bli brukt i denne oppgaven om denne prosessen.

### **2.2.3 Tilpasning av toppagarprotokollen til andre indikatorbakterier**

Det ble gjort overlay assay med andre streptokokker enn *S. pneumoniae*. Den eneste forskjellen i protokollen var at de ble resuspendert i passende næringsmedium etter sentrifugering. De andre indikatorbakteriene, dvs. de som ikke tilhørte slekten *Streptococcus*, krevde flere forandringer på grunn av ulike vekstkrav. Næringsmediet, softagaren og inkubasjonstemperaturen som ble benyttet var i overensstemmelse med dyrkingsbetingelsene i Tabell 2.1. Bakteriene ble inkubert aerobt i 1 døgn.

## **2.3 Identifisering av bakterier**

### **2.3.1 Ekstraksjon av DNA**

Ekstraksjon av DNA ble gjort med FastPrep eller via isolering av genomisk DNA (gDNA). DNA ble ekstrahert slik at det var mulig å sekvensere 16S rRNA-gen eller gDNA.

For å sekvensere 16S rRNA-gen med Sangersekvensering (se avsnitt 2.3.4) må genet først amplifiseres fra bakteriens genom ved hjelp av PCR (se avsnitt 2.3.2). Dette krever fritt DNA som templat i PCR-reaksjonen. Ofte kan hele bakterieceller benyttes direkte som templat i PCR fordi cellene sprekker ved 95°C i PCR-reaksjonen. I andre tilfeller må cellene lyses på andre måter før PCR. I dette arbeidet ble FastPrep benyttet til å lysere bakterier og fragmentere genomisk DNA. Et DNA-rene-kit ble deretter brukt til å rense DNA-fragmenter

mellom 100 og 10 000 bp slik at 16S rRNA-gen ble tilegnetlig for binding til primere under PCR. Dette ble gjort ved å sentrifugere en flytende bakteriekultur ved 4000 x g i 5 minutter, helle av supernatanten og løse cellepelleten i 600 µl NTI buffer. Deretter ble løst cellepellet overført til et FastPreprør som inneholdt 0,5 g med  $\leq 106$  µm glasskuler. Røret med cellene ble plassert i FastPrep-maskinen og ristet i 3x30 sekunder ved en hastighet på 6,5 m/s. Mellom hver runde ble røret satt på is i 1 minutt for å kjøles ned.

Etter lysering av cellene ble Nucleospin® Gel og PCR Clean-up kitet fra Macherey-Nagel brukt til rensing av DNA. Dette ble gjort ved å først sentrifugere prøven i 1 minutt ved 13 000 x g og deretter overføre supernatanten til en kolonne. Prøven ble deretter sentrifugert i 30 sekunder ved 13 000 x g. Tilgjengelig DNA i prøven vil binde til silikamembranen i kolonnen med hjelp av saltet i NTI bufferen, mens andre molekyler i prøven går igjennom og kastes. Neste steg var å vaske silikamembranen for å få bort urenheter. Dette ble gjort ved å sentrifugere kolonnen i 30 sekunder ved 13 000 x g etter tilsetning av 700 µl NT3 buffer. Da ble forurensninger fjernet og etter en runde til med sentrifugering i 1 minutt ved 13 000 x g ble også rester av NT3 bufferen fjernet. Deretter ble kolonnen plassert i et nytt eppendorfrør og 15-30 µl med NE buffer ble tilsatt avhengig av om det er mye eller lite DNA i prøven. NE bufferen har lavt saltinnhold og en pH på 8,5, noe som gir gunstige forhold for eluering av DNA. Etter inkubering i 1 minutt i romtemperatur og sentrifugering ved 11 000 x g i 1 minutt har derfor DNA blitt eluert og finnes i NE bufferen (MACHEREY-NAGEL, 2017).

Isolering av genomisk DNA ble gjort med et kit bestående av NucleoBond® AXG Columns og NucleoBond® Buffer Set. Først ble 5 ml bakteriekultur med  $OD_{550} \approx 0,3$  sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter, supernatanten ble dekantert og pelleten ble resuspendert i 5 ml G3 buffer. Første steg var å lysere cellene. Dette ble gjort ved å tilsette 25 µl av 20 mg/ml proteinase K og deretter inkubere prøven ved 37°C i 40 minutter. Noen bakterier er vanskeligere å lysere enn andre, og generelt er Gram-positive bakterier vanskeligere å lysere enn Gram-negative bakterier, derfor kan det være nødvendig å tilsette flere enzymer. Under isolering av gDNA fra *S. colwelliana* ble 80 µl lysozyme og 50 µl mutanolysin også tilsatt, mens 5 µl lytA ble tilsatt i tillegg til proteinase K under isolering av gDNA fra *S. pneumoniae* RH14. Deretter ble 1,2 ml av G4 buffer tilsatt, prøven ble vortexet og inkubert ved 50°C i 30 minutter. Hvis ikke lysatet var klarnet etter 30 minutter, måtte det inkuberes lengere. I tillegg

er det anbefalt å sentrifugere prøven ved 5000 x g i 5 minutter for å fjerne cellekomponenter som kan tette igjen kolonnen. Neste steg var ekvibrering av kolonnen, noe som ble gjort ved å tilsette 2 ml av buffer N2. Deretter fulgte DNA-binding til kolonnen. Først ble 5 ml buffer N2 tilsatt til prøven, blandingen ble vortexet i 15 sekunder og tilsatt i kolonnen. Etter at prøven hadde passert gjennom kolonnen kunne vaskesteget starte, og da ble 3 x 4 ml med buffer N3 tilsatt kolonnen. Neste steg var eluering av gDNA og derfor ble kolonnen overført til et corexrør. Corexrør tåler høye hastigheter, noe som er viktigere for et senere sentrifugeringstrinn. Genomisk DNA ble eluert med 4 ml med buffer N5 og deretter skulle det felles ut fra eluatet i corexrøret. Da ble 3,5 ml med isopropanol tilsatt, røret ble invertert 5 ganger (parafilm for å holde røret tett) og prøven ble inkubert i 30-60 minutter i romtemperatur. Prøven ble så sentrifugert ved 4°C og 13 000 x g i 25 minutter, og supernatanten ble helt av mens DNA-pelleten var igjen i corexrøret. Siste steg av isolering av gDNA var vasking av DNA-pelleten. Da ble det tilsatt 1 ml iskald 70% etanol i corexrøret, løsningen ble forsiktig blandet uten å løse opp pelleten og etanolen ble helt ut. Deretter ble det samme gjentatt med 96% etanol. DNA-pelleten ble så tørket ved 37°C i et varmeskap, løst opp i dH<sub>2</sub>O og overført til et eppendorfrør som ble frosset ved - 20°C (MACHEREY-NAGEL, 2015).

### **2.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)**

PCR er en metode som gjør det mulig å amplifisere spesifikke DNA fragmenter. Metoden krever templat DNA, primere som er komplementære til målsekvensen, 4 deoksyribonukleotid trifosfater (dATP, dGTP, dCTP og dTTP) og en varmestabil DNA polymerase. PCR er basert på DNA polymerase sin evne til å syntetisere DNA fra deoksyribonukleotider og foregår i tre hovedtrinn. Under det første trinnet denatureres templat DNA-et ved en høy temperatur slik at enkeltrådene blir tilgjengelig for trinn to. Da senkes temperaturen slik at primerene kan hybridisere til målsekvensen. Til slutt, i trinn tre, skjer det en temperaturøkning som er gunstige for den varmestabile DNA polymerasen, som så syntetiserer nye DNA-tråder. Takket være oppdagelsen av varmestabile DNA polymeraser ble det mulig å automatisere prosessen, og derfor gjentas de tre hovedtrinnene i flere sykluser slik at resultatet blir mange kopier av målsekvensen (Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985).

I Tabell 2.2 er reaksjonsoppsettet for en PCR-reaksjon med DNA polymerasen Phusion® High-Fidelity DNA polymerase. DNA polymerasen har stor nøyaktighet og er derfor et bra valg når endeproduktet skal brukes videre, sånn som ved kloning og sekvensbestemmelse (BioLabs, 2020). DNA templatet som ble brukt var enten DNA-et som ble ekstrahert ved bruk av FastPrep metoden eller gDNA rensset ved hjelp av NucleoBond kitet. Phusion bufferen inneholder  $Mg^{2+}$  fordi det er en nødvendig kofaktor for DNA polymerasen. Dersom det var vanskelig å få et PCR-produkt ble  $Mg^{2+}$  konsentrasjonen økt. Dette ble gjort ved å bytte ut 1  $\mu$ l av vannet i reaksjonen med 1  $\mu$ l 50 mM  $MgCl_2$ .

Tabell 2.2. Reaksjonsoppsettet for en PCR-reaksjon med Phusion® High-Fidelity DNA polymerase.

Reagenser	Volum i $\mu$ l
10 $\mu$ M forward primer	2,5
10 $\mu$ M reverse primer	2,5
5x Phusion® High-Fidelity buffer	10
10 mM dNTPs	1
Templat DNA	2
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	0,5
dH <sub>2</sub> O	31,5
<b>Totalt volum</b>	<b>50</b>

Tabell 2.3 viser PCR programmet som ble brukt til å amplifisere DNA templat i denne oppgaven. Etter denaturering ved 94°C fulgte primerhybridisering ved 55°C. Dette var en passende temperatur for primerene i PCR-reaksjonen i Tabell A.4. Temperaturen er basert på smeltepunktet til primerene, som varierer etter GC-innhold og primerlengde. Den optimale temperaturen for Phusion® High-Fidelity DNA polymerase er 68°C under elongeringstrinnet, og anbefalt elongeringstid er 30 sekunder per kilobase for gDNA (BioLabs, 2020).

Tabell 2.3. PCR programmet som ble brukt til amplifisering av DNA med Phusion® High-Fidelity DNA polymerase.

Steg	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Initiell denaturering	94°C	10 minutter	1x

Denaturering	94°C	30 sekunder	
Primerhybridisering	55°C <sup>a</sup>	30 sekunder	25x
Elongering	72°C	50 sekunder <sup>b</sup>	
Slutt elongering	72°C	3 minutter	1x
Oppbevaring	4°C	∞	

<sup>a</sup> Temperaturen varier etter smeltepunktet til primerene.

<sup>b</sup> Tiden per elongeringstrinn varierer etter lengden av DNA fragmentet som skal amplifiseres.

Det ble lagd degenererte oligonukleotid-primerne basert på en sammenligning av aminosyresekvensene til såkalte «nonribosomal peptide synthetases» (NRPS). Det er disse enzymene som syntetiserer sykliske lipopeptider (Das et al., 2008). NRPS-sekvensene ble funnet ved søk i NCBI databasen, og primerene ble laget på grunnlag av de mest konserverte strekkene av aminosyrer i disse proteinene som samtidig ikke lå for langt fra hverandre i proteinet. Deretter ble det undersøkt om *S. colwelliana* produserte NRPS enzymer via PCR screening for NRPS-sekvensene.

### 2.3.3 Gelelektroforese

Gelelektroforese er en teknikk hvor et elektrisk felt blir brukt til å separere molekyler, slik som DNA eller protein, etter størrelse og ladning. I denne oppgaven ble DNA fragmenter separert, og det ble gjort i en agarosegel. Ved nøytral pH har DNA negativ ladning og dette er grunnen til at det vandrer mot den positive polen i et elektrisk felt. Agarose polymerene danner et nettverk av porer som fungerer som en slags sil når DNA passer igjennom gelen. Mindre fragmenter møter mindre motstand og vandrer fortere enn store fragmenter, noe som gjør det mulig å separere DNA molekylene etter størrelse. For å opprettholde en jevn pH under gelelektroforesen blir det brukt en elektroforesebuffer som bufrer systemet (Lee, Costumbrado, Hsu, & Kim, 2012). Etter at elektroforesen er ferdig, må det usynlige DNA-et synliggjøres. Det finnes flere metoder for å gjøre dette, men i denne oppgaven ble det tilsatt et fluorescerende stoff kalt peqGREEN til gelen. Ved bindingen til DNA og under UV-lys, fluorescerer stoffet.

En 1 % agarosegel ble brukt til å separere PCR produktene etter endt PCR. Gelen ble lagd ved å tilsette 0,5 g agarosepulver i 50 ml 1x TAE buffer, og agarosen ble løst i bufferen under oppkok i en mikrobølgeovn. Når løsningen var helt klar, ble det tilsatt 1 µl peqGREEN. Løsningen ble forsiktig blandet, helt opp i støpeformen, og for å lage brønner ble det satt kammer i gelen. Etter 20-25 minutter hadde gelen stivnet, og den ble overført til gelkaret. Kammene ble tatt ut og det ble tilsatt nok 1x TAE buffer til å dekke gelen. Deretter ble prøven applisert i brønnene. Prøven som skal kjøres på gel ble tilsatt loading buffer før applisering. Loading bufferen gjør det enklere å applisere prøven fordi den gjør at prøveløsningen får høyere massetetthet, slik at den synker til bunnen av brønnen.. Dessuten er loading bufferen tilsatt et organisk fargestoff som vandrer i bufferfronten slik at det blir mulig å se når elektroforesen er ferdig. I tillegg ble 5 µl av en såkalt 1 kb DNA ladder tilsatt i en brønn. Ladderens inneholder DNA fragmenter med kjent størrelse og gjør det mulig å finne en omtrentlig størrelse på fragmentene i prøven. Elektroforesen ble utført ved 90 volt i 20 minutter. Deretter ble gelen tatt ut av kammeret og UV-lys ble brukt til å visualisere DNA-båndene i et geldokumenteringssystem (Gel Doc 1000).

#### **2.3.4 DNA sekvensering**

DNA sekvensering er en metode der nukleotidrekkefølgen i et DNA fragment blir funnet. Det finnes flere sekvenseringsmetoder, men i denne oppgaven ble det brukt Sanger sekvensering til å identifisere bakteriene. Sanger sekvensering krever DNA polymerase, primere, templat DNA, deoksyribonukleotider og dideoksyribonukleotider (ddATP, ddCTP, ddTTP og ddGTP). Metoden er basert på at ddNTPer mangler en hydroksylgruppe (-OH), noe som gjør det umulig for DNA polymerasen å sette på flere nukleotider (Sanger & Coulson, 1975). I tillegg er ddNTPene merket med fire ulike fluorescerende grupper, noe som gjør at de kan detekteres. Under Sanger sekvensering vil DNA polymerasen inkorporere enten dNTPer eller ddNTPer, og ved innsetting av ddNTPer stopper sekvensen. Resultatet er at det dannes mange forkortede kopier av originale sekvensen som kan sorteres etter størrelse. ddNTPene detekteres etter hvilken posisjon i sekvensen de terminerer, og dataene blir vist som et kromatogram det er mulig å lese sekvensen av (Ansorge, Sproat, Stegemann, & Schwager, 1986) .

Identifisering av bakteriene ble gjort ved å sekvensere 16S rRNA-genet. Genet blir brukt til å finne fylogenetisk slektskap mellom bakterier, noe som er basert på at genet er universelt for

bakterier, og det har både konserverte og varierende områder. Dette gjør det mulig å identifisere bakterier på slekts- eller artsnivå ved å sammenligne 16S rRNA sekvenser (Mignard & Flandrois, 2006).

Selve sekvenseringen ble gjort av firmaet Eurofins. Prøvene som ble sendt til sekvensering måtte innehold riktig konsentrasjon av primer og templat DNA. Dette ble gjort ved å tilsette 1 µl av 10 µM primer og 50 ng templat DNA i en prøve der dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til et sluttvolum på 10 µl. Det ble klargjort to prøver per DNA templat som skulle sekvenseres, en for forward primer og en for revers primer. Konsentrasjonen av templat DNA i prøven ble målt med Nanodrop 2000. Nanodropmålingen gjorde det mulig å regne ut hvor mye DNA som skulle tilsettes for å oppnå en konsentrasjon på 50 ng i prøven.

Det var ønskelig å selektere for mutanter av *S. pneumoniae* RH14 med økt resistens mot colwellicin. Fremgangsmåten for dette er beskrevet i avsnitt 2.7.2. For å sjekke om seleksjonspresset RH14 ble utsatt for resulterte i suppressormutasjoner, ble det gjennomført genomsekvensering med Illumina sekvensering. Dette er en neste generasjons sekvenseringsteknikk som kalles high-throughput sekvensering. Dette betyr at det er mulig med massiv parallell sekvensering av mange tusen prøver, samt at genom kan sekvenseres raskere og billigere enn med Sanger sekvensering (Van Dijk, Auger, Jaszczyszyn, & Thermes, 2014). Selve sekvenseringen ble utført av Universitetet i Oslo. Det var nødvendig å sende med gelbilde av prøvene, samt Nanodropmåling av konsentrasjonen i ng/µl, pluss målinger av A<sub>260/280</sub> og A<sub>260/230</sub>.

## **2.4 Dyrkingsbetingelser for produksjon av antimikrobielt stoff**

### **2.4.1 Dyrkingsbetingelser for *E. oxidotolerans***

For å finne optimal produksjon av det antimikrobielle stoffet når *E. oxidotolerans* blir dyrket på agarskåler, ble flere næringsmedier, inkubasjonstider og temperaturer undersøkt. Dette ble gjort ved å tilsette 3 µl av en flytende kultur på 10 TH plater og 10 BHI plater. I tillegg ble det tilsatt 3 µl av en flytende kultur på en MH plate, en LB plate og en Middlebrook plate.

Oppskriften på de ulike agarmediene finnes i A.7.1. En av hver plate ble inkubert aerobt i romtemperatur i to døgn og deretter ble softagar med *S. pneumoniae* RH425 lagt over platen



for å teste antibakteriell aktivitet etter protokollen i 2.2.2. De resterende 9 TH platene og de resterende 9 BHI platene ble fordelt på ulike temperaturer og ulike inkubasjonstider. Platene ble inkubert ved 10°C, 20°C eller 30°C i 2,4 eller 7 døgn. Deretter ble eventuelt antimikrobiell aktivitet undersøkt med *S. pneumoniae* RH425 som indikatorbakterie.

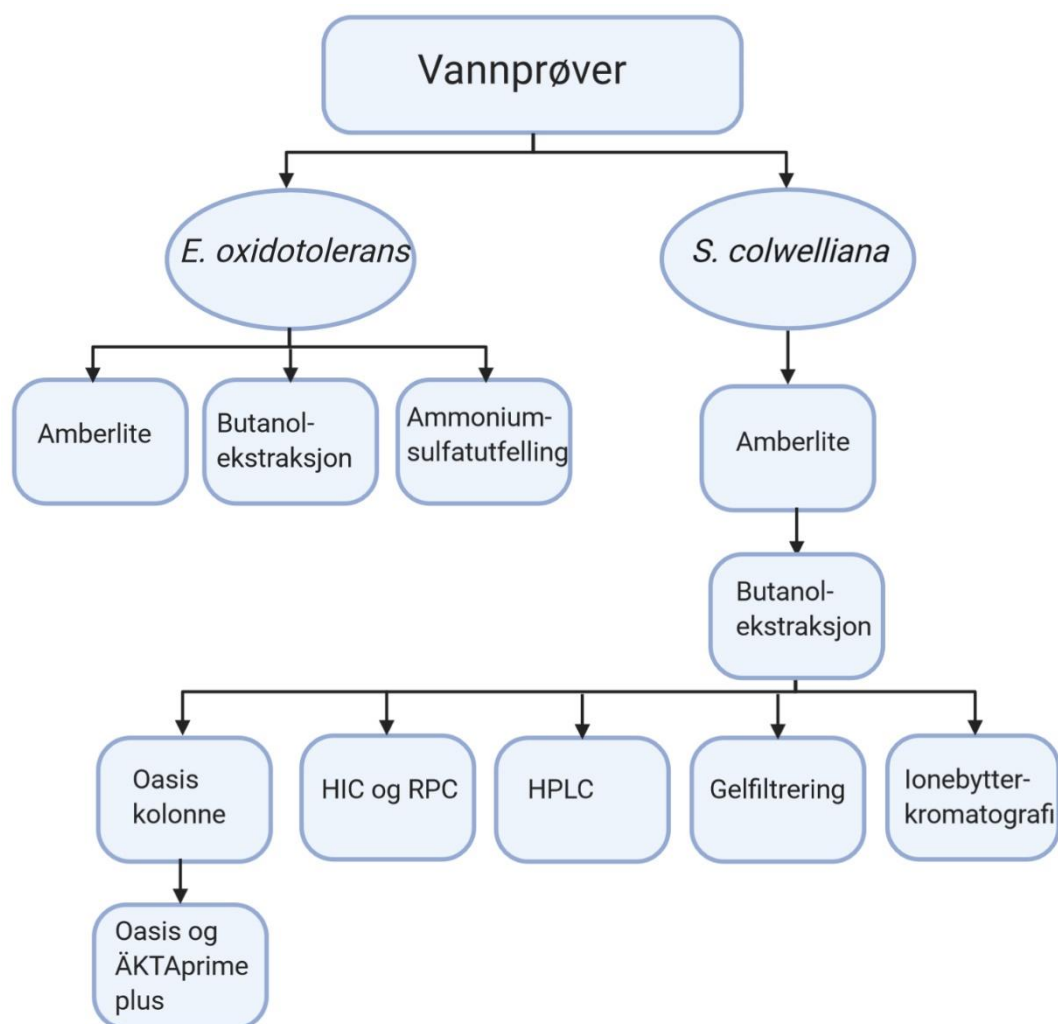
Ved dyrking av *E. oxidotolerans* i flytende kultur ble det brukt enten BHI eller TH medium, og den flytende kulturen ble inkubert i minst 2 døgn i romtemperatur.

#### **2.4.2 Dyrkingsbetingelser for *S. colwelliana***

Dyrking av *S. colwelliana* ble gjort med BHI næringsmedium. Det ble brukt en erlenmeyerkolbe med riller i bunnen til dyrking av *S. colwelliana* i flytende kultur. Dette ble gjort for å øke oksygeninnholdet i kulturen når den ble ristet ved 150 rpm. Bakteriekulturen ble inkubert i 4 døgn ved 24°C. Dyrking på plate ble gjort ved enten å tilsette *S. colwelliana* fra en flytende kultur eller ved å stryke ut bakterien. Deretter ble BHI platen inkubert aerobt i romtemperatur i minst et døgn.

#### **2.5 Rensing av colwellicin**

I løpet av denne oppgaven ble flere ulike metoder brukt i et forsøk på å rense colwellicin fra *S. colwelliana*, samt til å forsøke å isolere det antimikrobielle stoffet fra en flytende kultur av *E. oxidotolerans*. Figur 2.1 viser en oversikt over metodene som ble prøvd ut.



Figur 2.1. Figuren viser en oversikt over alle metodene som ble bruk til å rense colwellicin, samt hvilke metoder som ble bruk til å prøve å isolere det antimikrobielle stoffet fra en flytende kultur av *E. oxidotolerans*.

### 2.5.1 Amberlite

Amberlite XAD1180N ble brukt til å anrike colwellicin fra en flytende kultur av *S. colwelliana*. I tillegg ble amberlite brukt som et første trinn i et forsøk på å rense det antimikrobielle stoffet som produseres av *E. oxidotolerans* når denne bakterien vokser på agarskåler. Amberlite XAD1180N er en ikke-ionisk matriks som binder hydrofobe og polare forbindelser (Sigma-Aldrich, 2020a).

For å oppnå binding mellom colwellicin og amberlite ble kultursupernatanter (600 ml) fra *S. colwelliana* inkubert med 3 g amberlite i minst 1 time ved romtemperatur under omrøring ved

150 rpm. Etter at supernatanten var helt av, ble amberlite-matriksen vasket for å bli kvitt ikke-bindende molekyler. Til slutt ble stoffer som bandt amberlite, under de betingelsene som ble brukt, eluert med et passende organisk løsemiddel. I løpet av denne oppgaven ble det utført mange forsøk med amberliterensing for å optimalisere prosedyren. Etter å ha prøvd ulike konsentrasjoner av etanol og metanol til vasking og eluering, endte den endelige protokollen opp med to vask med 60% etanol etterfulgt av to elueringstrinn med 100% metanol. For hvert vaske- eller elueringstrinn ble 50 ml av etanol eller metanol tilsatt til amberlite-matriksen og løsningen ble blandet i ett minutt. Deretter ble falconrøret sentrifugert i to minutter ved 4000 x g for å separere kulene fra væsken. Videre ble supernatanten enten kastet etter vask eller tatt vare på under eluering. For å oppkonsentrere colwellicin ble elueringsfraksjonene tørket. Dette ble gjort ved å fordele elueringsfraksjonene i eppendorfrør, og vakuamtørke disse. Under vakuamtørking blir prøven tørket under lavt trykk, noe som gjør at tørkingen kan foregå ved lavere temperaturer. Væsken som fordamper fra prøven suges ut med en pumpe og kondenserer tilbake til flytende form i en kjølefelle (-50°C). Deretter ble det tørkede stoffet løst opp i et mindre volum med dH<sub>2</sub>O, ofte 20-25 µl, og oppbevart ved -20°C.

### **2.5.2 Butanolekstraksjon**

Etter det første rensetrinnet var colwellicin anrikt, men ikke rent. Butanolekstraksjon ble derfor benyttet som det neste trinnet i renseprosessen. Under butanolekstraksjonen vil butanol fungere som den organiske fasen, som vil tiltrekke seg hydrofobe forbindelser, mens vannfasen vil tiltrekke seg hydrofile forbindelser. Amfile forbindelser vil legge seg i grensen mellom butanol- og vannfasen. En 1:1 blanding bestående av butanol og dH<sub>2</sub>O-løst colwellicin fra amberliterensing ble vortexet i ett minutt. Blandingen ble sentrifugert i 2 minutter ved 5000 x g, noe som førte til at fasene ble separert og gav en butanolfase, interfase og vannfase. Deretter ble butanolfasen overført til eppendorfrør, vakuamtørket og løst i et lite volum med dH<sub>2</sub>O.

Første gangen butanolekstraksjonen ble gjennomført ble også vannfasen og interfasen oppkonsentrert ved tørking, og testet for antimikrobiell aktivitet. Butanolekstraksjon ble også utført etter samme metode med supernatanten fra en flytende kultur med *E. oxidotolerans* i et forsøk på å isolere det antimikrobielle stoffet fra en flytende kultur.

### 2.5.3 High-performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC er en teknikk som brukes til å separere, identifisere og kvantifisere komponenter i en løsning. Teknikken er basert på at en løsning (mobilfase) blir pumpet med høyt trykk gjennom en kolonne som inneholder et absorberende materiale (stasjonærfase), og at hver komponent i løsningen interagerer ulikt med det absorberende materialet. Dette fører til forskjellige strømningshastighet, noe som resulterer i at de ulike komponentene separeres etter hvor lang tid de bruker på å passere igjennom kolonnen. Denne tiden kalles for retensjonstid (Neue & El Fallah, 1997). Det finnes flere ulike typer HPLC, men i denne oppgaven ble revers fase HPLC brukt. Denne metoden er basert på at kolonnen er laget av et hydrofobt materiale hvor hydrofobe grupper bestående av 18 eller 8 karbonatomer er bundet til overflaten av en silikamatriks. Separasjon av komponentene i løsningen er da basert på hydrofobe interaksjoner med C-18 eller C-8 gruppene, og retensjonstiden vil derfor være lengere for molekyler som er mindre polare, mens polare molekyler eluerer lettere (Molnar & Horváth, 1976). Det er mulig å detektere molekylene som passerer gjennom kolonnen med ulike metoder, men i denne oppgaven ble absorbans av UV-lys ved 206 nm eller 220 nm benyttet.

Det gjort mange forsøk med revers fase HPLC for å optimalisere rensingen av colwellicin, og det ble brukt flere ulike løsningskombinasjoner og kolonner. En oppsummering av hvilke buffere som ble brukt med hvilke kolonner er angitt i Tabell 2.4.

Tabell 2.4. En oversikt over alle kolonnene og løsningskombinasjonene som ble brukt ved HPLC.

Kolonne	Løsning A og løsning B
Halo 160 Å ES-C18, 2.7 µm, 4.6 x250 mm	<ul style="list-style-type: none"><li>Løsning A: 0,05 % TFA i dH<sub>2</sub>O Løsning B: 0,05 % TFA i 100% acetonitril</li><li>Løsning A: 0,1% maursyre i dH<sub>2</sub>O Løsning B: 0,1% maursyre i 100% metanol</li></ul>
YMC-Triat C8/S-3µm/12nm, 4.6 x 250 mm	<ul style="list-style-type: none"><li>Løsning A: 0,1% maursyre og 5% metanol i dH<sub>2</sub>O Løsning B: 100% metanol</li><li>Løsning A: 0,1% maursyre i dH<sub>2</sub>O</li></ul>

Før prøven ble injisert på HPLC instrumentet, ble kolonnen vasket med løsning B, og deretter ekvilibrert med løsning A. Prøven ble klargjort ved å lage en 1:1 blanding av dH<sub>2</sub>O-løst colwellicin og løsning A. Prøven ble så sentrifugert i 10 minutter ved 20 000 x g. Deretter ble supertanten tatt ut, og eventuelle utfellinger ble kastet, slik at prøven ikke skulle tette igjen kolonnen. De første forsøkene med HPLC ble gjort med colwellicin som kun hadde vært rensert med Amberlite XAD1180N. Senere ble HPLC trinnet utført med colwellicinprøver som i tillegg hadde vært ekstrahert med butanol. I tillegg ble en ufortynnet prøve bare bestående av butanolekstrahert colwellicin og ikke løsning A brukt under et forsøk med C8 kolonnen. Prøvevolum på 15-50 µl ble injisert inn i kolonnen. Deretter ble colwellicin forsøkt eluert med en lineær 30 minuttersgradient fra 0% løsning B til 100% løsning B. Colwellicin ble forsøkt detektert ved enten 206 nm, som er brukt for peptider, eller 220 nm, som er optimalt for lipopeptider. Fraksjonene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae* RH425, enten på skåler eller i flytende kultur i en plateleser.

#### 2.5.4 Gelfiltrering

Gelfiltrering er en teknikk som brukes til å separere molekylene i en løsning etter størrelse. Løsningen blir pumpet igjennom en kolonne som inneholder en matriks med porer og kanaler i ulike størrelser. Mindre molekyler vil bruke lengre tid på å vandre igjennom alle porene og kanalene i kulene fordi de får en lengere vei gjennom kolonnen enn de molekylene som er så store at de glir utenom eller bare vandrer igjennom de største porene. Derfor passerer de største molekylene gjennom kolonnen først, mens de mindre molekylene passerer gjennom kolonnen sist (Laurent & Killander, 1964). Flere runder med gelfiltrering ble gjort i et forsøk på å rense colwellicin, og ulike kolonner og buffere ble brukt. Oversikten over hvilken kolonne som ble brukt med hvilke buffere er vist i Tabell 2.5. Gelfiltreringen ble gjort med et ÄKTA pure kromatografi system.

Tabell 2.5. En oversikt over hvilke buffer/kolonne kombinasjoner som ble brukt under gelfiltreringen.

Kolonne	Buffer
Superdex™ 75 10/300	TBS

Superdex™ 30 Increase 10/300 GL	20% etanol i 100% TBS
	70% etanol i dH <sub>2</sub> O
	8M Urea i dH <sub>2</sub> O

Gelfiltrering startet med ekvilibrerings av kolonnen med ønsket buffer, og prøvene med colwellicin ble klargjort til å inneholde lik buffer som kolonnen ble ekvilibrert med. Klargjøringen av prøven varierte fra gang til gang. Når TBS buffer ble brukt til ekvilibrerings besto prøven av 200 µl eluat fra amberliterensetrinnet. En annen strategi var å gelfiltrere prøven etter butanolekstraksjonstrinnet, der prøven hadde blitt tørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O. Det var mistanke om at colwellicin kunne være et hydrofobt stoff basert på dets binding til Amberlite XAD1180N og preferanse for å være løst i organiske løsemidler som butanol. For å øke løseligheten og hindre dannelsen av aggregater under gelfiltreringen, ble kolonnen ekvilibrert med TBS tilsatt etanol. I en type forsøksoppsett ble kolonnen ekvilibrert i TBS tilsatt 20% etanol. For at prøven skulle inneholde like mye etanol (20%), ble 400 µl av prøven fra butanolfasen tilsatt 104 µl etanol. I et annet forsøksoppsett ble gelfiltreringskolonnen ekvilibrert med dH<sub>2</sub>O tilsatt 70% etanol. I dette tilfellet ble 210 µl colwellicin fra butanolekstraksjon tilsatt 490 µl etanol til en sluttkonsentrasjon på 70% etanol. I et tredje forsøk på å hindre aggregering av det antimikrobielle stoffet ble dH<sub>2</sub>O tilsatt urea. Også ved bruk av urea ble prøven fra butanolfasen (250 µl) tilsatt 0,12g urea slik at konsentrasjonen i prøven var den samme som i urealøsningen (8M). Uavhengig av klargjøringsmetode ble prøven sentrifugert i 5 minutter ved 20 000 x g og supernatanten ble tatt vare på. Eventuelle utfellinger ble kastet slik at kolonnen ikke skulle bli tettet igjen. 200- 500 µl av supernatanten fra prøven ble injisert inn i kolonnen og colwellicin ble forsøkt eluert med bufferen. Eluering foregikk isokratisk. Det betyr at mobilfasen holdes konstant under elueringen. Bufferen hadde en jevn flyt på 0,3 ml/minutt eller 0,4 ml/minutt, og colwellicin ble forsøkt detektert med en UV-detektor ved 280 nm. Fraksjonene ble testet for aktivitet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay eller i en plateleser.

### 2.5.5 Ionebytterkromatografi

Ionebytterkromatografi er en separasjonsteknikk som er basert på den elektriske ladningen til molekyler. Det blir brukt en kolonne som er pakket med et materiale som er dekket med negative eller positive ladninger. Hvis kolonnen består av et negativt ladd materiale, vil den

binde positivt ladde molekyler når de passer igjennom kolonnen. Hvis kolonnen derimot består av et positivt ladd materiale, vil den binde negativt ladde molekyler. Deretter brukes en salt eller pH gradient til å frigjøre molekylerne fra materialet (Yamamoto, Nakanishi, & Matsuno, 1988). I denne oppgaven ble ionebytterkromatografi benyttet i et forsøk på å rense colwellicin. Dette ble utført med en Mono S 5/50 GL kolonne (kationbytter, altså negativt ladd kolonnemateriale) koblet opp mot et ÄKTA pure kromatografisystem.

100 µl av elutatet fra amberliterensetrinnet ble tørket og deretter løst i 20 mM Tris HCl, pH 7,4 (buffer A) og sentrifugert i 10 minutter ved 20 000 x g. Supernatanten ble tatt vare på mens pelleten ble kastet slik at kolonnen ikke skulle bli tettet igjen. Supernatanten ble injisert på kolonnen og colwellicin ble forsøkt eluert over en 30 minutters lineær NaCl-gradient fra 0 til 1M NaCl i 20 mM Tris HCl, pH 7,4 (buffer B). Mono S kolonnen er negativt ladet og binder positivt ladde molekyler. Etter hvert som konsentrasjonen av Na<sup>+</sup> fra buffer B øker, vil Na<sup>+</sup> utkonkurrere de positivt ladde molekylerne i prøven om å binde til kolonnen. Dette fører etter hvert til at positivt ladde molekyler i prøven løsner fra kolonnen. Molekyler med mange positive ladninger vil binde sterkt til kolonnematerialet og elueres ved høy Na<sup>+</sup> konsentrasjon, mens de med få positive ladninger vil binde svakere og elueres ved lavere Na<sup>+</sup> konsentrasjoner. Colwellicin ble forsøkt detektert ved måling av absorbans (UV 280 nm). Fraksjonene fra ionebytterkromatografi ble oppbevart ved – 20°C og testet for antimikrobiell aktivitet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay. Dette ble også gjort med det materialet som ikke bandt til kolonnen for å undersøke om colwellicin bandt til kolonnen eller ikke.

### **2.5.6 Hydrofob interaksjonskromatografi og revers fase kromatografi**

Både hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) og revers fase kromatografi (RPC) har til felles med revers fase HPLC at de er kromatografiske metoder der det blir brukt en hydrofob stasjonærfase. Hovedprinsippet er at molekylerne i en løsning interagerer ulikt via hydrofobe interaksjoner med et hydrofobt kolonnemateriale, noe som gjør det mulig å separere molekyler etter retensjonstiden. Det finnes derimot viktige forskjeller mellom de to metodene. I revers fase kromatografi vil molekyler som er til stede i prøven binde seg med ulik styrke til de ikke-polare alkylkjedene (C-18 eller C-8) som dekker kolonnematerialet. Hvor sterkt de binder kommer an på hvor polare de er. Ikke-polare molekyler binder sterkest, mens sterkt polare molekyler binder svakt. For å separere molekylerne blir de eluert med en økende

gradient av et organisk løsemiddel med lav polaritet. Ved HIC tas det hensyn til at et molekyl består av en blanding av hydrofobe og hydrofile områder, og at de hydrofobe områdene ofte ikke er tilgjengelige for interaksjon med en ikke-polar ligand på grunn av at de skjermes av vannmolekyler. For å øke eksponeringen av de hydrofobe områdene slik at de lettere kan binde liganden, tilsettes en høy konsentrasjon av salt, ofte 2M ammoniumsulfat. HIC kolonnen ekvilibrerer først med en buffer som inneholder for eksempel 2M ammoniumsulfat, før prøven, som inneholder tilsvarende saltkonsentrasjon, injiseres. Molekyler som har bundet HIC kolonnen elueres med en omvendt gradient hvor saltkonsentrasjonen i bufferen sakte senkes til null. (Fausnaugh, Kennedy, & Regnier, 1984). I denne oppgaven ble HIC og RPC brukt i et forsøk på å rense colwellicin. Dette ble gjort med henholdsvis en HiTrap Phenyl HP kolonne for HIC og en Resource RPC kolonne for RPC. Begge kolonnene ble koblet opp til et ÄKTA prime plus kromatografisystem.

Colwellicin ser ut til å være ekstremt hydrofobt basert på tidligere resultater og det gikk ikke å eluere stoffet fra hverken C18 eller C8. Derfor valgte vi å teste om colwellicin ville binde til HIC-phenyl-kolonnen, uten å ha salt til stede, da hydrofob interaksjonskromatografi ble utført. Vi var oppmerksomme på at det var stor sannsynlighet for at colwellicin ville gå rett gjennom kolonnen, men testet likevel. Deretter ble colwellicin eluert med metanol siden colwellicin elueres godt fra Amberlite XAD1180N med metanol. Colwellicinprøven som ble brukt til HIC ble tatt fra en butanolfase etter butanolekstraksjon. 100 µl butanolfaseekstrahert colwellicin ble tørket og løst i 1 ml dH<sub>2</sub>O (buffer A). Før prøven ble injisert inn i kolonnen, ble kolonnen ekvibrert med 5 ml dH<sub>2</sub>O. Dette ble gjort ved å presse vannet gjennom kolonnen med en sprøyte. Deretter ble prøven injisert inn i kolonnen, etterfulgt av en innsprøytning av 4 ml dH<sub>2</sub>O. Vannet som ble sprøytet igjennom ble tatt vare på og testet for antimikrobiell aktivitet sammen med fraksjonene fra HIC. Dette ble gjort for å undersøke om colwellicin bandt til fenylkolonnen eller ikke. Deretter ble kolonnen koblet til ÄKTAprime plus, og colwellicin ble forsøkt eluert med en økende gradient av metanol (buffer B). Gradienten startet fra 0% metanol og deretter var det en lineær økning i metanol til 100% i løpet av 30 minutter. Fraksjonene fra HIC ble vakuomtørket og løst i 50 µl dH<sub>2</sub>O. Deretter ble fraksjonene testet for aktivitet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay.



Revers fase kromatografi med Resource RPC kolonnen ble gjort som en støteluering med 100% acetonitril. Colwellicinprøven som ble brukt hadde blitt tørket etter butanolekstraksjon og løst opp i dH<sub>2</sub>O. Prøven ble injisert inn i kolonnen og ved bruk av skiftet fra dH<sub>2</sub>O til 100% acetonitril ble colwellicin forsøkt støteluert fra RPC kolonnen. Fraksjonene ble vakuamtørket, løst opp 20 µl dH<sub>2</sub>O og deretter testet for aktivitet mot *S. pneumoniae* via avlesning av OD<sub>550</sub> i en Synergy H1 plateleser.

### **2.5.7 Oasis HLB Extraction kolonne**

Oasis kolonnene inneholder en såkalt hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB), revers fase absorbent som kan brukes til fast-fase ekstraksjon. Fast-fase ekstraksjon vil si at et fast stoff i små kolonner brukes til selektiv rensing og oppkonsentrering av forbindelser. Kolonnen har blitt utviklet for å ekstrahere en rekke sure, basiske og nøytrale forbindelser, og inneholder en kopolymer. Kopolymeren består av en bestemt ratio av en hydrofil monomer, divinylpyrrolidon, og en hydrofob monomer, divinylbenzen (Waters, 2010). I denne oppgaven ble Oasis kolonnene brukt i et forsøk på å rense colwellicin.

Under bruk av Oasis kolonnene ble en 5 ml pipette brukt til å generere et trykk slik at løsningsene ble presset igjennom kolonnen. Først ble kolonnen ekvilibrert med 0,6 ml 80% acetonitril, og deretter ble 0,6 ml dH<sub>2</sub>O presset igjennom. Videre ble 50 µl av en prøve med colwellicin tilsatt. Prøven ble tatt ut fra en tørket butanolfase, som hadde blitt løst opp i dH<sub>2</sub>O, etter rensing med butanolekstraksjon. I løpet av oppgaven ble det gjort flere forsøk med Oasis kolonnene, og under hvert forsøk ble ulike vaske- og elueringsløsninger brukt. Dette ble gjort for finne hvilke løsninger og hvilken konsentrasjon som førte til eluering av colwellicin. Til slutt besto Oasis protokollen av vask med 400 µl 30% etanol, 400 µl 50% isoporpanol, 400 µl 40% acetonitril og 400 µl 50% metanol. Colwellicin ble deretter eluert med 400 µl 100% metanol, og løsningen ble vakuamtørket, løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O og oppbevart ved – 20°C. Fraksjonene ble testet for antimikrobiell aktivitet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay.

### **2.5.8 Oasis og ÄKTAPrime plus**

Det var ønskelig å eluere colwellicin med en metanolgradient fra en Oasis kolonne for å øke renheten på det rensede colwellicinet. Derfor ble en Oasis kolonne koblet til ÄKTAPrime

plus. Før kolonnen ble koblet til ÄKTAprime plus instrumentet, ble den ekvilibrert med 0,6 ml 80% acetonitril etterfulgt av 0,6 ml dH<sub>2</sub>O. Deretter ble prøven injisert inn i kolonnen. Prøven besto av 100 µl colwellicin fra et stort parti med colwellicin fra en butanolekstraksjon som hadde blitt tørket og løst opp i 3,6 ml dH<sub>2</sub>O. Prøven hadde blitt sentrifugert ved 20 000 x g i 10 minutter for å fjerne utfellinger. Etter at prøven hadde blitt injisert inn i kolonnen ble 400 µl dH<sub>2</sub>O presset inn i kolonnen for å føre prøven igjennom kolonnematerialet. Oasis kolonnen ble deretter koblet til ÄKTAprime plus via en overgang fra en HPLC kolonne. Denne overgangen kunne bare bli festet i bunnen av Oasis kolonnen, og derfor ble kolonnen snudd opp ned, og plastdelen over det absorberende materialet ble skåret av. Deretter ble colwellicin eluert med en 0% - 100% metanolgradient (30 minutter). Fraksjoner på 1 ml ble samlet ved at Oasis kolonnen ble flyttet manuelt fra oppsamlingsrør til oppsamlingsrør. Etter at Oasis kolonnen hadde blitt koblet fra ÄKTA prime plus instrumentet, ble eventuelt resterende colwellicin støteluert ved å presse 1 ml 100% metanol gjennom kolonnen med en 5 ml pipette for å sikre at 100% metanol hadde gått igjennom kolonnen. Denne fraksjonen og fraksjonene fra da Oasis kolonnen var koblet til ÄKTA prime plus instrumentet ble vakuomtørket, løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O og oppbevart ved – 20°C. Fraksjonene ble testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay.

### **2.5.9 Ammoniumsulfatutfelling**

Ammoniumsulfatutfelling er en metode som blir brukt til å felle ut proteiner fra en løsning. Det er basert på at løseligheten til proteiner vanligvis minker ved høye saltkonsentrasjoner, noe som fører til at proteinene klumper seg sammen (Wingfield, 2001). I et forsøk på å rense det antimikrobielle stoffet fra en flytende kultur av *E. oxidotolerans* ble ammoniumsulfatutfelling utført. Dette ble gjort ved å tilsette 8 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> til 20 ml supernatant fra en flytende kultur med *E. oxidotolerans*, slik at løsningen inneholdt 40% ammoniumsulfat. Deretter ble (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> løst opp i supernatanten og løsningen sto i 1 time i romtemperatur. Videre ble løsningen sentrifugert ved 12 000 x g i 30 minutter, og supernatanten helt av og kastet. Pelleten ble løst opp i 1 ml dH<sub>2</sub>O og testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay.

## **2.6 Karakterisering av colwellicin**

### **2.6.1. Behandling av colwellicin med enzymer**

#### **2.6.1.1 Polymyxin acylase**

Polymyxin acylase er et enzym som deacylerer acylgrupper, og enzymet vil derfor kutte bindingen mellom for eksempel en fettsyre og et peptid i et lipopeptid (Misumi, Tsuruta, Furuishi, & Shoji, 1995). I denne oppgaven ble enzymet brukt til å undersøke om colwellicin kan være et lipopeptid eller om colwellicin generelt har acylgrupper som er viktig for å opprettholde den antimikrobielle aktiviteten.

Prøven ble klargjort for tilsetning av polymyxin acylase ved å blande 5 µl av et eluat fra amberliterensing, som hadde blitt tørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O, med 5 µl av en Tris-HCl buffer (150 mM NaCl i 10 mM Tris-HCl, pH 8,1). Totalt 10 µl prøve ble tilsatt 1 µl polymyxin acylase fra stockløsningen på 10 mg/ml slik at konsentrasjonen av enzymet i prøven ble 1 µg/µl. I tillegg ble det lagd en kontroll bestående av 5 µl dH<sub>2</sub>O, 5 µl Tris-HCl buffer (150 mM NaCl i 10 mM Tris-HCl, pH 8,1) og 1 µl polymyxin acylase for å undersøke om enzymet i seg selv hadde en antimikrobiell effekt mot indikatorbakterien. Prøven og kontrollen ble satt til inkubering over natt ved 37°C, som er optimal temperatur for enzymet. Deretter ble 3 µl av prøven og 3 µl av kontrollen testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay.

#### **2.6.1.2 Proteinase K**

Proteinase K hydrolyserer peptidbindinger i proteiner og har bred spesifisitet. Proteinase K tilhører gruppen serin proteaser siden serin er den nukleofile aminosyren i enzymets aktive sete (Ebeling et al., 1974). Colwellicin ble behandlet med enzymet for å undersøke om det har peptidbindinger som kløyves av proteinase K.

Et eluat fra amberliterensing av colwellicin som hadde blitt tørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O, ble behandlet med proteinase K. Sluttkonsentrasjonen av enzymet i 10 µl av eluatet var 20 µg/ml. Etter tilsetning ble prøven inkubert i 3 timer ved 37 °C, den optimale temperaturen for proteinase K. Deretter ble enzymet denaturert ved 95°C i 10 minutter, slik at det ikke skulle kunne virke mot indikatorbakterien. I tillegg ble det tatt med en kontroll bestående av 10 µl

eluat som ble varmebehandlet i 10 minutter ved 95°C. 3 µl av prøven og 3 µl av kontrollen ble testet i et overlay assay. Det ble brukt to *S. pneumoniae* indikatorstammer: RH425 og RH14.

### **2.6.1.3 Trypsin**

Trypsin er et sekvensspesifikt enzym som hovedsakelig hydrolyserer peptidbindinger på karboksylsiden av aminosyrene lysin og arginin (Rick, 1974). Colwellicin ble behandlet med enzymet for å undersøke om forbindelsen inneholder trypsin-sensitive peptidbindinger.

1 µl av en løsning med 1 µg/µl trypsin ble tilsatt til 10 µl eluat fra amberliterensing. Elutatet hadde blitt vakuomtørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O. Prøven ble inkubert i 3 timer ved 37°C, og deretter ble enzymet denaturert ved 95°C i 10 minutter. I tillegg til enzymbehandlingen ble også en kontroll bestående av bare 10 µl eluat varmebehandlet på samme vis som prøven med enzymet. 3 µl av prøven og 3 µl av kontrollen ble testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay for å undersøke effekten av trypsinbehandlingen.

### **2.6.1.3 Pronase**

Pronase er en blanding av flere ulike ikke spesifikke endo- og eksoproteaser som hydrolyserer proteiner svært effektivt. Pronase-enzymene vil kunne kløve mange typer peptidbindinger. (Sigma-Aldrich, 2020b). Blandingen ble brukt til å undersøke om colwellicin er et peptid eller har en peptiddel, slik som for eksempel i et lipopeptid.

En oversikt over forsøksoppsettene er angitt i Tabell 2.6. Selve fremgangsmåten var lik for alle prøvene. Etter at alle reagensene bortsett fra pronase hadde blitt tilsatt, ble prøvene varmet opp til 37°C i et vannbad, som var innenfor optimaltemperaturen for pronase. Deretter ble pronase tilsatt prøvene og prøvene ble inkubert ved 37°C over natten. Totalt var det 4 prøver, der to var kontroller. Grunnen til dette var at en prøve og en kontroll ikke ble tilsatt 0,5% SDS i tilfelle SDS hadde en effekt på resultatet. SDS kan som kjent denaturere proteiner. Etter inkubering ble 3 µl av prøvene testet med et *S. pneumoniae* overlay assay.

Tabell 2.6. En oversikt over reagensene som ble brukt til behandling av colwellicin med pronase.

<b>Prøve 1 (med 0,5% SDS)</b>	<b>Kontroll 1</b>	<b>Prøve 2 (uten 0,5% SDS)</b>	<b>Kontroll 2</b>
25 µl eluat fra amberliterensing*	25 µl eluat fra amberliterensing	25 µl eluat fra amberliterensing	25 µl eluat fra amberliterensing
0,1M Tris-HCl pH 7,4	0,1M Tris-HCl pH 7,4	0,1M Tris-HCl pH 7,4	0,1M Tris-HCl pH 7,4
0,5% SDS	0,5% SDS	-	-
2 mg/ml pronase	-	2 mg/ml pronase	-
10 mM CaCl <sub>2</sub>	10 mM CaCl <sub>2</sub>	10 mM CaCl <sub>2</sub>	10 mM CaCl <sub>2</sub>

\* Eluatet fra amberliterensing hadde blitt tørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O.

### 2.6.2 Varmerbehandling av colwellicin

Eluat som hadde blitt tørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O etter amberliterensing, ble varmebehandlet som en kontroll ved de samme temperaturene som ble brukt under enzymbehandlingene. I tillegg ble det også gjennomført en lengere varmebehandling av elutatet ved litt høyere temperatur. Dette ble gjort for å undersøke om varme har en effekt på colwellicin. Da ble 25 µl eluat tilsatt et PCR-rør og prøven ble inkubert ved 100°C i 20 minutter. Deretter ble en eventuell effekt testet med et *S. pneumoniae* overlay assay.

### 2.6.3 Undersøkelse av effekten av pH på colwellicin

Tre 1:1 løsninger bestående av 5 µl tørket eluat fra amberliterensing som hadde blitt løst opp i dH<sub>2</sub>O og 5 µl pH regulerende løsninger ble lagd. Den første løsningen besto av 5 µl eluat og 10 mM HCl (pH ≈ 2,0), den andre løsningen besto av 5 µl eluat og 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, med 150 mM NaCl og i den siste løsningen var det 5 µl eluat og 25 mM NaCO<sub>3</sub> (pH 11,0). Løsningene skulle teste effekten av henholdsvis lav pH, nøytral pH og høy pH. Etter tilsetning av de pH regulerende løsningene ble pH målt på pH-papir for å sjekke at løsningen var innen ønsket pH område. Deretter ble prøvene inkubert i 1 time i romtemperatur. Etter inkubering ble løsningene nøytralisert ved å tilsette 0,5 µl 1M Tris, pH 7,4. For å verifisere at prøvene var nøytrale, ble 0,5 µl av prøvene testet med et pH-papir. 3 µl av prøvene ble testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay for å undersøke om pH hadde en effekt på den antimikrobielle aktiviteten.

#### **2.6.4 Behandling av colwellicin med ditiotreitol**

Ditiotreitol (DTT) er et redoksmiddel som reduserer disulfidbindinger (Cleland, 1964). Colwellicin ble behandlet med DTT for å undersøke om det inneholder disulfidbindinger.

1,25 µl DTT fra en 0,1M DTT løsning ble tilsatt 25 µl eluat fra amberliterensing til en sluttkonsentrasjon av DTT på 5 mM. Elutatet hadde blitt tørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O. Deretter ble prøven inkubert i romtemperatur i 1 time, og 3 µl av prøven ble testet med et *S. pneumoniae* overlay assay.

#### **2.6.5 Mikroskopi**

Det var ønskelig å undersøke om colwellicin har en effekt på morfologien til *S. pneumoniae* og å dokumentere morfologien til *S. colwelliana*. Dette ble gjort med mikroskopet LSM700 fra Zeiss. Fasekontrastmikroskopi ble brukt til å undersøke eventuelle morfologiske forandringer hos *S. pneumoniae* etter dyrking med colwellicin, og til å ta bilder av *S. colwelliana*. I tillegg ble mikroskopet brukt til å undersøke resultatet av levende/død farging.

Cellene som ble mikroskopert ble tatt fra flytende kulturer i eksponentiell vekst, og antallet celler ble justert etter behov. Dette ble gjort ved å enten fortynne ca. 50 µl av kulturen med PBS eller ved å spinne ned cellene og løse de i et mindre volum. Preparatet ble klargjort ved å legge et tynt lag 1,2% agarose/PBS gel på objektglasset og deretter tilsette 0,5 µl-1 µl cellekultur til ønsket antall brønner. Cellene ble så dekket med et dekkglass slik at preparatet ble klart for mikroskopering. Det ble brukt 100x objektiv og bildene ble tatt med kameraet ORCA-Flash 4.0 V2 Digital CMOS som var koblet til mikroskopet.

#### **2.6.6 Undersøkelse av colwellicins omtrentlige molekylvekt ved hjelp av filtrering**

Det ble brukt et filter med en «nominal molecular weight limit» (NMWL) på 3000 Da for å få et hint om molekylvekten til colwellicin. Filteret som ble benyttet har en porestørrelse som vil slippe igjennom globulære molekyler med en molekylvekt som er mindre enn ca. 3000 Da. Forsøket ble utført ved å blande 20 µl eluat fra amberliterensing med 80 µl dH<sub>2</sub>O. Eluatet hadde blitt vakuomtørket og løst opp i dH<sub>2</sub>O. Prøven ble deretter satt på filteret, som var

plassert i et oppsamlingsrør, og sentrifugert ved 10 000 x g i 5 minutter. Dette resulterte i to fraksjoner: en «flow through» fraksjon og en fraksjon som ikke hadde passert igjennom filteret. Begge fraksjonene ble tatt vare på og testet med et *S. pneumoniae* overlay assay. Hvis «flow through» fraksjonen hadde aktivitet, ville det bety at colwellicin var mindre enn ca. 3000 Da. Hvis fraksjonen som filteret hadde holdt igjen hadde aktivitet, kunne dette bety at colwellicin var større enn ca. 3000 Da.

### 2.6.7 Dialyse

Dialyse en metode som brukes til å separere molekyler i en løsning ved hjelp av en semipermeabel membran som kan produseres med porer i ulike størrelser (Reed & Reed, 2007). Det ble gjennomført dialyse av colwellicin for å undersøke om det antimikrobielle stoffet danner miceller.

Dialyseinnretningen, float-A-lyzer G2, ble brukt. Den besto av en flytbar kassett med vegger laget av en semipermeabel membran. Membranen hadde en «molecular weight cut-off» (MWCO) på 100 kDa. Før prøven ble injisert, ble membranen hydrert. Dette ble gjort ved å tilsette 1 ml 10% etanol til kassetten, og deretter la kassetten flyte i en løsning med 10% etanol i 10 minutter. Før bruk ble dialyseinnretningen tatt ut av etanolløsningen, og etanolen i membranen ble fjernet. Deretter ble kassetten skylt med dH<sub>2</sub>O ved at dH<sub>2</sub>O ble injisert i kassetten, og ved at dialyseenheten ble plassert i dH<sub>2</sub>O i 20 minutter. Enda en runde med skylling ble så gjennomført ved å fylle kassetten på nytt med dH<sub>2</sub>O og å deretter helle ut vannet. Membranen ble så tilpasset dialysebufferen gjennom skylling med 1 ml TBS buffer. TBS bufferen ble helt ut og 500 µl colwellicinløsning fra det store butanolekstraksjonspartiet ble tilsatt (se avsnitt 2.7.1). Deretter ble membranens satt i et begerglass med 500 ml TBS, og dialyseinnretningen ble satt på forsiktig røring ved hjelp av en magnet og en magnetrører. Prøven ble så dialysert i romtemperatur i 24 timer. Etter 24 timer ble 50 µl tatt ut av prøven inni dialyseskassetten, mens de resterende 450 µl forble i kassetten. Kassetten ble så flyttet over i en ny buffer bestående av 70% metanol, for å undersøke om denne konsentrasjonen av metanol kunne løse opp eventuelle miceller av colwellicin. Prøven ble satt på forsiktig røring og dialysert i 24 timer. Deretter ble prøven tatt ut av membranens, vakuamtørket og løst opp i et likt volum med dH<sub>2</sub>O. Dette ble gjort for å fjerne metanolen slik at det ikke påvirket resultatet. Deretter ble 3 µl av prøven fra dialyse i TBS buffer og 3 µl av prøven fra dialyse i

70% metanol testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay for å sjekke om noen av prøvene hadde antimikrobiell aktivitet.

## **2.7 Karakterisering av colwellicins virkningsmetode**

### **2.7.1 Relativ minimum inhibitory concentration**

Det lagd et stort parti med colwellicin via butanolekstraksjon etter protokollen i 2.5.2. Dette partiet ble brukt til å finne en relativ minimum inhibitory concentration (RMIC). Med RMIC menes hvor mye dette partiet, som var anrikt med hensyn på colwellicin via to rensetrinn, kan fortynnes før det ikke lenger er i stand til å hemme veksten av *S. pneumoniae*.

Bestemmelsen av en RMIC var nødvendig for å kunne utføre forsøkene som er beskrevet under de ulike punktene i avsnitt 2.7.

RMIC ble bestemt for *S. pneumoniae* RH425 og RH14. Startkulturer av stammene ble tint, sentrifugert og fortynnet til  $OD_{550} = 0,05$ , og 300  $\mu\text{l}$  av hver stammekultur ble tilsatt brønner i en 96-brønns mikrotiterplate. For hver stamme ble RMIC bestemt med 3 paralleller, noe som vil si at 3 x 12 brønner ble tilsatt cellekultur. Deretter ble 5  $\mu\text{l}$  av en 2-folds fortynningsrekke med colwellicin tilsatt 11 av brønnene og absorbansen ble målt ved 550 nm i en Synergy H1 plateleser, noe som gjorde det mulig å sammenligne vekstkurver. I den første brønnen ble det tilsatt 5  $\mu\text{l}$  av det anrikede partiet. Med en 2-folds fortynning vil det da være 1/1024 igjen av denne prøven i den siste brønnen, dvs. 0,005  $\mu\text{l}$ . Det ble også tatt med en kontroll hvor 5  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O ble tilsatt i brønn 12 i stedet for prøven som inneholdt colwellicin. Plateleseren var forvarmet til optimal veksttemperatur for *S. pneumoniae* (37°C), og før hver avlesning ble mikrotiterplaten automatisk ristet for å homogenisere prøvene.

### **2.7.2 Seleksjon av mutanter med økt resistens mot colwellicin**

For å finne ut av virkningsmekanismen til colwellicin ble det forsøkt å lage colwellicin-resistente mutanter av *S. pneumoniae* RH14. Dette ble gjort ved å lage en 2-folds fortynningsrekke av colwellicin, og deretter tilsette 5  $\mu\text{l}$  av hver fortynning til 300  $\mu\text{l}$  RH14 ved  $OD_{550} \approx 0,05$  i en 96-brønns mikrotiterplate. Fortynningsrekken besto av en gradient fra 5  $\mu\text{l}$  til 0,005  $\mu\text{l}$  colwellicin fra det store butanolekstraksjonspartiet. Deretter ble RH14 dyrket med ulike konsentrasjoner av colwellicin til stede, mens absorbansen ble lest av ved 550 nm i en Synergy H1 plateleser, noe som gjorde det mulig å sammenligne vekstkurver. Dette ble



gjentatt 10 ganger, og etter hver runde ble den fortyningen som gav delvis, men hemmet vekst av *S. pneumoniae* tatt vare på og frosset ved - 20°C. Neste runde ble startet med å tine prøven fra forrige runde, og deretter dyrke den opp med en 2- folds fortynningsrekke av colwellicin som beskrevet ovenfor. Etter 10 runder ble kulturen som gav delvis vekst strøket ut på en TH plate, og dyrket anaerobt over natt ved 37 °C. Deretter ble enkeltkolonier plukket og dyrket, slik at det var mulig å sammenligne RMIC for RH14 med RMIC til isolatene som hadde blitt selektert for økt resistens mot colwellicin. Dette ble gjort ved å sammenligne vekstkurver som beskrevet i protokollen i 2.7.1. Deretter ble gDNA isolert og sendt til sekvensering som beskrevet under punktene 2.3.1 og 2.3.4.

Stammene som var selektert for å tåle høyere konsentrasjoner av colwellicin enn RH14 ble også sammenlignet med RH14 med hensyn på deres følsomhet ovenfor daptomycin og viscosin. Både viscosin og daptomycin ble valgt fordi det angriper cellemembranen, og har surfaktantlignende egenskaper (Geudens et al., 2017). Forsøket ble gjort for å undersøke om eventuelle mutasjoner hos de selekterte isolatene gav økt resistens mot antibiotika med denne virkningsmekanismen. Isolatene og en RH14 kontroll, som ikke hadde blitt dyrket med colwellicin, ble fortynt til  $OD_{550} = 0,05$ . Deretter ble 300 µl cellekultur tilsatt en 96-brønns mikrotiterplate. Dette ble gjort i to paralleller, slik at effekten av viscosin og daptomycin kunne bli avlest ved 550 nm i en Synergy H1 plateleser fra den samme mikrotiterplaten. Deretter ble en 2- fold fortynningsrekke med viscosin tilsatt de mulige mutantene og RH14 kontrollen. Det samme ble gjort med en 2- folds fortynningsrekke med daptomycin. Viscosins fortynningsrekke var basert på en kjent MIC verdi på 7,5 µg/ml (estimert av Dr. Daniel Straume i gruppen for molekylær mikrobiologi), mens daptomycins fortynningsrekke var basert på en kjent MIC verdi på 0,5 µg/ml (estimert av Dr. Gro Stamsås i gruppen for molekylær mikrobiologi).

### **2.7.3 Hemolyse**

Målet med denne oppgaven var å se nærmere på marine bakterier som en kilde til nye antibiotika, og derfor ble det undersøkt om colwellicin er toksisk for eukaryote celler. En vanlig test for dette er å undersøke om colwellicin lyserer røde blodceller (erytrocytter). Dette ble gjort ved å tilsette 2 ml saueblod i 18 ml PBS. Løsningen ble blandet godt og deretter ble blodcellene vasket 3 ganger med PBS. Blodcellene ble høstet ved 2000 x g i 2 min mellom

hver vask. Etter hver sentrifugeringsrunde ble supernatanten kastet og cellepelleten ble resuspendert i 20 ml PBS. Etter siste vask og resuspensjon i 20 ml PBS, ble volumer på 500  $\mu$ l blod i PBS overført til 12 eppendorfrør. Det ble lagd en 2-folds fortynningsrekke med colwellicin fra det store butanolekstraksjonspartiet, og 5  $\mu$ l av hver fortykning ble tilsatt i eppendorfrørene. Fortyningsserien besto av en gradient fra uforynnet 5  $\mu$ l til fortynnet 0,005  $\mu$ l colwellicin, samt en kontroll med 5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Prøvene ble satt til inkubering ved 37°C i 30 minutter. Deretter ble cellene sentrifugert ved 2000 x g i 2 min, og 300  $\mu$ l av supernatanten ble overført til en 96-brønns mikrotiterplate. Absorbansen ble lest av ved 490 nm i en Synergy H1 plateleser. Resultatet av hemolyseforsøket ble sammenlignet med RMIC resultatene for *S. pneumoniae*. Det ble brukt samme fortynningsrekke med colwellicin i begge forsøkene, men RMIC-forsøket ble gjort med 300  $\mu$ l cellekultur, mens hemolyseforsøket ble gjort med 500  $\mu$ l cellekultur. Derfor var det nødvendig å regne ut hva 5  $\mu$ l colwellicin i 500  $\mu$ l cellekultur tilsvarer i 300  $\mu$ l cellekultur ved å ta  $(5 \times 300) / 500$ . Deretter var det mulig å sammenligne RMIC med hemolyseaktiviteten.

#### 2.7.4 Sytox green

Sytox green er et fluorescerende stoff som binder DNA med høy affinitet, og som ved DNA-binding avgir grønn fluorescens når det eksiteres med lys på rundt 485 nm. Stoffet går lett inn i celler med ødelagt cellemembran, men kan ikke krysse intakte membraner, noe som gjør det til en nyttig indikator (Thakur, Cattoni, & Nöllmann, 2015). Sytox ble brukt til å undersøke om colwellicin ødelegger cellemembranen til *S. pneumoniae*.

Det ble brukt to ulike stammer av *S. pneumoniae*, RH425 og RH14. For hver stamme ble det målt absorbans ved 550 nm og fluorescens ved 528 nm. Forsøket ble utført med 3 paralleller. Først ble en startkultur av hver stamme tint, sentrifugert og fortynnet i C-medium til  $OD_{550} \approx 0,05$ , og 280  $\mu$ l av hver cellekultur ble tilsatt i 3x12 brønner i en 96 brønns mikrotiterplate. Deretter ble sytoxløsningen klargjort ved å tilsette 9  $\mu$ l sytox fra SYTOX® Green stockløsning til 1491  $\mu$ l C-medium, og 20  $\mu$ l av den fortynnede sytoxløsningen ble tilsatt til hver av brønnene. Løsningen var lyssensitiv og måtte derfor oppbevares i mørket. Mikrotiterplaten ble plassert i plateleseren, og ved  $OD_{550} = 0,2$  ble 5  $\mu$ l av en 2-folds fortyningsserie av colwellicin med en gradient på 5  $\mu$ l til 0,005  $\mu$ l tilsatt. Det ble også tatt med en kontroll hvor colwellicin var byttet ut med dH<sub>2</sub>O. I tillegg var det med en kontroll

med RH425 og en kontroll med RH14 som besto av 20  $\mu$ l fortynnet sytox og 280  $\mu$ l cellekultur. Etter at  $OD_{550} = 0,2$  for disse cellekulturene, ble 3  $\mu$ l av en løsning med 10% triton X-100 tilsatt. Triton X-100 er en detergent som blir brukt til å lysere celler, og det er kjent at denne detergenten ødelegger cytoplasmamembranen til *S. pneumoniae*.

### 2.7.5 Levende/død farging

LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit består av to fluorescerende stoffer som kan brukes til å bestemme om cellene i en prøve er levende eller døde. De to stoffene er SYTO 9, som fluorescerer grønt, og propidium iodide (IP), som fluorescerer rødt. Begge fargestoffene fluorescerer kun ved binding til nukleinsyrer, men bare SYTO 9 kan passere igjennom intakte cellemembraner. IP, derimot, kan bare gå inn i celler med ødelagt cellemembran. IP har høyere affinitet for nukleinsyrer og vil derfor fortrenge SYTO 9. Resultatet blir at celler med intakt cellemembran fluorescerer grønt, mens celler med ødelagt cellemembran fluorescerer rødt. Intakte cellemembraner er nødvendig for å opprette holde liv, og derfor vil grønne celler telles som levende, mens røde celler med ødelagt membran vil telles som døde (Scientific, 2005). I denne oppgaven ble levende/død farging brukt til å undersøke effekten colwellicin har på cellemembranen til *S. pneumoniae* RH14.

En RH14 startkultur ble fortynnet til  $OD_{550} = 0,05$  og fordelt på 5 rør med 2,5 ml i hvert rør. Kulturene ble deretter dyrket opp til  $OD_{550} = 0,2$  for å oppnå god vekst. Imens ble en 2-foldfortynningsrekke av colwellicin laget. Fortynningsrekken ble laget på samme vis som i protokollen for bestemmelse av RMIC i 2.7.1, noe som gjorde det mulig å velge den fortynningen som gav delvis hemming, dvs. 1/8 fortynning. Ved  $OD_{550} = 0,2$  ble en 1/8 fortynningen av colwellicin tilsatt, samt ufortynnet colwellicin. I tillegg ble kulturer tilsatt en 1/4 fortynning og en 1/16 fortynning av colwellicin. Den femte kulturen fungerte som en kontrollkultur, og ble ikke tilsatt colwellicin. Etter tilsetning av colwellicin, ble cellekulturene inkubert i 10 minutter ved 37°C. Så ble cellene sentrifugert ved 4000 x g i 5 minutter og deretter vasket med 2,5 ml 0,85% NaCl i tre omganger. I løpet av hver vaskerunde ble cellene sentrifugert ved 4000 x g i 5 min, supernatanten ble kastet og cellene ble resuspendert i 0,85% NaCl. Etter vasking ble pelleten på nytt resuspendert i 2,5 ml 0,85% NaCl og deretter ble live/dead miksen tilsatt. Forholdet i miksen var 1:1 mellom SYTO 9 og IP, og til 1 ml cellekultur blir 3  $\mu$ l av denne blandingen tilsatt. Til 2,5 ml kulturer var det derfor nødvendig

med 7,5 µl live/dead miks. Etter tilsetning av miksen ble prøvene inkubert i mørket i 15 minutter. Deretter ble cellene sentrifugert ved 4000 x g i 5 minutter og supernatanten ble kastet for å fjerne fargestoff som ikke hadde bundet til cellene. Pelleten ble resuspendert i 1 ml NaCl og et preparat ble klargjort for mikroskopering etter protokollen i 2.6.5.

### **2.7.6 Massespektrometri**

Massespektrometri er en analytisk metode som kan brukes til bestemmelse av masse og konsentrasjon, til å finne strukturer og til identifikasjon av atomer og molekyler. Metoden er basert på at molekylene i en prøve blir ionisert. Dette skaper et forhold mellom massen og ladningen til molekylene kalt for m/z-verdier, der m er masse og z er ladning. Deretter kan molekylene separeres etter dette forholdet og en detektor registrer når molekylene passerer måleinstrumentet. Forskjellen i m/z-verdier registreres av detektoren, som gir informasjonen i form av et massespektrum. Det finnes flere ioniseringsteknikker for ionisering av prøvene, men i denne oppgaven ble matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) brukt. Dette er en teknikk som ioniserer prøven direkte uten at molekylene blir fragmentert, noe som er nyttig med tanke på bestemmelse av masse. For å oppnå dette blandes prøven med en matriks som absorberer energien fra en laser og denne energien brukes til å ionisere prøven (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

I denne oppgaven ble massespektrometri utført for å finne massen til colwellicin. Dette ble gjort med massespektrometeret UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF og prøven ble applisert i fire ulike fortyninger (50% metanol, 0.1% TFA): 1x (ufortynnet), 2x, 5x, og 10x. To matriser ble brukt: DHB (0.5 M i 50% metanol, 0.1% TFA) og HCCA (15 mg/ml i 50% etanol, 49.9% acetonitril, 0.1% TFA). I tillegg ble det utført en LIFT-analyse (MS/MS) for å undersøke om colwellicinprøven inneholdt ulike addukter av samme molekyl. LIFT-analysen er en form for massespektrometri kalt MS/MS, der utvalgte ioner blir brutt ned til fragmenter og deretter blir fragmentene analysert i et forøk på å avsløre deler av den kjemiske strukturen. Ved bruk av MS/MS kobles to masseanalytatorer sammen (Suckau et al., 2003).

Colwellicinprøven ble applisert ufortynnet, med to ulike matriser: DHB og HCCA.

Massespektrometrianalysene ble utført av Dr. Morten Skaugen ved proteomikkplattformen på KBM, NMBU.

### 3. Resultater

#### 3.1 Dyrkingsbetingelser og hemmingsaktivitet for *Exiguobacterium oxidotolerans*

##### 3.1.1 Optimalisering av dyrkingsbetingelser for produksjon av det antimikrobielle stoffet fra bakteriekolonier

Før oppstarten på denne oppgaven var det allerede kjent at et isolat av *E. oxidotolerans* produserer et stoff med antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae*. Det var ønskelig å finne hvilke dyrkingsbetingelser som gav optimal produksjon av dette antimikrobielle stoffet når *E. oxidotolerans* ble dyrket på agarplater. Derfor ble ulike temperaturer, inkubasjonstider og næringsmedier undersøkt ved å måle størrelsen på hemmingssonene etter et *S. pneumoniae* overlay assay. En oversikt over resultatene er angitt i Tabell 3.1. Næringsmediene som ble undersøkt var BHI, TH, LB, MH og Middlebrook medium. Etter inkubasjon i to døgn ved romtemperatur var det hemmingssone på TH, Middlebrook og MH plater, men ikke på LB og BHI. Kolonien på Middlebrook platen var liten og vokste dårlig, og gav en hemmingssone på 1 mm. Hemmingssonene på TH platen og MH platen var henholdsvis på 2 mm og 3 mm. Etter videre undersøkelser med TH plater inkubert ved forskjellige temperaturer, ble resultatet at *E. oxidotolerans* gav størst hemmingssone (4 mm) på TH-plater etter fire døgn i 20°C.

Tabell 3.1. Hemmingssone av *S. pneumoniae* rundt kolonier av *E. oxidotolerans* dyrket ved ulike inkubasjonstider, temperaturer og næringsmedier.

Inkubasjonstid	Temperatur	Næringsmedium	Hemmingssone <sup>a</sup>
2 døgn	10°C	TH	2 mm
		BHI	0 mm
	20°C	TH	3 mm
		BHI	0 mm
	30°C	TH	0,5 mm
		BHI	0 mm
	Romtemperatur	TH	2 mm
		BHI	0 mm
		Middlebrook	1 mm

		MH	3 mm
		LB	0 mm
4 døgn	10°C	TH	3 mm
		BHI	0 mm
	20°C	TH	4 mm
		BHI	0 mm
7 døgn	10°C	TH	3 mm
		BHI	0 mm
	20°C	TH	2 mm
		BHI	0 mm
30°C	TH	1 mm	
	BHI	0 mm	

<sup>a</sup> Hemmingssonene ble målt som en rett linje i mm fra kanten av kolonien til kanten av hemmingssonen.

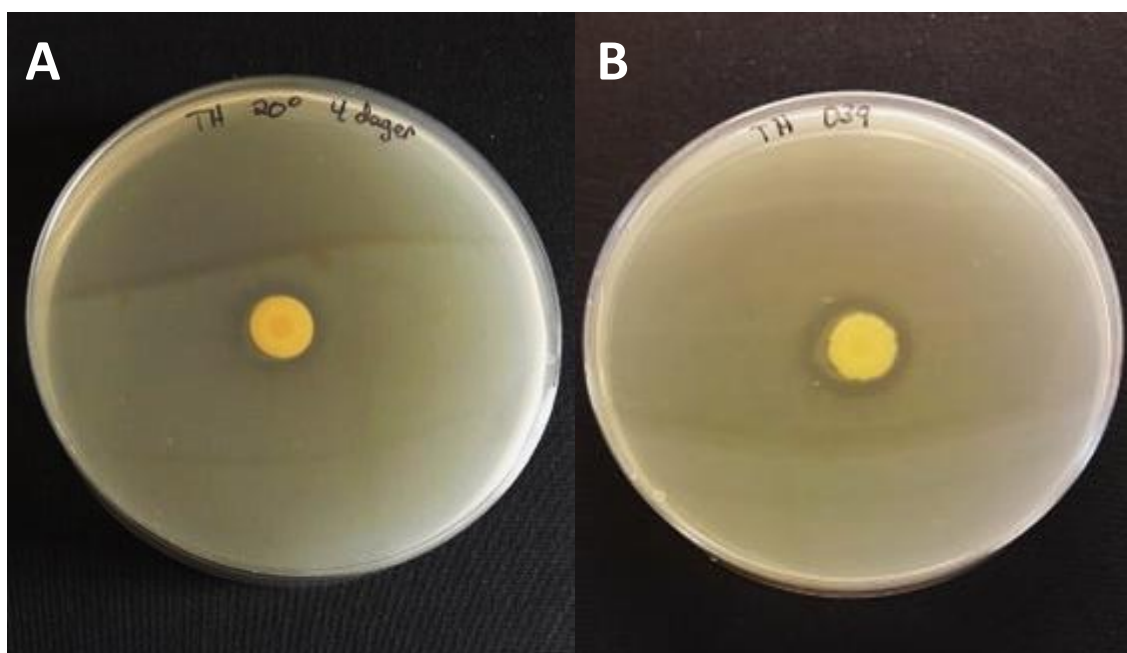
### 3.1.2 Produksjon av det antimikrobielle stoffet i flytende medium

Produksjon av det antimikrobielle stoffet i flytende kultur var viktig for videre arbeid med rensing og karakterisering. Fordi dyrking av *E. oxidotolerans* på TH-plater gav de største hemmingssonene ble *E. oxidotolerans* dyrket opp i en flytende kultur med TH medium. Deretter ble det benyttet flere ulike metoder for å undersøke om bakterien produserte det antimikrobielle stoffet i flytende kultur. Først ble en flytende kultur med *E. oxidotolerans* sentrifugert og det ble undersøkt om det var aktivitet i supernatanten. Dette ble gjort med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay, der det ble applisert 3 µl av supernatanten oppå softagaren. Supernatanten hadde ikke hemmingsaktivitet mot *S. pneumoniae* RH425. Deretter ble det undersøkt om det var aktivitet i 24 ganger oppkonsentrert supernatant (480 µl supernatant som hadde blitt vakuumentørket og løst opp i 20 µl dH<sub>2</sub>O), men konsentrert supernatant inhiberte heller ikke *S. pneumoniae* RH425. I tillegg ble det undersøkt om det var aktivitet i prøvene etter butanolekstraksjon, etter dyrking av *E. oxidotolerans* i en flytende kultur med glassull for å øke dannelsen av biofilm, med ammoniumsulfatutfelling og med bruk av Amberlite XAD1180N (se metoder). Ingen av metodene gav prøver som førte til

hemming av *S. pneumoniae*. Det ser derfor ut som at *E. oxidotolerans* ikke produserer det antimikrobielle stoffet i flytende kultur. Hvis den gjør det, er produksjonen i hvert fall veldig liten.

### 3.1.3 Hemming av ulike indikatorbakterier

Av alle indikatorbakteriene som ble testet hadde det antimikrobielle stoffet, som ble produsert av *E. oxidotolerans*, bare aktivitet mot *S. pneumoniae*. En fullstendig oversikt over indikatorbakteriene fra slekten *Streptococcus* og indikatorbakteriene som ikke tilhører *Streptococcus* er angitt i materialer under avsnitt A.1. To *S. pneumoniae* stammer, RH425 og D39, ble testet for sensitivitet mot det antimikrobielle stoffet med et overlay assay og resultatet viste at stoffet førte til hemming av begge stammene (Figur 3.1). Stammene ble valgt fordi RH425 ikke har kapsel, mens D39 er patogen og har kapsel. Hemmingssonene ble målt i en rett linje fra kanten av kolonien til kanten av hemmingssonen, og var 4 mm for RH425 og 3 mm for D39.

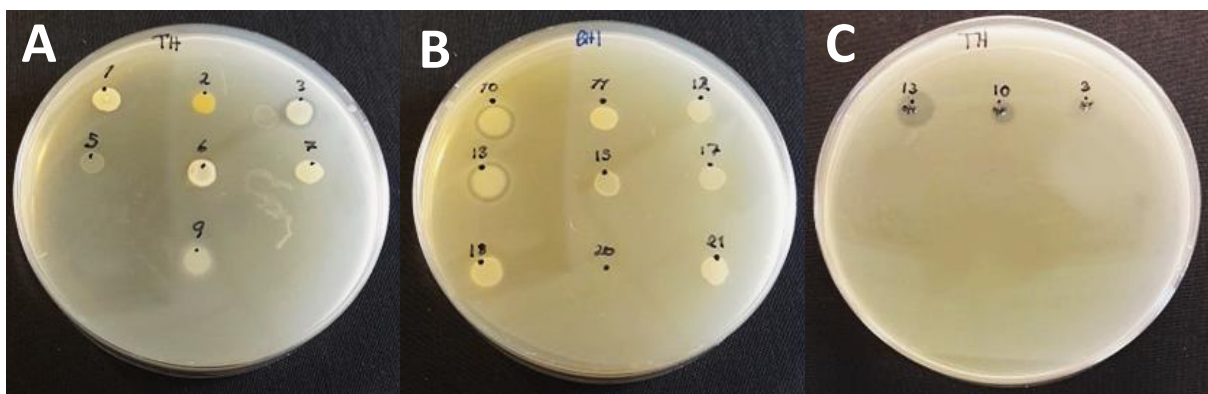


Figur 3.1. Bilder av hemmingssonene rundt kolonier av *E. oxidotolerans* etter overlay assay med *S. pneumoniae* RH425 (A) og D39 (B).

## 3.2 Screening for bakterier som hemmer vekst av *S. pneumoniae*

### 3.2.1 Hemming av *S. pneumoniae*

Siden det ikke lyktes med å få *E. oxidotolerans* til å produsere det antimikrobielle stoffet i flytende kultur var det heller ikke mulig å rense og karakterisere denne forbindelsen. Høsten 2019 ble det derfor hentet inn nye prøver fra strandsonen i Hvitsten ved Oslofjorden. Etter å ha fått ulike bakterieisolater i renkultur ble total 21 av disse dyrket på TH plate eller BHI plater, og et overlay assay ble utført for å undersøke om koloniene produserte stoffer med antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae* RH425. Det var ikke store hemmingssoner rundt noen av koloniene, men koloniene kalt 3, 10 og 13 hadde hemmingssoner på henholdsvis 1,5 mm, 1 mm og 1 mm. Hemmingssonene ble målt i en rett linje fra kanten av kolonien til kanten på hemmingssonen på grunn av ulik kolonistørrelse. Deretter ble flytende kulturer av 3, 10 og 13 sentrifugert, slik at supernatanten kunne bli undersøkt for antimikrobiell aktivitet. Dette ble gjort ved oppkonsentrering av 480 µl supernatant med vakuumbørking og prøvene ble løst opp i 20 µl dH<sub>2</sub>O, noe som førte til at supernatantene ble oppkonsentrert 24 ganger. Deretter ble det gjennomført et overlay assay for å undersøke om *S. pneumoniae* RH425 var sensitiv mot oppkonsentrert supernatant. Tre µl av oppkonsentrert supernatant gav hemmingssoner på henholdsvis 5 mm, 5 mm og 10 mm i diameter for 3, 10 og 13. Bakterie nummer 13 hadde altså størst hemmingssone, og denne ble derfor valgt ut for videre arbeid i denne oppgaven. Figur 3.2 viser hemmingssonene koloniene gav og hemmingssonene oppkonsentrering av supernatant gav for 3, 10 og 13.

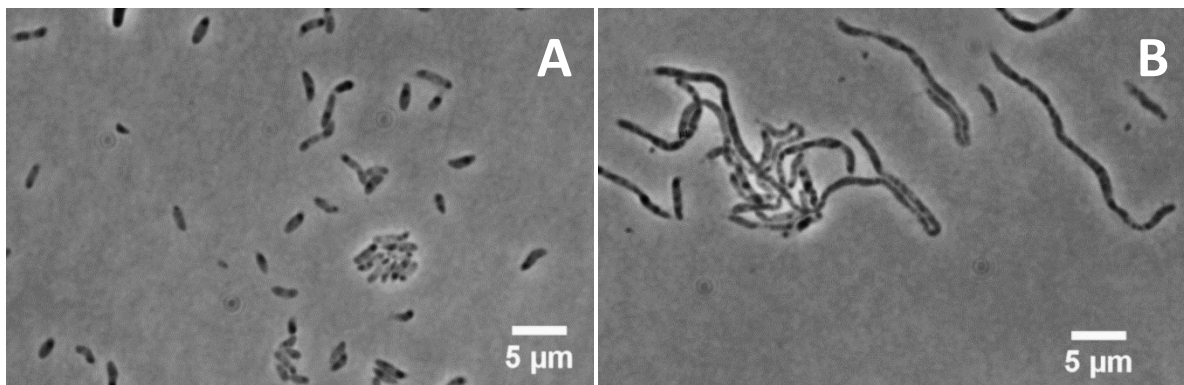


Figur 3.2. Hemmingssonene rundt koloni 3 (A), 10 og 13 (B), samt hemmingssonene etter oppkonsentrering av supernatant (C) etter et overlay assay med *S. pneumoniae* RH425.



### 3.2.2 Identifisering av isolat 13

Det ble gjennomført 16S rRNA sekvensering av isolat nummer 13, og i tillegg 16S rRNA resekvensering av *E. oxidotolerans*. Sekvensen fra isolat 13 ble brukt i et BLAST søk mot NCBI databasen. Sekvensen i databasen som hadde høyest likhet til søkesekvensen var 16S rRNA sekvensen til *Shewanella colwelliana*. I tillegg ble identiteten til *E. oxidotolerans* bekreftet. Resultatet av BLAST søkene finnes i vedlegg B.1. Det ble tatt bilder av *S. colwelliana* med fasekontrastmikroskopi (Figur 3.3). Bakterien viser de samme morfologiske variasjonene som tidligere er beskrevet av Sledjeski og Weiner, da både korte, stavformede celler og avlange helikser ble observert (Sledjeski & Weiner, 1993).



Figur 3.3. Bilder av en tre døgn gammel flytende kultur av *S. colwelliana* tatt med fasekontrastmikroskopi og 100X objektiv. Noen av cellene er korte og stavformede (A), men andre er avlange helikser (B).

## 3.3 Hemmingsaktiviteten til colwellicin

### 3.3.1 Inhibering av streptokokker

Det ukjente antimikrobielle stoffet som blir produsert av isolat 13 (*S. colwelliana*) ble kalt colwellicin. Til sammen 15 arter som tilhører slekten *Streptococcus* ble undersøkt for sensitivitet mot colwellicin med overlay assay. Dette ble først utført ved å støpe inn indikatorstreptokokken i softagar over en *S. colwelliana* koloni, noe som resulterte i små hemmingssoner for noen av streptokokkene. Den største hemmingssonen ble målt for *Streptococcus mitis* og var 2 mm fra kanten av *S. colwelliana* kolonien til kanten av hemmingssonen. I tillegg var det noen streptokokker som virket resistente mot colwellicin (se Tabell 3.2). Dette resultatet ble dobbeltsjekket med et nytt overlay assay, men denne gangen ble 3 µl anrikt colwellicin etter bruk av Amberlite XAD1180N tilsatt oppå mulig resistente

streptokokker innstøpt i softagar. Prøven med anrikt colwellicin hadde blitt vakuomtørket etter eluering med 100% metanol og løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O. Resultatet viste at colwellicin hadde en antibakteriell effekt mot alle de tidligere antatt resistente streptokokkartene (se Tabell 3.2). Totalt sett inhiberte colwellicin alle de 15 streptokokkartene som ble testet. Den største effekten var mot kontrollstammen *S. pneumoniae* RH425, hvor hemmingssonen hadde en diameter på 45 mm. Colwellicin hadde minst effekt mot *Streptococcus mutans*, med en hemmingssone på 10 mm etter anrikning.

Tabell 3.2. En oversikt over effekten av colwellicin testet mot 15 streptokokkarter.

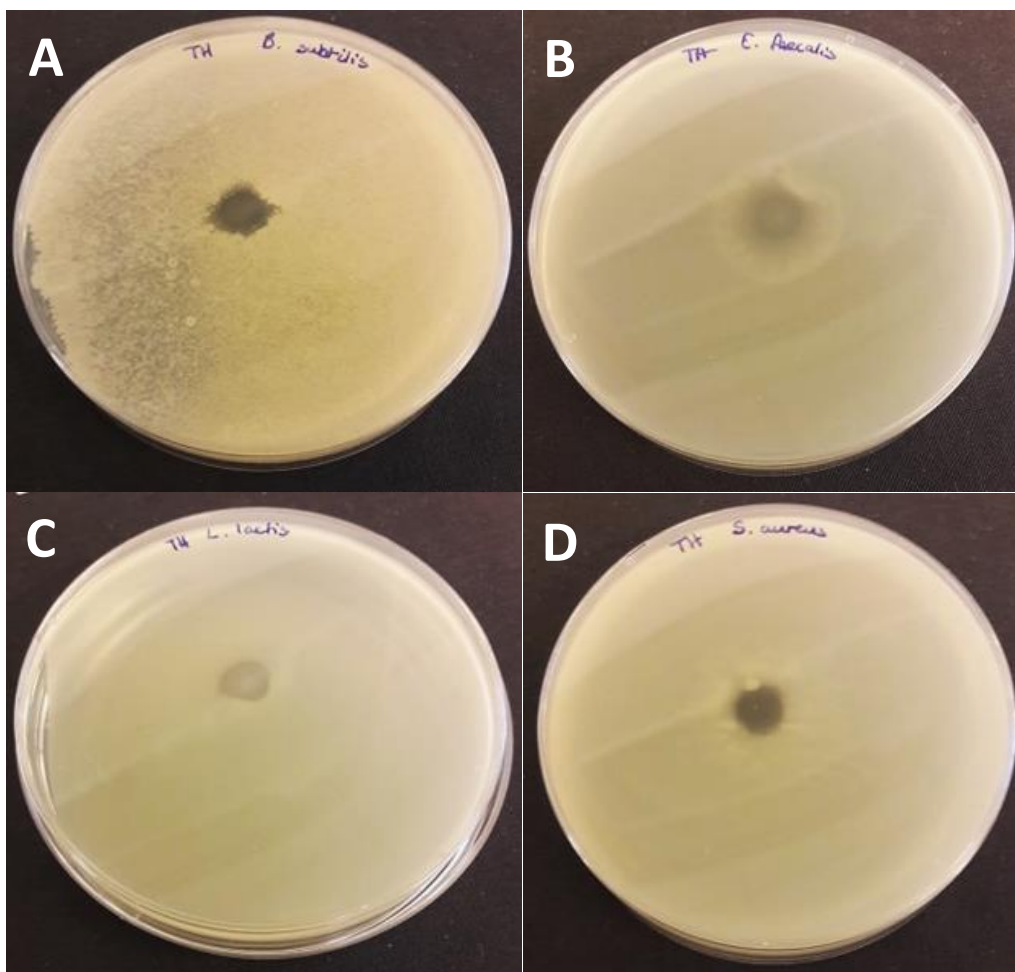
Art	Stamme	Hemmingssone (over koloni) <sup>a</sup>	Hemmingssone (anrikt colwellicin) <sup>b</sup>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	NCTC 8181	Resistent	20 mm
<i>Streptococcus bovis</i>	NCTC 8177	Resistent	12 mm
<i>Streptococcus criceti</i>	ATCC 19642	1 mm	-
<i>Streptococcus cristatus</i>	NTCT 12479 (SCr79)	Resistent	25 mm
<i>Streptococcus gordonii</i>	SK6	1 mm	-
<i>Streptococcus infantis</i>	SK140	0,5 mm	-
<i>Streptococcus mitis</i>	SK142	2 mm	-
<i>Streptococcus mutans</i>	NCTC 10449 (SM49)	Resistent	10 mm
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	Resistent	18 mm
<i>Streptococcus parasaguinis</i>	ATCC 15912	Resistent	13 mm
<i>Streptococcus perori</i>	SK958	1 mm	-
<i>Streptococcus phocea</i>	ATCC 29128	1 mm	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RH14	-	37 mm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RH425	1 mm	45 mm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	D39	1 mm	-
<i>Streptococcus sanguinis</i>	SK90	0,5 mm	-
<i>Streptococcus vestibularis</i>	NCTC 12166	Resistent	13 mm

<sup>a</sup> Overlay assay hvor softagar med indikatorbakterien ble lagt over *S. colwelliana* kolonier og hemmingssonene ble målt fra kanten av kolonien til kanten av hemmingssonen.

<sup>b</sup> Oppkonsentrert colwellicin ble tilsatt oppå den innstøpte indikatorbakterien og aktiviteten ble målt som diameteren av hemmingssonen.

### 3.3.2 Inhibering av andre mikroorganismer

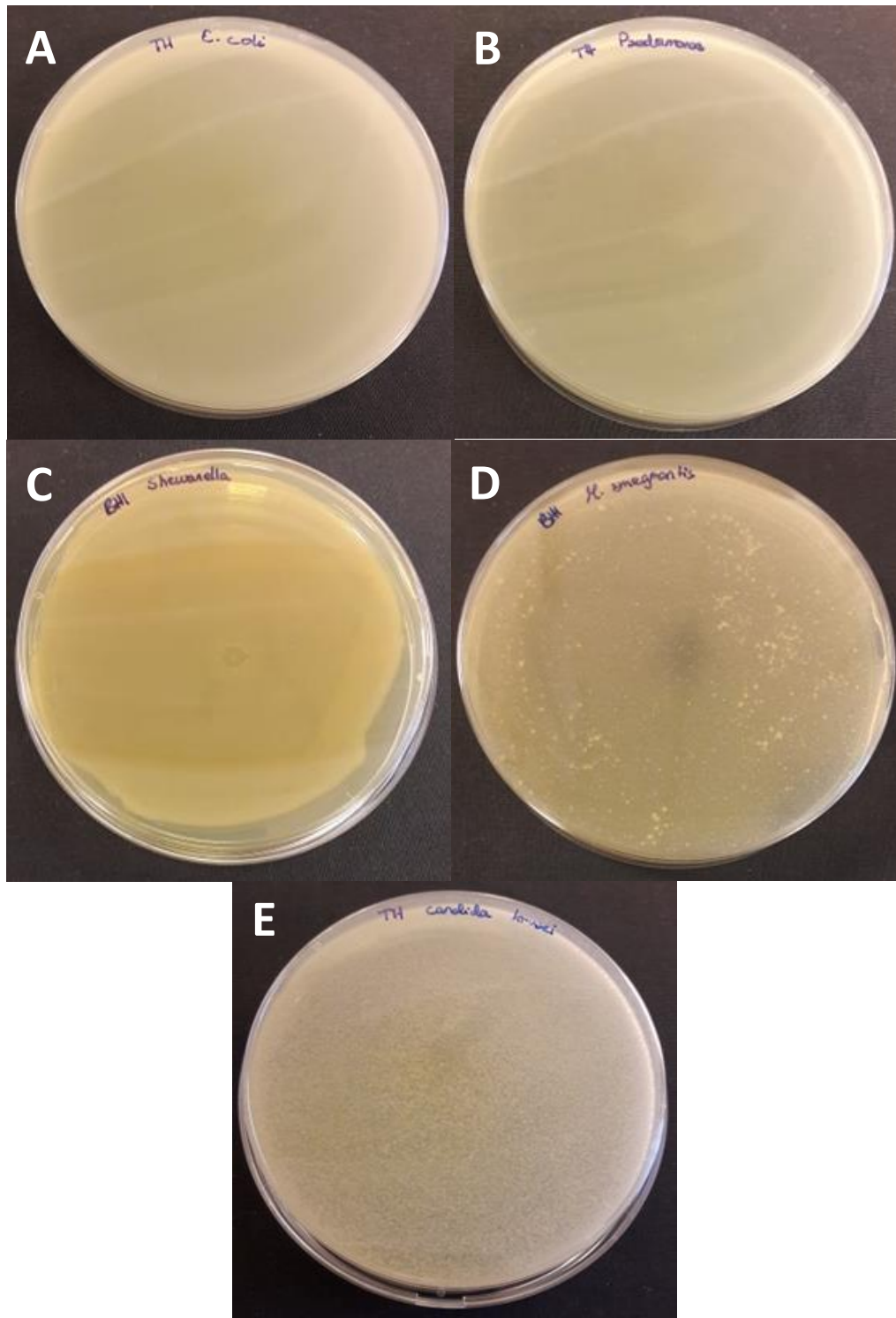
Effekten av colwellicin ble også testet mot andre mikroorganismer gjennom å utføre et overlay assay, hvor 3 µl anrikt colwellicin etter rensing med Amberlite XAD1180N ble tilsatt oppå den innstøpte mikroorganismen. Colwellicin hadde blitt anrikt gjennom eluering med 100% metanol fra amberlitematriksen og deretter hadde eluatet blitt vakuumtørket og løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O. Syv av mikroorganismene var bakterier, mens en av dem var gjæren *Candida krusei*. I tillegg ble det undersøkt om colwellicin inhiberte *S. colwelliana*. Fire av de syv indikatorbakteriene var sensitive mot colwellicin (Figur 3.4).



Figur 3.4. Inhibering av *Bacillus subtilis* (A), *Enterococcus faecalis* (B), *Lactococcus lactis* (C) og *Staphylococcus aureus* (D) med colwellicin. Hemmingsaktiviteten ble testet med overlay assay.

*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* og *Staphylococcus aureus* var alle sensitive mot colwellicin og hadde hemmingssoner på henholdsvis 11 mm, 9 mm, 9 mm og 9

mm. Av indikatorbakteriene som ikke tilhørte slekten *Streptococcus* var altså *B. subtilis* den bakterien som var mest sensitiv mot colwellicin. *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. lactis* og *S. aureus* har til felles at alle er Gram-positive bakterier. De resterende mikroorganismene var resistente. Colwellicin hadde ikke en synlig effekt mot hverken *Escherichia coli* eller *Pseudomonas* isolat 33, som begge er Gram-negative. *Mycobacterium smegmatis*, en Gram-positiv bakterie, hadde derimot en uklar hemmingssone på 3 mm, men effekten var ikke stor nok til at bakterien ble klassifisert som sensitiv. I tillegg var både *C. krusei* og *S. colwelliana* resistente. Resultatet av overlay assay med de resistente mikroorganismene er vist i Figur 3.5.



Figur 3.5. Colwellicin inhiberte ikke vekst av *Escherichia coli* (A), *Pseudomonas* isolat 33 (B), *Shewanella colwelliana* (C), *Mycobacterium smegmatis* (D) eller *Candida krusei* (E).

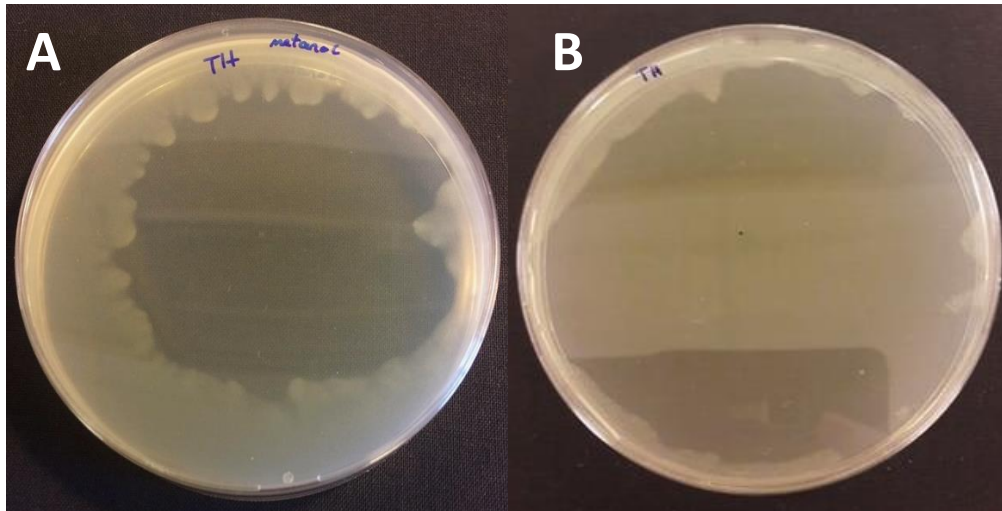
### 3.4 Rensing av colwellicin

#### 3.4.1 Amberlite XAD1180N og butanolekstraksjon

For videre karakterisering av egenskapene til colwellicin og for identifikasjon av massen til stoffet, er det nødvendig å oppkonsentrere og rense colwellicin. For å teste om colwellicin hadde hydrofobe egenskaper som kunne benyttes i en renseprosedyre, ble stoffet først forsøkt anriket med Amberlite XAD1180N som er porøse kuler med hydrofob overflate (se metoder, avsnitt 2.5.1). Under anrikelsesprosessen ble ulike konsentrasjoner av etanol undersøkt for vasking og eluering fra amberlite-matriksen. I tillegg ble det undersøkt om 100% metanol var mer effektivt enn 96% etanol til eluering av colwellicin. Supernatant (0,6 L) fra en fire døgn gammel flytende kultur av *S. colwelliana* ble tilsatt 3 g Amberlite XAD1180N og inkubert med risting i 1 time (se metoder). En ml av vasketrinnene og eluatene (6 ml) ble oppkonsentrert med vakuomtørking og løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O. Deretter ble 3 µl av prøvene testet i et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay. Den lavest etanolkonsentrasjonen som eluerte stoff med antimikrobiell aktivitet var 40% etanol, men dette gav små og svake hemmingssoner (4 mm) av *S. pneumoniae* RH425 i et overlay assay. Ved 60% etanol var hemmingssonen noe større (6 mm), men den var fortsatt ikke like stor som ved 96% etanol eller 100% metanol. Av 96% etanol og 100% metanol gav metanol den største hemmingssonen og ble derfor brukt videre til eluering. En hemmingssone med anriket colwellicin eluert med 100% metanol fra amberlite-matriksen er vist i Figur 3.6. Eluatet gav hemmingssoner på 45 mm. Hemmingssonen var helt klar, men var ujevn i kantene.

Det neste rensetrinnet etter anrikelse av colwellicin med Amberlite XAD1180N var butanolekstraksjon. Dette resulterte i at colwellicin havnet i butanolfasen, mens vannfasen og interfasen ikke inneholdt colwellicin. Figur 3.6 viser også resultatet av et overlay assay der 3 µl med colwellicin fra butanolfasen har blitt tilsatt oppå innstøpt *S. pneumoniae* RH425, noe som gav en hemmingssone på 58 mm. I dette tilfellet hadde butanolekstraksjonen blitt utført med amberliteanriket colwellicin og butanol i et 1:1 forhold (se metodeavsnitt 2.5.2).

Butanolfasen som ble brukt til testing for aktivitet mot *S. pneumoniae* RH425 besto av 200 µl butanolfase som hadde blitt vakuomtørket og løst opp i 50 µl dH<sub>2</sub>O. Siden all colwellicinaktiviteten havnet i butanolfasen, mens forurensende komponenter av hydrofil natur gikk i vann- eller interfasen, var butanolekstraksjon et nyttig rensetrinn på veien til et helt rent produkt.



Figur 3.6. Bilder av hemmingssonene etter et overlay assay med *S. pneumoniae* RH425, der 3  $\mu$ l eluat fra eluering med 100% metanol fra amberlite-matriksen ble tilsatt (A), og 3  $\mu$ l av butanolfasen etter butanolekstraksjon av colwellicin ble tilsatt (B).

### 3.4.2 Rensing av colwellicin med diverse kromatografiske metoder

Etter bruk av Amberlite XAD1180N og butanolekstraksjon hadde colwellicinprøven blitt oppkonsentrert og renere, men prøven var fortsatt ikke ren nok til at det var mulig å finne MIC eller å analysere prøven med massespektrometri for bestemmelse av molekylvekt. Derfor ble flere kromatografiske rensemetoder prøvd ut. Resultatet av rensingen ble undersøkt enten med overlay assay eller i flytende kultur hvor effekten på veksten til *S. pneumoniae* RH425 ble overvåket. En oversikt over metodene som ble prøvd er angitt i Tabell 3.3. Tabellen viser også resultatet av fast-fase ekstraksjon.

Tabell 3.3 En oversikt over kromatografiske metoder som ble brukt i et forsøk på å rense colwellicin, samt resultatet av fast-fase ekstraksjon. Etter at en metode hadde blitt gjennomført ble fraksjonene fra rensemetoden testet for hemmingsaktivitet mot *S. pneumoniae* RH425.

Metode	Kolonne	Løsning/buffer	Inhiberingsaktivitet i elueringsfraksjoner
HPLC	Halo 160 Å ES-C18	Løsning A: 0,05 % TFA i dH <sub>2</sub> O Løsning B: 0,05 % TFA i 100% acetonitril	Nei
	YMC-Triat C8/S-3 $\mu$ m/12nm	Løsning A: 0,1% maursyre i dH <sub>2</sub> O	Nei

		Løsning B: 0,1% maursyre i 100% metanol	
		Løsning A: 0,1% maursyre og 5% metanol i dH <sub>2</sub> O	Nei
		Løsning B: 100% metanol	
		Løsning A: 0,1% maursyre i dH <sub>2</sub> O	Nei
		Løsning B: 0,1% i 100% acetonitril	
Gelfiltrering	Superdex™ 75 10/300	TBS	Ja*
	Superdex™ 30 Increase 10/300 GL	20% etanol i 100% TBS 70% etanol 8M Urea	Ja Ja Nei
Ionebytterkromatografi	Mono S 5/50 GL	Buffer A: 20 mM Tris HCl pH 7,4 Buffer B: 1M NaCl i 20 mM Tris HCl pH 7,4	Nei
Hydrofob interaksjonskromatografi	HiTrap Phenyl HP	Løsning A: dH <sub>2</sub> O Løsning B: 100% metanol	Nei
Revers fase kromatografi	Resource RPC	Løsning A: dH <sub>2</sub> O Løsning B: 100% acetonitril	Nei
Fast-fase ekstraksjon	Oasis®HLB Extraction Cartridge	Metanol/etanol/ isopropanol/acetonitril	Ja
Gradient eluering fra Oasis kolonne	Oasis®HLB Extraction Cartridge koblet til ÄKTAprime plus	Løsning A: dH <sub>2</sub> O Løsning B: 100% metanol	Ja

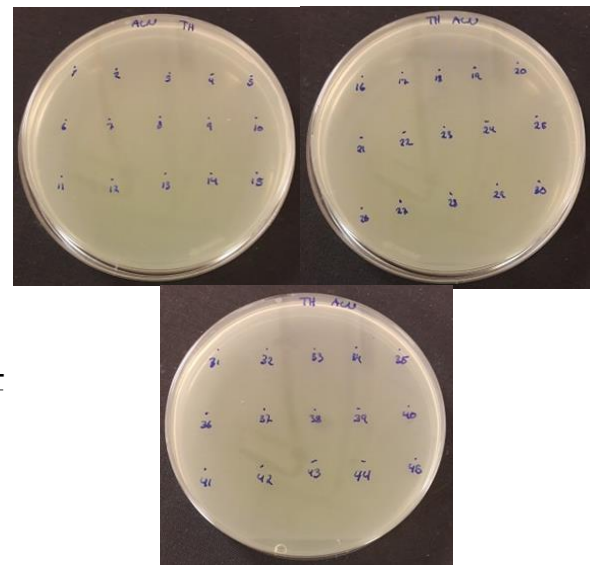
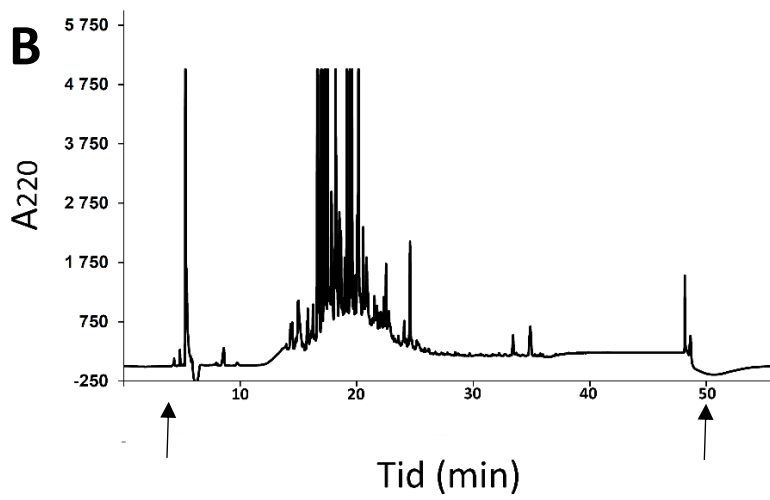
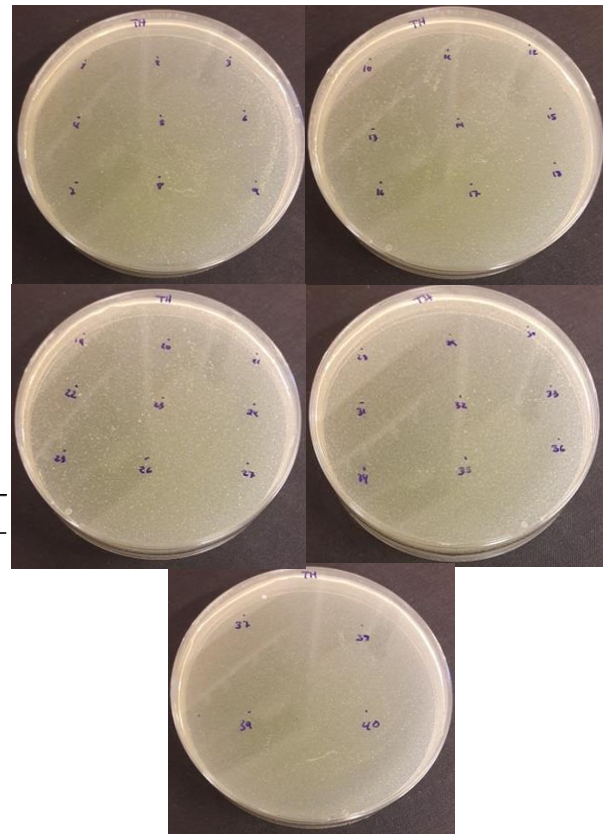
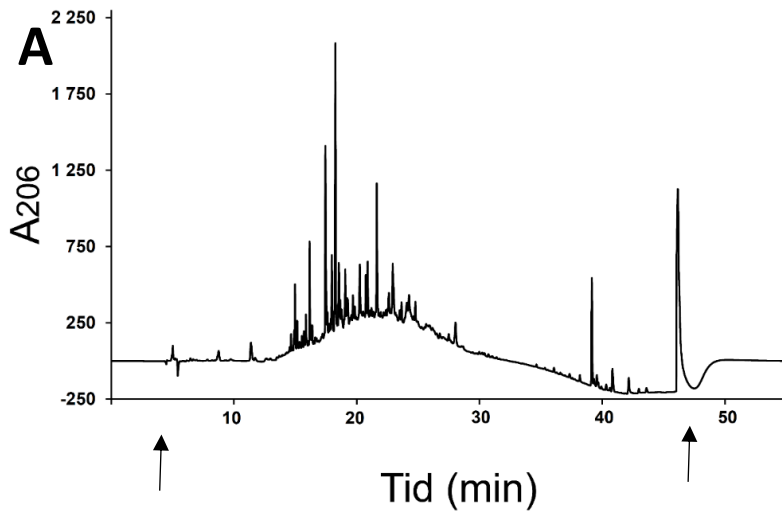
\* Det var bare aktivitet i «flow through». De andre fraksjonene inhiberte ikke *S. pneumoniae* RH425.

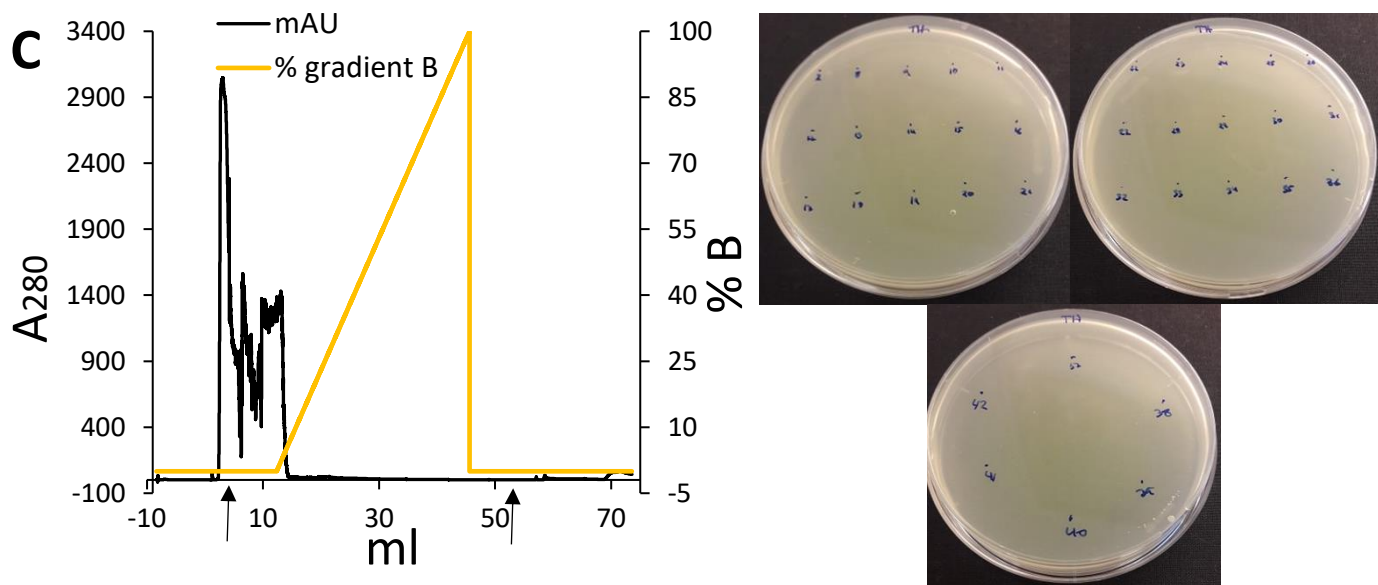
Revers fase HPLC var blant de kromatografiske metodene som ble testet fordi rensing med Amberlite XAD1180N viste at colwellicin bandt til en hydrofob matriks. Først ble HPLC gjennomført med en C18 kolonne, men i tilfellet colwellicin bandt for sterkt til kolonnen og



derfor var vanskelig å eluere, ble rensing også forsøkt med en C8 kolonne. C8 kolonnen er mindre hydrofob enn C18 kolonnen, så hvis colwellicin er et veldig hydrofobt molekyl ville dette gjøre elueringen lettere. I tillegg ble det brukt ulike løsningskombinasjoner for begge kolonnene. Ingen av kolonnene og løsningskombinasjonene gav elueringsfraksjoner etter HPLC som inhiberte *S. pneumoniae* RH425. Det ble i tillegg prøvd å slå sammen alle fraksjonene etter HPLC for å undersøke om colwellicin besto av flere komponenter som eluerte ved ulik konsentrasjon av løsning B, men dette gav heller ikke et positivt resultat. Prøven som besto av de sammenslåtte fraksjonene, hadde blitt vakuomtørket og løst opp i 20 µl dH<sub>2</sub>O. Vi antok at colwellicin bandt for sterkt til kolonnene og ikke ble eluert med metanol eller acetonitril. Derfor ble kolonnene vasket med dimetylsulfoksid (DMSO) og DMSO vaskefraksjonene ble testet for aktivitet. Igjen ble det ikke funnet antimikrobiell aktivitet. DMSO er et organisk løsningsmiddel som løser både polare og upolare forbindelser (Balakin et al., 2004).

Revers fase HPLC var ikke den eneste kromatografiske metoden som ble forsøkt. Ionebytterkromatografi, revers fase kromatografi og hydrofob interaksjonskromatografi er blant metodene som ble prøvd ut, men ingen av dem førte til rensede fraksjoner med hemmingsaktivitet mot *S. pneumoniae* RH425. Heller ikke «flow through» fra ionebytterkromatografi inhiberte indikatorbakterien. Fraksjonene ble testet med overlay assay eller via overvåkning av vekstkurver (se metoder under avsnitt 2.5.5 og 2.5.6). Figur 3.7 viser utvalgte grafer fra forsøk med HPLC og ionebytterkromatografi, samt resultatet av *S. pneumoniae* RH425 overlay assay. Data fra revers fase kromatografi og hydrofob interaksjonskromatografi er ikke vist.

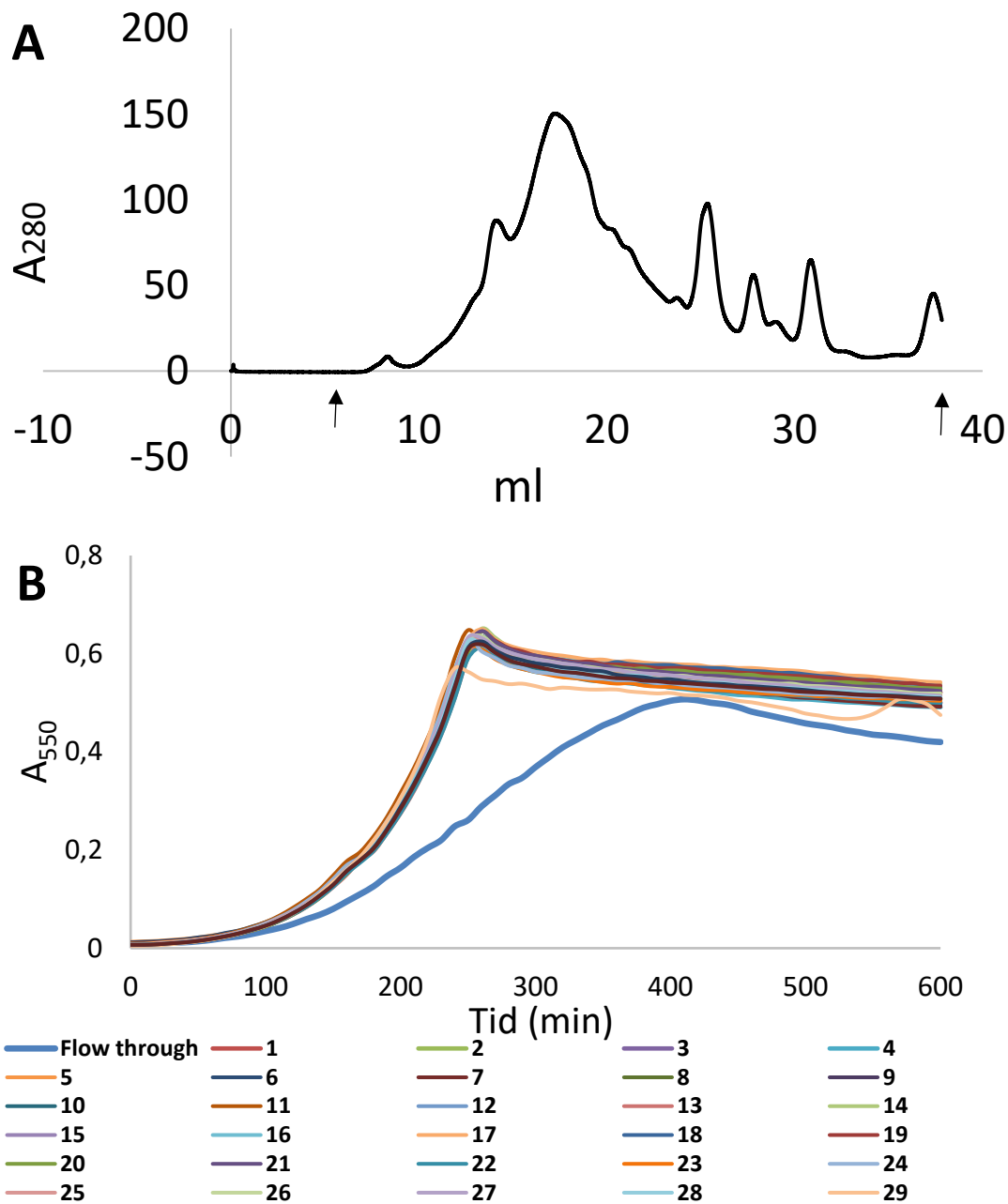




Figur 3.7. Forsøk på rensing av colwellicin med revers fase HPLC og ionebytterkromatografi, samt resultatet av testing av elueringsfraksjoner med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay. A: En C18 kolonne ble brukt sammen med løsning A: 0,05 % TFA i dH<sub>2</sub>O og løsning B: 0,05 % TFA i 100% acetonitril. Colwellicin ble forsøkt detektert ved 206 nm og flow raten var 0,3 ml/min. B: I et annet forsøk ble en C8 kolonne brukt sammen med løsning A: 0,1% maursyre i dH<sub>2</sub>O og løsning B: 0,1% maursyre i 100% metanol. Colwellicin ble forsøkt detektert ved 220 nm, og flow raten var 0,3 ml/min. C: Ionebytterkromatografi ble gjort med Buffer A: 20 mM Tris HCl pH 7,4 og Buffer B: 1M NaCl i 20 mM Tris HCl pH 7,4. Colwellicin ble forsøkt detektert ved 280 nm og flow raten var 1 ml/min. De svarte pilene i A, B og C indikerer området i kromatogrammet som fraksjonene ble samlet fra.

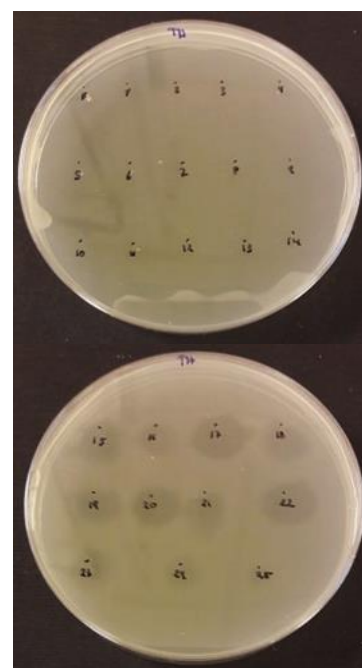
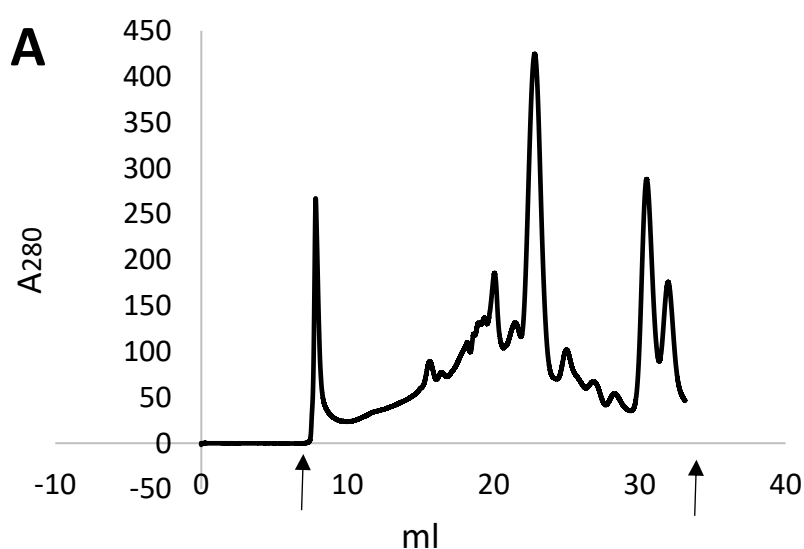
Siden hverken revers fase HPLC eller ionebytterkromatografi var egnede metoder for reversibel binding av colwellicin, ble gelfiltrering forsøkt som et mulig rensetrinn. I tillegg kunne metoden gi informasjon om størrelsen til colwellicin. Det ble gjennomført fire eksperimenter med gelfiltrering, der ulike buffere ble prøvd ut. Det første gelfiltreringsforsøket ble utført med TBS buffer og prøven som ble injisert på gelfiltreringskolonnen besto av 200 µl amberliteanrikt colwellicin (Figur 3.8). Prøven med colwellicin hadde blitt oppkonsentrert 5 ganger (1 ml 100% eluat fra amberliterensingen ble vakuamtørket og løst opp i 200 µl dH<sub>2</sub>O). Fraksjonene som ble samlet opp under det første gelfiltreringseksperimentet ble ikke vakuamtørket og var derfor på 500 µl. I tillegg ble de siste 500 µl av «flow through» tatt vare på. Både 10 µl og 100 µl av fraksjonene og «flow through» fra gelfiltreringseksperimentet med TBS buffer ble testet for antimikrobiell aktivitet. 10 µl av fraksjonene og «flow through» førte ikke til inhibering av *S. pneumoniae* RH425,

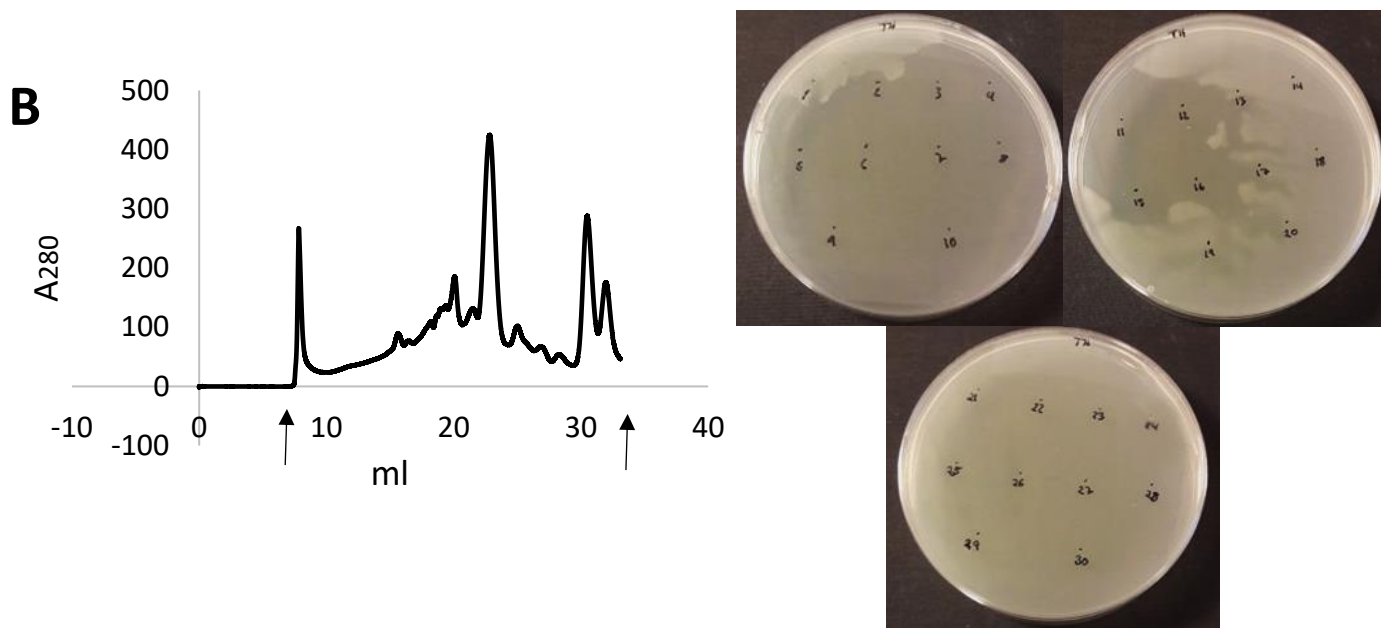
men 100  $\mu$ l av «flow through» inhiberte veksten av indikatorbakterien. 100  $\mu$ l av de andre fraksjonene viste ingen antimikrobiell aktivitet. Testingen ble gjort ved å dyrke *S. pneumoniae* RH425 i en Synergy H1 plateleser. Fraksjonene og «flow through» som ble testet for antimikrobiell aktivitet ble tilsatt ved tid null (Figur 3.8)



Figur 3.8. A: Gelfiltrering med colwellicin. Det ble brukt TBS buffer og en flow rate på 0,5 ml/min. Pilene indikerer området i kromatogrammet som fraksjonene og «flow through» ble samlet fra. B: Vekstkurver for *S. pneumoniae* RH425 som har blitt tilsatt 100  $\mu$ l av fraksjonene (1-29) fra gelfiltrering med TBS buffer, samt 100  $\mu$ l av «flow through». Vekstkurven for «flow through» er markert med en uthevet linje.

Fordi colwellicin havnet i «flow through» hadde vi en mistanke om at det antimikrobielle stoffet dannet aggregater. Derfor ble det undersøkt om gelfiltrering med 20% og 70% etanol i prøven og kromatograferingsbufferen kunne løse opp eventuelle hydrofobe aggregater, og om dette kunne føre til at colwellicin ble eluert i en av fraksjonene fra gelfiltreringskolonnen i stedet for å gå i «flow through». Prøvene som ble injisert i gelfiltreringskolonnen besto av 400 µl colwellicin for forsøket med 20% etanol og 210 µl colwellicin for forsøket med 70% etanol. Prøvene ble tilsatt 104 µl etanol og 210 µl etanol til en sluttkonsentrasjon på henholdsvis 20% og 70% etanol. Colwellicinprøvene ble tatt fra et stort butanolekstraksjonsparti med det antimikrobielle stoffet som også ble brukt i avsnitt 3.4.3, 3.5.4 og i alle avsnittene i 3.6. Dette partiet med colwellicin besto av en butanolfase på 13 ml som hadde blitt vakuamtørket og løst opp i 3,6 ml dH<sub>2</sub>O. Gelfiltreringsfraksjonene som ble samlet opp var på 400 µl for 20% etanol og 300 µl for gelfiltrering med 70% etanol. Fraksjonene ble vakuamtørket og løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O. Deretter ble 3 µl av fraksjonene testet for aktivitet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay, som viste at gelfiltrering med TBS tilsatt 20% etanol resulterte i at alle fraksjonene inhiberte RH425. Det eneste unntaket til dette var den siste fraksjonen, som ikke hadde antimikrobiell aktivitet (Figur 3.9). Gelfiltrering med 70% etanol resulterte i at fraksjon 2-12, 15 og 16 inhiberte *S. pneumoniae* RH425, mens fraksjon 1,13,14 og 17-30 ikke hadde aktivitet (Figur 3.9).





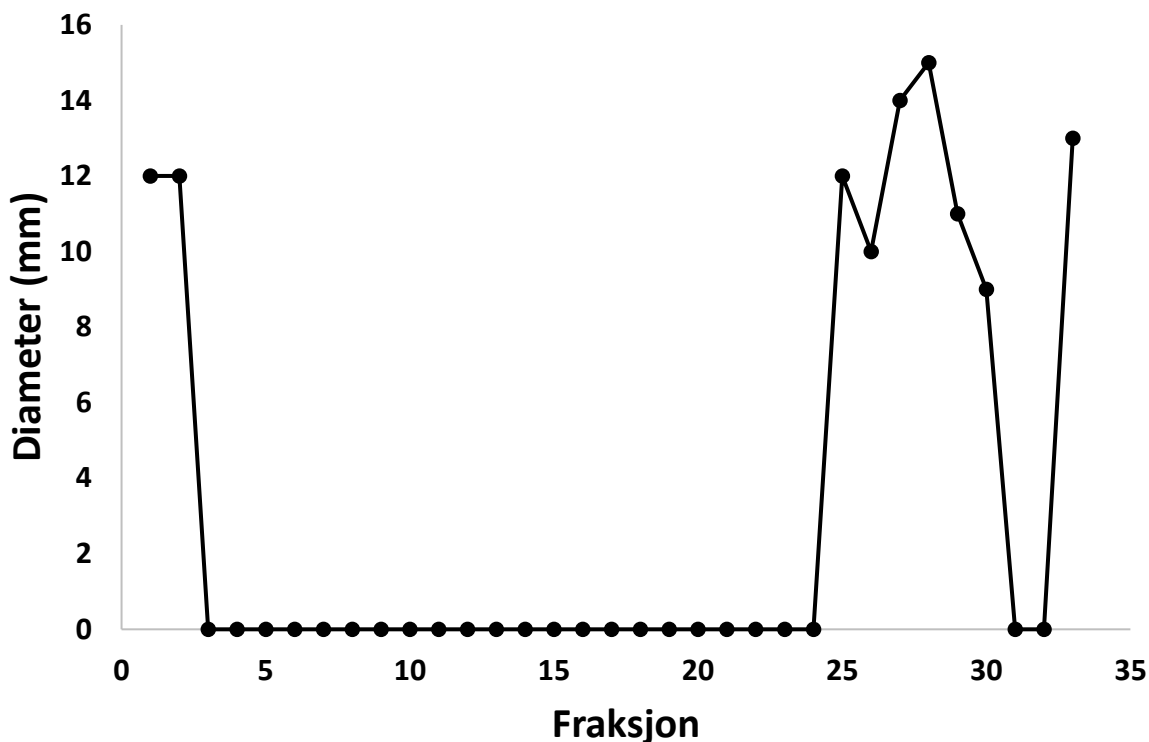
Figur 3.9. Gelfiltrering med colwellicin. A: Det ble brukt 20% etanol i TBS og flow raten var 0,4 ml/min. Testing av fraksjonene ble gjort med *S. pneumoniae* RH425 overlay assay og viser at mange av fraksjonene har antimikrobiell aktivitet. B: 70% etanol i dH<sub>2</sub>O og flow raten var 0,3 ml/min. Testing av fraksjonene for antimikrobiell aktivitet viste at fraksjon 2-12, 15 og 16 inhiberte *S. pneumoniae* RH425. Pilene i A og B indikerer området i kromatogrammet som fraksjonene ble samlet opp fra.

I tillegg ble det undersøkt om gelfiltrering med 8M urea hindret dannelsen av hydrofobe aggregater, men ingen av fraksjonene hadde antimikrobiell aktivitet etter testing av 3 µl på et overlay assay med innstøpt *S. pneumoniae* RH425 (data ikke vist). Den høye ureakonsentrasjonen gjorde det vanskelig å vakuamtørke og oppkonsentrere fraksjonene som var på 1 ml, noe som betyr at colwellicinkonsentrasjonen muligens var for lav til å ha en effekt. Totalt sett gav resultatene fra gelfiltreringsforsøkene ikke en god indikasjon på massen til colwellicin. Renheten av gelfiltreringsfraksjonene ble ikke analysert siden colwellicin ikke lot seg eluere med revers fase HPLC, men basert på gelfiltrering-kromatogrammene ser det ut til å være flere ulike komponenter (topper med ulik høyde og bredde) som eluerer sammen med colwellicin.

### 3.4.3 Rensing av colwellicin med Oasis®HLB Extraction Cartridge

Det ble utført såkalt fast-fase ekstraksjon med Oasis®HLB Extraction Cartridge i et forsøk på videre rensing av colwellicin. Dette ble gjort med 50 µl colwellicin fra det store butanolekstraksjonspartiet. Testing av 3 µl av eluater fra fast-fase ekstraksjon med et overlay assay for aktivitet mot *S. pneumoniae* RH425, viste at prøvene inhiberte vekst av bakterien. Dette betød at colwellicin band kolonnen og lot seg eluere med organiske løsemidler. Det ble derfor gjennomført flere forsøk med fast-fase ekstraksjon med ulike vaske- og elueringsløsninger for å optimalisere protokollen. Colwellicin ble støteluert fra samme kolonne med en rekke av ulike løsningsmidler. Først ved bruk av acetonitril (50%), etanol (40%) og til slutt metanol (80%). Målet med rensingen var å fjerne flest mulig urenheter og derfor ble metanol, elueringsløsningen med høyest konsentrasjon, brukt til å eluere colwellicin, fordi det tillot flere vaskesteg. I tillegg ble isopropanol undersøkt som en mulig vaske- eller elueringsløsning, men siden 100% isopropanol eluerte lavere konsentrasjoner av colwellicin enn metanol (mindre relativ hemming av *S. pneumoniae*) ble isopropanol bare brukt til vasking.

Vi antok at det antageligvis ble eluert ut flere forurensinger sammen med colwellicin ved 80% metanol. Det var derfor ønskelig å eluere colwellicin fra Oasis kolonnen ved høyere metanolprosent, slik at det meste av urenheter hadde blitt vasket ut av kolonnen før eluering med 100% metanol. Derfor ble Oasis kolonnen koblet til ÄKTAprime plus instrumentet, noe som gjorde det mulig å eluere colwellicin med en lineær metanolgradient i stedet for med støteluering. Fraksjonene fra gradientelueringen var på 1 ml, men de ble oppkonsentrert 40 ganger via vakuumbørking og oppløsning i 25 µl dH<sub>2</sub>O. Deretter ble 3 µl av fraksjonene testet for aktivitet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay og diameteren til hemmingssonene ble målt i mm (Figur 3.10). Dette resulterte i aktivitet i fraksjon 24-30, samt i fraksjon 1,2 og 33 ut av totalt 33 fraksjoner.



Figur 3.10. Diameteren i mm til hemmingssonene målt etter et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay med fraksjonene fra rensforsøket der en Oasis kolonne ble koblet til ÄKTAprime plus. Colwellicin ble eluert med en lineær metanolgradient fra 0-100%.

Fraksjonen med høyest konsentrasjon av metanol og som også inneholdt colwellicin var fraksjon 33 med 100% metanol. Siden fraksjon 33 ble eluert med 100% metanol, kunne det bety at det meste av forurensinger hadde blitt vasket bort tidligere i elueringsgradienten. Fraksjonen ble derfor analysert med massespektrometri (MALDI-TOF-MS), men resultatet av denne analysen viste at det var mange toppe med ulik masse og at videre rensing er nødvendig for å få en sikker identifisering av massen til stoffet som har antimikrobiell aktivitet. Flere detaljer rundt resultatet av massespektrometri analysen er angitt i resultater under avsnitt 3.6.8. Det ble ikke funnet en protokoll for fullstendig rensing av colwellicin i løpet av den tiden jeg hadde til rådighet, men jeg oppnådde å komme fram til en protokoll som beskriver en delvis rensing av dette stoffet. Denne protokollen besto til slutt av anrikning med Amberlite XAD1180N, så oppkonsentrering og rensing ved butanolekstraksjon og deretter videre rensing med en Oasis kolonne koblet til ÄKTAprime plus instrumentet.



### 3.5 Karakterisering av colwellicin

#### 3.5.1 Protease- og acylasebehandlet colwellicin

To enkle tester for å bestemme om colwellicin er et peptid, protein og/eller har acylbindinger (typisk for lipopeptider) i molekylet er å behandle stoffet med henholdsvis en protease eller en acylase for så å se om stoffet har fått redusert sin antimikrobielle aktivitet. Protease- og acylasebehandlingene ble gjort med 1 ml 100% metanoleluat fra amberliterensning som hadde blitt vakuamtørket og løst opp i 25  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Etter enzymbehandlingene ble 3  $\mu$ l av prøvene testet for aktivitet. Colwellicin ble behandlet med tre ulike proteaser: proteinase K, trypsin og pronase. Ingen av proteasebehandlingene hadde en effekt på colwellicins hemmingsaktivitet mot *S. pneumoniae*. Enzymet polymyxin acylase ble brukt til å undersøke om colwellicin har acylgrupper. Behandling med polymyxin acylase resulterte i mindre hemmingssoner enn ved testing av ubehandlet colwellicin, men fordi *S. pneumoniae* overlay assay på TH agarplater gav store, ujevne hemmingssoner ble polymyxin acylase behandlet colwellicin også testet på blodagar. Vi hadde tidligere observert at vi får mindre hemmingssoner med samme mengde colwellicin på blodagar. Årsaken til dette er ukjent. Dette gjorde det enklere å vurdere effekten av enzymbehandlingene. På blodagar ble hemmingssonene målt til å være 6 mm for acylasebehandlet colwellicin, og 10 mm for ubehandlet colwellicin (Figur 3.11). Dette viste at polymyxin acylase har en viss effekt på hemmingsaktivitet, samt at colwellicin har en viss hemolytisk aktivitet.



Figur 3.11. Effekten av polymyxin acylase behandling på colwellicin. Effekten ble testet med et *S. pneumoniae* RH425 overlay assay på blodagarplater, som viste at 3  $\mu$ l acylasebehandlet colwellicin gav en hemmingssone på 6 mm (øverst), mens 3  $\mu$ l ubehandlet colwellicin gav en hemmingssone på 10 mm (nederst).

### 3.5.2 Effekten av varmebehandling, DTT og pH på colwellicin

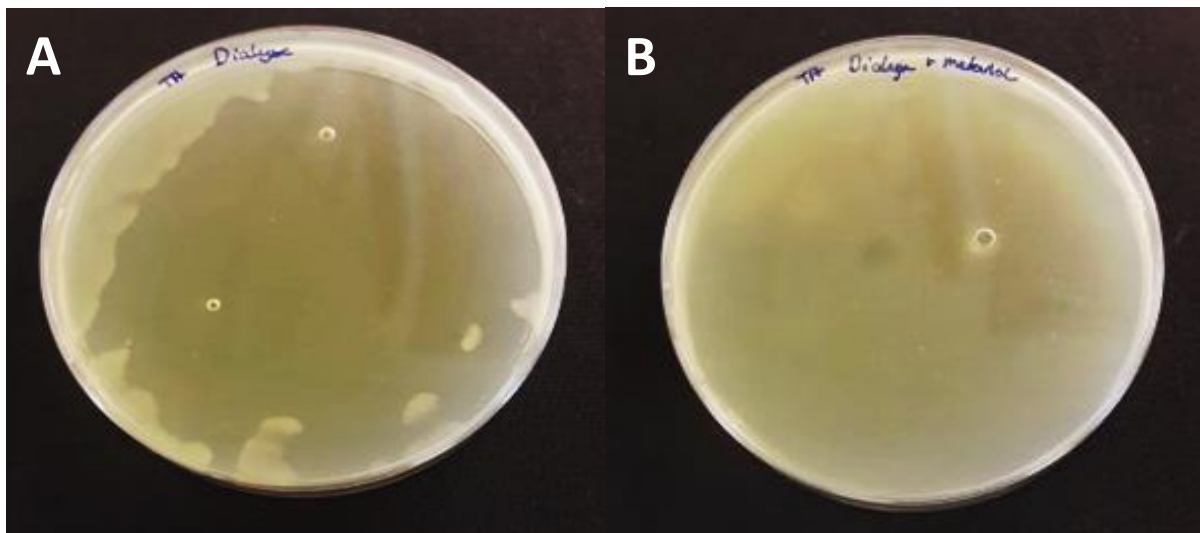
Varmebehandling ved 100°C i 20 minutter hadde ikke en effekt på colwellicins hemmingsaktivitet mot *S. pneumoniae* RH425. Heller ingen av enzymbehandlingskontrollene, som ble varmebehandlet på samme vis som prøven med enzym, resulterte i mindre hemmingssoner etter testing av 3 µl prøve med et overlay assay. Et *S. pneumoniae* overlay assay tilsatt 3 µl prøve viste også at DTT-behandling og behandling av colwellicin med ulike pH-regulerende løsninger ikke resulterte i endret colwellicinaktivitet. Alle behandlingene ble gjort med colwellicin fra et 1 ml 100% metanoleluat som hadde blitt vakuamtørket og løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O.

### 3.5.3 Undersøkelse av colwellicins omtrentlige molekylvekt med hjelp av filtrering

Colwellicin fra et 1 ml 100% metanoleluat som hadde blitt vakuamtørket og løst opp i 25 µl dH<sub>2</sub>O, ble forsøkt filtrert gjennom et filter med en nedre grense på 3000 Da. Etter at colwellicin ble forsøkt filtrert, ble 3 µl av prøven som passerte igjennom filteret og 3 µl av prøven som ikke passerte igjennom filteret testet for aktivitet mot *S. pneumoniae* RH425. Prøven som hadde passert gjennom filteret inhiberte ikke *S. pneumoniae* RH425, men prøven som ble holdt igjen av filteret hadde beholdt hemmingsaktiviteten.

### 3.5.4 Dialyse av colwellicin

Det ble gjennomført dialyse av 500 µl colwellicin fra det store butanolekstraksjonspartiet for å undersøke om det antimikrobielle stoffet dannet miceller. Etter dialyse i TBS buffer og deretter dialyse i 70% metanol ble 3 µl av prøvene testet for antimikrobiell aktivitet med *S. pneumoniae* RH425 overlay assay. Prøven som ble tatt etter dialyse i TBS buffer gav en hemmingssone på 50 mm, men prøven som også hadde blitt dialysert i 70% metanol ført ikke til inhibering av *S. pneumoniae* (Figur 3.12). Dialysen ble gjort med en semipermeabel membran med MWCO på 100 kDa. Etter dialyse i 70% metanol diffunderte colwellicin ut av membranen, noe som kan tyde på at eventuelle miceller ble løst opp i metanolen.



Figur 3.12. Dialyse av colwellicin. Etter testing av 3  $\mu$ l av prøvene med *S. pneumoniae* RH425 overlay assay, gav prøven som hadde blitt dialysert i TBS buffer en hemmingssone på 50 mm (A), men prøven som i tillegg hadde blitt dialysert i 70% metanol gav ikke en hemmingssone (B).

### 3.5.5 Undersøkelse av om *S. colwelliana* har nonribosomal peptide synthetases

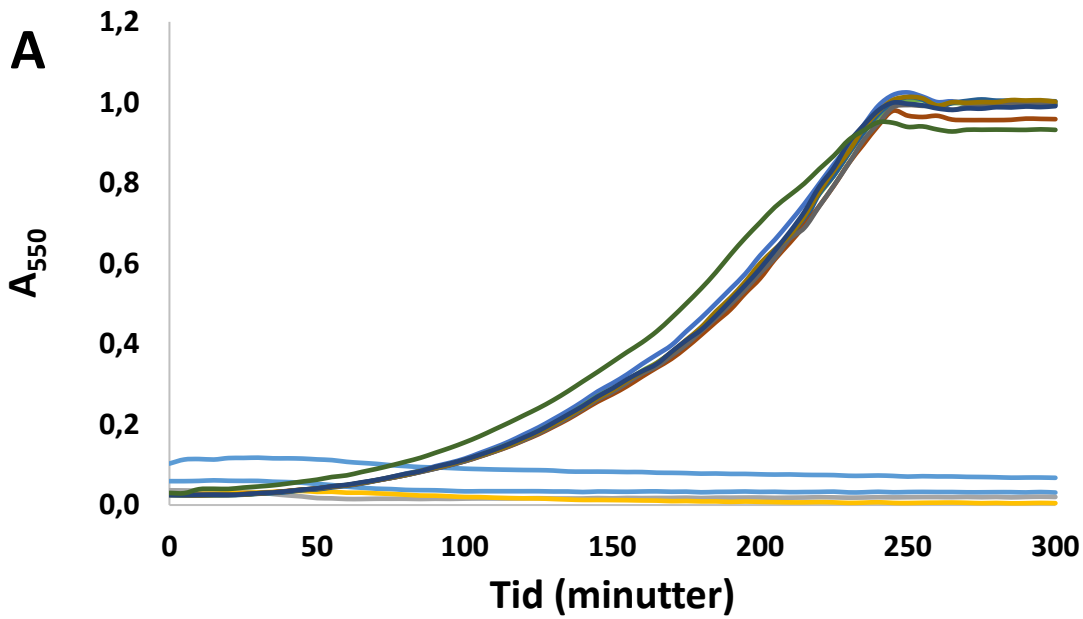
«Nonribosomal peptide synthetases» (NRPS) er enzymer som syntetiserer peptiddelen av lipopeptider. For å undersøke om *S. colwelliana* har NRPS-er ble det gjennomført en PCR-screening med degenererte oligonukleotid-primere som ble laget på grunnlag av en sammenligning av aminosyresekvensene til NRPS-er. Det ble ikke funnet noen treff i gDNA-et til *S. colwelliana* med disse primerene.

## 3.6 Karakterisering av colwellicins virkningsmekanisme

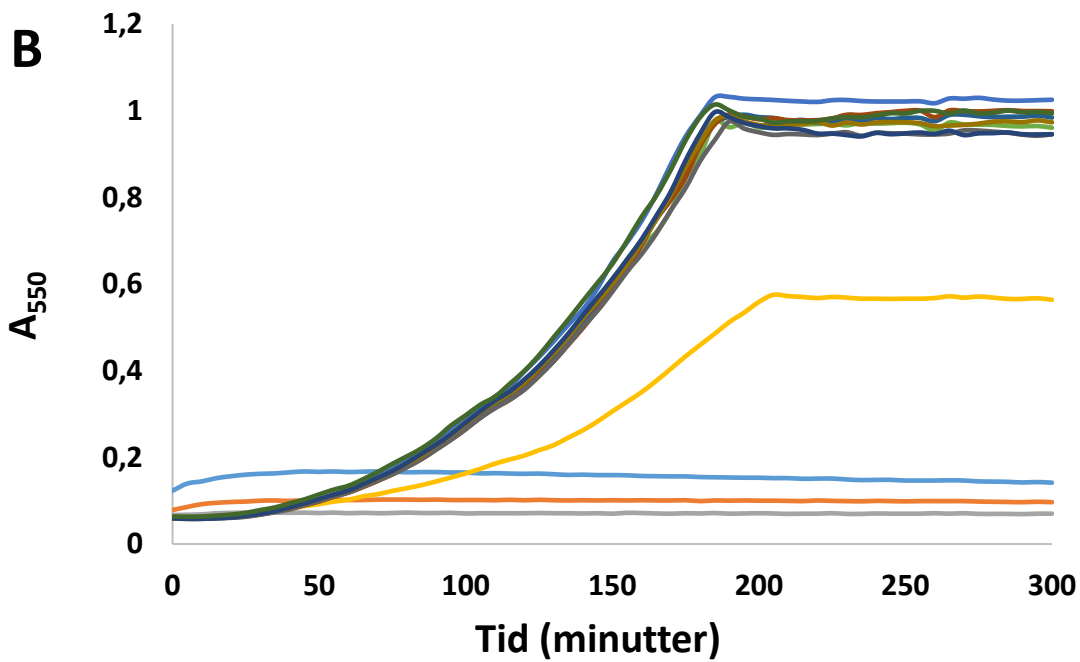
### 3.6.1 Relativ minimum inhibitory concentration for colwellicin

Det ble lagd et stort parti med delvis rensed colwellicin som først var anrikt ved hjelp av Amberlite XAD1180N og deretter ytterligere rensed med butanolekstraksjon. Colwellicinen i dette partiet var ikke rent nok til å bestemme MIC, men for å kunne selektere for mutanter som er mer resistente mot colwellicin ble det bestemt en såkalt relativ MIC (RMIC). Med RMIC menes hvor mye colwellicinen i det store partiet kan fortynnes før den ikke lenger kan inhibere veksten av indikatorbakterien *S. pneumoniae*. Etter at 5  $\mu$ l av en 2-folds fortynningsrekke med colwellicin fra dette colwellicinpartiet ble tilsatt *S. pneumoniae* RH425 og RH14, ble vekstkurvene avlest i en plateleser. Forsøket besto av 3 paralleller for hver av

stammene, og resultatet av målingene viste at parallellene var tilnærmet like. Derfor ble ikke standardavvik tatt med i Figur 3.13, som viser vekstkurvene. RMIC for *S. pneumoniae* RH425 er 0,63 µl colwellicin fra det store partiet per 300 µl cellekultur. RMIC for *S. pneumoniae* RH14 var høyere enn for RH425. Ved tilsetning av 0,63 µl colwellicin var det delvis vekst av RH14, og derfor ble 1,25 µl colwellicin per 300 µl cellekultur bestemt som RMIC for *S. pneumoniae* RH14.



5  $\mu\text{L}$     2,5  $\mu\text{L}$     1,25  $\mu\text{L}$     0,63  $\mu\text{L}$     0,31  $\mu\text{L}$     0,16  $\mu\text{L}$   
 0,08  $\mu\text{L}$     0,04  $\mu\text{L}$     0,02  $\mu\text{L}$     0,01  $\mu\text{L}$     0,005  $\mu\text{L}$     0  $\mu\text{L}$



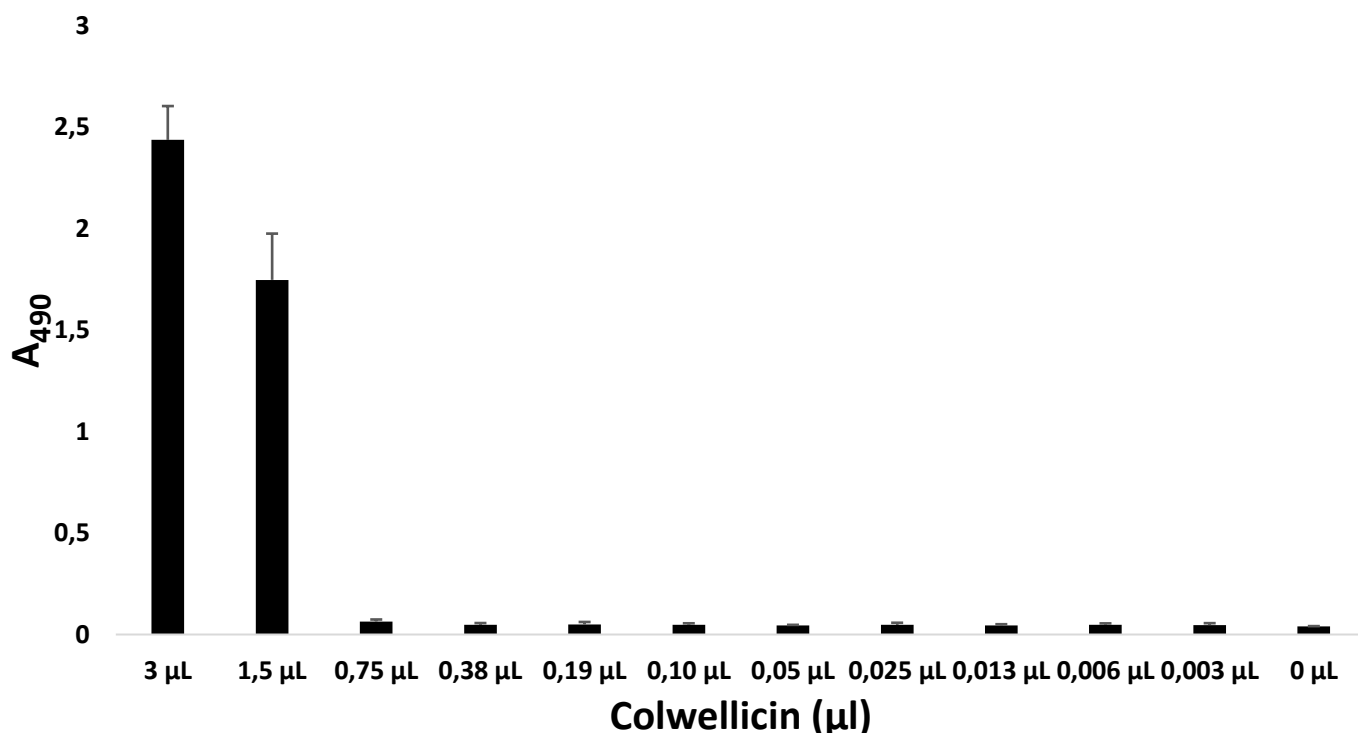
5  $\mu\text{L}$     2,5  $\mu\text{L}$     1,25  $\mu\text{L}$     0,63  $\mu\text{L}$     0,31  $\mu\text{L}$     0,16  $\mu\text{L}$   
 0,08  $\mu\text{L}$     0,04  $\mu\text{L}$     0,02  $\mu\text{L}$     0,01  $\mu\text{L}$     0,005  $\mu\text{L}$     0  $\mu\text{L}$

Figur 3.13. RMIC til colwellicin. RMIC ble bestemt for *S. pneumoniae* RH425 (A) og for *S. pneumoniae* RH14 (B), og var på henholdsvis 0,63  $\mu\text{L}$  og 1,25  $\mu\text{L}$ .

### 3.6.2 Hemolyse

For at et stoff skal ha potensiale som fremtidig antibiotika bør det ha lav toksisitet.

Colwellicin hadde allerede vist hemolytisk aktivitet etter tilsetning av det antimikrobielle stoffet på blodagarskåler, men det var ønskelig å sammenligne konsentrasjonen som fører til hemolyse mot RMIC. Derfor ble en 2-folds fortynningsrekke med colwellicin fra det store butanolekstraksjonspartiet tilsatt blodceller. Resultatet er vist i Figur 3.14 og viser at colwellicin fører til hemolyse ved tilsetning av 1,5  $\mu\text{l}$  fra det store colwellicinpartiet til 300  $\mu\text{l}$  blodceller. Dette er ikke langt unna RMIC for hverken *S. pneumoniae* RH425 eller RH14, der det henholdsvis er 0,87  $\mu\text{l}$  og 0,25  $\mu\text{l}$  forskjell mellom hemolytisk aktivitet og RMIC.



Figur 3.14. Den hemolytiske aktiviteten til colwellicin.

### 3.6.3 Seleksjon av mutanter med økt resistens mot colwellicin

For å få et innblikk i mekanismen colwellicin bruker for å hemme *S. pneumoniae*, så ble det selektert frem mutanter med økt resistens mot det antimikrobielle stoffet. Mutanter ble selektert frem ved å dyrke *S. pneumoniae* RH14 i nærvær av konsentrasjoner av colwellicin som lå på grensen av hva de tålte. En 2-folds fortynningsrekke av colwellicin fra den store rensingen nevnt ovenfor ble tilsatt kulturer av *S. pneumoniae* RH14 som ble dyrket i mikrotiterbrett. For hver runde ble kulturen som vokste ved den høyeste colwellicinkonsentrasjonen tatt vare på og brukt videre i neste runde. Etter 10 runder med

dyrking, ble enkeltkolonier fra pneumokokkkulturen som vokste ved høyest colwellicinkonsentrasjon dyrket opp og testet for økt resistens mot colwellicin. Dette ble gjort ved å sammenligne RMIC for koloniene mot RMIC for *S. pneumoniae* RH14 via sammenligning av vekstkurver etter tilsetning av en 2-folds fortynningsrekke med colwellicin. Vekstkurvene viste at tre av isolatene vokste ved RMIC for RH14, men ikke ved fortynningen før 1,25 µl. RMIC for isolatene ble derfor bestemt til å være 2,5 µl. Deretter ble gDNA isolert fra isolatene og sekvensert. Detaljene er beskrevet i avsnitt 2.7.2. Resultatet av sekvenseringen viste at tre av genene som hadde mutert kan være involvert i utviklingen av resistens mot antimikrobielle stoffer. Dette var genene *ppnK*, *pspC* og *crcB* (Du et al., 2014; Hu et al., 1996; Men, Shibata, Takeshita, & Yamashita, 2016; Pan et al., 2018). Det ble ikke funnet noen forbindelse til resistensutvikling for de resterende genene som hadde mutasjoner. Mutasjonen i både *ppnK* og *crcB* ble funnet i alle tre isolater, men mutasjonen i *pspC* ble bare funnet i ett av isolatene. En oversikt over genene, genprodukt, type mutasjon, variantfrekvensen og lokus tag er angitt i Tabell 3.4. Gener som ikke assosieres med resistensutvikling ble ikke tatt med i tabellen. Variantfrekvensen er % av alle reads som dekker et område på genomet med akkurat den mutasjonen (Strom, 2016). Variantfrekvensen var på omtrent 30% for de tre isolatene, samt for flere av genene med mutasjoner. Dette ble tolket som at en signifikant andel av cellene hadde mutasjoner, men at det var stor sannsynlighet for at bakteriekulturen var blandet og besto av både muterte og umuterte RH14 celler.

Tabell 3.4. En liste over muterte gener som muligens kan kobles til resistensutvikling. Genene ble funnet med gDNA sekvensering etter dyrking av *S. pneumoniae* RH14 med colwellicin.

Gen	Produkt	Type mutasjon	Mutasjon	Variantfrekvens	Lokus tag
<i>ppnK</i>	Uorganisk polyfosfat/ATP-NAD kinase	Polymorfisme: SNP* (transisjon)	A -> G	32,1%	spr1005
<i>pspC</i>	Kolin bindende protein A	Polymorfisme: SNP (transversjon)	T -> A	37,3%	spr1995
<i>crcB</i>	Kamfer resistens protein CrcB	Polymorfisme: SNP (transversjon)	A -> C	30,0%	spr1172

\*Single nucleotide polymorphism

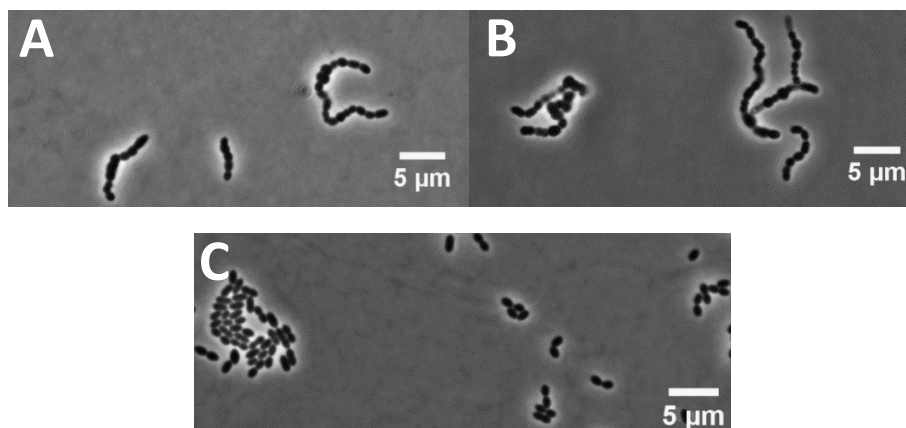
Mutasjonene i de tre isolatene var SNPer, der mutasjonen i *ppnK* var en transisjon og mutasjonene i *pspC* og *crcB* var transversjoner. En transisjon er en forandring fra en purin til

en annen purin eller fra en pyrimidin til en annen pyrimidin, mens en transversjon er substitusjon av en purin med en pyrimidin eller omvendt (Arabnejad et al., 2018). Mutasjonen i *ppnK* førte til en forandring i kodonet fra GAT til GGT, som igjen gav en aminosyreforandring fra D til G. Mutasjonen i *ppnk* er i posisjon 161. Mutasjonen i *pspC* førte til et trunkert protein, og er i posisjon 1177. Mutasjonen i *crcB* gav en endring i kodonet fra GTA til GGA, som igjen førte til en aminosyreforandring fra V til G. Mutasjonen er i posisjon 260.

Det ble også undersøkt om isolatene hadde utviklet resistens mot daptomycin og viscosin. En sammenligning av vekstkurven til en *S. pneumoniae* RH14 kontroll med vekstkurver for isolatene som hadde blitt behandlet med antibiotikaene, viste at det ikke var noen endring i MIC-verdi mellom kontrollen og isolatene. Isolatene hadde derfor ikke utviklet resistens mot daptomycin og viscosin.

#### 3.6.4 Morfologiske forandringer i *S. pneumoniae* etter behandling med colwellicin

En kultur (300  $\mu$ l) med *S. pneumoniae* RH14 ble tilsatt 0,63  $\mu$ l colwellicin fra det store colwellicinpartiet. Cellene ble undersøkt for eventuelle morfologiske forandringer med fasekontrastmikroskopi. Cellene behandlet med colwellicin hadde en annerledes morfologi enn kontrollen (Figur 3.15). De var kortere og rundere, og vokste i lengre kjeder enn ubehandlede celler. I tillegg hadde noen av cellen svulmet kraftig opp, og var mye større enn kontrollcellene.

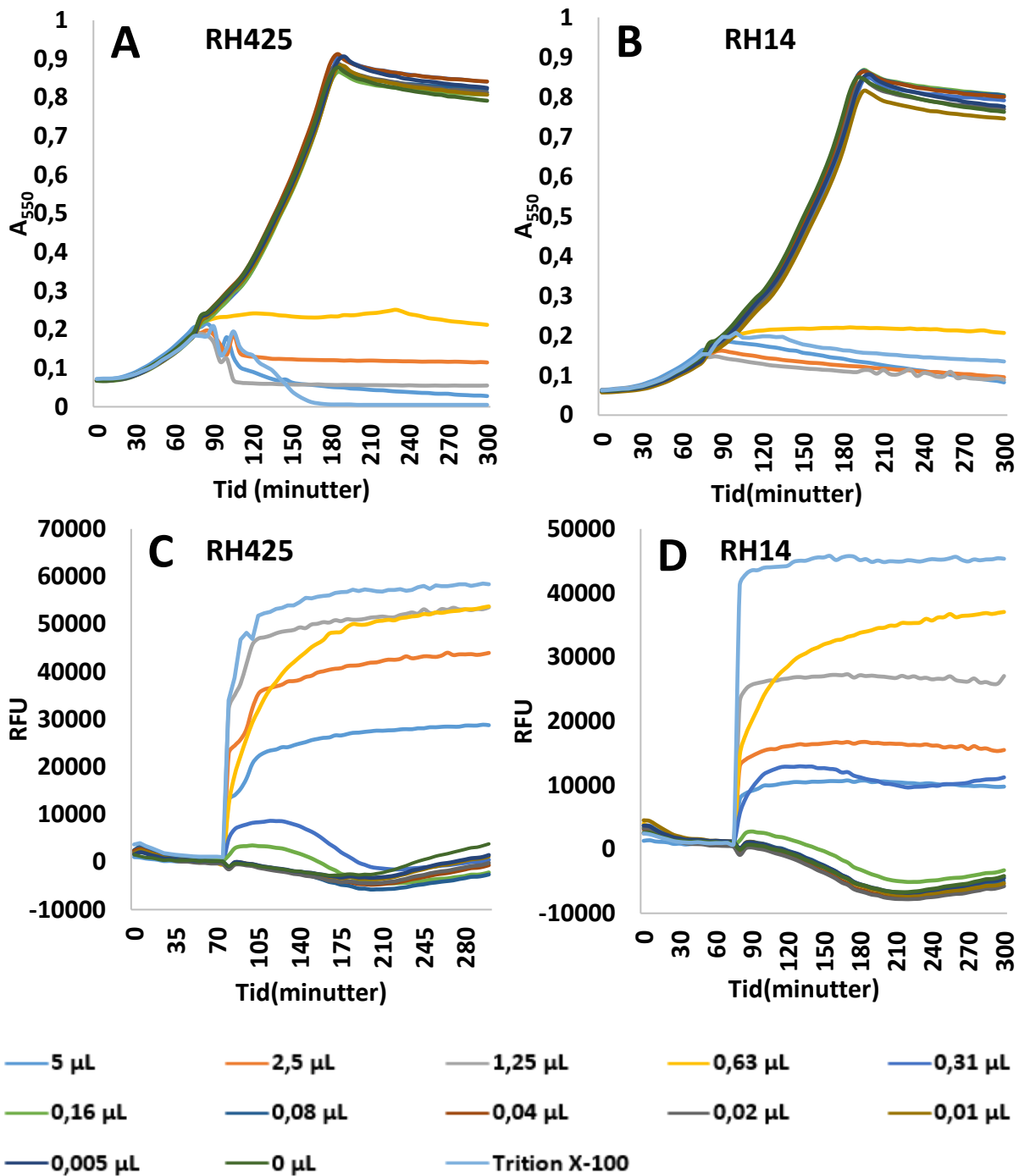


Figur 3.15. Bilder av *S. pneumoniae* RH14 som har blitt behandlet med 0,63  $\mu$ l colwellicin (A og B) og en RH14 kontroll som ikke har blitt behandlet. Bildene ble tatt ved fasekontrastmikroskopi med 100X objektiv.



### 3.6.5 Deteksjon av cellelysis i *S. pneumoniae* behandlet med colwellicin

Basert på resultatene ovenfor som viste at colwellicin er hydrofobt og mest sannsynlig kan danne miceller/aggregater (gelfiltrering) hadde vi en hypotese om at colwellicin virker antimikrobielt ved å destabilisere cellemembranen. Ved å utføre et såkalt Sytox-assay (metoder, avsnitt 2.7.4) kan man få informasjon om cellemembranen destabiliseres og om hvor raskt dette skjer. Kulturer av *S. pneumoniae* RH425 og RH14 på 300  $\mu$ l ble tilsatt sytox green, og ved  $OD_{550} = 0,2$  ble kulturene behandlet med ulike mengder colwellicin fra en 2-folds fortynningsrekke. Fortynningsrekken ble laget fra det store partiet med colwellicin. Sytox green fluorescerer når det binder til DNA, men er ikke i stand til å trenge igjennom intakte cellemembraner. Deteksjon av fluorescens betyr derfor at integriteten til cellemembranen er ødelagt eller at cellen er gått i lysis. For hver stamme ble det målt absorbans ved 550 nm og fluorescens ved 528 nm i 3 paralleller i en plateleser. Grafene fra målingene er vist i Figur 3.16, og fordi parallellene var tilnærmet like er ikke standardavvik tatt med i grafene. Ved tilsetning av konsentrasjoner på 0,63  $\mu$ l colwellicin eller høyere til cellekulturene viste  $OD_{550}$  målingene at vekstkurvene for både RH425 og RH14 flatet ut. Samtidig gav disse colwellicinkonsentrasjonen økt fluorescens. RH14 ble tatt med i forsøket fordi stammen mangler LytA og autolysinet vil derfor ikke påvirke resultatet. Fluorescensøkningen var størst ved behandling med 0,63-1.25  $\mu$ l colwellicin. Høyere colwellicinkonsentrasjoner gav mindre fluorescens, noe som var uventet. Lavere konsentrasjoner enn 0,63  $\mu$ l gav ikke økt fluorescens bortsett fra en liten økning ved tilsetning av 0,31  $\mu$ l colwellicin. Colwellicinkonsentrasjoner lavere enn 0,63  $\mu$ l hadde heller ikke en effekt på vekstkurvene. Kontrollene med triton X-100 gav høyest fluorescens. Tilsetning av colwellicin førte altså ikke til like høye fluorescensverdier. Måling av  $OD_{550}$  viste at Triton X-100 førte til at vekstkurvene flatet ut.

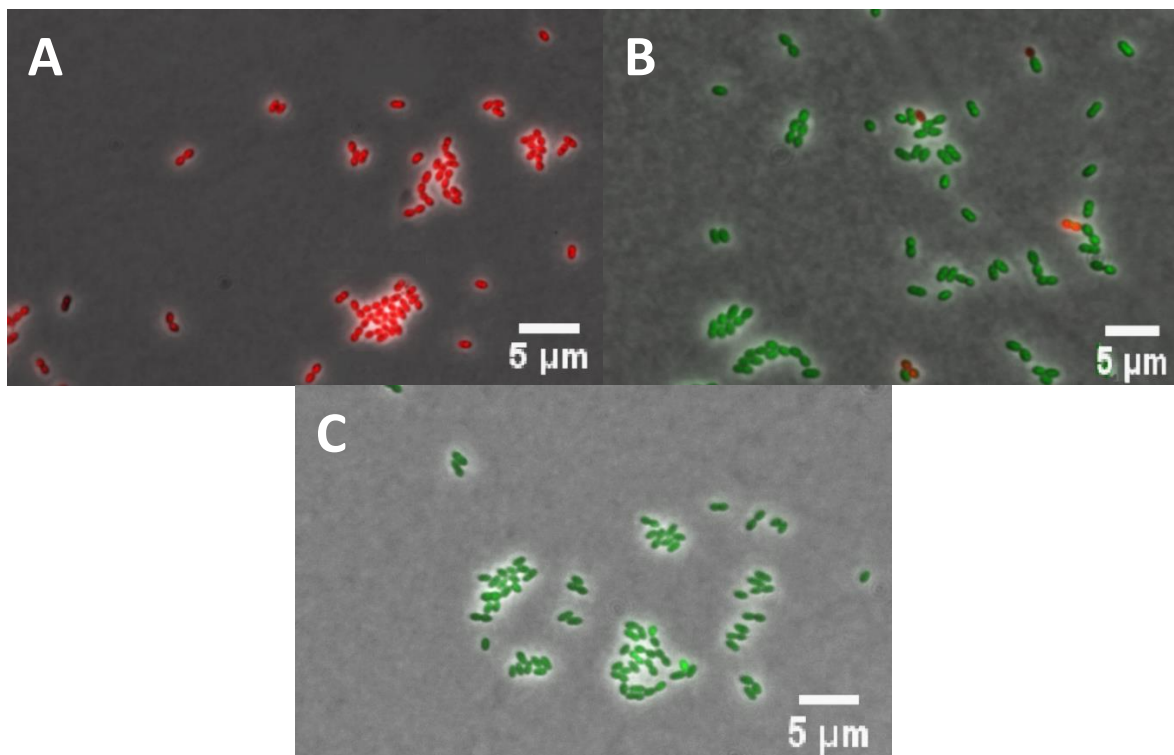


Figur 3.16. Påvisning av colwellicin induisert ødeleggelse av cellemembranen til *S. pneumoniae* RH425 og RH14 med sytox green ved måling av  $A_{550}$  (A og B) og fluorescens (C og D).

### 3.6.6 Levende/død farging av *S. pneumoniae* behandlet med colwellicin

Det ble gjennomført levende/død farging av *S. pneumoniae* RH14 for å undersøke om cellemembranen var intakt etter behandling av cellene med en 2-folds fortynningsrekke med colwellicin fra det store partiet med det antimikrobielle stoffet. Resultatet av fargingen etter

behandling med 5  $\mu$ l ufortynnet colwellicin, en fortyning med 0,63  $\mu$ l colwellicin og en kontroll bestående av dH<sub>2</sub>O per 300  $\mu$ l cellekultur er vist i Figur 3.17. Ufortynnet colwellicin gav røde celler, noe som betyr at cellemembranintegriteten har blitt ødelagt. Etter behandling med 0,63  $\mu$ l colwellicin ble noen celler farget rødt, mens resten ble farget grønt. Bestemmelse av RMIC for *S. pneumoniae* RH14 viste at 0,63  $\mu$ l colwellicin førte til delvis vekst, og levende/død farging viste også at kulturen besto av både levende og døde celler. Kontrollen uten colwellicin ble farget grønt, og cellene i kontrollen ble derfor telt som levende.



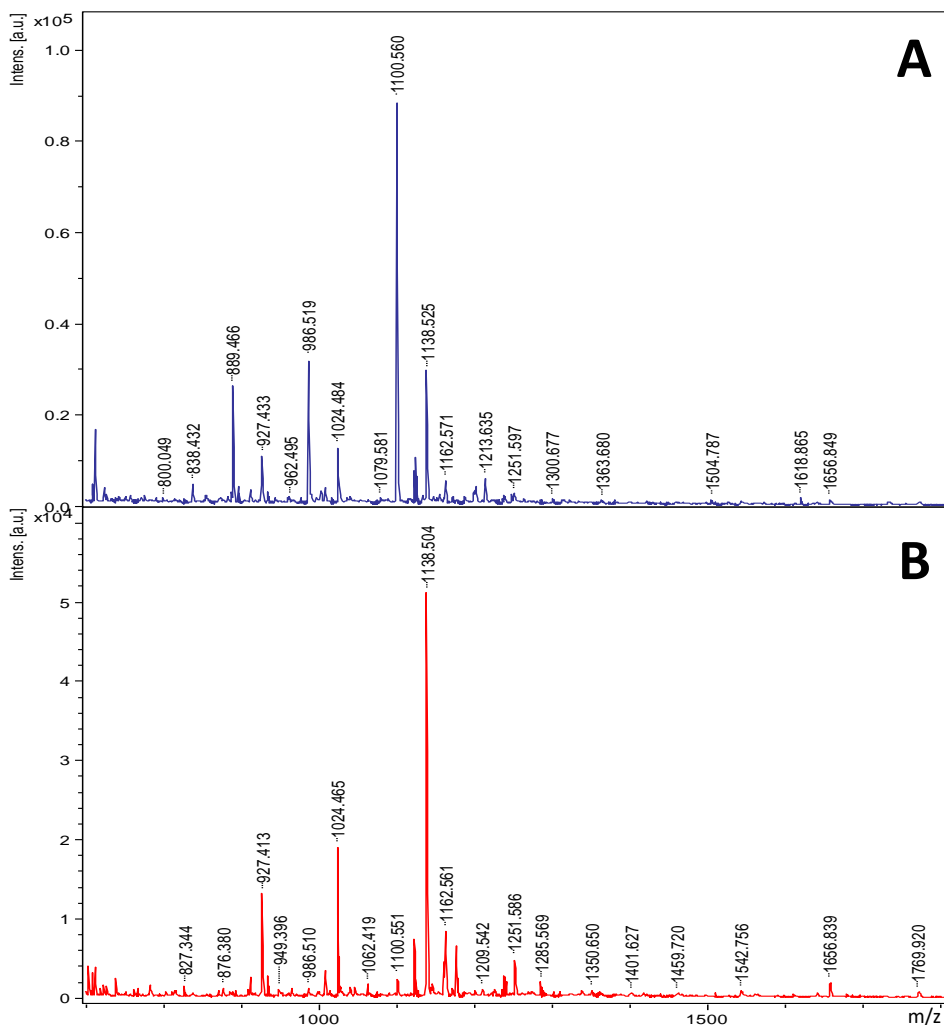
Figur 3.17. Levende/død farging av *S. pneumoniae* RH14 etter behandling med colwellicin. Cellene ble behandlet med 5  $\mu$ l ufortynnet colwellicin (A), 0,63 $\mu$ l colwellicin (B) og 5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O (C).

### 3.6.7 Bestemmelse av massen til colwellicin med massespektrometri

Etter rensing av colwellicin med en Oasis kolonne koblet til ÄKTAPrime plus instrumentet ble fraksjonene testet for antimikrobiell aktivitet. Resultatene av dette er angitt i resultater under avsnitt 3.4.2 og viser at fraksjon 33 ble vurdert som den reneste fraksjonen med antimikrobiell aktivitet. Fraksjonen ble derfor analysert med massespektrometri.

Massespektrometri ble gjort med to ulike matriser, DHB og HCCA, og massespektrene for begge matrisene er vist i Figur 3.18. Bare en ufortynnet prøve med colwellicin gav et brukbart

signal. Spektrene viser flere topper, men det er en topp i begge matrisene som er mye større enn de andre. DHB gav en topp på  $m/z$  1100,560, mens HCCA gav en topp på  $m/z$  1138,504. Etter at et hydrogenmolekyl har blitt trukket fra blir massen 1099,56 Da med DHB og 1137,504 Da med HCCA. Massene er ikke like og derfor ble det gjennomført en LIFT-analyse for å undersøke om  $m/z$  1100,560 og  $m/z$  1138,504 representerer ulike addukter av samme molekyl. Resultatet av LIFT-analysen viste at  $m/z$  1100,560 og  $m/z$  1138,504 mest sannsynlig ikke er addukter, og at  $m/z$  1100,560 kan være et mulig peptid med aminosyresekvensen DNF $\text{P}$ YV (vedlegg B.2). Det er nødvendig med en renere prøve for å konkludere. Massene ble søkt opp i massedatabasene MassBank og PubChem, men det ble ikke funnet noen treff for den eksakte massen til de to toppene.



Figur 3.18. Massespektre for colwellicin med matrisene DHB (A) og HCCA (B). DHB gav en stor topp på  $m/z$  1100,560 og HCCA gav en stor topp på  $m/z$  1138,504.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Produksjon og hemmingsaktivitet av det antimikrobielle stoffet produsert av *Exigobacterium oxidotolerans*

Det ble observert hemmingssoner når *S. pneumoniae* støpt inn i softagar ble lagt over en *E. oxidotolerans* koloni, men ikke når andre indikatorbakterier ble benyttet. Dette tyder på at det antimikrobielle stoffet er svært smalspektret. For å fortsette arbeidet med karakterisering og rensing av det antimikrobielle stoffet var det nødvendig å isolere det fra en flytende kultur. Dessverre viste tester av supernatanter fra flytende kulturer ingen hemmingsaktivitet. Heller ikke dyrking av bakterien i flytende kultur med glassull resulterte i at det antimikrobielle stoffet ble funnet i supernatanten. Glassull ble tilsatt for å gi *E. oxidotolerans* en overflate å vokse på i tilfellet bakterien kun produserer stoffet når den vokser på et fast underlag. Det ble også prøvd flere teknikker for oppkonsentrering av stoffet fra supernatanten, men hverken vakuumsørking, Amberlite XAD1180N, butanolekstraksjon eller ammoniumsulfatutfelling gav prøver med hemmingsaktivitet. Det kan virke som at *E. oxidotolerans* ikke produserer det antimikrobielle stoffet eller har veldig lav produksjon av stoffet i flytende kultur.

Antibiotika er sekundærmetabolitter som blant annet produseres fordi det gir et konkurransefortrinn i kampen om ressurser, men det har også blitt vist at antibiotika kan fungere som signalmolekyler som er viktige for quorum-sensing og biofilmformasjon (Sengupta, Chattopadhyay, & Grossart, 2013). Det vil derfor være bortkastet energi å produsere antibiotika hvis ikke enkelte betingelser blir oppfylt, og det er mulig at disse betingelsene ikke blir oppfylt for *E. oxidotolerans* i en flytende kultur. Det er også mulig at produksjonen hemmes på et vis i flytende kultur, slik som for noen antibiotikaproduserende bakterier i *Streptomyces* slekten. Bakteriene vokser i filamenter, og på agarplater er dette ikke problematisk, men i flytende kulturer går bakteriene sammen i globulære strukturer. Formasjonen av disse strukturene fører til at de innerste cellene får begrenset tilgang til næring og til slutt blir cellevekst redusert til det ytterste cellelaget. Dette fører til en reduksjon av antibiotikaproduksjonen (Hobbs, Frazer, Gardner, Cullum, & Oliver, 1989). *E. oxidotolerans* vokser ikke i filamenter, og det var god vekst i flytende kulturer av bakterien. Det virker derfor usannsynlig at produksjon ble hemmet på grunn av dårlige vekstbetingelser i en flytende kultur, men det kan være andre mekanismer som hemmer produksjonen av det antimikrobielle stoffet. Fremtidig arbeid med det antimikrobielle stoffet produsert av *E.*

*oxidotolerans* burde derfor fokusere på finne betingelsene som fører til produksjon i en flytende kultur. Alternativt kan man forsøke å isolere såkalte «gain of function» mutanter av *E. oxidotolerans*, dvs. mutanter som har fått evnen til å produsere antibiotikumet også i flytende kultur.

#### **4.2 Colwellicin har bredspektret aktivitet mot Gram-positive bakterier**

Colwellicin ble testet for aktivitet mot 15 ulike streptokokker og mot 7 indikatorbakterier fra andre slekter. Resultatet viste at colwellicin inhiberer vekst av alle de Gram-positive indikatorbakteriene bortsett fra *M. smegmatis*, men stoffet har ikke en antimikrobiell effekt mot de Gram-negative indikatorbakteriene. Det er forskjell mellom Gram-negative og Gram-positive bakterier i oppbygningen av celleveggen. Gram-positive har et tykt lag med peptidoglykan, mens Gram-negative har et tynt peptidoglykanlag. I tillegg har Gram-negative bakterier en ytre lipopolysakkaridmembran (Willey, Sherwood, & Woolverton, 2014). Det er mulig at målet til colwellicin er spesifikt for Gram-positive bakterier eller at målet blir beskyttet i Gram-negative bakterier ved at yttermembranen fungerer som en barriere. Gram-negative bakterier er resistente mot daptomycin, et syklisk lipopeptid som angriper cellemembranen. Årsaken er sannsynligvis at Gram-negative bakterier har færre negativt ladde fosfolipider i cellemembranen enn Gram-positive bakterier (Randall et al., 2013). Colwellicin angriper sannsynligvis også cellemembranen (se under). Det er derfor mulig at resistens mot colwellicin er basert på noe lignende.

En forskjell i celleveggoppbyggingen kan forklare hvorfor *M. smegmatis* er resistent mot colwellicin. *M. smegmatis* klassifiseres som Gram-positiv, men den avviker fra andre Gram-positive bakterier. *M. smegmatis* har nemlig et ytre lag bestående av lange fettsyrer (mykoliske syrer) som er kovalent bundet til et polysakkarid, som igjen er bundet til det underliggende peptidoglykanlaget. Dette skaper en hydrofob kappe som er ugjennomtrengelig for organiske molekyler over en viss størrelse. Mindre organiske og uorganiske molekyler slipper igjennom kappen via porinlignende kanaler (Willey et al., 2014). Det er antageligvis denne kappen hos *M. smegmatis* som er grunnen til resistensen mot colwellicin. Det virker derfor også mest sannsynlig at Gram-negative bakterier er resistente på grunn av yttermembranen, og at colwellicin derfor ikke når fram til sitt angrepsmål hos Gram-negative

bakterier. Angrepsmålet til colwellicin må være en konservert struktur, siden Gram-positive bakterier fra flere ulike slekter er alle følsomme.

Colwellicin hadde heller ikke en antimikrobiell effekt mot produksjonsbakterien *S. colwelliana*, noe som var forventet siden *S. colwelliana* er Gram-negativ. I tillegg var *C. krusei* resistent mot colwellicin, noe som tyder på at colwellicin ikke har en antifungal effekt.

Supernatanten fra en flytende kultur av *S. colwelliana* hadde større grad av aktivitet etter inkubasjon i fire døgn enn i to døgn. Det er mulig at colwellicin blir produsert som en sekundærmetabolitt mot slutten av vekstfasen til *S. colwelliana*, og at produksjonen av colwellicin kan være koblet til den morfologiske forandringen som skjer mot slutten av vekstfasen (Sledjeski & Weiner, 1993). Denne forandringen krever et skifte i metabolismen, og det er mulig colwellicin blir produsert som en del av dette skiftet. Det er også tenkelig at produksjonen av colwellicin skjer i stasjonærfasen. Det ville derfor vært interessant å undersøke hvor mye colwellicin som blir produsert i flytende kulturer av *S. colwelliana* etter inkubering i mer enn fire døgn.

#### **4.3 Karakterisering av colwellicin og colwellicins virkningsmekanisme**

Det ble undersøkt om colwellicin er et protein, peptid eller har en peptiddel. Dette ble først og fremst gjort gjennom flere behandlinger med ulike proteaser. Hverken proteinase K eller trypsin førte til endret hemmingsaktivitet, noe som kan bety at colwellicin ikke har proteinase K- eller trypsin-sensitive peptidbindinger. I tillegg ble colwellicin behandlet med pronase, men pronasebehandlingen hadde ingen effekt på hemmingsaktiviteten. Pronase er en blanding av flere proteaser som hydrolyserer proteiner svært effektivt og burde derfor hatt en effekt hvis colwellicin var et peptid. Heller ikke behandling med DTT, varme eller løsninger med ulik pH hadde en effekt. Hvis colwellicin hadde vært et protein kunne det forventes at varmebehandlingen denaturerte proteinet eller at pH endringen hadde påvirket ladningen slik at proteinet mistet aktiviteten. Det kunne også forventes at DTT behandlingen reduserte eventuelle disulfidbindinger. Totalt sett er det derfor høyst usannsynlig at colwellicin er et protein. Et peptid eller organisk molekyl derimot vil sannsynligvis være forholdsvis varmestabilt og kunne tåle oppvarming til 100 °C, men siden proteaser heller ikke har noen effekt kan det konkluderes med at colwellicin hverken er et protein eller et peptid.

Colwellicin ble behandlet med polymyxin acylase for å undersøke om det antimikrobielle stoffet har acylgrupper. Behandlingen med polymyxin acylase førte til mindre hemmingssoner etter testing med et *S. pneumoniae* overlay assay, og på blodagar var hemmingssonen 4 mm mindre enn hemmingssonen til ubehandlet colwellicin. Dette kan tyde på at colwellicin har acylgrupper, men at de ikke er 100% nødvendig for å oppretthold den antimikrobielle aktiviteten. Alternativt kan det tenkes at polymyxin acylasen ikke er særlig effektiv til å kløyve av acylgruppen(e) til colwellicin. Det er også en mulighet at colwellicin er heterogent og at ødeleggelse av den ene komponenten kun gir en reduksjon, men ikke en fullstendig blokkering av den antimikrobielle aktiviteten. I utgangspunktet kunne resultatet av polymyxin acylase behandlingen tolkes som at colwellicin er et lipopeptid, og at enzymet hadde kløyvd av bindingen mellom fettsyre- og peptiddelen av lipopeptidet. Denne tolkningen ble derimot vurdert som usannsynlig fordi colwellicin antageligvis ikke er et peptid eller har en peptiddel. I tillegg ble det undersøkt om *S. colwelliana* har NRPS enzymer. Disse enzymene står for syntesen av peptiddelen til lipopeptider. Dette ble gjort via en PCR-screening med degenererte oligonukleotid-primere som var basert på en sammenligning av NRPS-sekvenser. PCR-screeningen gav ikke et positivt resultat, noe som også tyder på at colwellicin ikke er et lipopeptid.

Ved tilsetning av 5 µl colwellicin fra det store rensespartiet (RMIC = 0,63 µl) til flytende kulturer av *S. pneumoniae* RH425 lyserte cellene veldig raskt, ofte i løpet av 5 minutter. Dette førte til videre undersøkelser av effekten colwellicin eventuelt har på cellemembranen. Sytox green blir brukt som en indikator på om cellemembranintegriteten er ødelagt eller ikke. Tilsetning av sytox green til *S. pneumoniae* behandlet med ulike konsentrasjoner av colwellicin viste at cellemembranen ikke lenger var intakt ved konsentrasjoner av colwellicin som gav celledød. Under forsøket med sytox green ble det målt høyest fluorescens for cellene behandlet med triton X-100. Triton X-100 ødelegger cellemembranen fullstendig og ble brukt som en kontroll i forsøket. Fordi triton X-100 gav høyere fluorescensmålinger enn colwellicin, er det mulig at colwellicin ødelegger cellemembranen delvis og ikke fullstendig ved at stoffet lager permanente eller transiente hull i membranen. Det ble også gjennomført et levende/dødfarging eksperiment av *S. pneumoniae* behandlet med colwellicin, som viste at konsentrasjoner som førte til celledød gav rødfargede celler. Etter resultatet av sytox green



forsøket var dette som forventet. Eksperimentet viste at propidium iodide, som fluorescerer rødt, hadde trengt inn i cellene og bundet DNA, og at cellemembranintegriteten derfor må ha blitt ødelagt. Det ble observert grønne og noen røde celler for konsentrasjoner som gav delvis hemming. Dette stemmer med at konsentrasjoner av colwellicin som kun gir delvis hemming bare dreper en fraksjon av pneumokokkene i kulturen. Til sammen tyder karakteriseringen av colwellicin på at forbindelsen har surfaktantlignende egenskaper. Surfaktanter er amfifile molekyler som består av en hydrofil og en hydrofob del. Det er kjent at surfaktanter kan angripe cellemembraner, og at de derfor kan ha en antimikrobiell effekt (Brown & Audet, 2008).

Det er også kjent at surfaktanter danner miceller. Hvis colwellicin er en surfaktant eller et surfaktantlignende molekyl, er det derfor sannsynlig at det danner miceller. For å undersøke dette ble det gjennomført dialyse av colwellicin. Først ble colwellicin dialysert i TBS buffer, og deretter i 70% metanol. Dialysen ble gjort med en semipermeabel membran med en «cut-off»-verdi på 100 kDa. Det har blitt vist at tilsetning av en høy nok prosent av alkohol til en vannfase med miceller kan føre til oppløsning av micellene. Grunnen til dette er at dannelsen av miceller i en vannfase er avhengig av hydrofobe interaksjoner (Khaledi, 1997). Tanken var derfor at 70% metanol ville løse opp micellene, som muligens var så store at de ble holdt igjen av membranen. Dette ble testet ved å ta ut prøver og deretter teste prøvene for antimikrobiell aktivitet. Prøven tatt etter dialyse i TBS buffer hadde beholdt den antimikrobielle aktiviteten, noe som betyr at colwellicin ikke hadde diffundert ut gjennom membranen. Prøven som ble tatt etter dialyse i 70% metanol hadde derimot ikke antimikrobiell aktivitet, noe som tyder på at colwellicin hadde diffundert ut av membranen. Dette kan derfor tolkes som at metanolen løste opp micellene og at colwellicin diffunderte ut i dialysebufferen. Dannelse av miceller kan også forklare resultatet av filtreringen som ble gjort under undersøkelsen av colwellicins omtrentlige molekylvekt. Prøven som hadde beholdt den antimikrobielle aktiviteten var prøven som hadde blitt holdt igjen av filteret med en «cut-off»-verdi på ca. 3000 Da. Det er sannsynlig at colwellicin ikke passerte igjennom filteret på grunn av micelledannelse. Den mulige micelledannelsen gjorde det derfor vanskelig å si noe om colwellicins omtrentlig molekylvekt fordi det er mulig at monomerene fra de oppløste micellene ville passert igjennom filteret.

Colwellicin har hemolytisk aktivitet, noe som ble vist etter tilsetning av colwellicin på blodagarplater og etter behandling av blodceller med ulike konsentrasjoner av stoffet. Forskjellen mellom colwellicinkonsentrasjonen som fører til hemolyse og RMIC er liten, og colwellicin vil derfor være et dårlig valg til innvortes behandling av infeksjoner. Det er imidlertid mulig å tenke seg andre mulige applikasjoner for det relativt bredspektrede stoffet. Det kan for eksempel kanskje benyttes til behandling av utvortes infeksjoner eller til å hindre biofilmdannelse av Gram-positive bakterier. Det er kjent fra før at surfaktanter kan føre til hemolyse via økning av membranløseligheten eller via osmotisk lysering (Manaargadoo-Catin et al., 2016). Den hemolytiske aktiviteten til colwellicin tyder derfor på, i likhet med de andre resultatene, at colwellicin angriper cellemembraner.

#### **4.4 Seleksjon av mutanter med økt resistens mot colwellicin**

Det ble selektert for mutanter med økt resistens mot colwellicin gjennom å dyrke *S. pneumoniae* RH14 med colwellicinkonsentrasjoner som var i nærheten av RMIC. Dette resulterte i tre isolater med en RMIC som var litt høyere enn for kontrollstammen *S. pneumoniae* RH14, og gDNA ble isolert og sekvensert for disse isolatene. Etter sekvensering ble det funnet mutasjoner i tre gener som har blitt assosiert med resistensutvikling mot andre antibiotika. Et av disse genene var *ppnK*. Det har blitt vist at en A til G substitusjon mutasjon i overlappet mellom *tlyA* og *ppnK* genene gav økt capreomycinresistens hos *M. smegmatis*. Mutasjonen førte til at stoppkodonet til *tlyA* ble forandret til et Trp-kodon, noe som gjorde at TlyA ikke ble funksjonelt fordi det blir translatert forbi stopp-kodonet (Du et al., 2014). Det er kjent fra før at *tlyA* er involvert i capreomycinresistens (Johansen, Maus, Plikaytis, & Douthwaite, 2006). I tillegg kan en aminosyreforandring i begynnelsen av PpnK gi økt produksjon av dette proteinet. Det har blitt vist ved overuttrykk av et rekombinant *ppnK* gen at dette kan gi en liten økning i capreomycinresistens for *E. coli* og *M. smegmatis* (Du et al., 2014). Mutasjonen i overlappet mellom *tlyA* og *ppnK* har antageligvis en effekt på begge genene, som samlet gir økt resistens mot capreomycin. Det er imidlertid lite sannsynlig at mutasjonen som ble identifisert i *ppnK* genet hos isolatene som var selektert for å tåle høyere konsentrasjoner av colwellicin fører til økt produksjon av eller høyere aktivitet til genproduktet, men det gjenstår å bekrefte eller avkrefte dette. Capreomycin er et antibiotikum som brukes i kombinasjon med andre antibiotika for behandling av tuberkulose. Den eksakte virkningsmekanismen til capreomycin er ikke kjent, men det har blitt foreslått at capreomycin inhiberer proteinsyntese via binding til 70S ribosomet (Lin et al., 2014). Etter forsøkene med

sytox green og levende/død farging virket derimot cellemembranen, og ikke proteinsyntesen, som det mest sannsynlige angrepsmålet for colwellicin. PpnK syntetiserer NADPH fra NAD, og er et viktig enzym i anabolismen.. Det er derfor usannsynlig at mutasjonen i *ppnK* skulle være direkte involvert i resistens mot colwellicin, og mutasjonen er antageligvis heller et resultat av stresset RH14 ble utsatt for under dyrking med det antimikrobielle stoffet.

Mutasjoner i *pspC* har blitt assosiert med resistens mot cefuroksim, makrolider og trimetoprim-sulfametoxazol i *S. pneumoniae* etter helgenomresekvensering av isolater med ulike resistensprofiler (Pan et al., 2018). Antibiotikaene har ulike virkningsmekanismer, der cefuroksim inhiberer celleveggsyntese, makrolider inhiberer proteinsyntese og trimetoprim-sulfametoxazol er involvert i inhibering av viktige enzymprosesser i folatsyntesen (Gold & Rodriguez, 1983; Kwon, 2017; Smilack, 1999). Assosiasjonen er basert på analyser med sekvensdata og det er derfor usikkerhet hvor stor påvirkning *pspC* har *in vivo* for antibiotikaresistens. Det vil derfor være nødvendig med mer forskning for å bekrefte eller avkrefte assosiasjonen. Genet *pspC* koder for et adhesin som er forankret til celleveggen via et kolinbindende domene. PspC er en virulensfaktor som binder til den sekretoriske delen av immunoglobulin A (IgA), til komplement komponent C3 og til komplementfaktor H (Georgieva, Kagedan, Lu, Thompson, & Lipsitch, 2018). Det er liten sjanse for at det skal ha en effekt mot colwellicin, som antageligvis angriper cellemembranen. Det er allikevel mulig å tenke seg at PspC kan binde opp colwellicin, og dermed minske mengden av stoffet som når fram til cellemembranen. Mutasjonen førte derimot til et trunkert protein, og derfor er mutasjonen antageligvis et resultat av det ekstreme stresset colwellicin utsatte RH14 cellene for.

Genet *crcB* er involvert i resistens mot kamfer. Kamfer har antimikrobiell aktivitet gjennom dekondensering av kromosomer. Overproduksjon av *crcB* sammen med 2 andre gener, *crcA* og *cspE*, fører til rekondensering av kromosomene og motvirker effekten av kamfer (Hu et al., 1996). Det virker usannsynlig at substitusjonsmutasjonen i *crcB* førte til overproduksjon av genet. I tillegg har det blitt vist med sytox green og levende/død farging av colwellicin mest sannsynlig påvirker cellemembranen og derfor ikke kromosomene. Genet *crcB* er også forbundet med resistens mot fluor i orale streptokokker og i *E. coli*. Det er kjent at fluor forstyrrer metabolske prosesser i mange organismer og at det ved høye nok konsentrasjoner

har en baktericid effekt (Men et al., 2016). CrcB har blitt predikert til å være et membranprotein som tilhører en superfamilie med hovedsakelig transportproteiner, og i *E. coli* ble CrcB proteinet karakterisert som en F<sup>-</sup>-effluks kanal (Baker et al., 2012). I streptokokker har det blitt forslått at proteinet har en lignende rolle og fungerer som en kanal for negativt ladde molekyler (Men et al., 2016). Det er mulig at colwellicin er en negativt ladd surfaktant som kan hindres i å trenge inn i membranen av CrcB, men dette virker usannsynlig. Mutasjonen i *crcB* førte til en endring fra valin til glysin i genproduktet. Begge aminosyrene er upolare og omtrentlig like store, og vil antageligvis ikke gi et mer aktivitet protein som har en effekt mot colwellicin. I tillegg vil en slik resistensmekanisme sannsynligvis betydd at colwellicin transporteres inn i cellen før cellemembranen ødelegges, noe som virker usannsynlig. Det er også tenkelig at CrcB proteinet virker som en reseptor for colwellicin som hjelper antibiotikumet med å trenge inn i og ødelegge cellemembranen. I så fall ville det bety at endringen fra valin til glysin forringet reseptorfunksjonen til CrcB slik at effekten av colwellicin blir litt dårligere. Denne teorien kan testes ved at *crcB* genet, som ikke er essensielt, deleteres i *S. pneumoniae*.

Total sett er det mest sannsynlig at mutasjonene i *ppnK*, *pspC* og *crcB* ikke er direkte koblet til colwellicin sin virkningsmekanisme, men at mutasjonene heller er et indirekte resultat av stresset det antimikrobielle stoffet utsatte cellene for. Genene var forbundet med utvikling av resistens mot antibiotika med ulike angrepspunkt, noe som også tyder på at cellene ble påvirket av stresset og at de ikke utviklet resistens mot colwellicin. For å si med større sikkerhet om genene er koblet til resistensutvikling eller ikke må det utføres mer eksperimentelt arbeid. Det ble det ikke tid til i denne oppgaven. I fremtidige studier kan man for eksempel deletere eller senke ekspresjonen av de tre genene, og undersøke om dette har en effekt på resistensen mot colwellicin.

Under bestemmelsen av RMIC, og generelt ved tilsetning av ulike fortyninger av colwellicin til flytende kulturer, ble det klart at et at det var et ekstremt smalt vindu mellom 100% hemming og 0% hemming. Dette gjør at det ikke kan utelukkes at MIC-verdien mellom mutanter og kontroll RH14 faktisk var lik. I tillegg var variantfrekvensen på omtrent 30% for mutantene, noe som ble tolket som at en signifikant andel av cellene hadde mutasjonen, men at kulturen mest sannsynlig var blandet. Det er mulig at enkeltkoloniene som ble plukket ikke

var helt renstrøket, og at det derfor ble dratt med spor av umutert RH14 som vokste bedre enn isolatene og derfor utgjorde en stor andel av kulturen. Dette må imidlertid ha skjedd med alle isolatene, og derfor er det smale vinduet mellom 100% og 0% hemming en mer sannsynlig grunn.. Videre arbeid med colwellicin kunne derfor repetert dette forsøket, men med en 1,5-folds eller 1,25-folds fortynningsrekke av colwellicin. Dette ville forhåpentligvis gjøre det enklere å treffe vinduet som gav delvis hemming, og i større grad lagt til rette for resistensutvikling.

Det er mulig å selektere for mutanter ved å introdusere tilfeldige mutasjoner i *S. colwelliana* med transposoner. En metode for å slå ut gener med transposoner har allerede blitt utviklet for *Shewanella oneidensis* (Baym, Shaket, Anzai, Adesina, & Barstow, 2016). Metoden er basert på at transposoner kan slå ut enkeltgener og at genene deretter kan kobles til funksjon. Det er mulig at det samme systemet kan introduseres i *S. colwelliana*, og at det deretter er mulig å finne isolater som har en redusert produksjon av colwellicin. Dette kan muligens belyse hvilke gener som er involvert i colwellicinproduksjonen, og dermed også gi informasjon om hva slags stoff colwellicin er.

#### **4.5 Massen til colwellicin**

Massespektrometri med matrisene DHB og HCCA gav to massespektre som viste to ulike topper. DHB gav en stor topp på  $m/z$  1100,560, mens HCCA gav en stor topp på  $m/z$  1138,504. I tillegg viste spektrene flere mindre topper, noe som tyder på at colwellicinprøven inneholdt forurensinger. Det ble også gjennomført en LIFT-analyse for å undersøke om  $m/z$  1100,560 og  $m/z$  1138,504 representerer ulike addukter av samme molekyl. Resultatet av LIFT-analysen viste at  $m/z$  1100,560 og  $m/z$  1138,504 mest sannsynlig ikke er addukter, og at  $m/z$  1100,560 kan være et mulig peptid som inneholder aminosyresekvensen DNFPYV. Etter behandling med flere proteaser og andre reagenser som kunne hatt en effekt på peptider, ble det konkludert med at colwellicin antageligvis ikke er et peptid eller har en peptiddel. Derfor vil  $m/z$  1138,505 være en mer sannsynlig masse enn  $m/z$  1100,560. Etter at et hydrogenatom har blitt trukket fra er derfor 1137,504 Da kanskje den mest sannsynlige massen til colwellicin. Det kan imidlertid ikke utelukkes helt at 1100,560 Da er massen til det antimikrobielle stoffet, siden det ikke er sikkert at stoffet med denne massen virkelig er et peptid. En tredje mulighet er at en av de mindre toppene representerer massen til colwellicin. I

tillegg er det mulig at colwellicin er heterogent, og at en variasjon i for eksempel lengden eller sammensetningen av hydrokarbonkjeden, gir opphav til flere mulige masser. Bacitracin er et eksempel på et heterogent antibiotikum, og referer til en blanding av flere nesten like polypeptider. En aminosyre kan være den eneste forskjellen mellom noen av polypeptidene (Bell, 1991). Det er også mulig at colwellicin ikke ble ionisert med hverken DHB eller HCCA, og at toppene representerte ulike forurensinger som dominerte i prøven. Det er derfor nødvendig med en renere prøve for å oppnå en sikker massebestemmelse av colwellicin.

#### 4.6 Rensing av colwellicin

Da colwellicin ble anrikt ved amberlite-rensing, ble det antimikrobielle stoffet eluert mest effektivt med 100% metanol. Det tyder på at stoffet er hydrofobt. Etter butanolekstraksjon, ble colwellicin funnet igjen i butanolfasen, men ikke i vannfasen eller interfasen. Dette tyder også på colwellicin er hydrofobt. Derfor ble det brukt hydrofobe stasjonærfaser under rensing av colwellicin i flere av de kromatografiske metodene. Dette inkluderte revers fase HPLC, men etter flere forsøk med denne metoden ble det ikke funnet rensede fraksjoner med aktivitet mot *S. pneumoniae*. Alle fraksjonene etter HPLC ble vakuamtørket og løst opp i 20-25 µl dH<sub>2</sub>O, og det er derfor usannsynlig at konsentrasjonen av colwellicin var for lav til å ha en effekt mot indikatorbakterien. Det er mulig at colwellicin er så ekstremt hydrofobt at stoffet ikke blir eluert selv ved bruk av metanol og acetonitril. Derfor ble C18 kolonnen vasket med DMSO og prøvene fra vaskingen ble testet for aktivitet, men prøvene inhiberte ikke vekst av *S. pneumoniae*. En annen mulighet kan derfor være at colwellicin danner aggregater som ikke binder til kolonnen. Hvis colwellicin er en surfaktant eller et surfaktantlignende molekyl, kan disse aggregatene være miceller. I en vannfase vil surfaktantmonomerene vende den hydrofile delen mot vannet. Dette skaper et hydrofilt ytterlag som kanskje ikke binder til den hydrofobe stasjonærfasen. Det er derfor mulig at colwellicin gikk rett i «flow through» og ikke ble samlet opp i en av fraksjonene. Ved å slå sammen HPLC-fraksjonene ble det også testet om colwellicin egentlig er flere stoffer som fungerer sammen, og at de derfor ble eluert ved ulike prosenter av elueringsløsningen. Dette resulterte ikke i aktivitet, men fordi det er usikkert om colwellicin var i fraksjonene etter HPLC kan det ikke utelukkes at stoffet er heterogent.

Det ble heller ikke funnet aktivitet i fraksjonene etter rensing med RPC og HIC, kromatografiteknikker som også benytter hydrofobe stasjonærfaser. Årsakene til dette er

usikre, men kan være de samme som ble diskutert for revers fase HPLC. Da HIC ble gjennomført, ble «flow through» tatt vare på, vakuumentørket, løst opp i 50 µl dH<sub>2</sub>O og testet for aktivitet. Etter tilsetning av 3 µl «flow through» på et *S. pneumoniae* overlay assay, ble indikatorbakterien ikke inhibert. Det er derfor mulig at colwellicin binder veldig sterkt til kolonnen, men dette er kun spekulasjon.

Ionebytterkromatografi ble gjort med en negativt ladd kolonne (Mono S), og ingen av fraksjonene inhiberte vekst av *S. pneumoniae*. Det var derfor mulig at colwellicin kunne være et negativt ladd eller uladet molekyl, og at stoffet derfor endte opp i «flow through». Etter testing av «flow through» fra ionebytterkromatografi ble det imidlertid ikke funnet aktivitet. Det er mulig at en eventuell micelledannelse skaper et ytre hydrofilt lag som kan være positivt ladd, og colwellicin derfor interagerer med kolonnen. Hvis colwellicin i tillegg er heterogent, kan det hende at colwellicin ble eluert i ulike fraksjoner. Fraksjonene fra ionebytterkromatografi ble ikke slått sammen og testet for aktivitet, og dette er derfor uvisst. Det er også begrenset i hvor stor grad det går an å oppkonsentrere fraksjonene fra ionebytterkromatografi på grunn av den etter hvert høye konsentrasjonen av Na<sup>+</sup>. Det er derfor mulig at mengden colwellicin som ble brukt i overlay assayet var for lav til å inhibere veksten av *S. pneumoniae*.

Det ble funnet aktivitet i prøvene etter fast-fase ekstraksjon med Oasis kolonnen. Både Oasis kolonnen og Amberlite XAD1180N har en matris bestående av en bestemt ratio mellom uladete og polare monomerer. Hvis colwellicin er en surfaktant eller et surfaktantlignende molekyl, vil det ha en amfifil oppbygning. Det er derfor mulig at det antimikrobielle stoffet bindes bedre med en bestemt blanding av uladete og polare monomerer. Etter butanolekstraksjon ble det ikke funnet aktivitet i vannfasen eller i interfasen, men bare i butanolfasen. Dette tyder på at colwellicin ikke er et sterkt ladet molekyl fordi da ville colwellicin antageligvis havnet i interfasen eller i vannfasen. Colwellicin kan derimot godt være et amfifilt molekyl med en polar og en hydrofob ende. Butanol er en alkohol og amfifile molekyler kan derfor være godt løselige i butanol.

Etter gelfiltrering av colwellicin med TBS buffer ble det funnet aktivitet i «flow through». Dette var et overraskende resultat fordi det kunne tyde på at colwellicin er veldig stort, og kanskje større enn 50-70 kDa som er den øvre eksklusjonsgrensen for kolonnen som ble brukt. Dette resultatet kan derimot forklares hvis det stemmer at colwellicin danner miceller. Micellene kunne i så fall være så store at de passerte utenom porene i gelfiltreringsmatriksen og gikk rett i «flow through». At colwellicin danner store miceller i vandig løsning stemmer også godt overens med resultatene fra dialyseforsøkene. Det ble funnet aktivitet etter gelfiltrering med 20% metanol i TBS buffer og med 70% metanol i dH<sub>2</sub>O. Tre µl av fraksjonene fra de to gelfiltreringsforsøkene ble testet med et *S. pneumoniae* overlay assay. Nesten alle fraksjonen etter gelfiltrering med 20% metanol hadde aktivitet, men bare fraksjonene fra første halvdel av gelfiltrering med 70% metanol inhiberte *S. pneumoniae*. Dette er et overaskende resultat fordi det er motsatt av hva som var forventet. Det var forventet at 70% metanol ville løse opp eventuelle miceller i større grad enn ved bruk av 20% metanol. Under gelfiltrering passerer de største molekylene gjennom kolonnen først, og derfor var det forventet at fraksjonene fra den siste halvdel av gelfiltreringen med 70% metanol inhiberte *S. pneumoniae*. Det gjaldt derimot bare for gelfiltrering med 20%, noe som tydet på at eventuelle micelledeler hadde en mindre diameter enn ved gelfiltrering med 70% metanol. En mulig forklaring på at gelfiltrering med 20 % metanol gav aktivitet i nesten alle fraksjoner er at colwellicin er heterogent. Massespektrene fra massespektrometri viste ulike topper, og det er mulig at flere av de små toppene representerte massen til ulike varianter av colwellicin. De to store toppene som ble funnet ved DHB og HCCA kan være varianter av colwellicin som dominerte i prøven. Totalt sett gav gelfiltreringen og dialysen ingen klar indikasjon på massen til colwellicin, men resultatene fra begge tyder sterkt på at colwellicin danner miceller i vandig løsning.

Det virker som at aggregatene/micellene colwellicin danner blir løst opp ved 20% metanol, og det kunne derfor vært interessant å gjennomføre HPLC med en colwellicinprøve som innholdet 20% metanol. Det er mulig at micelledannelsen hindrer colwellicin i å interagere med HPLC-kolonnen. Etter tilsetning av 20% metanol kan derfor micellene i prøven ha blitt helt eller delvis oppløst, noe som kan føre til at colwellicin lettere interagerer med kolonnen. Deretter kan det være mulig å eluere colwellicin med en økende metanolgradient.



## 5. Konklusjon

I denne oppgaven ble to marine bakterier som produserte antimikrobielle stoffer isolert fra vannprøver og identifisert som *E. oxidotolerans* og *S. colwelliana*. Begge bakteriene inhiberte vekst av *S. pneumoniae*, et opportunistisk patogen som har utviklet resistens mot flere antibiotika. Dette er derfor et lovende resultat som viser at marine bakterier kan være en kilde til nye og effektive antibiotika. Et av stoffene, colwellicin, viste bredspektret aktivitet mot Gram-positive bakterier, men hadde også hemolytisk aktivitet. Dette begrenser dessverre en eventuell klinisk bruk av colwellicin. Den eksakte virkningsmekanismen til colwellicin er ukjent, men resultatene i denne oppgaven tyder på at det antimikrobielle stoffet angriper integriteten til selve cellemembranen eller essensielle prosesser som foregår i cellemembranen. Det ble funnet sterke indikasjoner på at colwellicin er en surfaktant eller et surfaktantlignende molekyl, noe som er i overensstemmelse med den foreslåtte virkningsmekanismen. For å komme videre med karakteriseringen av colwellicin må det utvikles en bedre renseprotokoll. Hvis en lykkes med dette vil en kunne slå fast om stoffet er homogent, heterogent eller består av flere komponenter som virker sammen. Colwellicin synes å være veldig potent mot Gram-positive bakterier, så det kan være verdt å forske videre på virkningsmekanismen og egenskapene til dette stoffet.

## Referanser

- Ahmed, S. A., Bariş, E., Go, D. S., Lofgren, H., Osorio-Rodarte, I., & Thierfelder, K. (2017). *Assessing the global economic and poverty effects of antimicrobial resistance: The World Bank.*
- Alcantara, R. B., Preheim, L. C., & Gentry-Nielsen, M. J. (2001). Pneumolysin-Induced Complement Depletion during Experimental Pneumococcal Bacteremia. *Infection and immunity*, 69(6), 3569. doi:10.1128/IAI.69.6.3569-3575.2001
- Aliabadi, M. A., Ghasemi, M. F., & Isazadeh, K. (2014). Antimicrobial activity bioactive compounds produced by *Exiguobacterium acetylicum* PTCC1756 against pathogenic bacteria. *Sci J Microbiol*, 3, 55-62.
- Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J., & Schwager, C. (1986). A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 13(6), 315-323.
- Arabnejad, M., Dawkins, B. A., Bush, W. S., White, B. C., Harkness, A. R., & McKinney, B. A. (2018). Transition-transversion encoding and genetic relationship metric in ReliefF feature selection improves pathway enrichment in GWAS. *BioData mining*, 11, 23-23. doi:10.1186/s13040-018-0186-4
- Baker, J. L., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Roth, A., Stockbridge, R. B., & Breaker, R. R. (2012). Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6065), 233-235. doi:10.1126/science.1215063
- Balakin, K. V., Ivanenkov, Y. A., Skorenko, A. V., Nikolsky, Y. V., Savchuk, N. P., & Ivashchenko, A. A. (2004). In silico estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening. *Journal of biomolecular screening*, 9(1), 22-31.
- Baym, M., Shaket, L., Anzai, I. A., Adesina, O., & Barstow, B. (2016). Rapid construction of a whole-genome transposon insertion collection for *Shewanella oneidensis* by Knockout Sudoku. *Nature communications*, 7(1), 13270. doi:10.1038/ncomms13270
- Bell, R. G. (1991). Separation and isolation of the isomers of bacitracin by high-performance liquid chromatography and their relationship to microbial activity. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 9(10-12), 843-847.
- BioLabs. (2020). PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Retrieved from <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530>
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.
- Bouffieux, O., Berquand, A., Eeman, M., Paquot, M., Dufrêne, Y. F., Brasseur, R., & Deleu, M. (2007). Molecular organization of surfactin–phospholipid monolayers: Effect of phospholipid chain length and polar head. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(7), 1758-1768. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.04.015>
- Brown, R. B., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5 Suppl 2(Suppl 2), S131-S138. doi:10.1098/rsif.2008.0009.focus
- Bush, K., Courvalin, P., Dantas, G., Davies, J., Eisenstein, B., Huovinen, P., . . . Zgurskaya, H. I. (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 9(12), 894-896. doi:10.1038/nrmicro2693

- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., . . . Cecchini, M. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56-66.
- Castro-Severyn, J., Remonsellez, F., Valenzuela, S. L., Salinas, C., Fortt, J., Aguilar, P., . . . Saavedra, C. P. (2017). Comparative Genomics Analysis of a New Exiguobacterium Strain from Salar de Huasco Reveals a Repertoire of Stress-Related Genes and Arsenic Resistance. *Frontiers in microbiology*, 8, 456-456. doi:10.3389/fmicb.2017.00456
- Chen, W.-C., Juang, R.-S., & Wei, Y.-H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158-169.
- Cherazard, R., Epstein, M., Doan, T.-L., Salim, T., Bharti, S., & Smith, M. A. (2017). Antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, mechanisms, and clinical implications. *American journal of therapeutics*, 24(3), e361-e369.
- Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3(4), 480-482.
- Collins, M., Lund, B., Farrow, J., & Schleifer, K. (1983). Chemotaxonomic Study of an Alkalophilic Bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology*, 129(7), 2037-2042.
- Conly, J., & Johnston, B. (2005). Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 16(3), 159-160. doi:10.1155/2005/892058
- Cowan, S., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R., . . . Rosenbusch, J. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*, 358(6389), 727-733.
- Coyne, V., Pillidge, C., Sledjeski, D., Hori, H., Ortiz-Conde, B., Muir, D., . . . Colwell, R. (1989). Reclassification of *Alteromonas colwelliana* to the genus *Shewanella* by DNA-DNA hybridization, serology and 5S ribosomal RNA sequence data. *Systematic and applied microbiology*, 12(3), 275-279.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., . . . Debruyne, R. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and drug resistance*, 12, 3903-3910. doi:10.2147/IDR.S234610
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25(1), 165-186.
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*: John Wiley & Sons.
- Dowling, A., O'Dwyer, J., & Adley, C. (2017). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Formatex Research Center: Badajoz, Spain*, 536-545.

- Du, Q., Long, Q., Mao, J., Fu, T., Duan, X., & Xie, J. (2014). Characterization of a novel mutation in the overlap of tlyA and ppnK involved in capreomycin resistance in Mycobacterium. *IUBMB life*, 66(6), 405-414.
- Dusane, D. H., Pawar, V. S., Nancharaiah, Y., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. S. (2011). Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. *Biofouling*, 27(6), 645-654.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., & Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album limber*. *European Journal of Biochemistry*, 47(1), 91-97.
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(5), 980-987.
- Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, 4(2016), 90-101.
- Fausnaugh, J., Kennedy, L., & Regnier, F. (1984). Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. *Journal of chromatography A*, 317, 141-155.
- Folkehelseinstituttet, r. F. E., Rønning K, Steens A, Aaberge I, Vestrheim DF, Bergsaker MR, et al. (2015). *Rapport 2015:7 Anbefalinger for bruk av pneumokokkvaksine utenfor barnevaksinasjonsprogram i Norge*. Retrieved from
- Forrest, G. N., & Tamura, K. (2010). Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 14-34. doi:10.1128/CMR.00034-09
- Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, J. Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., . . . Nahm, M. H. (2015). Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 871-899. doi:10.1128/CMR.00024-15
- Georgieva, M., Kagedan, L., Lu, Y.-J., Thompson, C. M., & Lipsitch, M. (2018). Antigenic variation in *Streptococcus pneumoniae* PspC promotes immune escape in the presence of variant-specific immunity. *MBio*, 9(2), e00264-00218.
- Geudens, N., Nasir, M. N., Crowet, J.-M., Raaijmakers, J. M., Fehér, K., Coenye, T., . . . Deleu, M. (2017). Membrane interactions of natural cyclic lipodepsipeptides of the viscosin group. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859(3), 331-339.
- Giguère, S., Prescott, J. F., & Dowling, P. M. (2013). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*: John Wiley & Sons.
- Gold, B., & Rodriguez, W. J. (1983). Cefuroxime: mechanisms of action, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical applications, adverse reactions and therapeutic indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 3(2), 82-100.
- Gong, A.-D., Li, H.-P., Shen, L., Zhang, J.-B., Wu, A.-B., He, W.-J., . . . Liao, Y.-C. (2015). The *Shewanella* algae strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against *Aspergillus* pathogens and aflatoxins. *Frontiers in microbiology*, 6, 1091.
- Grein, F., Müller, A., Scherer, K. M., Liu, X., Ludwig, K. C., Klöckner, A., . . . Schneider, T. (2020). Ca<sup>2+</sup>-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. *Nature communications*, 11(1), 1-11.

- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(4), a025387.
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Biosurfactants Produced by Marine Microorganisms with Therapeutic Applications. *Marine drugs*, 14(2), 38. doi:10.3390/md14020038
- Hassanshahian, M. (2014). Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine pollution bulletin*, 86(1-2), 361-366.
- Hau, H. H., & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 237-258.
- Heerklotz, H., & Seelig, J. (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal*, 36(4-5), 305-314.
- Heidary, M., Khosravi, A. D., Khoshnood, S., Nasiri, M. J., Soleimani, S., & Goudarzi, M. (2018). Daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), 1-11.
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(7), a010215.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C., Cullum, J. A., & Oliver, S. G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 31(3), 272-277.
- Horta, A., Pinteus, S., Alves, C., Fino, N., Silva, J., Fernandez, S., . . . Pedrosa, R. (2014). Antioxidant and antimicrobial potential of the *Bifurcaria bifurcata* epiphytic bacteria. *Marine drugs*, 12(3), 1676-1689.
- Hu, K. H., Liu, E., Dean, K., Gingas, M., DeGraff, W., & Trun, N. J. (1996). Overproduction of three genes leads to camphor resistance and chromosome condensation in *Escherichia coli*. *Genetics*, 143(4), 1521-1532.
- Huang, Z., & London, E. (2016). Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chemistry and physics of lipids*, 199, 11-16. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.03.002
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J. M., Bax, K., & Brown, J. S. (2010). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and immunity*, 78(2), 704-715.
- Håvarstein, L. S., Gaustad, P., Nes, I. F., & Morrison, D. A. (1996). Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Molecular microbiology*, 21(4), 863-869.
- Johansen, S. K., Maus, C. E., Plikaytis, B. B., & Douthwaite, S. (2006). Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular cell*, 23(2), 173-182.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., & Håvarstein, L. S. (2005). Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *Journal of bacteriology*, 187(13), 4338-4345.
- Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Miura, H., & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 45(2), 406-408.

- Khaledi, M. G. (1997). Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. *Journal of chromatography A*, 780(1-2), 3-40.
- Kwon, J. H. (2017). Macrolides, ketolides, lincosamides and streptogramins. In *Infectious Diseases* (pp. 1217-1229. e1211): Elsevier.
- Laurent, T. C., & Killander, J. (1964). A theory of gel filtration and its experimental verification. *Journal of chromatography A*, 14, 317-330.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(62), e3923.
- Leonard, A., & Lalk, M. (2018). Infection and metabolism—*Streptococcus pneumoniae* metabolism facing the host environment. *Cytokine*, 112, 75-86.
- Li, T., Jian, Q., Chen, F., Wang, Y., Gong, L., Duan, X., . . . Jiang, Y. (2016). Influence of Butylated Hydroxyanisole on the Growth, Hyphal Morphology, and the Biosynthesis of Fumonisin in *Fusarium proliferatum*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1038-1038. doi:10.3389/fmicb.2016.01038
- Lin, Y., Li, Y., Zhu, N., Han, Y., Jiang, W., Wang, Y., . . . Jiang, J. (2014). The antituberculosis antibiotic capreomycin inhibits protein synthesis by disrupting interaction between ribosomal proteins L12 and L10. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2038-2044. doi:10.1128/AAC.02394-13
- López, Y., Cepas, V., & Soto, S. M. (2018). The Marine Ecosystem as a Source of Antibiotics. In *Grand Challenges in Marine Biotechnology* (pp. 3-48): Springer.
- Lucas-Elío, P., Gómez, D., Solano, F., & Sanchez-Amat, A. (2006). The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2493-2501.
- Lucas-Elio, P., Hernandez, P., Sanchez-Amat, A., & Solano, F. (2005). Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1721(1-3), 193-203.
- MACHEREY-NAGEL. (2015). Genomic DNA and RNA purification, User manual, NucleoBond® RNA/DNA, NucleoBond®CB, NucleoBond®AXG Columns. In.
- MACHEREY-NAGEL. (2017). PCR clean-up, Gel extraction User manual. In.
- Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pougna, J.-L., & Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants—a review. *Advances in colloid and interface science*, 228, 1-16.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical reviews*, 97(7), 2651-2674.
- McGee, L., & Klugman, K. P. (2017). Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 777-790): Springer.
- McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr., & Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(7), 3974-3977. doi:10.1073/pnas.77.7.3974
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., De Loubresse, N. G., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 560.

- Men, X., Shibata, Y., Takeshita, T., & Yamashita, Y. (2016). Identification of Anion Channels Responsible for Fluoride Resistance in Oral Streptococci. *PloS one*, *11*(11), e0165900-e0165900. doi:10.1371/journal.pone.0165900
- Mignard, S., & Flandrois, J.-P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of microbiological methods*, *67*(3), 574-581.
- Mirouze, N., Bergé, M. A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., . . . Polard, P. (2013). Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(11), E1035-E1044.
- Misumi, S., Tsuruta, M., Furuishi, K., & Shoji, S. (1995). Determination of N-myristoyl peptide sequence both by MALDI TOF MASS and with an N-myristoyl cleaving enzyme (polymyxin acylase). *Biochemical and biophysical research communications*, *217*(2), 632-639.
- Mitchell, A., & Mitchell, T. (2010). Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clinical microbiology and infection*, *16*(5), 411-418.
- Molnar, I., & Horváth, C. (1976). Reverse-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high-performance liquid chromatography. *Clinical chemistry*, *22*(9), 1497-1502.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Müller, A., Wenzel, M., Strahl, H., Grein, F., Saaki, T. N. V., Kohl, B., . . . Hamoen, L. W. (2016). Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(45), E7077. doi:10.1073/pnas.1611173113
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., . . . Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *32*(1), 917-919.
- Neue, U. D., & El Fallah, M. Z. (1997). *HPLC columns: theory, technology, and practice* (Vol. 415): Wiley-VcH New York.
- Normark, B. H., & Normark, S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, *252*(2), 91-106.
- Olowe, O. A., Idris, O. J., & Taiwo, S. S. (2013). Prevalence of tet genes mediating tetracycline resistance in Escherichia coli clinical isolates in Osun State, Nigeria. *European journal of microbiology & immunology*, *3*(2), 135-140. doi:10.1556/EuJMI.3.2013.2.7
- Oxoid. (2020). Atmosphere Generation System. Retrieved from [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=AN0035](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=AN0035)
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, *12*(1), 633-654. doi:10.3390/ijms12010633
- Pan, F., Zhang, H., Dong, X., Ye, W., He, P., Zhang, S., . . . Zhong, N. (2018). Comparative genomic analysis of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae isolates. *Infection and drug resistance*, *11*, 659-670. doi:10.2147/IDR.S147858

- Percival, K. M. (2017). Antibiotic Classification and Indication Review for the Infusion Nurse. *Journal of Infusion Nursing*, 40(1), 55-63.
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., . . . Tsegaye, G. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Molecular microbiology*, 51(4), 1051-1070.
- Pham, T. D. M., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. T. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 10(10), 1719-1739. doi:10.1039/c9md00120d
- Pichichero, M. E., Khan, M. N., & Xu, Q. (2016). Next generation protein based *Streptococcus pneumoniae* vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(1), 194-205. doi:10.1080/21645515.2015.1052198
- Proctor, M., & Manning, P. J. (1990). Production of immunoglobulin A protease by *Streptococcus pneumoniae* from animals. *Infection and immunity*, 58(9), 2733-2737.
- Rajam, G., Phillips, D. J., White, E., Anderton, J., Hooper, C. W., Sampson, J. S., . . . Romero-Steiner, S. (2008). A functional epitope of the pneumococcal surface adhesin A activates nasopharyngeal cells and increases bacterial internalization. *Microbial pathogenesis*, 44(3), 186-196.
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 637-639.
- Reed, R. H., & Reed, R. (2007). *Practical skills in biomolecular sciences*: Pearson education.
- Rick, W. (1974). Trypsin. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 1013-1024): Elsevier.
- Robbel, L., & Marahiel, M. A. (2010). Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 27501-27508.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401-401. doi:10.3390/ijms17030401
- Satomi, M., Vogel, B. F., Venkateswaran, K., & Gram, L. (2007). Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(2), 347-352.
- Scientific, T.-F. (2005). LIVE/DEAD® BacLight® Bacterial Viability Kits User Manual. In Selvakumar, G., Joshi, P., Nazim, S., Mishra, P. K., Kundu, S., & Gupta, H. S. (2009). *Exiguobacterium acetylicum* strain 1P (MTCC 8707) a novel bacterial antagonist from the North Western Indian Himalayas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 131-137.



- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H.-P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, *4*, 47-47. doi:10.3389/fmicb.2013.00047
- Shane, A. L. (2006). Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases, 27th Edition. *Emerging infectious diseases*, *12*(12), 2003-2004. doi:10.3201/eid1212.061045
- Shanthakumar, S., Duraisamy, P., Vishwanath, G., Selvanesan, B. C., Ramaraj, V., & David, B. V. (2015). Broad spectrum antimicrobial compounds from the bacterium *Exiguobacterium mexicanum* MSSRFS9. *Microbiological research*, *178*, 59-65.
- Sigma-Aldrich. (2020a). Amberlite® XAD1180N Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/10378?lang=en&region=NO>
- Sigma-Aldrich. (2020b). Pronase from *Streptomyces griseus* Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/pronro?lang=en&region=NO>
- Sledjeski, D., & Weiner, R. (1993). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Shewanella colwelliana* exopolysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.*, *59*(5), 1565-1572.
- Smilack, J. D. (1999). *Trimethoprim-sulfamethoxazole*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Spellerberg, B., & Brandt, C. (2015). *Streptococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition* (pp. 383-402): American Society of Microbiology.
- Strom, S. P. (2016). Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer biology & medicine*, *13*(1), 3-11. doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0004
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., & Holle, A. (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *376*(7), 952-965.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., . . . Carmeli, Y. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(3), 318-327.
- Thakur, S., Cattoni, D. I., & Nöllmann, M. (2015). The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent. *European Biophysics Journal*, *44*(5), 337-348.
- Thorell, K., Meier-Kolthoff, J. P., Sjöling, Å., & Martín-Rodríguez, A. J. (2019). Whole-genome sequencing redefines *Shewanella* taxonomy. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1861.
- Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J., Andrew, P. W., & Saibil, H. R. (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*, *121*(2), 247-256.
- Torres, A. M., Barros, G. G., Palacios, S. A., Chulze, S. N., & Battilani, P. (2014). Review on pre-and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International*, *62*, 11-19.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, *30*(9), 418-426.
- Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., & Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, *13*(3), 541-555.
- Waters. (2010). Oasis Sample Extraction Products: Chemistry & Formats. In.

- Weiner, R., Coyne, V., Brayton, P., West, P., & Raiken, S. (1988). *Alteromonas colwelliana* sp. nov., an isolate from oyster habitats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 38(3), 240-244.
- Weiser, J. N., Ferreira, D. M., & Paton, J. C. (2018). Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. *Nature reviews. Microbiology*, 16(6), 355-367. doi:10.1038/s41579-018-0001-8
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's Microbiology*.
- Wingfield, P. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science, Appendix 3*, Appendix-3F. doi:10.1002/0471140864.psa03fs13
- Winje, B. A., Berild, J. D., Vestheim, D. F., Denison, E. M.-L., Lepp, T., Roth, A., . . . Slotved, H.-C. (2019). Efficacy and effectiveness of pneumococcal vaccination in elderly—an update of the literature.
- World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*: World Health Organization.
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 57(10), 1451-1470.
- Yamamoto, S., Nakanishi, K., & Matsuno, R. (1988). *Ion-exchange chromatography of proteins*: CRC Press.
- Yumoto, I., Hishinuma-Narisawa, M., Hirota, K., Shingyo, T., Takebe, F., Nodasaka, Y., . . . Hara, I. (2004). *Exiguobacterium oxidotolerans* sp. nov., a novel alkaliphile exhibiting high catalase activity. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6), 2013-2017.
- Zhu, Z., Liu, G., Wang, F., Sasanya, J. J., & Cannavan, A. (2016). Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of 15 aminoglycoside residues in porcine tissues. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2587-2599.

## Vedlegg

### Innhold

<b>Vedlegg A- Materialer</b> .....	106
A.1 Bakterier .....	106
A.2 Kits.....	107
A.3 Enzymer, molekylvektstandarder og nukleotider .....	107
A.4 Primere.....	108
A.5 Kjemikalier .....	108
A.6 Utstyr .....	110
A.7 Næringsmedium, buffere og løsninger .....	112
A.7.1 Næringsmedium .....	112
A.7.2 Buffere og løsninger.....	117
<b>Vedlegg B- Resultater</b> .....	121
B.1. 16S rRNA sekvenseringsresultater .....	121
B.2 LIFT-analyse.....	124

## Vedlegg A- Materialer

### A.1 Bakterier

Tabell A.1. Liste over bakteriene som ble brukt i denne oppgaven med stammenummer og referanse.

Art	Stamme	Referanse
<i>Bacillus subtilis</i>	DS698	Dr. Anette Fagerlund (Nofima, Ås)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2708	Laboratorium for mikrobiell genteknologi (LMG)
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	Invitrogen
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	DS702	Stammesamling ved lab for Molekylær Mikrobiologi (MolMik)
<i>Lactococcus lactis</i>	MG1363	LMG
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	NCTC 8159	Public Health England
<i>Pseudomonas</i>	Isolat 33	MolMik
<i>Shewanella colwelliana</i>	JSF34	Denne oppgaven
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 8325	MolMik
<i>Streptococcus agalactiae</i>	NCTC 8181	MolMik
<i>Streptococcus bovis</i>	NCTC 8177	Public Health England
<i>Streptococcus criceti</i>	ATCC 19642	MolMik
<i>Streptococcus cristatus</i>	NTCT 12479 (SCr79)	MolMik
<i>Streptococcus gordonii</i>	SK6	Prof. Mogens Kilian
<i>Streptococcus infantis</i>	SK140	Prof. Mogens Kilian
<i>Streptococcus mitis</i>	SK142	Prof. Mogens Kilian
<i>Streptococcus mutans</i>	NCTC 10449 (SM49)	MolMik
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 10557	MolMik
<i>Streptococcus parasaguinis</i>	ATCC 15912	MolMik
<i>Streptococcus perori</i>	SK958	Prof. Mogens Kilian
<i>Streptococcus phocea</i>	ATCC 29128	MolMik
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RH14	Eldholm et al 2009
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	RH425	Johnsborg et al 2009
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	D39	National Collection of Type Cultures, 1948
<i>Streptococcus sanguinis</i>	SK90	Prof. Mogens Kilian
<i>Streptococcus vestibularis</i>	NCTC 12166	MolMik

## A.2 Kits

Tabell A.2. Oversikt over kits som ble brukt, samt informasjon om formål, produsent og produksjonsnummer.

Navn	Formål	Produsent	Produktnummer
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up	Rensing av DNA	Machnery-Nagel	740609.250
NucleoBond® AXG Columns and NucleoBond® Buffer Set	Isolering av genomisk DNA	Machnery-Nagel	
LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit	Levende/død farging	Thermo Fisher Scientific	

## A.3 Enzymer, molekylvektstandarder og nukleotider

Tabell A.3. Oversikt over alle enzymer, molekylvektstandarder og nukleotider som ble brukt i denne oppgaven.

Navn	Stockkonsentrasjon	Produsent	Produktnummer
1 kb DNA ladder	500 µg/ml	New England BioLabs	
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	100 mM	TaKaRa	4026/4027/2028/4029
Lysozym LytA		Isolert av Dr. Daniel Straume	
Mutanolysin	4 U/µg	Sigma-Aldrich	M9901
Phusion® High- Fidelity DNA polymerase	2 U/µL	New England BioLabs	M0530
Polymyxin acylase Pronase	1 U/ml		
Proteinase K		Bioline	BIO-37037
Trypsin	1,6 U/µg	BioChemica	93615

## A.4 Primere

Tabell A.4. Oversikt over primerene som ble brukt i denne oppgaven i retning 5'-3'.

Navn	Sekvens 5'-3'	Beskrivelse
11F	TAACACATGCAAGTCGAACG	F sekvens for 16S rRNA
5R	GGTTACCTTGTTACGACTT	R sekvens for 16S rRNA
DS676	GCITAYRTIATITAYACIWSIGG	F sekvens for degenererte nonribosomal peptide synthetases (NRPS)
DS677	CCICKIATYTTIACYTGRTCRTC	R sekvens for degenererte nonribosomal peptide synthetases (NRPS)

## A.5 Kjemikalier

Tabell A.5. Liste over alle kjemikaliene som ble brukt i denne oppgaven. I tillegg er det informasjon om kjemisk formel, produsent og produktnummer.

Kjemikalie	Kjemisk formel	Produsent	Produktnummer
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	Sigma-Aldrich	271004
Adenosin	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	A9251
Agar		Merk	1.01614.1000
Agarose		Invitrogen	15510-027
Aktivt kull	C	Merck	1.020184.1000
Albumin		Sigma-Aldrich	A7906
Amberlite XAD1180N		Sigma-Aldrich	06474-250G
Ammoniumsulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	A3678
Asparagin monohydrat	C <sub>4</sub> N <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich	A4284
Bacto™ Brain Heart Infusion		BD Diagnostic	237200
Bacto™ Todd Hewitt		BD Diagnostic	249240
Bacto™ Trypton		Thermo Fisher Scientific	
Biotin	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	Sigma-Aldrich	19606
Blodagar		OXOID	

Bromfenolblå 1%	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Sigma-Aldrich	B-5525
Butanol	$C_4H_9OH$		
Casiton			
Celite		Acros Organics	206352500
Dikaliumhydrogenfosfat	$K_2HPO_4$	Merck	1.05104.1000
Dimethyl sulfoksid (DMSO)	$(CH_3)_2SO$	Sigma Aldrich	D5879
Dinatrium hydrogenfosfat	$Na_2HPO_4$		1.06580.1000
Ditiotreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$		
Eddiksyre	$CH_3COOH$	Merck	1.00063.1011
Etanol			
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2Na_2O_9 \cdot 2H_2O$	VWR	20 296.360
Glasskuler		Sigma-Aldrich	G4649
Glassull		Merck	1.04086.0250
Gjærekstrakt		Merck	1.04086.0250
Glukose	$C_6H_{12}O_6$	VWR	10117gK
Glycerol	$C_3H_5(OH)_3$	Merck	1.04094.1000
Isoproanol			
Jern(II)sulfat heptahydrat	$FeO_4S \cdot 7H_2O$	Fluka	
Kalsiumklorid dehydrert	$CaCl_2$	Fluka	21075
Kalsium pantotenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma	C8731
Kobbersulfat-pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka	61240
Kolinklorid	$C_6H_{14}NO \cdot Cl$	Sigma-Aldrich	C1879
L- asparagin monohydrat	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	A4284
L-cystein hydroklorid monohydrat	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka	30130
L- glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	Fluka	49419
L-tryptofan	$C_{11}H_{12}NaO_2$	Fluka	93660
M17		OXOID	
Magnesiumklorid heksahydrat	$ClMg \cdot 6H_2O$	Fluka	63072
Mangan(II) klorid tetrahydrat	$MnC_{12} \cdot 4H_2O$	Riedel-de Haën	31422
Maursyre	$HCOOH$		
Metanol	$CH_3OH$	Merck	
Middlebrook 7H9		BD Diagnostic	
Mueller-Hinton		BD Diagnostic	
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	Sigma-Aldrich	S3272

Natriumhydroksid	NaOH	Merck	1.06469.1000
Natriumkarbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		
Natriumklorid	NaCl	Merck	1.06464.1000
Natrium pyruvat	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	P8574
Nikotinsyre	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Fluka	72309
PeqGREEN		Saveen Werner	PEQL37-501
Pyridoksinhydroklorid	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	Fluka	95180
Riboflavin	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich	R-7649
Saltsyre	HCl	Riedel-De Haën	30721
Saueblod		Thermo Fisher Scientific	
Sinksulfat heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Fluka	96500
Sukrose	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	BHD	102745C
SYTOX® Green		Thermo Fisher Scientific	
Tiaminhydroklorid	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS.HCl	Sigma-Aldrich	T4625
Trifluoracetic acid (TFA)	C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	302031
Triton® X-100	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> (n = 9-10)	Sigma-Aldrich	X-100
Trizma® base	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich	T1503
Urea	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O		
Uridin	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich	C9H12N2O6

## A.6 Utstyr

Tabell A.6. Oversikt over utstyret som ble brukt i denne oppgaven. I tillegg til utstyret som er nevnt i listen ble det brukt standard laboratorieutstyr.

Utstyr	Modell	Leverandør
Dialyse	Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2 Dialysis Device	Spectrumlabs
Filter	Microcon centrifugal filter unit, YM-3 membrane, MWCO 3 kDa	Sigma-Aldrich
Fast fase ekstraksjon	Oasis®HLB Extraction	Waters



---

	Cartridge, 30 µm	
FastPrep	FastPrep® 24	MP™ Biomedicals
Gel imager	GelDoc-1000	BioRad
HPLC maskin	Dionex UltiMate 3000	Thermo-Fisher Scientific
HPLC kolonner	Halo 160 Å ES-C18, 2.7 µm, 4.6 x250 mm	Advanced Materials Technology
	YMC-Triat C8/S-3µm/12nm, 4.6 x 250 mm	YMC Co., LTD
Kromatografi	ÄKTA pure	GE Healthcare Life Sciences
Kromatografikolonner	Gelfiltrering:	
	Superdex™ 75 10/300	GE Healthcare Life Sciences
	Superdex™ 30 Increase 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences
	Ionebyttekromatografi:	
	Mono S 5/50 GL	GE Healthcare Life Sciences
Massespektrometri	UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF	Daltonics
Mikroplateleser	Synergy H1 Hybrid Reader	BioTek®
Mikroskop	LSM700	Zeiss
Revers fase kromatografi	Resource RPC	GE Healthcare Life Sciences
Spektrofotometer	NanoDrop 2000	Thermo-Fisher Scientific
PCR maskin	ProFlex PCR Systems	Applied Biodynamics
Vakuumpumpe og kjølefelle	Gel pump GP100	Savant
Væskekromatografi	ÄKTAprime plus	GE Healthcare Life Sciences
Hydrofob interaksjonskromatografi	HiTrap Phenyl HP	GE Healthcare Life Sciences

---

## **A.7 Næringsmedium, buffere og løsninger**

### **A.7.1 Næringsmedium**

#### **Todd Hewitt (TH):**

##### TH flytende medium:

30 g pulver til 1 L dH<sub>2</sub>O. Blandingen ble autoklavert.

##### TH agarplater:

15 g TH pulver

7,5 g agarpulver

500 ml dH<sub>2</sub>O.

Blandingen ble autoklavert og helt ut i petriskåler. Agarplatene ble oppbevart ved 4°C.

##### TH softagar:

9 g TH pulver

2,25 g agarpulver

300 ml dH<sub>2</sub>O.

Blandingen ble autoklavert.

#### **Brain heart infusion (BHI):**

##### BHI flytende medium

37 g pulver til 1 L dH<sub>2</sub>O. Blandingen ble autoklavert.

##### BHI agarplater

18,5 g BHI pulver

7,5 g agarpulver

500 ml dH<sub>2</sub>O.

Blandingen ble autoklavert og helt ut i petriskåler. Agarplatene ble oppbevart ved 4°C.

### BHI softagar

9,25 g BHI pulver

2,25 g agarpulver

300 ml dH<sub>2</sub>O.

Blandingen ble autoklavert.

### **LB (Lysogeny broth):**

#### LB softagar

3 g bactotrypton

1,5 g gjærekstraktpulver

3 g natriumklorid

2,25g agarpulver

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

Blandingen ble autoklavert.

#### LB agarplater

2,5 g bactotrypton

1,25 g gjærekstraktpulver

2,5 g natriumklorid

3,75 g agarpulver

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

Blandingen ble autoklavert og helt ut i petriskåler. Agarplatene ble oppbevart ved 4°C.

## **GM17:**

### GM17 softagar

GM17 softagar består av M17 (oxid), 0,5% (v/v) glukose og 0,75% (w/v) agar. Blandingen ble autoklavert.

## **Middlebrook 7H9:**

### Middlebrook agarplater

1,75 g middelbrookpulver

1 ml glyserol

3,75 g agarpulver

Næringssprøyte bestående av:

- 0,2125 g natriumklorid
- 15,6 ml 8% BSA

Det ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 250 ml.

8% BSA ble tilsatt etter at blandingen hadde blitt autoklavert fordi BSA inneholder proteiner som feller ut ved høye temperaturer. Blandingen ble helt ut i petriskåler og oppbevart ved 4°C.

## **Mueller-Hinton (MH):**

### Mueller-Hinton agarplater

9,5 g Mueller-Hinton pulver ble tilsatt til 250 ml dH<sub>2</sub>O. Pulveret inneholder agar.

Blandingen ble autoklavert og helt ut i petriskåler. Agarplatene ble oppbevart ved 4°C.

## **C- medium komponenter:**

### Pre-C-medium:

22,5 mg L-cystein HCl

4 g natriumacetat

10 g casitone

12 mg L-tryptofan

17g dikaliumhydrogenfosfat

dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til et sluttvolum på 2L og 150 ml av løsningen ble fordelt på flasker. Flaskene ble autoklavert og oppbevart i romtemperatur.

### ADAMS I

150 µl biotin 0,5 mg/ml

75 mg nikotinsyre

87,5 mg pyridoksinhydroklorid (4 °C)

300 mg kalsium pantotenat (4 °C)

80 mg tiaminhydroklorid

35 mg riboflavin

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

### ADAMS II

500 mg jern(II)sulfat heptahydrat

500 mg kobbersulfat-pentahydrat

500 mg sinksulfat heptahydrat

200 mg Mangan(II) klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert HCl

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

### ADAMS III

128 ml ADAMS I

3,2 ml 10X ADAMS II

1,6 g asparagin monohydrat

160 mg kolin

0,4 g kalsiumklorid anhydrid

16 g magnesiumklorid heksahydrat

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

### Gjærekstraktløsning

40 g gjærekstrakt

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

37% HCl

16 g aktivt kull

Løsningen ble rørt i 10 minutter og inkubert i 2 timer ved 4°C. Deretter ble løsningen filtret over natt gjennom en kolonne som var pakket med glassull og celitt. Videre ble pH i løsningen justert til pH 7,8 med høymolar NaOH og endelig volum ble justert til 400 ml med dH<sub>2</sub>O. Til slutt ble løsningen sterilfiltrert og oppbevart i 4 ml alikvoter ved -80°C.

### **C-medium:**

Til 150 ml pre-C-medium tilsettes:

150 µl Mangan(II)klorid 0,4 mM

1,5 ml glukose 20%

3,75 ml ADAMS III

110 µl glutamin 3%

2,25 ml natrium pyruvat 2%

95 µl sukrose 1,5 M

1,5 ml uridin adenosin 2 mg/ml

1,5 ml albumin/BSA 8%

3,75 ml gjærekstrakt

Før bruk ble løsningen sterilfiltrert og deretter ble den oppbevart ved 4 °C. Bare dagsfersk C-medium ble brukt.

## **A.7.2 Buffere og løsninger**

### **A.7.2.1 Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese**

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

242 g Tris base

57,1 ml eddiksyre

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

dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til et sluttvolum på 1 L.

#### **6x Loading buffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

40 % sukrose

0.01% bromfenolblå

### **1 kb DNA ladder (50 mg/ml)**

50 µL 1 kb ladder (Invitrogen)

200 µL 10x loading buffer

750 µL dH<sub>2</sub>O

### **1 % agarosegel**

0,5 g agarose

50 ml TAE buffer

1 µL peqGREEN

peqGREEN ble tilsatt etter at agarosen hadde blitt løst opp i TAE bufferen.

### **A.7.2.2 Løsninger til HPLC**

#### **TFA og acetonitril:**

##### **Løsning A: 0,05 % TFA (trifluoracetic acid)**

250 µl TFA ble fortynnet i dH<sub>2</sub>O til sluttkonsentrasjon 0,05% og sluttvolum 0,5L.

##### **Løsning B: 100% acetonitril og 0,05 % TFA**

250 µl TFA ble tilsatt i 0,5L 100% acetonitril.

#### **Maursyre og metanol:**

##### **Løsning A: 0,1% maursyre**

0,5 ml maursyre ble tilsatt i 500 ml dH<sub>2</sub>O.

##### **Løsning B: 100% metanol og 0,1% maursyre**



250 µl maursyre ble tilsatt i 250 ml 100% metanol.

Løsning A: 5% metanol og 0,1% maursyre

14,5 ml 100% metanol ble tilsatt 290 ml 0,1% maursyre.

Løsning B: 100% metanol

500 ml 100% metanol ble brukt.

**Maursyre og acetonitril:**

Løsning A: 0,1% maursyre

0,5 ml maursyre ble tilsatt i 500 ml dH<sub>2</sub>O.

Løsning B: 0,1% og 100% acetonitril

0,5 ml maursyre ble tilsatt i 500 ml acetonitril.

**A.7.2.3 Buffere til gelfiltrering**

**Tris-buffered saline (TBS) buffer:**

20 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

Bufferen besto av 20 ml av 1M Tris-HCl pH 7,4 og 30 ml av en 5M NaCl-løsning. dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til sluttvolum 1 L.

**20% etanol i 100% TBS:**

100 ml av 96% etanol, 10 ml av Tris-HCl pH 7,4 og 15 ml av 5M NaCl ble tilsatt. Sluttvolum ble justert til 500 ml med dH<sub>2</sub>O.

### **70% etanol i dH<sub>2</sub>O:**

350 ml 96% etanol ble tilsatt dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 500 ml.

### **8M Urea:**

dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til 120,12 g urea til sluttvolum 250 ml. Løsningen ble satt på røring med en magnet.

#### **2.7.2.4 Buffere til ionebytterkromatografi**

##### **Buffer A: 20 mM Tris HCL pH 7,4:**

10 ml av 1M Tris-HCl pH 7,4 ble tilsatt i 490 ml dH<sub>2</sub>O.

##### **Buffer B: 20 mM Tris HCL pH 7,4 og 1M NaCl:**

5 ml av 1M Tris-HCl pH 7,4 ble tilsatt i 245 ml dH<sub>2</sub>O, samt 14,61 g NaCl.

#### **A.7.2.5 Andre buffere**

##### **1 M Tris-HCl buffere:**

Tris-HCl buffere ble lagd ved å løse 30,285 g Trisbase i 150 ml dH<sub>2</sub>O. Deretter ble pH justert med enten HCl eller NaOH til ønsket pH og dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til sluttvolum 250 ml.

##### **1 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 8,0:**

18.6 g EDTA ble løst i 100 ml dH<sub>2</sub>O, and pH ble jusert til 8,0 med NaOH.

##### **Phosphate-buffered Saline (PBS):**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Det ble tilsatt 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 144g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> og 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 400 ml dH<sub>2</sub>O. Deretter ble pH justert til 7,2 med HCl, og dH<sub>2</sub>O ble tilsatt til sluttvolum 1 L.

## **Vedlegg B- Resultater**

### **B.1. 16S rRNA sekvenseringsresultater**

Figur B.1 og B.2 viser det beste treffet for 16S rRNA sekvensene fra isolat 13 (*S. colwelliana*) og *E. oxidotolerans* etter et BLAST søk.

## Shewanella colwelliana strain CeD-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MN220615.1](#) Length: 1408 Number of Matches: 1

Range 1: 30 to 961 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1714 bits(928)	0.0	931/932(99%)	1/932(0%)	Plus/Plus
Query 6	CTTGCTAATTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGGAACTGCCAGTCG	65		
Sbjct 30	CTTGCTAATTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGGAACTGCCAGTCG	89		
Query 66	AGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAAGAGG	125		
Sbjct 90	AGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAAGAGG	149		
Query 126	GGACCTTCGGGCCTTCTGCGATTGGATGTACCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA	185		
Sbjct 150	GGACCTTCGGGCCTTCTGCGATTGGATGTACCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA	209		
Query 186	ATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC	245		
Sbjct 210	ATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC	269		
Query 246	TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA	305		
Sbjct 270	TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA	329		
Query 306	AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAG	365		
Sbjct 330	AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAG	389		
Query 366	CGAGGAGGAAAGCTTAAGCGTTAATAGCGTTTAGGTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGGA	425		
Sbjct 390	CGAGGAGGAAAGCTTAAGCGTTAATAGCGTTTAGGTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGGA	449		
Query 426	CCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGAGGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATT	485		
Sbjct 450	CCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGAGGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATT	509		
Query 486	ACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAA	545		
Sbjct 510	ACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAA	569		
Query 546	CCTGGGAACTGCATTTTGAAGTGGCAGACTAGAGTCTTGTAGA - GGGGGTAGAATTTTCAG	604		
Sbjct 570	CCTGGGAACTGCATTTTGAAGTGGCAGACTAGAGTCTTGTAGAAGGGGGTAGAATTTTCAG	629		
Query 605	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG	664		
Sbjct 630	GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG	689		
Query 665	ACAAAGACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA	724		
Sbjct 690	ACAAAGACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA	749		
Query 725	GTCCACGCCGTAACGATGTCTACTCGGAATTTGGTGTCTTGAACACTGGGTTCTCAAGC	784		
Sbjct 750	GTCCACGCCGTAACGATGTCTACTCGGAATTTGGTGTCTTGAACACTGGGTTCTCAAGC	809		
Query 785	TAACGCATTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG	844		
Sbjct 810	TAACGCATTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG	869		
Query 845	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT	904		
Sbjct 870	ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT	929		
Query 905	ACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTGCTAGA	936		
Sbjct 930	ACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTGCTAGA	961		

Figur B.1. Viser et skjermbilde av det beste nukleotid BLAST treffet som ble funnet med forward 16S rRNA sekvensen fra *S. colwelliana*. Treffet hadde 100 % identitet.

### Exiguobacterium oxidotolerans strain LPB0102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KU051408.1](#) Length: 1370 Number of Matches: 1

Range 1: 9 to 1212 [GenBank](#) [Graphics](#)

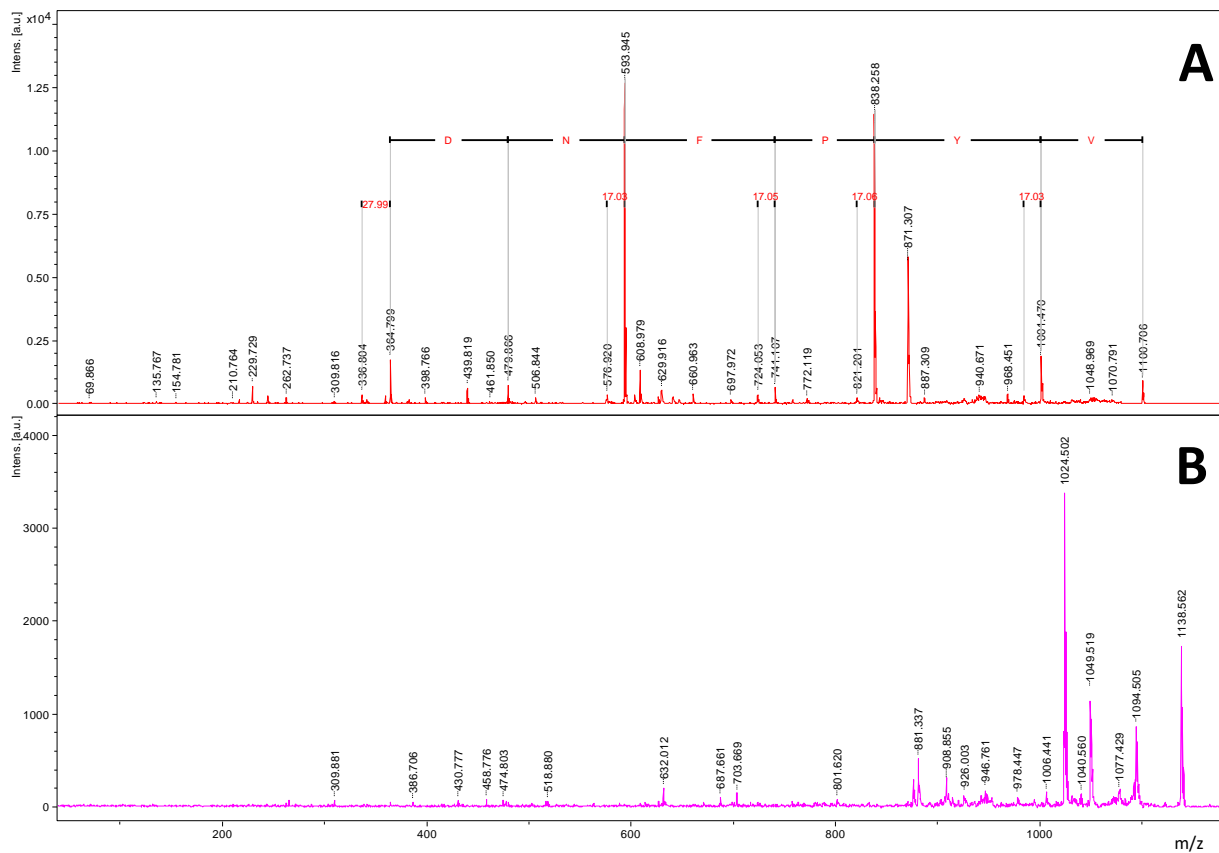
[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2206 bits(1194)	0.0	1201/1204(99%)	2/1204(0%)	Plus/Plus
Query 3	GGAA - TCTTCGGA - GGAAGCGAGTGGAAATGAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGGA	60		
Sbjct 9	GGAACTCTTCGGAGGGAAGCGAGTGGAAATGAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGGA	68		
Query 61	ACCTGCCTCAAGGATTGGGATAACTCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTCG	120		
Sbjct 69	ACCTGCCTCAAGGATTGGGATAACTCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTCG	128		
Query 121	GACCCGATGGTCCGATGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCACCTTGAGATGGCCTTGCGGTGC	180		
Sbjct 129	GACCCGATGGTCCGATGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCACCTTGAGATGGCCTTGCGGTGC	188		
Query 181	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG	240		
Sbjct 189	ATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGG	248		
Query 241	GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG	300		
Sbjct 249	GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG	308		
Query 301	AATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTC	360		
Sbjct 309	AATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTC	368		
Query 361	GGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAGATACGAGAGGTAAATGCTCGTATCCTGA	420		
Sbjct 369	GGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAGATACGAGAGGTAAATGCTCGTATCCTGA	428		
Query 421	CGGTACCTTGCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT	480		
Sbjct 429	CGGTACCTTGCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT	488		
Query 481	GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCCTTTTAAGTCTGA	540		
Sbjct 489	GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCCTTTTAAGTCTGA	548		
Query 541	TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGGCTTGAGTACAGA	600		
Sbjct 549	TGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGAAACTGGAAGGCTTGAGTACAGA	608		
Query 601	AGAGAAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG	660		
Sbjct 609	AGAGAAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG	668		
Query 661	TGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAA	720		
Sbjct 669	TGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAA	728		
Query 721	CAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGTT	780		
Sbjct 729	CAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGGGGGTT	788		
Query 781	TCCGCCCTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA	840		
Sbjct 789	TCCGCCCTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA	848		
Query 841	GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT	900		
Sbjct 849	GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT	908		
Query 901	CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTTGACCGCTTGAGAGATCAA	960		
Sbjct 909	CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTTGACCGCTTGAGAGATCAA	968		
Query 961	GTTTTCCCTTCGGGGACAAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG	1020		
Sbjct 969	GTTTTCCCTTCGGGGACAAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG	1028		
Query 1021	AGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCCAGCATTTAGT	1080		
Sbjct 1029	AGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTTGCCAGCATTTAGT	1088		
Query 1081	TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC	1140		
Sbjct 1089	TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC	1148		
Query 1141	ATCATGCCCTTATGAGTTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCG	1200		
Sbjct 1149	ATCATGCCCTTATGAGTTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCG	1208		
Query 1201	AGAC 1204			
Sbjct 1209	AGAC 1212			

Figur B.2. Viser et skjermbilde av det beste nukleotid BLAST treffet som ble funnet med forward 16S rRNA sekvensen fra *E. oxidotolerans*. Treffet hadde 99,75% identitet.

## B.2 LIFT-analyse

Det ble gjennomført en LIFT-analyse av  $m/z$  1100,560 og  $m/z$  1138,504 for å undersøke om colwellicinprøven besto av ulike addukter av samme molekyl (Figur B.3).



Figur B.3. LIFT-analyse av  $m/z$  1100,560 (A) og  $m/z$  1138,504 (B).  $m/z$  1100,560 kan være et peptid, men noe lignende ble ikke observert for  $m/z$  1138,504.



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway