



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Daniel Straume

Overuttrykk, rensing og karakterisering av fratrisinet CbpD fra *Streptococcus dysgalactiae*

Overexpression, purification and characterization of
the fratricin CbpD from *Streptococcus dysgalactiae*

Anna Teigen Schultheiss

Bioteknologi

Forord

Arbeidet i denne masteroppgaven er gjort som en del av masterstudiet i bioteknologi, retning molekylærbiologi ved Norges miljø - og biovitenskapelige universitet. Arbeidet ble utført fra august 2020 til mai 2021 hos molekylær mikrobiologisk forskningsgruppe ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Jeg vil veldig gjerne rette en stor takk til hovedveilederen min, Dr. Daniel Straume. Jeg har lært utrolig mye av deg, både på laboratoriet og under skriveprosessen. Takk for du har vært så tålmodig og tilgjengelig for meg. Det har vært et veldig kjekt og lærerikt år. Jeg vil også gjerne takke min biveileder, Dr. Morten Kjos, for oppfølging både faglig og sosialt. Takk til laboratoriegruppen som alltid besvarte spørsmål, og spesielt takk til Marita som har delt mange erfaringer og stilt opp for meg gjennom hele året. Jeg har lært mye av dere og setter pris på de gode samtalene vi har hatt, med ulik grad av seriøsitet. En takk går også til masterstudentene jeg har vært på laboratoriet med dette året. Det har vært et hyggelig år sammen med dere.

Jeg vil også rette en takk til mine gode venner som jeg har delt studietiden min med. En spesiell takk går til medstudent, Frida, som har hjulpet meg med Excel og alltid tatt seg tid til å forklare ting jeg ikke har forstått. Jeg vil også takke familien min, spesielt min mor, for alltid å ha troen på meg og for å alltid ha vært interessert i det jeg driver med. Videre går en utrolig stor takk til samboeren min, Kristine. Takk for alt du gjør for meg og for at du har vært ekstra tålmodig og snill dette året.

Anna Teigen Schultheiss

Ås, juni 2021

Sammendrag

Streptococcus pneumoniae er en viktig humanpatogen. Mye forskning er derfor blitt utført på denne og nært beslektede streptokokker, men man har ikke like mye kunnskap om de mer perifere slektningene av denne bakterien, slik som *Streptococcus dysgalactiae*. *S. dysgalactiae* koloniserer både mennesker og dyr, og den er en av de viktigste patogene bakteriene innen storfe-drift, hvor den hovedsakelig forårsaker mastitt. Mange streptokokker kan bli naturlig kompetente for genetisk transformasjon, noe som innebærer at de kan ta opp DNA fra miljøet rundt cellen og inkorporere dette i sitt eget genom. Dette er en sterk pådriver for spredning av virulens- og antibiotikaresistensgener hos streptokokker. Kompetente streptokokker uttrykker et ekstracellulært enzym, et såkalt fratrisin, som kutter i celleveggen og lyserer nært beslektede arter (fratrisid – broderdrap). Hovedhypotesen er at dette gir den kompetente cellen tilgang på homologt DNA som kan tas opp i den kompetente bakterien. *S. dysgalactiae* har genene som er nødvendig for å gå inn i en kompetent tilstand, men om *S. dysgalactiae* i det hele tatt kan, eller i hvor stor grad denne bakterien benytter seg av muligheten til å bli kompetent, er ukjent. Det at *S. dysgalactiae* relativt nylig har blitt assosiert med en rekke infeksjoner hos både dyr og mennesker, gjør at bakterien blir eksponert for antibiotika ved infeksjonsbehandling. Et spørsmål man ønsker svar på er derfor om *S. dysgalactiae* kan ta opp og spre resistensgener på lik linje som sin slektning, *S. pneumoniae*. Første skritt på veien er å undersøke evnen *S. dysgalactiae* har til å bli kompetent og om den benytter seg av fratrisidmekanismen.

I dette arbeidet har fratrisinet fra *S. dysgalactiae*, kalt CbpD^{SD}, blitt overuttrykt og rensset ved hjelp av Ni²⁺ affinitetskromatografi. Dette er første gang et fratrisin er rensset fra noen streptokokker i pyogenesgruppen. CbpD^{SD} viste seg å ha et bredt aktivitetsspekter. Behandling av bakterier med rensset CbpD^{SD} resulterte i tydelig lysis av streptokokker fra undergruppene pyogenes, mitis, mutans og noe i salivarius, men ikke i gruppene bovis og anginosus. Effekten til CbpD^{SD} er doseavhengig og at den kan lysere flere ulike streptokokkarter. Ved å fusjonere CbpD^{SD} til sfGFP (superfolder green fluorescent protein), ble fluorescensmikroskopi brukt til å vise at CbpD^{SD} spesifikt binder til delingssonen hos målcellene som var mest sensitive for CbpD^{SD}'s lytiske aktivitet. I dette arbeidet ble det vist at *S. dysgalactiae* lot seg transformere ved hjelp av elektroporering, men det lyktes derimot ikke å vise at *S. dysgalactiae* kan bli naturlig kompetent ved å tilsette syntetisk kompetanseinduser (ComS1). Til dette ble transformasjon av DNA-kassetter med

antibiotikaresistensgener benyttet, samt zymografi, for å teste om CbpD^{SD} var uttrykt i ComS1-induserte celler. Ved hjelp av HPLC ble det også forsøkt å finne ut hvor i celleveggen CbpD^{SD} kutter, men ingen kløyvningsprodukter ble detektert. I sum har dette arbeidet vist at CbpD^{SD} kan overuttrykkes i milligramsmengder, enzymet er aktivt og må binde til delingssonen til målcellene for å effektivt lysere disse. Det lyktes ikke å bevise at *S. dysgalactiae* kan bli naturlig kompetent, men transformasjon med elektroporering ble utført med hell.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen. A lot of research has therefore been done on this bacteria and closely related streptococci. There is not as much knowledge about the more peripheral relatives of this bacteria, such as *Streptococcus dysgalactiae*. *S. dysgalactiae* colonize both human and animals and is one of the most important pathogens at cattle farms, where it mainly causes mastitis. Many streptococci can become natural competent for genetic transformation, which involves taking up DNA from the environment around the cell to incorporate it into its own genome. This strongly drives the spread of virulence - and antibiotic resistance genes for streptococci. Competent streptococci express an extracellular enzyme, a so-called fratrisin, that cuts in the cell wall and lysates closely related species (fratricide – killing its brother). The main hypothesis is that this gives the competent cell access to homologous DNA that can be taken up into the competent bacteria. *S. dysgalactiae* possess the genes necessary to enter a competent state, but it is unknown if *S. dysgalactiae* can, or in which degree, it can become competent. *S. dysgalactiae* has relatively recently become associated with a number of infections, both for animals and human, which is making the bacteria exposed to antibiotics in treatment of infections. A question one wish to get answered is therefore if *S. dysgalactiae* can take up and spread resistance genes in the same degree as its relative, *S. pneumoniae*. The first step is to explore the ability *S. dysgalactiae* has to become competent and if it uses the fratricide mechanism.

In this work the fratrisin from *S. dysgalactiae*, called CbpD^{SD}, has been overexpressed using Ni²⁺ affinity chromatography. This is the first time a fratricin is purified from any streptococci in the pyogenes group. CbpD^{SD} showed a broad activity spectrum. Treatment of bacteria with purified CbpD^{SD} resulted in clear lysis of streptococci from the pyogenes, mitis, mutans, and some in the salivarius group, but none in the bovis and anginosus. The effect of CbpD^{SD} is dose dependent and can lysate many different *Streptococcus* species. By merging CbpD^{SD} to sfGFP (superfolder green fluorescent protein), a fluorescence microscope was used to show that CbpD^{SD} specifically bind to the division zone of the target cells that were most sensitive for the CbpD^{SD} lytical activity. In this work it is shown that *S. dysgalactiae* is transformable by electroporation, but failed to show that *S. dysgalactiae* can become natural competent by adding a synthetic competenceinduser (ComS1). For this work, transformation of DNA cassettes with antibiotic resistance genes was used, as well as zymography for testing if CbpD^{SD} was expressed in ComS1-induced cells. By the help of HPLC, it was attempted to

find where in the cell wall CbpD^{SD} cuts, but no cleavage products were detected. In sum, this work has showed that CbpD^{SD} can be overexpressed in milligram amounts, and that the enzyme is active and must bind to the division zone of the target cells for efficiently lysate these. It failed to show that *S. dysgalactiae* can become natural competent, but transformation by electroporation was successful.

Innholdsfortegnelse

1 Introduksjon	1
1.1 Horisontal genoverføring hos bakterier	1
1.2 Streptokokker	1
1.3 Naturlig kompetanse for genetisk transformasjon	3
1.4 Regulering av naturlig kompetanse i streptokokker	4
1.5 Opptak og homolog rekombinasjon av DNA	6
1.6 Fratrissid	8
1.6.1 Den biologiske rollen til fratrissidmekanismen	9
1.6.2 Fratrissiner hos streptokokker	9
1.6.3 Det katalytiske CHAP-domenet hos fratrissiner	11
1.6.4 Immunitet mot fratrissiner	12
1.7 Celleveggstrukturen til streptokokker	12
1.8 CbpD og LytF binder til delingssonen på målcellene	14
1.9 <i>S. dysgalactiae</i>	16
1.10 Mål for oppgaven	18
2 Materialer	19
2.1 Vekstmedier	19
2.1.1 Løsninger for tillaging av C-medium	20
2.2 Buffere	21
2.3 Kommersielle kit	22
2.4 Kjemikalier	22
2.5 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører	23
2.6 Primere	23
2.7 Bakteriestammer og plasmider	24
2.8 Antibiotika	26
2.9 Induserpeptider	26
2.10 Oppskrift SDS-page-geler	27
2.11 Utstyr	27
3 Metoder	28
3.1 Kultivering av bakterier	28
3.1.1 Dyrkningsbetingelser av streptokokker	28
3.2 Dyrkning av bakterier i mikroplateleser	28
3.3 Polymerase kjedereaksjon	28
3.3.1 Screening med RedTaq	30
3.3.2 Overlapp PCR	31
3.4 Agarose gelelektroforese	32
3.5 Isolering av plasmid	34
3.6 Restriksjonskutting og ligering	34

3.7 Transformasjon av bakterier	35
3.7.1 Transformasjon av <i>E. coli</i>	36
3.7.2 Transformasjon av <i>S. dysgalactiae</i>	36
3.8 DNA-sekvensering	38
3.9 DNA-kloning	38
3.9.1 Konstruksjon av pRSET-His-TEV-cbpD ^{SD} og pRSET-sfGFP-cbpD ^{SD}	38
3.10 Overutrykking av rekombinant CbpD ^{SD} og sfGFP-CbpD ^{SD}	40
3.10.1 Lysering av <i>E. coli</i>	40
3.10.3 Fjerning av His-tag i His-TEV-CbpD ^{SD}	41
3.11 SDS-PAGE	41
3.12 Dialyse av protein	42
3.13 Test av aktiviteten til CbpD ^{SD} mot <i>S. dysgalactiae</i> ved hjelp av Sytox Green™	42
3.15 Mikroskopi	43
3.16 Zymografi	44
3.17 Isolering av cellevegg	44
3.18 High performance liquid chromatography (HPLC)	45
4 Resultater	47
4.1 Multiplert sammenstilling av CbpD fra ulike streptokokkarter	47
4.2 Kloning av cbpD fra <i>S. dysgalactiae</i> ma201 (cbpD ^{SD})	47
4.3 Overutrykking og rensing av CbpD ^{SD}	48
4.4 Kutting av His-TEV-CbpD ^{SD} med TEV-protease	50
4.5 Vekstforsøk	51
4.6 Test av aktiviteten til CbpD	52
4.7 DTT og EDTA har ingen effekt på aktiviteten til CbpD ^{SD}	54
4.8 Test av aktiviteten til CbpD ^{SD} mot ulike arter av Streptokokker	55
4.9 CbpD ^{SD} binder til delingssonen til <i>S. dysgalactiae</i>	57
4.10 Transformasjon av <i>S. dysgalactiae</i>	59
4.11 Induseres kompetanse hos <i>S. dysgalactiae</i> ma201 med ComS1?	60
5 Diskusjon	63
5.1 Rensing av CbpD ^{SD}	63
5.2 Fjerning av His-tag	64
5.3 Påvirkes aktiviteten til CbpD ^{SD} av EDTA/DTT?	65
5.4 Transformasjon av <i>S. dysgalactiae</i>	66
5.5 Induksjon av kompetanse hos <i>S. dysgalactiae</i> ma201	67
5.6 Lytisk aktivitet av CbpD ^{SD}	67
5.7 Hvor i celleveggen binder CbpD ^{SD} ?	68
5.8 CbpD ^{SD} lyserer celler fra flere grupper av streptokokker	69
5.9 Kutting av renset cellevegg med CbpD ^{SD}	72

Referanseliste

75

Vedlegg

80

1 Introduksjon

1.1 Horisontal genoverføring hos bakterier

Mange bakterier kan anskaffe nye gener fra miljøet rundt seg ved å ta i bruk en mekanisme kalt horisontal genoverføring. Dette fenomenet kan oppstå ved én av tre ulike mekanismer; transduksjon, transformasjon eller konjugasjon (Soucy, Huang, & Gogarten, 2015).

Transduksjon krever at en bakteriofag tar DNA fra en bakterie til en annen. Transformasjon innebærer at en bakterie tar opp nakent DNA fra miljøet, mens konjugasjon krever kontakt mellom cellene og at det forekommer en direkte overføring av DNA mellom disse (O'Connell, 1984). Som en del av det bakterielle genomet, finner vi plasmider. Disse er veldig mobile og kan både bli anskaffet eller mistet gjennom horisontal genoverføring. Plasmider blir gjerne overført mellom ulike bakteriearter og de kan kode for egenskaper som ikke er vitale i de fleste miljø, slik som antibiotikaresistens eller økt mutasjonsfrekvens (Hayes, 2001).

Spredning av antibiotikaresistens er ofte relatert til horisontal genoverføring og forekommer oftest mellom nært beslektede arter (Soucy et al., 2015). En gruppe bakterier av spesiell interesse innen horisontal genoverføring er streptokokker. Hos disse bakteriene finner man gjerne en høy frekvens av både genetisk rekombinasjon og horisontal genoverføring (Choi et al., 2012).

1.2 Streptokokker

Bakterier innen slekten *Streptococcus* var en av de første mikroorganismene man oppdaget at kunne føre til smittsomme sykdommer, noe som førte til at både hygiene og sterilisering ble innført ved sykehus (Jenkinson & Lamont, 1997). Streptokokker er Gram-positive, ikke sporeformende og vokser ofte i par eller i kjeder. Streptokokker er anaerobe og mangler elektrontransportkjede, men får energi fra fermentering av sukker (Patterson, 1996).

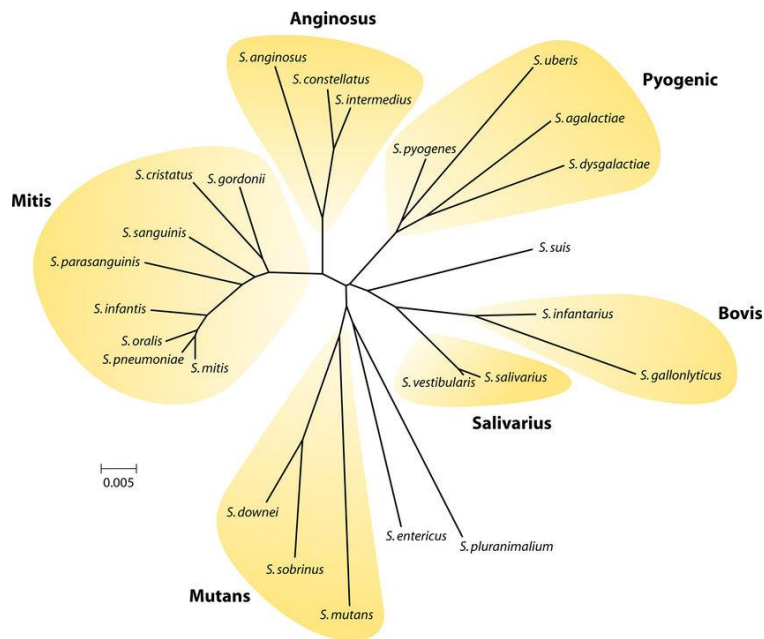
Streptokokker er ofte kommensale bakterier i bakteriefloraen hos mennesker og dyr (Patterson, 1996), men regnes samtidig som en av de mest invasive gruppene av bakterier. Det finnes mer enn 50 streptokokkarter (Yu et al., 2020) og 8 underarter, og av disse har 35 blitt identifisert som patogene for mennesker. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* og *Streptococcus mitis* er eksempler på arter som gir infeksjon i mennesker (Krzyściak, Pluskwa, Jurczak, & Kościelniak, 2013). Basert på 16sRNA

gensekvensering kan man dele streptokokker inn i 6 ulike grupper; mitis, pyogenes, bovis, salivarius, mutans og anginosus (Figur 1.1) (Nobbs, Lamont, & Jenkinson, 2009).

Ifølge World Health Organization (WHO) dør 1,2 millioner barn i alderen 0-5 år av lungebetennelse hvert år. Den vanligste årsaken til lungebetennelse er *S. pneumoniae*, som også er den streptokokken som oftest gir infeksjon etterfulgt av *S. pyogenes* (Krzyściak et al., 2013). Den sistnevnte bakterien betegnes ofte som en «kjøttetende bakterie» fordi den kan føre til bløtvevsinfeksjoner, faryngitt, og toksisk sjokksyndrom (Bennett, Dolin, & Blaser, 2014). Bakterier i pyogenesgruppen kan produsere ulike virulensfaktorer slik som toksiner og ekstracellulære proteiner (Nobbs et al., 2009). *S. agalactiae* er en art som kan være farlig ved graviditet da den kan føre til spontanabort og for tidlig fødsel. Det nyfødte barnet kan også få sepsis, lungebetennelse og meningitt (Patterson, 1996).

Flere streptokokker begynner å bli resistente mot antibiotika som eksempelvis penicillin, tetrasykliner og erytromycin. Førstevalget for behandling av streptokokkinfeksjoner er penicillin, men man har blant annet sett at det sporadisk oppstår halsinfeksjoner som ikke kan behandles med hverken erytromycin eller tetrasykliner, som også kan brukes.

Antibiotikaresistens i streptokokker er et økende problem og i *in vitro* studier vises det for eksempel utveksling av resistensgener ved for eksempel konjugasjon via plasmider. *In vivo* er ikke disse mekanismene bevist, men det finnes data som viser at streptokokker er viktige donorer av resistensmarkører (Patterson, 1996). Antibiotikaresistensgener spres ofte via horisontal genoverføring mellom bakterier. Mange streptokokker kan bli naturlig kompetente for genetisk transformasjon (se Seksjon 1.3) og det er vist at streptokokker utveksler konjugative transposoner (von Wintersdorff et al., 2016).



Figur 1.1: Fylogenetisk kart. Oversikt over de 6 hovedgruppene av *Streptococcus* (Nobbs et al., 2009).

1.3 Naturlig kompetanse for genetisk transformasjon

I 1928 oppdaget Frederick Griffith det han den gang kalte transformasjonsprinsippet. Dette gjorde han ved bruk av to typer *S. pneumoniae*, en virulent og en ikke-virulent. Den virulente stammen ble drept med varme, og injisert i mus sammen med den ikke-virulente stammen. Hverken den varmeinaktiverte virulente stammen eller den ikke-virulente stammen drepte musen alene, men musen som ble injisert med begge, døde. Dermed oppdaget Griffith at den levende stammen kunne ta opp virulente egenskaper fra den døde stammen (Griffith, 1928; Solomon & Grossman, 1996). Omlag 15 år seinere, oppdaget Oswald T. Avery at den fundamentale enheten for transformasjonsprinsippet til Griffith, var en nukleinsyre av deoxyribose (DNA) (Avery, MacLeod, & McCarty 1944).

Naturlig kompetanse for genetisk transformasjon er bakteriens evne til å skaffe seg nye egenskaper ved å aktivt ta opp omkringliggende DNA, for så å inkorporere det inn i genomet ved homolog rekombinasjon (Straume, Stamsås, & Håvarstein, 2015). På denne måten kan bakterier skaffe seg nye egenskaper uten at det trenger å oppstå en mutasjon i genene de allerede har, og derfor kan det tenkes å være evolusjonært fordelaktig for en bakterie å være naturlig kompetent. I tillegg har det blitt foreslått at kompetanse kan bli brukt for reparasjon av kromosomale skader i cellen ved å bruke det homologe DNAet bakterien tar opp. I studier av *S. pneumoniae* blir de fleste celler naturlig kompetente når en kultur i log-fase når en kritisk tetthet, eller ved stress (Straume et al., 2015). *S. pneumoniae* har også evnen til å bli

resistent mot ulike antibiotika, samt å motstå vaksinetrykket, grunnet den genetiske plastisiteten den har som følge av naturlig kompetanse. Evnen til naturlig transformasjon har vist seg å være livsviktig for *S. pneumoniae*, noe som kan understrekes ved at det for eksempel har blitt funnet flere tetracyclin - og erythromycinresistente gener i bakterien. I denne bakterien finner man oftere antibiotikaresistens på konjugative transposoner enn på plasmider. Dette gjelder imidlertid ikke resistens mot β -laktamer som penicillin (Montanari, Cochetti, Mingoia, & Varaldo, 2003).

Det har blitt vist at *S. pneumoniae* kan ta opp gener fra arter som *S. mitis* og *Streptococcus oralis* (Eldholm, Johnsborg, Haugen, Ohnstad, & Håvarstein, 2009). Dette forekommer ved at de kommensale streptokokkene, som har mutasjoner i de penicillinbindende proteinene sine, lyserer og frigir resistensgenene til kompetente pneumokokker via homolog rekombinasjon. Det er også funnet at resistensgener mot penicillin i stor grad overføres mellom pneumokokkarter. Denne resistensen overføres ved transformasjon mellom *S. pneumoniae* og fører til endringer i de penicillinbindende proteinene, noe som igjen vil senke affiniteten for β -laktam antibiotika (Sauerbier, Maurer, Rieger, & Hakenbeck, 2012). Dette er et eksempel på at transformasjon gir evolusjonært fordelaktige egenskaper under seleksjonspress.

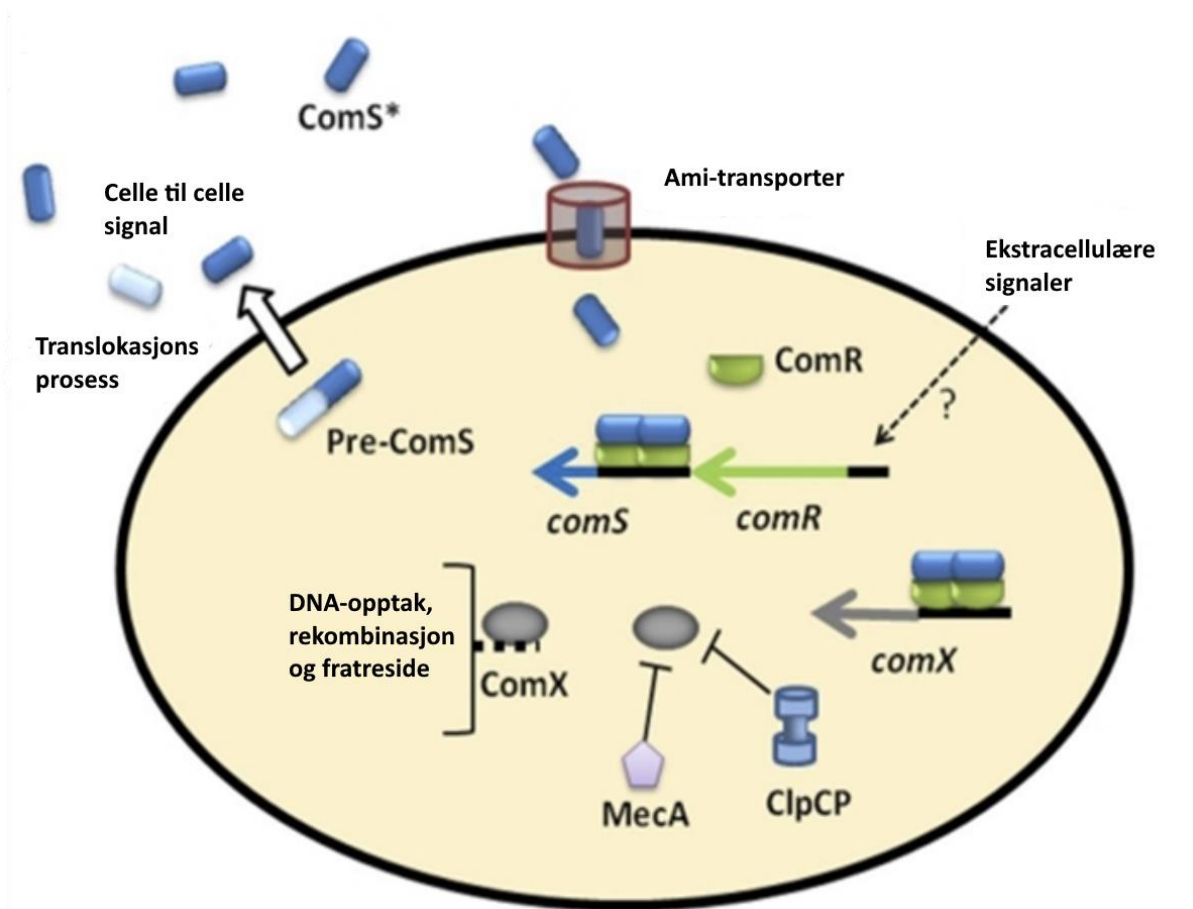
1.4 Regulering av naturlig kompetanse i streptokokker

I pneumokokker kan transformasjonsprosessen deles inn i fire trinn, hvor det første trinnet går ut på at bakterien monitorerer interne og eksterne signaler og velger å bli kompetent. For å kunne gå inn i kompetanse, må bakterien inn i trinn to av prosessen. Dette trinnet involverer å uttrykke tidlige og sene kompetanseproteiner. Når disse er uttrykt, vil *S. pneumoniae* ta opp DNA for å inkorporer dette i genomet (trinn tre). Som en del av trinn tre skiller bakterien også ut en murein hydrolase som lyserer nærliggende celler. Grunnen til dette er trolig for å få tilgang på homologt DNA fra andre nært beslektede streptokokker innen samme nisje (se Seksjon 1.6). Trinn fire inkluderer at kompetansegenene skrur av for at bakterien skal gå ut av kompetanse igjen (Straume et al., 2015).

Det er en energetisk kostnad for bakterien å bli naturlig kompetent. Dette må derfor kunne reguleres for at kompetansegenene ikke skal være uttrykt konstant. Det finnes to systemer for regulering av kompetanse hos streptokokker; et ComCDE-system og et ComRS-system. Begge system er basert på såkalt «quorum sensing» der bakteriene responderer på konsentrasjonene av kompetansestimulerende peptider i miljøet. Hos *S. pneumoniae* og dens

nære slektninger, som eksempelvis *S. oralis*, *S. mitis* og *Streptococcus infantis*, reguleres transformasjonen av fem proteiner som går under navnet; ComABCDE. Genet *comC* koder for et prepeptid som, via transport ut av cellen gjennom ComAB, prosesseres til et kompetansestimulerende peptid (CSP) med sekvensen NH₂-EMRLSKFFRDFILQRKK-COOH. Utenfor cellen vil konsentrasjonen av CSP akkumulere, og ved høy nok konsentrasjon vil CSP binde til ComD som er en kinase lokalisert i cellemembranen. Binding av CSP fører til at det cytoplasmatiske kinasedomenet til ComD autofosforyleres, og overfører fosfatgruppen til responsregulatoren ComE. Fosforylert ComE aktiverer transkripsjon av *comABCDE* (dette er en autolytisk sirkel som fungerer som en bryter som skrur på transkripsjonen) i tillegg til ca. 20 andre tidlige kompetansegener. Et av produktene til de tidlige kompetansegenene, er den alternative sigmafaktor ComX. Denne aktiverer uttrykk av de sene kompetansegenene som er involvert i binding, opptak og rekombinering av DNA som transformeres. Et av de sene genene koder for DprA som assisterer DNA-rekombinasen RecA, og i tillegg binder fosforylert ComE og hindrer ComE i å aktivere transkripsjon fra de tidlige genene. På denne måten kommer bakteriene ut av den kompetente tilstanden (Claverys et al., 2009).

Det andre kompetansesystemet i streptokokker kalles ComRS-systemet, som vises i Figur 1.2. Bakterier som har dette systemet for regulering av kompetanse, er foreslått å være i blant annet bovis - og pyogenesgruppen. Dette systemet baserer seg på at *comR* og *comS* uttrykkes og reguleres på bakgrunn av intracellulære og ekstracellulære signaler som man ikke kjenner til enda. *comS* vil da uttrykkes og produktet, pre-ComS, vil translokere ut av cellen og gjøres om til ComS, som er et modent feromon, via en ukjent mekanisme. ComS fungerer nå som et quorumsensing-signal og importeres inn i cellen via oligopeptidet Ami-transporter. Når ComS har kommet inn i cellen vil det binde til og aktivere ComR, som er en transkripsjonsregulator. ComR vil da binde til promotorregionen til *comS*, *comR* og *comX*. Disse genene vil amplifisere feromonsignalet og dermed lede til ekspresjon av de sene kompetansegenene. ComX vil, på samme måte som beskrevet ovenfor, indusere uttrykk av alle gener som er nødvendige for DNA-opptak, prosessering og homolog rekombinasjon. Den ATP-avhengige proteasen, ClpC, og adaptorproteinet, MecA (Ziqing et al., 2009), jobber sammen slik at det ikke skjer en opphopning av ComX når det ikke er nødvendig for cellen å være kompetent (Berg, Bjørnstad, et al., 2012). *S. dysgalactiae*-isolatene, som er studert i dette arbeidet, har intakte *comRS*-gener og kan i teorien aktivere ComR for induksjon av naturlig kompetanse.

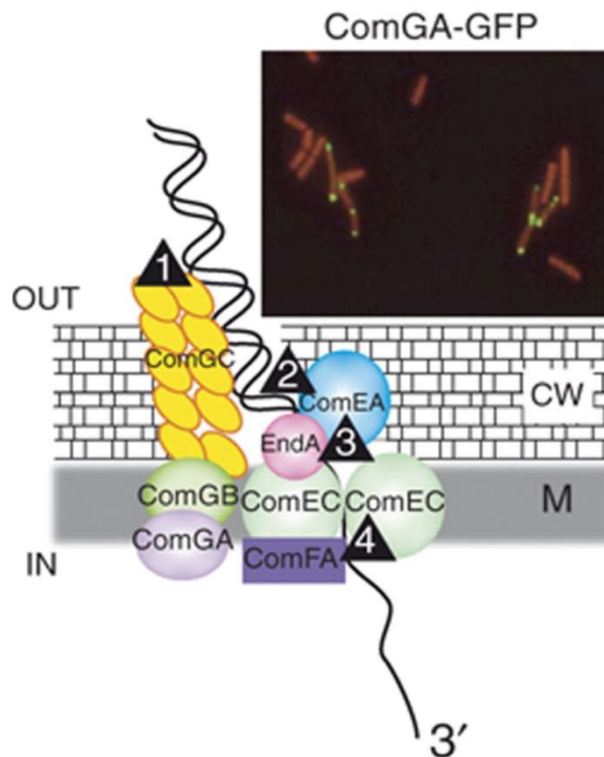


Figur 1.2: ComRS-regulering av kompetanse: ComRS-systemet hos blant annet *S. dysgalactiae*. ComRS-systemet skrur på ved at ComS* (pre-ComS) transporteres inn i cellen gjennom en ami-transporter. Dette fører til positiv feedback-loop ved at ComR og ComS inducerer uttrykket av *comS* ved å binde til promotorregionen. ComX vil da også uttrykkes og de sene kompetansegene vil skrur på. Da vil DNA-opptak, rekombinasjon og homolog rekombinasjon også aktiveres. MecA og ClpC hemmer ComX for å kunne skru av kompetansen. Fargede, rette piler representerer gener. Svarte merker på pilene indikerer promotorregioner. Hele svarte piler indikerer stimulerende effekt og svarte linjer med en strek på indikerer hemmende effekt. Figur er modifisert fra: (Berg, Bjørnstad, Johnsborg, & Håvarstein, 2012).

1.5 Opptak og homolog rekombinasjon av DNA

Allerede i 1999 ble det beskrevet en detaljert mekanisme for DNA-opptak for *S. pneumoniae*, noe som var lenge før alle genene for DNA-opptak hadde blitt identifisert. Prosessen starter med at DNA binder til en pilus på overflaten av cellen. Pilusen trekkes inn i cellen og tar med seg DNA til celleoverflaten (Lam et al., 2021). Ved binding til cellen, kuttes den ene tråden i dsDNA og 3' → 5' ssDNA transporteres inn i cellen, mens 5' → 3' DNAet degraderes (Figur 1.3). Maskineriet består av en struktur som er i slekt med type IV pili, med hovedpilinlignende protein, ComGC, og de mindre pilinlignende proteinene, ComGD, ComGE og ComGG. I tillegg består maskineriet av dsDNA reseptorprotein (ComnEA),

endonukleasen EndA, ComEC som fungerer som en transmembran kanal for ssDNA og ATP-bindende protein ComFA. Membranproteinet ComGB og trafikk-NTPasen ComGA hjelper å samle pseudopilus som prepilin peptidasen Cpl har prosessert (Claverys et al., 2009).



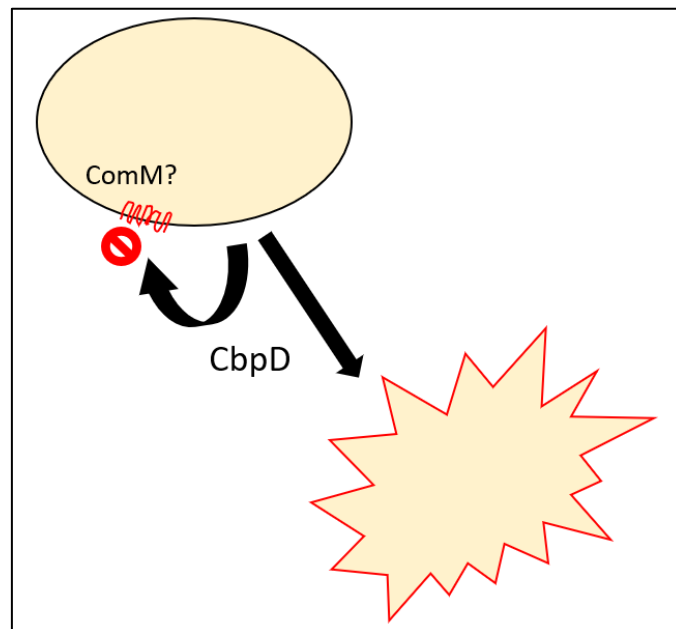
Figur 1.3: Opptak av DNA i *S. pneumoniae*. Opptaksmaskineriet til *S. pneumoniae*. Dobbeltrådig DNA omdannes til enkelttrådig DNA og tas opp i den kompetente cellen. Øverst: lokalisering av ComGA under kompetanse. Figuren er modifisert fra (Claverys, Martin, & Polard, 2009).

Etter at enkelttrådig DNA er tatt opp i cellen, bidrar de kompetanseinduserte proteinene CoiA, DprA, RadA, RecA og SsbB til at ssDNAet integreres inn i genomet til den kompetente cellen ved hjelp av homolog rekombinasjon. For detaljert beskrivelse av denne prosessen, se oversiktsartikkelen av Jean-Pierre Claverys og medforfattere (Claverys et al., 2009). I tillegg til alle genene som er nødvendig for DNA-opptak og rekombinasjon, uttrykker streptokokker også en celleveggshydrolase under kompetanse. Dette er et enzym som skiller ut av den kompetente bakterien og kan angripe celleveggen til andre nært beslektede streptokokker slik at disse lyserer. Dette fenomenet kalles derfor fratrisid (broderdrap direkte oversatt fra engelsk), og enzymene kalles for fratrisiner (Berg, Biørnstad, et al., 2012).

1.6 Fratrissid

Fratrisid er en bakteriolytisk mekanisme som mange streptokokker benytter under kompetanse (Claverys, Martin, & Håvarstein, 2007). Dette involverer en såkalt angripende celle og en målcelle. Den angripende cellen produserer bakteriolytiske proteiner for å aktivt lysere ikke-kompetente søskenceller, eller nært beslektede celler. Dette gjør at den kompetente angripende cellen får tilgang på homologt DNA (Claverys et al., 2007). Det vil også frigis næring, noe som vil være fordelaktig for overlevende celler, samt virulensfaktorer som kan være gunstig for cellene ved en infeksjon.

Fratrisid kan skje i blandede streptokokkpopulasjoner, der noen er kompetente og andre ikke (Claverys & Håvarstein, 2007). Fratrissid tilrettelegger for opptak av DNA som er homologt med DNA-sekvenser i genomet til de kompetente cellene. Det kan være risikofylt for en bakterie å ta opp DNA fra en fjernt beslektet bakterie da de for eksempel kan få gener som uttrykker proteiner eller RNA som kan være toksisk for cellen eller interfererer negativt med vitale funksjoner. På bakgrunn av dette er det grunn til å tro de dreper nært beslektede bakterier. DNAet er da mye likere den angripende bakterien sitt DNA og dermed er sjansen for skade mindre (Johnsborg & Håvarstein, 2009). Fratrissid er ko-regulert med naturlig transformasjon (Johnsborg, Eldholm, Bjørnstad, & Håvarstein, 2008), noe som er en sterk indikasjon på at dette tilrettelegger for opptak av homologt DNA mellom streptokokker.



Figur 1.4: Fratrissidmekanismen i streptokokker. Figuren viser en kompetent celle som skiller ut CbpD. CbpD lyserer den ikke-kompetente nabocellen, mens den selv har uttrykt det som hos noen streptokokker er ComM, og derfor er beskyttet (Se Seksjon 1.6.4).

1.6.1 Den biologiske rollen til fratrisidmekanismen

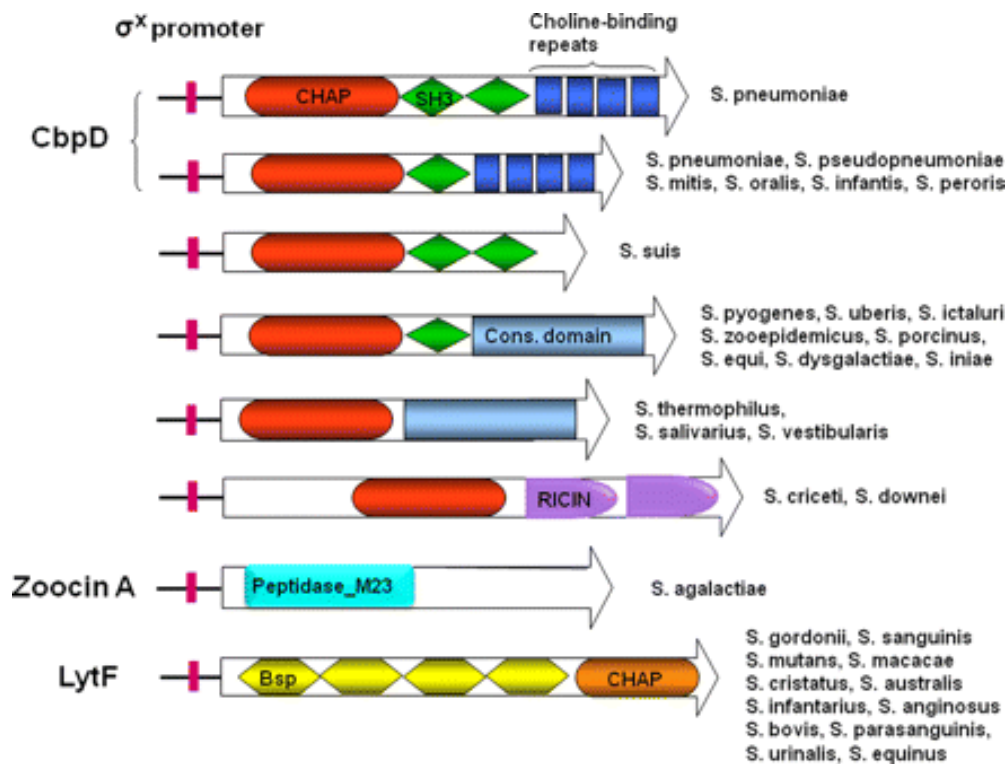
Fratrisiner produseres av alle streptokokker der man har funnet kompetanseregulerende gener i genomet, noe som indikerer at disse enzymene spiller en viktig biologisk rolle hos streptokokker. Det har blitt foreslått fire grunner til at streptokokkene produserer disse murein hydrolasene under kompetanse. Teoriene er a) å tilrettelegge for DNA-opptak, b) bruke det som kjemisk våpen for å drepe konkurrenter i samme nisje c) for å skaffe seg homologt DNA fra de lyserte cellene, eller d) gjøre DNAet til målcellen tilgjengelig slik at det kan gi strukturell støtte til biofilmdannelse (Berg, Biørnstad, et al., 2012).

Det er en mulighet for at fratrisider tilrettelegger for DNA-opptak i angripercellen. Det har blitt foretatt undersøkelser som viser at CbpD fra *Streptococcus thermophilus* har en stimulerende effekt på evnen bakterien har til å transformere. Det er ikke nødvendig at CbpD er tilstede for transformasjon, men transformasjonsraten er signifikant lavere (~18 fold) i en $\Delta cbpD$ mutant (Biørnstad et al 2012). I *S. pneumoniae* og *Streptococcus gordonii*, derimot, har henholdsvis CbpD^{SP} og LytF ingen effekt på DNA-opptaket. Dette tyder på at tilrettelegging av DNA-opptak ikke er den viktigste biologiske rollen til fratrisidmekanismen, men kan likevel ikke utelukkes før det er foretatt flere studier på dette. Det at fratrisiner fungerer som våpen mot andre nært beslektede streptokokker i kamp om næringsstoffer og nisjer, eller for å frigjøre DNA til oppbygging av biofilm, kan heller ikke utelukkes helt. Likevel er det mest nærliggende å tro at fratrisid er en mekanisme bakteriene utfører for å få tilgang på homologt DNA under kompetanse. Dette er basert på at uttrykket av fratrisiner induseres under kompetanse og at bakterier som uttrykker fratrisiner mer effektivt kan ta opp gener fra andre streptokokker (Johnsborg & Håvarstein, 2009).

1.6.2 Fratrisiner hos streptokokker

Som tidligere nevnt, har de fleste streptokokkarter et kompetanseindusert gen som koder for en celleveggshydrolase. Dette enzymet er studert i størst grad hos *S. pneumoniae*, og det er vist å være et nøkkelprotein for fratrisidmekanismen. CbpD står for choline binding protein D. Som navnet tilsier, binder CbpD til kolinresiduer som er kovalent festet til tekoinsyrer i celleveggen til flere streptokokkarter i mitisgruppen, som eksempelvis *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. infantis* og *Streptococcus perosis*. Disse artene skiller seg fra andre streptokokker på bakgrunn av sine kolindekorerte tekoinsyrer, og de uttrykker flere kolinbindende proteiner (CBPer) som har viktige roller i celleveggfysiologien, i noen trinn av

koloniseringsprosessen og ved eventuelle interaksjoner med vertsceller (Maestro & Sanz, 2016). CbpD i mitisgruppen består av et N-terminalt katalytisk cystein, histidin, amidopeptidase (CHAP) domene, et eller to SRC homology (SH3b) domener og fire kolinbindende repeterende motiv som til sammen utgjør et kolinbindende domene C-terminalt (Figur 1.5). Som nevnt, vil det kolinbindende domenet binde kolin på overflaten av målcellene, mens SH3b-domenet mest sannsynlig gjenkjenner peptidoglykanlaget i celleveggen. SH3b er lite karakterisert i bakterier, men ut ifra de bevisene som finnes, tyder det på at SH3b kjenner igjen bakteriens peptidoglykan og binder her. De kolinbindende domeneene fører CbpD til delingssone i *S. pneumoniae* hvor CHAP-domenet vil lage kutt i celleveggen (se Seksjon 1.6.3) (V. Eldholm et al., 2010).



Figur 1.5: Domeneorganisering av ulike fratrisiner hos streptokokker. CbpD, LytF eller Zoocin A domeneene hos ulike streptokokkarter (Berg, Ohnstad, & Håvarstein, 2012).

Andre streptokokker som ikke har kolin på tekoinsyrene, uttrykker andre typer fratrisiner; LytF, en CbpD homolog eller et protein kalt zoocin A. LytF er ulik fra CbpD, men utøver samme funksjon. LytF og CbpD er kun beslektet på grunn av CHAP-domenet, men har samtidig flere likheter. Begge er eksempelvis kompetanseregulerte mureinhydrolaser og binder i septum til målcellen. Det er derfor grunn til å tro at disse er funksjonelle analoger som har lignende, eller samme, biologiske rolle for cellen der de uttrykkes. LytF finnes i arter

som *Streptococcus mutans*, *S. gordonii* og *Streptococcus sanguinis* og har et celleveggbindende domene bestående av bsp-domener (gruppe B streptokokk sekretert protein). Zoocin A er et bakteriosin som kun noen få arter produserer, den finnes hos *S. agalactiae* og har et karbohydratsbindende domene kalt peptidase_M23 (Berg, Biørnstad, et al., 2012).

CbpD er ikke nødvendigvis et godt navn da ikke alle CbpDer binder kolin. CbpD er forskjellig i de ulike artene av streptokokker. Felles er at de alle har et CHAP-domene, mens det kolinbindende domene ofte er erstattet med andre domener. Man antar at disse også har som funksjon å binde celleoverflaten til målcellene (Figur 1.5). Videre har CbpD hos noen arter et eller to SH3b-domener, mens andre arter, slik som *S. thermophilus*, ikke har det. I *S. dysgalactiae* består CbpD av et CHAP-domene, en SH3 og et konserverte domene som sannsynligvis fungerer som et celleveggbindende domene. Flere sentrale arter har også dette domenet, slik som *S. pyogenes* og *S. uberis*. For å skille de ulike CbpDene, vil det videre i teksten bli referert til CbpD fra *S. pneumoniae* som CbpD^{SP}, fra *S. dysgalactiae* som CbpD^{SD}, *S. thermophilus* som CbpDST og så videre.

1.6.3 Det katalytiske CHAP-domenet hos fratrisiner

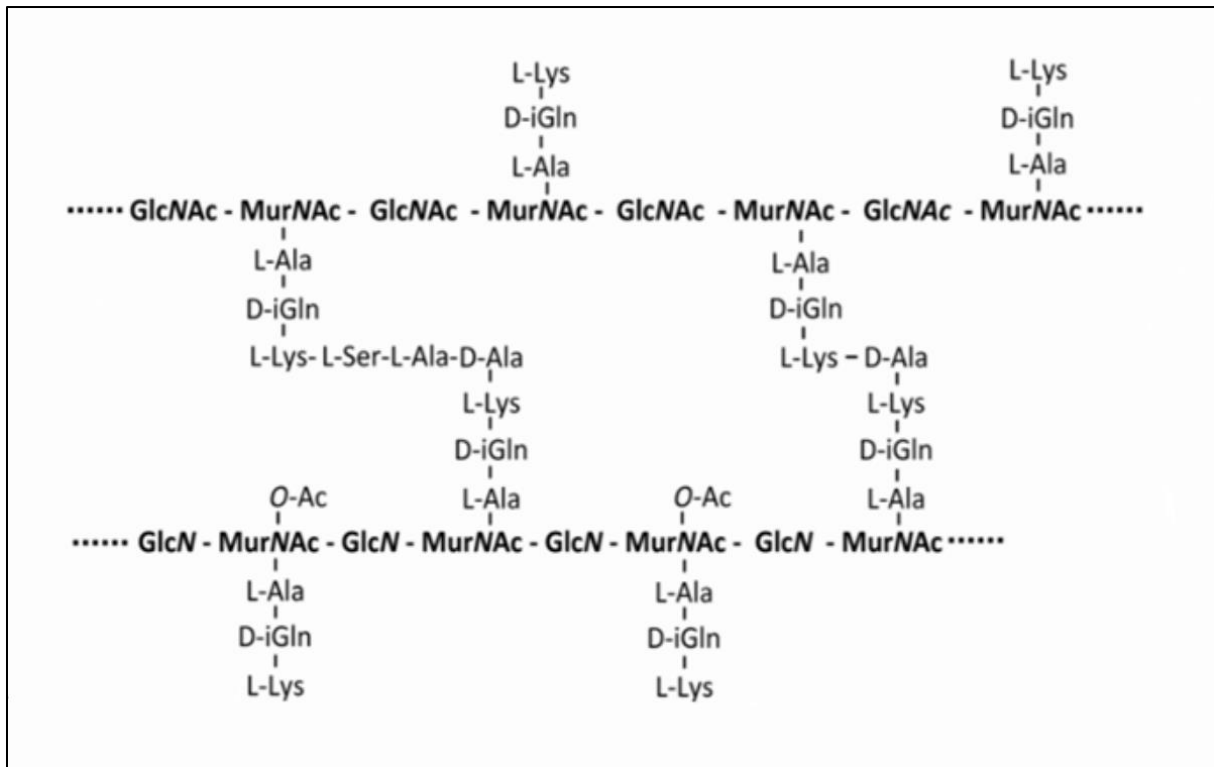
I tillegg til CbpD og LytF i streptokokker, finnes proteiner med CHAP-domenet i mange ulike bakterieslekter. CHAP viser en betydelig homologi til murein hydrolaser (lager kutt i peptidoglykanlaget i celleveggen) og fag-lysiner med endopeptidaseaktivitet som klipper bånd i stampeptidet eller med amidaseaktivitet som kløyver N-acetylmuramyl-L-Ala båndet. Det finnes et stort antall multifunksjonelle hydrolaser, noe som kan tyde på at de jobber sammen om å kløyve spesialiserte substrater. Det er for eksempel funnet et protein kalt PcsB som har et CHAP-domene som kreves for å kløyve celleveggen mellom to datterceller slik at de kan separeres til to individuelle celler. CHAP-domenet er ofte mellom 110 og 140 aminosyrer langt. I tillegg finnes to konserverte aminosyrer i alle CHAP-domener, en cystein og en histidin. Disse to residuene danner deler av det aktive setet til disse proteinene. Det er også derfor navnet CHAP er laget; cystein, histidin dependent aminohydrolase/peptidase (Bateman & Rawlings, 2003).

1.6.4 Immunitet mot fratrisiner

For ikke å begå selvmord ved produksjon av fratrisiner, er det hensiktsmessig for den kompetente bakterien å ha en immunitetsmekanisme. *S. pneumoniae* produserer et integrert membranprotein kalt ComM (Håvarstein et al 2006). Proteinene er predikert å ha seks til syv transmembrane segmenter, og kodes for av et såkalt tidlig-gen som gjør at det uttrykkes omtrent fem minutter før CbpD. Mekanismen bak ComM-mediert immunitet mot CbpD er ikke kjent, men det er nærliggende å anta at ComM modifierer strukturen til den nyligst syntetiserte delen av celleveggen for å gjøre den motstandsdyktig mot CbpD (Berg, Biørnstad, et al., 2012). Resultater som støtter dette, er at ComM overuttrykk fører til abnormal celleveggsyntese i *S. pneumoniae*. Det er funnet homologer av ComM i flere andre streptokokker slik som *S. oralis* og *S. sanguinis*, men ikke i for eksempel *S. dysgalactiae* (Straume, Stamsås, Salehian, & Håvarstein, 2017). Immunitet mot Zoocin A oppstår ved at strukturen til stempeptidene i peptidoglykanet endres, dermed endres substratet til disse enzymene og de vil ikke kunne sette seg i det aktive setet til enzymet (Berg, Ohnstad, et al., 2012).

1.7 Celleveggstrukturen til streptokokker

Celleveggen til bakterier har to hovedoppgaver; å forhindre at cellen sprekker grunnet det høye indre turgor-trykket i cellen, og å holde formen til bakterien. Gram-positive bakterier slik som streptokokker har en cellevegg hovedsakelig bestående av flere tykke peptidoglykanlag (30-100 nm) (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010). Peptidoglykanet er laget av glykankjeder bestående av repeterende enheter med et disakkarid av N-acetylglukosamin (GlcNAc) og N-acetylmuraminsyre (MurNAc). Glykankjedene er krysslinket via pentapeptider som er festet til MurNAc (Figur 1.6) (Vollmer, Blanot, & De Pedro, 2008).



Figur 1.6: Cellevegg. Hos streptokokker er peptidoglykankjeder krysslinket med stempeptider festet til MurNAc. Figuren er modifisert fra Vollmer et. al (Vollmer, Massidda, & Tomasz, 2019).

Pentapeptidet i peptidoglykanet varierer mellom ulike bakteriearter. Hos streptokokker har pentapeptidet følgende sekvens: L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Pentapeptidene fra to glykantråder linkes mellom D-Ala i fjerde posisjon på et peptid og epsilon aminogruppen på L-Lys i tredje posisjon på det andre peptidet. Det er penicillinbindende proteiner (PBP) som utfører denne transpeptideringsreaksjonen. Det er disse PBPene som hemmes av β -lactam antibiotika ved at antibiotikaet etterlikner transpeptideringsreaksjonen og blokkerer enzymene (Straume et al., 2020). Stempeptidene kan også linkes sammen med interpeptid-broer som består av L-Ser-L-Ala eller L-Ala-L-Ala (Vollmer et al., 2019). For streptokokker er syntese – og peptidoglykanstruktur best studert hos *S. pneumoniae*, men oppbygningen av dette makromolekylet er hovedsakelig likt mellom ulike streptokokkarter. Det som varierer, er lengden på glykantrådene og i hvor stor grad de er krysslinket med peptidbroer (Vollmer & Seligman, 2010).

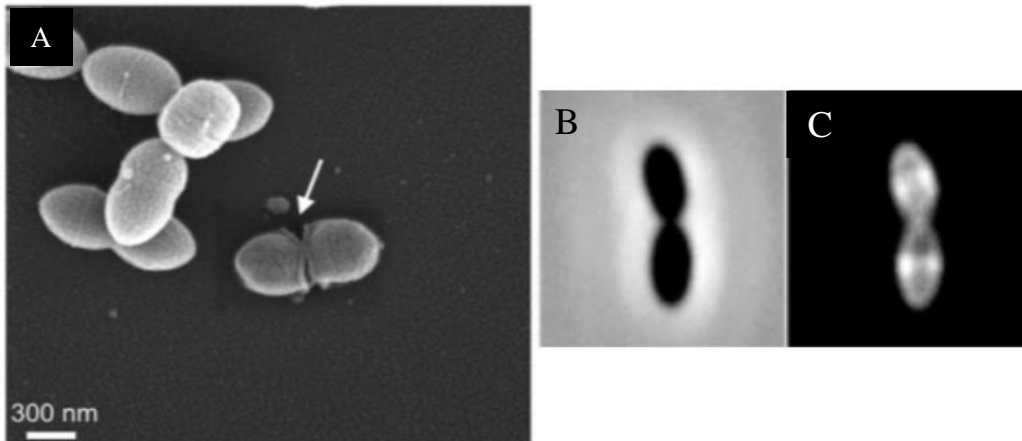
En komponent i celleveggen som varierer mellom streptokokkarter, er tekoinsyrer som er polymerer kovalent bundet til MurNAc (veggtekoinsyrer). Disse har ulik struktur for ulike streptokokkarter. Tekoinsyrer er også forankret til lipider i cytoplasmamembranen, og kalles da lipotekoinsyrer. Funksjonen til tekoinsyrer er essensiell og involverer blant annet å beskytte bakterien fra vertens immunsystem, forankre celleoverflateproteiner og de strekker

seg langt fra cellens overflate for å interagere med celler til en eventuell vertsorganisme (Gisch, Peters, Zähringer, & Vollmer, 2015). I tillegg bindes CbpD^{SP} til tekoinsyrer (binder til kolinresiduene), og man antar at LytF sine bsp-domener (se Figur 1.5) også binder til tekoinsyrer på celleoverflaten til sine målceller, men eksperimentelle bevis for dette mangler.

Tekoinsyrer har ofte flere unike strukturelle egenskaper (Archibald & Baddiley, 1967). *S. pneumoniae* fungerer som modellorganisme, der blant annet peptidoglykanet og tekoinsyrene er blitt mye studert. Tekoinsyrene til pneumokokker har en veldig kompleks struktur i den repeterte enheten. De har flere fosfokolinresiduer som kan fungere som anker for kolinbindende proteiner. *S. pyogenes* og *S. mutans* har henholdsvis gruppe A og gruppe C glykopolymerer på overflaten. Likheten mellom disse er at de har grunnstrukturen ($\rightarrow 3$) α -Rha(1 \rightarrow 2) α -Rha(1 \rightarrow) polyrhamnose. De skiller ved at *S. pyogenes* har glykosyl sidekjederesiduer som er N-acetyl- β -D-glucosamine (GlcNAc), mens *S. mutans* har α -glucose (Glc) (Edgar et al., 2019).

1.8 CbpD og LytF binder til delingssonen på målcellene

CbpD^{SP} og CbpDST samt LytF fra *S. gordonii*, er vist å binde til celleveggen i delingssonen hos sine respektive målceller (Berg, Ohnstad, et al., 2012; Biørnstad, Ohnstad, & Håvarstein, 2012) (Figur 1.7). Dette viser at det er egenskaper i denne nysyntetiserte celleveggen som skiller seg fra resten av celleveggen og at fratrisiner spesifikt gjenkjenner dette. Når streptokokker deler seg, syntetiseres ny cellevegg på midten av cellen. Bakterien utvider celleveggen i lengderetningen ved at det blir satt inn nytt celleveggsmateriale ved det som kalles for ekvatoriale ringer. Dette gjør at cellen vokser i lengden. Samtidig syntetiseres en septal cellevegg som til slutt separerer cytoplasmamembranen til de to dattercellene (Scheffers & Pinho, 2005).



Figur 1.7: Bindingsmønster. Bildene er hentet og modifisert fra Straume et al. (Straume et al., 2020). Bilde A er et elektronmikroskopibilde der pilen viser hvor CbpD rensset fra *S. mitis* (CbpDSM) har angrepet *S. pneumoniae*. Cellene ble behandlet med CbpDSM i 60 sekunder. Bilde B og C viser mikroskopibilder av *S. pneumoniae* der C er tilsatt en CbpDSM-GFP for å finne ut hvor CbpDSM vanligvis binder. De lysere områdene viser binding av CbpDSM. Bildene er hentet fra en serie som viser binding av CbpDSM-GFP i flere stadier av celledelingen. B og C er fra det siste trinnet i celledelingen.

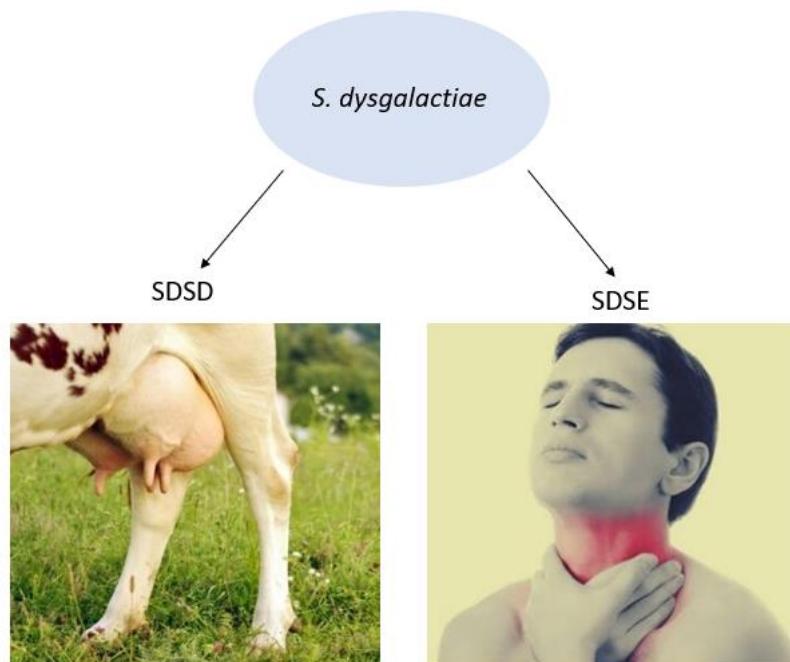
To proteinkomplekser, kalt elongasomet og divisomet, er ansvarlig for celleveggsyntese i henholdsvis lengderetningen og septum. Elongasomet og divisomet er nøye regulert og koordinert i både tid og sted gjennom cellyklusen og involverer mange proteiner. Detaljert beskrivelse av dette vil derfor ikke bli gitt her, men se følgende review-artikkel for mer detaljer (Massidda, Nováková, & Vollmer, 2013). Den septale celleveggen må kuttes på en kontrollert måte for å separere dattercellene. Det er denne septale veggen fratrisiner angriper under fratisid. Det er også vist at *S. pneumoniae* med kompromitert elongering, men funksjonelt divisome, blir hypersensitive mot CbpD. Det har derfor blitt diskutert om disse cellene er ekstra sensitive på bakgrunn av at de inneholder en større andel septal cellevegg (Straume et al., 2017).

I et forsøk utført av Eldholm et al. erstattet de CHAP-domenet til CbpD^{SP} med et grønt fluoriserende protein som viste at CbpD^{SP} hovedsakelig binder i delingssonen til pneumokokker (V. Eldholm et al., 2010). I forsøkene hvor det kolinbindende domenet ble fjernet fra komplekset, ble det vist binding over hele cellen. Resultatene viste også at dersom full lysis skal oppnås i cellen, kreves det at CbpD binder til både tekoinisyrene og peptidoglykanet ved at kolinbindende domene og SH3b binder. Det ble indikert at CbpD fungerer mer effektivt når den blir guidet til septum, enn når den binder til andre deler av pneumokokkveggen. CbpD angrep kun peptidoglykanets sacculus der cellene ble delt i to

langs ekvator. Peptidoglykanet er tykkere her, og de foreslår at CbpD kløyver langs midten av den ekvatorielle ringen, et område kalt piecrust (V. Eldholm et al., 2010).

1.9 *S. dysgalactiae*

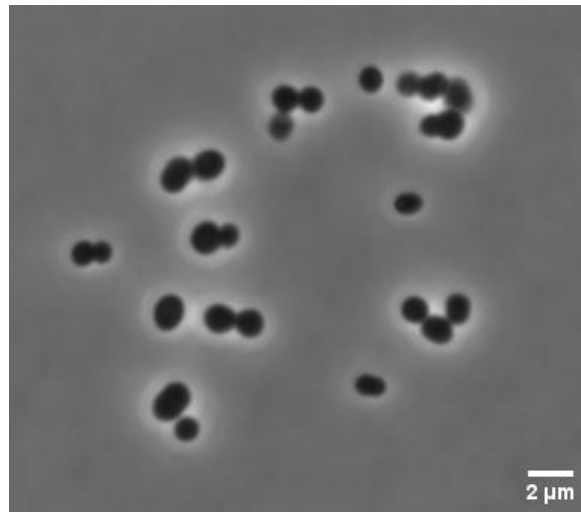
En streptokokkart som har fått økt oppmerksomhet de siste årene på bakgrunn av evnen til å gi infeksjon hos dyr og mennesker, er *S. dysgalactiae*. Den ble først beskrevet av Diernhofer i 1932 (Diernhofer, 1932), men ble ikke en offisiell art før i 1983 (Garvie, Farrow, & Bramley, 1983). Den hører til i pyogenesgruppen (Abdelsalam, Asheg, & Eissa, 2013) og er videre delt inn i to undergrupper; subspecies *dysgalactiae* (SDSD) og subspecies *equimillis* (SDSE). SDSD er ikke β -hemolytiske, noe SDSE er. *S. dysgalactiae* er et patogen som trolig kan invadere bovine brystceller (Almeida & Oliver, 1995). SDSD sitt habitat er ofte respiratorisk - og genitalisk trakt i ulike dyr, men ikke hos mennesker. Hos SDSE er habitatet gjerne human respiratorisk trakt og vagina (Figur 1.8) (Vandamme, Pot, Falsen, Kersters, & Devriese, 1996).



Figur 1.8: Infeksjon. *S. dysgalactiae* gir sykdom hos dyr og mennesker. SDSD gir infeksjon hos dyr, mens SDSE gir hos mennesker.

S. dysgalactiae opptrer i kjeder på rundt 4-10 celler (Figur 1.9). Bakterien kan karakteriseres som både et smittomt patogen og som et miljøpatogen. Det er en veldig vanlig bakterie hos kløvdyr, da det er den første bakterien som koloniserer en spene. Samtidig er den veldig ofte isolert ved tilfeller av mastittinfeksjoner. Når det kommer til virulensfaktorer i *S. dysgalactiae*, er mye ukjent. Imidlertid er det observert at bakterien kan interagere med flere

proteiner som produseres av en infisert organisme. Eksempler på disse er immunoglobulin G, albumin og kollagen (Calvinho, 1998).



Figur 1.9: Mikroskopibilde av *S. dysgalactiae*. Fasekontrast mikroskopibilder av *S. dysgalactiae*. Bildet er tatt i forbindelse med denne oppgaven. En størrelseskala på 2 μm vises nede til høyre.

Tidligere var SDSE sett på som ikke-patogen, men det er nå sett på som en viktig humanpatogen. Det er funnet flere av de samme virulensgenene i SDSE som også finnes i *S. pyogenes*. Infeksjonene smitter fra menneske til menneske (Hughes, Wilson, Brandt, & Spellerberg, 2009) og kan være årsaken til beinbetennelse (Oppegaard, Mylvaganam, Skrede, & Kittang, 2018) og alt fra overfladiske hudinfeksjoner til revmatisk feber og livstruende sykdommer som toksisk sjokksyndrom (Hughes et al., 2009).

I Tyskland oppstår 2,8-5,5% av alle mastittinfeksjoner grunnet *S. dysgalactiae*. Dette er den største årsaken til mastitt i landet etter *Streptococcus uberis*. Enkelte hevder at smitten kan overføres mellom gårder og man ser at smitten går mellom kuer på samme gård. Den samme undersøkelsen, av totalt 16 gårder, viste at alle gårdene hadde *S. dysgalactiae* i miljøet. Det ble funnet 93 isolater, men kun 1 av disse var årsak til mastitt på de undersøkte gårdene (Wente & Krömker, 2020).

På bakgrunn av at *S. dysgalactiae* nylig er oppdaget å være assosiert med langt flere infeksjoner enn tidligere antatt, er det sannsynlig at økte utfordringer knyttet til denne bakterien, både innen helsevesen og dyrehold, vil være sannsynlig i fremtiden. Det er derfor viktig å forstå mekanismene som bidrar til antibiotikaresistens og spredning av resistensgener hos denne bakterien.

1.10 Mål for oppgaven

Antibiotikaresistens hos bakterier er et økende problem over hele verden. Hos flere streptokokker er det oppdaget naturlig transformasjon, der resistensgener kan overføres mellom streptokokkene i sitt naturlige miljø. *S. dysgalactiae* er et patogen som kan føre til blant annet mastitt hos dyr. Det er også oppdaget patogene *S. dysgalactiae* hos mennesker. Flere streptokokker har vist seg å være resistente for ulike antibiotika, noe som gjør behandlingen av pasienter vanskeligere. Det er derfor viktig å få kunnskap om hvordan resistensgener spres mellom streptokokker. Nesten alle streptokokkarter man kjenner har gener som koder for fratrisiner. CbpD er et av disse fratrisinene og lyserer nært beslektede streptokokker, slik at DNAet blir frigjort og tilgjengelig i ekstracellulær matriks. Dette er derfor en viktig komponent i spredning av resistensgener og dermed et viktig protein å forstå for å kunne få mer kunnskap om, og potensielt kunne bremse spredningen av resistensgener blant streptokokker. Lite er kjent om hvordan *S. dysgalactiae* tar opp eller sprer gener. For å kunne prøve å forstå mer om naturlig kompetanse og fratrisid i *S. dysgalactiae*, var det derfor ønskelig å forsøke følgende:

- Overuttrykke og rense CbpD^{SD} slik at det blir tilgjengelig i løselig form
- Teste aktivitet av CbpD^{SD} mot *S. dysgalactiae* og andre streptokokkarter
- Prøve å slå på ComRS-systemet til *S. dysgalactiae* for å gjøre dem naturlig kompetente for genetisk transformasjon
- Finne ut hvor i celleveggen til ulike streptokokker CbpD^{SD} vanligvis binder
- Finne ut hvor i peptidoglykanet renset CbpD^{SD} kutter

2 Materialer

2.1 Vekstmedier

Tabell 2.1: Oversikt over vekstmedier brukt i denne oppgaven.

Vekstmedium	Oppskrift
Super optimal broth (SOC/SOB), 100ml	0,5g gjær ekstrakt 2g trypton 0,0584g NaCl 0,0186g KCl 0,24g MgSO ₄ Autoklavert og avkjølt Steril glukose ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1% (v/v) etter autoklaving
Brain Heart Infusion media (BHI)	37g BHI-pulver blandet med dH ₂ O til et totalt volum på 1l og sterilisert ved autoklaving
Luria Bertani broth media (LB)	10g Trypton 5g gjærekstrakt 10g NaCl Blandet med dH ₂ O til et totalvolum på 1l og sterilisert ved autoklaving
LB-agar, 1l	10g Trypton 10g NaCl 5g gjærekstrakt 15g agar
Tryptic Soy Broth (TSB)	30g TSB broth (Merck) Løsningen ble tilsatt dH ₂ O til et totalvolum på 1l
Todd Hewitt broth (TH)	30g TH broth (Becton, Dickinson and Company) Løsningen ble tilsatt dH ₂ O til et totalvolum på 1l
C-medium	Til 150ml autoklavert pre-C-medium tilsettes: 150µl 0,4 mM MnCl ₂ 1,5ml glukose (20%) 3,75 ml ADAMS III 110 µl Glutamin (3%) 2,25ml Natriumpyruvat (2%) 95 µl 1,5M Sukrose 1,5ml Uridin adenosin 2mg/ml 1,5ml Albumin/BSA (8%) 3,75ml gjærekstrakt Løsningen kan oppbevares på 4 grader i maks ett døgn

2.1.1 Løsninger for tillaging av C-medium

Tabell 2.1.1: De ulike løsningene som er nødvendige for å lage C-medium (se tabell 2.1).

Løsninger for tillaging av C-medium	Oppskrift
ADAMS III	128ml ADAMS I 3,2ml ADAMS II (10x) 1,6ml Aspargin monohydrate 0,16g Kolinklorid 0,4g Kalsiumklorid dehydrert 16g Magnesiumklorid hexahydrat Løsningen ble tilsatt dH ₂ O til et totalvolum på 800ml og pH ble justert til 7,6. Løsningen ble sterilfiltrert og lagret ved 4°C
ADAMS II (10x)	500mg Jernsulfat heptahydrat 500mg Kobbersulfat pentahydrat 500mg Sinksulfat heptahydrat 200mg Mangan(II)-klorid tetrahydrat 10ml konsentrert HCl Løsningen ble tilsatt dH ₂ O til et sluttvolum på 100ml, og sterilfiltrert og lagret ved 4°C
ADAMS I	0,15ml 0,5mg/ml Biotin 75mg Nikotinsyre 87,5mg Pyridoxine hydroklorid 300mg Kalsium panthothenate 800mg Thiamin hydroklorid 35mg Riboflavin Løsningen ble tilsatt dH ₂ O til et sluttvolum på 0,5l og pH ble justert til 7,0. Løsningen ble sterilfiltrert og lagret ved 4°C
Pre-C-medium	0,045g Cystein HCl 8g Natriumacetat 20g BactoÔ Casitone 0,024g L-Tryptofan 34g K ₂ HPO ₄ Blandet med dH ₂ O til et totalvolum på 4l før det autoklaveres

2.2 Buffere

Tabell 2.2: oversikt over buffere brukt i denne oppgaven.

Buffere	Oppskrift
Coomassie blue stain	0,5g Coomassie Brilliant Blue (0,1% w/v) 200ml metanol (40% v/v) 35ml eddiksyre (7,5% v/v) 265ml dH ₂ O
Coomassie destain	50ml eddiksyre 50ml etanol 400ml dH ₂ O
Refoldingsbuffer til zymografi	50mM NaCl 20mM MgCl ₂ 0,5% Triton 20mM Tris-HCl (pH 7,4)
Buffer A	20mM Tris-HCl (pH 7,4) 500mM NaCl 20mM imidazol
Buffer B	20mM Tris-HCl (pH 7,4) 500mM NaCl 500mM imidazol
TBS	10mM Tris-HCl (pH 7,4) 150mM NaCl
2x SDS-PAGE buffer	100mM Tris-HCl (pH 6,8) 4% SDS 20% Glycerol 200mM Beta-mercapto etanol Noen få korn bromophenol blue
10x Elektroforesebuffer	30g Tris-base (0,25M) 144g Glysin (1,92M) 50ml 20% SDS (1% v/v) Løsningen ble justert til et sluttvolum på 1l, og oppbevart ved romtemperatur
PBS, justert til pH 7,4	8g NaCl 0,2g KCl 1,44g Na ₂ HPO ₄ 0,24g KH ₂ PO ₄ 1000ml dH ₂ O
6x Loadingbuffer agarose	40% sukrose (w/v) 20mM Tris-HCl (pH 8,0) 6mM EDTA 0,05% (w/v) bromfenolblå

2.3 Kommersielle kit

Tabell 2.3: Kommersielle kit brukt i denne oppgaven.

Navn	Leverandør
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-Tek
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Machnery-Nagel
Spectra/Por membran	Spectrum®

2.4 Kjemikalier

Tabell 2.4: Kjemikalier brukt i denne oppgaven.

Kjemikalie	Formel	Produsent
Acetonitril (ACN)	C ₂ H ₃ N	Sigma-Aldrich
Agarose		VWR
Akrylamid 4x (40%)	C ₃ H ₅ NO	Saveen Werner
Brilliant blue	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	Sigma-Aldrich
Bromfenolblå	C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa	Sigma-Aldrich
DTT (DL-Dithiothreitol)	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	Sigma-Aldrich
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O _{8.2} H ₂ O	VWR
Glass beads		Sigma-Aldrich
Glucose 20%	C ₆ H ₁₂ O ₆	VWR
Glycerol 85%	C ₆ H ₁₂ O ₆	Merck
Kalsiumklorid dehydrert	CaCl ₂	Fluka
N,N,N,N-tetramethyl ethylene diamine (TEMED)	C ₆ H ₁₆ N ₂	Sigma-Aldrich
Natriumklorid	NaCl	Merck
peqGREEN	PEQL37-501	Saveen Werner
SDS (sodium dodecyl sulfat)	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Fluka
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Fluka
SytoxTmGreen		Invitrogen
Trifluoroeddiksyre (TFA)	C ₂ HF ₃ O ₂	Sigma-Aldrich

2.5 Enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører

Tabell 2.5: enzymer, nukleotider og størrelsesmarkører brukt i denne oppgaven.

Stoff	Produsent
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	TaKaRa
DNA ladder (1kb)	New England BioLabs
Mutanolysin	Sigma Aldrich
Phusion ® High-fidelity DNA-polymerase	New England BioLabs
Quick T4 DNA-Ligase	New England BioLabs

2.6 Primere

Tabell 2.6: oversikt over primere brukt i denne oppgaven.

Primere	Sekvens
ATS1 fwd His-TEV-CbpD dysgalactiae	TACGCATATGCATCATCATCATCATGAG AACCTGTACTTCCAAGGTGAACATACAGGA GTTGTTTCATG
ATS2 rev CbpD dysgalactiae	CGTAAAGCTTTTATGGCAATTTAGAGGCTTT ATC
ATS3 Fwd His-sfGFP	TACGCATATGCATCATCATCATCATCATAAA CATCTTACCGTTCTAAAG
ATS4 Rev sfGFP no stop	TGCGGCCGCTCCACTAGTTTTG
ATS5 Fwd sh3b-sfGFP compl	CAAACTAGTGGAGCGGCCGCACCTAGTGG TGAAGCAAGTAAG
ATS6 fwd up cbpD dysgalactiae	GGAAGTGGAGCATAAGCTCC
ATS7 rev up cbpD dysgalactiae janus comp	CACATTATCCATTAATAAATCAAACCTATTAC CTCCTGTAACCTAATTATTC
ATS8 fwd down cbpD dysgalactiae janus comp	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGTCCCTTTTCCT CTTCTTCGTTTTTC
ATS9 rev down cbpD dysgalactiae	AACTGACTTTGACTTATGATTTG
ATS10 fwd up cbpD nested dysgalactiae	GTCGCCATCATAAGAACGCTTG
ATS11 rev down CbpD nested dysgalactiae	GAGATGCAGATGCGGCAATCC
ATS12 fwd 150 up comR	CCAAACGCGTGGATGACATC
ATS13 rev 150 down comS	AAAATGTTTAATTGCTCCTTAACC

Primere	Sekvens
ATS14 Rev up cbpD P1 complement	GTATTTTCTAGTATTATAGCACATTTAATCAT TACCTCCTGTAACATAATTATTC
ATS15 fwd down CbpD aad9 complement.	CTATTTAAATAACAGATTAATAAAATTATAA TCCCTTTTCTTCTTTCGTTTTT
ATS 16 fwd 1000 up hirL	ATCGCTTATTAAGATTAAAGTGG
ATS17 rev up hirL P1 compl	GTATTTTCTAGTATTATAGCACATTTAAAAA ATCTCCTTCTTGTTATATCTTAG
ATS18 fwd down hirL aad9 compl	CTATTTAAATAACAGATTAATAAAATTATAA TAAACTAAAAGTATTTTAAAAGGGATT
ATS19 rev 1000 down hirL	GTCTAAATGAATATCACCATTCC
ATS20 fwd 1000 up hirL	GTAATCAGCATGAAGCACAGG
ATS21 rev up hirL P1 compl	GTATTTTCTAGTATTATAGCACATTTAATAG AGCTGAACCATTTTCAGTTC
Fwd His-sfGFP	TACGCATATGCATCATCATCATCATAAA CATCTTACCGTTCTAAAG
Rev sfGFP no stop	TGCGGCCGCTCCACTAGTTTTG
Fwd sh3b-sfGFP compl.	CAAACTAGTGGAGCGGCCGCACCTAGTGG TGAAGCAAGTAAG

2.7 Bakteriestammer og plasmider

Tabell 2.7: Oversikt over bakteriestammer og plasmider benyttet i denne oppgaven.

Stamme	Karakteristikk/Art	Referanse
<i>S. dysgalactiae</i>		
ATS3	B237-3	Prof. Mogens Kilian
ATS4	B02-1	Prof. Mogens Kilian
ATS5	MA201-1	Prof. Mogens Kilian
ATS38	ATS5 renstryk på BHI	Dette arbeidet
ATS45	Med pFD116, elektroportert	Dette arbeidet
ATS47	NORM75	Oddvar Oppegaard (Chief physician at Haukeland University Hospital)

Stamme	Karakteristikk/Art	Referanse
<u>Andre streptokokk-arter</u>		
ATS12	<i>S. thermophilus</i> LMG18311	ATCC (BAA-250)
ATS13	<i>S. pyogenes</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS14	<i>S. bovis</i> NCTC 8177	Prof. Mogens Kilian
ATS15	<i>S. mutans</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS16	<i>S. equi subsp zooepidemicus</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS17	<i>S. porcinus</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS18	<i>S. agalactiae</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS19	<i>S. anginosus</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS20	<i>S. mitis</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS21	<i>S. oralis</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS22	<i>S. sanguinis</i> NTC7863	Prof. Mogens Kilian
ATS23	<i>S. sanguinis</i> , immun mutant	Dr. Katarzyna Piechowiak
ATS24	<i>S. gordonii</i> Challis	Prof. Mogens Kilian
ATS25	<i>S. salivarius</i> Subsp: <i>samuiuaius</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS26	<i>S. cricète</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS27	<i>S. phocae</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS28	<i>S. ratti</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS29	<i>S. fryi</i>	Prof. Mogens Kilian
ATS30	<i>S. vestibularis</i> 121 bb	Prof. Mogens Kilian
ATS31	<i>S. parasanguinis</i> sk236	Prof. Mogens Kilian
ATS32	<i>S. peronis</i> GTC 848	Prof. Mogens Kilian
ATS33	<i>S. infantis</i> , Sk140	Prof. Mogens Kilian
ATS34	<i>S. cristatus</i> , NCTC 12479	Prof. Mogens Kilian
ATS35	<i>S. gordonii</i> , NCTC7869	Prof. Mogens Kilian
ATS36	<i>S. uberis</i> M13-1	Prof. Mogens Kilian

Stamme	Karakteristikk/Art	Referanse
<i>E. Coli</i>		
ATS1	DH5 α	Invitrogen TM
ATS2	BL21	Invitrogen TM
ATS8	DH5 α , med pRSET A-CbpDDS	Dette arbeidet
ATS10	BL21, med pRSET A-CbpDDS	Dette arbeidet
ATS11	His-TEV. Ds689, BL21	Dr. Daniel Straume
ATS36	pRSET-sfGFP, DH5 α	Dette arbeidet
ATS37	pRSET-sfGFP, BL21	Dette arbeidet
ATS40	DH5 α med pFD116	Dr. Morten Kjos
DS227	DH5 α med <i>sfGFP</i> -amplikonet	Dr. Daniel Straume
<u>Plasmider og kassetter</u>		
P1-aad9	Spectinomycinkassett	Dr. Daniel Straume
MBP-His-TEV	His-TEV-templat	Dr. Daniel Straume
pRSET A	sfGFP-CbpD ^{SD}	Dr. Daniel Straume

2.8 Antibiotika

Tabell 2.8: Oversikt over antibiotika benyttet i denne oppgaven.

Antibiotika	Konsentrasjon	Leverandør
Ampicillin	100mg/ml	Sigma-Aldrich
Kanamycin	100mg/ml	Sigma-Aldrich
Spectinomycin	100mg/ml	Sigma-Aldrich

2.9 Induserpeptider

Tabell 2.9: Oversikt over induserpeptider benyttet i denne oppgaven.

Induserpeptid	Aminosyresekvens (N \rightarrow C)	Produsent
ComS1	EFDWWNLG	Research genetics, Inc
ComS2	QVDWWRL	Research genetics, Inc

2.10 Oppskrift SDS-page-geler

Tabell 2.10: Oppskrift på separasjonsgeler benyttet i denne oppgaven.

Oppskrift på separasjonsgeler (2 stk.)	12 %
ddH ₂ O	4,3ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5ml
10% SDS	0,1ml
40% akrylamid +0,8% bis-akrylamid	3,0ml
10% APS (fersk)	0,1ml
TEMED	0,005ml
Sluttvolum	10ml

Tabell 2.11: Oppskrift på stackinggeler benyttet i denne oppgaven.

Oppskrift på stackinggeler (2 stk.)	4 %
ddH ₂ O	3,15ml
0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25ml
10% SDS	0,05ml
40% akrylamid +0,8% bis-akrylamid	0,50ml
Bromfenolblå	0,05ml
10% APS (fersk)	0,05ml
TEMED	0,005ml
Sluttvolum	5,00ml

2.11 Utstyr

Tabell 2.12: Oversikt over utstyr benyttet i denne oppgaven.

Maskin	Modell	Leverandør
PCR-maskin	ProFlex PCR systems	Applied Biodynamics
Spektrofotometer	NanoDrop 2000	Thermo-Fischer Scientific
Mikroplateleser	Synergy H1 Hybrid Reader	BioTek®
Mikroskop	LSM700	Zeiss
UHPLC-maskin	Dionex UltiMate 3000	Thermo-Fisher Scientific
Fast prep	FastPrep® 24	MP™ Biomedicals
Gel-bildetaker	GelDoc-1000	BioRad
Gel-bildetaker	Azure Imager c400	Azure Biosystems
Proteinrenser	Äkta pure25 L	GE healthcare life sciences

3 Metoder

3.1 Kultivering av bakterier

3.1.1 Dyrkningsbetingelser av streptokokker

S. dysgalactiae ble dyrket i C-medium i lufttette rør på vannbad ved 37 °C, eller på BHI-plater i lufttette beholdere ved 37 °C. Oksygenet i beholderne ble fjernet ved bruk av AnaeroGen™-pose fra Oxoid som ble plassert i lufttette beholdere. Posen fjernet da oksygen. For å lagre *S. dysgalactiae* ble 15% (v/v) glyserol tilsatt som deretter ble fryst ved -80°C.

3.1.2 Escherichia coli

E. coli ble kultivert aerobt ved 37°C, enten på LB-agar eller i flytende LB-medium med risting. Passende antibiotika ble inkludert i vekstmediet ved behov. *E. coli* ble lagret på samme måte som tidligere beskrevet for streptokokker.

3.2 Dyrkning av bakterier i mikroplateleser

S. dysgalactiae ble dyrket i 5ml BHI medium til $OD_{550} = 0,5$. Deretter ble bakteriene fortynnet til $OD_{550} = 0,05$ i BHI, LB, TH, TSB og C-medium. Et volum på 300µl av de fem fortynnede kulturene ble overført til hver sin brønn i en 96-brønners mikrotiterplate. Platen ble inkubert ved 37°C og OD_{550} ble lest av automatisk hvert femte minutt. En blank ble brukt for hvert vekstmedium som referanseverdi. Når lytisk aktivitet til CbpD^{SD} ble testet, ble 0,3mM Sytox™ Green inkludert i brønnene med cellekultur. Sytox binder dobbeltrådig DNA og vil fluorescere når det er DNA bundet ved eksitasjon med 485nm lys. Sytox kan ikke krysse cellemembranen og fluorescence-signal vil derfor direkte korrelere med grad av cellelysis i kulturen.

3.3 Polymerase kjedereaksjon

Polymerase kjedereaksjon, fra nå av kalt PCR, er en metode som brukes til å lage mange kopier av en spesifikk DNA-sekvens. Den er basert på et DNA-templat, to sekvensspesifikke DNA-oligoer (såkalte primere), frie nukleotider og en DNA polymerase. Først må DNA-templatet denatureres ved høy temperatur, mellom 94-98°C. Deretter senkes temperaturen til ca. 50-60°C. Ved denne temperaturen vil primerne hybridisere til sine respektive sekvenser på DNA-templatet. Deretter endres temperaturen slik at DNA polymerasen får optimale betingelser for å syntetisere DNA med utgangspunkt i 3'-OH endene på primerne. Ved å

designe primere slik at den ene hybridiserer til såkalt forward templattråd og den andre hybridiserer til komplementær DNA-tråd, vil man i en PCR kunne syntetisere DNAet som er mellom primerne. Ved å repetere reaksjonen flere ganger vil antall kopier av DNAet mellom primerne dobles for hver reaksjon og dermed kopieres eksponentielt (Sambrook & Russell, 2006a).

Prinsippet bak PCR ble for første gang beskrevet av Kleppe et al. i 1971, men den gangen måtte man tilsette nytt DNA-polymeraseenzym for hver reaksjonssyklus. På 1980-tallet videreutviklet Dr. Kary B. Mullis og hans kollegaer metoden ved å oppdage en varmestabil DNA-polymerase fra *Thermus aquaticus*. Dermed kunne metoden automatiseres uten å tilsette nytt enzym for hver syklus (Saiki et al., 1988). Mot slutten av 1980-tallet, var dermed PCR blitt et svært viktig verktøy innen genetiske - og molekylære analyser.

Reaksjonen foregår i en PCR-maskin, en maskin som regulerer temperaturen nøyaktig for hvert trinn av syklusen og er lukket for å forhindre fordamping av prøvematerialet. De tre trinnene i PCR, som gjentas 25-35 ganger, består av følgende trinn: 1. Et denatureringstrinn. Som vist i Tabell 3.1, er temperaturen høy slik at dobbeltrådet DNA skal separeres til enkelttrådet DNA. 2. Primer-annealing: temperaturen vil senkes. Dette er for å tilrettelegge for at primerene skal binde seg til det enkelttrådede DNAet i prøven. Primerene ble designet med en smeltetemperatur (T_m) på 58-60°C for å redusere sannsynligheten for uspesifikk binding. Som siste 3' base ble en G eller en C valgt. Dette er for å skape en optimal hybridisering av primer til templat der DNA-polymerasen skal forlenge primeren, da disse basene binder med 3 hydrogenbånd. 3. I det siste trinnet, elongering, vil temperaturen økes til 68-72°C avhengig av optimal temperatur for DNA-polymerasen som ble benyttet. DNA-polymerasen syntetiserer nytt DNA ut fra den frie 3' OH-gruppen på primerene. Elongeringstiden avhenger av lengde på DNA-fragmentet som skal amplifiseres. Jo lengre fragmentet er, jo lengre tid krever dette trinnet (Rahman, Uddin, Sultana, Moue, & Setu, 2013). Ved slutten av hver syklus vil det nylig syntetiserte PCR-produktet fungere som templat for neste syklus, noe som resulterer i en eksponentiell akkumulering av DNA i henhold til formelen 2^n der n står for antall sykler.

I dette arbeidet ble det brukt to ulike DNA-polymeraser. Phusion® polymerase har høy grad av proof-reading, og ble benyttet for reaksjoner der det var viktig å unngå innføring av mutasjoner i PCR-produktet, for eksempel når PCR-produktet skulle brukes videre i kloningsarbeid. RedTaq® polymerase ble brukt i reaksjoner der PCR-produktet ikke skulle brukes videre, for eksempel ved screening av transformanter. Typiske PCR-reaksjoner for

Phusion® og RedTaq® er angitt i henholdsvis tabell 3.1 og 3.3. Primere brukt i dette arbeidet er listet i avsnitt 2.7.

Tabell 3.1: PCR. innholdet i blandingen brukt ved PCR ved bruk av Phusion® High-Fidelity polymerase.

Reagens	Volum	Konsentrasjon
Phusion® High-Fidelity buffer	10µl	5x
Templat DNA	1µl (10-100 ng)	
Fremover primer	2,5µl	(10µM)
Revers primer	2,5µl	(10µM)
Phusion® DNA Polymerase	0,5µl	0.02U/µl
dH ₂ O	32,5µl	
Sluttvolum	50µl	

Forholdene for PCR-reaksjonen ble tilpasset lengden på DNA-templatet, effektiviteten til DNA-polymerasen og smeltetemperaturen til primerene. Et standard program for en PCR-reaksjon er vist i Tabell 3.2.

Tabell 3.2: de ulike trinnene og syklusene i en PCR-reaksjon.

Prosess	Temperatur i °C	Tid	Antall sykluser
Initiell denaturering	98	5-10 minutter	1
Denaturering	98	30 sekunder	25-30
Hybridisering	45-72	30 sekunder	
Polymerisering	72	X ¹ sekunder	
Sluttpolymerisering	72	5-10 minutter	1
Oppbevaring	4	∞	

¹30 sekunder per 1000 basepar for Phusion®, og 60 sekunder per 1000 bp for RedTaq®.

3.3.1 Screening med RedTaq

PCR-screening ble i dette arbeidet brukt som en rask og effektiv metode for å undersøke om et gitt DNA er til stede etter transformasjon av bakterier. PCR screening innebærer lysing av bakteriene etterfulgt av amplifisering av DNA med primere spesifikke for det introduserte DNAet. Til dette ble RedTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix brukt. Dette er en klar-til-bruk miks som inneholder buffer, dNTP, *Taq*-polymerase og en loading-dye. *E. coli* er en Gram-negativ bakterie og lyserer enkelt i første denatureringstrinn under PCR. De gangene det likevel var et problem, ble 1 µl cellekultur plassert i mikrobølgeovn på 850W i 2 minutter før

tilsetting til reaksjonsmikros. *S. dysgalactiae* er en Gram-positiv bakterie og viste seg å være vanskeligere å lysere. For å gjennomføre PCR-screening av *S. dysgalactiae*-kolonier eller DNA, ble FastPrep brukt slik som i Seksjon 3.10.1 Etter FastPrep ble plasmidet fra cellene isolert ved bruk av metode beskrevet seksjon Seksjon 3.5.

RedTaq miksen ble blandet med passende primere, DNA templat og dH₂O, som beskrevet i Tabell 3.3. Forholdene for PCR-reaksjonen er lik for RedTaq® som for Phusion®, med tilpasning av polymeriseringstid basert på effektiviteten til DNA-polymerasen.

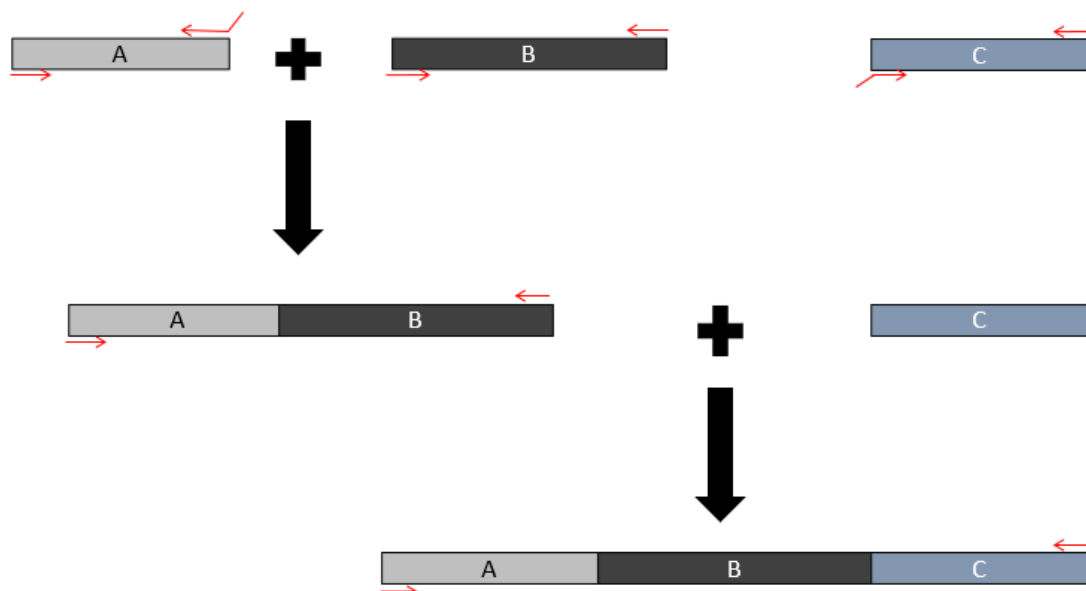
Tabell 3.3: PCR med RedTaq®. Oversikt over reagenser, volum og konsentrasjon til reagensene som er brukt i PCR-reaksjoner der RedTaq® er brukt som polymerase.

Reagens	Volum	Konsentrasjon
RedTaq® ReadyMix™ PCR reaction mix	5µl	2x
Templat DNA	1µl	
Fremover primer	1µl	10µM
Revers primer	1µl	10µM
dH ₂ O	2µl	
Sluttvolum	10µl	

3.3.2 Overlapp PCR

Overlapp PCR (kjent som «overlap extension PCR» på engelsk), er en metode for å fusjonere flere PCR-produkt sammen til ett større produkt. Overlapp PCR er en allsidig teknikk som kan brukes til å fusjonere gener, tagge gener, innføre mutasjoner eller deletere spesifikke sekvenser i et bestemt DNA-område. Metoden består av flere runder med PCR. I første runde amplifiseres hvert PCR-produkt slik at de har ender som overlapper med hverandre, altså 3'-enden på fragment A er komplementær med 5'-enden på fragment B, og 3'-enden på fragment B er igjen komplementær til 5'-enden på fragment C (Figur 3.1). Før neste PCR-reaksjon ble fragmentene A, B og C separert ved hjelp av agarose gelelektroforese og rensert slik som beskrevet i Seksjon 3.4. I den andre PCR-reaksjonen blandes fragment A og B i en reaksjon hvor begge brukes som templat i reaksjonen. De overlappende sekvensene vil da fungere som primere for polymerasen. Når de komplementære overlappene hybridiserer vil DNA polymerasen fylle inn «hullene» på samme måte som beskrevet i Seksjon 3.3.

I dette arbeidet ble overlapp PCR brukt for å konstruere genkassetter for å slå ut *cbpD* og *hirL*. Konstruktet ble laget slik som Figur 3.1 viser, der en *aad9*-kassett ble brukt som fragment B. *Aad9* inneholdt et gen for spectinomycinresistens (spectinomycin adenyl transferase) og denne egenskapen ble brukt som seleksjonsmarkør. Tre ulike fragmenter ble amplifisert ved hjelp av PCR med overlappende ender: en spectinomycin resistensmarkør, homologe regioner (for homolog rekombinasjon, se Seksjon 1.5) oppstrøms og nedstrøms for *cbpD*. I tillegg ble tre ulike fragmenter amplifisert med homologe ender til *hirL*. Fragmentene ble skjøtet sammen i de to siste trinnene ved bruk av overlapp PCR etter at alle fragmentene var amplifisert. I begge tilfellene var *aad9* midtstykket.



Figur 3.1: Overlapp PCR. figuren viser bruk av overlapp PCR for å skjøte sammen 3 fragmenter. Boksene forestillir dobbeltråd DNA-sekvenser. De røde pilene indikerer primere ($3' \rightarrow 5'$).

3.4 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en metode for å separere DNA-fragmenter etter størrelse. Når smeltet agarose kjøles ned, danner agarosen heliksfibre som holdes sammen av hydrogenbindinger som igjen danner porer av ulik størrelse i agarosegelen. Ved å sette agarosegelen i et elektrisk felt, tvinges de negativt ladde DNA-molekylene gjennom porene i gelen mot anoden (positiv pol). Korte DNA-molekyler møter mindre motstand ved at de vandrer lettere gjennom porene og vil dermed vandre raskere gjennom gelen enn større DNA-molekyler. På denne måten separeres molekylene etter størrelse. For å visualisere DNA-

molekylene etter elektroforesen, ble det i denne oppgaven tilsatt PeqGreen til agarosegelen. En binding av DNA til PeqGreen vil endre energinivået i ett eller flere kovalente bånd i PeqGreen-molekylet. Denne endringen gjør at elektronene eksiteres av UV-lys. Når disse eksiterte elektronene så går ned ett eller flere energinivå, frigjøres energi i form av synlig lys. Lyset kan detekteres i en Gel Doc-1000 (Bio-Rad) som DNA-bånd. Dermed er det kun PeqGreen bundet til DNA som vil vise på bildet.

I dette arbeidet ble det brukt 1% (w/v) agarosegeler for separering av DNA-molekyler. Agarosegelen ble laget ved å tilsette 0,5g til 50ml 1x TAE før blandingen ble varmet i mikroovnen til kokepunktet. Løsningen ble kjølt ned til ca. 60°C og 1µl PeqGreen ble så tilsatt. Gelen ble helt ut i en støpeform, og brønner ble dannet ved å plassere plastkammer som dannet ønsket størrelse på brønnene i gelen. Agarosegelen ble satt til å stivne ved romtemperatur i ca. 30 minutter. DNA-prøver ble blandet i 5:1 forhold med 6x loadingbuffer. Loadingbufferen inneholder blant annet sukrose som bidrar til at prøven får høy tetthet og synker til bunnen av brønnen, samt bromfenolblå for å visualisere prøven. Elektroforesen ble utført ved 90V i 20-30 minutter.

3.4.1 Rensing av DNA fra agarosegel

For å rense DNA-fragmenter som skulle brukes videre fra agarosegeler, ble Nucleospin® Gel og PCR Clean-up kit fra Macherey-Nagel brukt. Først ble det ønskede DNA-fragmentet visualisert ved å bruke GelDoc slik at båndene kom tydelig frem. Etter dette ble fremgangsmåten som fulgte med kittet benyttet; ønsket fragment ble kuttet ut av gelen med en steril skalpell. Gelbiten ble løst opp i 200µl NTI per 100mg gel ved 55°C. Den oppløste gelbiten ble overført til en Nucleospin® Gel og PCR Clean-up kolonne med et tilhørende oppsamlingsrør. Kolonnen med oppsamlingsrøret ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 min, slik at DNA kunne binde seg til kolonnen. NTI-bufferen inneholder salter som er kaotropiske. Disse reduserer den hydrofobe effekten som tilrettelegger binding til silicamembranen. Etter sentrifugeringen ble innholdet i oppsamlingsrøret kastet.

Neste trinn er et vasketrinn der 700µl buffer NT3 blir tilsatt, før kolonnen og oppsamlingsrøret blir sentrifugert i 30 sekunder ved 13 000 x g. NT3 inneholder etanol og fjerner kontamineringer og salter fra kolonnen uten at DNAet løsner fra silicamembranen. Innholdet i oppsamlingsrøret ble kastet og kolonnen og oppsamlingsrøret ble sentrifugert i 1 minutt på 13 000 x g for å tørke kolonnen. Kolonnen ble så plassert i et nytt eppendorfrør og

tilsatt 15-40µl elueringsbuffer ut fra forventet og ønsket konsentrasjon av produktet. DNA vil ved tilsetning av elueringsbuffer, som er noe basisk buffer (pH 8.0) uten salter, slippe membranen. Etter ett minutt inkubering ved romtemperatur, ble DNA eluert ved 13 000 x g i 1 minutt. Renset DNA ble lagret ved -20°C.

3.5 Isolering av plasmid

Plasmid ble rensset ved å bruke E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I fra Omega. Kittet utnytter plasmidets egenskaper til å binde eller slippe en silicamembran, avhengig av hvilke løsninger som tilsettes før kolonnene sentrifugeres. Prosedyren er fulgt direkte fra fremgangsmåten som følger med kittet; E.Z.N.A HiBind® DNA minikolonner ble ekvilibrert ved å tilsette 50µl ekvilibreringsbuffer til kolonnen og sentrifugering ved 13 000 x g i ett minutt. Cellepelletten ble resuspendert i 250µl løsning I, som er en resuspansjonsbuffer med RNaseA slik at potensiell RNA ble degradert. Cellene ble lysert ved å tilsette 250µl løsning II, som er en alkalisk lysisbuffer. Det skal nå bli et klart lysat. 350µl løsning III ble tilsatt for å nøytralisere den alkaliske pH-en, noe som fører til felling av kromosalt DNA, proteiner og cellulært avfall, mens plasmidet blir igjen i løsningen. Avfallet ble fjernet ved sentrifugering og den klare supernatanten ble overført til en ekvilibrert HiBind® minikolonne etterfulgt av sentrifugering ved 13 000 x g i 30 sekunder. Det bundne plasmidet ble så vasket med HBC-vaskebuffer med tilsatt isopropanol og en vaskebuffer som inneholdt etanol. Etter vasking ble den tomme kolonnen sentrifugert ved 13 000 x g i ett minutt for å tørke kolonnen og fjerne den resterende alkoholen. Plasmidet ble eluert ved å tilsette 30-100µl elueringsbuffer, og eluatet med plasmidet kunne deretter lagres på -20°C.

3.6 Restriksjonskutting og ligering

Restriksjonszymer finnes i bakterier hvor de virker som en forsvarsmekanisme mot fremmed DNA som entrer cellen, eksempelvis via virus, ved å kløyve DNA-er. Disse enzymene er sekvensspesifikke og har derfor blitt en essensiell del av DNA-kloningsarbeid. I dag er flere enn 800 ulike restriksjonszymer kommersielt tilgjengelig. Ved å kombinere restriksjonszymer og DNA-ligaser, kan man kutte og «lime» sammen DNA-molekyler for å oppnå ønsket DNA-konstrukt. I dette arbeidet ble restriksjonskutting benyttet for å åpne plasmider og ligere DNA-fragmenter inn i plasmidet. Restriksjonskutting ble gjort ved bruk av reagensene i Tabell 3.4. Alkalisk fosfatase ble i tillegg tilsatt til rør med plasmid for å

forhindre re-ligering ved at fosfatase fjerner 5' fosfatgrupper på det kuttete plasmidet.

Blandingen ble så inkubert på vannbad på 37°C i 1-2 timer.

Tabell 3.4: Restriksjonskutting. Oversikt over reagenser brukt i restriksjonskutting ved bruk av NdeI og HindII.

Reagens	Mengde
NdeI	1µl
HindIII	1µl
DNA	25µl (200-500 ng)
10X 2.1 buffer	3µl
Totalvolum	30 µl

Ligering er en metode for å feste DNA-fragmenter til hverandre. Det kan for eksempel være et DNA-fragment som liggeres inn i et plasmid. Det tilsettes da en DNA-ligase som gjør at fragmentene fester seg til hverandre. I Tabell 3.5 vises en oversikt over reagenser som ble brukt i ligeringsreaksjoner i denne oppgaven. Reaksjonen ble så inkubert i romtemperatur i fem minutter.

Tabell 3.5: Ligeringsreaksjoner. Oversikt over reagenser brukt i ligeringsreaksjoner.

Reagens	Mengde
Quick ligase	1µl
Plasmid	4µl (20-50 ng)
PCR produkt	5µl (20-50 ng)
2x ligerings buffer	10µl

3.7 Transformasjon av bakterier

Metoder for å kunne transformere DNA inn i bakterier er essensielt for genetisk - og molekylærbiologisk forskning. Ettersom det er et stort behov for å kunne transformere DNA inn i bakterier på en effektiv og kontrollert måte, er det utviklet to hoved metoder for dette, herunder kjemotransformasjon og elektroporering (Aune & Aachmann, 2010). I denne masteroppgaven ble elektroporering og naturlig transformasjon brukt.

3.7.1 Transformasjon av *E. coli*

For å introdusere DNA inn i *E. Coli*, ble varmesjokktransformasjon benyttet. I denne metoden må *E. coli* først gjøres såkalt kjemisk kompetent. For å lage kjemisk kompetente *E. coli* BL21 og DH5 α , ble en tett kultur ($OD_{600} = 0,6 - 0,8$) fortynnet til en OD_{600} på 0,05. Videre ble kulturen dyrket til en OD_{600} på 0,4 før cellene ble høstet ved 4000 x g i 5 minutter på 4°C. De resterende trinnene ble utført på is. Pelleten ble resuspendert i halvparten av kulturvolumet av 0,1M CaCl₂ og inkubert på is i én til to timer. Cellene ble så sentrifugert og pelleten ble resuspendert i 1/10 kulturvolum av 0,1M CaCl₂. For lagring, ble cellene tilsatt iskald steril glyserol til en sluttkonsentrasjon på 15% (v/v) og lagret i -80°C. Rollen til Ca²⁺ er ikke helt kjent, men den danner mulig en kation-bro mellom fosfatene i DNA og de negativt ladde gruppene i fosforylat-lipid A i cellemembranen. Dermed vil CaCl₂ tilrettelegge for binding av DNA til celleoverflaten. Varmesjokket vil da kunne hjelpe det festede DNAet å entre cellen (Sambrook & Russell, 2006b).

Kjemisk kompetente *E. coli* og plasmidet ble tint på is. 50 μ l DH5 α celler ble tilsatt til et kaldt rør sammen med 1 μ l rensset plasmid eller 10 μ l plasmid fra ligeringsreaksjon. Innholdet i røret ble blandet forsiktig og inkubert på is i én time. Cellene ble så utsatt for et varmesjokk på 42°C i 35 sekunder, før de ble plassert på is i to minutter. 450 μ l SOC-medium ble tilsatt til røret, og ble deretter inkubert ved 37°C og risting i én time. Avhengig av om cellene var transformert med rensset plasmid eller en ligeringsreaksjon, ble henholdsvis 50 μ l eller hele volumet (500 μ l) sådd ut på LB-agar med egnet antibiotika. I dette arbeidet ble 100 μ g/ml ampicillin benyttet for seleksjon av transformanter med pRSET A-baserte plasmid. Platen ble inkubert over natten på 37°C. Koloniene som vokste frem, ble plukket med en steril tannpirker og overført til et rør med LB medium med 100 μ g/ml ampicillin. Røret ble inkubert ved 37°C med risting, inntil vekst ble observert. Kulturene ble deretter screenet, slik som beskrevet i Seksjon 3.3.1.

3.7.2 Transformasjon av *S. dysgalactiae*

3.7.2.1 Elektroporering

Da det var uklart om *S. dysgalactiae*-isolatene benyttet i dette arbeidet kunne transformeres via induksjon av naturlig kompetanse, ble fremmed DNA introdusert ved å benytte elektroporering. Ved å utsette en bakterie for et elektrisk støt, antar man at cellemembranen destabiliseres til en viss grad slik at små porer dannes. I tillegg vil det elektriske feltet indusere en spenningsforskjell mellom utsiden og innsiden av membranen. DNA som er

negativt ladd vil da få mulighet til å entre cytoplasma gjennom porene ved vandring mot den positivt ladde polen (Weaver, 1996).

S. dysgalactiae ble elektroporert på samme måte som beskrevet av Kimoto et al., men med få modifikasjoner (Kimoto & Taketo, 2003). Cellene ble gjort elektrokompetente ved å dyrke *S. dysgalactiae* til en OD₅₅₀ på 0,3. Videre foregikk alt på is; kulturen ble sentrifugert på 4000 x g og cellene ble vasket tre ganger med 10% glyserol. Etter vasking ble pelleten løst i 20% glyserol, fordelt i rør og fryst på -80°C.

De elektrokompetente cellene ble tint på is, før omtrent 500ng plasmid ble tilsatt til 50µl elektrokompetente celler. Blandingen ble overført til en iskald, tørr elektroporeringskvyvette og elektroporering ble utført med følgende parametere: 2,1kV, 100W og 25µF. 950µl C-medium ble tilsatt og cellene ble inkubert i to timer på 37°C. De ble så sådd ut på BHI-skåler med 100µg/ml spectinomycin og satt til dyrking over natt ved 37°C. Den påfølgende dagen ble koloniene plukket med tannpirker og satt til vekst i C-medium tilsatt 75µg/ml spectinomycin.

3.7.2.2 Naturlig transformasjon

For å teste om *S. dysgalactiae*-isolater var naturlig kompetente for genetisk transformasjon, ble ComS-induserpeptid brukt. Peptidet ble testet for om det kunne inducere naturlig kompetanse i ulike *S. dysgalactiae*-stammer (Tabell 2.8). Induksjon av naturlig kompetanse og transformasjon i *S. dysgalactiae* ble gjennomført på følgende måte: Det ble gjort klart en transformasjonsreaksjon og en negativ kontroll for hver stamme som skulle transformeres. I transformasjonsreaksjonen ble det tilsatt 2,5µl ComS (100ng/µl) og 10µl av et av de to DNA-fragmentene (*DcbpD::aad9* og *DhirL::aad9*) i hver prøve. Til negativ kontroll ble det ikke tilsatt DNA. *S. dysgalactiae* ble dyrket til en OD₅₅₀ på ca. 0,3 og deretter ble 1mL av kulturen tilsatt til rørene. Rørene ble satt på 37°C for vekst på vannbad i to timer, før kulturen ble sådd ut på BHI-plater med 100µg/ml spectinomycin for seleksjon. Etter anaerob inkubasjon over natt på 37°C, ble eventuelle kolonier plukket for screening (Seksjon 3.3.1) og oppdyrking i C-medium tilsatt spectinomycin (100µg/ml).

3.8 DNA-sekvensering

Etter at såkalt neste-generasjon-sekvensering ble etablert tidlig på 2000-tallet, har DNA-sekvensering blitt mye mer effektivt og billig for å sekvensere store mengder DNA. Den tradisjonelle sangersekvenseringsmetoden (også kalt kjedetermineringsreaksjon) er derimot fortsatt det beste og billigste alternativet for å sekvensere enkeltgener eller andre DNA-sekvenser generert gjennom DNA-kloningsarbeid. Her brukes en DNA-polymerase for å legge til spesifikke deler av DNAet med et enkelttrådet DNA som templat. I tillegg krever metoden en primer for sekvensering, deoksynukleotidtrifosfater (dNTP) og dideoksynukleotider (ddNTP). Sistnevnte nukleotider mangler 3-OH gruppen og merkes med fluorokromer spesifikk for hver basetype, som gir ut lys i ulike bølgelengder.

Selve sekvenseringsreaksjonen vil starte med å hybridisere sekvenseringsprimeren til templatet. Videre skjer reaksjoner hvor dNTP og ddNTP inkorporeres. Ekstensjonen avsluttes når ddNTPer inkorporeres på grunn av den manglende 3-OH gruppen, noe som gjør det umulig å legge til flere baser i tråden. Siden ddNTPene inkorporeres tilfeldig, vil kjedeterminering statistisk sett forekomme for hver base i sekvensen til templatet, og resultere i DNA-fragmenter som skilles fra hverandre med en bases lengde. Videre vil prøven, som nå inneholder flere fragmenter av ulike størrelser, separeres på bakgrunn av dette i en polyakrylamid elektroforese. En laser vil lese av fluorokromsignalene og dermed tolke rekkefølgen av nukleotidene (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977; Shendure et al., 2017).

I dette arbeidet ble sangersekvensering brukt for å sekvensere flere ulike DNA-fragmenter for å bekrefte at sekvensen var slik som ønsket. DNA sekvenseringsreaksjoner ble laget som følger: 5µl templat (plasmid DNA/PCR produkt [80-100 ng/µl]), 2µl sekvenseringsprimer (10µM) og 3µl dH₂O. Reaksjonen utføres i en termosyklus, som beskrevet for PCR, men ettersom det bare er én primer per sekvenseringsreaksjon, vil det kun syntetiseres DNA i én retning. En vellykket sekvensering gir en sekvens på ca. 1000 baser.

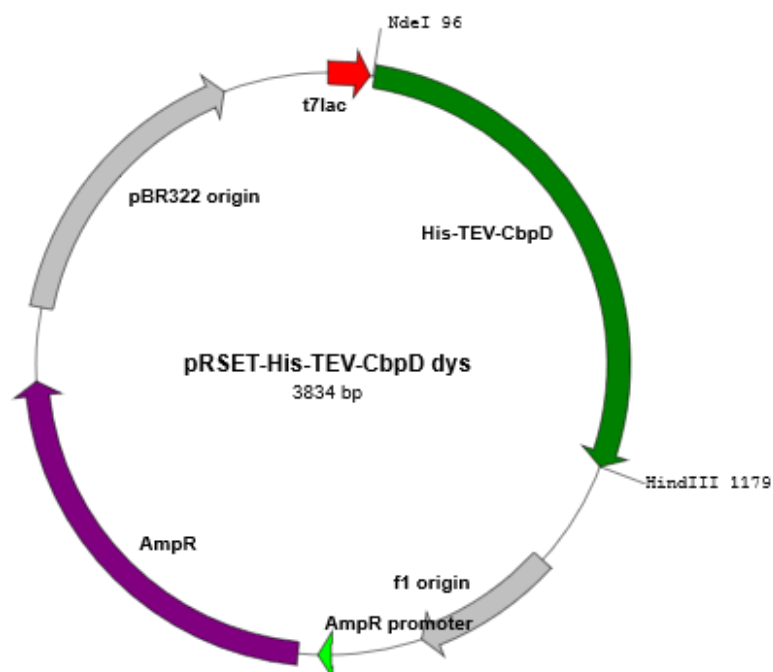
3.9 DNA-kloning

3.9.1 Konstruksjon av pRSET-His-TEV-cbpD^{SD} og pRSET-sfGFP-cbpD^{SD}

For å studere CbpD^{SD}, var det nødvendig å få enzymet i rensert form. *cbpD* i *S. dysgalactiae* ble amplifisert ved bruk av PCR og primerparet ATS1 og ATS2 (sekvens beskrevet i Tabell 2.7).

Primerene var designet for å introdusere en sekvens som koder for en polyhistidin tag (6xHis-tag), etterfulgt av en målsekvens for TEV-protease i N-terminal ende av CbpD^{SD}. TEV-protease er en endopeptidase som originalt kommer fra «tobakk etch»-viruset som kutter mellom glutamin og glycin i den spesifikke målsekvensen H₂N-ENLYFQG-COOH (Cesaratto & Petris, 2016). Denne målsekvensen ble innført slik at det skulle være mulig å kutte His-taggen av His-CbpD^{SD} etter rensing. I tillegg introduserte fremoverprimeren kuttasetet til restriksjonsenzymet NdeI, mens reversprimeren introduserte kuttasetet til restriksjonsenzymet HindIII. PCR-produktet ble separert på agarosegel og rensset fra gel, slik som beskrevet under henholdsvis Seksjon 3.4 og 3.4.1.

Det rensede produktet ble ligert inn i plasmidet pRSET A, som er et plasmid som brukes til overuttrykking av proteiner i *E. coli*. For å lage *His-sfgfp-cbpD*-fusjonsgenet, ble det brukt PCR-overlapp slik som beskrevet i Seksjon 3.3.2. Her ble CHAP-domenet i CbpD^{SD} byttet ut med sfGFP. Primer for reverskonservert domene (Tabell 2.7) og framover for sfGFP, ble dermed brukt i det siste trinnet av metoden. *sfGFP-CbpD* ble laget ved bruk av overlapp-PCR, hvor de to fragmentene sfGFP og CbpD ble spleiset sammen. Videre ble fragmentet klonet inn i DH5α og BL21 slik som beskrevet i Seksjon 3.7.1. Proteinene ble overuttrykt (Seksjon 3.10), og rensset på HPLC (Seksjon 3.18).



Figur 3.2: Plasmid pRSET-His-TEV-CbpD^{SD}. Oversikt over pRSET A-plasmidet med insersjon og kuttasetet.

TEV-protease benyttes ofte på forskningslaboratoriet hvor oppgaven er skrevet, og derfor eksisterte det allerede en *E. coli* BL21 med et pRSET-His-TEV-proteaseplasmid klonet inn.

3.10 Overuttrykking av rekombinant CbpD^{SD} og sfGFP-CbpD^{SD}

Rekombinant CbpD^{SD}, sfGFP-CbpD^{SD} og TEV-protease ble overuttrykt i *E. coli* BL21. Fordelen med å bruke *E. coli* ved rensing av protein er at den har en veldig hurtig delingstid, hvor den best sett kan være nede i 20 minutter per generasjon. *E. coli* BL21 mangler Lon-protease som degraderer fremmede proteiner, i tillegg til protease OmpT som degraderer ekstracellulære proteiner. BL21 uttrykker også T7 RNA-polymerase som gjenkjenner T7-promotoren oppstrøms for *cbpD* i plasmidet (Donahue Jr & Bebee, 1999; Rosano & Ceccarelli, 2014). En 100ml pre-kultur med BL21 celler som inneholdt pRSET-cbpD^{SD}, pRSET-His-sfGFP-CbpD^{SD} eller pRSET-His-TEV-protease ble dyrket til en OD₆₀₀ på 0,5. Videre ble denne kulturen fortynnet til OD₆₀₀ = 0,1 i 500ml LB-medium og dyrket til en OD₆₀₀ på 0,4. 100mM IPTG ble tilsatt kulturen for å indusere overuttrykking av His-CbpD^{SD}, og kulturen ble satt på 25°C med risting i fire timer. Kulturen ble deretter sentrifugert på 7000 x g i 5 minutter, supernatanten ble dekantert og pelleten ble fryst ved -20°C.

3.10.1 Lysering av *E. coli*

For å få cellene til å lysere slik at det utrykte proteinet kunne bli frigjort i løsningen, ble pelleten fra Seksjon 3.10 resuspendert i buffer A (se Tabell 2.2) og tilsatt 0,5g syrevaskede glasskuler (<106 µm) per 1,5ml cellesuspensjon. Cellene ble deretter mekanisk knust ved hjelp av risting i en FastPrep 24®-maskin med en hastighet på 6,5m/s i 3x20 sekunder. Blandingen ble så sentrifugert på 13 000 x g i 5 minutter og supernatanten ble overført til nye rør, da de løselige proteinene befant seg her.

3.10.2 IMAC

IMAC står for “immobilized-metal affinity chromatography”, og er en proteinrensem metode som utnytter evnen histidin og cystein har til å binde divalente kationer. Den vanligste bruken av IMAC er for rensing av rekombinante proteiner med en Histidin-tag (His-tag) festet på. Histidintaggen består av seks eller flere histidinresiduer (Block et al., 2009). Når et protein med en His-tag sendes gjennom en nikkelkolonne (Ni²⁺), vil proteinet feste seg til nikkellionene i kolonnen og dermed vil de resterende stoffene i prøven skilles fra proteinet ved at de sendes gjennom kolonnen. Eluering av proteinet gjøres ved å tilsette økende mengder

imidazole, som har den samme funksjonelle gruppen som histidin, og vil derfor utkonkurrere His-taggen for binding til Ni^{2+} .

I dette forsøket ble kolonnen først ekvilibrert ved å tilsette buffer A. Videre ble lysatet med His-CbpD^{SD} eller His-TEV tilsatt til kolonnen for å binde His-CbpD^{SD} eller His-TEV til Ni^{2+} . Deretter ble kolonnen vasket med 10x kolonnevolum av buffer A, slik at ubundne proteiner og andre kontaminanter ble sendt gjennom. Buffer B, som inneholder mye imidazol (500mM), ble så sendt gjennom. Dette er fordi imidazol har affinitet til Ni^{2+} , og i store mengder vil imidazolen i bufferen dermed binde seg til kolonnen og det His-taggede proteinet vil løsne fra kolonnen og sendes ut. Det ble brukt en lineær gradient fra 20 til 500mM imidazol over 30 minutter for å eluere proteinene. Flow-raten var på 1ml/ml. Eluerte proteiner ble detektert ved 280nm og samlet i 1ml-fraksjoner.

3.10.3 Fjerning av His-tag i His-TEV-CbpD^{SD}

For å kutte av His-taggen fra CbpD^{SD}, ble proteinet tilsatt DTT til en sluttkonsentrasjon på 1mM og TEV-protease (10 μ g/ml sluttkonsentrasjon). Kuttereaksjonen ble inkubert ved 30°C i tre timer eller ved romtemperatur over natt. I noen tilfeller ble kortere inkubering benyttet ved 30°C, noe som er beskrevet i resultatdelen (se Seksjon 4.4).

3.11 SDS-PAGE

SDS-PAGE står for «sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese», og er en metode for å separere proteiner på bakgrunn av deres molekylære vekt. Akrylamid vil, sammen med bis-akrylamid ved tilsetning av ammoniumpersulfat (APS)10% og N,N,N',N'-

Tetramethylethylenediamine (TEMED), danne en polyakrylamid-gel med porer, som kan benyttes for å separere proteiner og DNA på samme måte som agarosegeler brukes for DNA.

En SDS-PAGE-gel består av en separasjonsgel og en såkalt «stacking gel». Separasjonsgelen ble laget ved å først sette opp to helt rene, kommersielle glassplater parallelt festet med en klamme og plassert slik at væsken som skulle tilsettes, ikke rant gjennom (BioRad). SDS-PAGE-geler ble laget ved hjelp av et «Protean Mini gel casting»-system fra Biorad.

Komponentene i separasjonsgelen ble blandet, som vist i Tabell 2.10. Da APS og TEMED var tilsatt, startet polymeriseringen. 3,2ml av blandingen ble raskt applisert mellom glassplatene i støpesystemet. Vann ble plassert forsiktig på toppen av separasjonsgelen før den hadde polymerisert. På grunn av lavere tetthet, la vannet seg på toppen og resultere i en helt vannrett

øvre kant på separasjonsgelen. En 4% stacking-gel ble så laget og tilsatt på toppen, og en plastkam til å dele gelen i brønner, ble satt på toppen.

Før elektroforese, behandles proteinene med en SDS-prøvebuffer (Tabell 2.2) ved 95°C i 5 minutter. SDS er en detergent som åpner og denaturerer molekylene ved å binde hydrofobt til polypeptidkjeden, og β -mercaptoetanol i bufferen er en reduserende agent som åpner disulfidbånd. Til sammen gjør dette at proteinet blir lineært og SDS gir proteinet en negativ ladning. Proteinene kan dermed separeres etter størrelse og sammenlignes med en størrelsesmarkør som inneholder proteiner av kjent størrelse. Kortere kjeder vil vandre raskere og dermed lengre i gelen, enn de lengre kjedene (Brunell, 2014). Elektroforesen ble utført i et kar med elektroforesebuffer ved 200V i rundt 45 minutter.

Etter gelelektroforese, ble de separerte proteinene i gelen visualisert ved å farge dem med Coomassie blue. Gelen ble plassert i Coomassie blue-fargeløsning og varmet opp til kokepunktet i en mikrobølgeovn. Deretter ble gelen farget i 10 minutter på et vippebord. Etter fargingen ble gelen skylt i vann, før ubunden Coomassie blue ble fjernet ved å inkubere gelen i avfargingsløsning i minst 60 minutter.

3.12 Dialyse av protein

For å fjerne imidazole og salter fra His-CbpD^{SD} etter IMAC-rensing, ble His-CbpD^{SD} dialysert mot 1 liter 10mM Tris-HCl med en pH 7,4. Dette ble utført ved å overføre rensed His-CbpD^{SD} til en rehydrert dialyseslange (spectrum®) med en porestørrelse på 12000-14000Da. Slangen med His-CbpD^{SD} i bufferen ble plassert på en magnetrører i to timer i romtemperatur for dialyse.

3.13 Test av aktiviteten til CbpD^{SD} mot *S. dysgalactiae* ved hjelp av Sytox GreenTM

Den lytiske aktiviteten til CbpD^{SD} mot streptokokker, ble detektert ved å observere reduksjon i celletetthet i tillegg til å måle økningen av mengde fritt DNA i cellekulturen. Til dette ble det benyttet en mikrotiterplateleser (Synergy H1 Hybrid Reader) og Sytox GreenTM. Sytox Green er en fluorokrom som fluorescerer når det binder DNA. Siden Sytox Green ikke kan krysse cytoplasmamembranen, vil en økning i fluorescens være direkte korrelert med cellelysis. *S. dysgalactiae* ble dyrket i C-medium i mikrotiterplater som rommet 300 μ l per brønn, og Sytox Green var tilsatt hver brønn til en sluttkonsentrasjon på 0,33mM. Sytox GreenTM eksiteres og

fluorescerer ved en bølgelengde på 485nm. Ved $OD_{550} = 0,25$ ble en 2-folds fortynningsrekke av CbpD^{SD} (0.15µg/ml til 1,83x10⁻⁵µg/ml) tilsatt brønnene i 3 paralleller. Kulturene ble så dyrket videre i 150 minutter. For å teste aktiviteten til CbpD^{SD} mot *S. dysgalactiae*, ble 20µl sytox og 280µl kultur tilsatt til brønnene.

3.13.1 Test av aktiviteten til CbpD^{SD} mot andre streptokokkarter

Den lytiske aktiviteten ble, på samme måte som i Seksjon 3.13, målt i en mikrotiterplateleser der endring i celletetthet ble målt. De ulike streptokokkartene CbpD^{SD} ble testet mot, ble dyrket i C-medium og tilsatt til en mikrotiterplate ved OD_{550} på 0,05. Etter hvert som hver kultur nådde $OD_{550} = 0,25$ ble 5µg CbpD^{SD} tilsatt brønnene.

3.14 Test av effekt av EDTA og DTT

For å teste aktiviteten til CbpD^{SD} tilsatt EDTA eller DTT, ble 1mM av hvert stoff tilsatt til hver sin brønn i en mikrotiterplate sammen med 5µg/µl CbpD^{SD}. Det ble også tilsatt 1mM EDTA og 1mM DTT til hver sin brønn uten CbpD for å teste om disse hadde veksthemmende effekt alene. 280µl kultur av *S. dysgalactiae* ble så tilsatt til alle brønnene og platen ble plassert i en plateleser på 37°C. OD_{500} ble så registrert i 500 minutter.

3.15 Mikroskopi

Mikroskopiske analyser av bakterier ble utført ved å bruke et Zeiss LM700 mikroskop, med et 100x fasekontrastobjektiv. Bakterier ble dyrket til OD_{550} på 0,2-0,3 før 0,5µl kultur ble tilsatt til et mikroskopiglass dekket med 1,2% (w/v) agarose-PBS. Bildene ble tatt med et ORCA-Flash 4.0 V2 Digital CMOS-kamera (Hamamatsu Phoetics) koblet til mikroskopet.

Programmet imageJ ble benyttet for å analysere bildene.

For å kunne se hvor på celleoverflaten CbpD^{SD} vanligvis binder, ble rensed His-sfGFP-CbpD^{SD} benyttet. Aktuelle streptokokkarter ble dyrket i 5ml kulturer til $OD_{550} = 0,2-0,3$. Cellene ble deretter høstet ved 4000 x g og vasket én gang med 1ml PSB. Cellene ble så resuspendert i 500µl PSB-T (0,05% Tween 20) som inneholdt 15µg/ml His-sfGFP-CbpD^{SD}. Etter 8 minutter inkubasjon i mørket ved romtemperatur, ble bakteriene vasket 3 ganger med PBS. Pelleten ble så resuspendert i 100-200µl PBS. Til slutt ble 0,5µl GFP-merket cellesuspensjon applisert på mikroskopiglass på samme måte som ved vanlig mikroskopering. GFP eksiteres ved en bølgelengde på 480nm, og bildene ble derfor tatt ved lys i denne

bølgelengden. Bildene som ble tatt i mikroskop ble analysert med imageJ og plug-in pakken microbeJ.

3.16 Zymografi

Zymografi er en metode for å undersøke kollagendegradering og ble for første gang benyttet i 1962. Metoden, som nå eksempelvis blir brukt til å detektere aktiviteten til celleveggshydrolaser, er basert på at celler støpes inn i en SDS-PAGE-gel slik at dette kan benyttes som substrat til CbpD^{SD}. Celleveggshydrolasene tilsettes til brønner på samme måte som en prøve tilsettes under SDS-PAGE, og etter et protein-refoldingstrinn detekteres aktiviteten til enzymet av klare soner i den ellers hvitfargede gelen (Vandooren, Geurts, Martens, Van den Steen, & Opdenakker, 2013).

Gelen ble laget ved at 300ml *S. dysgalactiae* ma201 ble dyrket opp til en OD₅₅₀ på 0,3 før cellene ble høstet ved 7000 x g i 5 minutter. Cellepelleten ble så løst i 1,25ml 1,5M Tris-HCl, pH 8,8. Cellene ble videre varmeinaktivert i 5 minutter på 95°C før de ble tilsatt til en SDS-PAGE-separasjonsgel som ble laget på samme måte som beskrevet i Seksjon 3.11. Cellene ble tilsatt før gelen polymeriserte. En stacking-gel ble så laget (Seksjon 3.11). En 10ml kultur av *S. dysgalactiae* ble indusert med 250ng/μl ComS ved OD₅₅₀ = 0,2. Det ble tatt ut prøver ved tid 0, 10, 20, 30, 40, 50 og 60 minutter. Cellene fra disse prøvene ble pelletert ved 16 000 x g og resuspendert i 50% av prøvevolum 1x SDS-samplebuffer. Deretter ble prøvene behandlet videre for SDS-PAGE. Renset His-CbpD^{SD} (4μg) ble brukt som kontroll. Alle prøvene ble kokt i 5 minutter med 50% sample-buffer før de ble tilsatt til brønnene. Karet (Bio-Rad) som inneholdt gelen ble så tilført 200V strøm i 40 minutter. Etter dette ble gelen vasket 2x30 minutter i vann, og deretter tilsatt en refoldings-buffer, slik at enzymet kunne refolde og bli aktivt igjen. Gelen lå i denne bufferen i 2 dager.

3.17 Isolering av cellevegg

Cellvegg ble isolert fra *S. dysgalactiae* dyrket i BHI-medium, da C-medium er mye mer tidkrevende å lage. 1 liter kultur ble dyrket til en OD₅₅₀ på omtrent 0,4, før cellene ble høstet ved 10 000 x g i 10 minutter. Pelleten ble så resuspendert i 40ml iskald 50mM Tris/HCl med en pH på 7,0. Blandingen ble så tilsatt dråpevis til 120ml kokende 5% SDS-løsning med kraftig røring. Etter 15 minutter koking ble løsningen kjølt ned til romtemperatur og sentrifugert på 12 000 x g i 10 minutter. SDS i pelleten ble vasket bort ved å utføre følgende vasketrinn: to ganger med 20ml 1M NaCl og fire ganger med 20ml dH₂O. Etter siste

vasketrinn ble pelleten resuspendert i 2ml dH₂O som ble fordelt i to rør inneholdende 0,5g syrevaskede glasskuler (<106 µm, Sigma). En FastPrep FP120 (Bio 101) ble brukt til å fragmentere celleveggene med 6-8 ganger 20 sekunder på 6,5m/s. For å fjerne resterende hele bakterier og glasskulene, ble prøvevolumet justert til 25ml med dH₂O før et sentrifugeringstrinn ved 2000 x g i 5 minutter. Etter dette ble celleveggen høste ved 25 000 x g i 15 minutter. Pelleten ble så resuspendert i 2 ml 100mM Tris/HCl med en pH på 7,5 og med 20mM MgSO₄. DNase og RNase ble tilsatt med en sluttkonsentrasjon på henholdsvis 10µg/ml og 50µg/ml før prøven ble inkubert på 37°C i 18 timer ved risting.

Etter inkubasjonen ble SDS tilsatt fra en 8% løsning til en sluttkonsentrasjon på 1%. Prøven ble inkubert på 80°C i 15 minutter og volumet ble så justert med vann til 20ml. Celleveggen ble så sentrifugert på 13000 x g i 30 minutter i egnede glassrør. Pelleten ble resuspendert i 10ml 8M LiCl og inkubert på 37°C i 15 minutter, og celleveggen ble igjen sentrifugert på 13000 x g i 30 minutter. Pelleten resuspendertes så i 10ml 100mM EDTA med en pH 7,0 og ble inkubert på 37°C i 15 minutt. Den ble igjen sentrifugert på lik hastighet over samme tid. Etter dette ble følgende vasketrinn utført; 20ml dH₂O, så 20ml aceton, før nye 20ml dH₂O. Etter siste sentrifugering ble pelleten resuspendert i 2ml med vann og overført til to forhåndsveide eppendorfrør. Celleveggen ble så tørket i en vakumtørker (Savant). Tørrvekten til cellevegg ble bestemt, og ut fra vekten ble et volum dH₂O tilsatt til å gi en sluttkonsentrasjon på 25mg/ml. Celleveggen ble lagret ved -80°C.

3.18 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC er en form for kromatografi som kan brukes til å separere, identifisere og kvantifisere forbindelser i en prøve. Metoden krever en kolonne (stasjonær fase), en pumpe som pumper den mobile fasen (væsken) gjennom kolonnen, og en detektor som registrerer tiden det tar for en forbindelse å bevege seg gjennom kolonnen. I dette forsøket ble reversfasekromatografi benyttet. Metoden er basert på å separere molekyler, avhengig av deres hydrofobe interaksjoner, med det hydrofobe materialet i kolonnen (stasjonære fasen) (Malviya, Bansal, Pal, & Sharma, 2010).

I dette forsøket ble følgende prøver preparert: a) cellevegg (200µg), b) CbpD (5µg), c) cellevegg + mutanolysin (20 units), d) cellevegg + DTT (1M), e) cellevegg + CbpD + DTT og f) cellevegg + CbpD. CbpD ble målt til en konsentrasjon på 0,608ng/µl. Alle prøvene ble justert til 25µl ved å tilsette dH₂O. De ble så satt til inkubasjon på 37°C over natt. Etter dette

ble prøvene varmebehandlet på 90°C i 20 minutter for å felle ut CbpD og mutanolsin. 1µl (20% v/v) fosforsyre ble tilsatt for å justere pH til 2-3 slik at alle peptidene fikk lik ladning og dermed lik hydrofobisitet. Dette er for å unngå at et peptid eluerer i flere topper i stedet for at det blir en topp per type peptid. Prøvene ble sentrifugert på 13 000 x g i 5 minutter før tilsetning til HPLC-maskinen. Under analysen ble en Vydac 218 TP C18 5u kolonne (Grace) benyttet. Denne ble ekvilibrert i 0,05% trifluoredikksyre (TFA). En økende mengde acetonitril (ACN) ble tilsatt for å eluere peptidene. ACN ble tilsatt i en lineær gradient fra 0-15% over 2 timer. Peptidene ble detektert på en bølgelengde på 206nm.

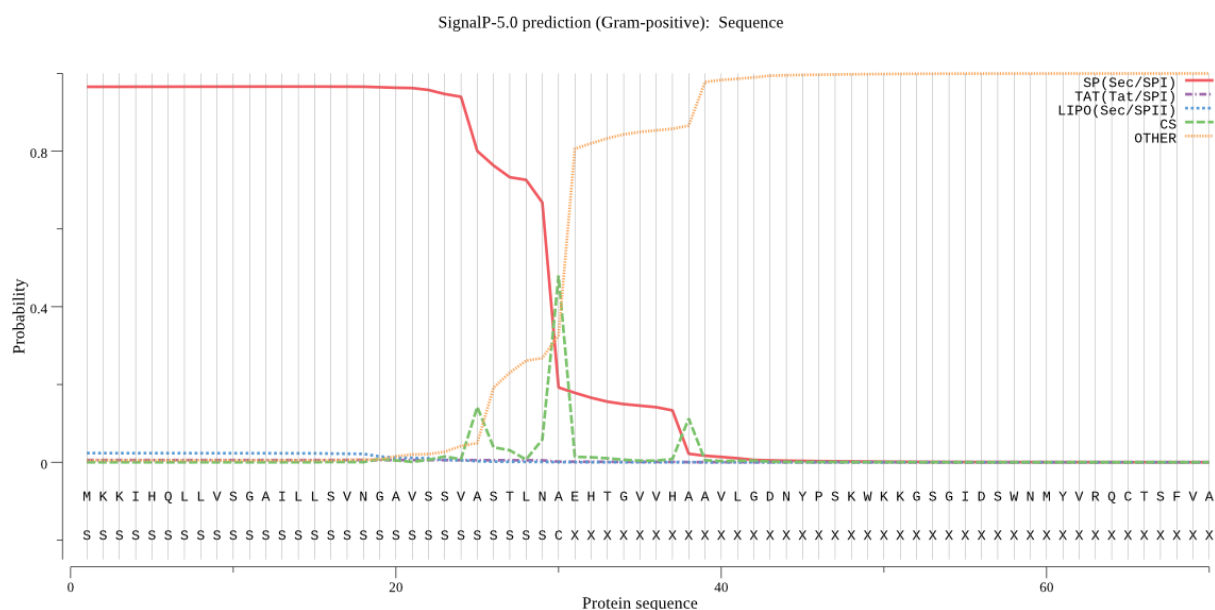
4 Resultater

4.1 Multippel sammenstilling av CbpD fra ulike streptokokkarter

For å se etter likheter mellom CbpDer fra ulike streptokokkarter ble ulike CbpDer sammenlignet i en multippel sammenstilling. CHAP - og SH3b-domenene er konserverte for CbpD hos streptokokker fra pyogenes og mitis gruppe, men CbpD fra pyogenes har et helt annet domene C-terminalt i stedet for det kolinbindende domene hos CbpD i mitis-gruppe-streptokokker. Som beskrevet i Seksjon 1.6.3, har CHAP-domener en konservert cystein og histidin. For sammenstilling, se Vedlegg D.

4.2 Kloning av *cbpD* fra *S. dysgalactiae* ma201 (*cbpD^{SD}*)

Selv om *S. dysgalactiae* har et gen som koder for celleveggshydrolyasen CbpD, og at *cbpD*-genet ser ut til å ha en kompetanseregulert promotor (har bindingssete for ComX, 5'-TTCGAATA-3'), er det lite kjent i hvor stor grad *S. dysgalactiae* utfører fratrisid under kompetanse. For å få et bedre innblikk i fratrisidmekanismen hos denne bakterien, var derfor hovedmålet i dette prosjektet å studere CbpD^{SD} i mer detalj. Sekvensen til *cbpD^{SD}* i *S. dysgalactiae* ma201 (isolert fra mastitt hos ku) som ble studert i denne oppgaven var ikke tilgjengelig da prosjektet ble startet. Det ble derfor tatt utgangspunkt i genomet til *S. dysgalactiae* NCTC4669 for å designe primere til å amplifisere *cbpD^{SD}* fra ma201-stammen. Nativt *CbpD^{SD}* uttrykkes med en signalsekvens slik at proteinet sekreteres ut av cellen. Det var ønskelig å uttrykke det modne og aktive CbpD^{SD}-enzymet uten signalsekvens fordi den er hydrofob, og derfor ville gjøre det vanskelig å uttrykke proteinet i løselig form i *E. coli*. Signalsekvensen til CbpD^{SD} fra NCTC4669 ble predikert ved hjelp av SignalP-5.0-serveren (Figur 4.2). Basert på prediksjonen ble de første 30 aminosyrene utelatt fra CbpD^{SD} som skulle overuttrykkes og renses.

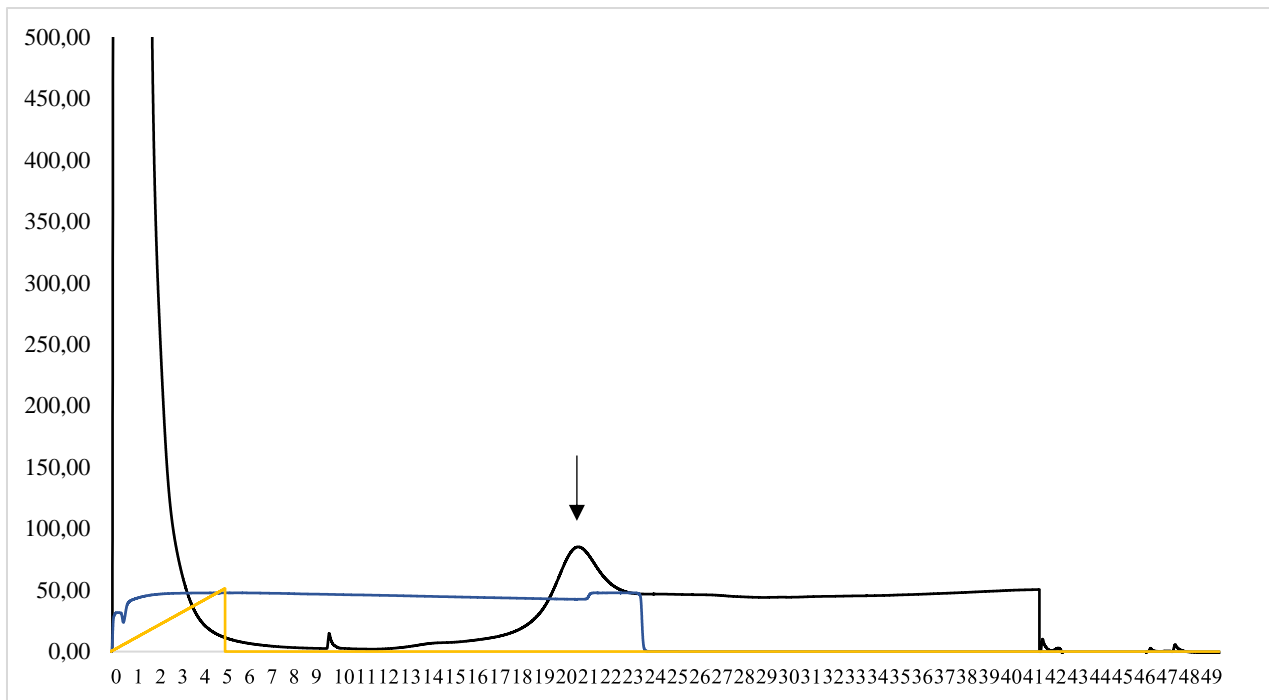


Figur 4.2: Prediksjon av signalsekvens. De første 30 aminosyrene ble utelatt ved primerdesigning for å ikke få med signalsekvensen i rensset CbpD^{SD}. Prediksjonen er gjort ved hjelp av SignalP-5.0-serveren og med utgangspunkt i *S. dysgalactiae* NCTC4669.

Primerne ble designet med *cbpD* fra NCTC4669 som utgangspunkt, og disse ga et PCR-produkt med forventet størrelse (1080 bp) da genomisk DNA fra *S. dysgalactiae* ma201 ble brukt som templat. Etter kloning inn i pRSET A (se metoder og nedenfor) ble *cbpD*-genet sekvensert. Sekvensen til *cbpD*^{SD} fra stamme ma201 uten signalsekvenskodende sekvens er vist i Vedlegg E.

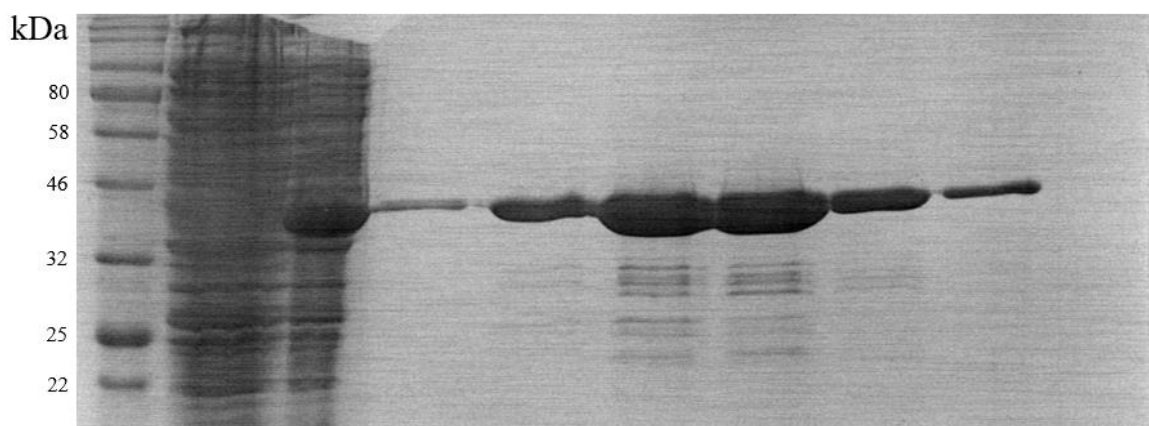
4.3 Overuttrykking og rensing av CbpD^{SD}

Molekylære studier av funksjonen til et protein krever ofte at man har proteinet i rensset form. For å rense CbpD^{SD} valgte vi å fusjonere en 6xHis tag til N-terminus av CbpD^{SD}. I tillegg ble det plassert et kutteseite for TEV-protease etter His-taggen slik at denne kunne kuttes av CbpD^{SD}. His-TEV-CbpD^{SD} ble produsert i *E. coli* BL21 som beskrevet i Seksjon 3.10. Et ekstra bånd ved rundt 40kDa kunne tydelig sees når totalt cellelysat fra IPTG-induserte celler ble analysert med SDS-PAGE (Figur 4.4). Størrelsen på båndet passer med forventet teoretisk størrelse av His-TEV-CbpD^{SD} (41kDa). His-TEV-CbpD^{SD} ble rensset ved hjelp av Ni²⁺ IMAC som beskrevet i Seksjon 3.10.2. Kromatogrammet viser at det ble eluert en stor topp ca. midtveis av imidazolgradienten (~250mM imidazol) (Figur 4.3). Videre ble fraksjonene analysert ved bruk av SDS-PAGE (Figur 4.4) for å finne ut hvilke fraksjoner som inneholdt His-TEV-CbpD^{SD}.



Figur 4.3: Kromatogram. Den svarte pilen indikerer toppen der His-TEV-CbpDSD er registrert. X aksen indikerer antall milliliter og ble proteinet blir eluert i en fraksjonssamler med tilsvarende tall. Den svarte grafen er tilsatt prøve, den gule er buffer B. Den blå er mS/cm.

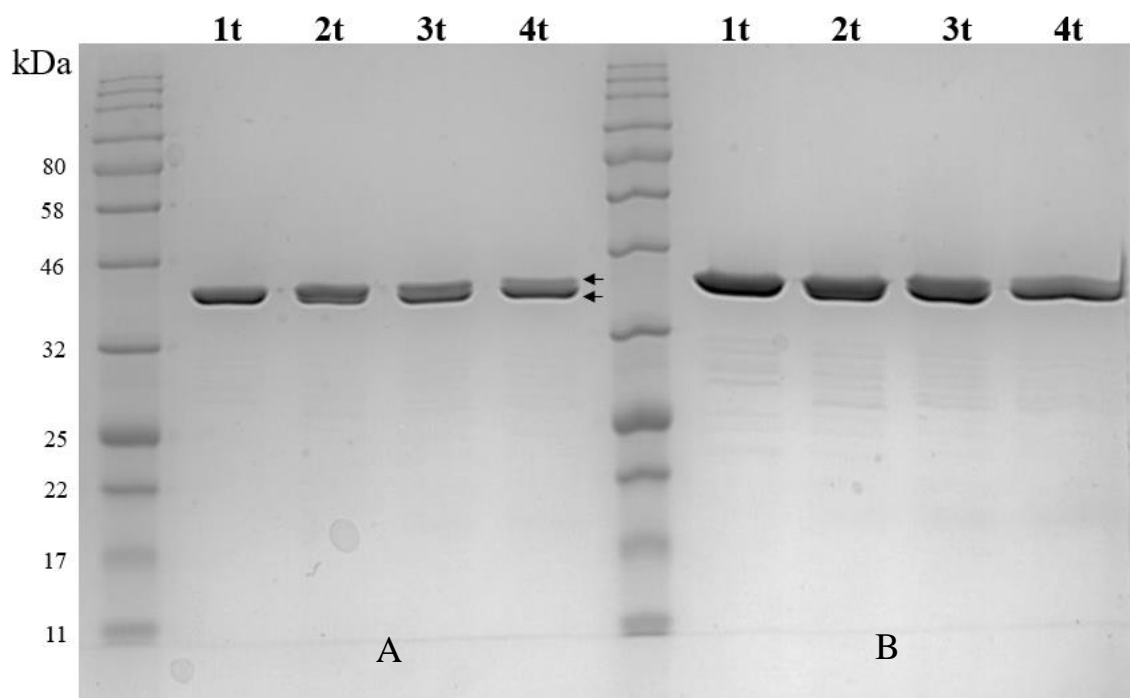
Det kommer frem av Figur 4.4 at proteinet som ble rensert er av en størrelse på ca. 40kDa, noe som stemmer godt overens med den teoretiske størrelsen (39,9 kDa) til His-TEV-CbpD^{SD}. Det kommer også frem i figuren at det var blitt rensert store mengder protein, da båndene i figuren er sterke. Konsentrasjonen ble målt til å være 0,6mg/ml. Noen svake bånd, med mindre størrelse, indikerer andre proteiner i prøven. Renheten estimert ut ifra gelen ligger på 85-90%.



Figur 2.4: Rensing av CbpDSD. SDS-page resultat av rensing av CbpD^{SD}. Til venstre er en ladder vist i kDa. I de to første brønnene er det tilsatt henholdsvis kultur før induksjon og etter induksjon. Videre er det ut ifra Figur 4.3 tilsatt fraksjoner som vis viste proteininnhold. 5µl ble tilsatt til hver brønn.

4.4 Kutting av His-TEV-CbpD^{SD} med TEV-protease

Etter at His-TEV-CbpD^{SD} var renset og dialysert, var det ønskelig å kutte av His-taggen ved bruk av TEV-protease (Vedlegg C) siden taggen potensielt kan påvirke funksjonen til CbpD. I denne oppgaven ble en His-tagget TEV-protease overuttrykt og renset som beskrevet i Seksjon 3.10.3 og vist i Vedlegg C. Figur 4.5A viser kutting av his-tag ved 2,8 µg His-TEV-CbpD^{SD} tilsatt i hver brønn, mens Figur 4.5B viser kutting av his-tag ved 5,6 µg His-TEV-CbpD^{SD}-prøve tilsatt i hver brønn. Kuttingen ble inkubert i 1, 2, 3 og 4 timer i både Figur 4.5A og B. Båndene i figuren viser at His-taggen blir kuttet av His-TEV-CbpD^{SD}, men at ikke alt har blitt kuttet. Det viser at det, etter 4 timer, er størst grad av kutting. Prøven ble tilsatt til den samme nikkelkolonnen, som tidligere brukt for rensing, for å fjerne fri His-tag, ukuttet fusjonsprotein og His-TEV proteasen fra CbpD^{SD}. CbpD^{SD} vil ikke binde kolonnen og ble forventet å havne i «flow-through», mens resten av prøven har His-tag og skulle binde til kolonnen. Dette rensetrinnet gikk ikke som planlagt ettersom det var vanskelig å skille fusjonsproteinet His-TEV-CbpD^{SD} fra CbpD^{SD} etter TEV-protease-kutting, og det ble derfor bestemt at videre forsøk i dette arbeidet skulle utføres med hele fusjonsproteinet. Heretter vil derfor His-TEV-CbpD^{SD} bli referert til som «CbpD^{SD}» for enkelthetens skyld.

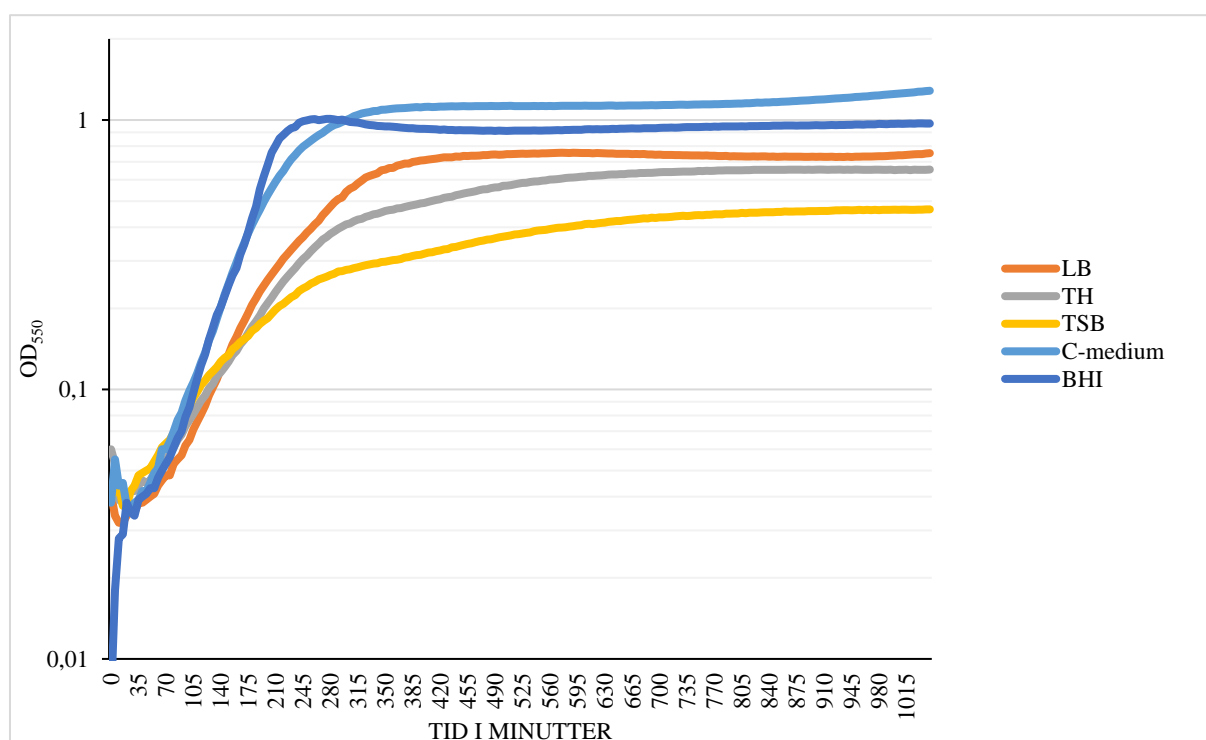


Figur 4.5: SDS-page. A viser 2,8µg CbpD^{SD} tilsatt til brønnene. Videre viser B 5,6µg CbpD^{SD} tilsatt til brønnene. Det er fire brønner i hver del av figuren. Forskjellen på disse er antall timer inkubasjonstid for CbpD^{SD} og TEV-proteasen. Jo lengre tid prøven har inkubert, jo sterkere er det nederste båndet, noe som indikerer større grad av kutting. To svarte piler indikerer båndene i time 4 med 2,8 µg CbpD^{SD} tilsatt til brønnen. Den øverste piler indikerer kuttet CbpD^{SD}, mens den nederste indikerer ukuttet CbpD^{SD}.

4.5 Vekstforsøk

Hvilket vekstmedium som er optimalt for dyrkning av streptokokker, varierer mellom arter. Det var derfor ønskelig å vite det best egnede vekstmediet for *S. dysgalactiae*, slik at forsøk videre kunne gjøres effektivt med raskest mulig vekst. Dette ble gjort i en mikrotiter plateleser ved å måle OD₅₅₀ av kulturer med *S. dysgalactiae* dyrket i fem ulike vekstmedier, ofte brukt til å dyrke streptokokker og andre bakterier i laboratoriet: BHI, LB, TH, TSB og C-medium (Figur 4.6).

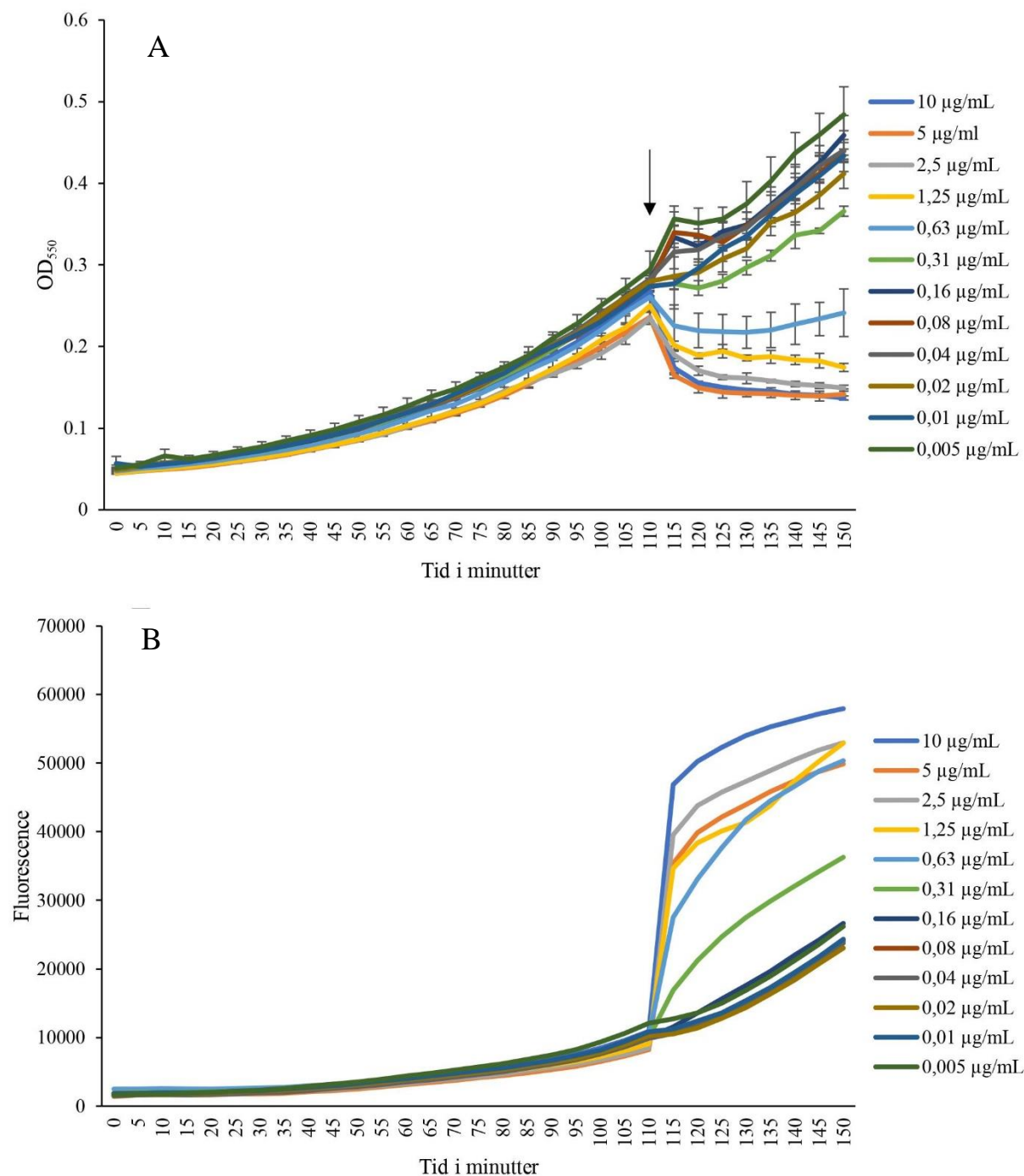
Kurvene fra vekstforsøket er plottet semilogaritmisk for å finne hvilket vekstmedium som ga høyest veksthastighet. C-medium og BHI viste like hurtig vekst. BHI er ikke kompatibel med Sytox™, så i de tilfeller der Sytox™ ble brukt for å måle cellelysis, var dyrkningsmediumet C-medium. BHI tar mindre tid å lage enn C-medium og ble brukt i de resterende forsøkene. TH, TSB og LB ble dermed ikke brukt, da de viste en langsommere vekst.



Figur 4.6: Vekstforsøk. Logaritmiske vekstkurver for kulturer med *S. dysgalactiae* dyrket i vekstmediene BHI, LB, TH, TSB og C-medium. Forsøket ble utført på 37°C i 1015 minutter.

4.6 Test av aktiviteten til CbpD^{SD} mot *S. dysgalactiae*

For å teste om det rensede CbpD^{SD} hadde lytisk aktivitet, ble det satt opp et forsøk for å teste om enzymet kunne lysere *S. dysgalactiae* ma201. I tillegg ble det laget en 2-fold fortynningsrekke av enzymet for å finne ut hvor mye enzym som gir maksimum lysis og 50% lysis. Det ble laget tre paralleller med kulturer i en mikrotiterplate som ble analysert i en plateleser. For hver ny brønn med celler, halvertes mengden enzym. Figur 4.7B viser at i kulturene tilsatt konsentrasjon av CbpD^{SD} lik eller høyere enn 5µg/ml, ses maksimum lysis som reduserte OD₅₅₀ med omtrent 50%. Ved 1,25µg/ml og 0,31µg/ml avtar effekten av CbpD^{SD}, mens i kulturene med lavere konsentrasjon er det ikke en signifikant lysis. En konsentrasjon på 0,63µg/ml CbpD^{SD} gir omtrent halvparten av maksimal lysis. I kulturene hvor det oppstår lysis, forekommer dette umiddelbart etter tilsetning av CbpD^{SD}. I Figur 4.7A er det også gjort tre paralleller for å kunne beregne standardavvik. I flere av grafene er standardavviket relativt lavt, mens i noen, slik som 0,63µg/ml er det noe større avvik.



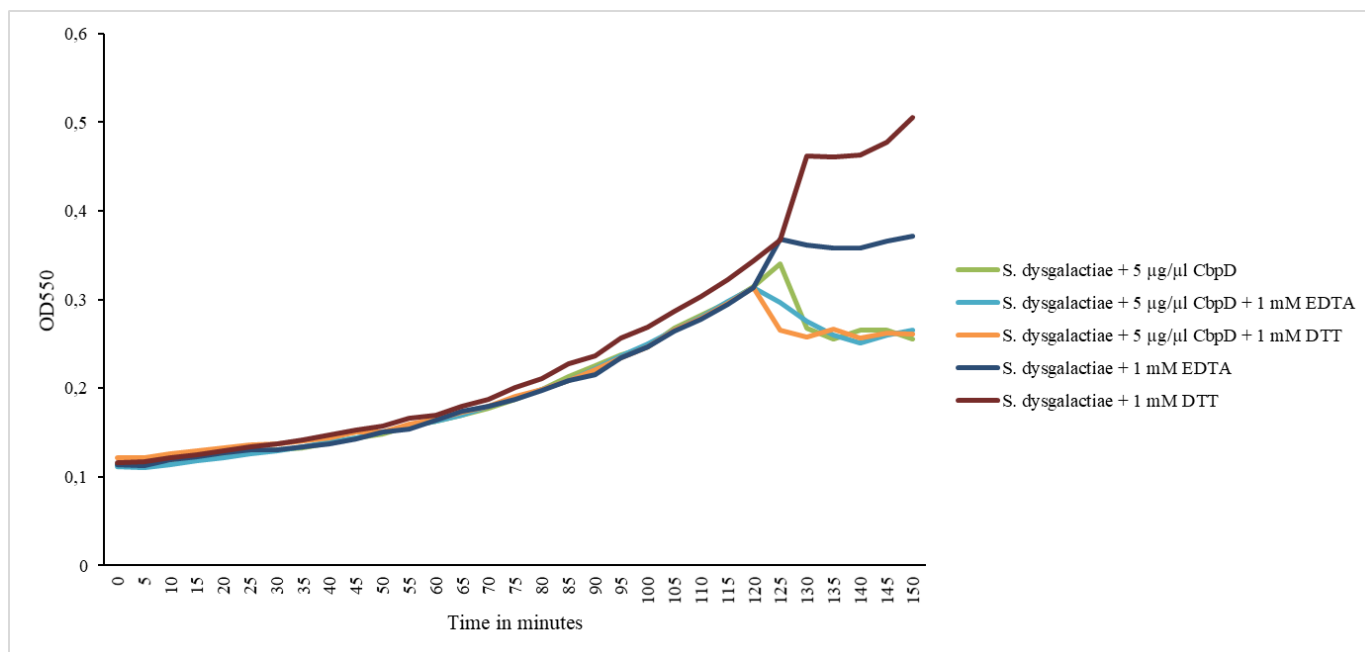
Figur 4.7: Lytisk effekt av CbpD^{SD} på *S. dysgalactiae*. A) Oversikt over tettheten i kulturen ved tilsetning av 12 ulike konsentrasjoner av CbpD^{SD} tilsatt til *S. dysgalactiae* dyrket i C-medium. CbpD^{SD} ble tilsatt ved en OD₅₅₀ på 0,25. Forsøket ble utført på 37°C over 150 minutter. B) Sytox-assay. Fluorescence målt i de samme brønnene som A) ved tilsetning av SytoxTM. SytoxTM binder til DNAet til de lyserte cellene og flurosencesignalet blir registrert av plateleseren.

For å bekrefte at lysis oppstod ved tilsetning av CbpD^{SD}, ble det også tilsatt SytoxTM til kulturene. Det var ønskelig å finne ut hvor aktivt enzymet var. SytoxTM binder til DNA fra lyserte celler og er derfor en mer sensitiv metode enn kun ved å måle OD. Dette gir dermed et mer nøyaktig resultat.

Fluorescensverdiene fra Sytox korresponderte med de reduserte OD-verdiene målt etter tilsetning av rensset CbpD^{SD}. Figur 4.7B viser at fluorescenssignalet øker dramatisk rett etter at CbpD^{SD} er tilsatt for konsentrasjonene 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml og 0,63µg/ml. 0,31µg/ml CbpD^{SD} ga omtrent halvparten så mye lysis som de tidligere nevnte konsentrasjonene. Lavere konsentrasjoner av CbpD^{SD} ga ikke økning i signal. Grafene er basert på gjennomsnitt av tre parallelle kulturer for hver CbpD^{SD}-konsentrasjon.

4.7 DTT og EDTA har ingen effekt på aktiviteten til CbpD^{SD}

Da det på laboratoriegruppen tidligere var registrert en høyere effekt av CbpD ved tilsetning av EDTA til CbpD rensset fra *S. pneumoniae* (CbpD^{SP}) (Eldholm et al., 2009), var det ønskelig å teste om dette kunne gi en større effekt av CbpD^{SD}. Den eksakte årsaken til dette er ikke kjent, men det er observert at visse divalente kationer hemmer CbpD^{SP}. Det er også tidligere erfart at DTT kan gjøre at CbpD^{SP} og CbpDST (fra *S. thermophilus*) reaktiveres dersom det har mistet aktivitet over tid (Biørnstad et al., 2012; Eldholm et al., 2009). Dette kan være fordi sulfydrylgruppen på cysteinen i CHAP-domenet oksiderer og enzymet dermed mister aktiviteten. For å teste om EDTA og DTT kunne gi en økt lytisk effekt for CbpD^{SD} mot *S. dysgalactiae* ble det satt opp et vekstforsøk slik at ubehandlet CbpD^{SD} ble sammenlignet med CbpD^{SD} behandlet med EDTA eller DTT. DTT og EDTA ble brukt som kontroll på at de alene ikke hadde lytisk effekt på cellene. Ved tilsetning av 5µg/µl CbpD^{SD} kommer det frem en tydelig lysis (Figur 4.8). Ved tilsetning av 5µg/µl CbpD^{SD} + 1mM EDTA i en kultur, og 5µg/µl CbpD^{SD} + 1mM DTT i en annen, kommer det også frem en tydelig lysis, men ikke en kraftigere lysis enn ved tilsetning av ubehandlet CbpD^{SD}. Ved å kun tilsette EDTA oppstår det noe lysis, mens ved tilsetning av DTT er det ikke en signifikant endring. Man kan dermed konkludere med at EDTA og DTT ikke hadde noe effekt på grad av lysis CbpD^{SD} førte til hos *S. dysgalactiae*.



Figur 4.8: Effekt av EDTA og DTT på CbpD aktivitet. Effekten av CbpD^{SD} ved tilsetning av 1mM EDTA og 1mM DTT: effekten på *S. dysgalactiae* ved tilsetning av kun CbpD^{SD}, av CbpD^{SD} og EDTA, CbpD^{SD} og DTT, av kun EDTA og av kun DTT ble vist i figuren. Forsøket ble utført i 480 minutter ved en temperatur på 37 °C.

4.8 Test av aktiviteten til CbpD^{SD} mot ulike arter av Streptokokker

For å teste om CbpD^{SD} kunne lysere andre arter i *Streptococcus*-slekten, ble rensset CbpD^{SD} tilsatt kulturer av streptokokker ved OD₅₅₀ på 0,25. Eventuell lytisk aktivitet ble identifisert ved senkning i OD og økt fluorescenssignal fra SytoxTM Green som beskrevet over (Vedlegg B). Resultatet er satt sammen og fremstilt i Tabell 4.1. Artene ble valgt ut for å teste streptokokker fra alle seks undergruppene; mitis, pyogenes, anginosus, salivarius, bovis og mutans, på bakgrunn av om de var tilgjengelig på laboratoriet, samt fylogeni, slik at arter fra flere grupper ble testet. Dette gir informasjon om hvor bredt aktivitetsspekteret til CbpD^{SD} er.

Tabell 4.1: Oversikt over lytisk effekt av CbpD^{SD} på streptokokker. Tabellen viser en oversikt over effekten av CbpD^{SD} ved tilsetning av 10 µg/ml CbpD^{SD} til hver kultur.

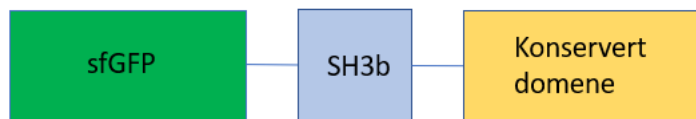
Art	Gruppe	Sensitiv for CbpD ^{SD}	Nativt fratrisid
<i>S. dysgalactiae</i>	Pyogenes	Ja	CbpD
<i>S. uberis</i>	Pyogenes	Ja	CbpD
<i>S. equi</i>	Pyogenes	Ja	CbpD
<i>S. pyogenes</i>	Pyogenes	Ja	CbpD
<i>S. porcinus</i>	Pyogenes	Noe	CbpD
<i>S. phocae</i>	Pyogenes	Ja	CbpD
<i>S. parasanguinis</i> sk236	Mitis	Ja	LytF
<i>S. cristatus</i> NCTC12479	Mitis	Ja	LytF
<i>S. gordonii</i> NCTC7869	Mitis	Ja	LytF
<i>S. sanguinis</i>	Mitis	Noe	LytF
<i>S. gordonii challis</i>	Mitis	Ja	LytF
<i>S. lutetiensis</i>	Bovis	Nei	LytF
<i>S. bovis</i>	Bovis	Nei	LytF
<i>S. mutans</i>	Mutans	Nei	LytF
<i>S. rattii</i>	Mutans	Ja	LytF
<i>S. anginosus</i>	Anginosus	Nei	LytF
<i>S. peroris</i> GTC848	Mitis	Nei	CbpD (kolinbindende)
<i>S. infantis</i> sk140	Mitis	Noe	CbpD (kolinbindende)
<i>S. pneumoniae</i>	Mitis	Nei	CbpD (kolinbindende)
<i>S. oralis</i>	Mitis	Nei	CbpD (kolinbindende)
<i>S. mitis</i>	Mitis	Nei	CbpD (kolinbindende)
<i>S. thermophilus</i>	Salivarius	Noe	CbpD (uten SH3b)
<i>S. salivarius</i>	Salivarius	Noe	CbpD (uten SH3b)
<i>S. vestibularis</i> 121bb	Salivarius	Ja	CbpD (uten SH3b)
<i>S. agalactiae</i>	Pyogenes	Ja	Zoocin A
<i>S. criceti</i>	Mutans	Ja	CHAP-ricin domain
<i>S. fryi</i>	Pyogenes	Nei	Ikke funnet

Feltene merket med rødt viste ikke lysis ved tilsetning av CbpD, de lysegrønne hadde noe lysis, mens de mørkegrønne hadde stor grad av lysis. For graf, se Vedlegg B.

På laboratoriet var en mutant av *S. sanguinis* tilgjengelig. Denne mutanten uttrykte immunitetsproteinet ComM konstitutivt slik at den var immun mot LytF fra *S. sanguinis*. Siden CbpD^{SD} hadde noe aktivitet mot *S. sanguinis*, ønsket vi å teste om ComM i *S. sanguinis* også kunne gi beskyttelse mot CbpD^{SD}. Dette ble testet ved å tilsette rensset CbpD^{SD} til den lytF-immune *S. sanguinis* mutanten. Resultatet viste derimot at denne lyserte i like stor grad som villtype *S. sanguinis*. CbpD^{SD} har et bredt aktivitetsspekter. De artene som likevel skiller seg ut som helt immune er streptokokker som har kolin på tekoinsyrene, og uttrykker et kolinbindende CbpD. *S. infantis* er likevel et unntak fra denne regelen, og er noe sensitiv for CbpD^{SD}.

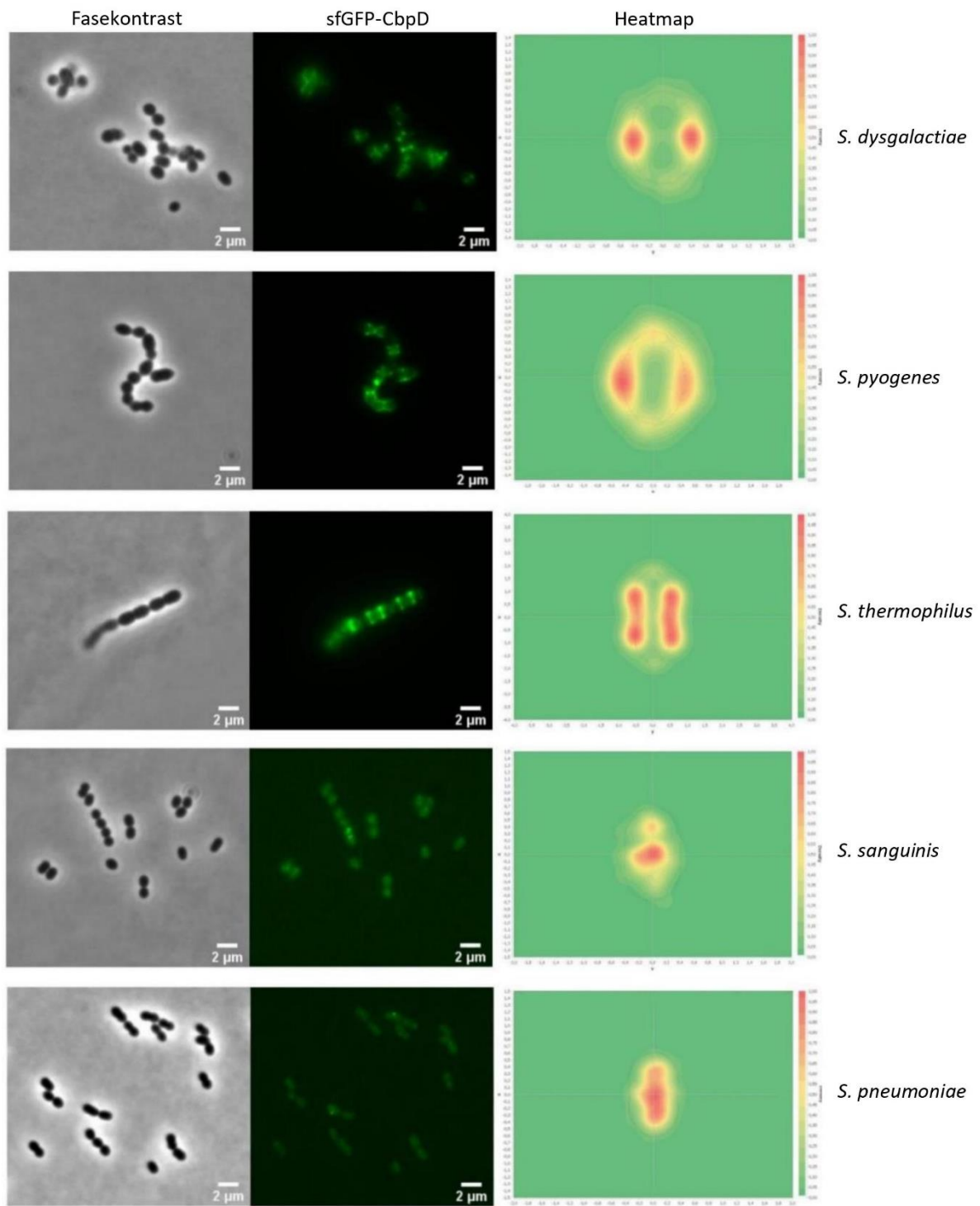
4.9 CbpD^{SD} binder til delingssonen til *S. dysgalactiae*

Det er tidligere vist at fratrisiner, som CbpD^{SP} og LytF i *S. gordonii*, binder til delingssonen til målcellene. CbpD^{SP} er også vist å kutte spesifikt i celleveggen i septum (Berg, Ohnstad, et al., 2012; Straume et al., 2020). CbpD^{SD} har et C-terminalt domene med en ukjent funksjon. Dette er sannsynligvis den delen av CbpD^{SD} med tilsvarende funksjon som det kolinbindende domene (CBD) i for eksempel CbpD^{SP}. Dens funksjon er å binde til målcellens kolinrike tekoinsyrer. Det konserverte domenet i CbpD^{SD} antas derfor å fungere på samme måte, på tross av at det ikke er kolinrike tekoinsyrer på overflaten til denne arten. På bakgrunn av dette var det ønskelig å se om dette også stemte for *S. dysgalactiae* og CbpD^{SD} fra denne bakterien. For å finne ut hvor på de ulike streptokokkartene CbpD^{SD} bandt, ble det laget et fusjonsprotein der CHAP-domenet i CbpD ble byttet ut med sfGFP (Figur 4.9).



Figur 4.9: Fusjonsproteinet. sfGFP-SH3b-konserverte domene ble tilsatt til ulike arter av streptokokker for å se hvor CbpD^{SD} vanligvis binder i cellen. sfGFP er satt inn der hvor CHAP vanligvis er.

sfGFP-SH3-konserverte domene (heretter kalt sfGFP-CbpD^{SD}) ble så overuttrykt, renset og tilsatt til kulturer av *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. sanguinis* og *S. thermophilus*. sfGFP-CbpD^{SD} bundet til celleoverflaten ble detektert ved at GFP eksiterer ved en bølglengde på 485nm og det emitterte lyset ved 510nm leses av i fluorescensmikroskopi. På hver bakterie der sfGFP-CbpD^{SD} har bundet, blir minst ett punkt registrert i et program kalt Maxima i ImageJ. Dette punktet indikerer hvor på bakterien det er sterkest signal og derfor størst grad av binding. Basert på disse punktene, ble det generert såkalte heatmaps som viser lokaliseringen av sfGFP-CbpD^{SD} for N bakterier analysert og satt sammen (Figur 4.10). Jo flere bakterier som har binding på samme punkt, jo mer rødfarge. Gul indikerer noe binding, mens grønn er bakgrunnsfarge og indikerer dermed ingen binding. For *S. dysgalactiae* er 427 bakterier analysert (N=427), for *S. pyogenes* er N=124, for *S. thermophilus* er N=135, for *S. sanguinis* er N=243 og for *S. pneumoniae* er N=341.



Figur 4.10: Fasekontrastbilder, fluorenscebilder og heatmaps. I første kolonne er fasekontrastbildene. Videre er fluorenscebilder med sfGFP-CbpD^{SD} bundet til celleoverflaten til bakterien. En størrelsesmarkør på 2 µm vises nede til høyre på mikroskopbildene. Til høyre i figuren er et heatmap for hver bakterie (Maxima).

De grønne områdene i fluorescensmikroskopibildene i Figur 4.10 viser hvor på cellene sfGFP-CbpD^{SD} binder. Figuren viser også fasekontrastbilder av *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. sanguinis* og *S. pneumoniae*. Det kommer også frem et heatmap for hver av bakteriene.

For *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes* og *S. thermophilus* bandt sfGFP-CbpD^{SD} omtrent til septum av bakterien. Dette kommer ekstra klart frem for *S. dysgalactiae*, mens for *S. thermophilus* er det binding over et noe større område på cellen. Videre viser ikke *S. sanguinis* og *S. pneumoniae* et klart bindingsmønster og man kan si at det er binding over hele celleoverflaten. I fluorescensbildene for sistnevnte bakterier kommer det også frem at det er en mye svakere binding til cellene enn for de tre førstnevnte bakteriene.

4.10 Transformasjon av *S. dysgalactiae*

For å finne ut om det var mulig å indusere naturlig transformasjon hos *S. dysgalactiae* ble ulike *S. dysgalactiae*-stammer tilsatt ComS-induser og DNA med antibiotikaresistensmarkører. Ulike stammer av *S. dysgalactiae* benytter seg av en av to varianter av ComS; enten ComS1 (EFDWWNLG) eller ComS2 (QVDWWRL). Isolat ma201 som ble testet i denne oppgaven uttrykker ComS1. Transformanter ble selektert for på BHI-plater med egnet antibiotika. Det ble forsøkt transformert *S. dysgalactiae* ma201 og *S. dysgalactiae* NORM75. Det ble testet om bakteriene kunne transformeres via naturlig kompetanse ved å bruke plasmidet som er beskrevet nedenfor eller PCR-produkt. For PCR produktene var en spectinomycinresistenskasset flankert av DNA opp- og nedstrøms for *hirL* (ikke-essensielt gen brukt for rekombinasjon av genkassetter i *S. pneumoniae* (Steinmoen, Knutsen, & Håvarstein, 2002)), eller *cbpD*^{SD} for homolog rekombinasjon. Hver transformasjon ble testet minst tre ganger, men uten å generere positive transformanter for hverken opptak av plasmid eller PCR-produkt. På grunn av covid-19 pandemien ble laboratoriet stengt i perioder og det ble ikke nok tid til å teste ut modifiserte transformasjonsprotokoller for å få transformasjon via induksjon av naturlig kompetanse hos *S. dysgalactiae*.

CRISPRi er et gendeplesjonssystem der man kan bruke proteinet dCas9 som står for engelske «dead» Cas9, som mangler nukleaseaktivitet. Dette proteinet kan binde til et single guide RNA (sgRNA), men vil ikke kutte og fungere derfor som en transkripsjonell blokkering av spesifikke gener (Yao, Cengic, Anfelt, & Hudson, 2016). For å videre kunne teste

transformasjon hos *S. dysgalactiae* var det ønskelig å få CRISPRi systemet inn i bakterien. Dette er fordi man kan bruke systemet til å skru av et hvilket som helst gen i bakterien, avhengig av sgRNAet man velger å co-utrykke med dCas9. Videre kan derfor CRISPRi også brukes i studier av *S. dysgalactiae*.

For å få CRISPRi systemet inn i *S. dysgalactiae* ble elektroporering brukt. Plasmidet replikerer i streptokokker og har en spectinomycin resistensmarkør. Cellene ble tilført elektrisitet og inkubert før de ble sådd ut på agarplater. Videre ble koloniene screenet slik som beskrevet i Seksjon 3.3.1. Resultatet bekreftet at plasmidet hadde blitt tatt opp i cellen.

4.11 Induseres kompetanse hos *S. dysgalactiae* ma201 med ComS1?

Siden det ikke lykkes å transformere *S. dysgalactiae* via naturlig transformasjon, ønsket vi å undersøke om dette skyldes at kompetanse ikke ble skrudd på ved tilsetning av induserpeptidet ComS1. En måte å teste om bakteriene skrude på kompetansesystemet er å lete etter CbpD^{SD} aktivitet hos ComS-induserte celler. Basert på promotorsekvensen skal *cbpD^{SD}*-ekspresjonen skrues på under kompetanse. Til dette ble et zymogram utført. ComS ble tilsatt til kulturer av *S. dysgalactiae* og ble inkubert i 10, 20, 30, 40, 50 og 60 minutter før totalt cellelysat ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE gel med *S. dysgalactiae* celler støpt inn i den. Etter refolding av CbpD^{SD} vil det oppstå blanke felt der enzymet er aktivt og dermed produsert i bakteriene. Enzymet degraderer celleveggsmaterialet i gelen som resulterer i klare bånd mot det hvite cellematerialet.

Den blå pilen i Figur 4.11 viser positiv kontroll som er renset CbpD^{SD}. Dette feltet er blankt og som dermed beviser at CbpD^{SD} kutter i celleveggen til *S. dysgalactiae* i dette området etter at refoldingsbufferen ble tilsatt. Det forventede resultatet var blanke bånd på noen av de seks prøvene på 40kDa, på linje med renset CbpD^{SD}. Likevel er det ingen bånd her.

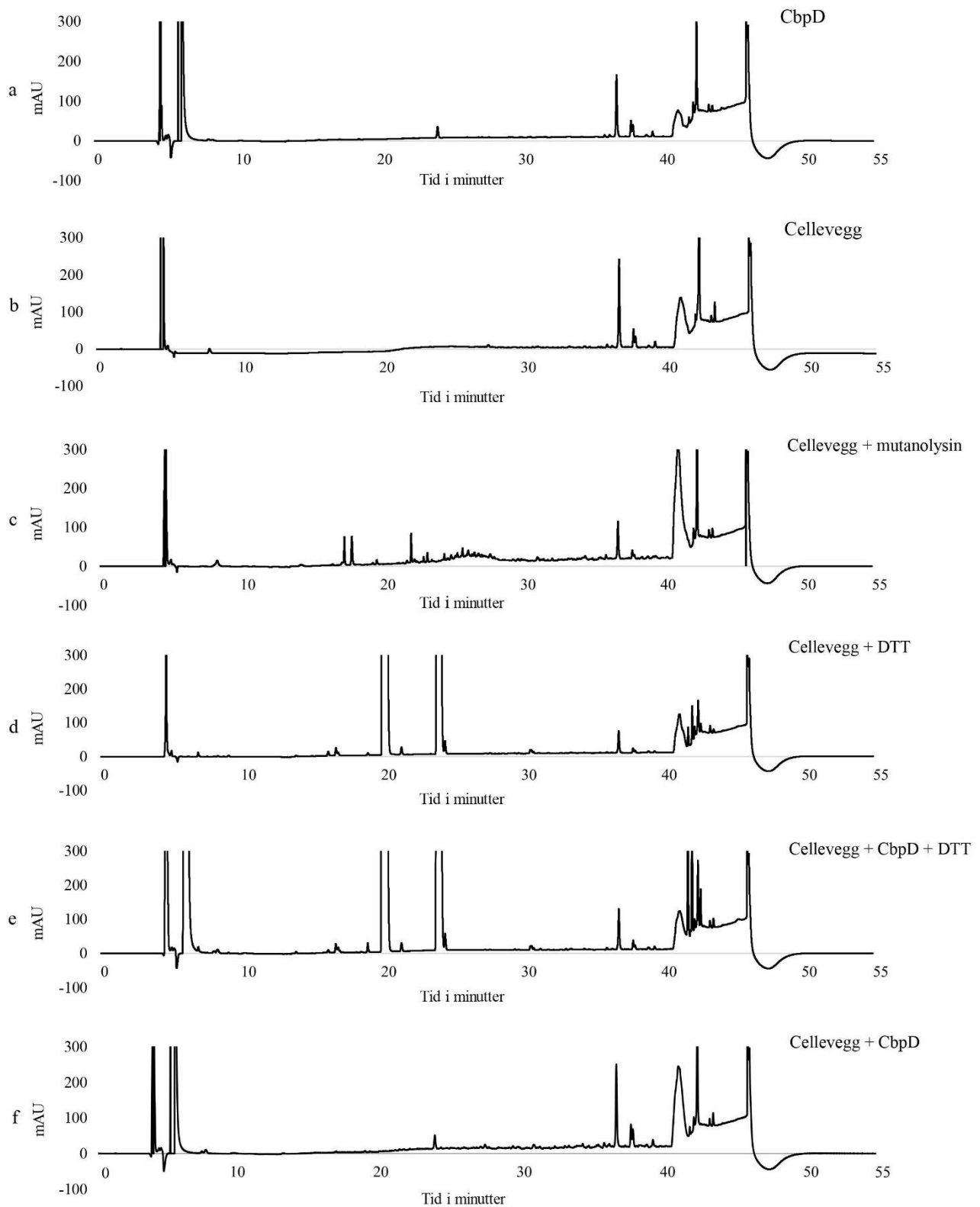


Figur 4.11: Zymogram. *S. dysgalactiae* celler støpt inn i en SDS-pagegel. Til hver brønn ble det tilsatt kulturer av *S. dysgalactiae* der ComS (100ng/µl) på forhånd ble inkubert i 10, 20, 30, 40, 50 og 60 minutter før tilsetning. Til venstre er en størrelsesmarkør. Til høyre er en blå pil for å indikere båndet der CbpD (5µg/µl) ble tilsatt.

4.12 Hvor i celleveggen kutter CbpD^{SD}?

Hvilket bånd i peptidoglykanet CbpD^{SD} kutter, er ikke kjent. I *S. mitis* finnes det et protein kalt SkI som inneholder et CHAP-domene. Som tidligere nevnt er CHAP-domener ofte veldig konserverte og det er derfor nærliggende å tro at kuttasetet kan være relevant for CbpD^{SD} i *S. dysgalactiae*. SkI kutter mellom NAM og L-Ala i målcellens cellevegg (Llull, López, & García, 2006). Fordi man ikke vet hvor i celleveggen fratrisiner fra streptokokker kutter, var det ønskelig å forsøke å finne dette hos CbpD^{SD}. Det ble derfor foretatt et eksperiment der CbpD^{SD} ble inkubert med rensset cellevegg fra *S. dysgalactiae*. Hvis deler av stempeptidene i peptidoglykanet ble kuttet ut av CbpD^{SD}, kunne disse detekteres ved hjelp av HPLC-analyse.

CbpD^{SD} vises som topp nummer to i kromatogrammet. Denne toppen er i kromatogram a, e og f, som alle inneholder CbpD. Den viser ikke i de resterende. Videre er det flere små topper i kromatogram c, noe som tyder på at mutanolysinen har kuttet flere steder i celleveggen. DTT kommer frem som to topper i midten i kromatogram d og e. Det er ikke mulig å detektere aktivitet fra CbpD ut ifra kromatografiene.



Figur 4.12: Kromatogrammer. Følgende prøver ble analysert: a) CbpD (5 μ g), b) cellevegg (200 μ g), c) cellevegg + mutanolsin (20units), d) cellevegg + DTT (1M), e) cellevegg + CbpD + DTT og f) cellevegg + CbpD. Prøvene ble inkubert i 18 timer før de ble analysert på HPLC. Y-aksen er justert til 300mAU for å få et tydeligere bilde av de små toppene i kromatogrammene.

5 Diskusjon

Naturlig kompetanse og fratrisid har først og fremst blitt studert i *S. pneumoniae* hvor det reguleres av ComCDE-systemet og et kolinbindende CbpD^{SP}-fratrisin produseres fra et sent kompetansegen. At naturlig kompetanse er viktig for spredningen av antibiotikaresistens - og virulensgener hos pneumokokker finnes det en rekke studier som støtter (Blokesch, 2016; Jason & Elaine, 2020; Perry & Wright, 2013). Hos andre streptokokker derimot, er evnen til å bli naturlig kompetent og å utføre fratrisid mindre kjent. I dette prosjektet ønsket vi derfor å få en større forståelse for fratrisid hos streptokokker som benytter ComRS-systemet til å regulere kompetanse. Pyogenesgruppen er en klinisk viktig gruppe med streptokokker som benytter ComRS-systemet, deriblant *S. dysgalactiae* som gir infeksjoner hos både mennesker og dyr. *S. dysgalactiae* uttrykker også et fratrisin, CbpD^{SD}, som er veldig lite studert. I dette prosjektet ble derfor *S. dysgalactiae* brukt som modellorganisme for å studere både kompetanse og fratrisid hos pyogenesgruppe-streptokokker. For å studere CbpD^{SD} var derfor første mål i dette prosjektet å oppnå dette enzymet både i rensset form og helst i milligrams mengder. Det er fordelaktig å ha proteinet i en rensset form da dette vil gjøre det påfølgende arbeidet lettere. Dette ble tidlig oppnådd og dermed åpnet det seg mange muligheter for videre undersøkelser, blant annet aktiviteten av CbpD^{SD} mot *S. dysgalactiae* og andre streptokokker, transformasjonsforsøk og undersøkelser for å finne kuttasetet til CbpD^{SD} i celleveggen til bakterien.

5.1 Rensing av CbpD^{SD}

Overuttrykk av rekombinante proteiner i *E. coli* kan by på utfordringer med hensyn på toksisitet for *E. coli*, om proteinet uttrykkes i løselig form og om det blir utsatt for proteolytisk degradering. CbpD^{SD} fra *S. dysgalactiae* ma201 ble overuttrykt i *E. coli* BL21 (Figur 4.2) med det resultat at et ekstra bånd ved teoretisk størrelse for CbpD^{SD} (40kDa) ble tydelig synlig etter IPTG-induksjon. Siden det His-taggede CbpD^{SD}-proteinet ble rensset ved hjelp av Ni²⁺-IMAC med utbytte i milligram (0,6mg/ml) viste dette at proteinet var uttrykt i løselig form. Det har i forskningsgruppen tidligere vært forsøkt å rense CbpDST (*S. thermophilus*) uten hell, og dette er første gangen CbpD fra pyogenesgruppen har blitt rensset. Det var noen ekstra proteiner med mindre størrelse i samme elueringsfraksjon som fullengde His-TEV-CbpD. Disse kan være C-terminalt degraderingsprodukter av His-TEV-CbpD^{SD} som da fortsatt vil ha His-taggen N-terminalt. Alternativt kan det være proteiner fra *E. coli* som har fulgt med i

renseprosessen. Man kunne benyttet immunoblotting med antistoff mot His-taggen for å konkludere om dette faktisk var CbpD^{SD} degraderingsprodukter. CbpD^{SD} som ble rensset viste seg å være ca. 85-90% rent (basert på visuell inspeksjon av Coomassie-blå-farget gel). For enzymatiske tester er dette tilstrekkelig, men ekstra rensetrinn er nødvendig om man ønsker å oppnå mer enn 95% renhet som ofte behøves ved krystallografi. Et fremtidig mål er å løse 3D strukturen til CbpD^{SD} ved hjelp av krystallografi. Dette krever minst 5mg rent protein, og med så stort utbytte som 0,6mg/ml og en total mengde på 2,82mg er dette innen rekkevidde.

Da CbpD^{SD} ble forsøkt rensset i ettertid ble det mindre utbytte enn i det første forsøket. Grunner til dette kan for eksempel ha vært for høy eller for lav OD på kulturen som ble induisert med IPTG, eller at cellene ikke ble lysert i like stor grad etter FastPrep. Dette blir likevel bare spekulasjoner og metoden for å rensse CbpD^{SD} fungerte bra.

5.2 Fjerning av His-tag

Det er alltid en risiko for at en tag kan påvirke aktiviteten til proteinet det er fusjonert til, selv om den bare består av seks aminosyrer slik som His-taggen på His-TEV-CbpD^{SD}. Derfor var det ønskelig å kutte His-taggen av His-TEV-CbpD^{SD}. Allerede etter én time inkubasjon med TEV-protease kunne man tydelig se at His-taggen var kuttet av en stor fraksjon av fusjonsproteinene (Figur 4.5). Etter fire timer var mer enn 50% av His-TEV-CbpD^{SD} kuttet av TEV-proteasen. Dette viser at proteasen som ble rensset i denne oppgaven var aktiv, og at sekvensen som TEV-proteasen gjenkjenner var tilgjengelig for proteolytisk hydrolyse. Selv om His-taggen ble kuttet av CbpD^{SD}, viste det seg å være mer utfordrende å separere ukuttet His-TEV-CbpD^{SD} fra det kuttete CbpD^{SD}-proteinene ved hjelp av Ni²⁺ IMAC. I teorien skulle kuttet CbpD^{SD} gå rett gjennom kolonnen, mens His-TEV-CbpD^{SD}, His-TEV og fri His-tag skulle binde kolonnen. Det kom likevel antakelig ut en blanding av alle disse. Grunnen kan ha vært at dialyseringen ikke var god nok og at det var rester av imidazol i denne (TEV-proteasen er robust og vil ha ca. 50% aktivitet selv ved imidazolkonsentrasjoner på 50mM (Truman & Hook, 2013)). Imidazolrester i prøven vil kunne føre til at de His-taggede delene ikke binder og at alt blir eluert.

Siden separasjon av His-tagget CbpD^{SD} fra CbpD^{SD} viste seg å være vanskeligere enn først antatt, og at Covid-19-pandemien førte til perioder med ufrivillig fravær fra laboratoriet, ble det bestemt at videre testing av CbpD^{SD} ble gjort med den His-taggede versjonen. Disse testene viste at dette fusjonsproteinene hadde tydelig muralytisk aktivitet mot *S. dysgalactiae*.

His-taggen påvirket derfor mest sannsynlig ikke funksjonen til CbpD^{SD} i nevneverdig grad. I tillegg viste mikroskopibildene (Figur 4.10) at His-tagget sfGFP-CbpD^{SD} som forventet i stor grad bandt til delingssonen på målcellene, noe som kan indikere at His-taggen ikke har betydning for binding. Videre har det blitt vist at His-CbpD^{SP} fra *S. pneumoniae* har tilnærmet lik aktivitet som CbpD^{SP} uten His-tag (Eldholm et al., 2009).

5.3 Påvirkes aktiviteten til CbpD^{SD} av EDTA/DTT?

Det er vist at CbpD^{SP} vil bli mye mer aktivt dersom det tilsettes EDTA (Eldholm et al., 2009). Dette ble derfor testet for CbpD^{SD}. For CbpD^{SD} viste EDTA ingen effekt på grad av lysis. Dette kan indikere at divalente kationer, som kan hemme CbpD^{SP}, ikke hemmer aktiviteten til CbpD^{SD}. Det bør likevel nevnes at det i dette forsøket ble benyttet 5µg/ml CbpD^{SD} som gir maksimal lysis for ubehandlet CbpD^{SD} (Figur 4.8). Det er derfor mulig at ved å ha benyttet en lavere konsentrasjon av CbpD^{SD}, så ville man kunne sett forskjell i aktiviteten til ubehandlet og EDTA-behandlet CbpD^{SD}. Igjen ble mangel på tid grunnet Covid-19 en faktor som forhindret oss i å utføre denne testen.

Ved å tilføre DTT til CbpDST (fra *S. thermophilus*) vil aktiviteten til enzymet øke (Biørnstad et al., 2012), noe som også er vist å være tilfellet for CbpD^{SP} (Eldholm et al., 2009). Resultatene fra denne oppgaven viser derimot at DTT ikke hadde noe effekt på aktiviteten til CbpD^{SD}. Dette kan indikere at sulfydrylgruppen på den konserverte cysteinen i aktivt setet i CHAP-domenet ikke er oksidert for en subpopulasjon av CbpD-enzymene i prøven, men igjen burde forsøket også vært testet med lavere konsentrasjon av CbpD^{SD} som nevnt ovenfor for å konkludere.

5µg/ml CbpD^{SD} var kanskje for høy konsentrasjon da denne konsentrasjonen gir full lysis av CbpD^{SD}. Full lysis tilsvarer kun at halvparten av cellene lyserer og derfor er det ikke sikkert at det har påvirket forsøket. Videre er det ikke observert nevneverdig utfelling av CbpD^{SD} i løpet av perioden oppgaven er skrevet. Mot slutten ble det observert noe svakere effekt enn det tidligere ga, og dette kan indikere at lagring over lang tid fører til inaktivering av ukjent grad. Tilsetning av DTT og EDTA gjorde heller her ingen forskjell. Proteinet ble ikke tint flere ganger og dermed kan det bety at proteinet misfolder i frysen eller danner aggregater over tid, som ikke synes i løsningen når den tines.

5.4 Transformasjon av *S. dysgalactiae*

Et av hovedmålene i dette prosjektet var å prøve og transformere *S. dysgalactiae* ved å gjøre den naturlig kompetent for genetisk transformasjon. Iherdige forsøk med ulike DNA og bakteriestammer resulterte likevel i negativt resultat (se Seksjon 4.10). Mashburn et al. har tidligere forsøkt å transformere *S. pyogenes* via naturlig transformasjon. *S. pyogenes* har som *S. dysgalactiae* ComRS-systemet for å kontrollere naturlig kompetanse. Gjennom omfattende forsøk viste studien deres at transformasjonen ble blokkert allerede ved opptak av DNA. Som et resultat av dette gjorde de derfor DNAet radioaktivt og forsøkte å transformere *S. mutans* og *S. pyogenes*, hvor det viste seg at bare førstnevnte klarte å ta opp DNAet. De avkreftet også at DNAet ble degradert på utsiden av cellen. Kompetanseregulonet var intakt og ble induert i *S. pyogenes*, men transformasjonen ble blokkert ved trinnet hvor DNA skulle blitt tatt opp (Mashburn-Warren, Morrison, & Federle, 2012). På bakgrunn av denne studien, kan det derfor være nærliggende å tro at det samme også har skjedd ved transformasjon av *S. dysgalactiae* i denne oppgaven.

Videre viste studien at *S. thermophilus* og *Streptococcus salivarius* ikke ble transformerbare i alle medium og at de krever kjemisk definerte vekstmedium etter at ComS-induseren er tilsatt. Her spekulerer de om peptidrikt medium kan gjøre at peptidene konkurrerer med ComS om å transporteres inn i cellen via Ami-transporteren og dermed forstyrre signalet. De prøvde flere ulike vekstmedier for *S. pyogenes*, uten å få transformanter. Det vises til tre ulike årsaker for dette; enten at kompetansesystemet i artene ikke fungerer, at kompetansegenene har fått en ny funksjon som man ikke vet om, eller at det er vanskelig å gjenskape naturlig transformasjon på laboratoriet. Alle disse tre grunnene kan også gjelde for *S. dysgalactiae*, men den siste er kanskje den mest sannsynlig da et slik kompetansesystem vises i mange ulike streptokokker (Mashburn-Warren, Morrison, & Federle, 2010).

Andre mulige årsaker til at transformasjonen av *S. dysgalactiae* ikke var vellykket i denne oppgaven, kan for eksempel være at bakterien bruker mer enn to timer på å uttrykke kompetansegenene sine ved tilsetting av ComS eller at alle kompetansegenene i stammene som ble forsøkt transformert, ikke var intakte. Da genomsekvenseringsdata for ma201-isolaten ble tilgjengelig (via Dr. Davide Porcellato, NMBU) mot slutten av dette arbeidet, ble det oppdaget et IS-element på om lag 1000bp som hadde satt seg mellom *comR* og *comS* og dermed kan forstyrre uttrykket av disse genene som er essensielle for at kompetanse skal indueres. Dette er nok likevel ikke grunnen, da også *S. dysgalactiae* NORM75, som har alle kompetansegener intakt, ble forsøkt transformert uten hell.

Det var vellykket å transformere plasmid inn i *S. dysgalactiae* ved hjelp av elektroporering. Dette åpner mange muligheter til å utforske bakterien mer dersom det blir vanskelig å naturlig transformere DNA inn i cellen.

5.5 Induksjon av kompetanse hos *S. dysgalactiae* ma201

For å finne ut om kompetanse i det hele tatt ble skrudd på hos *S. dysgalactiae* etter at syntetisk ComS1 ble tilsatt, forsøkte vi å se etter uttrykk av CbpD^{SD} i kompetente *S. dysgalactiae* ved hjelp av zymografi. I zymogrammet kommer det frem at det ikke var noen blanke bånd ved forventet størrelse til CbpD^{SD} bortsett fra for prøven hvor det rensede CbpD^{SD}et var tilsatt. Dette beviser det at CbpD^{SD} kutter i celleveggen til sine målceller og viser at gelen fungerte slik den skulle. Samtidig indikerer det at ComS1-induserte *S. dysgalactiae* ikke hadde uttrykt CbpD^{SD}.

Zymogramresultatene kan stemme overens med at transformasjonen heller ikke fungerte. Det som er interessant å bemerke seg her er at dette er en metode for å påvise at kompetansesystemet er aktivt uten at metoden krever DNA-opptak. Det er i tidligere forskning skrevet om en protease som irreversibelt ble hemmet av SDS (Jobin & Grenier, 2003), noe som potensielt kunne vært en forklaring på hvorfor det ikke oppstod klare felt i zymogrammet. Likevel kan denne teorien ganske raskt avskrives da det blanke feltet, forårsaket av den positive kontrollen, viser at CbpD^{SD} fortsatt innehar lytisk evne etter behandling med SDS-pagebuffer, for så å ha blitt behandlet med refoldingsbuffer. En alternativ forklaring kan være at det ble produsert for lav konsentrasjon av CbpD^{SD} i kompetente *S. dysgalactiae* til at det kunne detekteres i zymogrammet. Den klare sonen for rensed CbpD^{SD} var ganske svak, som betyr at lave mengder CbpD^{SD} vil være vanskelig å se i zymogrammet.

5.6 Lytisk aktivitet av CbpD^{SD}

Figur 4.7A viser at fra og med 10µg/ml CbpD^{SD} til og med 1,25µg/ml CbpD^{SD} lyserer cellene i så stor grad at kulturen stopper å vokse. 0,63µg/ml har tydelig lytisk effekt, men kulturen fortsetter å vokse etterpå. I Figur 4.7B er SytoxTM assay brukt. Sytox binder til DNAet til de lyserte cellene og er derfor et mer nøyaktig mål for lysis. I denne Figuren kommer grad av lysis tydeligere frem i de høyeste konsentrasjonene av tilsatt CbpD^{SD}. Eksempelvis ser man at kulturen tilsatt 10µg/ml CbpD^{SD} viser klart størst grad av lysis, mens den i Figur A fremstår

som like stor i kulturen tilsatt 5µg/ml. Dette kan forklares med at fluorsense-målingene er mer sensitive enn OD-målingene. Dette bekreftes også dersom man ser på kulturen tilsatt 0,31µg/ml CbpD^{SD}. Dette er fordi det kan se ut som om det ikke er noe lysis etter tilsetning av CbpD^{SD} i Figur A, mens det i Figur B kommer frem at det er relativt stor grad av lysis. Man kan ut ifra grafene til sammen tolke at et sted mellom 0,63µg/ml og 0,31µg/ml tilsatt CbpD^{SD} gir halvparten av maksimum lysis. Videre ser man at alle konsentrasjoner lavere enn 0,31µg/ml tilsatt CbpD^{SD} er for lave til å gi lysis.

For å få maksimum lysis trenger man ifølge graf A kun 5µg/ml CbpD^{SD}, mens det i graf B kommer frem at 2,5µg/ml gir høyere lysis enn 5µg/ml. I tillegg kommer det frem at 10µg/ml gir høyere lysis enn de andre. Dette kan tyde på at enzymet fortsatt ikke er mettet av substratet og at lysis dermed kunne blitt større dersom det hadde blitt tilsatt enda høyere konsentrasjoner av CbpD. Graf A tyder ikke på dette.

For *S. pneumoniae* har det tidligere blitt registrert opp til 69% lysis. Dette er i flytende kultur og ved at cellene har uttrykt autolysinene LytC og LytA i tillegg til fratrisinet CbpD^{SP} (Eldholm et al., 2009). Dette er imidlertid ikke en veldig god sammenligning da CbpD^{SP}, i nevnte tilfelle, ikke er tilsatt fra rensset form og det ikke er funnet enzymer slik som LytC og LytA i *S. dysgalactiae*. Likevel ser man at disse resultatene korrelerer med resultatene for denne oppgaven. Den høyeste graden av lysis oppnådd er at omtrent halvparten av cellene lyses, dersom man ser på graf A. Det kan dermed tenkes at det er mulig at det *in vivo* er enda større grad av lysis. Figur A viser relativt lave standardavvik. På noen grafer, slik som 0,63µg/ml er det noen større standardavvik, men ikke store nok til å påvirke resultatene.

5.7 Hvor i celleveggen binder CbpD^{SD}?

Forskning har vist at CbpDST, som er homolog med CbpD^{SD}, men mangler SH3b-domenet, binder til septum hos målcellene (Biørnstad et al., 2012). Det er også vist at CbpD^{SP} binder til septum på sine målceller (V. Eldholm et al., 2010). I denne oppgaven, er det på samme måte som i de refererte artiklene over, brukt GFP som er satt inn i stedet for CHAP-domenet, som vist i 4.9. Bindingsmønsteret til CbpD^{SD} (Figur 4.10) viste at dette fratrisinet også binder til septum på sine målceller. Sammenligner man bindingsmønsteret til sfGFP-CbpD^{SD} med hvilke celler som er sensitive for CbpD^{SD} er det en klar sammenheng mellom binding til septum og høy grad av sensitivitet. sfGFP-CbpD^{SD} band tydelig til septum hos *S. dysgalactiae*, *S. pyogenes* og *S. thermophilus* som alle var sensitive, mens for celler der

sfGFP-CbpD^{SD} bandt svakt og jevnt over hele celleoverflaten viste mindre sensitivitet. Unntaket er for *S. sanguinis* hvor sfGFP-CbpD^{SD} bandt jevnt over hele celleoverflaten, men likevel hadde CbpD^{SD} noe lytisk effekt mot disse. Dette tyder på at enzymet har størst lytisk effekt når det binder delingssonen hos målcellene, men at lysis også kan skje ved svakere binding. Man kan spekulere i at siden sfGFP-CbpD^{SD} bant over hele cellen for *S. sanguinis*, så vil også noe binde i delingssonen. Kanskje dette er nok til å lysere en sub-fraksjon av cellepopulasjonen. Bindingen av sfGFP-CbpD^{SD} på *S. pneumoniae* var enda svakere enn for *S. sanguinis* (Figur 4.10), Dette kom også frem i heatmappet der det ble registrert svak binding over hele cellen. og her ble det ikke observert lytisk aktivitet.

I *S. dysgalactiae* kommer det tydelig frem at det er binding i septum, både i mikroskopibildene og heatmappet (Figur 4.10). Ut ifra resultatene til Eldhom et al. og Biørnstad et al. er det dette man ville forventet (Biørnstad et al., 2012; V. Eldholm et al., 2010). Ut ifra evnen CbpD^{SD} har til å lysere arter fra ulike grupper, kunne man likevel forvente binding til septum hos de bakteriene som lyserte. Dette stemte for *S. pyogenes*. Det stemte som tidligere nevnt også med *S. thermophilus*, men som også bare viste noe lysis ved tilsetning av CbpD^{SD} til kulturen.

Hva som gjør at fratrisiner spesifikt gjenkjenner delingssonen hos målceller er ikke kjent. Det er spekulert i om antall tekoinsyrer er forskjellig i septum sammenliknet med resten av celleoverflaten, eller at peptidoglykanet har en annen struktur i septum enn i de perifere delene av cellen. At peptidoglykanet i septum hos Gram-positive celler har en annen struktur enn perifer peptidoglykan ble nylig bekreftet ved hjelp av atomic force mikroskopi (Pasquina-Lemonche et al., 2020).

5.8 CbpD^{SD} lyserer celler fra flere grupper av streptokokker

I tidligere forskning kommer det fram at CbpD^{SP} kan lysere *S. mitis* og *S. oralis*, men ikke *S. gordonii* (Johnsborg et al., 2008). Som tidligere beskrevet, har *S. pneumoniae* og nært beslektede arter slik som eksempelvis *S. mitis* og *S. oralis*, tekoinsyrer dekket med kolin (Denapate, Brückner, Hakenbeck, & Vollmer, 2012). *S. gordonii*, som er i mitisgruppen sammen med de tidligere nevnte streptokokkartene, har ikke kolin i tekoinsyrene (Lima et al., 2019).

Basert på resultatene fra denne oppgaven, kommer det frem at CbpD^{SD} ikke kan lysere *S. pneumoniae*, *S. mitis* eller *S. oralis*. Det vises imidlertid at CbpD^{SD} kan lysere *S. gordonii* og

S. gordonii challis, hvor førstnevnte er den streptokokken i mitisgruppen som er fjernest i slekt til *S. pneumoniae*, som vist i Figur 5.1. Videre kommer det frem at *S. sanguinis* lyserer noe ved tilsetning av CbpD^{SD}. Denne bakterien er nest fjernest fra *S. pneumoniae* av bakteriene i mitisgruppen. Fra mikroskopibildene i Figur 4.10, der sfGFP-CbpD^{SD} er tilsatt til *S. sanguinis*, vises det liten grad av binding, men større grad enn det man ser på de tilsvarende bildene hos *S. pneumoniae*.

På bakgrunn av de nevnte observasjonene er det nærliggende å tro at fordi *S. pneumoniae* og nært beslektede arter har mye kolin i sine tekoinsyrer, mens veldig mange streptokokker ikke har det, kan ikke CbpD^{SD} binde til disse og det vil dermed ikke oppstå lysis. Det kunne vært interessant å endre CHAP-domenet i CbpD^{SD} til et CHAP-domene fra for eksempel CbpD^{SD} for å bekrefte teorien om at det ikke er CHAP som bestemmer en CbpDs evne til lysis hos beslektede arter, men at det derimot er binding til tekoinsyrene og dermed celleveggen som er av betydning. Som beskrevet i 1.6.3, er CHAP veldig konservert mellom arter og dermed er det antakelig ikke dette domenet som avgjør om det oppstår lysis eller ikke.

Videre lyserte *S. equi*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. phocae* og *S. uberis* ved tilsetning av CbpD^{SD}. Alle disse streptokokkene er fra pyogenesgruppen. En interessant observasjon er at *S. porcinus* og *S. fryi* ikke lyserte. De er også fra pyogenesgruppen og dermed nært beslektet til *S. dysgalactiae*. CbpD^{SD} lyserer dermed de fleste streptokokker fra pyogenesgruppen, men ikke alle. *S. ratti*, *S. cricète*, *S. mutans* er alle fra mutansgruppen, og det var kun *S. ratti* og *S. cricète* som lyserte, mens *S. mutans* ikke gjorde det.



Figur 5.1: Fylogenetisk tre. Dette fylogenetiske treet er basert på genomsekvensering av 16s rRNA. De tre gruppene mitis, salivarius og pyogenes er markert, mens de resterende streptokokkgruppene skilles i farger. Figuren er modifisert fra (Thompson, Emmel, Fonseca, Marin, & Vicente, 2013).

S. thermophilus, *S. salivarius* og *Streptococcus vestibularis* er alle fra salivariusgruppen. Kulturene fra både *S. thermophilus* og *S. salivarius* lyserte noe, mens *S. vestibularis* kulturen tydelig lyserte ved tilsetning av CbpD^{SD}. Dette tyder på at CbpD^{SD} binder relativt godt på celleoverflaten til bakterier i denne gruppen. Ut fra mikroskopibildene hvor sfGFP-CbpD^{SD} er tilsatt, vises det en sterk binding til septum hos *S. thermophilus*. Dette kommer også frem i det tilsvarende heatmap-bildet av bakterien (Figur 4.10).

På mikroskopibildene som ble tatt der sfGFP-CbpD^{SD} var tilsatt, ble det observert noen få celler av *S. pneumoniae* som viste binding av proteinet i septum (se Vedlegg A). Dette var noe overraskende siden *S. pneumoniae* var helt immun mot CbpD^{SD}. Det er kjent at SH3b-domenet som finnes hos CbpD fra både *S. dysgalactiae* og *S. pneumoniae* binder peptidoglykan (Eldholm et al., 2010), men siden SH3b-domenet er vist å binde til hele celleoverflaten på pneumokokker, er det mer sannsynlig at det konserverte domenet C-terminalt i CbpD^{SD} er årsaken til at det angripes i septum hos noen pneumokokker. Sannsynligvis gjenkjenner dette domenet egenskaper i nysyntetisert cellevegg som er lignende hos *S. dysgalactiae* og *S. pneumoniae*. Dette er antakelig ikke nok til å gi lysis da dette ikke ble detektert hos bakterien (Tabell 4.1).

Sensitivitetsforsøket for CbpD^{SD} mot ulike streptokokker burde vært gjentatt med tilsetning av sytoxTM for å øke sensitiviteten for cellelysis, spesielt i de bakteriene som gir noe fluktuerende OD-verdier pga at bakteriene vokser i lange kjeder eller klumper. Dette ble det ikke tid til grunnet Covid-19 pandemien.

Både *S. sanguinis* og en *S. sanguinis* mutant som var immun mot CbpD^{SS} ble tilsatt CbpD^{SD}. Begge bakteriestammene viste full lysis og dermed var ikke den immune mutanten immun mot CbpD^{SD}. Man kjenner ikke til immunitetsproteinene til *S. dysgalactiae*, men resultatene fra denne oppgaven indikerer at det ikke er det samme som i *S. sanguinis*. Fordi denne mutanten var tilgjengelig på laboratoriet ble denne testet. Det kunne vært interessant å teste mot en immun streptokokk fra for eksempel pyogenesgruppen for å se om denne var immun.

5.9 Kutting av renset cellevegg med CbpD^{SD}

Det er kjent at mange proteiner, som inneholder CHAP-domenet, kutter i peptidkryssbindingene i peptidoglykanet (Alex & Neil, 2003). Det er nærliggende å tro at dette også gjelder for CbpD^{SD}, men det er til nå ikke funnet ut hvilket bånd i peptidoglykanet som CbpD fra streptokokker kutter. Siden man klarte å rense CbpD^{SD}, et nytt CbpD fra pyogenesgruppen, i dette arbeidet var det derfor ønskelig å teste om dette nye enzymet var hadde aktivitet *in vitro*, og om det var lettere å finne ut *in vitro* for CbpD fra *S. dysgalactiae*.

Hypotesen var at hvis CbpD^{SD} kutter i stempeptidene i peptidoglykanet, så ville disse peptidene kunne detekteres og identifiseres ved hjelp av HPLC og massespektrometri. Dette er en standard fremgangsmåte som har blitt benyttet for å finne kuttasetet til en rekke muralytiske enzymer (William Wiley, Hung, Kym, & Olaf, 1999). Etter celleveggsrensingen

kom det frem i kromatogrammene at det ikke ble detektert noen ekstra topp(er) for prøver inkubert med CbpD^{SD} sammenliknet med kontrollprøvene. Alle toppene kunne forklares som enten cellevegg, CbpD eller DTT. Det kan være fordi CbpD^{SD} har en endopeptidaseaktivitet og kun kutter ett båndet som krysslinker interpeptidbroene, for eksempel mellom L-Lys i posisjon 3 fra peptid 1 og D-Ala i posisjon 4 i peptid 2, eller mellom L-Ala/L-Ser-L-Ala i forgrenede peptidbroer (se Figur 1.6). Da vil fortsatt peptidoglykan kuttet og svekkes, men det kuttet ikke ut et peptid som kan detekteres ved hjelp av HPLC. En løsning kunne vært å tilsette mutanolysin før behandling med CbpD^{SD}. Mutanolysin kutter mellom beta 1-4 N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine koblingene i peptidoglycan-polysakkaridet (Lichtman, Okoruwa, Keku, Schwab, & Sartor, 1992), resulterende i ulike muropeptider der stempeptidene fortsatt er festet til sukkermolekylene. Disse elueres som mange topper i kromatogrammet. Dersom CbpD^{SD} kutter bare én plass som beskrevet over, kunne man sammenliknet kromatogrammene fra cellevegg kuttet bare med mutanolysin med cellevegg kuttet med både mutanolysin og CbpD^{SD}. Potensielt kunne en eller flere av toppene fra mutanolysin-kuttingen ha forskjøvet seg fordi CbpD^{SD} har kuttet av en aminosyre slik at hydrofobisiteten til muropeptidet endres. Alternativt kunne man ha renset kun CHAP-domenet for å sjekke om det kunne ha kuttet uavhengig av SH3 og det konserverte domenet.

5.10 Konklusjon og videre arbeid

For videre undersøkelser basert på funnene i denne oppgaven, er det flere ting som kan være spennende å ta tak i. Dette kan eksempelvis være å benytte CRISPRi-systemet. Dette systemet er elektroporert inn i *S. dysgalactiae* og dette kan utnyttes ved å elektroporere inn det et plasmid som uttrykker sgRNA-molekyler etter ønske. På denne måten kan man studere genfunksjoner i cellen dersom naturlig transformasjon ikke lar seg gjøre. Dette er også en enkel og effektiv måte for å regulere genuttrykk og dermed kunne studere vitale gener. I tillegg har det blitt vist at *S. thermophilus* får økt grad av transformasjon dersom de har genene som koder for CbpDST (Biørnstad et al., 2012). Det kunne da vært interessant å utforske om dette også gjaldt for *S. dysgalactiae*, ved for eksempel å bruke CRISPRi-systemet eller ved å slette *CbpD^{SD}*. Dette fordrer at man får til transformasjon og at man da sammenligner transformasjon i *S. dysgalactiae* stammer med og uten *CbpD^{SD}*. Videre har resultatene i denne oppgaven vist at CbpD^{SD} er relativt bredspektret, noe som hadde vært interessant å undersøke ytterligere. Hvorfor lyserer noen bakterier og andre ikke? Hvilket molekyl på overflaten gjenkjenner det C-terminale konserverte domenet til CbpD^{SD}?

Resultatene i denne oppgaven har videre vist at *S. dysgalactiae* også kan brukes som en mindre patogen organisme for å eksempelvis undersøke *S. pyogenes*, da disse har mange av de samme egenskapene. CbpD^{SD} bandt i septum hos *S. pyogenes* og det er dermed nærliggende å tro at CbpD fra de to bakteriene deler likheter.

Som tidligere beskrevet, ble det rensset så betydelige mengder protein ved denne metoden at det derfor skal være mulig å prøve krystallografi for å forsøke å løse 3D-strukturen til CbpD^{SD}. Dette kunne også vært en metode for å finne kuttasetet til CbpD^{SD} ved å ko-krySTALLISERE stempeptider med CbpD^{SD}.

S. dysgalactiae har de siste årene vist seg også å være et humanpatogen, samt en viktig patogen i for eksempel storfeindustrien. Det er viktig å undersøke antibiotikaresistensspredningen i dette patogenet da denne, basert på kunnskap om andre streptokokker, også kan erverve seg gener for antibiotikaresistens.

Dersom transformasjonen av *S. dysgalactiae* ikke er mulig, kan bruk av luciferase være en alternativ metode for å undersøke kompetansesystemet til bakterien. Man kan da plassere et luciferase reporter-gen (eller *GFP*), bak en kompetanseindusert promotor. Dette skal i teorien være mulig da det på bakgrunn av resultatene for denne oppgaven er vist at det er mulig å elektroporere *S. dysgalactiae*. Så kan man måle luminescence fra cellene etter tilsetning av ComS.

Resultatene fra denne oppgaven gir nye kunnskaper om CbpD fra pyogenesgruppen, da ingen har klart å rense CbpD fra bakterier i denne gruppen tidligere. Det er flere interessante funn, slik som hvilke bakterier CbpD^{SD} kan lysere og hvor CbpD^{SD} binder i målcellen. Det er imidlertid flere ting som må undersøkes videre, og det kan virke som at *S. dysgalactiae* kan bli en viktig modellorganisme for CbpD-undersøkelser hos streptokokker i pyogenesgruppen i fremtiden.

Referanseliste

- Abdelsalam, M., Asheg, A., & Eissa, A. E. (2013). Streptococcus dysgalactiae: An emerging pathogen of fishes and mammals. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(1), 1-6. doi:10.1016/j.ijvsm.2013.04.002
- Alex, B., & Neil, D. R. (2003). The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), 234-237. doi:[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00061-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00061-6)
- Almeida, R. A., & Oliver, S. P. (1995). Invasion of Bovine Mammary Epithelial Cells by Streptococcus dysgalactiae. *Journal of Dairy Science*, 78(6), 1310-1317. doi:[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76752-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76752-2)
- Archibald, A. R., & Baddiley, J. (1967). The Teichoic Acids. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 21, 323-375. doi:[https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60320-3](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60320-3)
- Aune, T. E. V., & Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1301-1313. doi:10.1007/s00253-009-2349-1
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2), 137-158. doi:10.1084/jem.79.2.137
- Bateman, A., & Rawlings, N. D. (2003). The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), 234-237.
- Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2014). *Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases: 2-volume set* (Vol. 2): Elsevier Health Sciences.
- Berg, K. H., Biørnstad, T. J., Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2012). Properties and biological role of streptococcal fratricins. *Appl Environ Microbiol*, 78(10), 3515-3522. doi:10.1128/aem.00098-12
- Berg, K. H., Ohnstad, H. S., & Håvarstein, L. S. (2012). LytF, a novel competence-regulated murein hydrolase in the genus Streptococcus. *J Bacteriol*, 194(3), 627-635. doi:10.1128/jb.06273-11
- Biørnstad, J., Ohnstad, H., & Håvarstein, L. (2012). Deletion of the murein hydrolase CbpD reduces transformation efficiency in Streptococcus thermophilus. *Microbiology (Reading, England)*, 158, 877-885. doi:10.1099/mic.0.056150-0
- Block, H., Maertens, B., Priestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., . . . Schäfer, F. (2009). Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Methods in Enzymology*, 463, 439-473. doi:[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5)
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology*, 26(21), R1126-R1130. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.058>
- Brunell, J.,
- Green, R. (2014). Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*, 541, 151-159. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Calvinho, L. F. A., R. A
- Oliver, S. P. (1998). Potential virulence factors of Streptococcus dysgalactiae associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 61(1), 93 - 110. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00172-2)
- Cesaratto, F. B., O. R., & Petris, G. (2016). Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *Journal of Biotechnology*, 231, 239 - 249. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.012>

- Choi, S. C., Rasmussen, M. D., Hubisz, M. J., Gronau, I., Stanhope, M. J., & Siepel, A. (2012). Replacing and Additive Horizontal Gene Transfer in Streptococcus. *Molecular Biology and Evolution*, 29(11), 3309-3320. doi:10.1093/molbev/mss138
- Claverys, J.-P., & Håvarstein, L. S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 219-229. doi:10.1038/nrmicro1613
- Claverys, J.-P., Martin, B., & Håvarstein, L. S. (2007). Competence-induced fratricide in streptococci. *Molecular Microbiology*, 64(6), 1423-1433. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05757.x>
- Claverys, J.-P., Martin, B., & Polard, P. (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 643-656. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00164.x
- Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R., & Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of teichoic acids in Streptococcus pneumoniae and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist*, 18(3), 344-358. doi:10.1089/mdr.2012.0026
- Diernhofer, K. (1932). Aesculinbouillon als Hilfsmittel für die Differenzierung von Euter- und Milchstreptokokken bei Massenuntersuchungen. *Milchwirts Forsch*, 13, 368-374.
- Donahue Jr, R. A., & Bebee, R. L. (1999). BL21-SI™ competent cells for protein expression in E. coli. *Protein Expr. Purif*, 7, 289.
- Edgar, R. J., van Hensbergen, V. P., Ruda, A., Turner, A. G., Deng, P., Le Breton, Y., . . . Korotkova, N. (2019). Discovery of glycerol phosphate modification on streptococcal rhamnose polysaccharides. *Nature Chemical Biology*, 15(5), 463-471. doi:10.1038/s41589-019-0251-4
- Eldholm, Johnsborg, Haugen, Ohnstad, & Håvarstein. (2009). Fratricide in Streptococcus pneumoniae: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology (Reading)*, 155(Pt 7), 2223-2234. doi:10.1099/mic.0.026328-0
- Eldholm, Johnsborg, Straume, Ohnstad, Berg, Hermoso, & Håvarstein. (2010). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Molecular Microbiology*, 76(4), 905-917. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07143.x>
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H. S., Berg, K. H., Hermoso, J. A., & Håvarstein, L. S. (2010). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Molecular Microbiology*, 76(4), 905-917. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07143.x>
- Garvie, E. I., Farrow, J. A. E., & Bramley, A. J. (1983). Streptococcus dysgalactiae (Diernhofer) nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(2), 404-405. doi:<https://doi.org/10.1099/00207713-33-2-404>
- Gisch, N., Peters, K., Zähringer, U., & Vollmer, W. (2015). Chapter 8 - The Pneumococcal Cell Wall. In J. Brown, S. Hammerschmidt, & C. Orihuela (Eds.), *Streptococcus Pneumoniae* (pp. 145-167). Amsterdam: Academic Press.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *Epidemiology & Infection*, 27(2), 113-159.
- Hayes, F. (2001). The Horizontal Gene Pool — Bacterial Plasmids and Gene Spread. Christopher M. Thomas (ed.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2000. Pp. 419. Price £69.00, hardback. ISBN 90 5702 462 4. *Heredity*, 86(2), 251-252. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.0902b.x>
- Hughes, J. M., Wilson, M. E., Brandt, C. M., & Spellerberg, B. (2009). Human Infections Due to Streptococcus dysgalactiae Subspecies equisimilis. *Clinical Infectious Diseases*, 49(5), 766-772. doi:10.1086/605085
- Jason, W. R., & Elaine, I. T. (2020). Caging and COM-Bating Antibiotic Resistance. *Cell Host & Microbe*, 27(4), 489-490. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.013>
- Jenkinson, H. F., & Lamont, R. J. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8(2), 175-200. doi:10.1177/10454411970080020601

- Jobin, M.-C., & Grenier, D. (2003). Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*, 220(1), 113-119. doi:10.1016/s0378-1097(03)00088-0
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjørnstad, M. L., & Håvarstein, L. S. (2008). A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology*, 69(1), 245-253. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06288.x>
- Johnsborg, O., & Håvarstein, L. S. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 627-642. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00167.x
- Kimoto, H., & Taketo, A. (2003). Efficient Electrotransformation System and Gene Targeting in Pyogenic *Streptococci*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(10), 2203-2209. doi:10.1271/bbb.67.2203
- Krzyściak, W., Pluskwa, K. K., Jurczak, A., & Kościelniak, D. (2013). The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(11), 1361-1376. doi:10.1007/s10096-013-1914-9
- Lam, T., Ellison, C. K., Eddington, D. T., Brun, Y. V., Dalia, A. B., & Morrison, D. A. (2021). Competence pili in *Streptococcus pneumoniae* are highly dynamic structures that retract to promote DNA uptake. *Molecular Microbiology*, n/a(n/a). doi:<https://doi.org/10.1111/mmi.14718>
- Lichtman, S. N., Okoruwa, E. E., Keku, J., Schwab, J. H., & Sartor, R. B. (1992). Degradation of endogenous bacterial cell wall polymers by the muralytic enzyme mutanolysin prevents hepatobiliary injury in genetically susceptible rats with experimental intestinal bacterial overgrowth. *J Clin Invest*, 90(4), 1313-1322. doi:10.1172/jci115996
- Lima, B. P., Kho, K., Nairn, B. L., Davies, J. R., Svensäter, G., Chen, R., . . . Herzberg, M. C. (2019). Streptococcus gordonii Type I Lipoteichoic Acid Contributes to Surface Protein Biogenesis. *mSphere*, 4(6), e00814-00819. doi:10.1128/mSphere.00814-19
- Llull, D., López, R., & García, E. (2006). Skl, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS Lett*, 580(8), 1959-1964. doi:10.1016/j.febslet.2006.02.060
- Maestro, B., & Sanz, J. M. (2016). Choline Binding Proteins from *Streptococcus pneumoniae*: A Dual Role as Enzybiotics and Targets for the Design of New Antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*, 5(2). doi:10.3390/antibiotics5020021
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O., & Sharma, P. (2010). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 22-26.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D. A., & Federle, M. J. (2010). A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Molecular Microbiology*, 78(3), 589-606. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07361.x>
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D. A., & Federle, M. J. (2012). The Cryptic Competence Pathway in Streptococcus pyogenes Is Controlled by a Peptide Pheromone. *Journal of Bacteriology*, 194(17), 4589-4600. doi:10.1128/jb.00830-12
- Massidda, O., Nováková, L., & Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environmental Microbiology*, 15(12), 3133-3157. doi:<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12189>
- Montanari, M. P., Cochetti, I., Mingoia, M., & Varaldo, P. E. (2003). Phenotypic and Molecular Characterization of Tetracycline- and Erythromycin-Resistant Strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7), 2236-2241. doi:10.1128/aac.47.7.2236-2241.2003
- Nobbs, A., Lamont, R., & Jenkinson, H. (2009). *Streptococcus* Adherence and Colonization. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73, 407-450, Table of Contents. doi:10.1128/MMBR.00014-09

- O'Connell, M. (1984). 1.1 Genetic Transfer in Prokaryotes: Transformation, Transduction, and Conjugation. *Advanced molecular genetics*, 2.
- Oppegaard, O., Mylvaganam, H., Skrede, S., & Kittang, B. R. (2018). Exploring the arthritogenicity of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. *BMC Microbiology*, 18(1), 17. doi:10.1186/s12866-018-1160-5
- Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R. D., Kumar, S., Tank, R., Mullin, N., . . . Hobbs, J. K. (2020). The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*, 582(7811), 294-297. doi:10.1038/s41586-020-2236-6
- Patterson, M. J. (1996). *Streptococcus*. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
- Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Perry, J., & Wright, G. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in Microbiology*, 4(138). doi:10.3389/fmicb.2013.00138
- Rahman, M., Uddin, M., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4. doi:10.3329/akmmcj.v4i1.13682
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*, 5, 172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., . . . Erlich, H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491. doi:10.1126/science.239.4839.487
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006a). *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006b). Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *CSH Protoc*, 2006(1). doi:10.1101/pdb.prot3932
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Sauerbier, J., Maurer, P., Rieger, M., & Hakenbeck, R. (2012). *Streptococcus pneumoniae* R6 interspecies transformation: genetic analysis of penicillin resistance determinants and genome-wide recombination events. *Molecular Microbiology*, 86(3), 692-706. doi:<https://doi.org/10.1111/mmi.12009>
- Scheffers, D.-J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 585-607. doi:10.1128/mubr.69.4.585-607.2005
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550(7676), 345-353. doi:10.1038/nature24286
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Solomon, J. M., & Grossman, A. D. (1996). Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends in Genetics*, 12(4), 150-155. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10014-7](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10014-7)
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472-482. doi:10.1038/nrg3962
- Steinmoen, H., Knutsen, E., & Håvarstein, L. S. (2002). Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7681-7686.
- Straume, D., Piechowiak, K. W., Olsen, S., Stamsås, G. A., Berg, K. H., Kjos, M., . . . Håvarstein, L. S. (2020). Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal

- cell wall. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(11), 6129-6138.
doi:10.1073/pnas.1917820117
- Straume, D., Stamsås, G. A., & Håvarstein, L. S. (2015). Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 371-380.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.020>
- Straume, D., Stamsås, G. A., Salehian, Z., & Håvarstein, L. S. (2017). Overexpression of the fratricide immunity protein ComM leads to growth inhibition and morphological abnormalities in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 163(1), 9-21.
doi:<https://doi.org/10.1099/mic.0.000402>
- Thompson, C., Emmel, V., Fonseca, E., Marin, M., & Vicente, A. (2013). Streptococcal taxonomy based on genome sequence analyses [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 2(67).
doi:10.12688/f1000research.2-67.v1
- Truman, A., & Hook, B. (2013). A TEV Protease Compatible with Inhibitory Compounds from Protein Purification.
- Vandamme, P., Pot, B., Falsen, E., Kersters, K., & Devriese, L. A. (1996). Taxonomic Study of Lancefield Streptococcal Groups C, G, and L (*Streptococcus dysgalactiae*) and Proposal of *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(3), 774-781. doi:<https://doi.org/10.1099/00207713-46-3-774>
- Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature Methods*, 10(3), 211-220.
doi:10.1038/nmeth.2371
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Vollmer, W., Massidda, O., & Tomasz, A. (2019). The Cell Wall of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 7(3). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0018-2018
- Vollmer, W., & Seligman, S. J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in microbiology*, 18(2), 59-66.
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., . . . Wolfs, P. F. G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7(173).
doi:10.3389/fmicb.2016.00173
- Weaver, J. C. C., Yu, A. (1996). Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41(2), 135 - 160. doi:[https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05062-3](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05062-3)
- Wente, N., & Krömker, V. (2020). *Streptococcus dysgalactiae*—Contagious or Environmental? *Animals*, 10(11), 2185. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/11/2185>
- William Wiley, N., Hung, T.-T., Kym, F. F., & Olaf, S. (1999). Multiple Enzymatic Activities of the Murein Hydrolase from Staphylococcal Phage ϕ 11: IDENTIFICATION OF A d-ALANYL-GLYCINE ENDOPEPTIDASE ACTIVITY*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), 15847-15856.
doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15847>
- Yao, L., Cengic, I., Anfelt, J., & Hudson, E. P. (2016). Multiple Gene Repression in Cyanobacteria Using CRISPRi. *ACS Synthetic Biology*, 5(3), 207-212. doi:10.1021/acssynbio.5b00264
- Yu, J., Zhou, T., Zhu, B., Wei, Y., Li, X., & Liu, Y. (2020). Species-Specific Identification of *Streptococcus* based on DNA Marker in 16S–23S rDNA Internal Transcribed Spacer. *Current Microbiology*, 77(8), 1569-1579. doi:10.1007/s00284-020-01975-8
- Ziqing, M., Feng, W., Yutao, Q., Zhiyuan, Z., Qi, H., Han, L., . . . Yigong, S. (2009). Molecular Determinants of MecA as a Degradation Tag for the ClpCP Protease*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 34366-34375. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053017>

Vedlegg

Vedleggsinnhold

Vedlegg A: Bilder av CbpD^{SD} mot *S. pneumoniae*

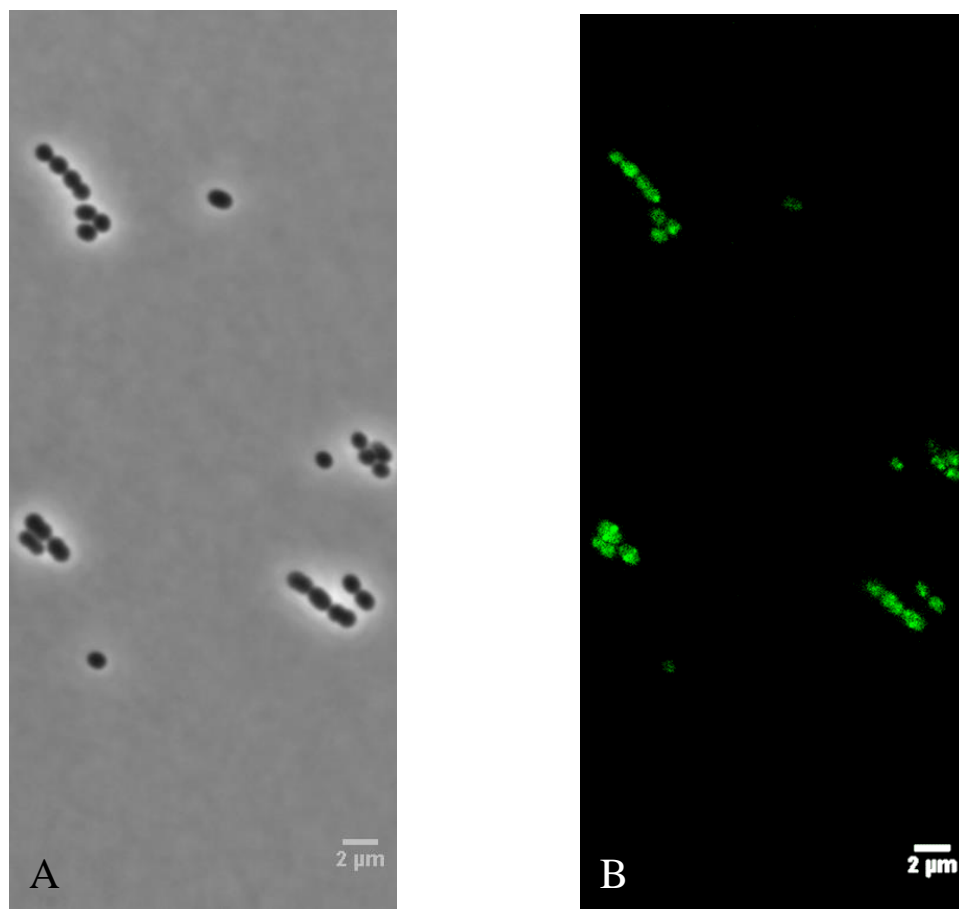
Vedlegg B: Ulike streptokokkarters sensitivitet for CbpD^{SD}

Vedlegg C: Rensing av TEV-protease

Vedlegg D: Multippel sammenstilling av CHAP-domener

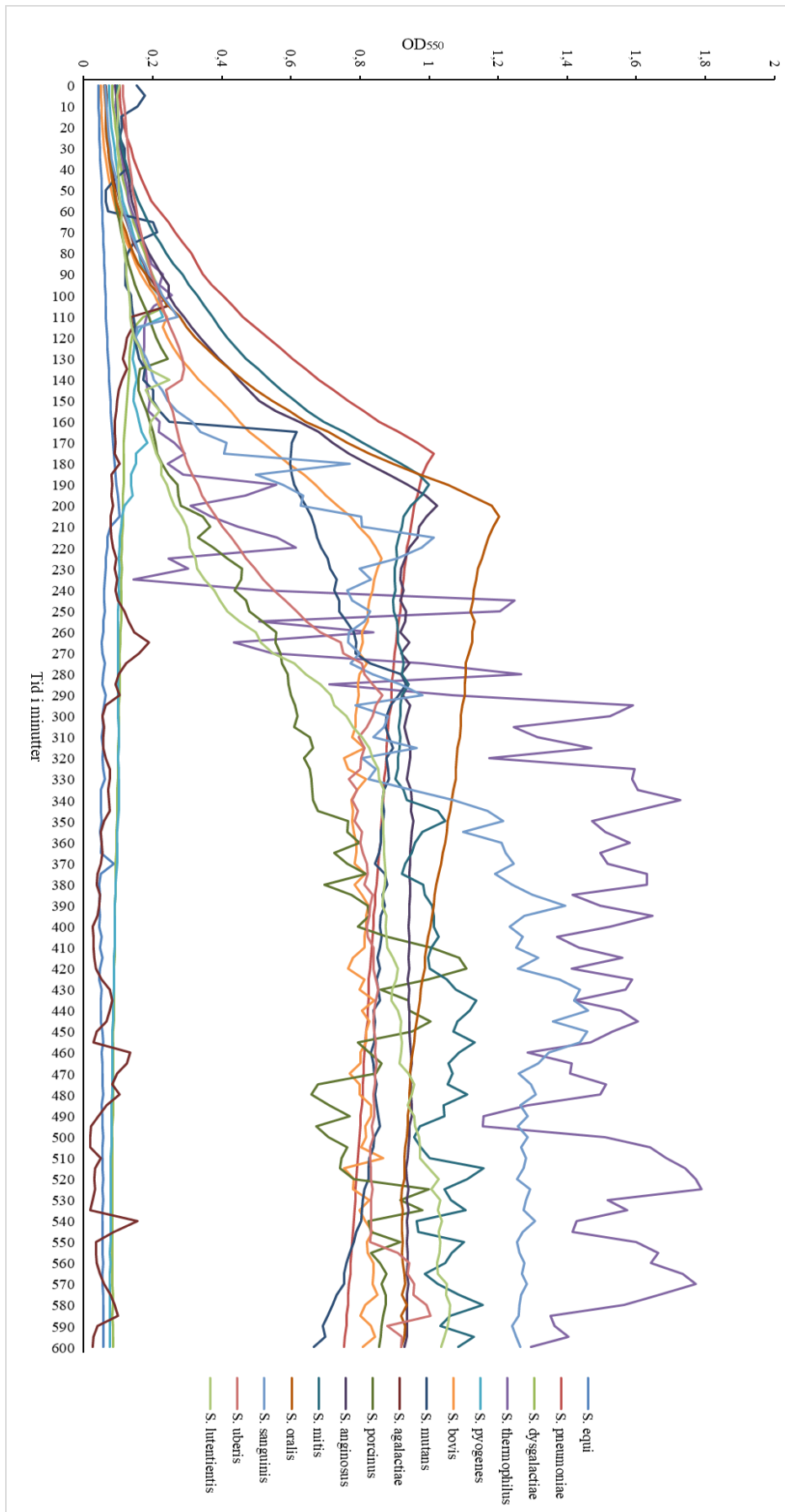
Vedlegg E: DNA- og aminosyresekvensen til His-TEV-CbpD^{SD}

Vedlegg F: Forkortelser

Vedlegg A: Binding av CbpD^{SD} til overflaten av *S. pneumoniae*

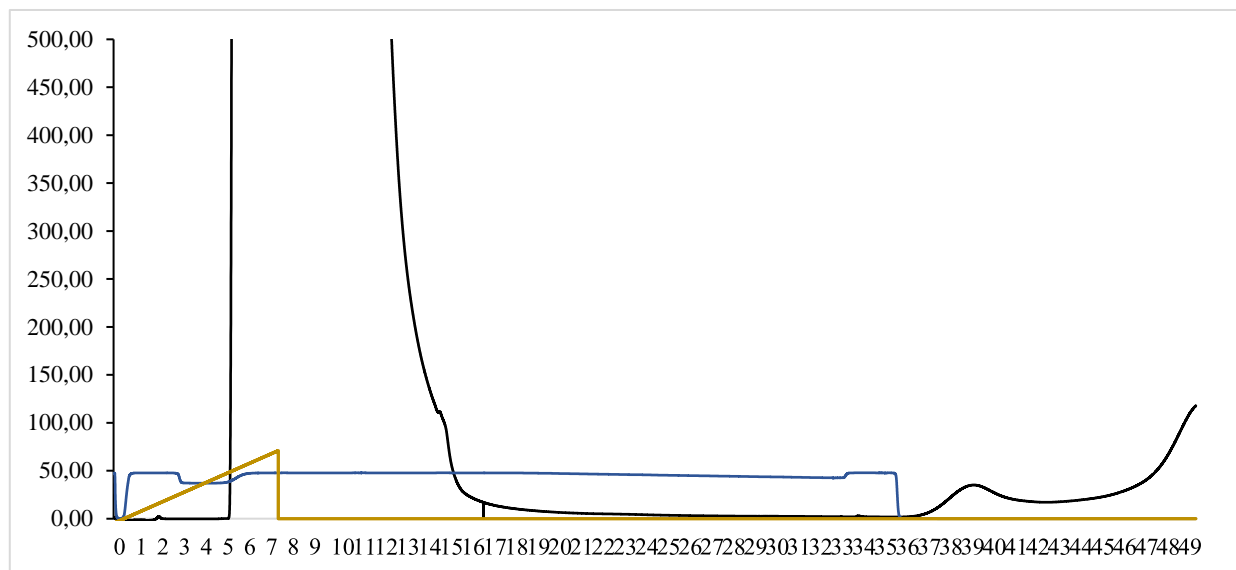
Figur A: CbpD^{SD} mot *S. pneumoniae*. GFP-CbpD^{SD} viste noe binding til septum hos *S. pneumoniae* i noen av bildene, slik som beskrevet i Seksjon 5.8. Bilde A viser fasekontrastbilde av *S. pneumoniae* og bilde B viser *S. pneumoniae* tilsatt GFP-CbpD^{SD}.

Vedlegg B: Ulike streptokokkarters sensitivitet for CbpD^{SD}

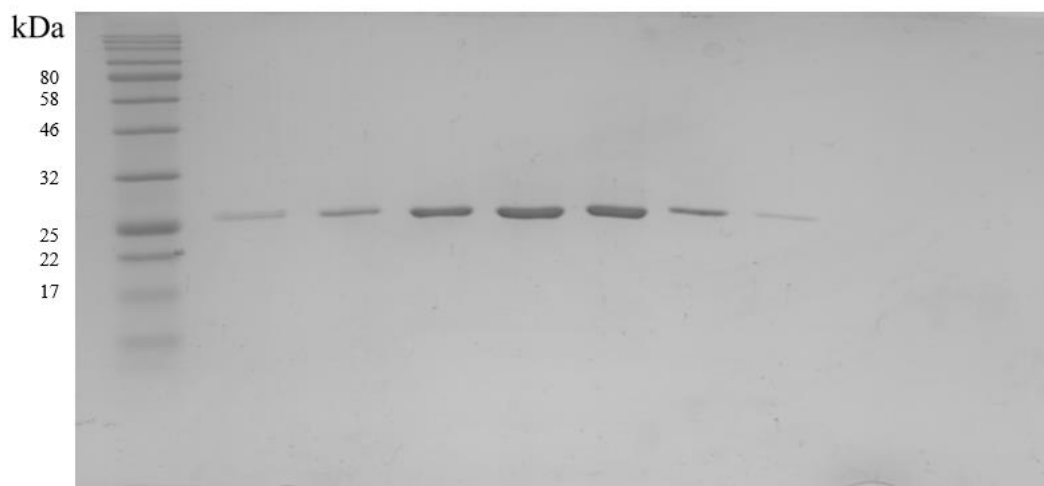


Figur B: CbpD^{SD}. Oversikt over ulike arter av streptokokkers sensitivitet mot CbpD^{SD}.

Vedlegg C: Rensing av TEV-protease



Figur C.1: His-TEV-protease. Kromatogram som viser His-TEV-proteasen. Den svarte grafen er proteinet, den gule er buffer B og den blå er mS/cm.



Figur C.2: His-TEV-Protease. SDS-page-gel viser prøvene som i viser en topp i Figur C.1. TEV sin teoretiske størrelse er 28-29kDa og konsentrasjonen på prøvene 0,29mg/ml.

Vedlegg D: DNA-sekvens og aminosyre-sekvens til His-TEV-CbpD hos *S. dysgalactiae*

>His-TEV-CbpD *S. dysgalactiae*

ATGCATCATCATCATCATGAGAACCTGTACTTCCAAGGTGAACATACAGGAG
 TTGTTTCATGCAGCTGTCCTTGGGGATAATTATCCTAGCAAATGGAAAAAGGGATC
 TGGAATTGATTCTTGGAATATGTATGTTTCGTCAGTGCACATCATTTGTCGCTTTCC
 GTCTGAGTTCAGCAAATGGTTTTTCAGTTGCCCAAAGGCTATGGGAATGCCTGCAC
 TTGGGGACATATTGCAAAAAACAAGGCTATACTGTCAATAAGACCCCTAAAGTC
 GGGGCAGTGGCGTGGTTTGATACTAACGCTTTCCAATCTCATGCAACGTATGGTC
 ATGTGGCTTGGGTAGCCGAAGTACGTGGAGATTCTGTTGTGATTGAGGAATATAA
 TTACAATGCTGGTCAAGGACCTGAGAAATACCATAAGCGTCAAATCCCCAAAAA
 CCATGTGAGCGGTTATATTCATTTTAAAGATTTGCCTAGTGGTGAAGCAAGTAAG
 TCTCAAACAAAAGAACAACAGGTTTTCTAAAGAAGCAGTAAAAACAAGGAGGAACT
 TACCATTTTACTGAGCGTACTCCTGTAAAGCACAGGCTCAACTCACTAGTCCTGA
 CTTAGCTTATTATAATCCTGGACAATCTGTTTCATTACGATCAAGCTATGACCGTTG
 ACGGTCATGAATGGATTAGCTATCTCAGTTTTTCAGGAAGTCGACGTTATATCCC
 AATTA AAAAGACGGGGCAAAAAACACAACAAGTCTCTGAGACAACATCGCCTAT
 CAATATTGGTGATAGAGTGACTTTCCCTGGCGTTTTCCGTGTGGATCGTATTGTAA
 ACAATCTATTAGTTAGCGAGGAGCTAGCTGGTGGGGGCGCTACTTCTCTTAACTG
 GATTGATCCCTCACCTTTGGATGAAACAGATCGTAAAGGAGTAAAAGCAGGAAA
 TCAAATTTTACAGGCCGGTGAGTTTTTTGTTATCCCAGGTA ACTATAGGGTACTGA
 AAGTCGACCGACCAAGCAATGGGATTTATGTCAAGATTGGATCACGTGGAACAT
 GGTTAACTGCTGATAAAGCCTCTAAATTGCCATAA

>His-TEV-CbpD *S. dysgalactiae*

MHHHHHHENLYFQGEHTGVVHAAVLGDNYPKWKKGSGIDSWNMYVRQCTSFVA
 FRLSSANGFQLPKGYGNACTWGHIAKKQGYTVNKTPKVGAVAWFDTNAFQSHATY
 GHVAWVAEVRGDSVVIEEYNYNAGQGPEKYHKRQIPKNHVSFYIHFKDLPSGEASK
 SQTKEQQVSKEAVKQGGTYHFTERTPVKAQAQLTSPDLAYYNPGQSVHYDQAMTV
 DGHEWISYLSFSGNRRYIPIKKIEQKTQQVSETTSPINIGDRVTFPGVFRVDRIVNLLV
 SEELAGGGATSLNWIDPSPLDETDRKGVKAGNQILQAGEFFVIPGNRYRVLKVDRPSN
 GIYVKIGSRGTWLTADKASKLP

His-taggen er markert i gul, mens TEV-kuttasetet er markert i grønn.

Vedlegg E: Forkortelser

CbpD = Kolinbindende protein D

CbpD^{SD} = CbpD fra *S. dysgalactiae*

CbpD^{SP} = CbpD fra *S. pneumoniae*

CbpDST = CbpD fra *S. thermophilus*

SH3b = Src homologi 3b

CHAP = Cystein, histidin-avhengig amidohydrolase/peptidase

sfGFP = Superfolder Green fluorescence protein



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway