



Forord

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av studieprogrammet Master i Mikrobiologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Arbeidet ble utført på Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap, seksjon for molekylær mikrobiologi. Arbeidet foregikk i perioden august 2014 til mai 2015.

Først vil jeg takke hovedveileder Prof. Leiv Sigve Håvarstein for god veiledning og oppfølging både i praktisk arbeid og under skriveprosessen. Jeg vil også gi en stor takk til medveileder Dr. Kari Helene Berg som under hele prosessen har gitt super veiledning og tips under laboratoriearbeidet. Og mest av alt vil jeg takke deg for dine kommentarer og tips under skriveprosessen. Jeg setter veldig stor pris på all tid og arbeid du har lagt i det.

Generelt rettes en stor takk til alle medarbeiderne på laboratoriet og den lille gruppen Molekylær mikrobiologi. Jeg ønsker å takke Dr. Daniel Straume for god hjelp under HPLC-forsøkene og for annen god hjelp til diverse praktiske problemer på laben. Zhian Salehian fortjener også en stor takk for hjelp til alle småting på laben. Jeg vil også takke Gro Stamsås for gode tips til håpløse PCR-reaksjoner. En takk rettes også til mine medmasterstudenter, Olav Aaseth Hegnar og Vegard Osa Lie for å lage god stemning på laben og for å dele bekymringer, spørsmål og svar.

Til slutt ønsker jeg å takke alle venner og all familie for å gi meg god støtte gjennom perioden, og for å ha gitt meg mange uforglemmelige opplevelser og minner under hele studietiden min.

Karoline Wahlstrøm

Ås, mai 2015

Sammendrag

Streptococcus pneumoniae er en bakterie som kan forårsake flere sykdommer, og det har blitt observert økende antibiotikaresistens blant pneumokokker. Essensielle gener, altså gener bakterien er avhengig av for fullstendig cellefunksjon og overlevelse, utgjør potensielle mål for antibiotika. Dette gjør studier av essensielle gener viktig. Essensielle gener er vist å være vanskelig å studere, siden man ikke kan se konsekvensene av mangel på genproduktet før cellene dør. Dette er gjort mulig ved å uttrykke et essensielt gen ektopisk fra en regulerbar promoter ved hjelp av en inducer, noe som muliggjør delesjon av det native genet. Slik kan man manipulere uttrykket av genet ved tilsetning av inducer, og overuttrykke eller deplete genet. Slik kan man se hvordan bakterien påvirkes, og få en ide om hvilke prosesser det essensielle genproduktet er involvert i. ComRS-systemet induseres av peptidet ComS, som aktiverer transkripsjonsregulatoren ComR som videre regulerer transkripsjon av gener fra promoteren P_{comX} . Ved å sette inn et ønsket essensielt gen bak P_{comX} , og skru av den native varianten av genet, kan man ved tilsetning av ønsket konsentrasjon av ComS kontrollere uttrykket av genet bak P_{comX} . Et annet system mye brukt system er Zn^{2+} -systemet. Her kan man regulere uttrykket av gener fra promoteren P_{czcD} ved å tilsette Zn^{2+} til vekstmediet.

I dette arbeidet ble 15 modifiserte peptider (S1-S15) syntetisert med utgangspunkt i ComS*. Hensikten var å se om en av disse hadde andre ønskede egenskaper enn ComS*. Testede egenskaper var bl.a. maksimums induksjon, hvor høy eller lav konsentrasjon av peptider som trengtes og hvor raskt peptidet ble degradert i cellen. Luciferase reporterassay viste at et peptid S1, induserte til høyere luciferaseaktivitet ved lavere konsentrasjoner enn ComS*. Luciferase reporterassay og depletion-forsøk viste at peptidene S4 og S6 ga raskere nedgang luciferaseaktivitet og raskere depletion. Noe som er fordelaktig for å få en rask effekt av fraværet av et genprodukt. Dermed kan man anta at S4 og S6 degraderes raskere i cellen enn ComS*. I tillegg ble det nyetablerte ComRS-systemet sammenlignet med det veletablerte Zn^{2+} -systemet i *S. pneumoniae*. Deres evne til å kontrollere genuttrykk, og til å deplete et essensielt gen ble undersøkt. Luciferase reporterassay og depletion-forsøk viste at ComRS-systemet er best egnet til overuttrykkelse av et gen. En viktig grunn til dette er at høye konsentrasjoner av Zn^{2+} har negative effekter på cellen. Zn^{2+} -systemet gir derimot noe raskere depletion. En mulig forklaring kan være at Zn^{2+} inngår i flere cellefunksjoner og dermed raskere brukt opp av cellen. ComRS-systemet er også vist å egne seg godt til depletion. Totalt sett er det mindre usikkerhet ved bruk av ComRS-systemet, siden ComS* ikke har andre kjente virkninger i cellen enn induksjon.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is a bacterium that may cause several diseases, and it is been observed increasing antibiotic resistance among pneumococci. Essential genes, that is to say genes a bacterium relies on to maintain completely cell function and survival, constitute potential targets for antibiotics. Studies of essential genes are therefore important, but difficult because you do not have the time to see the effects of the lack of the gene product before cell lysis. Studies are possible by expressing an essential gene ectopic from a regulative promoter using an inducer, which allows deletion of a native gene. In this way, one can manipulate the expression of the gene by addition of inducer, and overexpressing or deplete the gene. This shows that the bacteria is affected, and get an idea of which processes the essential gene product is involved in. The ComRS system is induced by the peptide ComS, which activates the transcription regulator ComR, which further regulates transcription of genes form the promoter P_{comX} . By inserting a desirable gene behind P_{comX} , and turn of the native variant of the gene you could, and by adding desirable concentration of ComS, control the expression of the gene behind P_{comX} . Another system that is widely used is the Zn^{2+} -system where you can regulate the gene expression from the promoter P_{czd} by adding Zn^{2+} to the growth medium.

In this work 15 modified peptides (S1-S15) where synthesized based on ComS*. The purpose of the peptides where to find out if a peptide has other properties than ComS*. Tested properties including maximum induction, how high or low concentration of peptides needed, and how fast the peptide degrades in the cell. Luciferase reporter assay showed that a peptide S1, induced to higher activity of luciferase by lower concentrations than ComS*. Luciferase reporter assay and depletion experiments showed that S4 and S6 peptides provides a faster depletion than ComS*. This is advantageous to see a fast effect of the lack of a gene product. Thereby, one can assume that S4 and S6 degrades faster in the cell than ComS*. In this work, the newly established ComRS system was compared to the established Zn^{2+} system in *S. pneumoniae*. Their ability to control gene expression, and their ability to deplete an essential gene were investigated. Luciferase reporter assay and depletion experiments showed that the ComRS system is best suited to over expression genes. A reason to this is that high concentrations of Zn^{2+} have negative effects on the cell. However, the Zn^{2+} system provides a slightly faster depletion. A possible explanation is that Zn^{2+} is included in many other cell functions and thereby faster used by the cell. The ComRS system is also shown to be well suited to depletion. Totally, it is less insecurity by use of the ComRS system, because ComS* do not have any other known function in the cell than induction.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.1.1 Fylogeni, morfologi og metabolisme	1
1.1.2 Naturlig genetisk transformasjon hos <i>S. pneumoniae</i>	3
1.1.3 Epidemiologi, vaksiner og penicillinresistens	5
1.2 Essensielle gener og studier av essensielle gener ved hjelp av heterologiske/induserbare promotersystemer	7
1.2.1 Ektopiske promotersystemer	7
1.3 Zn ²⁺ -systemet	8
1.4 Det heterologe promotersystemet ComRS	10
1.4.1 Kompetanseregulering med ComRS-systemet	10
1.4.2 Peptidet ComS	10
1.4.3 Transkripsjonsregulatoren ComR og aktivering ved ComS	11
1.4.4 ComRS som et heterologt promotersystem i <i>S. pneumoniae</i>	12
1.5 Målet med oppgaven	14
2. Materialer	16
2.1 Stammer av <i>S. pneumoniae</i> og plasmider	16
2.2 Sekvenseringsprimere	17
2.3 Primere	17
2.4 Peptider	19
2.5 Molekylvektstandarder, enzymer og nukleotider	20
2.6 Antibiotika	21
2.7 Kit	21
2.8 Dataprogrammer	21
2.9 Kjemikalier	21
2.10 Utstyr	24
2.11 Oppskrifter – Dyrkningsmedier, løsninger og buffere	25
2.11.1 Dyrkningsmedier	25
Pre C-medium:	25
2.11.2 Løsninger og buffere	27
2.5 Øvrige løsninger og buffere	30
2.5.1 Natriumfosfatbuffer	30
2.5.2 Fikseringsløsning for mikroskopering	30
3. Metode	31
3.1 Dyrking og oppbevaring av <i>S. pneumoniae</i>	31
3.2 Oppløsning av peptider i natriumacetatbuffer	31

3.2.1 Bestemmelse av peptidenes konsentrasjon.....	32
3.3 Luciferase genreporterassay og undersøkelse av peptidenes aktivitet	32
3.3.1 Protokoll luciferase genreporterassay.....	33
3.4 Vekstforsøk for SPH165	33
3.5 Depletion ved bruk av ComRS-systemet	33
3.5.1 Protokoll depletion	34
3.6 SDS-Page og Bocillin-merking av PBPer	35
3.7.1 Protokoll SDS-PAGE av Bocillin-merkede prøver	36
3.7 Mikroskopering	37
3.8 Inhiberingsforsøk.....	37
3.9 PCR med Phusion DNA-polymerase	38
3.9.1 Polymerase Chain Reaction.....	38
3.9.2 Overlap ekstension-PCR	39
3.9.3 Protokoll PCR.....	40
3.10 Agarosegel-elektroforese.....	41
3.10.1 Protokoll agarosegel-elektroforese.....	42
3.11 Transformasjon.....	43
3.11.1 Negativ seleksjon ved bruk av Januskassetten	43
3.11.2 Protokoll transformasjon	46
3.12 DNA-sekvensering	46
3.13 Undersøkelse av luciferaseaktivitet for P_{czcD}	47
3.14 Vekstforsøk hvor <i>pbp2x</i> uttrykkes med Zn^{2+} -systemet	48
3.15 Depletion av <i>pbp2x</i> : Zn-systemet vs. ComRS-systemet	48
4 Resultater.....	49
4.1 Oppløsning av peptider og bestemmelse av deres konsentrasjon.....	49
4.2 Undersøkelse av peptidenes aktivitet ved luciferase genreporterassay	50
4.3 Vekstforsøk med ComS*, S4 og S6	54
4.4 Depletion av PBP2x med S4 og S6	56
4.5 Depletion av PBP2b med S4	57
4.6 Visualisering av PBP2b-depletion ved SDS-PAGE Bocillin-gel.....	59
4.7 Mikroskopering av PBP2b-depletede pneumokokker	61
4.8 Inhiberingsforsøk.....	64
4.9 Etablering av Zn^{2+} -depletionsystemet i <i>S. pneumoniae</i>	68
4.10 Aktiviteten til P_{czcD} -promoteren.....	69
4.11 Bruk av Zn^{2+} -systemet for å uttrykke et essensielt gen (<i>pbp2x</i>).....	72
4.11.1 Vekstforsøk for KW15	72
4.11.2 Depletion av PBP2x i Zn^{2+} - og ComRS-systemet – en sammenligning	74

5. Diskusjon.....	76
5.1 Ulike peptider induserer til ulik luciferaseaktivitet	76
5.2 Indusering med peptidene S4 og S6 fører til raskere depletion	77
5.3 Blokkering av ComS*-bindingssetet i ComR med inaktive peptider.....	79
5.4 Sammenligning av egenskapene til P_{comX} og P_{czcD} - promoterene	81
5.5 Depletion med Zn^{2+} -systemet	81
5.6 ComRS-systemet vs. Zn^{2+} -systemet	82
6. Konklusjon og videre arbeid	83
Referanseliste	85
Vedlegg	I

1. Introduksjon

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1 Fylogeni, morfologi og metabolisme

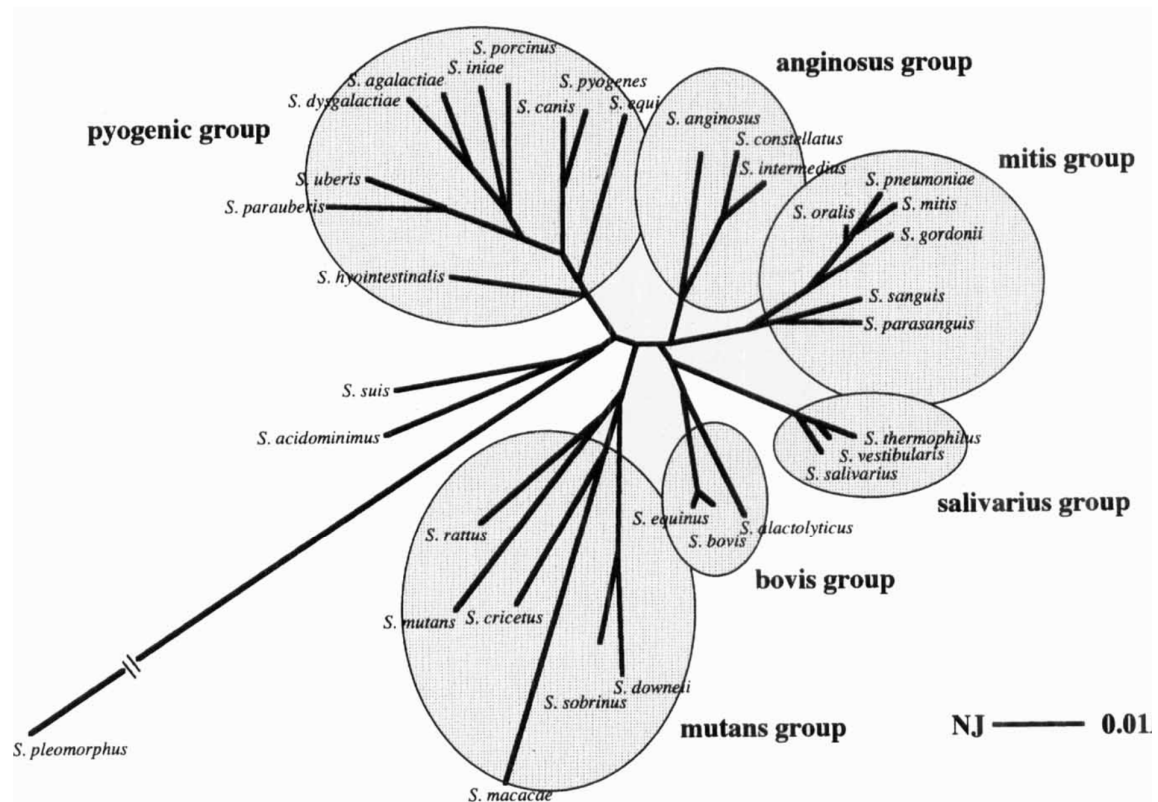
Bakterier innen slekten *Streptococcus* er Gram-positive og tilhører grenen for lavt innhold av G + C (36-46 %) (Garrity et al. 2004). Slekten *Streptococcus* tilhører fylum *Firmicutes*. Øvrig taksonomi finnes i Tabell 1.1. Videre deler man *Streptococcus* inn i seks ulike grupper basert på 16s rDNA sekvensanalyse. Disse gruppene heter pyogenes, mitis, salivarius, bovis, anginosus og mutans. En fylogenetisk oversikt over slekten *Streptococcus* er illustrert i Figur 1.1. *S. pneumoniae* tilhører mitis-gruppen (Kawamura et al. 1995), hvor de fleste medlemmene er kompetente for naturlig genetisk transformasjon (Kilian et al. 2008). Naturlig genetisk transformasjon er en prosess hvor ekstracellulært DNA blir tatt opp av cellen, og ved homolog rekombinasjon blir DNAet integrert i genomet til mottakeren (Chen & Dubnau 2004).

Tabell 1.1 Oversikt over *Streptococcus*-slektens taksonomi (Garrity et al. 2004)

Taxon	Navn
Domene	Bacteria
Fylum	<i>Firmicutes</i>
Klasse	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familie	<i>Streptococcacea</i>
Slekt	<i>Streptococcus</i>

Morfologiske egenskaper hos *S. pneumoniae* er at enkeltcellene har oval form som en rugbyball. Enkeltcellene henger sammen som par, såkalte diplokokker, eller de danner korte kjeder. De er ikke-mobile og ikke-sporedannende. Pneumokokker er også katalase-negative (Hardie & Whiley 1997). En måte å skille *S. pneumoniae* fra andre streptokokker er deres evne til hemolyse ved dyrking på blodagar. *S. pneumoniae* er alfa-hemolytisk og produserer hydrogenperoksid som oksiderer hemoglobin til methemoglobin (Kilian et al. 2008). På en blodagarplate karakteriseres dette ved en grønn sone rundt koloniene. En annen morfologisk egenskap hos pneumokokker er at de har en kapsel bestående av polysakkarider som omgir cellen. Dette er den viktigste egenskapen knyttet opp mot pneumokokkers virulens (Andrew et

al. 2008). De involverte genene for denne polysakkaridkapselen finnes i et kapsellokus. I dette arbeidet er *S. pneumoniae* R6 brukt som utgangsstamme. Hos R6-stammen er dette kapsellokuset defekt. Dette gjør at stammen ikke har evnen til å danne kapselen, og er dermed avirulent.



Figur 1.1 Fylogenetisk kart for slekten *Streptococcus*. Inndelingen av slekten er basert på 16S rRNA analyser og delt inn i seks hovedgrupper. *S. pneumoniae* tilhører mitisgruppen. Figurkilde: Kawamura et al. (1995).

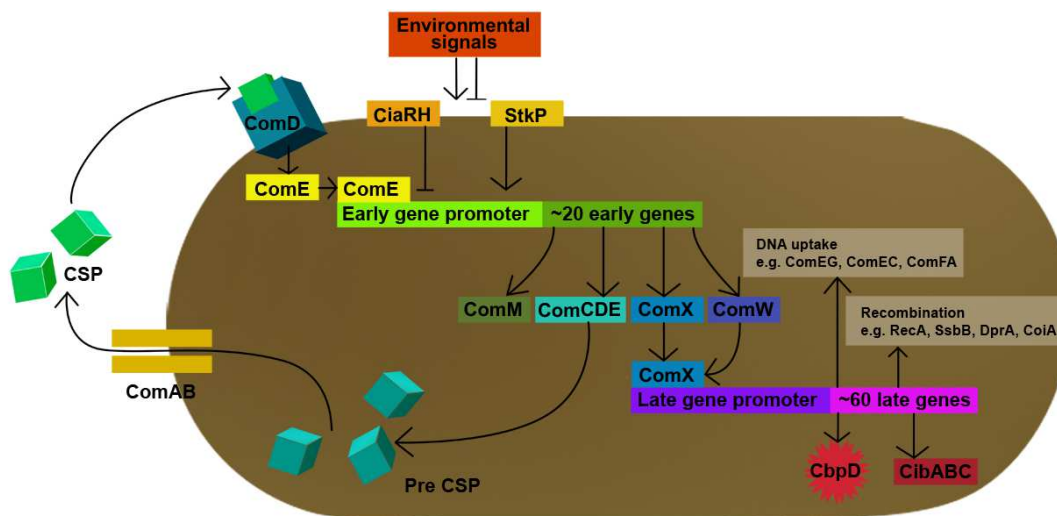
S. pneumoniae er en fakultativ anaerob bakterie, altså vokser den optimalt med liten tilgang på oksygen. For å generere energi til vekst og celledeling fermenterer den karbohydrater med laktat som hovedendeprodukt (Kilian 1998). *S. pneumoniae* R6 har ikke genene som koder for en fullstendig elektrontransportkjede eller for enzymene i TCA-syklus (Hoskins et al. 2001). Pnemokokker krever at vekstmediet består av karbohydrater, vitaminer, peptider, salter, pyrimidiner, puriner og aminosyrer (Kilian 1998).

1.1.2 Naturlig genetisk transformasjon hos *S. pneumoniae*

Som nevnt tidligere er naturlig genetisk transformasjon en egenskap hvor en bakteriecelle kan ta opp fritt ekstracellulært DNA. Videre integreres dette DNAet i bakteriens genom ved hjelp av homolog rekombinasjon. På den måten kan en bakterie tilegne seg en egenskap den ikke hadde i utgangspunktet (Claverys et al. 2004). Frederick Griffith jobbet i 1928 med å utvikle en vaksine mot lungebetennelse. Under dette arbeidet oppdaget han pneumokokkenes evne til naturlig genetisk transformasjon. Griffith injiserte levende pneumokokker uten kapsel (avirulente) sammen med døde pneumokokker med kapsel (virulente) inn i friske levende mus. Da han injiserte dem hver for seg forble musene levende, men da han injiserte de to typene pneumokokker sammen, døde musene. Videre isolerte han virulente pneumokokker (med kapsel) fra de døde musene. Med andre ord hadde virulensen hos de døde pneumokokkene blitt transformert, til de avirulente levende pneumokokkene (Griffith 1928). Hvordan dette hadde skjedd ble ikke umiddelbart forstått, men i videre studier gjort av Oswald T. Avery (1944) ble det oppdaget at det var DNA som blitt overført mellom pneumokokkene. Dette var første gang DNA ble identifisert som bærer av genetisk informasjon, og at genetiske egenskaper ble nedarvet fra DNA (Avery et al. 1944).

En bakterie som kan utføre naturlig genetisk transformasjon kalles kompetent. Disse bakteriene har ulike systemer for blant annet regulering av opptak av DNA. Disse systemene kalles for kompetansesystemer (Johnsborg et al. 2007). Kompetansesystemet som finnes naturlig hos pneumokokker kalles ComCDE-systemet. Dette systemet består av komponenter som regulerer og transkriberer tidlige og sene kompetansegener. Først transkriberes de tidlige kompetansegenene som består av ~20 ulike gener (Figur 1.2). Noen av de tidlige kompetansegenene er avgjørende for at cellen skal indusere til kompetanse. Viktige tidlige kompetansegener er blant annet *comCDE* og *comX* (Lee & Morrison 1999). Induksjon av kompetanse i dette systemet induseres av «competence-stimulating-peptide» (CSP). CSP blir kodet av *comC*. ComC består av en ledersekvens og det modne peptidet CSP. Når ComC binder til membranbundet ComAB, spaltes ledersekvensen av og modent CSP blir sendt gjennom membranen og ut av cellen. CSP kan indusere kompetanse hos andre celler i nærheten når konsentrasjonen når et visst grensepunkt (Håvarstein et al. 1995a; Håvarstein et al. 1995b). Små variasjoner i sekvensen i *comC*-genet gjør at CSP virker kun på nært beslektede stammer. Ved sekvensering av *comC* kan man identifisere en bakterie ofte helt ned til stamme-nivå. Det er på grunn av stammespesifikk variasjon i sekvensen både når det kommer til aminosyresammensetning og lengde (Håvarstein et al. 1997). CSP induserer kompetanse ved

at den binder til en membranbundet histidin kinase reseptor kalt ComD. ComD kodes av *comD* som er blant de tidlige genene. Når CSP binder til ComD fører det til fosforylering av responsregulatoren ComE. ComE fungerer som en transkripsjonsaktivator for de tidlige genene (Peterson et al. 2004). Blant disse finnes genet som koder for den alternative sigmafaktoren ComX. Denne alternative sigmafaktoren regulerer transkripsjon av de sene kompetansegenene (Lee & Morrison 1999). De sene kompetansegenene består av ca. 60 gener som blant annet koder for apparatet som sørger for selve opptaket og rekombinasjonen av det ekstracellulære DNAet under transformasjon (Claverys et al. 2004; Peterson et al. 2004). For systematisk oversikt over systemet, se Figur 1.2.



Figur 1.2 Systematisk oversikt over ComCDE-systemet. Figuren viser en oversikt over kompetenssystemet i *S. pneumoniae*. Man kan se av figuren at pre-CSP finnes i cellen før den spalter av modent CSP som sendes ut av cellen via ComAB. Figuren illustrerer også den katalytiske loopen hvor CSP (grønne bokser utenfor cellen) binder membranbundet ComD (blå boks i membranen i cellen), og aktivert ComE aktiverer transkripsjon av de tidlige genene. Den viser enkelte av de tidlige genene (ComM, ComCDE, ComX og ComW) og at ComX transkriberer de sene genene fra promoter P_{comX} . Figurkilde: Johnsborg og Håvarstein (2009b).

Ikke alle bakterier er naturlig kompetente. *S. pneumoniae* er det vi kaller naturlig kompetent for genetisk transformasjon (Håvarstein et al. 2006). Teoriene om hvorfor naturlig genetisk transformasjon er en egenskap som har blitt bevart gjennom evolusjon er mange. Teorier er at det gir en celle muligheten til å reparere seg selv, det fører til økt genetisk diversitet, for ernæringsmessige årsaker, og for å generelt skaffe nye egenskaper (Finkel & Kolter 2001; Redfield 2001). Sebert et al. (2011) viste at kompetens induseres i pneumokokker som en respons på større forekomst av biosyntetiske feil under proteinsyntesen (Sebert et al. 2011). Det

har blitt vist at en protease kalt HtrA, er involvert i kompetanseregulering ved at den undertrykker kompetanse. Måten den undertrykker kompetanse på er å bryte ned CSP når det er lav mengde ufoldede proteiner i cellen (Sebert et al. 2012). Sebert og hans medarbeidere (2011) spekulerer også i om kompetanse i tillegg til å reparere skader, er et middel for å håndtere ufoldede proteiner. Grunnen til dette er at gener som koder for proteaser og proteiner som bidrar til folding av andre proteiner (chaperoner), er blant de sene kompetansegenene (Sebert et al. 2011; Sebert et al. 2012). Det er også en risiko for en bakterie å ta opp fremmed DNA, fordi DNAet kan kode for gener som er skadelig for cellen (Finkel & Kolter 2001). Som nevnt over, finnes det ulike mekanismer og systemer for kompetanseinduksjon. De ulike systemene er omtalt nærmere i avsnitt 1.2 - 1.5.

1.1.3 Epidemiologi, vaksiner og penicillinresistens

S. pneumoniae opptrer stort sett som en kkommensal mikroorganisme som forbigående koloniserer nasofarynks uten å føre til sykdom. Den er også en patogen mikroorganisme som forårsaker sykdommer hos mennesker og dyr. Pneumokokker kan gi sykdommer som bakteriemi (sepsis), meningitt (hjernehinnebetennelse), atritt (leddbetennelse), endokarditt (hjerterklaffbetennelse) og bakteriell pneumoni (lungebetennelse) (Hermans et al. 2004). Den kan også føre til mindre alvorlig sykdommer som otitis media (mellomørebetennelse) og sinusitis (bihulebetennelse) (Hiller et al. 2007). Sent på 1800-tallet isolerte både Georg Stenberg og Louis Pasteur de første pneumokokkene. Kort tid etter hadde man funnet mange av de infeksjonene bakterien kan forårsake (Austrian 1981). Blant virulensfaktorene hos pneumokokker er som tidligere nevnt polysakkaridkapselen som omslutter cellen den viktigste. Den beskytter bakterien fra fagocytose. Variasjoner i denne polysakkaridkapselen gir grunnlag for omtrent 92 ulike serotyper, hvor enkelte serotyper er mer hissig enn andre (Hoskins et al. 2001; Kilian 1998). Det finnes serotyper som ikke er patogene for individet bakterien koloniserer, men spesielt for mennesker med svekket immunforsvar finnes det serotyper som kan gi alvorlig sykdom (Henriques-Normark & Normark 2010). I år 2000 viste WHO i en studie at det blant barn under 5 år, var omtrent 14,5 millioner tilfeller av infeksjoner forårsaket av pneumokokker (O'Brien et al. 2009). Det er også estimert 1.6 millioner dødsfall tilknyttet pneumokokkinfeksjoner, hvor 0,8-1 million av disse er barn (Levine et al. 2006). Dette har ført til at *S. pneumoniae* er fått en viktig plass i verdenshistorien både når det kommer til tapte menneskeliv og forskning innen genetikk, mikrobiologi og immunologi.

Et mål ved vaksiner mot *S. pneumoniae* er polysakkaridkapselen, noe som gjør at det vaksineres med et utvalg av kapselserotyper. De ulike serotypene gjør at vaksinene må være svært spesifikke. Golubchik et al. (2012) har i et studie vist at *S. pneumoniae* kan ta opp kapselgener ved naturlig transformasjon og dermed skifte serotype. Det fører til at pneumokokkene kan erverve serotyper som det ikke er blitt vaksinert mot, og slik mister vaksinen sin effekt (Golubchik et al. 2012).

Penicillin ble oppdaget av Alexander Fleming i 1929, og i 1940 ble den tatt i bruk som medisin mot infeksjoner forårsaket av pneumokokker (Fleming 1929). De oppdaget penicillinresistens hos pneumokokker sent på 1960-tallet, og snart var det påvist resistens over hele verden. Den økte bruken av penicillin oppgjennom årene har en klar sammenheng med utviklingen og spredningen av penicillinresistens. Ungarn og Spania er de landene i Europa hvor penicillin er mest utbredt (Dowson et al. 1997; Hakenbeck 1999). I Norge er forekomsten fortsatt lav, og i 2009 ble det rapportert at 2-3% av norske pneumokokkisolater viser nedsatt følsomhet av penicillin (Simonsen 2009). Resistensen er vist å fortsette å øke, og antibiotikaresistens har fått større oppmerksomhet verden over de siste årene. Denne utviklingen er bekymringsfull i forhold til å kunne behandle sykdommer forårsaket av pneumokokker i fremtiden (Henriques-Normark 2007). Det har ført til at bruken av antibiotika har blitt noe skjerpet, noe som er viktig for å hindre videre utbredelse av resistens (Riedel et al. 2007). På grunn av økningen i resistens er videre forskning om antibiotikaresistens veldig viktig, slik at man også i framtiden kan benytte penicillin til å bekjempe sykdommer.

Penicillinbindende proteiner (PBPer) er målet for penicillin og andre β -laktamantibiotika. PBPer er sentrale komponenter i celleveggsyntesen. β -laktamer binder kovalent til det aktive setet hos PBPer ved å konkurrere med PBPeres naturlige substrat. Når penicillin binder til PBPer, vil derfor celleveggsyntesen stoppe opp og medføre lysis av bakterien (Hakenbeck et al. 1999). En måte pneumokokkene kan oppnå penicillinresistens på er ved mutasjoner i bindingssetene til PBPer. Mutasjoner her fører til reduksjon i PBPeres affinitet til β -laktamet. En annen måte å erverve penicillinresistens på, er ved naturlig genetisk transformasjon av gener som koder for lavaffinitets PBPer og andre resistensdeterminanter. Dette fører til at man må øke konsentrasjonen av antibiotikumet for å hemme PBPeres aktivitet (Hakenbeck 2014). Pneumokokkenes evne til å tilpasse seg gjør de til en ekstra stor trussel og behandlingen av sykdommer knyttet til dem enda vanskeligere å behandle (Hiller et al. 2007).

1.2 Essensielle gener og studier av essensielle gener ved hjelp av heterologiske/induserbare promotersystemer

Essensielle gener er en betegnelse på gener som koder for genprodukter som en celle er avhengig av for optimal cellefunksjon og for å overleve. Fravær av et essensielt gen er altså letalt for cellen. De essensielle genene koder eksempelvis for komponenter som er viktig i karbohydrattransport, metabolisme og synteseveier som for eksempel celleveggsyntese (Song et al. 2005). Song et al. (2005) identifiserte 133 essensielle gener i *S. pneumoniae*. Blant disse ble genene som koder for de penicillinbindende proteinene PBP2b og PBP2x identifisert (Song et al. 2005).

Det å «skru av» et gen, er en vanlig måte å finne ut om et gen er essensielt eller ikke. Man kan skru av et gen enten ved å slå genet ut av genomet, eller ved å innføre mutasjoner rettet mot sentrale posisjoner i proteinet som for eksempel et aktivt sete. Studier av essensielle gener kan være utfordrende. Grunnen til det er hvis man fjerner eller skrur av genet fra bakteriens genom, vil cellen dø før man rekker å se konsekvensene av mangelen på det essensielle genet og dens genprodukt. For å gjøre studier av essensielle gener mulig, har man benyttet seg av ulike induserbare promotersystemer. Ved å sette det genet man ønsker å undersøke bak en regulerbare promoter kan man uttrykke genet ektopisk. Videre må man skru av det native genet. Slik vil den eneste varianten av genet være det som befinner seg bak promoteren. På den måten kan man kontrollere uttrykket av genet ved å tilsette en induser som aktiverer transkripsjon fra den regulerbare promoteren (Berg et al. 2011). En måte å gjøre funksjonelle studier av essensielle proteiner, er ved depletion av gener. Dette er en metode hvor man gradvis fjerner induser fra cellene, slik at transkripsjonen av det essensielle genet skrur trinnvis av og dets genprodukt dermed tappes (depletes) fra cellen. Slik vil man kunne studere hvordan en gradvis reduksjon i mengden av et essensielt protein påvirker cellen når det kommer til for eksempel vekst og cellemorfologi. Denne gradvise effekten avhenger av hvor raskt en depletion skjer (Berg et al. 2013).

1.2.1 Ektopiske promotersystemer

Det finnes flere forskjellige ektopiske promotersystemer som er tatt i bruk med hensikt å studere essensielle gener. For mange av disse systemene benyttes indusere som cellene er avhengig av for å kunne transkribere det essensielle genproduktet fra den ektopiske promoteren. Et eksempel er et system brukt av blant annet Chan et al. (2003). Dette er et system som er basert på en

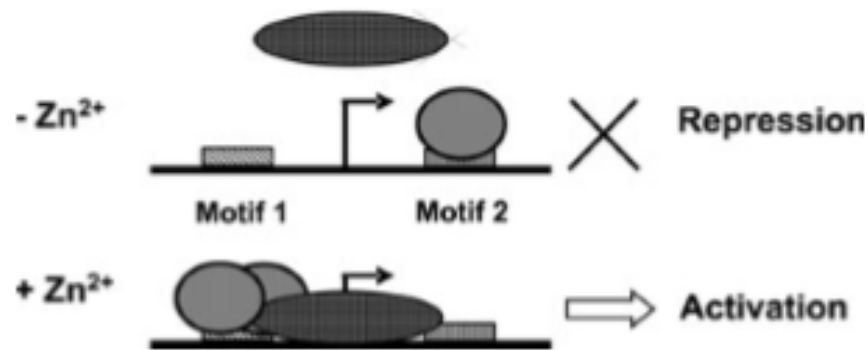
promoter P_{fcsk} regulert av sukkeret fukose. Dette systemet har vist å ikke virke optimalt fordi aktiveringen har ført til uttrykk av uønskede gener som befinner seg i samme operon, samt at det har vært usikkerhet rundt hvorvidt fukose metaboliseres av cellen og slik påvirker metabolismen hos bakterien. Til tross for dette blir dette fukosesystemet fortsatt brukt. Det er fordi det er vist å kunne brukes til å studere proteiner som er essensielle for cellene ved å titrere ned nivået av protein. Nivået protein kontrolleres ved å kontrollere mengde induser (Chan et al. 2003). Andre systemer som har blitt utviklet, er systemer hvor promoteren er regulert av bakteriocinet nisin og antibiotikumet tetracyclin. En til at disse systemene har vist seg ikke å være optimale er at fordi både nisin og tetracyclin i utgangspunktet er skadelig for bakteriene. Dermed vil promoterene ha en smal titrerbar rekkevidde. (Apfel et al. 1999; Eichenbaum et al. 1998).

1.3 Zn^{2+} -systemet

Metallioner er viktig for mange av cellens funksjoner. Spesielt er de viktig i enzymer og regulatoriske proteins struktur og funksjon. Selv om de er viktige, kan store konsentrasjoner av metallionene være skadelig for cellen. Dette gjør at bakteriecellene har systemer som regulerer opptak og utstrømming metallioner (Hantke 2005). Det finnes flere slike opptakssystemer i *S. pneumoniae*. Et viktig regulatorisk system regulerer opptak og effluks av Zn^{2+} -ioner og kalles her Zn^{2+} -systemet. Her tas Zn^{2+} -ioner opp i cellen ved hjelp av PsaBCA permease (Dintilhac et al. 1997; Lawrence et al. 1998). Opptakssystemet for Zn^{2+} kalles ABC opptakssystem og genene finnes blant en samling av gener kalt *adcCBA* (Dintilhac & Claverys 1997). Kuipers et al. (2007) fant ut i sitt arbeid at et gen kalt *czcD* i *S. pneumoniae*, koder for proteinet CzcD som er involvert i Zn^{2+} -resistens. CzcD beskytter mot høye nivåer av Zn^{2+} hos cellen ved å virke som en utstrømningspumpe for Zn^{2+} i bakterien. I tillegg responderer promoteren til *czcD* (P_{czcD}) på konsentrasjonen av andre metallioner, og CzcD regulerer også konsentrasjonen av disse. Transkripsjon fra P_{czcD} reguleres av regulatoren SczA, som videre induseres av Zn^{2+} , Co^{2+} og Ni^{2+} . En sekvensanalyse gjort av Kuipers et al. (2007) viste at oppstrøms for P_{czcD} befinner det seg sju baser, etterfulgt av en palindromsekvens. Palindromsekvensen og de sju basene utgjør sammen motiv 1. Rett nedstrøms for P_{czcD} finnes et motiv 2, som er identisk til den andre halvdel av palindromsekvensen. Motiv 1 og motiv 2 er illustrert i Figur 1.3. Videre fant Kuipers et al. (2007) ut at fravær av Zn^{2+} vil føre til at regulatoren SczA binder til motiv 2 nedstrøms for P_{czcD} . Denne bindingen fører til blokkering av P_{czcD} , og en polymerase vil bli hindret i å binde og transkribere fra P_{czcD} . Dersom Zn^{2+} er

tilstede i cellen vil Zn^{2+} binde SczA, som videre fører til at SczA binder motiv 1. Bindingen til motiv 1 fører til aktivering av transkripsjon fra P_{czcD} (Kuipers et al. 2007). Dette er illustrert i Figur 1.3.

Zn^{2+} -systemet kan benyttes til studier av essensielle gener. Ved å sette inn en kopi av det essensielle genet bak P_{czcD} kan man ved tilsetning av Zn^{2+} -ioner i mediet drive transkripsjon fra P_{czcD} . Slik uttrykkes en kopi av det essensielle genet ektopisk, noe som tillater fjerning av det native genet fra genomet. Dermed kan man kontrollere uttrykket av ønsket gen ved tilsetning av Zn^{2+} (Veening et al. 2009).



Figur 1.3 Oversikt over hva som skjer i Zn^{2+} -systemet ved fravær av Zn^{2+} og ved tilgang på Zn^{2+} i *S.*

pneumoniae. Pilen definerer P_{czcD} . Den svarte ovale sirkelen illustrerer en DNA polymerase, og den grå sirkelen viser SczA. Figurkilde: Kuipers et al. (2007)

Høye nivåer av Zn^{2+} kan som tidligere nevnt føre til skader og i verste fall lysis hos en bakteriecelle. Dette er fordi sink kan reagere med thiolere og dermed blokkere essensielle reaksjoner i cellen (Hantke 2005). Metallioner som Zn^{2+} er som tidligere nevnt, ofte essensielt for mange regulatoriske proteiner og enzymer. Sink er derfor viktig for cellenes funksjoner og er en viktig faktor for mange av cellens reaksjoner. Dette gjør at Zn^{2+} kan aktivere uttrykk av flere gener enn det som befinner seg bak P_{czcD} (Kuipers et al. 2008; Veening et al. 2009). Dermed kan dette gjøre at systemet ikke er optimalt for studier av essensielle gener. Siden Zn^{2+} ved høye konsentrasjoner kan føre til lysis av cellen, vil det føre til at konsentrasjons-spennet av Zn^{2+} som kan benyttes er begrenset. Likevel har Zn^{2+} -systemet vist å være et egnet system for studier av essensielle gener.

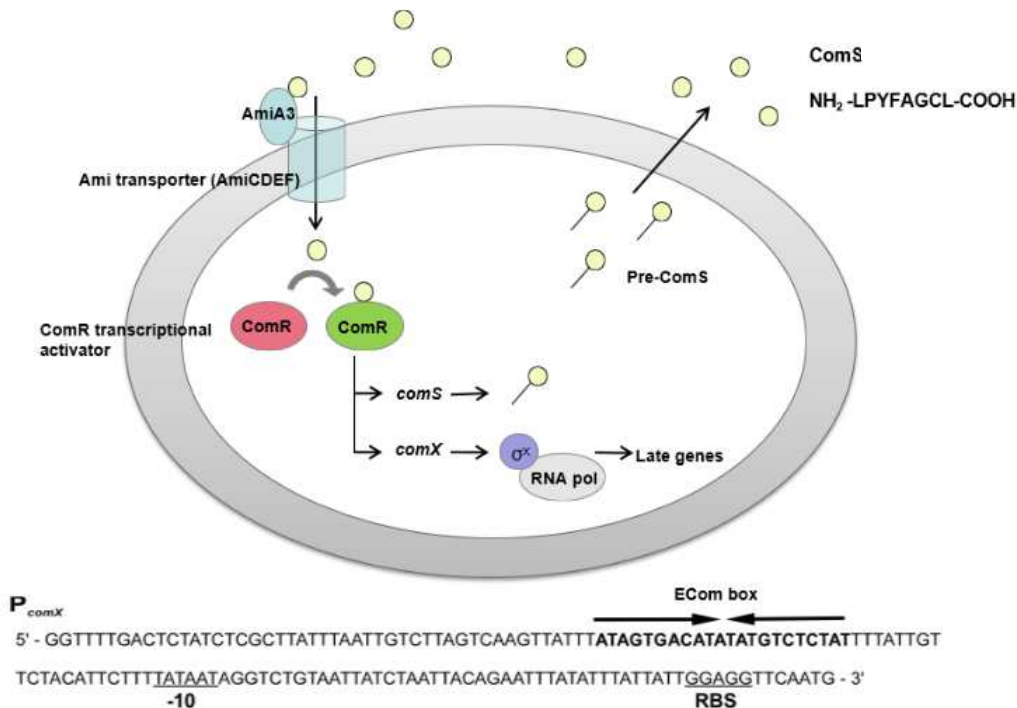
1.4 Det heterologe promotersystemet ComRS

1.4.1 Kompetanseregulering med ComRS-systemet

I *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius* (begge fra salivarius-gruppen) og *Streptococcus mutans* finnes det naturlig et kompetansereguleringssystem kalt ComRS-systemet. Dette systemet består av transkripsjonsregulatoren ComR, dens induserpeptid ComS og promoteren P_{comX} , jf. Figur 1.4. ComS tas opp i cellen via membranbundet Ami-transporter. Inne i cellen binder ComS til bindingssetet i ComR. Denne bindingen fører til en konformasjonsendring av ComR, som igjen gir aktivering av ComR (Fontaine et al. 2010). Aktivert ComR fører til transkripsjon fra promotere som består av en ECom-boks. Denne ECom-boksen består av to «inverted repeats». P_{comX} har en slik ECom-boks, og aktivert ComR vil transkribere gener herfra. Genet *comX* befinner seg bak P_{comX} , og koder for ComX. I likhet med kompetansesystemet i *S. pneumoniae* omtalt i avsnitt 1.1.2, står ComX også her for transkripsjon av sene kompetansegener. Genet som koder for Pre-ComS (*comS*) har også en ECom-boks i sin promoter og vil aktiveres av ComR. Dermed dannes en autokatalytisk loop hvor Pre-ComS omdannes til modent ComS og sendes ut av cellen (Fontaine et al. 2010). ComRS-systemet er ikke beslektet med ComCDE-systemet. En illustrasjon av systemet i *S. thermophilus* er vist i figur 1.4.

1.4.2 Peptidet ComS

Pre-ComS syntetiseres som et propeptid på 24 aminosyrer. Den modne native sekvensen av ComS består av de siste 11 C-terminale aminosyrene (ComS₁₄₋₂₄; NH₂-IAILPYFAGCL-COOH) og er et hydrofobt peptid (Gardan et al. 2013). Det vist av Fontaine et al. (2010) at en versjon på 8 aminosyrer gir full aktivering av ComR og aktivitet: ComS₁₇₋₂₄; NH₂-LPYFAGCL-COOH. Ved alanin-scanning (der hver aminosyre trinnvis ble byttet ut med alanin, bortsett fra i posisjon 21 som ble byttet ut med glycin) fant Fontaine og medarbeidere (2013) ut at aminosyrene i posisjon 19, 20 og 24 var kritiske i forhold til bindingen til ComR. De oppsummerte med at det var to krav til struktur for ComS*-aktivitet. Den første er at det i posisjon 19 og 20 må det være aromatiske aminosyrer tilstede. Det er også vist at det i posisjon 24 er en konserverv leucin, men at leucinet også kan byttes ut med enten isoleucin eller valin (Fontaine et al. 2013).



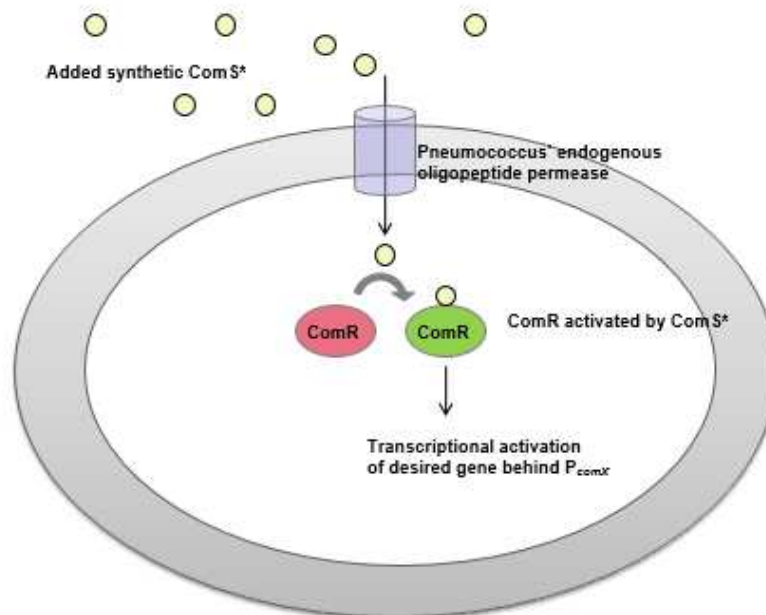
Figur 1.4 Visualisering av det native ComRS-systemet i *S. thermophilus*. Figuren illustrerer kompetansesystemet ComRS i *S. thermophilus* med dens komponenter, samt den genetiske sekvensen (5'-3') av P_{comX} og ECom-boksen. Figuren viser ComS, Ami-transporteren og ComR. Den viser også aktivert ComR og at denne aktiveringen fører til transkribering av *comS* og *comX*, som igjen fører til transkribering av de sene genene. Figuren er lånt med tillatelse av Dr. Kari Helene Berg.

1.4.3 Transkripsjonsregulatoren ComR og aktivering ved ComS

ComR er et Rgg-lignende protein. Rgg-proteiner er i Fleuchot et al. (2011) beskrevet som en «stand-alone» transkripsjonell regulator hos Gram-positive bakterier med lavt G-C-innhold. De er typisk bygd opp av et Helix-Turn-Helix DNA-bindende domene i N-terminal ende og en konservert C-terminal ende (Fleuchot et al. 2011). Om det er en direkte interaksjonen mellom ComS* og ComR er ikke bevist, men det er bevist at bindingen skjer i C-terminal ende av ComS* (Mashburn-Warren et al. 2010). For medlemmer av Rgg-familien er det vist at det skjer en konformasjonsendring ved Helix-Turn-Helix-delen ved binding av det aktiverende peptidet. Det er denne konformasjonsendringen som gjør at affiniteten til ECom-boksen øker (Declerck et al. 2007; Ferain et al. 1996). Denne konformasjonsendringen er ikke vist direkte for ComR, men den er vist i andre homologe regulatoriske peptider. Dermed kan man spekulere i om denne konformasjonsendringen også skjer for ComR (Fontaine et al. 2010).

1.4.4 ComRS som et heterologt promotersystem i *S. pneumoniae*

Basert på ComRS-systemet utviklet Berg et al. (2011) et gen-depletionsystem i *S. pneumoniae*. Hensikten med dette systemet er å studere essensielle gener hos pneumokokker. Dette systemet ble introdusert i *S. pneumoniae* sitt genom ved at *comR* og P_{comX} ble klonet inn på nøytrale områder. I tillegg ble en 8-aminosyre lang versjon av ComS (her kalt ComS*) syntetisert til bruk som induser (Berg et al. 2011). For illustrasjon og oversikt over ComRS-systemet i *S. pneumoniae* vises det til Figur 1.5.

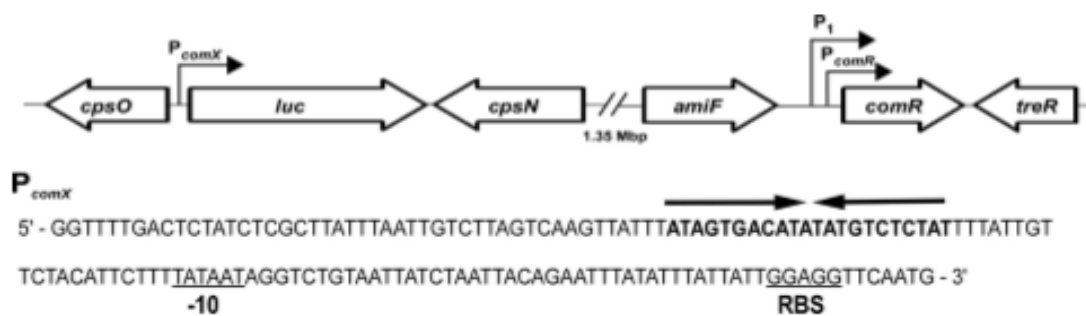


Figur 1.5 Illustrasjon av ComRS-systemet i *S. pneumoniae*. Figuren viser oversikt over ComRS-systemet utviklet i *S. pneumoniae*. Lysegule rundinger indikerer syntetisk ComS*. Den blå sylindere illustrerer membranbundet oligopeptid permease. Rød runding indikerer ComR og grønn runding med lysegul runding indikerer ComR aktivert av ComS*. Figuren er lånt med tillatelse av Dr. Kari Helene Berg.

Ved bruk av ComRS-systemet til studier av essensielle gener vil først en kopi av det essensielle genet settes inn nedstrøms for den induserbare promotoren (P_{comX}). Syntetisk ComS* som tilsettes i vekstmediet tas opp av cella og aktiverer ComR intracellulært. Dermed aktiveres transkripsjon av genkopien fra P_{comX} . Når en kopi av det essensielle genet uttrykkes ektopisk muliggjør dette mutagenese eller knock out av det native genet. Ved å slå ut og ved mutasjon av sårbare posisjoner i genomet, vil bakteriecellene kun overleve dersom ComS* befinner seg i vekstmediet slik at det essensielle genet fremdeles uttrykkes i cella. P_{comX} er en titrerbar promoter. Det vil si at uttrykket av genet nedstrøms vil variere med og reflektere mengden

induser som finnes i mediet. Fordelen med en slik titrerbar promoter, er at man da kan kontrollere uttrykket av et gen, og slik bestemme i hvilken grad det skal uttrykkes. Siden ingen komponenter i ComRS-systemet har nære naturlige homologer i *S. pneumoniae* (Berg et al. 2011), vil ikke regulering av genuttrykk påvirke celledimensjon.

I studiet til Berg et al. (2011) ble genet som koder for enzymet luciferase (*luc*) transformert inn nedstrøms for P_{comX} ($P_{comX}::luc$) mellom kapselgenene *cspN* og *cspO*. Genet som koder for ComR og dens native promoter (P_{comR}) ble satt inn i Ami-locuset. I tillegg ble en syntetisk konstitutiv promoter (P_1) satt inn oppstrøms for P_{comR} for å øke transkripsjonen av *comR* og dermed øke uttrykket fra P_{comX} (Berg et al. 2011; Johnsborg & Håvarstein 2009a). Organiseringen av *comR* (med promotere) og P_{comX} i *S. pneumoniae* er vist i Figur 1.7. Ami-locuset er et nøytralt område i genomet. Det er fordi at det inneholder en degenerert transposase (*spr1701*). *S. pneumoniae* har native oligopeptidpermeaser som tar opp ComS* og transporterer det over membranen og inn i cellen. Av den grunn ble ikke Ami-transportersystemet satt inn i *S. pneumoniae*s genom. ComS* binder og aktiverer ComR intracellulært. ComR vil igjen aktivere transkripsjonen av *luc* som er lokalisert bak P_{comX} . Enzymet luciferase spalter D-luciferin (tilsatt til medium) til oxyluciferin. Samtidig med denne reaksjonen vil lys eksiteres. Lyset som eksiteres kalles luminescens og kan måles direkte som Relative Light Units (RLU). Transkripsjonsraten av *luc* reflekteres altså av luciferaseaktivitet som måles ved lysintensitet i RLU.



Figur 1.6 Oversikt over ComRS-systemet i *S. pneumoniae*. Figuren viser konstruktene $P_{comX}::luc$ og $P_1::P_{comR}::comR$. Nederst vises sekvensen til ECom boksen og P_{comX} . P_{comR} er den native ComR-promoteren, og P_1 er en syntetisk konstitutiv promoter. Figurkilde: Berg et al. (2011)

Videre studier viste at konsentrasjonen av ComS* reflekterte den målte luciferaseaktiviteten. Økt konsentrasjon av ComS* førte til økt aktivitet av luciferase (Berg et al. 2011). Dette tydet på at systemet hadde titrerbare egenskaper avhengig av konsentrasjonen av ComS*. Dette ble vist ved at det ble konstruert en dobbel knockout av genene *licD1* og *licD2* ($\Delta licD1 \Delta licD2$). Dette er gener som bidrar i teikoinsyresyntesen. Fraværet av begge disse genene samtidig er letalt for cellen, fordi pneumokokkene ikke kan vokse uten disse teikoinsyrene. Cellen overlever imidlertid dersom ett av genene er til stede (Zhang et al. 1999). Ved å tilsette ComS* til vekstmediet og dermed uttrykke *licD1* ektopisk fra P_{comX} , ble det mulig å slå ut begge de native genene. Hvilken konsentrasjon av ComS* som førte til normal morfologi og veksthastighet, ble sammenlignet med en villtype som fortsatt hadde begge de native genene inne. En depletion ble satt opp hvor ComS* ble fjernet fra mediet, og en 2-fold fortynningsrekke førte til at uttrykket av *licD1* ble gradvis redusert. Det tok mellom fire og fem timer før fjerning av ComS* ga utslag på veksthastigheten. En mulig teori er at degradering av intracellulært ComS* er en ganske langsom prosess. Dette viste at systemet var egnet til å deplete essensielle gener, vist ved *licD1* i en $\Delta licD1 \Delta licD2$ -bakgrunn (Berg et al. 2011).

Senere gjorde Berg et al. (2013) et depletionforsøk hvor de essensielle genene *pbp2b* og *pbp2x* ble gradvis depletet fra cellen. Kell et al. (1993) har vist at *pbp2b* og *pbp2x* er blant de essensielle genene i *S. pneumoniae*. Også i dette eksperimentet ble de essensielle genene depletet relativt langsomt fra cellen. Dermed fikk man gradvis se hvilke og hvor store konsekvenser mangelen på PBP2b og PBP2x fikk for morfologien og veksthastigheten på cellene. Disse resultatene viste at ved depletion av PBP2b endret celledens morfologi ved at cellene hadde en linselignende form og vokste i kjeder. Depletion av PBP2x ga celler med en sitronlignende form som ikke vokste i kjeder. Dette er resultater som for første gang viser at PBP2b er involvert i perifær celleveggsyntese, og at PBP2x er involvert i septal celleveggsyntese i *S. pneumoniae* (Berg et al. 2013).

1.5 Målet med oppgaven

Denne oppgaven består av to deler. I den første delen av oppgaven var målet å forsøke og optimalisere ComRS-systemet ved å undersøke andre induserpeptider som var modifisert med utgangspunkt i ComS*. Med dette peptidet var det ønskelig å oppnå godt genuttrykk med en titrerbar range, men som eksempelvis ble brutt ned raskere og lettere ble tappet fra cellen. På den måten kunne man kanskje oppnå en raskere og mer fullstendig depletion.

I den andre delen av oppgaven var formålet å sammenligne ComRS-systemet og Zn^{2+} -systemet i *S. pneumoniae*. Det var av interesse å undersøke maksimalt uttrykk (til bruk ved overuttrykk av gener), titerbar range, konsentrasjon som gir nativt uttrykk og påvirkning av induser på cellen for å finne ut om induseren innvirker på cellefunksjoner. Det var også interessant å sammenligne i hvilken grad systemene egnet seg til depleksjon i forhold til utgangskonsentrasjon, hvor raskt induser tappes fra cellen og om depleksjon skjer raskere med det ene systemet enn det andre. Fordeler og ulemper med praktisk bruk for begge systemene ble også vurdert.

2. Materialer

2.1 Stammer av *S. pneumoniae* og plasmider

Tabell 2.1 Oversikt over *S. pneumoniae*-stammer og plasmid brukt i dette arbeidet med relevant genotypebeskrivelse

Stammenavn/plasmid	Genotype/relevant karakteristik	Referanse/kilde
<i>S. pneumoniae</i>		
RH1	$\Delta egb::spc$, Ery ^R , Spc ^R	(Johnsborg et al. 2008)
RH425	R704, men Sm ^R ved transformation med CP1200 kromosomalt DNA, Ery ^R Sm ^R	(Johnsborg & Håvarstein 2009a)
SPH130	<i>comR</i> i Ami-locus, $P_{comX}::luc$, Kan ^R	(Berg et al. 2011)
SPH158	SPH157, men ($\Delta lytA::Spc$), $P_{comX}::pbp2b$, Sm ^R , Spc ^R	(Berg et al. 2013)
SPH165	SPH164, men ($\Delta lytA::Spc$), $P_{comX}::pbp2x$, Sm ^R , Spc ^R	(Berg et al. 2013)
Plasmid:		
pJWV101	Bærer promoteren P_{czcD} . Tet ^R	Gave fra Veenig-gruppen (Veenig et al. 2014).

Tabell 2.2. Oversikt over mutanter konstruert i dette arbeidet med deres genotypebeskrivelse og en kort beskrivelse av hvordan de ble konstruert.

Stammenavn	Genotype/relevant karakteristik	Konstruksjon
KW10	RH425, men plasmidet pJWV101 i bgaA-locus, Ery ^R , Sm ^R , Tet ^R	KW10 ble konstruert ved å transformere RH425 med plasmidet pJWV101 inn i bgaA-locus ved selektering på Tet. P_{czcD} ble dermed satt inn og Tet ^R ble ervervet.

KW11	KW10, men $P_{czcD}::janus$, Ery ^R , Kan ^R , Tet ^R	KW11 ble konstruert ved å transformere inn en Januskasett nedstrøms for P_{czcD} i KW10. Kan ^R ble ervervet.
KW12	KW11, men $\Delta janus::luc$, Ery ^R , Sm ^R , Tet ^R	KW12 ble konstruert ved å transformere KW11 med $\Delta janus::luc$.
KW14	KW11, men $\Delta janus::pbp2x$, Ery ^R , Sm ^R , Tet ^R	KW14 ble konstruert ved å transformere KW11 med $\Delta janus::pbp2x$.
KW15	KW14, men $\Delta pbp2x_{wt}::janus$, Ery ^R , Tet ^R , Kan ^R	KW15 ble konstruert ved å transformere KW14 med $\Delta pbp2x_{wt}::janus$. Kan ^R ble ervervet.

2.2 Sekvenseringsprimere

Tabell 2.3 Oversikt over sekvenseringsprimere som ble brukt i dette arbeidet med nukleotidsekvens og beskrivelse

Primer- navn	Oligonukleotidsekvens (5'-3')	Beskrivelse	Referanse
khh260	GAATCCTATGTAAGAGAGCAAC	400 bp nedstrøms fra start for <i>pbp2x</i>	Dr. Kari Helene Berg
khh261	CTGGCAACAACGCAACGAC	900 bp nedstrøms fra start for <i>pbp2x</i>	Dr. Kari Helene Berg
khh262	GGATTTTCAGTGACCCAGACG	1400 bp nedstrøms fra start for <i>pbp2x</i>	Dr. Kari Helene Berg
khh263	TCTTCAAACAACAGCTAAGGC	1900 bp nedstrøms fra start for <i>pbp2x</i>	Dr. Kari Helene Berg

2.3 Primere

Tabell 2.4 Oversikt over primere som ble brukt i dette arbeidet med oligonukleotidsekvensen samt en kort beskrivelse.

Primer- navn	Oligonukleotidsekvens (5'-3')	Beskrivelse	Referanse
-----------------	-------------------------------	-------------	-----------

Rpsl41.R	CTTTCCTTATGCTTTTGGAC	Reversprimer for Januskassetten	Johnsborg et al. 2008
gs64		Luc.R	Dr. Gro Stamsås
khh417		Pbp2x.R	Dr. Kari Helene berg
kw6	GATTA ACTAATAAGGAGGACAAA CGTTTGATTTTAAATGGATAATGTG	Binder forward i Janus. Har overheng i P_{czcD}	Dette arbeidet
kw9	CACATTATCCATTA AAAAATCAAA CGTTTGTCCTCCTTATTAGTTAAT	Binder revers i P_{czcD} . Har overheng i Janus	Dette arbeidet
kw10	GATTA ACTAATAAGGAGGACAAA CATGAGATCCGCCAAAAACATAA	Binder forward i <i>luc</i> . Har overheng i P_{czcD}	Dette arbeider
kw13	TTATGTTTTTGGCGGATCTCAT GTTTGTCCTCCTTATTAGTTAAT	Binder revers i P_{czcD} . Har overheng i <i>luc</i> .	Dette arbeidet
kw16	TACGGCGGTCAATGTTAGTC	Binder ca. 600 bp oppstrøms for P_{czcD}	Dette arbeidet
kw17	CAGACATGGCCTGCCCGGT	Binder revers i GFP i pJWV101.	Dette arbeidet
kw19	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGCT TGAATACAACCTCAACTCTC	Binder ca. 480 bp forward i GFP i pJWV101. Har overheng i Janus	Dette arbeidet
kw20	GGCGGAAAGCCCAAATTGTAA CTTGAATACAACCTCAACTCTC	Binder ca. 480 bp forward i GFP i pJWV101. Har overheng i <i>luc</i> .	Dette arbeidet
kw21	GATTA ACTAATAAGGAGGACAAA CATGAAGTGGACAAAAAGAGTAA TC	Binder i forward <i>pbp2x</i> . Har overheng i P_{czcD} .	Dette arbeidet

kw22	ATTACATTA ACTTTAGGAGACTA ACTTGAATACA ACTTCA ACTCTC	Binder ca. 480 bp forward i GFP. Har overheng i <i>pbp2x</i>	Dette arbeidet
kw23	GATTACTCTTTTTGTCCACTT CAT GTTTGCCTCCTTATTAGTTAAT	Binder revers i <i>P_{czcD}</i> . Har overheng i <i>pbp2x</i>	Dette arbeidet

2.4 Peptider

Tabell 2.5 Oversikt over peptider brukt i dette arbeidet med tilhørende aminosyresekvens og stockløsning. Det er også beskrevet løseligheten av enkelte av peptidene i 0,1 M NaAc.

Peptid	Stamme	Aminosyresekvens (NH ₂ → COOH)	Stock- løsning	Produsent
CSP-1	<i>S. pneumoniae</i> R6	EMRLSKFFRDFILQRKK	100 µg/ml	
ComS*		LPYFAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S1		LPYYAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S2		LPYFAGVL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S3		LPYFAGSL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S4		LAYFAGCL	250 µM	Genosphere Biotechnologies
M1		MGLDWWSL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
V1		VPFFMIYY	250 µM	Genosphere Biotechnologies
S5		LAFFAGCL	250 µM	Genosphere Biotechnologies
S6		LAYYAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies

S7	LTYFAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S8	LGYFAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S9	LVYFAGCL	250 µM	Genosphere Biotechnologies
S10	LNYPAGCL	250 µM	Genosphere Biotechnologies
S11	LDYFAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S12	LKYFAGCL	500 µM	Genosphere Biotechnologies
S13	SGSGSLAYFAGCL	250 µM	Genosphere Biotechnologies
S14	SGSGSLVYFAGCL	250 µM	Genosphere Biotechnologies
S15	LPYFAGC	500 µM	Genosphere Biotechnologies

2.5 Molekylvektstandarder, enzymer og nukleotider

Tabell 2.6 Oversikt over molekylvektstandarder, enzymer og nukleotider som ble benyttet i dette arbeidet.

Navn	Stock- konsentrasjon	Produktnummer	Produsent
1 kb DNA ladder	50 ng/µl i loadingbuffer og MQ-vann	N3232	New England BioLabs® Inc.
dNTPer	10 µM	4026	Takara
LytA	5 mg/ml		
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	2,0 U/µl	M0530	New England BioLabs® Inc.

2.6 Antibiotika

Tabell 2.7 Oversikt over antibiotika brukt i dette arbeidet, deres konsentrasjon av stockløsning og brukskonsentrasjoner for selektiv dyrking.

Antibiotikum	Stockløsning	Brukskonsentrasjon	Produktnummer	Leverandør
Kanamycin	100 mg/ml	400 µg/ml	K4000	Sigma Aldrich
Streptomycin	100 mg/ml	200 µg/ml	S6501	Sigma Aldrich
Tetracyclin	12,5 mg/ml	0,2 µg/ml	T7660	Sigma Aldrich

2.7 Kit

Tabell 2.8 Oversikt over Kit brukt i dette arbeidet med kort forklaring av bruksområde, produktnummer og produsent

Navn	Bruksområde	Produktnummer	Produsent
NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up	Rensing av DNA fra agarosegel	740609	Macherey-Nagel

2.8 Dataprogrammer

Tabell 2.9 Oversikt over dataprogrammer som ble brukt i dette arbeidet med en kort beskrivelse av deres bruksområde.

Dataprogram	Bruksområde	Tilgjengelig fra
BioEdit	Redigering av sekvenseringsresultater	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
ClustalW2	Analyse av sekvenseringsresultater	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Reverse Complement	Reverskomplementere DNA-sekvenser	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

2.9 Kjemikalier

Tabell 2.10 Oversikt over kjemikalier brukt i dette arbeidet med deres kjemiske formel.

Navn	Kjemisk formel	Leverandør	Produktnummer
Acetonitril	CH ₃ CN	Sigma	34998
Acrylamid	C ₃ H ₅ NO	Saveen Werner	B1AC41

Adenosin	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	Sigma	A9251
Agar		Merk	1.01614.1000
Agarose		Merk	15510-027
Aktivt kull	C	Merck	1.02182.1000
Albumin		Sigma Aldrich	A7906
Ammonium persulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma	A3678
Asparagin monohydrat	$C_4N_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma Aldrich	A4284
β -mercaptoetanol	C_2H_6SO	Sigma-Aldrich	M6250
Bacto™ Casitone		BD Diagnostic Systems	249240
Bacto™ Todd Hewitt Broth		BD Diagnostic Systems	212750
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma-Aldrich	19606
Bocillin™ FL penicillin, sodium salt	$C_{30}H_{31}BF_2N_5NaO_6S$	Molecular probes	B13233
Bromfenolblå 1%	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Sigma	B-5525
Celite		Acros Organics	206352500
Cholin klorid	$C_5H_{14}NO.Cl$	Sigma	C1879
D-Luciferin		Thermo Fisher scientific	88291
di-kalium hydrogenfosfat	K_2HPO_4	Merck	1.05104.1000
di-natrium hydrogenfosfat	Na_2HPO_4	Merck	1.06580.1000
Dimethyl sulfoksid (DMSO)	$(CH_3)_2SO$	Sigma Aldrich	D5879
Eddiksyre	CH_3COOH	Merck	1.00063.2500
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2Na_2O_9 \cdot 2H_2O$	VWR	20.296.360
Gjærekstrakt granulert		Merck	1.03753.0500
Glassull		Sigma	G4649
Glukose 20%	$C_6H_{12}O_6$	VWR	101176K
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Merck	1.04201.1000

Glyserol	$C_3H_5(OH)_3$	Sigma	49781
Jernsulfat heptahydrat	$FeO_4S \cdot 7H_2O$	Fluka	44970
Kalsium klorid dehydrert	$CaCl_2$	Fluka	21075
Kalsium panthothenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma	C8731
Kobbersulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka	61240
L-Asparagine monohydrat	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	A8381
L-Cystein Hydrochloride Monohydrat	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka	30130
L-Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	Fluka	49419
L-Tryptofan	$C_{11}H_{12}NaO_2$	Fluka	93660
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Riedel-de Haën	31422
Metanol	CH_3OH	Merck	1.06009.2500
Metanol for HPLC	CH_3OH	Sigma	34885
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	VWR	27650.292
Natrium di-hydrogenfosfat	NaH_2PO_4	Merck	1.06349.1000
Natrium pyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma Aldrich	P8574
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	Fluka	72309
Paraformaldehyd	$(CH_2O)_n$	Sigma Aldrich	P6148
PegGREEN		Peqlab (VWR)	37-5000
Pyridoxin hydroklorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Fluka	95180
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich	R-7649
Saltsyre	HCl	Merck	1.00317.2500
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	AppliChem	UN1325
Sinksulfat heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka	96500
Sucrose	$C_{12}H_{24}O_{12}$	BHD	102754C
TEMED	$C_6H_{16}N_2$	Sigma	T9281
Thiamin hydroklorid	$C_6H_{17}N_4OS \cdot HCl$	Sigma	67038
Trizma® base	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma	T1503
Tris-HCL	$NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$		
Uridin	$C_9H_{12}N_2O_6$	Sigma	U6382

2.10 Utstyr

Tabell 2.11 Oversikt over utstyr og maskiner brukt i dette arbeidet med deres modell og produsent.

Utstyr	Modell	Produsent
Anaerobe dyrkingsposer	AnaeroGen TM	Oxoid
Autoklav	cv-el 12L / 18L	Certoclav
Beholder for anaerob dyrking		Oxoid
Bordsentrifuge I	Centrifuge 5424	Eppendorf
Bordsentrifuge II	Centrifuge 5430R	Eppendorf
Bordsentrifuge III	Multifuge 3S-R	Heraeus
Bordsentrifuge PCR-rør	Ministar silverline	VWR
Elektroforesekar til agarosegelektroforese	Mini-Sub Cell® GT	BioRad
Elektroforesekar til SDS-PAGE elektroforese	Mini PROTEAN ® Tetra Cell	BioRad
Engangskyvetter	759015	Brand
Gass	Fireboy	
Gass	Integra Fireboy	
Glasskyvetter	104-QS	Hellma
Filter 0,2 µM		Sarstedt
Fotoprinter	P91	Mitsubishi
Geldokumentasjon	GelDoc	Biorad
Geldokumentasjon SDS-PAGE	Typhoon 8600 Variable mode Imager	Molecular Dynamics
Inkubatorskap		Termaks
Inokuleringslupe	86.1562.010	Sarstedt
Magnetrører I	M22/1	Framo Gerätetechnik
Magnetrører II	MR3001 K	Heidolph
Mikroskop	LSM T-PMT 700	Zeiss
Mikroplate-avleser	Synergy H1 hybrid reader	BioTek
Mikrotiterplate, 96 brønner	3604	Corning
PCR-maskin I	PTC-100 TM	MJ Research, Inc.
PCR-maskin II	2720 Thermal cycler	Applied biosystems

pH-meter	PHM210	MeterLab®
Pipetter	Finnpipetter (0,01-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml, 1-10 ml)	Thermo scientific
Pipetter	612-1684	VWR
Spektrofotometer	LKB Novaspec II	Pharmacia
Spektrofotometer II	DU 800 Spec	Belkman Coulter
Sprøyter til sterilfiltrering	Div volum	BD Plastipak™
Sterilbenk		KEBO productions
Strømforsyning til agarose gelelektroforese	Power pac 200	BioRad
Strømforsyning til SDS-PAGE elektroforese	Power pac 1000	BioRad
Vannbad	7A	Julabo
Vannbad	TW20	Julabo
Vekt	Entris	Sartorius
Vekt for finveiiing	CP 124 S	Sartorius
Vortexer	Press-to-mix 34524	Snijders

2.11 Oppskrifter – Dyrkningsmedier, løsninger og buffere

2.11.1 Dyrkningsmedier

Pre C-medium:

Til 4 liter:

0,045 g L-cystein HCl

8 g Natrium Acetat

20 g Bacto™ Casitone

0,024 g L-tryptofan

34 g di-kaliumhydrogenfosfat (K₂HPO₄)

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 4 liter. 150 ml av løsningen ble fordelt på flasker og autoklavert ved 121 °C i 15 minutter. Løsningen ble oppbevart på romtemperatur.

C-medium:

Til 150 ml pre C-medium tilsettes:

150 µl 0,4 mM Manganklorid

1,5 ml 20% Glukose

3,75 ml ADAMS III

110 µl 3% Glutamin

2,25 ml 2% Natrium pyruvat

95 µl 1,5M Sukrose

1,5 ml 2mg/ml Uridin/ Adenosin

1,5 ml 8% Albumin

3,75 10% Gjærekstrakt

Løsningen ble oppbevart i opptil én dag i 4°C.

Zn²⁺-fritt C-medium:

Til 150 ml pre C-medium tilsettes:

150 µl 0,4 mM Manganklorid

1,5 ml 20% Glukose

3,75 ml ADAMS III uten Sink sulfat heptahydrat

110 µl 3% Glutamin

2,25 ml 2% Natrium pyruvat

95 µl 1,5M Sukrose

1,5 ml 2mg/ml Uridin/ Adenosin

Løsningen ble oppbevart i opptil én dag i 4°C.

Todd Hewitt Agar (THA):

For 500 ml:

15 g Todd Hewitt buljong

7,5 g agar

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 500 ml. Løsningen autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter. Ved 60 °C ble eventuell antibiotika tilsatt mediet til ønsket konsentrasjon.

Løsningen ble så støpt på skåler og oppbevart i plastposer ved 4 °C.

2.11.2 Løsninger og buffere

Løsninger til C-medium:

Gjærekstrakt

40 g gjærekstrakt

360 ml MQ-vann

6 ml 12 N/37% HCl

16 g aktivt kull

40 g gjærekstrakt ble løst i 360 ml MQ-vann. pH ble justert med saltsyre til 3,0. 16 g aktivt kull ble tilsatt. Løsningen ble så rørt i 10 minutter på magnetrører, og oppbevart på 4 °C i 2 timer. Så ble løsningen filtrert over natt gjennom en kolonne pakket med glassull og celitt. Deretter ble pH justert til 7,8 med høymolar NaOH, og sluttvolum ble justert til 400 ml. Løsningen ble sterilfiltrert, 4 ml ble tilsatt til 15 ml-falconrør og oppbevart ved -80 °C.

ADAMS I

0,15 ml 0,5 mg/ml Biotin

75 mg Nikotinsyre

87,5 mg Pyridoxine hydroklorid (oppbevares i kjøleskap)

300 mg Kalsium panthothenate (oppbevares i kjøleskap)

80 mg Thiamin hydroklorid

35 mg Riboflavin

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 500 ml og pH justert til 7,0. Deretter ble løsningen sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

ADAMS II – 10X

500 mg Jernsulfat heptahydrat

500 mg Kobbersulfat pentahydrat

500 mg Sink sulfat heptahydrat

200 mg Mangan(II)- klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert HCl

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 100 ml. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

Sinkfritt ADAMS II – 10X

500 mg Jernsulfat heptahydrat

500 mg Kobbersulfat pentahydrat

200 mg Mangan(II)- klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert HCl

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 100 ml. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C.

ADAMS III

128 ml ADAMS I

3,2 ml ADAMS II - 10X

1,6 g Aspargin monohydrate

0,160 g Cholin klorid

0,4 g Kalsium klorid dehydret

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 800 ml og pH ble justert til 7,6. Deretter ble løsningen sterilfiltrert og oppbevart ved 4 °C. Sinkfritt ADAMS III ble lagd på tilsvarende måte, bortsett fra at vanlig ADAMS II – 10X ble byttet ut med sinkfritt ADAMS II – 10X.

Løsninger og buffere til støping av SDS-PAGE geler:***10 % Ammonium persulfat (APS)***

0,02 g APS

200 µl MQ-vann

Løsningen ble laget rett før bruk og burde brukes samme dag.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

30,28 g Tris base ble løst i 400 ml MQ-vann. Deretter ble pH justert med HCl til 6,8 og MQ-vann ble tilført til sluttvolum 500 ml. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

90,83 g Tris base ble løst i 400 ml MQ-vann. Deretter ble pH justert med HCl til 8,8 og MQ-vann ble tilført til sluttvolum 500 ml. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

10 % SDS

50 ml 20 % SDS ble løst i MQ-vann til sluttvolum 100 ml. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

Løsninger og buffere brukt ved SDS-PAGE:**10 x Tris-Glycin Runningbuffer**

30 g 0,25 M Tris Base

144 g 1,92 M glycin

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

Sluttvolum ble justert med MQ-vann til 1 liter. Løsningen ble oppbevart ved romtemperatur. Til SDS-PAGE ble det benyttet 1x runningbuffer.

2x SDS samplebuffer (Laemmli buffer)

1 ml 20% SDS (4 % v/v)

1,176 ml 85 % glyserol (20 % v/v)

1,250 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (0,125 M)

0,1 ml β -mercaptoetanol (2 % v/v)

0,01 % bromfenolblått

Justert til sluttvolum 5 ml med MQ-vann og korttidsoppbevart på 4 °C.

Løsninger og buffere til agarose-gelelektroforese:**50x TAE (Tris-Acetat EDTA)**

242 g Tris base

57,1 ml eddiksyre

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

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 liter. Oppbevaring på romtemperatur. Til gelstøping og –elektroforese ble 1x TAE brukt.

10x loadingbuffer

2 ml 1% bromfenolblått (0,13 % v/v)

5 ml 50 % glyserol (16,7 % v/v)

8 ml autoklavert MQ-vann.

Oppbevaring ved 4 °C

2.5 Øvrige løsninger og buffere

2.5.1 Natriumfosfatbuffer

En løsning med 1 M Na_2HPO_4 ble laget ved at 89 g Na_2PO_4 ble løst i 500 ml MQ-vann.

Løsning med 1 M NaH_2PO_4 ble laget ved at 69 g NaH_2PO_4 ble løst i 500 ml MQ-vann.

For å lage 100 mL 0,1 M pH = 7,2 blandes 68,4 mL 1 M Na_2HPO_4 med 31,6 mL 1 M NaH_2PO_4 .

2.5.2 Fikseringsløsning for mikroskopering

7,5 % (w/V) paraformaldehyd løses i PBS (pH 7,2) på 60 °C vannbad. Når løst ble 1,8 % (w/V) glutardialdehydløsning (i PBS) til sluttkonsentrasjon 0,0018 %.

Til 100 ml fikseringsløsning:

7,89 g 95 % paraformaldehyd ble løst i PBS (pH=7,2).

1,8 % glutardialdehydløsning ble laget ved å løse 360 μl 25 % glutardialdehyd i PBS (pH7,2), og 1 ml av løsningen ble tilsatt til paraformaldehydløsningen. Sluttvolum ble så justert til 100 ml med PBS. 400 μl fikseringsløsning ble blandet med 1 mL kultur til en sluttkonsentrasjon på 2,5 % paraformaldehyd og 0,006 % glutardialdehyd.

Phosphate-buffered Saline (PBS):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na_2HPO_4

2 mM KH_2PO_4

I 400 ml MQ-vann ble 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 144g Na_2HPO_4 og 0,24 g KH_2PO_4 løst.

pH ble justert til 7,2 med HCl. MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 liter. Løsningen ble oppbevart ved 4 °C.

3. Metode

3.1 Dyrking og oppbevaring av *S. pneumoniae*

Kulturer av *S. pneumoniae* ble dyrket i flytende dagsferskt C-medium. For å sikre at cellene er i eksponentiell vekst og er tilført ferskt vekstmedium etter frysing, dyrkes ofte cellene opp på nytt før videre forsøk (cellene «fordyrkes»). Ved fordyrking av celler ble startkulturer tint opp og celler spunnet ned med sentrifuge (4000 rpm, 5 min, 4 °C). Supernatanten ble så kastet og cellepelletten løst i C-medium til ønsket utgangs-OD₅₅₀ og dyrket ved 37 °C. Celletetthet ble bestemt ved bruk av spektrofotometer og måling av Optical Density (OD). *S. pneumoniae* har en generasjonstid på ca. 30 minutter. Etter en times tid på vannbad eller når OD₅₅₀ ~ 0,3, ble cellene høstet på nytt og løst opp til OD₅₅₀ ~ 0,05 før eksperimenter settes opp.

Frysestokker og startkulturer ble laget ved at noen celler fra en tidligere frysestokk ble tilsatt i C-medium. De fikk vokse på vannbad til OD₅₅₀ ~ 0,3, og 50 % glyserol ble tilsatt til sluttkonsentrasjon 15 %. Både startkulturene og frysestokkene ble oppbevart på -80 °C.

3.2 Oppløsning av peptider i natriumacetatbuffer

De fleste peptidene var 8 bp lange og inneholder noen aminosyrer som er veldig hydrofobe. De hydrofobe aminosyrene som finnes hos de fleste peptidene er leucin, tyrosin, fenylalanin, alanin og glysin. Alle peptidene ble løst i 0,1 M natriumacetat (NaAc) med pH 6,2. NaAc ble brukt som løsemiddel på grunn av peptidenes hydrofobisitet. NaAc har kjemisk formel CH₃COONa, noe som gjør det til et hydrofilt løsemiddel som er godt egnet til å løse både polare og upolare komponenter. Oversikt over peptidene og deres aminosyresekvens finnes i Tabell 2.2.

Peptidene ble løst i det volumet NaAc som ga en sluttkonsentrasjon på 500 µM for hvert peptid (ProtParam ble brukt for å finne molar masse for alle peptidene). Eksempelvis ble først molar masse for S1 bestemt til 899 Mm. Videre ble massen av peptidet 0,01 g, delt på den molare massen. Dette ga stoffmengde $n=1.11 \cdot 10^{-5}$ mol som igjen ble delt på ønsket konsentrasjon 0,0005 M. Volumet S1 skulle løses i, ble dermed 22,2 mL. Videre ble de fordelt på 1,5 ml rør og oppbevart ved -80 °C.

Enkelte av peptidene var tungt løselige i 0,1 M NaAc. Derfor ble det forsøkt å tilsette mer NaAc for å se om dette hjalp på løseligheten. Det ble også forsøkt å løse opp de tungtløselige peptidene i forskjellige løsemidler. De ble forsøkt løst i acetonitril (ACN), dimetyl sulfoksid (DMSO) og metanol i ulike konsentrasjoner. Alle disse kjemikaliene er polare og sterke løsemidler som er

mye brukt for oppløsning av tungtløselige komponenter. Peptidene som ble forsøkt løst med disse løsemidlene var blant annet S4 og S9. I tillegg ble det konstruert varianter av peptidene S4 og S9, som i N-terminal ende hadde residuene SGSGS foran de øvrige aminosyrene. Hensikten med dette var å øke løseligheten til peptidene. Disse peptidene ble kalt S13 (S4-variant) og S14 (S9-variant).

3.2.1 Bestemmelse av peptidenes konsentrasjon

Som nevnt i avsnitt 3.2 var noen av peptidene vanskelige å løse opp. Dette gjorde at konsentrasjonene for de forskjellige peptidene ikke nødvendigvis nådde forventet sluttkonsentrasjon. Derfor ble det brukt flere metoder for å prøve å finne ut av den faktiske sluttkonsentrasjonen for de peptidene som var mest interessante. En metode som ble brukt, var HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Dette er en metode som separerer komponentene i en løsning og kvantifiserer dem (Aguilar 2004). Dermed vil peptidene komme som en topp i en kromatogram hvor man ved å sammenligne med en kontroll hvor man veit konsentrasjonen, kan bestemme konsentrasjonen av peptidet i løsningen. Konsentrasjonen ble også forsøkt målt ved UV i et spektrofotometer ved A206 og A280 som er de bølgelengdene proteiner absorberer ved. Ved 280 nm vil de aromatiske aminosyrene i peptidene absorbere, mens peptidbindingene absorberer ved 206 nm. Ved disse bølgelengden vil de aromatiske aminosyrene og peptidbindingene i peptidene absorbere lys, og mengden lys som slippes gjennom løsningen vil bli målt. Ved høye konsentrasjoner vil lite lys slippe gjennom løsningen, mens det ved lave konsentrasjoner vil slippe mye lys gjennom (Layne 1957). Spektrofotometeret ble først nullstilt med NaAc før peptidene ComS*, S4 og S6 ble målt direkte.

3.3 Luciferase genreporterassay og undersøkelse av peptidenes aktivitet

Målsetningen med oppgaven er å se hvordan ulike peptider, som er varianter av ComS*, induserer til transkripsjon fra promoteren P_{comX} . For å måle peptidenes evne til å indusere ble et reporterassay brukt. Ved å benytte et reportergen bak P_{comX} , der genproduktet har en detekterbar egenskap, kan man måle transkripsjonsraten til genet. I dette arbeidet ble luciferase genreporterassay brukt for å måle de ulike peptidenes aktivitet. Luciferasegenet (*luc*) koder for enzymet luciferase. Luciferase spalter D-luciferin (tilsettes til kulturen) til oxyluciferin. Samtidig i denne reaksjonen vil lys emitteres. Dette emitterte lyset kalles bioluminescens og

kan måles som relative light units (RLU) (Fan & Wood 2007; Wilson & Hastings 1998). Det gir et mål på transkripsjonsraten til *luc*-genet samtidig som det indirekte gir et mål på transkripsjonsraten til ønsket gen eller aktiviteten til aktuell promoter.

3.3.1 Protokoll luciferase genreporterassay

Stammen *S. pneumoniae* SPH130 ble brukt. Denne har *luc* bak P_{comX} . Kulturen ble tint opp og satt til fordyrking (som forklart i avsnitt 3.1) ved 37 °C til $OD_{550} \sim 0,3$, før de ble fortynnet i rent C-medium til $OD_{550} \sim 0,05$. Videre ble kultur induert med aktuelt peptid til ønsket sluttkonsentrasjon. Så ble 280 μ l induert kultur overført til en 96-brønners mikrotiterplate og tilsatt 20 μ l D-luciferin (sluttkonsentrasjon 10 mM). Platen ble så inkubert i en mikrotiterplateleser ved 37 °C hvor avlesning av luminescensen (RLU) og vekst (OD_{492}) ble målt automatisk. Blank prøve bestod av rent C-medium tilsatt D-luciferin til 10 mM.

3.4 Vekstforsøk for SPH165

Et vekstforsøk ble satt opp for å se hvordan ulike konsentrasjoner av peptidene påvirket veksten av *S. pneumoniae* SPH165. SPH165 ble satt opp til fordyrking som beskrevet i punkt 3.1 med 0,2 μ M av peptidene ComS*, S4 og S6. Videre ble 1,5-folds fortynningsrekker satt opp over 12 rør og induert med ComS*, S4 og S6 i rent C-medium med en startkonsentrasjon på 0,4 μ M. 150 μ l av hver fortynning ble tilsatt i hver sin brønn i en 96-brønners mikrotiterplate. Videre ble 150 μ l celler fordyrket med de respektive peptidene ($OD_{550} \sim 0,05$) tilsatt i brønnene med tilsvarende peptid. Slik ble peptidkonsentrasjonen i første brønn 0,2 μ M. Videre ble konsentrasjonen i brønnene følgende: 0,13 μ M, 0,09 μ M, 0,06 μ M, 0,04 μ M, 0,26 μ M, 0,02 μ M, 0,01 μ M, 0,008 μ M, 0,005 μ M, 0,003 μ M og 0,002 μ M. Mikrotiterplaten ble så inkubert i plateleseren ved 37 °C. Plateleseren leste av OD_{492} automatisk.

3.5 Depletion ved bruk av ComRS-systemet

Depletion er en metode for å studere effekten av å gradvis tømme (deplete) cellen for produktet fra essensielle gener. Et essensielt gen er et gen som bakteriecellen er avhengig av for å oppnå normal cellefunksjon. Til studier av disse brukes et heterologt promotersystem med en ektopisk promoter som reguleres av en induer. En kopi av det essensielle genet man ønsker å undersøke, settes inn bak den regulerbare promoteren. Ved å slå ut det native genet, vil man kunne regulere uttrykket av den ektopiske kopien av genet ved å tilsette ønsket konsentrasjon av induer for

aktivering av transkripsjon fra promoter. Ved å fjerne induseren fra vekstmediet, stopper transkripsjonen av det essensielle genet, og man oppnår gendepletion.

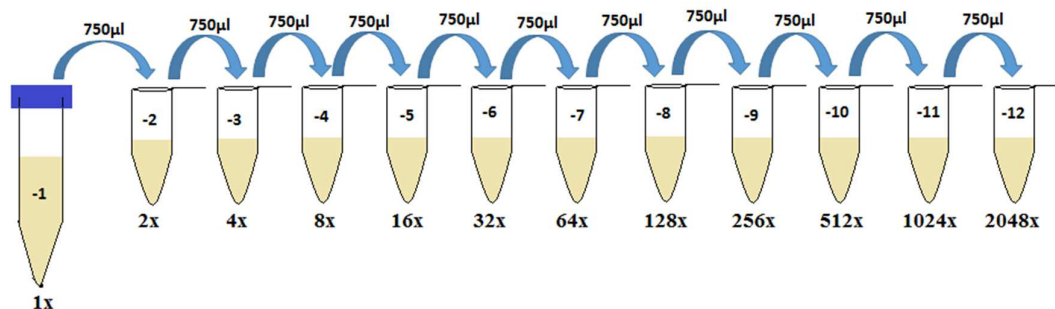
I denne oppgaven ble ComRS-systemet (Berg et al. 2011) benyttet. Her er P_{comX} den titrerbare promoteren, ComS* er induseren og ComR er transkripsjonsaktivatoren. Man setter opp en fortynningsrekke av celler som ikke får tilgang på ComS* i vekstmediet. I disse fortynningene av celler er den eneste induseren tilstede, den som er igjen intracellulært. Som nevnt i innledningen degraderes ComS* sent i cellene. Ved å sette opp en fortynningsrekke av celler oppnår man gjennom celledeling gradvis å tappe cellene for resterende intracellulært ComS*. Utover i fortynningsrekka vil man derfor se en gradvis effekt på cellevekst og andre fenotyper av den reduserte genekspressjonen fra P_{comX} . Når induseren etter hvert når et kritisk lavt nivå, stopper transkripsjonen av det essensielle genet fra P_{comX} opp og cellen dør. I dette arbeidet ble depletion brukt for å finne ut om peptidene S4 og S6 kunne gi en raskere depletion av de essensielle genene *pbp2x* og *pbp2b* enn ComS*. Det ble også brukt for å sammenligne Zn²⁺-systemet med ComRS-systemet.

«Depletion» er et engelsk uttrykk. I denne sammenhengen vil det bli brukt for å beskrive en gradvis nedregulering av ektopisk uttrykk av et gen. På grunn av at det mangler et godt norsk uttrykk som er dekkende for dette, vil «depletion» bli benyttet i denne oppgaven. For ulike bøyingsvarianter av ordet, vil også engelske varianter bli benyttet.

3.5.1 Protokoll depletion

Ved depletion av *pbp2x* ble *S. pneumoniae* SPH165 brukt, og for depletion av *pbp2b* ble *S. pneumoniae* SPH158 brukt. Stammen SPH165 har *pbp2x* uttrykt ektopisk fra P_{comX} og det native genet er fjernet fra genomet ($P_{comX}::pbp2x \Delta pbp2x_{wt}$). Stammen SPH158 har *pbp2b* uttrykt ektopisk fra P_{comX} mens det native genet er fjernet fra genomet ($P_{comX}::pbp2b \Delta pbp2b_{wt}$). Først ble startkultur tint opp og cellene ble spunnet ned ved 4000 rpm i 5 minutter på 4 °C. Cellepelleten ble så løst opp i rent C-medium og igjen spunnet ned på samme måte. Ved dette trinnet vaskes cellene og ekstracellulære rester av ComS* fra startkulturen fjernes. Videre ble cellepelleten løst opp igjen i rent C-medium til OD₅₅₀ ~ 0,05 og fordelt på tre rør. Kulturene ble så fordyrket med aktuelt peptid ved å tilsette ComS*, S4 eller S6 til en peptidkonsentrasjon på 0,2 µM og inkubert ved 37 °C. Når OD₅₅₀ ~ 0,3 ble cellene høstet og vasket på samme måte som forklart tidligere. Videre ble kulturene løst opp i rent C-medium til OD₅₅₀ ~ 0,05 og satt opp i 2-folds fortynningsrekker av celler. Den første fortynningen besto av ufortynnet kultur

($OD_{550} \sim 0,05$), og ble fortynnet 2-fold over 12 rør til og med 2048x fortynnede celler. Oppsettet er illustrert i Figur 3.1. Hver av rekkene med fortynnede celler ble delt i to paralleller, hvor en ene ble indusert med samme peptid til samme konsentrasjon som ved fordyrking. Den andre parallellen ble ikke tilsatt induser. Fortynningsrekkene ble så tilsatt en 96-brønners mikrotiterplate og inkubert i en mikrotiterplateleser ved 37 °C og OD_{492} ble målt automatisk.



Figur 3.1 2-folds fortynningsrekke av celler for depletion. Denne figuren illustrerer oppsettet ved cellefortynninger som ble satt opp ved ulike depletionforsøk. Først ble celler av ønsket kultur vasket og satt opp til fordyrking med ønsket induserpeptid fra $OD_{550} \sim 0,05$. Når $OD_{550} \sim 0,3$ ble celler spunnet ned, vasket og oppløst på nytt til $OD_{550} \sim 0,05$. Fra denne fortynningen av celler, ble de fortynnet ytterligere i en tofolds fortynningsrekke til og med 2048x fortynnede celler.

3.6 SDS-Page og Bocillin-merking av PBPer

SDS-PAGE (sodium dodecylsulfat polyakrylamid gelektroforese) er en metode som brukes til å separere proteiner etter størrelse. Gelen dannes ved at akrylamidmonomerer polymeriserer til lange kjeder og videre krysslinkes. Polymeriseringen er katalysert av N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin (TEMED) og N, N'-metylen-bisakrylamid gjør at krysslinkingen skjer. Ammonium persulfat driver polymeriseringen med hjelp av frie radikaler. Separasjonsevnen avhenger av porestørrelsen i gelen, og porestørrelsen avhenger igjen av konsentrasjonen av akrylamid.

Prøvene i en SDS-PAGE separeres vertikalt gjennom gelen. Før amplifisering på gelen, må prøvene prepareres med en sample buffer. Samplebufferen består av Tris-HCL (pH 6,8), bromfenolblått, glyserol, SDS og β -merkaptoetanol. Bromfenolblått er et fargestoff og migrerer sammen med prøvene i gelen slik at man ser hvor langt prøvene har vandret. β -merkaptoetanol reduserer intra- og intermolekulære disulfidbindinger. SDS er en anionisk detergent som binder til proteinene og ødelegger deres tredimensjonale struktur. Prøveprepareringen foregår på ca.

95 °C, som også bidrar til å denaturere proteinene. Denatureringen av proteinene gjør at de separeres etter størrelse og ikke etter struktur. Bindingen av SDS skjer uavhengig av proteinsekvens og gjør at proteinoverflaten får negativ ladning. Slik vil proteinene vandre mot positiv pol når strøm sendes gjennom gelen/systemet. Siden SDS-bindingen skjer uavhengig av proteinsekvensen, vil store proteiner ha større negativ ladning enn små og vil vandre kortere enn små proteiner som migrerer lettere gjennom porene i gelen. Proteinene kan visualiseres i gelen på flere måter. I dette arbeidet var hensikten å visualisere PBP2b for å se hvordan proteinmengden gradvis ble depletet gjennom fortynningsrekken. Derfor ble proteinene merket med det fluorescerende penicillinderivatet Bocillin FL. Bocillin FL vil på linje med andre penicilliner/ β -laktamer binde til PBPer som PBP2x (Zhao et al. 1999). Styrken på fluorescenssignalet vil gi en indikasjon på mengden protein i prøven. Penicilliner er et konkurrerende substrat for PBPene. Dette gjør at de PBPene bindes opp til penicillin og ikke til peptidoglykan og celleveggsyntesen stopper opp.

3.7.1 Protokoll SDS-PAGE av Bocillin-merkede prøver

Først ble en bakteriekultur satt opp som beskrevet i avsnitt 3.5 med SPH158 (*P_{comX}::p_{bp2b}*). Deretter ble en depletion satt opp for hver kultur fordyrket på hvert peptid i volum på 15 ml i en 2-folds fortynningsrekke av celler over 12 rør til og med 2048x fortynnede celler. I tillegg ble det satt opp en positiv kontroll bestående av 1x fortynnede celler indusert med 0,2 μ M av tilsvarende peptid. 300 μ l av hver av cellefortynningene, samt kontrollen, ble overført til en mikrotiterplate og inkubert i plateleser ved 37 °C hvor OD₄₉₂ ble lest av hvert 5 minutt for å følge veksten. Det resterende av fortynningsrekkene og kontrollen ble inkubert i varmeskap på 37 °C. Når OD₅₅₀ for hver av fortynningene nådde tilnærmet 0,21, ble 10 ml av prøven spunnet ned ved 4000 rpm i 5 min på 4 °C. Videre ble cellepelleten løst i 100 μ l Natriumfosfatbuffer (0,1 M, pH= 6,2). Deretter ble cellene lysert ved tilsetning av LytA til en sluttkonsentrasjon på 25 μ g/ml og inkubert i vannbad på 37 °C i 5 minutter, før de ble fryst og oppbevart ved -80 °C.

Bocillin FL ble løst i metanol til en bruksstock på 5 μ M. Videre ble prøvene tint opp og tilsatt Bocillin FL til sluttkonsentrasjon 3,3 μ M, før de ble inkubert på vannbad på 37 °C i 30 minutter for innmerking. I tillegg til prøvene fra depletionoppsettet og den positive kontrollen, ble også en villtypestamme RH1 preparert på samme måte. Deretter ble 2x SDS samplebuffer tilsatt i forholdet 1:1, og prøven inkubert i vannbad på 96 °C i 10 minutter. På forhånd var en 10 %

separasjonsgel med stackinggel støpt og satt i kar med running buffer. 10 μ l av hver prøve ble applisert på gelen. Det ble benyttet en spenning på 80 V inntil prøvene hadde migrert ut av stackinggelen, før de videre ble separert ved 160 V til loadingbufferen hadde migrert ut av gelen. Deretter ble de separert ytterligere 1,5 timer på 160 V. Til slutt ble det fluorescerende signalet i gelen visualisert i Typhoon 8600 Variable mode imager (Molecular dynamics, Amersham Pharma Biotech) hvor alle de 6 PBPene hos *S. pneumoniae* ble visualisert. Bocillin FL eksiterer emmitert lys som kan måles ved bølglengden ca. 530 nm (Zhao et al. 1999). Innstillingene som ble brukt var følgende - Acquisition mode: Fluorescence. Fluorescein Filter: 526 sp. 800V. Pixel size: 100. Laser: Green 532 nm).

3.7 Mikroskopering

Mikroskopering ble i dette arbeidet brukt for å se om forventet fenotype, som følge av lavere nivåer av PBP2b i cellene ble oppnådd (Berg et al. 2013). Hensikten var å sammenligne når fenotypen inntraff for celler som var depletet for S4, sammenlignet med tilsvarende fortykning av celler som var depletet for ComS*. En positiv kontroll for hver av depletionforsøkene ble også mikroskopert. Disse var indusert med henholdsvis 0,2 μ M S4 eller 0,2 μ M ComS*. Før mikroskoperingen ble en depletion satt opp som beskrevet i avsnitt 3.5. I tillegg til å sette opp fortykningsrekker i mikrotiterplaten, ble en parallell fortykningsrekke satt opp i rør, og inkubert i varmeskap på 37 °C. Når OD₅₅₀ ~ 0,3 ble 1 ml celler tatt ut og tilsatt 400 μ l fikseringsløsning for å stanse biologiske reaksjoner, bevare morfologi og gjøre prøven stabil. Dette er altså en kjemisk fiksering hvor de protein-kryssbindende reagensene paraformaldehyd og glutardialdehyd blir benyttet. Videre ble cellene inkubert en time på is, før de ble oppbevart i kjøleskap fram til mikroskopering. For mikroskopering ble lysmikroskop brukt.

3.8 Inhiberingsforsøk

Det ble satt opp forsøk for å finne ut om peptider som ikke induserte transkripsjon av genet bak *P_{comX}*, kunne konkurrere om bindingssetet til ComS*, og dermed inhibere eller redusere transkripsjonen av genet selv om ComS* var til stede. Aktiviteten ble også her målt ved uttrykk av luciferasegenet og luminescens (se avnsett 3.3). Først ble *S. pneumoniae* SPH130 dyrket opp og forbehandlet som beskrevet i avsnitt 3.3, men nå ble celler indusert med ulike kombinasjoner av peptider. En kombinasjon hvor både ComS* og «inaktivt» peptid var tilsatt fra start, en hvor kun ComS* var tilsatt fra start og «inaktivt» peptid ble tilsatt etter ca. 30 minutter (OD₄₉₂ ~

0,15), og til slutt en hvor ønsket «inaktivt» peptid ble tilsatt fra start og ComS* tilsatt ca. 40 minutter etter inkubering ($OD_{492} \sim 0,15$).

3.9 PCR med Phusion DNA-polymerase

3.9.1 Polymerase Chain Reaction

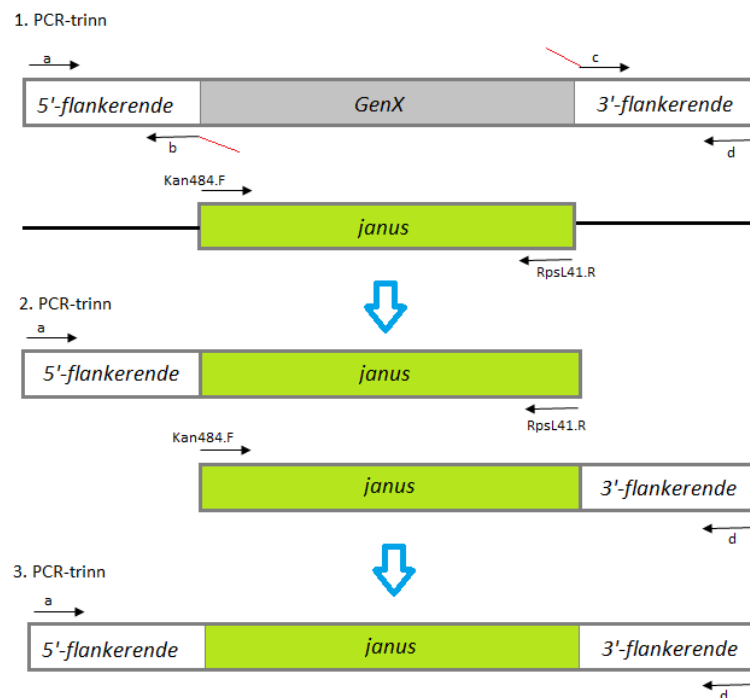
Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode for in vitro amplifisering av DNA-fragmenter. For å kunne amplifisere DNA ved hjelp av PCR, trenger man DNA polymerase, deoxynukleotidtrifosfater (dNTP), oligonukleotidprimere med en ledig 3' OH-ende som hybridiserer til et templat-DNA, og buffer som opprettholder pH i reaksjonsløsningen. I tillegg til dette må ingrediensene gjennomgå ulike trinn som varierer i tid og temperatur. De tidsbestemte variasjonene i temperatur skjer automatisk i en PCR-maskin. I det første trinnet denatureres dobbeltrådig templat-DNA, slik at et enkeltrådig templat blir tilgjengelig. Dette skjer ved en temperatur på 98 °C. Lengden av dette trinnet varierer med hvilken type templat som brukes. De ulike templatene som kan benyttes er hele celler, genomisk DNA isolert fra celler, plasmider eller tidligere PCR-produkter. Man trenger 100-200 ng DNA per 50 µl reaksjon. I neste trinn skjer hybridiseringen av primerene. Primerene er designet for å hybridisere med de komplementære sekvensene som flankerer det området som skal amplifiseres. De er også designet til å hybridisere ved 60 °C. I neste trinn justeres temperaturen til 72 °C. Det er ved denne temperaturen DNA-polymerasen virker, og elongeringen av templatet skjer ved påsetting av dNTPer. Varigheten av trinnet avhenger av typen templat, antall basepar templatet består av og effektiviteten av polymerasen. Etter at elongeringstrinnet er ferdig, begynner reaksjonen fra denatureringstrinnet igjen, og samme prosedyre gjentas 25-30 sykluser slik at nok kopier av DNA er amplifisert. Teorien er at antallet DNA-tråder fordobles for hver syklus, altså får man en eksponentiell økning av DNA-trådene. Når alle syklusene er ferdige, senkes temperaturen til 4 °C og reaksjonen er ferdig.

I dette arbeidet ble en Phusion® DNA Polymerase benyttet. Den er varmestabil og har polymeraseaktivitet ved 72°C. Denne er mer effektiv og har omtrent 50 ganger lavere feilrate enn Taq-polymerase som er en annen mye brukt DNA-polymerase. I dette arbeidet ble Phusion DNA-polymerase brukt ved amplifisering av DNA-fragmenter som skulle anvendes til transformasjon, og ved konstruksjon av nye DNA-fragmenter. Den ble også brukt til screening av transformanter.

3.9.2 Overlap ekstension-PCR

Dersom man skal konstruere et DNA-fragment som ikke er tilgjengelig i et templat, kan man benytte såkalt overlap ekstension-PCR. Dette er en metode med flere serier PCR-reaksjoner hvor bestemte punktmutasjoner eller insersjoner/delesjoner innføres i en sekvens (Higuchi et al. 1988; Ho et al 1989). To eller flere DNA-fragmenter settes altså sammen til ett DNA-fragment. I dette arbeidet ble overlap ekstension-PCR brukt for å konstruere DNA-fragmenter hvor Janus-kassetten, luciferasegenet og *pbp2x* ble satt inn bak P_{czcD} .

I en overlap ekstension-PCR må de DNA-fragmentene som skal settes sammen, ha overlappende 3'ender. Disse DNA-fragmentene syntetiseres i hver sin PCR-reaksjon. Dette gjøres ved å bruke primere som har en hale i 5'ende, og som er komplementære med hverandre. Altså vil PCR-reaksjon nummer 1, ha revers primer med 5'ende som er komplementær til 5'enden i forward primer i PCR-reaksjon nummer to. Dette gir da to produkter som har komplementære 3'ender. I en ny PCR-reaksjon kan disse fragmentene settes sammen ved at de overlappende 3'endene hybridiserer. 3'OH-endene virker da som primer for den komplementære tråden slik at en polymerase kan forlenge tråden. Et eksempel på konstruksjon av et fragment ved hjelp av overlap ekstension-PCR er vist i Figur 3.2.



Figur 3.2 Illustrasjon av overlap ekstension-PCR som viser inserasjon av en Januskassett i et DNA-fragment. Pilene illustrerer primere der pilenes retning indikerer 5' – 3' retning. Primerne b og c har en hale i 5'ende som er komplementær med Januskassetts sekvenser i 5' – 3' ende og er illustrert med en rød strek. I det

første trinnet amplifiseres de flankerende sekvensene til målgenet både oppstrøms- og nedstrøms hver for seg med sine respektive primere. I andre trinn amplifiseres konstruktene 5'-flankerende og janus med primerne a og RpsL41.R og janus med 3'-flankerende med primerne Kan484.F og d. Slik får man to fragmenter som overlapper med Januskassetten. I det siste trinnet fusjonerer man de to overlappende konstruktene til et PCR-produkt ved å benytte de flankerende primerne a og d. Figuren er rekonstruert fra Song et al. (2005).

3.9.3 Protokoll PCR

Når man skal sette opp en PCR, er det en fordel å jobbe på is. Til en 50 µl-reaksjon ble følgende brukt (Tabell 3.1):

Tabell 3.1 Viser oversikt over ingredienser og deres forhold i en PCR-reaksjon til sluttvolum 50 µl.

Reagens	Sluttkonsentrasjon/-volum
x µl MQ-vann	Justert til sluttvolum 50 µl
10 µl 5x Phusion® HF-buffer	1x
1 µl dNTP (10 mM)	0,2 mM
2,5 µl forward primer (10 pmol/µl)	0,5 µM
2,5 µl reverse primer (10 pmol/µl)	0,5 µM
X µl templat-DNA	100-200 ng per 50 µl. 2 µl frystestock/cellekultur eller 1 µl av hvert PCR-fragment som settes sammen
0,5 µl Phusion® DNA polymerase (2 U/µl)	0,02 U/µl

PCR-reaksjonen ble utført i en PCR-maskin. Programmet ble tilpasset det aktuelle templatet, primerenes smeltetemperatur (T_m) og lengden på templatet som skulle bli amplifisert. Primerenes T_m lå på 60 °C, men maskinen ble stilt inn på 58 °C for primerhybridiseringen (trinn 3 Tabell 3.2). Lengden på elongeringstrinnet (trinn 4 Tabell 3.2) varierte med lengden på fragmentet som ble amplifisert. Dersom templatet besto av hele celler eller gDNA, ble det regnet 30 sekunder per 1 kB. Ved bruk av PCR-fragmenter eller plasmid som templat, ble det regnet 15 sekunder per 1 kB. Antallet sykler som brukes, varierer etter som hva formålet med PCR-reaksjonen er. Ved vanlig amplifisering ble 25 sykler brukt, mens ved screening av transformanter ble 27 sykler brukt.

PCR-programmet så ut som følgende (Tabell 3.2):

Tabell 3.2 Viser oversikt over de ulike trinnene i en PCR-reaksjon

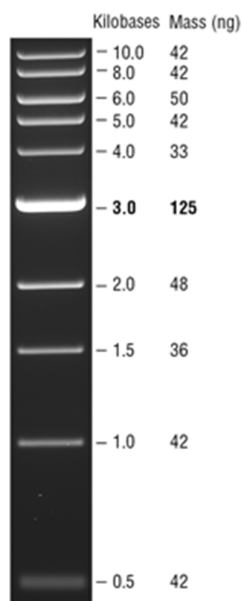
Trinn	Temperatur og tid
1. Initiell denaturering	94 °C, 5 min
2. Denaturering	94 °C, 30 sek
3. Primerhybridisering	X °C, 30 sek
4. Elongering	72°C, x sek
5. Antallet sykler	25-35 sykler (repeteres fra trinn 2)
6. Utfylling av ender	72 °C, 5 min
7. Midlertidig oppbevaring i PCR-maskin	4 °C, ∞

Etter amplifiseringen oppbevares templatene midlertidig ved 4 °C.

3.10 Agarosegel-elektroforese

Agarosegel-elektroforese er en metode som brukes for å separere, rense og størrelsesbestemme DNA-fragmenter. Teorien er at DNA-fragmentene separeres etter størrelsen ved hjelp av elektrisitet. DNA-molekylene migrerer gjennom en agarosegel som er i kontakt med en elektrode i hver ende. DNA har på grunn av fosfatgrupper negativ ladning ved nøytral pH og vil derfor migrere mot positiv elektrode. DNA-fragmenter med få basepar migrerer lengst i gelen, mens lengre DNA-fragmenter migrerer kortest. Hvordan DNA-fragmentet migrerer i gelen, avhenger også av konsentrasjonen av agarose i gelen, altså porestørrelsen, og spenningen over gelen. Gelen plasseres i et gelkar som inneholder TAE-buffer. Dette er bufferen som leder strømmen, derfor er det viktig at hele gelen er i kontakt med TAE-bufferen.

Agarosegelen tilsettes PegGREEN (Polyethylen Glycol). Denne binder DNA og fluorescerer ved belysning med UV. Slik kan man visualisere hvor i gelen DNA-fragmentet har migrert. Ved å bruke en molekylvektstandard, kan man bestemme størrelsen på DNAet. Denne molekylvektstandaren kalles DNA-ladder. En slik ladder kan også brukes til grovt å bestemme konsentrasjonen på DNA-fragmentet siden mengden fluorescens som avgis, er proporsjonal med den totale massen DNA. Figur 3.3 viser 1 kb ladder (A) og 100 bp ladder (B) fra New England BioLabs ® Inc.



Figur 3.3 1 kb ladder fra New England BioLabs® Inc. Båndene indikerer lengden på DNA-fragment/PCR-produkt i antall basepar. Styrken på båndene indikerer mengden/antall av amplifisert templat. Figurkilde:

<https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder>

3.10.1 Protokoll agarosegel-elektroforese

1 %-gel brukt for separering av PCR-produkter basert på størrelse i antall basepar. For 1 %-gel ble 0,5 g agarose tilsatt i 50 ml 1x TAE-buffer. Løsningen ble deretter varmet i mikrobølgeovn til all agarosen var løst. Videre ble løsningen nedkjølt til ca. 60 °C før det ble tilsatt 2 µl PegGREEN. Løsningen ble så tilsatt et støpekar hvor brønnekammer er satt inn. Etter at gelen hadde stivnet ble kammene fjernet, gelen overført til et elektroforesekar og 1x TAE-buffer ble tilsatt til det dekket alle brønnene. Videre ble 10 µl DNA-ladder applisert i ønsket brønn. Det ble benyttet en 1 kb DNA-ladder (Figur 3.3). Prøvene ble så tilsatt 3-5 µl 10x Loading buffer og applisert i de øvrige brønnene. Deretter ble elektroforesen utført ved 90 V til prøvene hadde blitt separert tilstrekkelig. Visualisering ble utført under UV-lys. Størrelsen og konsentrasjon av fragmentene ble bestemt ved sammenligning med ladder. For videre bruk av fragment, ble det skåret ut med et sterilt skalpellblad og renses ved bruk av NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel).

For rensing av fragmentet ble altså NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up (Macherey-Nagel). Først ble gelbiten veid og tilsatt dobbel mengde Binding buffer (NT). Gelbiten med Binding buffer ble satt på vannbad ved 55 °C til hele gelbiten hadde smeltet. Deretter ble alt dette

overført til en kolonne med oppsamlingsrør, og spunnet ned i 1 minutt ved 11000 x g. Binding buffer sørger for at DNA-fragmentene binder til kolonnen. Innholdet i oppsamlingsrøret ble kastet før 700 µl Wash buffer (NT3) ble tilsatt kolonnen og spunnet på samme måte. Wash bufferen vasker bort salter og andre komponenter slik at DNAet blir rent. Deretter ble innholdet i oppsamlingsrøret kastet og kolonnen ble spunnet 2 minutter i 11 000 x g for tørking. Så ble kolonnen plassert i et nytt og rent eppendorfrør. Elueringsbuffer ble så tilsatt i et volum på 20-50 µl avhengig av styrken på båndene. Kolonnen sto på benk i ca. 1 minutt før den ble spunnet i 1 minutt på 11000 x g. Elueringsbufferen gjør at DNAet løsner fra kolonnen og kommer ut i løsning. Etter rensing oppbevares templatet i -20 °C.

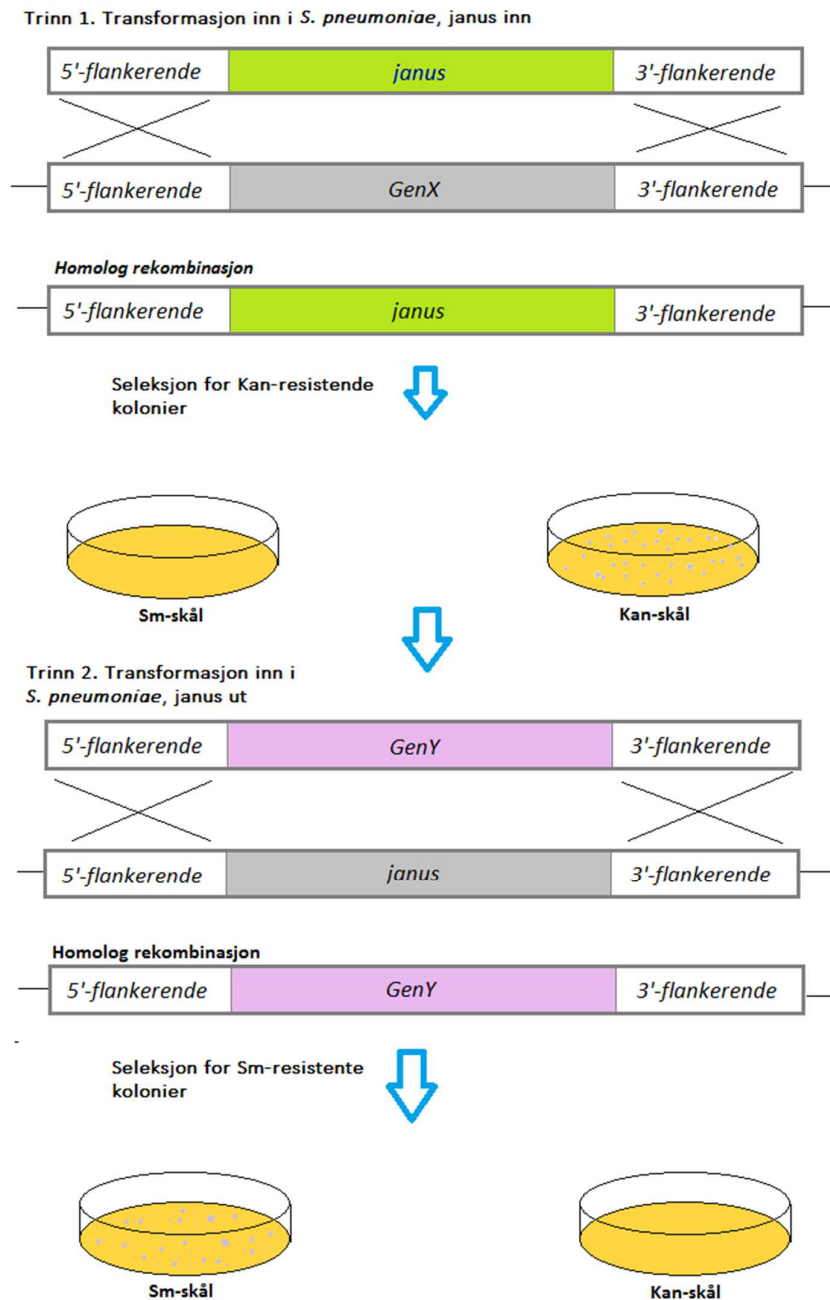
3.11 Transformasjon

S. pneumoniae er som forklart i innledningen (avsnitt 1.1.2) naturlig kompetent for genetisk transformasjon. Altså er de i stand til å ta opp og integrere ekstracellulært DNA i sitt genom ved homolog rekombinasjon. *S. pneumoniae* blir kompetent ved induksjon med et kompetansestimulerende peptidferomon kalt CSP. CSP aktiverer så transkripsjon av en rekke kompetasegener som blant annet koder for proteiner som er nødvendig for opptak og integrering av DNA (Håvarstein et al. 1995a). Ved å tilsette CSP-1 til vekstmediet, vil pneumokokkene være kompetente i omtrent 20 minutter, før de går tilbake til ukompetent tilstand. I løpet av disse 20 minuttene har pneumokokkene integrert DNAet som også vil finnes i genomet til de neste generasjonene. Transformasjon ble i dette arbeidet benyttet til å innføre DNA-fragmenter i *S. pneumoniae* for homolog rekombinasjon i genomet, i den hensikt å lage nye mutanter. Ingen av stammene brukt i dette arbeidet kan selv skille ut CSP fordi genet *comA*, hvis genprodukt virker som transportør for nativt produsert CSP, er fjernet fra genomet. Slike mutanter kalles $\Delta comA$ -mutanter og oppnår ikke kompetanse uten at syntetisk CSP tilføres. På denne måten kan man kontrollere når cellene skal bli kompetente.

3.11.1 Negativ seleksjon ved bruk av Januskassetten

Sung et al. (2001) har konstruert en DNA-kassett bestående av en gensekvens *kan-rpsL*⁺, kalt Janus. Januskassetten gir kanamycinresistens (Kan^R) og dominant streptomycinsensitivitet (Sm^S) i en streptomycinresistent bakgrunn. For at en utgangsstamme skal kunne få Janus satt inn til bruk for negativ seleksjon, kreves det at stammen er resistent mot streptomycin (Sm^R) og sensitiv for kanamycin (Kan^S). Streptomycinresistens kan oppstå spontant ved en mutasjon

i *rpsL*-genet (*rpsL*⁻) hos *S. pneumoniae* (Salles et al. 1992). Når en Januskassetten settes inn, vil *rpsL*⁺ allelet gjøre at bakterien blir sensitiv ovenfor streptomycin fordi streptomycinresistens er en recessiv egenskap (Claverys et al. 1980). Denne negative seleksjonen kan brukes til å selektere for mutanter hvor transformasjonen har skjedd på korrekt måte. Når Januskassetten skal transformeres inn, selekteres transformantene på en TH-agarskål tilsatt kanamycin (400 µg/ml). De klonene hvor transformasjonen har skjedd vil da være resistente mot kanamycin og de vil kunne vokse opp på platen. For de mutantene hvor transformasjonen ikke har skjedd, vil ikke Januskassetten sitte inne i genomet, og de vil være sensitive for kanamycin. Dermed vil ikke disse vokse opp på platen. Dette er en positiv seleksjon. Dersom Januskassetten skal ut av genomet ved transformasjon nummer to, kan man da plate ut mutantene på en TH-agarskål som inneholder streptomycin (200 µg/ml). Disse skal da igjen være resistente mot streptomycin. De mutantene som ikke har transformert Januskassetten ut, vil fortsatt være resistente mot kanamycin i stedet for Streptomycin, og ikke vokse opp. Dette kalles negativ seleksjon og er benyttet for konstruksjon av flere mutanter. Fordelen med negativ seleksjon er at man kan fjerne antibiotikamarkøren (Januskassetten) man selekterer på i 1. trinn, og gå tilbake til opprinnelig Sm^R-fenotype (Sung et al. 2001). Figur 3.4 viser en systematisk oversikt over de ulike trinnene ved en transformasjon.



Figur 3.4 Totrinns transformasjon i *S. pneumoniae* ved negativ seleksjon. Januskassetten (*kan-rpsL*⁺) transformeres i første trinn inn i en *S. pneumoniae* ved dobbel overkrysning. Dette forutsetter at de flankerende sekvensene er homologe med 5'- og 3'-flankerende sekvens til målgenet. Utgangstammen er Sm^R og Kan^S, men etter transformasjonen erverver den Sm^S og Kan^R. Dette gjør at man kan selektere for Kan^R-kolonier på THA-skåler tilsatt kanamycin (400 µg/ml). I neste trinn byttes Januskassetten ut med donor DNA (GenY) ved transformasjon. Også her må de flankerende sekvensene være homologe til 5'- og 3'-flankerende til målområdet. Når Januskassetten transformeres ut gjenopprettes Sm^R og Kan^S som er den opprinnelige genotypen. Dermed kan man selektere for Sm^R-kolonier på THA-skåler tilsatt streptomycin (200 µg/ml). Figuren er modifisert fra Song et al. (2005).

3.11.2 Protokoll transformasjon

Startkultur for ønsket stamme ble tint opp og spunnet i 5 minutter ved 5000 rpm og 4 °C. Supernatanten ble helt av og pelleten ble løst i C-medium til $OD_{550} = 0,05$. Deretter ble cellene satt på vannbad ved 37 °C i 15 minutter (til $OD_{550} \sim 0,05-0,1$). Videre ble 1 ml kultur indusert med CSP-1 til sluttkonsentrasjon 250 ng/ml, og tilsatt 0,5-1 µg/ml DNA for transformasjon. Det ble også benyttet en negativ kontroll som kun besto av 1 ml kultur og 250 ng/ml CSP-1. Deretter ble dette inkubert på vannbad ved 37 °C i 2 timer. Videre ble 20 µl kultur platet ut på THA-skåler med aktuelt antibiotikum for seleksjon. Dersom Janus-kassetten ble satt inn, ble transformantene selektert på THA-skål med 400 µg/ml kanamycin (Kan). Hvis Janus-kassetten skulle ut, ble THA-skåler med 200 µg/ml med streptomycin (Sm) benyttet for seleksjon. Etter utplating ble skålene inkubert anaerobt over natt ved 37 °C. Dagen etter ble kolonier plukket med sterile tannpirkere, og dyrket opp i 3 ml C-medium tilsatt samme antibiotikum i samme konsentrasjon som transformantene ble selektert på. Antallet kolonier som plukkes ble vurdert ut fra vekst på negativ skål sammenlignet med positiv skål. Når cellene hadde en god vekst, ble de tilsatt 50 % glyserol til sluttkonsentrasjon 15 % og fryst ned til -80 °C. Det ble tatt ut 1 ml til frysestock. For å kontrollere transformantene som ble plukket ble det satt opp PCR for screening. Ved screening ble en flankerende primer i tillegg til en primer inne i forventet innsatt fragment brukt.

3.12 DNA-sekvensering

Sekvensering av DNA er en mye brukt metode hvor hovedformålet er å bestemme baserekkefølgen i en DNA-tråd. Dette kan brukes til å undersøke om PCR-produkter er riktige, om en transformasjon og tillaging av en klon har vært vellykket, eller om det kan ha oppstått uønskede mutasjoner under disse prosessene. Den sekvenseringsmetoden som brukes mest i dag er Sanger-sekvensering. For å kunne utføre en sekvenseringsreaksjon trenger man, i tillegg til templatet man ønsker å sekvensere, oligonukleotidprimere, DNA-polymerase, deoksynukleotider (dNTP) og dideoksynukleosider (ddNTP). De fire forskjellige ddNTPene (ddATP, ddGTP, ddCTP og ddTTP) er merket med hvert sitt forskjellige fluorokrom. ddNTP kan inkorporeres i DNA-kjeden ved hjelp av DNA-polymerase slik som dNTP, men ddNTP mangler en fri 3' OH-gruppe. Denne 3' OH-gruppen finnes hos dNTP og sørger for at disse kan danne fosfodiesterbindinger med nye dNTPer. Dette betyr at inkorporering av en ddNTP medfører en terminering av DNA-syntesen. Dette gjør også at det er tilfeldig hvor ddNTPene

inkorporerer i den nysyntetiserte DNA-tråden. En sekvenseringreaksjon gir fragmenter i ulike lengder, hvor 5' ende er lik for alle og 3' ende avslutter med en av de fire ddNTPene. Disse fragmentene separeres etter størrelse og fluorokromet til ddNTP detekteres i en sekvensator og baserekkefølgen bestemmes. For sekvensering ble templat og primer sendt til GATC Biotech, hvor enten lightrun eller supreme run sanger-sekvensering ble utført. Lightrun vil si en hurtig sanger-sekvensering hvor sekvenseringen ikke gjentas dersom sekvensen er dårlig. For supreme run sanger-sekvensering blir sekvenseringen gjentatt opp til 8 ganger, noe som gir en bedre og mer fullstendig sekvens.

3.13 Undersøkelse av luciferaseaktivitet for P_{czcD}

Som beskrevet i innledningen var et delmål med oppgaven å sammenligne det relativt nyetablerte ComRS-systemet med det veletablerte Zn^{2+} -systemet. De ble i hovedsak sammenlignet med hensyn på aktivitet av transkripsjon, og hvor egnet systemene er i depletions eksperimenter. Til dette arbeidet ble derfor to mutanter konstruert. For disse mutantene ble først plasmidet pJWV101 (Veening et al. 2014) som inneholder promoteren P_{czcD} , transformert inn i en *S. pneumoniae* utgangsstamme RH425. Videre ble et fragment bestående av Janus bak P_{czcD} ($P_{czcD}::Janus$), samt flankerende sekvenser, satt sammen og amplifisert ved bruk av overlap ekstension-PCR (avsnitt 3.9.2). Dette fragmentet ble videre transformert inn i stammen hvor plasmidet befant seg. Deretter ble et DNA-fragment hvor Janus-kassetten ble byttet ut med luciferasegenet, konstruert på samme måte som beskrevet tidligere (avsnitt 3.9.2). Dette fragmentet ble satt inn bak P_{czcD} ved transformasjon ($\Delta Janus::luc$). Denne stammen ble kalt KW12 og ble brukt til å teste aktiviteten fra P_{czcD} i et luciferase genreporterassay, som beskrevet i avsnitt 3.3. Transkripsjon av *luc* ble induert ved tilsetning av ulike konsentrasjoner av $ZnCl_2$. Luciferaseaktiviteten ble sammenlignet med SPH130 ($P_{comX}::luc$) og uttrykket ComS* gir for ComRS-systemet.

KW12 og SPH130 ble satt opp som beskrevet i 3.1 og fordyrket i rent C-medium. KW12 ble også satt opp i et C-medium uten Zn^{2+} . Når $OD_{550} \sim 0,3$ ble cellene høstet og løst i ønsket C-medium til $OD_{550} \sim 0,05$. Videre ble ComS* og $ZnCl_2$ tilsatt til ønskede konsentrasjoner i brønnene i en 96-brønners mikrotiterplate. 280 μ l kultur av SPH130 ble tilsatt brønner med ComS* i et spenn mellom 0,02 μ M og 1 μ M, samt 4 μ M for å mette systemet, og KW12 ble induert med $ZnCl_2$ i et spenn på 0,01 mM og 0,2 mM, samt 4 mM for å mette systemet. I tillegg ble det satt opp uinduserte kontroller av hver kultur. Videre ble det tilsatt 20 μ l D-luciferin før

platen ble inkubert i plateleser ved 37 °C. Luminescens og OD₄₉₂ ble målt automatisk hvert 8 minutt.

3.14 Vekstforsøk hvor *pbp2x* uttrykkes med Zn²⁺-systemet

For å undersøke hvorvidt Zn²⁺-systemet egner seg til depletion, ble en stamme konstruert hvor det essensielle genet *pbp2x*-genet befant seg bak P_{czcD}. Denne ble kalt KW15 (P_{czcD}::*pbp2x*). For å konstruere denne stammen, ble først et DNA-fragment som inneholdt *pbp2x* bak P_{czcD} transformert inn (ΔJanus::*pbp2x*). Deretter ble det native *pbp2x*-genet slått ut, og en Januskassett satt inn (Δ*pbp2x*_{wt}::Janus). På grunn av at *pbp2x* er et essensielt gen for pneumokokker, måtte KW15 fordyrkes i C-medium tilsatt ZnCl₂ for å opprettholde transkripsjon av genet. For å bestemme hvilken konsentrasjon av ZnCl₂ som var mest optimal for å uttrykke *pbp2x* sammenlignet med kontrollene SPH165 (P_{comX}::*pbp2x*) og en villtypestamme (RH1), ble KW15 dyrket med ZnCl₂ i konsentrasjoner i et spenn mellom 0,05 mM og 0,2 mM. Konsentrasjonene som ble valgt har bakgrunn fra Kuipers et al (2007). Startkultur av KW15 ble tint opp, og cellene høstet, vasket og løst i C-medium til OD₅₅₀ ~ 0,05. Videre ble ZnCl₂ tilsatt til ulike sluttkonsentrasjoner. Samtidig ble SPH165 dyrket med 0,2 μM ComS* og RH1 satt opp i kun rent C-medium. Etter en times fordyrking av cellene, ble kulturene tynnet ned igjen til OD₅₅₀ ~ 0,05 i C-medium med aktuell konsentrasjon av ComS* eller ZnCl₂. Kulturene ble så overført til en 96-brønners mikrotiterplate. RH1 ble også overført til mikrotiterplaten, men ble ikke tilsatt induser. Platen ble inkubert i en plateleser ved 37 °C og OD₄₉₂ ble målt automatisk.

3.15 Depletion av *pbp2x*: Zn²⁺-systemet vs. ComRS-systemet

For å sammenligne en depletion av *pbp2x* for Zn²⁺-systemet med ComRS systemet, ble KW15 fordyrket i vanlig C-medium med tilsatt ZnCl₂ konsentrasjon 0,1 mM (resultat fra vekstforsøk 3.14). Som kontroll ble KW15 sammenlignet med SPH165 (P_{comX}::*pbp2x*). Stammene ble fordyrket på samme måte som beskrevet i punkt 3.2, hvor SPH165 ble tilsatt 0,2 μM ComS* og KW15 ble tilsatt 0,1 mM ZnCl₂. Fortynningene med celler ble overført til 96-brønners mikrotiterplate, hvor en rekke ble indusert med henholdsvis 0,2 μM ComS* for SPH165 og 0,1 mM ZnCl₂ for KW15. Videre ble platen inkubert i en mikrotiterplateleser i 37 °C og OD₄₉₂ ble lest av hvert 15 minutt i totalt 15 timer.

4 Resultater

4.1 Oppløsning av peptider og bestemmelse av deres konsentrasjon

Som nevnt i metoddelen (se avsnitt 3.2) var enkelte av peptidene tungtløselige i NaAc (0,1 M). Blant annet var peptidene S4 og S9 vanskelige å løse, derfor ble det forsøkt å øke løseligheten ved å tilsette mer buffer. Det ble forsøkt å doble buffervolumet uten at dette førte til at peptidene ble fullstendig løst. En oversikt over løseligheten til alle peptidene er vist i tabell 4.1. Det ble også forsøkt å tilsette DMSO, metanol og acetonitril for å øke løseligheten. Dette førte til en svakt bedring av løseligheten, men fullstendig oppløsning ble ikke oppnådd. I et forsøk på å bedre løselighetene til peptidene S4 og S9, ble det i tillegg syntetisert to nye peptider hvor en «hale» med aminosyresekvensen SGSGS ble satt inn ved peptidenes N-terminale ende. Disse peptidene ble kalt henholdsvis S13 og S14. Heller ikke disse peptidene var lettere løselige. Peptidenes aminosyresekvens og oppløsningsevne er beskrevet i Tabell 4.1.

Tabell 4.1 Oversikt over aminosyresekvensene og løseligheten til peptidene som ble brukt.

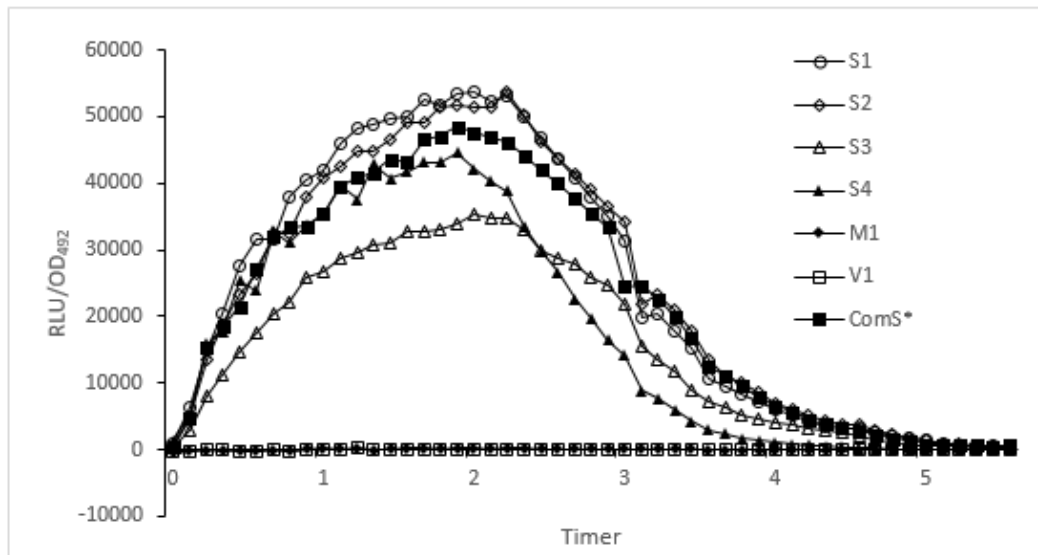
Peptid	Aminosyresekvens (NH ₂ →COOH)	Løselighet i 0,1 M NaAc
ComS*	LPYFAGCL	
S1	LPYYAGCL	Lett løselig
S2	LPYFAGVL	Lett løselig
S3	LPYFAGSL	Lett løselig
S4	LAYFAGCL	Tungt løselig. Volumet NaAc ble doblet.
M1	MGLDWWSL	Lett løselig
V1	VPPFMIYY	Tungt løselig. Volumet NaAc ble doblet.
S5	LAFFAGCL	Tungt løselig. Volumet NaAc ble doblet.
S6	LAYYAGCL	Lett løselig
S7	LYYFAGCL	Lett løselig
S8	LGYFAGCL	Lett løselig
S9	LVYFAGCL	Tungt løselig. Volumet NaAc ble doblet.
S10	LNYFAGCL	Tungt løselig. Volumet NaAc ble doblet.
S11	LDYFAGCL	Lett løselig
S12	LKYFAGCL	Lett løselig

S13	SGSGSLAYFAGCL	Tungt løselig
S14	SGSGSLVYFAGCL	Tungt løselig
S15	LPYFAGC	Lett løselig

På grunn av den dårlige løseligheten ble konsentrasjonen av peptidet S4 forsøkt bestemt ved å sammenligne med en kjent konsentrasjon av ComS*. Konsentrasjonen ble forsøkt målt ved hjelp av HPLC-analyse og ved direkte måling av absorpsjonen ved 280 og 206 nm. HPLC-analysen ga mange topper, selv etter gjentatte forsøk og optimalisering. Grunnen til dette var trolig at NaAc ikke var helt ren. På grunn av de mange toppene var det ikke mulig å si hvilken topp som kunne være peptidet, og resultatene kunne derfor ikke brukes. Ved direkte måling av A280 og A206 viste resultatene at S4 ga noe høyere absorpsjon enn ComS*, men på grunn av at løsningen med S4 var noe blakket ville dette interferere med målingene. På bakgrunn av absorpsjonsresultatene ble det bestemt å gå videre med løsningen av S4 i NaAc, og gå ut fra at konsentrasjonen var tilnærmet lik ComS*.

4.2 Undersøkelse av peptidenes aktivitet ved luciferase genreporterassay

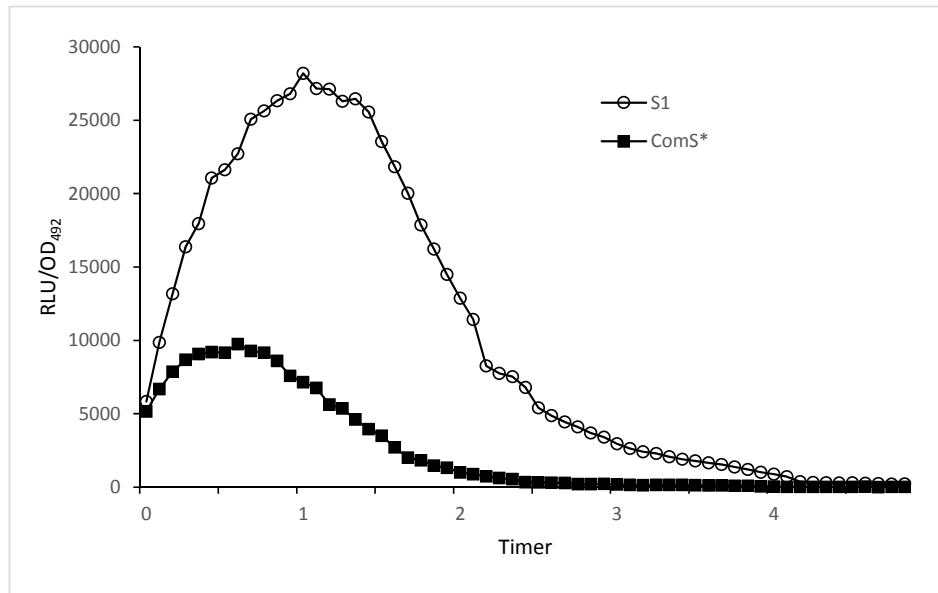
For å undersøke aktivitetene til de ulike peptidene ble det som forklart i punkt 3.3 brukt et luciferase genreporterassay. Med aktiviteten til et peptid menes evnen peptidet har til å indusere transkripsjonen av luciferasegenet (*luc*) fra P_{comX} promoteren, målt indirekte som emmitert lys (RLU). Figur 4.1 gir en oversikt over aktivitetene til 6 peptider sammenlignet med det beslektede peptidet ComS*. Disse ble først testet i en peptidkonsentrasjon på 1 μ M. Denne konsentrasjonen gir maksimal ekspresjon av luciferasen når ComS* benyttes som induser (Berg et al. 2011).



Figur 4.1 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon av SPH130 etter induksjon med de ulike peptidene. Bakteriekulturer av SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble ved OD₅₅₀ ~ 0,05 indusert med 6 ulike peptider (S1, S2, S3, S4, M1, V1 og ComS*) i en konsentrasjon på 1 μ M. Til 280 μ l kultur ble også 20 μ l luciferin tilsatt. Videre ble cellene inkubert i en 96-brønners plate ved 37 °C i en mikrotiteravleser. Bioluminescensen (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 6 minutt i ca. 6 timer. RLU ble deretter delt på OD₄₉₂.

Av Figur 4.1 kan man se at peptidene S1 og S2 gir litt høyere luciferaseaktivitet enn ComS*. S3 peptidet gir klart lavere luciferaseaktivitet enn ComS*, samtidig som induksjonen synes å gå noe tregere. Videre kan man se at S4 induserer til omtrent like høy ekspressjon av *luc* som ComS*, men luciferaseaktiviteten synker raskere. Peptidene M1 og V1 var ikke aktive.

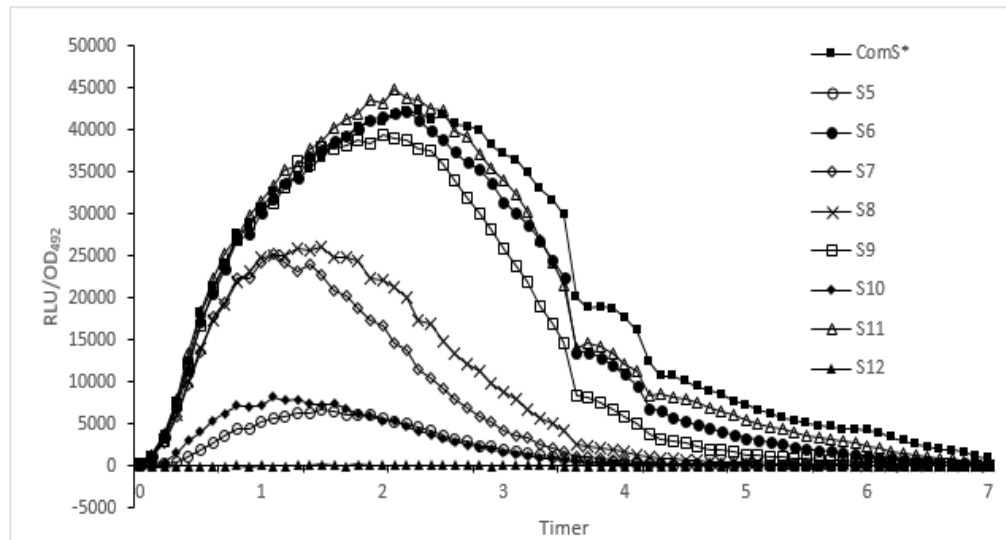
I tillegg ble peptidenes evne til å indusere luciferaseaktiviteten ved ulike konsentrasjoner undersøkt. Celler ble indusert med peptidkonsentrasjoner som varierte mellom 0,002 μ M og 1 μ M, samt 5 μ M (se avsnitt 3.3). Ut fra disse resultatene var det S1 som ga mest interessante resultater. Resultatet fra induksjon med 0,02 μ M S1 er vist i Figur 4.2. Resultatene viste at S1 er mer effektiv enn ComS* ved lave peptidkonsentrasjoner. Vedlegg A.1 (ComS*) og A.2 (S1) viser resultatene av de øvrige konsentrasjonene av ComS* og S1.



Figur 4.2 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon av SPH130 etter induksjon med 0,02 μ M S1 eller ComS*. Bakteriekulturer av SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble ved OD₅₅₀ ~ 0,05 induisert med 0, S1 eller ComS* i en peptidkonsentrasjon på 0,02 μ M. Til 280 μ l kultur ble også 20 μ l luciferin tilsatt. Videre ble cellene inkubert i en 96-brønners plate ved 37 °C i en mikrotiteravleser hvor luminescensen (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 4,5 minutt i ca. 5 timer. RLU ble deretter delt på OD₄₉₂.

Celler induisert med 0,02 μ M S1 gir en luciferaseaktivitet på ca. 27 000 RLU/OD₄₉₂, mens celler induisert med ComS* til samme konsentrasjon gir en luciferaseaktivitet nær 10 000 RLU/OD₄₉₂. Dette viser at S1 er et peptid som gir høyere uttrykk av P_{comX} -regulerte gener enn ComS* ved lave konsentrasjoner.

Ut fra resultatene i Figur 4.1 var det også interessant å undersøke om andre peptidvarianter i tillegg til S4, kunne gi en enda hurtigere nedgang i luciferaseaktiviteten etter at induseren var tilsatt. En induser som fjernes raskere, for eksempel ved at den degraderes raskere av bakteriecellene, vil være mer presis og enklere å bruke i praksis ved at depletionen av et målprotein går raskere. 8 nye varianter av ComS* peptidet (S5-S12, Tabell 1) ble derfor syntetisert og testet ved en konsentrasjon på 1 μ M. Resultatene er vist i Figur 4.3.

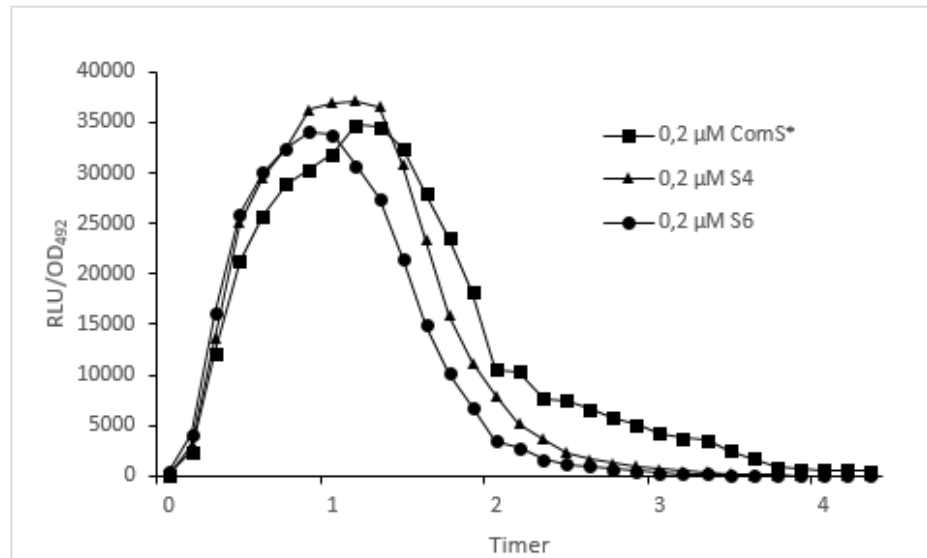


Figur 4.3 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon av SPH130 etter induksjon med ulike peptider. Bakteriekulturer av SPH130 (*P_{comX}::luc*) ble ved OD₅₅₀ ~ 0,05 induisert med ulike peptider (ComS*, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11 og S12) i en peptidkonsentrasjon på 1 µM. I tillegg ble 20 µl luciferin tilsatt til 280 µl kultur. Videre ble cellene inkubert i en 96-brønners plate ved 37 °C i en mikrotiteravleser og luminescensen ble målt hvert 6 minutt i 7 timer. Luminescensen ble deretter delt på veksten i OD₄₉₂.

Resultatene (Figur 4.3) viser at S6 og S11 gir bortimot samme maksimumaktivitet som ComS* (RLU/OD₄₉₂ ~ 43 000). Begge disse peptidene er lett løselige, så resultatene er til å stole på. Peptidet S9 derimot, er tungt løselig så resultatet er usikkert, og den induserer til noe lavere aktivitet enn ComS*. S7 og S8, som begge er lett løselige, har klart svakere luciferaseaktivitet enn ComS*. S5 og S10 var tilsynelatende begge svake indukere, men siden de også er tungt løselige så resultatet er usikkert. S12, som er lett løselig, hadde ingen induseraktivitet. S7 og S8 viser tendenser til å gi et raskere fall i luciferaseaktiviteten enn ComS* etter at maksimumsnivået er nådd, men de var vesentlig svakere som indukere. S6, S9 og S11 som derimot hadde luciferaseaktivitet nært ComS*, gir noe raskere nedgang i aktivitet.

Siden S6 hadde god løselighet, ble S6 brukt i videre undersøkelser og sammenlignet med S4 og ComS*. For å se hvordan disse oppførte seg ved lavere konsentrasjoner, ble SPH130 stammen induisert med 0,2 µM av alle tre peptidene. Resultatene er vist i Figur 4.4. Av denne figuren kan man se at S4, S6 og ComS* var omtrent like effektive ved denne konsentrasjonen. Alle tre ga en maksimal luciferaseaktivitet på rundt 35 000 RLU/OD₄₉₂, men kulturen som var induisert med S6 peptidet viser en raskere nedgang i luciferaseaktivitet enn kontrollen. Forskjellen

mellom S4 og ComS* var derimot noe mindre, og ut i fra forsøket som er vist i Figur 4.4 er det usikkert om forskjellen er signifikant.



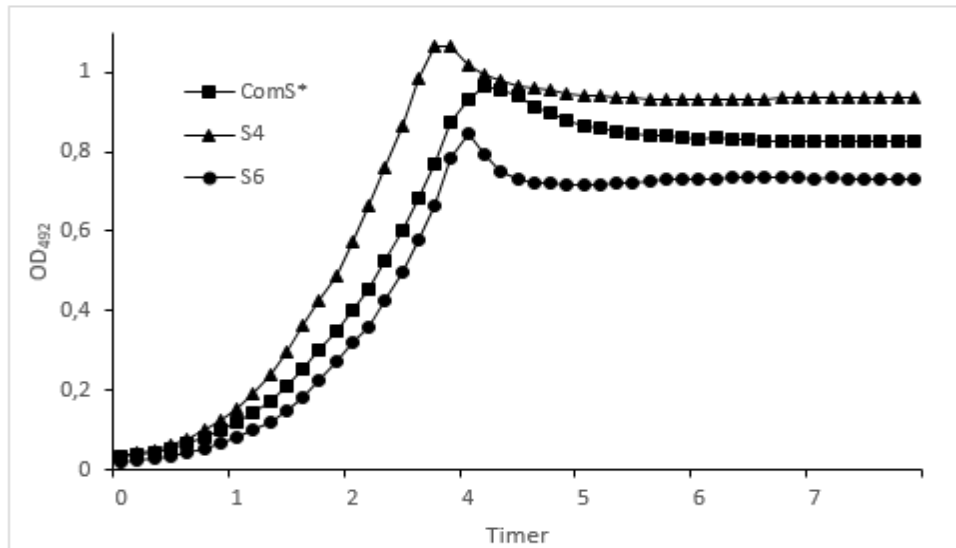
Figur 4.4 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon av SPH130 etter induksjon med ulike peptider. Celler fra SPH130 ($P_{comX}::luc$) med OD₅₅₀ ~ 0,05 ble tilsatt 0,2 μM ComS*, S4 eller S6. Til alle induserte kulturer ble også 20 μl (til 280μl) luciferin også tilsatt. Kulturene ble inkubert ved 37 °C i en mikroplateleser. OD₄₉₂ ble målt automatisk og samtidig med luminescensen måles i relative light units (RLU) og ble målt hvert 6 minutt i ca. 4 timer. Luminescensen ble så delt på veksten målt automatisk i OD₄₉₂.

Som nevnt ovenfor er det noen ganger ønskelig med en rask depleksjon slik at man kan se effekten av at cella mangler det essensielle genproduktet tidligere. Dette gjør også at effektene blir enda større ved de laveste cellefortynningene og kanskje at cellene dør i slutten av en fortynningsrekke. Det ideelle ville være at ekspresjonen av målgenet ble «skrudd av» i løpet av minutter i stedet for en gradvis senkning av ekspresjonen i løpet av flere timer.

4.3 Vekstforsøk med ComS*, S4 og S6

For å se hvordan ulike konsentrasjoner av peptidene S4 og S6 påvirket veksten når disse peptidene regulerer ekspresjonen av det essensielle genet *pbp2x*, ble det satt opp et vekstforsøk med SPH165 som forklart i punkt 3.5. Hensikten med dette var å finne fram til peptidkonsentrasjoner av S4 og S6 som ga tilnærmet samme vekst som en villtypestamme, dvs. en stamme hvor *pbp2x*-genet uttrykkes fra sin native promotor. SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$) induisert med 0,2 μM ComS* er vist å gi vekst lik villtypen RH1 (Berg et al. 2013) og representerer

derfor villtypen i dette forsøket. Først ble vekst ved 0,2 μM S4 og S6 testet fordi denne konsentrasjonen av ComS* ble brukt i et tidligere studium (Berg et al. 2013). I tillegg ble en 1,5-folds fortynningsrekke av peptidkonsentrasjoner fra 0,002 - 0,2 μM satt opp for å se om andre konsentrasjoner ga vekst som var likere veksten med 0,2 μM ComS*. Resultatet er vist i Figur 4.5.



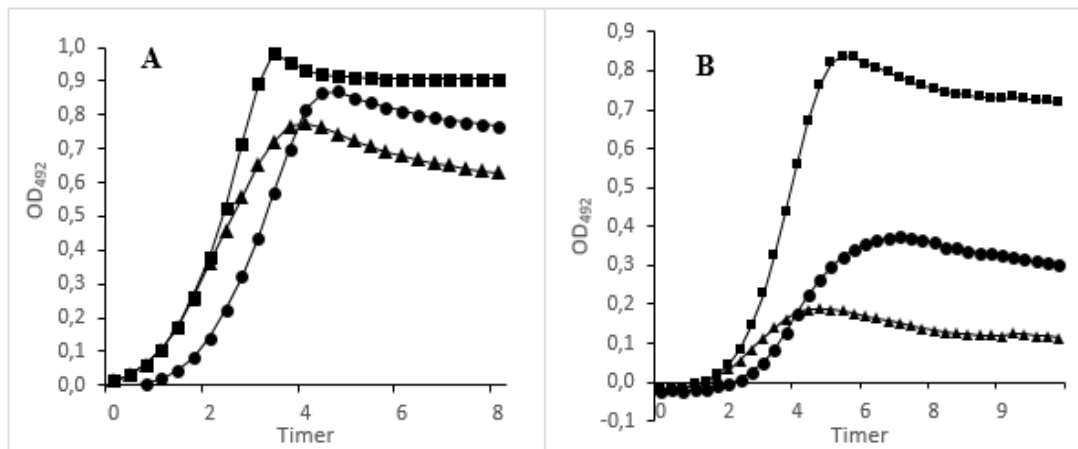
Figur 4.5 Veksthastighet for SPH165 tilsatt 0,2 μM av peptidene ComS*, S4 og S6. Bakteriekulturer av SPH165 ($P_{comX}::p_{bp2x}$) ble ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ induisert med peptidene ComS*, S4 og S6 i en peptidkonsentrasjon på 0,2 μM . Videre ble de inkubert ved 37 °C i en mikrotiteravleser og celletettheten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i 8 timer.

Av Figur 4.5 kan man se at SHP165 har noe høyere gjennomsnittlig veksthastighet når p_{bp2x} -uttrykk er induisert med 0,2 μM S4 sammenlignet med 0,2 μM ComS*. Indusering med S4 gir en maksimums- OD_{492} på over 1,0, mens ComS* gir OD_{492} under 1,0 for. SPH165 induisert med peptid S6 vokser opp til en lavere maksimum OD_{492} på omtrent 0,8, og tilnærmet lik gjennomsnittlig veksthastighet som for 0,2 μM ComS*. Den maksimale OD_{492} for en villtypestamme ligger erfaringsmessig også på ca. 1,0 når stammen dyrkes under samme betingelser (Berg, personlig kommunikasjon). Doblingstiden for kulturene ble målt ved å se hvor lang tid det tok før $\text{OD}_{492} \sim 0,2$ ble $\text{OD}_{492} \sim 0,4$. For celler dyrket med S4 lå doblingstiden på ca. 35 minutter, S6 ga doblingstid på ca. 45 minutter, mens ComS* ga doblingstid på omtrent 40 minutter. Resultatene for vekst av SPH165 induisert med alle konsentrasjoner av ComS* er vist i Figur A.3. Figur A.4 viser vekst for SPH165 dyrket med S4 og Figur A.5 dyrket med S6 for alle konsentrasjonene (Vedlegg A). For å få en mest mulig korrekt sammenligning av S4 og

med ComS*, og med tanke på at SPH165 hadde akseptabel vekst ved indusering med peptidkonsentrasjon 0,2 μM for både S4 og S6, ble depleksjonsforsøkene satt opp med en konsentrasjon på 0,2 μM av alle tre peptidene.

4.4 Depletion av PBP2x med S4 og S6

I dette forsøket var det ønskelig å finne ut om peptidene S4 og S6, kunne gi en raskere depleksjon av PBP2x enn ComS*. Stammen SPH165, som har det essensielle genet *pbp2x* bak P_{comX} ($P_{comX}::pbp2x$), ble benyttet til dette formålet. Kulturer av SPH165 ble fordyrket hver for seg med 0,2 μM av peptidene ComS*, S4 og S6. En mer detaljert protokoll er angitt i avsnitt 3.5.1. Siden PBP2x proteinet er essensielt, kan graden av depleksjon følges ved å sammenligne veksten av uindusert og indusert kultur ved OD_{492} og ved å sammenligne deres cellemorfologier. Siden det tar tid før induserpeptidet forsvinner/brytes ned, vil fraværet av PBP2x først merkes i kulturer som har vokst lenge, dvs, i de mer fortynnede kulturene. Resultatet er vist i Figur 4.6 A og B.



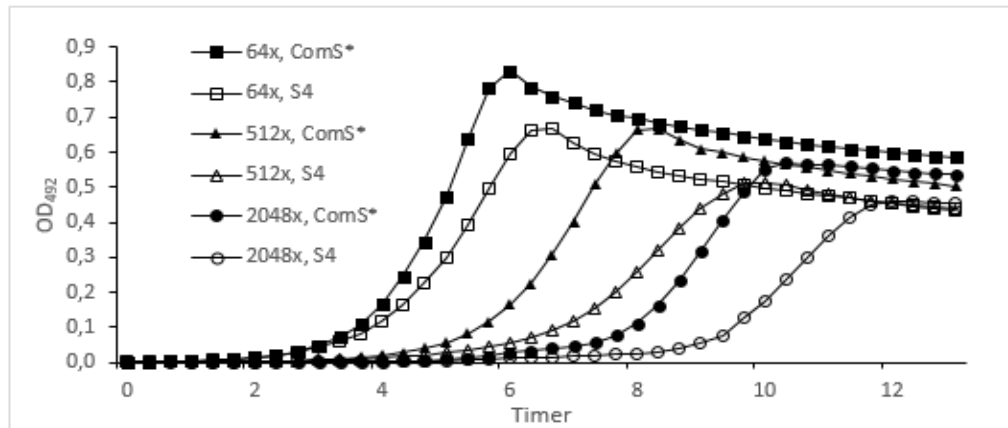
Figur 4.6 Depletion av PBP2x for celler fordyrket med forskjellige peptider. Fra en $OD_{550} \sim 0,05$ ble bakteriekulturer av SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$) fordyrket hver for seg med ComS*, S4 og S6 i en peptidkonsentrasjon på 0,2 μM . Etter fordyrking ble de fra $OD_{550} \sim 0,05$ 2-foldsfortynnet i parallelle fortynningsrekker med og uten peptid. Videre ble fortynningrekkeene inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$ i en mikrotiterplateavleser og celledettheten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 20 timer. Figur 4.6 A viser vekstkurver i et utdrag på 8 timer for celler 4x fortynnet. Figur 4.6 B viser vekstkurver i et utdrag på 10 timer for celler 32x fortynnet. Svarte firkanter (■) indikerer vekst for celler fordyrket med 0,2 μM ComS*, svarte trekanter (▲) indikerer vekst for celler fordyrket med 0,2 μM S4 og svarte rundinger (●) indikerer vekst for celler fordyrket med 0,2 μM S6. Tegnforklaringen gjelder både Figur A og B.

Figur 4.6 viser veksten ved OD₄₉₂ ved 4x fortynnede (A) og 32x fortynnede kultur (B). Man kan allerede ved 4x fortynnet kultur (Figur 4.6A) se at SPH165 fordyrket med S4 eller S6 viser tegn på veksthemming på grunn av PBP2x-depletion. Mens SPH165 fordyrket med ComS* vokser til en maksimums-OD₄₉₂ på ca. 1,0, vokser SPH165 fordyrket med S4 til en maksimums-OD₄₉₂ på 0,75 og for S6 like under 0,9. Man kan også se at veksten for SPH165 fordyrket med S6 kommer senere i gang enn for celler fordyrket med ComS* eller S4. Doblings tiden (tiden det tar før OD₄₉₂ ~ 0,2 blir OD₄₉₂ ~ 0,4) er for celler fordyrket med 0,2 µM ComS* og S4 ca. 35 minutter, mens for celler fordyrket med S6 er den ca. 40 minutter. Ved 32x fortynnet kultur (Figur 4.6B) kan man se at S4 gir veldig lav vekst som stopper ved en OD₄₉₂ på under 0,2. S6 gir også lav vekst som stopper ved OD₄₉₂ ~ 0,4, men ikke så lav som ved fordyrking med S4. Celler ved 32x fortynnet SPH165 fordyrket med ComS* har også begynt å deplete ved denne fortynningen, men har fortsatt god vekst til OD₄₉₂ ~ 0,8. For en fullstendig oversikt over depletionresultatene for alle fortynningene og deres kontrollkurver, henvises det til Vedlegg A og Figur A.6 – A.11. Figur A.6 (ComS*), A.8 (S4) og A.10 (S6) (vedlegg A) viser SPH165 fordyrket hver for seg med 0,2 µM peptid ComS*, S4 og S6, depletet over en 2-folds fortynningsrekke til og med 2048x fortynnet. Indusert kontroll er vist i figur A.7 (ComS*), A.9 (S4) og A.11 (S6), vedlegg A. Oppsummert av figur 4.3 A og B, A.6, A.8 og A.10 ser man at veksten ved OD₄₉₂ reduseres raskere for S4 og S6 enn for ComS*. Oppsummert gir S4 den hurtigste depletionen.

4.5 Depletion av PBP2b med S4

For å se om en depletion av det essensielle genet *pbp2b* gikk raskere ved fordyrking med et annet peptid enn ComS*, ble en depletion ved fordyrking med 0,2 µM S4 satt opp. På bakgrunn av resultatene fra depletionen av PBP2x (avsnitt 4.4 og Figur 4.6), hvor fordyrking med S4 førte til en raskere depletion enn fordyrking med S6, ble det valgt å gå videre med S4. Som vist i Figur 4.7 går depletionen av proteinet PBP2b i SPH158-celler (*P_{comX}::pbp2b*) fordyrket i 0,2 µM S4 noe raskere enn ved fordyrking i 0,2 µM ComS*. Allerede ved 64x fortynning går veksten av S4-kulturen noe saktere enn den tilsvarende ComS*-kulturen. Mens SPH158 kulturen som ble fordyrket i 0,2 µM ComS* nådde en maksimal OD₄₉₂ ~ 0,8, var maksimal OD₄₉₂ for kulturen som ble fordyrket med S4 rundt 0,6. Ved 512x og 2048x fortynnet kultur ser man at celler fordyrket med S4 har betydelig lavere veksthastighet enn celler fordyrket med ComS*. Det betyr at depleksjonen av PBP2b har gått fortere i celler fordyrket med S4 peptidet. Figur A.12 viser en fullstendig oversikt over vekst i OD₄₉₂ ved depletion av SPH158 fordyrket

med 0,2 μM ComS*, mens Figur A.13 viser induisert kontroll. Depletion av SPH158 fordyrket med 0,2 μM S4 er vist i Figur A.14 og induisert kontroll er vist i Figur A.15.



Figur 4.7 Depletion av PBP2b for celler fordyrket med 0,2 μM ComS* eller S4. Ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ ble bakteriekulturer av SPH158 ($P_{\text{comx}}::\text{pbp2b}$) fordyrket hver for seg i 0,2 μM ComS* og 0,2 μM S4. Videre ble kulturene satt opp i parallelle 2-folds forfynningsrekker med (0,2 μM) og uten induerende peptid. Kulturene ble så overført til en 96-brønners plate og inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$ i en mikrotiterplateleser og celletettheten (OD_{492}) ble avlest hvert 10 minutt i ca. 13 timer.

Tabell 4.2 gir en oversikt over doblingstiden til kulturer av SPH158 som er fordyrket med enten 0,2 μM ComS* eller S4, og fortynnet henholdsvis 64, 512 eller 2048 ganger i forhold til utgangskulturen. Dobblingstiden er tiden det tar fra cellene har en $\text{OD}_{492} \sim 0,2$ til $\text{OD}_{492} \sim 0,4$. Av Tabell 4.2 kan man se at celler fordyrket med 0,2 μM S4 har 10 minutter lengre doblingstid enn celler fordyrket med 0,2 μM ComS* i kulturer som er fortynnet 64x. I 512x og 2048x fortynnete kulturer er forskjellen 15 minutter.

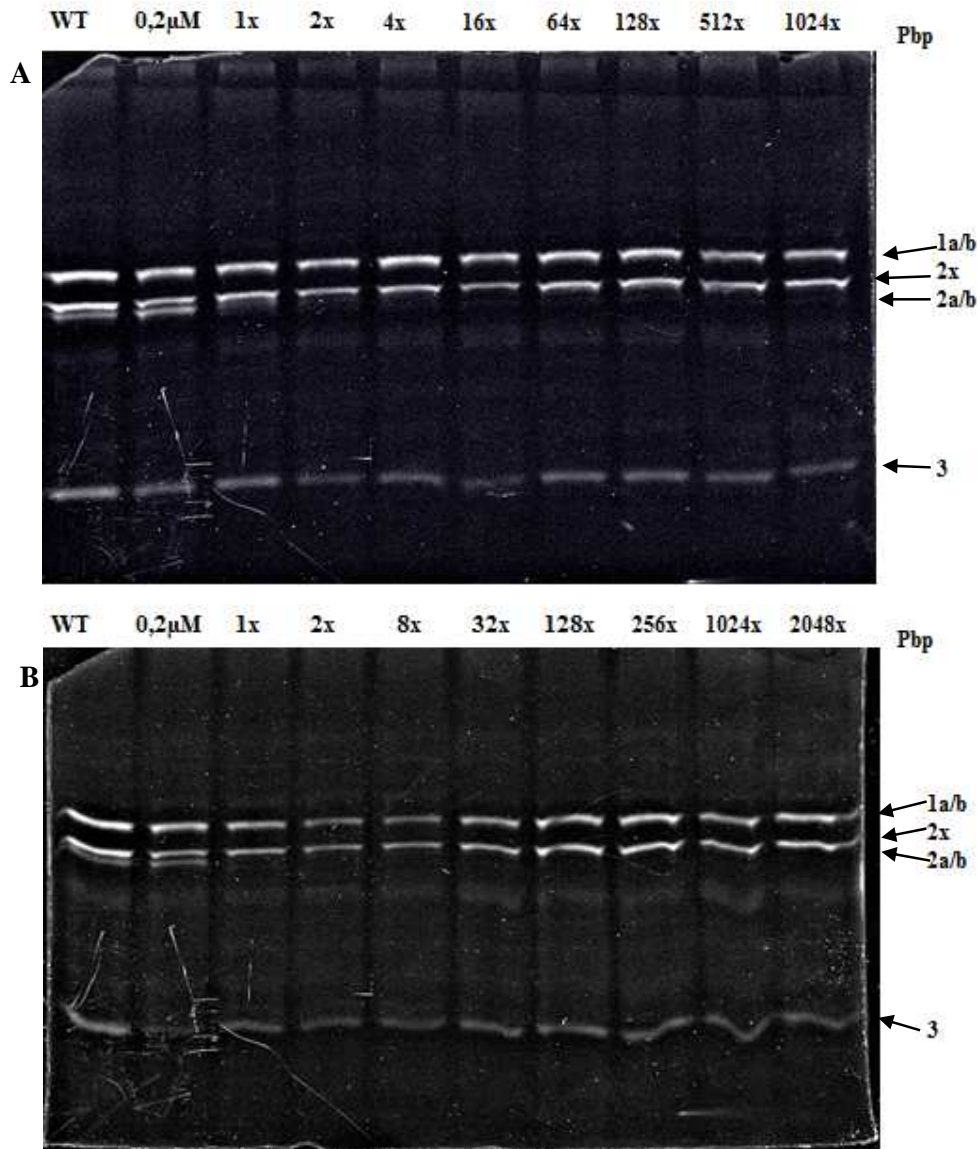
Tabell 4.2 Oversikt over doblingstid for SPH158 ($P_{\text{comx}}::\text{pbp2b}$) ved ulike cellefortynninger fordyrket med 0,2 μM ComS* eller S4.

Kultur (SPH158) fordyrket med 0,2 μM peptid	Dobblingstid
64x fortynnet fordyrket med ComS*	~ 40 minutter
64x fortynnet fordyrket med S4	~ 50 minutter
512x fortynnet fordyrket med ComS*	~ 50 minutter
512x fortynnet fordyrket med S4	~ 65 minutter
2048x fortynnet fordyrket med ComS*	~ 55 minutter
2048x fortynnet fordyrket i S4	~ 70 minutter

Oppsummert ser man at depletionen av PBP2x i celler som ble fordyrket med 0,2 μM S4 er tydelig raskere enn depletionen av PBP2x i celler som ble fordyrket med 0,2 μM ComS*. I tillegg depleter celler fordyrket med 0,2 μM S4 PBP2x noe raskere enn celler fordyrket med samme peptidkonsentrasjon av S6. S4 peptidet gir raskere deplektion enn ComS* også når *pbp2b* er målgenet, selv om forskjellen mellom S4 og ComS* er sterkere for PBP2x enn for PBP2b.

4.6 Visualisering av PBP2b-deplektion ved SDS-PAGE Bocillin-gel

For å vise deplektion av PBP2b på en annen måte enn ved måling av vekst, ble det satt opp SDS-PAGE Bocillin-gel som beskrevet i avsnitt 3.6.1. Ved å merke de penicillinbindende proteinene med det fluorescerende penicillin V-derivatet Bocillin FL, kan proteinene visualiseres etter SDS-PAGE (Zhao et al. 1999). Figur 4.8 A og B viser resultatet av Bocillin FL-merkingen. SDS-PAGE gelene viser fluoriserende bånd som representerer PBPer med ulike molekylvekt. Panel A) viser deplektion av PBP2b i SPH158 kulturer fordyrket med 0,2 μM ComS*, mens panel B) viser PBP2b deplektion i SPH158 kulturer fordyrket med 0,2 μM S4. I Figur 4.8 A og B kan man se et tydelig bånd som tilsvarende den forventede posisjonen til PBP2b i kolonnene merket WT og 0,2 μM . PBP2b og PBP2a vandrer veldig likt i en SDS-PAGE, og av figuren ser man at det ikke ble oppnådd noen tydelig separasjon av PBP2a og PBP2b. Styrken på PBP2b/PBP2a båndene hos villtypen RH1 (WT), og hos SPH158 stammen induisert med 0,2 μM ComS* eller S4, er omtrent lik. Dette viser at en peptidkonsentrasjon på 0,2 μM ComS* og S4 er en egnet konsentrasjon å bruke for å inducere PBP2b til tilnærmet villtype-nivå. Videre viser Figur 4.8 A og B at fra og med 2x fortynnet kultur svekkes PBP2b/PBP2a båndene. Siden PBP2a ikke er under kontroll av P_{comX} promoteren, må svekkelsen skyldes deplektion av PBP2b. Fra 16x til og med 128x fortynnet kultur var PBP2b båndene veldig svake, og ved 512x og 1024x fortynning kan man ikke lenger se båndene. Siden mengden av de øvrige PBPer skal være uforandret i prøvene tyder den observerte variasjonen i båndstyrken på at mindre prøvemateriale må ha blitt påsatt i noen av brønnene i SDS-PAGE gelen.



Figur 4.8 Effekt av depletion av PBP2b for celler fordyrket med 0,2 μM ComS* (A) eller S4 (B) vist i SDS-PAGE Bocillin-gel. En depletion av SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$) med fordyrking med 0,2 μM ComS* (A) og en fordyrket med 0,2 μM S4 (B) ble satt opp og inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$. Ved $\text{OD}_{492} \sim 0,21$ ble cellene høstet og lysert ved lytA. Videre ble cellene farget med Bocillin FL og preparert med SDS-samplebuffer. Deretter ble 15 μl preparat loadet på SDS-PAGE gelen. Båndene ble visualisert i gel-doc (Typhoon 8600). I første brønn finner man båndene for villtypen RH1 (WT) (A) og B)), mens i andre brønn finner man båndene for SPH158 induisert med 0,2 μM ComS* (A) og 0,2 μM S4 (B). Videre er figurene merket med celfortynninger for de uinduserte kulturene. Det øverste båndet er PBP1a/b og bånd nummer to er PBP2x (oven i fra). PBP2a/b er bånd nummer 3 og det siste båndet er PBP3. Gelene er visualisert i Typhoon 8600 Variable mode Imager (Molecular dynamics) med innstillingene – Acquisition mode: Fluorescence. Fluorescein Filter: 526 sp. 880V. Pixel size: 100. Laser: Green 523 nm.

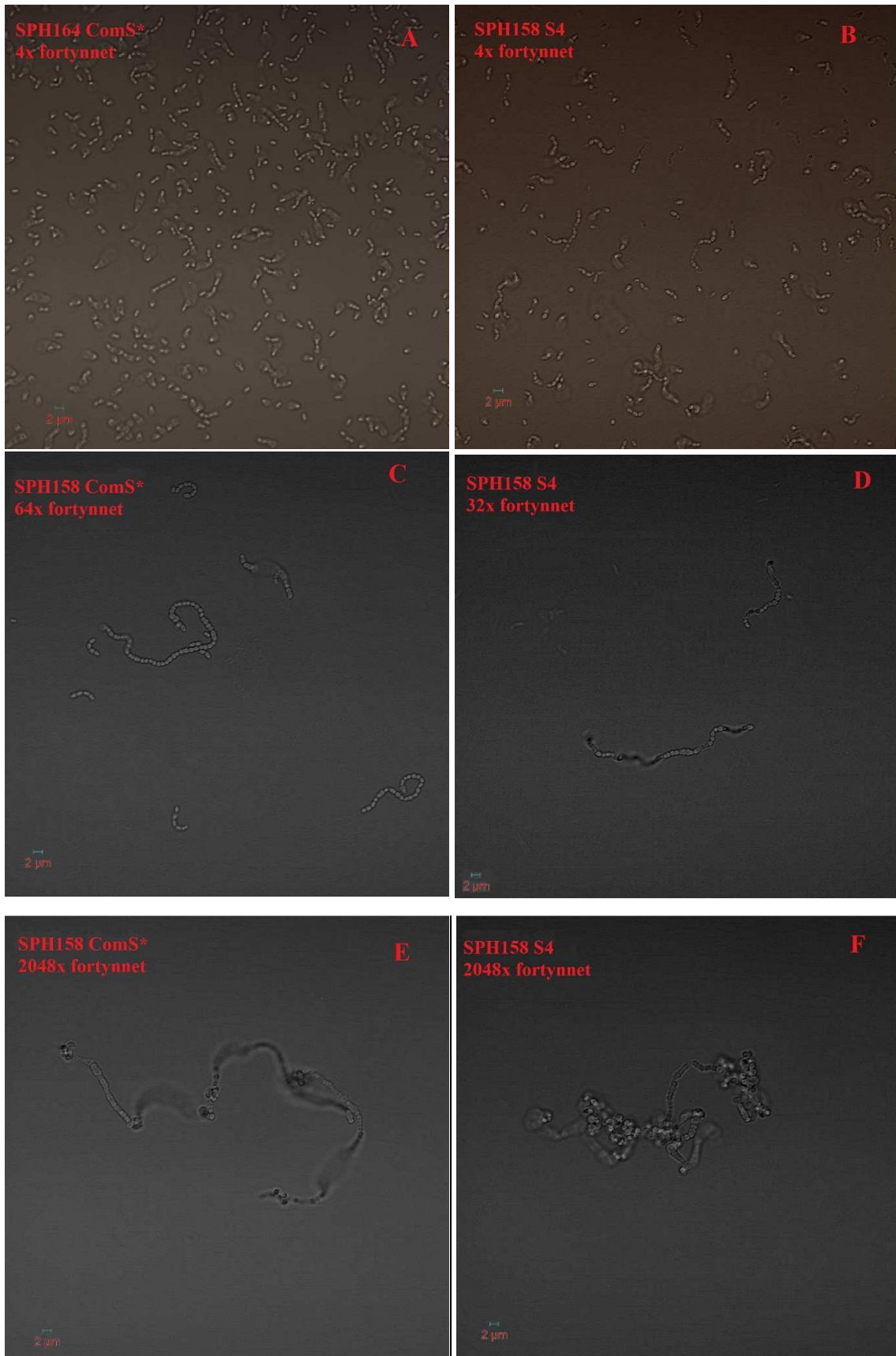
4.7 Mikroskopering av PBP2b-depletede pneumokokker

I et nylig publisert arbeid fra vårt laboratorium ble det vist at ved depleksjon av PBP2b får cellene en helt karakteristisk morfologi der cellene danner lange kjeder (Berg et al. 2013). For å se om denne fenotypen oppstår før veksthemming kan registreres (se Figur 4.7), ble det foretatt mikroskopering av PBP2b-depletede SPH158-kulturer fordyrket med 0,2 μM ComS* eller 0,2 μM S4. Cellene ble høstet når OD_{550} var omtrent 0,3. Som en kontroll ble morfologien til celler dyrket i nærvær av 0,2 μM ComS* eller 0,2 μM S4 først undersøkt. Begge så normale ut; man kan se noen korte kjeder blant ellers ovale diplokokker (Figur 4.9A og 4.9B). Morfologien for celler dyrket med 0,2 μM ComS* og 0,2 μM S4 er altså den samme.



Figur 4.9 Mikroskopbilder av SPH158-celler dyrket med 0,2 μM ComS* eller 0,2 μM S4. I SPH158 celler er transkripsjonen av *pbp2b*-genet drevet av P_{comX} -promoteren. Hensikten med forsøket var å se om 0,2 μM ComS* (A) og 0,2 μM S4 (B) gir en ekspresjon av PBP2b proteinet som gir normal cellemorfologi. Cellene ble høstet ved $\text{OD}_{550} \sim 0,3$.

Kulturen som var fordyrket med 0,2 μM ComS* hadde omtrent samme morfologi som kontrollstammen (dyrket med en konstant konsentrasjon på 0,2 μM ComS* i mediet) helt til 4x fortynningstrinnet. Man kunne kanskje se noen få lengre kjeder i den depletede kulturen enn i kontrollen (Figur 4.9A versus 4.10A). I et tilsvarende forsøk hvor SPH158 cellene var fordyrket med S4 peptidet kunne det helt klart registreres noe mer kjededannelse ved 4x fortynningstrinnet (Figur 4.9B versus 4.10B). Frem til 4x fortynning viste celler fordyrket med S4 samme morfologi som for induerte celler.



Figur 4.10 Mikroskopbilder av SPH158-celler med depletion av PBP2b. Bilder tatt i lysmikroskop av depletion av SPH158 (*P_{comX}::p_{bbp2b}*) fordyrket med 0,2 μ M ComS* (A) og 0,2 μ M S4 (B). **A)** Viser uinduserte celler av SPH158 fordyrket med 0,2 μ M ComS* ved 4x fortynnede celler, mens **B)** viser uinduserte celler av samme stamme og fortynning, men fordyrket med 0,2 μ M S4. **C)** viser uinduserte celler fordyrket med 0,2 μ M ComS* ved 64x fortynnet kultur. **D)** viser uinduserte celler fordyrket med 0,2 μ M S4 ved 32x fortynnet kultur. **E)** viser celler fordyrket med 0,2 μ M ComS* ved 2048x fortynnet kultur, mens **F)** viser celler fordyrket med 0,2 μ M S4 også ved 2048x fortynnet kultur. Alle cellene er høstet ved OD₅₅₀~0,3.

For celler fordyrket med 0,2 μ M ComS* begynte cellene i 8x, 16x og 32x fortynnede kulturer å vokse i noe lengre kjeder enn tidligere, med noe økning i lengden på kjedene for hvert fortynningstrinn. Ved 32x fortynnet kultur var prøven veldig heterogen. Den bestod av enkeltceller, diplokokker, korte og lange kjeder. I tillegg begynte noen celler å miste sin ovale fasong og bli mer runde i formen. Økende kjedelengde ble også observert i depleterede kulturer fordyrket med S4 peptidet, men cellene begynte å vise tendenser til å få en rundere form allerede i fortynningstrinn 16x. Ved 32x-fortynningstrinnet var kjedene til S4-cellene like lange som ved 16x-fortynningstrinnet, men cellene hadde fått en enda rundere form og noen celler hadde begynt å bli flattrykete. Dette er vist i Figur 4.10D. For 64x fortynnede celler fordyrket med ComS* ble endringer i formen enda tydeligere, og ved 128x fortynnet kultur var cellene tydelig linseformede. Noen lange kjeder forekom innimellom. I ComS*-kulturer som var fortynnet 512x i forhold til utgangskulturen var kjedene like lange som for 128x og 256x fortynnede kulturer, men cellene var tydelig mindre og rundere. Med økende fortynning gjennomgikk kulturene som var fordyrket med 0,2 μ M S4 en gradvis endring i cellemorfologien fra ovale diplokokker eller svært korte kjeder til svært lange kjeder av linseformede celler. I 2048x fortynnede kulturer var kjedene svært lange, små og flattrykete. Ved dette fortynningstrinnet var kjedene i S4-kulturene gjennomsnittlig noe lengre enn cellene i ComS*-kulturen, noe som førte til at de ofte kveilet seg sammen i nøster (Figur 4.10E og F). Tilhørende vekstkurver for hele PBP2b-depletionforsøket finnes i vedlegg A.12 (foryrket med ComS*) og A.14 (foryrket med S4).

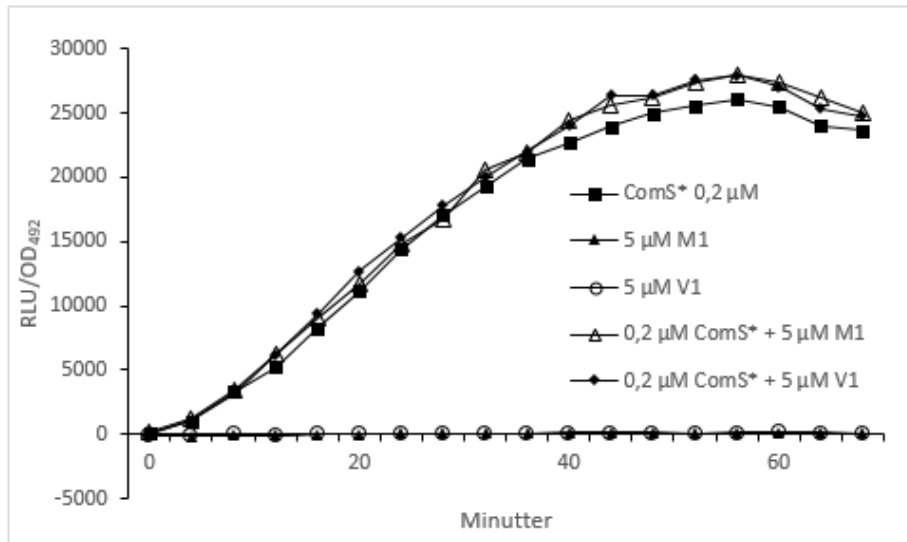
Oppsummert ser man at celler fordyrket med 0,2 μ M S4 danner kjeder på litt lavere fortynningstrinn enn celler fordyrket med 0,2 μ M ComS*. Man ser også at depletionen med S4 gir endret cellemorfologi i form av små runde eller flattrykete celler 1-2 fortynningstrinn tidligere enn ComS*-depletionen. I samsvar med vekstkurvene i Figur 4.7 viser mikroskoperingen at PBP2b-depletion inntreer noe tidligere i celler fordyrket med 0,2 μ M S4 enn celler fordyrket med 0,2 μ M ComS*. Ved de siste fortynningene (1024x og 2048x) danner

cellene fordyrket med 0,2 μM S4 tydelig lengre kjeder enn celler fordyrket med 0,2 μM ComS*. De lange kveilede kjedene er en sterkere fenotype, noe som totalt sett indikerer en sterkere depleksjon.

4.8 Inhiberingsforsøk

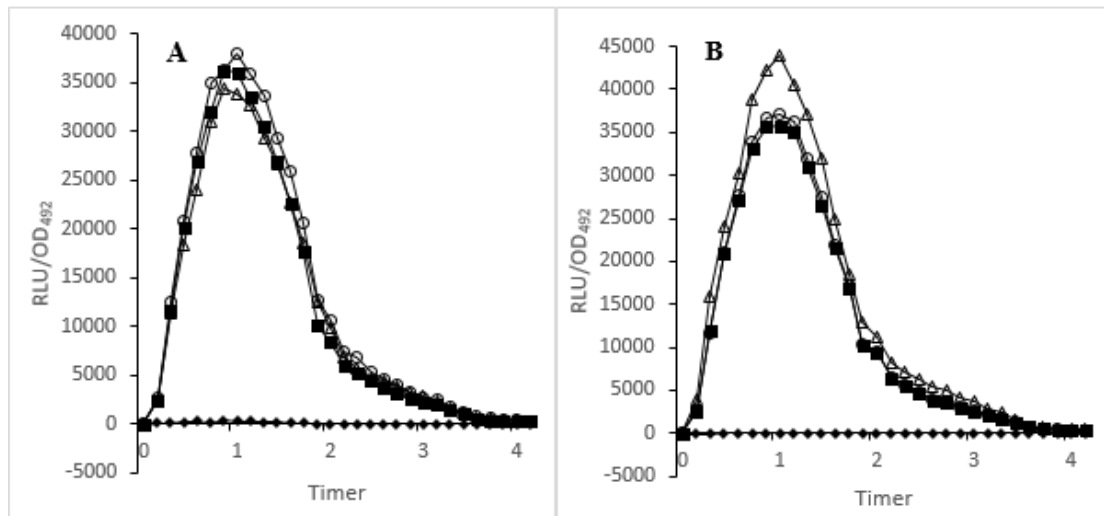
Som nevnt i avsnitt 4.2 var ikke alle de syntetiske peptidene aktive med hensyn på å indusere transkripsjon av luciferasegenet. Dette gjorde det interessant å undersøke om de inaktive peptidene kunne ha en inhiberende effekt dersom de ble tilsatt til en kultur hvor luciferaseekspresjonen allerede hadde blitt induert med et aktivt peptid. Tanken var at de inaktive peptidene kanskje binder til det samme allosteriske sete på ComR som de aktive peptidene, men uten at de er i stand til å indusere den konformasjonsendringen i ComR som aktiverer denne transkripsjonsfaktoren. Dersom dette var tilfellet, ville det inaktive peptidet konkurrere med det aktive peptidet om binding til og aktivering av ComR. På den måten vil inaktive peptider kunne brukes til effektivt å «slå av» transkripsjon fra P_{comX} . Derfor var det interessant å undersøke denne idéen nærmere.

Diverse kombinasjoner av peptider, konsentrasjoner og tidspunkt for induksjon ble derfor satt opp (se protokollen som er beskrevet i avsnitt 3.8). For å se om et peptid ga inhibering, ble luciferaseaktiviteten målt som i avsnitt 4.2. Som vist i Figur 4.1 viste peptidene M1 og V1 ingen induserende aktivitet. Derfor ble 5 μM av disse tilsatt fra starten av forsøket sammen med 0,2 μM ComS* for å se om de kunne konkurrere med ComS* om bindesetet på ComR og slik inhibere transkripsjon av *luc* fra P_{comX} . Figur 4.11 viser at luciferaseaktiviteten for celler induert med både ComS* og M1, eller ComS* og V1, er omtrent den samme som for celler induert med kun ComS* (positiv kontroll). Følgelig er hverken M1 eller V1 i stand til å konkurrere med ComS*.



Figur 4.11 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon for SPH130 induert med ulike kombinasjoner av peptidene ComS*, M1 og V1. Ved OD₅₅₀ ~ 0,05 ble kultur av SPH130 OD₅₅₀ ~ 0,05 induert med peptidene 0,2 µM ComS*, 5 µM M1, 5 µM V1, 0,2 µM ComS* og 5 µM M1 eller 0,2 µM ComS* og 5 µM V1. Videre ble de induerte kulturene overført til en 96-brønners mikrotiterplate og inkubert ved 37 °C i en mikrotiterplateavleser. Bioluminescensen (RLU) ble målt automatisk hvert 4 minutt i totalt 68 minutter. RLU ble deretter delt for veksten målt i OD₄₉₂.

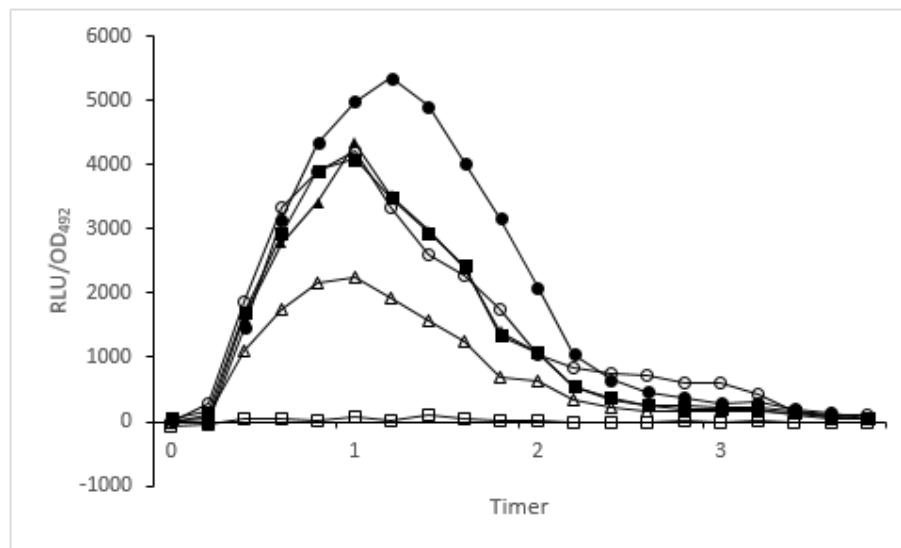
Som man kan se av Figur 4.3 er heller ikke S12-peptidet i stand til å induere transkripsjonen av luciferasegenet. Derfor ble det satt opp et forsøk hvor 0,2 µM ComS* ble tilsatt fra start sammen med varierte konsentrasjoner av S12. I tillegg ble det satt opp et forsøk hvor det fra start ble tilsatt 0,2 µM ComS*, mens S12 ble tilsatt ca. 15 minutter senere. Resultatene viste at en blanding av ComS* (0,2 µM) og S12 (0,2 eller 20 µM) ikke påvirker luciferase-aktiviteten (Figur 4.12A og B). Den lille økningen i luciferaseaktivitet som ble observert i kulturen som ble induert med 0,2 µM ComS* fra start og tilsatt 20 µM S12 etter ca. 15 minutter kan være tilfeldig (Figur 4.12B). Resultatene av hele forsøket er vist i Figur A.16 (S12 tilsatt fra start) og A.17 (tilsatt etter ca. 30 minutter). Av disse figurene kan man se at ingen av de benyttede konsentrasjonene inhiberer induseraktiviteten til ComS*.



Figur 4.12 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon for SPH130 induisert med ulike kombinasjoner av peptidene ComS* og S12. **A)** viser luciferaseaktivitet (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 induisert med 0,2 μM ComS* eller 1 μM S12. To av kulturene hvor 0,2 μM ComS* er induisert, ble også 0,2 μM eller 20 μM S12 fra start. **B)** viser luciferaseaktivitet (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 induisert med samme peptider og samme peptidkonsentrasjoner som i figur A), men der 0,2 μM ComS* er tilsatt S12, er S12 tilsatt etter ca. 15 minutter. Kulturene er inkubert ved 37 °C i en mikrotiterplateavleser og luminescensen (RLU) ble lest av hvert 8 minutt i ca. 4 timer. RLU ble delt på OD₄₉₂. Svarte firkanter (■) viser aktivitet for celler inkubert med 0,2 μM ComS* og svarte diamanter (◆) viser vekst for celler induisert med 1 μM S12. Hvite rundinger (○) indikerer aktivitet for celler som er induisert med 0,2 μM ComS* og 0,2 μM S12 fra start (A) eller etter ca. 15 minutter (B), mens hvite trekantene (△) viser aktivitet for celler som er induisert med 0,2 μM ComS* og 20 μM S12 fra start (A) eller etter ca. 15 minutter (B).

Som et siste forsøk på å finne et inhiberende peptid ble det syntetisert et peptid med samme aminosyresekvens som ComS*, bortsett fra at den siste aminosyren ble utelatt. Siden den siste C-terminale aminosyren i ComS* er tidligere vist å være essensiell for biologisk aktivitet (Fontaine et al. 2013) var tanken at denne versjonen av ComS* bare skulle binde og blokkere bindingsstedet uten å inducere transkripsjon av luciferase reporter genet. Dette peptidet ble kalt S15 (Tabell 2.2 og Tabell 4.1). Det ble først undersøkt om S15 kunne inducere transkripsjon av *luc* i SPH130 stammen. Resultatet av dette forsøket er vist i Figur 4.13. Man kan se at induksjon av SPH130 med 0,2 μM ComS* gir et luminescenssignal på noe over 5000 RLU, mens induksjon med samme konsentrasjon av S15 ikke gir noen signal. Som forventet er altså S15 inaktivt. Videre ble det satt opp et forsøk hvor flere parallelle SPH130 kulturer ble induisert med 0,2 μM ComS* fra starten av. To av brønnene ble i tillegg tilsatt S15 fra start (5 og 20 μM), mens to ble tilsatt S15 (5 og 20 μM) etter 30 minutter. Som Figur 4.13 viser, kan man se at det

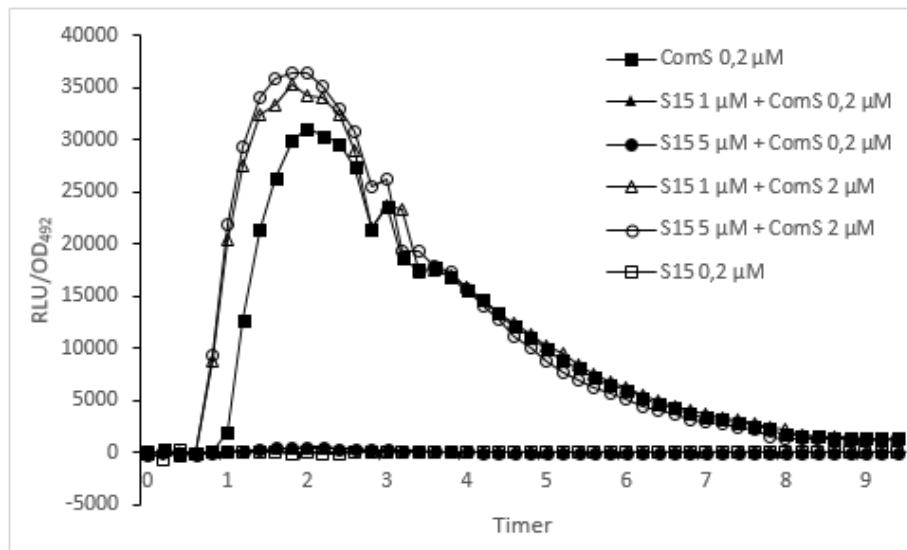
kun var antydning til inhibering når 5 μM S15 ble tilsatt 30 minutter etter starten på forsøket. Når 20 μM S15 ble tilsatt fra start førte det derimot til en økning av luciferaseaktiviteten. Som nevnt tidligere induserer S15 alene ikke luciferaseaktivitet (Figur 4.13). Av ukjente årsaker gav dette forsøket vesentlig lavere luciferaseaktivitet for den positive kontrollen (0,2 μM ComS*) enn tidligere forsøk. Det er allikevel sannsynlig at de innbyrdes forholdene mellom de ulike luciferaseaktivitetene i dette forsøket er korrekte.



Figur 4.13 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon for SPH130 induisert med ulike kombinasjoner av peptidene ComS* og S15. Figuren viser luciferaseaktivitet (RLU) delt på vekst (OD₄₉₂) for SPH130 ved OD₅₅₀ ~ 0,05 induisert med 0,2 μM ComS*, 1 μM S15, 0,2 μM ComS* og 5 μM S12 eller 0,2 μM ComS* og 20 μM S15 fra start eller etter ca. 30 minutter. Kulturene er inkubert ved 37 °C i en mikrotiterplateavleser og luminescensen ble lest av hvert 6 minutt i ca. 4 timer. Svarte firkanter (■) viser aktivitet for celler inkubert med 0,2 μM ComS*, hvite firkanter (□) viser vekst for celler induisert med 5 μM S15. Trekanter indikerer aktivitet for celler induisert med 0,2 μM ComS* og 5 μM S5 hvor svarte (▲) viser aktivitet ved S15 tilsatt fra start, mens hvite (△) viser aktivitet ved S15 tilsatt etter ca. 30 minutter. Rundinger indikerer aktivitet for celler induisert med 0,2 μM ComS* og 20 μM S15 hvor svarte (●) viser aktivitet ved S15 tilsatt fra start, mens hvite (○) viser aktivitet ved S15 tilsatt etter ca. 30 minutter.

I neste forsøk ble to brønner med SPH130 kultur tilsatt 1 μM S15, mens to brønner ble tilsatt 5 μM S15. Etter ca. 40 minutter ble hvert av de to parene tilsatt henholdsvis 0,2 og 2 μM ComS*. Kontrollene besto av SPH130-celler der 0,2 μM ComS* ble tilsatt etter ca. 40 minutter, og av SPH130-celler der 1 μM S15 ble tilsatt etter ca. 40 minutter. Resultatet av forsøket er vist i

Figur 4.14. Her kan man se at det ikke ble induisert noen luciferaseaktivitet der 0,2 μM ComS* ble tilsatt SPH130 kulturer forbehandlet med 1 og 5 μM S15. Dette tyder på at S15 i dette tilfellet klarer å blokkere for ComS*. I motsetning til dette ble det induisert full luciferaseaktivitete når 2 μM ComS* ble tilsatt SPH130 kulturer forbehandlet med 1 og 5 μM S15.



Figur 4.14 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) som viser luciferaseekspressjon for SPH130 induisert med ulike kombinasjoner av peptidene S15 og ComS*. Figuren viser luciferaseaktivitet (RLU) for SPH130 ved OD₅₅₀ ~ 0,05 induisert med 0,2 μM ComS*, 1 μM S15, 1 μM S15 og etter 40 minutter 0,2 μM ComS*, 5 μM S15 og 0,2 ComS* etter 40 minutter, 1 μM S15 og 2 μM ComS* etter 40 minutter, 5 μM S15 og 2 μM ComS* etter 40 minutter. Videre ble kulturene inkubert ved 37 °C i en mikrotiterplateavleser og luminescensen ble lest av hvert 12 minutt i 10 timer. Luminescensen ble delt på veksten (RLU/OD₄₉₂)

4.9 Etablering av Zn²⁺-depletionsystemet i *S. pneumoniae*

For å sammenligne vårt ComRS-ekspressjon/depletionsystem med Zn²⁺-systemet, som er et annet ekspressjon/depletionsystem som brukes mye i *S. pneumoniae*, ble en mutant kalt KW12 konstruert. Denne mutanten ble laget ved først å transformere inn et plasmid kalt pJWV101 (Veening et al. 2014) i *bga*-lokuset i utgangstammen RH425. Dette plasmidet inneholder promoteren for Zn²⁺-systemet kalt P_{czd}. Seleksjonen ble gjort med tetracyclin (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) siden pJWV101 bærer et tetracyclinresistensgen. Denne transformasjonen ga noen kolonier på negativ skål. Dette kan skyldes lav konsentrasjon av tetracyclin. Screening av koloniene på positiv skål viste allikevel en vellykket transformasjon av pJWV101. I neste trinn ble Januskassetten transformert inn bak P_{czd}-promoteren (P_{czd}::Janus). Negativ skål hadde ingen

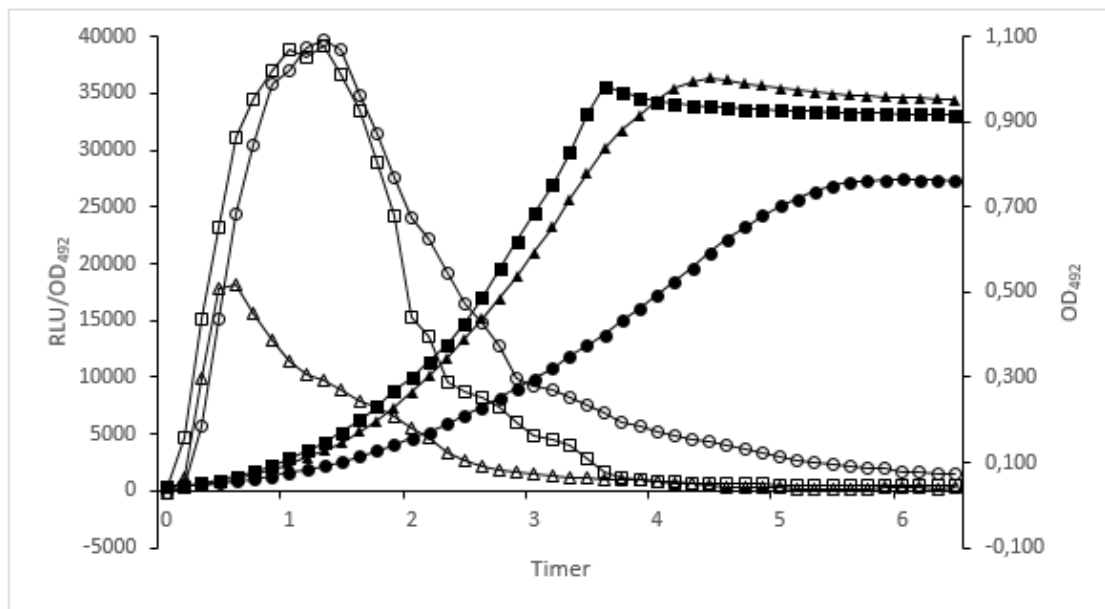
kolonier, og videre undersøkelse av koloniene på positiv skål viste at transformasjonen var vellykket. Til slutt ble Januskassetten byttet ut med *luc*-genet, som dermed kom under kontroll av P_{czcD} -promoterens ($P_{czcD}::luc$). Med et slikt oppsett skulle tilsetning av Zn^{2+} i vekstmediet indusere transkripsjon av *luc*-genet.

4.10 Aktiviteten til P_{czcD} -promoterens

Hensikten her var å undersøke om det nyetablerte ComRS-systemet fungerer like bra eller bedre enn det veletablerte Zn^{2+} -systemet med hensyn på maksimaluttrykk og overuttrykk av genet det regulerer. Det ville også være interessant å undersøke hvor raskt ekspresjonen av målprotein avtar etter at induseren er fjernet fra mediet, og hvor raskt cellene responderer på tilsetning av induser. Aktiviteten av P_{czcD} -promoter ble testet ved hjelp av *luc*-reportergen på tilsvarende måte som tidligere beskrevet for ComRS-systemet. Som nevnt i avsnittet over (4.9) kalles stammen som inneholder Zn^{2+} -systemet KW12. KW12 og SPH130 ble dyrket i C-medium til $OD_{550} \sim 0,3$. SPH130 (fra $OD_{550} \sim 0,05$) ble indusert med konsentrasjoner av ComS* som varierte fra 0,02 μM til 4 μM . En konsentrasjon på 2 μM har tidligere blitt funnet å gi maksimalt uttrykk av *luc* genet i SPH130 stammen (Berg et al. 2011). KW12 (fra $OD_{550} \sim 0,05$) ble indusert med $ZnCl_2$ i konsentrasjoner som varierte fra 0,01 mM til 0,2 mM. I tillegg ble 2 mM $ZnCl_2$ benyttet som den høyeste konsentrasjonen. Valget av disse konsentrasjonene er basert på en publikasjon fra Kuipers et al. (2007). Mer detaljert protokoll finnes i avsnitt 3.13.

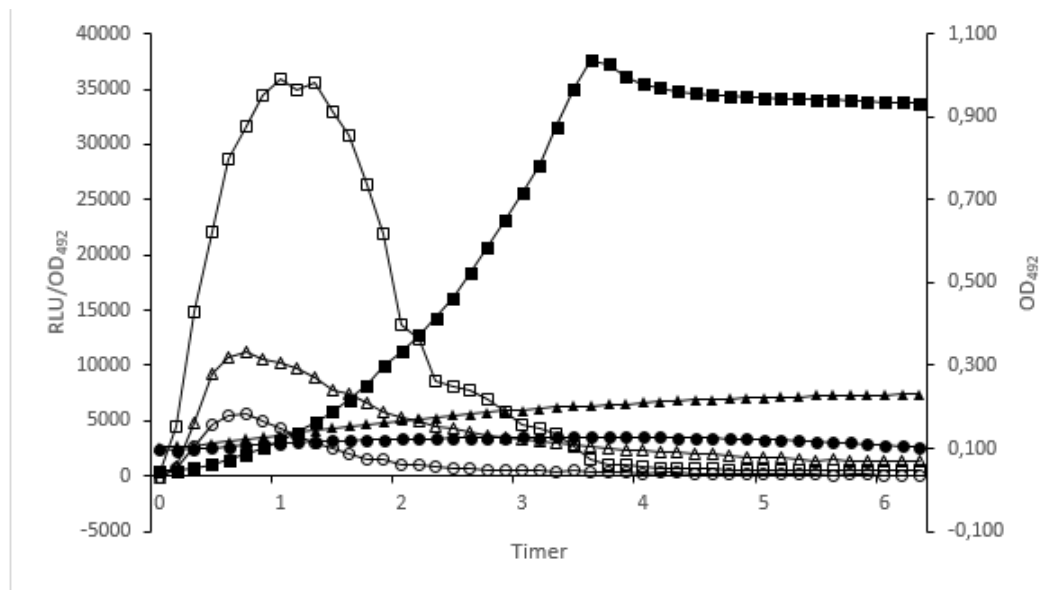
Figur 4.15 viser KW12 stammen indusert med de $ZnCl_2$ -konsentrasjonene som ga til høyest uttrykk av luciferase fra P_{czcD} promoterens og deres vekst (OD_{492}). Den viser også luciferaseaktivitet og vekst for SPH130, som ble indusert med 4 μM ComS* for å presse systemet maksimalt og gi høyeste mulig transkripsjon fra P_{comX} . KW12 indusert med 0,175 mM $ZnCl_2$ gir en RLU/ OD_{492} på rundt 18000. Cellene i kulturen har en doblingstid på ca. 40 minutter, og når en maksimal tetthet rundt $OD_{492} \sim 1$. Dobblingstiden er beregnet som tiden det tar fra $OD_{492} \sim 0,2$ til $OD_{492} \sim 0,4$. Sammenlignet med SPH130 kommer veksten for KW12 i gang noe senere. SPH130 indusert med 4 μM ComS* gav en maksimumsaktivitet på ca. 40 000 RLU/ OD_{492} . I likhet med KW12 var doblingstiden på ca. 40 minutter og veksten nådde toppen rundt $OD_{492} \sim 1$. Figur 4.15 viser også vekst og aktivitet for KW12 fordyrket og inkubert i C-medium uten tilsatt Zn^{2+} . Resultatet viser at luciferaseaktiviteten for KW12 dyrket i såkalt Zn^{2+} -fritt medium er mye høyere enn for KW12 dyrket i vanlig C-medium, men omtrent identisk

med aktiviteten målt i SPH130 kulturen induert med 4 μM ComS*. Resultatet viser også at KW12 kulturen som har vært fordyrket i C-medium uten tilsatt Zn^{2+} vokser betydelig saktere enn de andre. Cellene har en doblingstid på omtrent 65 minutter, og veksten når stasjonær fase ved $\text{OD}_{492} \sim 0,76$. Man kan også se av Figur 4.15 at luciferaseaktiviteten avtar noe senere for KW12 enn for SPH130. Figur A.18 viser aktivitet og Figur A.19 (Vedlegg A) viser vekst ved OD_{492} for KW12 fordyrket med vanlig C-medium. Figur A.20 (Vedlegg A) viser aktivitet og Figur A.21 vekst ved OD_{492} for KW12 fordyrket og satt til videre vekst i C-medium uten Zn^{2+} . Alle resultatene for luciferaseaktivitet finnes i Figur A.22 og vekst i Figur A.23 for SPH130 (Vedlegg A).



Figur 4.15 Vekst og bioluminescens ($\text{RLU}/\text{OD}_{492}$) for KW15 stammen induert med ZnCl_2 og SPH130 stammen induert med ComS*. KW15 ($P_{czd}::luc$) ble fordyrket i vanlig C-medium og Zn^{2+} -fritt C-medium, mens SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble fordyrket i C-medium. Ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ ble KW15 cellene induert med ZnCl_2 , mens SPH130 cellene ble induert med ComS*. Kulturene ble inkubert i en mikrotiterplateavleser hvor luminescensen (RLU) og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 8 minutt i 7 timer. Aktiviteten til luciferase reporterprotein er angitt som relative luminescence units (RLU) delt på OD_{492} . Hvide symboler indikerer luciferaseaktivitet hvor: rundinger (○) viser luciferaseaktivitet for KW12 dyrket i Zn^{2+} -fritt C-medium og induert med 0,15 mM ZnCl_2 , trekant (△) viser luciferaseaktivitet for KW12 dyrket i vanlig C-medium og induert med 0,175 mM ZnCl_2 og firkanter (□) viser luciferaseaktivitet for SPH130 induert med 4 μM ComS*. Svarte symboler viser vekst angitt som OD_{492} hvor: rundinger (●) viser vekst av KW12 dyrket i Zn^{2+} -fritt C-medium og induert med 0,15 mM ZnCl_2 , trekant (▲) viser vekst av KW12 dyrket i vanlig C-medium og induert med 0,175 mM ZnCl_2 og firkanter (■) viser vekst av SPH130 induert med 4 μM ComS*.

For å se hvordan KW12 celler ble påvirket av høye konsentrasjoner av Zn^{2+} -induser, ble kulturer dyrket i C-medium eller såkalt Zn^{2+} -fritt medium induisert med 2 mM $ZnCl_2$. SPH130 celler dyrket i C-medium og induisert med 4 μM ComS* ble brukt som kontroll. Induseren ble tilsatt kulturene ved $OD_{550} \sim 0,05$. Resultatene av dette forsøket viste at veksten av KW12 kulturene (uavhengig av vekstmedium) er svært lav (Figur 4.16). Luciferaseaktiviteten for disse kulturene er også lav med et maksimum på omtrent 11 000 RLU/ OD_{492} . Vekst og luciferaseaktivitet for SPH130 er omtrent den samme som før (Figur 4.15). Oppsummert ser man at ekspresjonen av luciferase i KW12 celler dyrket in Zn^{2+} -fritt C-medium og induisert med 0,15 mM $ZnCl_2$ er omtrent den samme som i SPH130 celler dyrket i vanlig C-medium og induisert med 4 μM ComS*. Videre er det tydelig at $ZnCl_2$ i høye konsentrasjoner hemmer vekst og dermed aktivitet. På grunn av den dårlige veksten for KW12 ved dyrking i Zn^{2+} -fritt C-medium (Figur 4.15) ble videre forsøk gjort ved dyrking i vanlig C-medium.



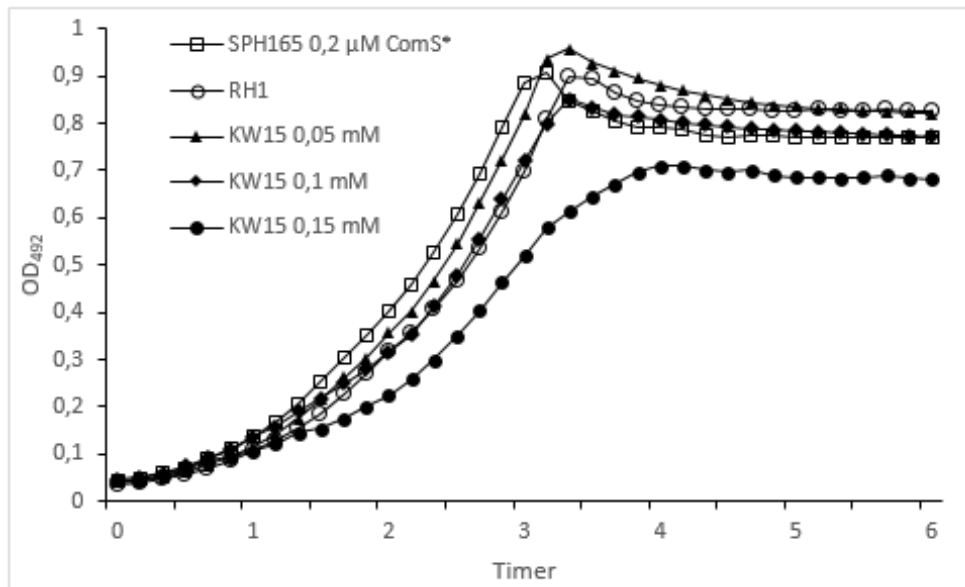
Figur 4.16 Vekst og bioluminescens for KW15 induisert med $ZnCl_2$ og for SPH130 induisert med ComS*. KW15 ($P_{czcD}::luc$) ble fordyrket i vanlig C-medium og Zn^{2+} -fritt C-medium, mens SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble fordyrket med 4 μM ComS*. Etter fordyrking ble celler av KW15 ved $OD_{550} \sim 0,05$ induisert med $ZnCl_2$ og SPH130 ble induisert med ComS*. Kulturene ble inkubert i en mikrotiterplateavleser og luminescensen (RLU) og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 8 minutt i 6 timer. Luminescensen ble delt på veksten (RLU/OD_{492}). Hvit tegnssetting indikere luciferaseaktivitet (RLU) hvor rundinger (○) viser for KW12 dyrket i Zn^{2+} -fritt C-medium og induisert med 2 mM $ZnCl_2$, trekanter (△) viser for KW12 dyrket i vanlig C-medium og induisert med 2 mM $ZnCl_2$ og firkanter (□) viser for SPH130 induisert med 4 μM ComS*. Svart tegnssetting indikerer vekst (OD_{492}) hvor rundinger (●) viser for KW12 dyrket i Zn^{2+} -fritt C-medium og induisert med 2 mM $ZnCl_2$, trekanter (▲) viser for KW12 dyrket i vanlig C-medium og induisert med 2 mM $ZnCl_2$ og firkanter (■) viser for SPH130 induisert med 4 μM ComS*.

4.11 Bruk av Zn^{2+} -systemet for å uttrykke et essensielt gen (*pbp2x*)

For å sammenligne hvor godt egnet Zn^{2+} -systemet er til depletion av et essensielt gen i forhold til ComRS-systemet ble det konstruert en ny mutant. Denne mutanten har *pbp2x* bak promoteren P_{czcD} og er kalt KW14 ($P_{czcD}::pbp2x$). I mutanten KW14 finnes det native *pbp2x*-genet fortsatt i genomet. Derfor ble det native genet byttet ut med en Janus-kassett ($\Delta pbp2x_{wt}::janus$). Dette dannet mutanten KW15. Den eneste kopien av *pbp2x*-genet i denne mutantens genom er kopien som er satt inn bak P_{czcD} -promoteren. Ved transformasjonen hvor villtypegenet for *pbp2x* ble slått ut, var konsentrasjonen av $ZnCl_2$ i skålene 0,15 mM. Dette er konsentrasjonen som Peters (2013) har valgt å bruke i sine forsøk hvor PBP2x har blitt depletet med Zn^{2+} -systemet. For mer detaljert protokoll, se punkt 3.14. For sammenligning med ComRS-systemet ble SPH165 brukt, siden denne stammen har *pbp2x*-genet bak P_{comX} -promoteren.

4.11.1 Vekstforsøk for KW15

Før PBP2x i KW15 kunne depleteres måtte veksthastigheten til stammen ved ulike konsentrasjoner av $ZnCl_2$ undersøkes. For å få en god sammenligning med ComRS-systemet burde veksthastigheten være tilnærmet lik veksthastigheten for SPH165 indusert med 0,2 μM ComS*. Denne konsentrasjonen av ComS* har vært brukt som standard i forsøk der ComRS-system har vært benyttet til depletion av utvalgte målgener. Et vekstforsøk ble derfor satt opp hvor KW15 ble indusert med konsentrasjoner av $ZnCl_2$ i et spenn av konsentrasjoner mellom 0,05 mM og 0,2 mM. Som kontroller ble veksthastigheten for SPH165 indusert med 0,2 μM ComS* og en villtypestamme (RH1) undersøkt. Mer detaljert protokoll finnes i avsnitt 3.14. Veksthastigheten for et KW15 indusert med et utvalg av konsentrasjoner samt kontrollene SPH165 og RH1 er vist i Figur 4.17. Vekstkurver for SPH130 indusert med øvrige konsentrasjoner av ComS* er vist i Figur A.23. Vekst av KW15 indusert med de øvrige konsentrasjonene er vist i Figur A.24 (Vedlegg A).

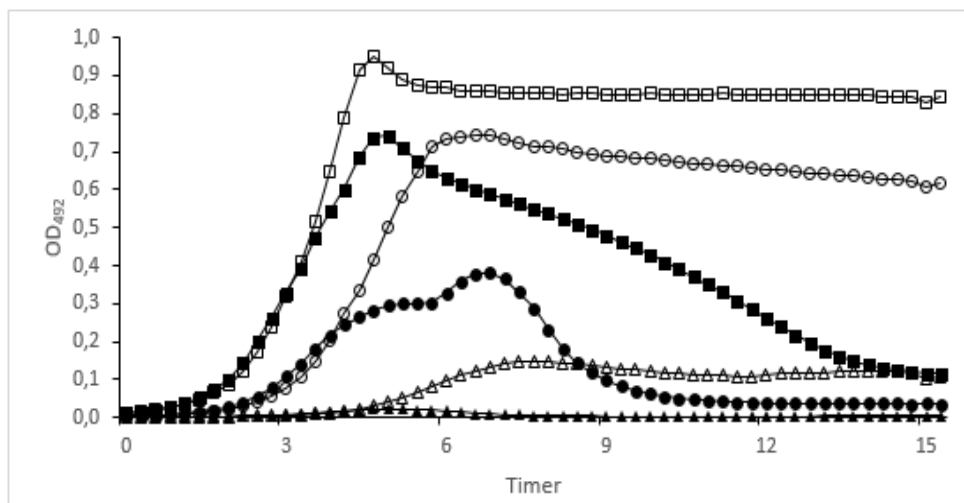


Figur 4.17 Veksthastighet for KW15 sammenlignet med SPH165 og RH1 målt i OD₄₉₂. Stammene KW15 (*P_{c_{zGD}::p_{bp2x}}*), SPH165 (*P_{c_{omX}::p_{bp2x}}*) og RH1 (villtype) ble løst i C-medium til OD₅₅₀ ~ 0,05. KW15 ble fordyrket i konsentrasjonene 0,05 mM, 0,1 mM og 0,15 mM ZnCl₂, mens SPH165 ble fordyrket i 0,2 µM ComS*. Når OD₅₅₀ ~ 0,3 ble kulturene løst til OD₅₅₀ ~ 0,05 og induert med tilsvarende induser i samme konsentrasjon som ved fordyrking. Kulturene ble så overført til en mikrotiterplate og inkubert i en mikrotiterplateleser ved 37 °C. OD₄₉₂ ble automatisk avlest hvert 10 minutt i 6 timer.

Resultatene viser at 0,05 og 0,1 mM ZnCl₂ gir KW15 en veksthastighet som er svært lik veksthastigheten til RH1 og SPH165 induert med 0,2 µM ComS* (Figur 4.17). Med andre ord så påvirker ikke disse ZnCl₂ konsentrasjonene veksten av KW15 stammen i nevneverdig grad, og begge konsentrasjonene gir normal cellevekst. Induksjon av KW15 med 0,15 mM ZnCl₂ derimot ga både lavere veksthastighet og maksimum-OD₄₉₂ (Figur 4.17). Denne sistnevnte konsentrasjonen er mye brukt av forskere som har anvendt Zn²⁺-systemet i sin forskning. Konsentrasjonen som ble valgt for videre forsøk og induksjon av KW15 var 0,1 mM. Denne mengden Zn²⁺-induser gir normal vekst og er svært nær den som oftest benyttes i litteraturen.

4.11.2 Depletion av PBP2x i Zn²⁺- og ComRS-systemet – en sammenligning

For å gjøre en direkte sammenligning av egenskapene til Zn²⁺- og ComRS-systemet ble det satt opp depletionsforsøk med PBP2x som målprotein. Hensikten var å finne ut hvilket system som egner seg best til studier av essensielle proteiner. Stammene som ble brukt var SPH165 (*P_{comX}::p_{bbp2x}*) og KW15 (*P_{czcD}::p_{bbp2x}*). SPH165 ble fordyrket med 0,2 µM ComS*, mens KW15 ble fordyrket med 0,1 mM ZnCl₂. Videre ble det satt opp 2-folds fortynningsrekker for begge kulturene med en start-OD₅₅₀ ~ 0,05. Protokollen for forsøket finnes i avsnitt 3.15. Et utvalg av resultatene er vist i Figur 4.18.



Figur 4.18 Vekst ved depletering av PBP2x i SPH165 og KW15. SPH165 (*P_{comX}::p_{bbp2x}*) og KW15 (*P_{czcD}::p_{bbp2x}*) ble løst til OD₅₅₀ ~ 0,05. Videre ble SPH165 fordyrket med 0,2 µM ComS* og KW15 ble fordyrket med 0,1 mM ZnCl₂. Når OD₅₅₀ ~ 0,3 ble cellene løst til OD₅₅₀ ~ 0,05 og de ble satt opp i 2-folds fortynningsrekker. Videre ble hver av fortynningsrekkene overført til en 96-brønners mikrotiterplate i to paralleller. En parallell av hver kultur ble tilsatt induser til samme konsentrasjon tilsvarende som ved fordyrking. Kulturene ble så inkubert i en mikrotiterplateleser hvor OD₄₉₂ ble avlest automatisk hvert 15 minutt i 15 timer. Svart tegning viser vekst for KW15 hvor firkanter (■) viser vekst for 4x fortynnede celler, rundinger (●) viser for 16x fortynnede celler og trekkanter (▲) viser for 256x fortynnede celler. Hvit tegning viser vekst for SPH165 hvor firkanter (□) viser vekst for 4x fortynnede celler, rundinger (○) viser for 16x fortynnede celler og trekkanter (△) viser for 256x fortynnede celler.

Av Figur 4.18 kan man se at SPH165 ved 4x fortynnet kultur har en maksimums-OD₄₉₂ nær 1. Til sammenligning kan man se at KW15 ved samme cellefortynning oppnår en maksimums-OD₄₉₂ rundt 0,75. Altså har veksten av KW15 cellene begynt å bli påvirket av mangelen på PBP2x allerede ved 4x fortynnet kultur. Ved 16x fortynnet kultur stopper veksten av KW15 cellene opp allerede ved OD₄₉₂ ~ 0,4, mens det i 256x fortynnet kultur nesten ikke har vært påviselig vekst. Det er helt tydelig at deplesjonen av PBP2x går saktere i ComRS-systemet (Figur 4.18). En iøynefallende forskjell mellom de to systemene er at KW15 cellene i motsetning til SPH165 cellene begynner å lysere omtrent umiddelbart etter at de har stoppet å vokse. Grunnen til dette er at KW15 er *lytA*⁺, mens SPH165 cellene er *lytA*⁻. SPH165 celler vil altså ikke produsere autolysinet LytA, og følgelig lyserer de ikke etter at de har stoppet å vokse. Villtype pneumokokker begynner å lysere etter at de har stått 5-6 timer i stasjonær fase, mens celler som er depletet for PBP2x begynner å lysere med en gang veksten stopper opp (Berg, personlig kommunikasjon). Induserte kontroller for begge stammene hadde tilnærmet samme veksthastighet ved alle fortynningene (se vedlegg A). Resultatene av alle cellefortynningene for både induserte og uinduserte celler av SPH165 og KW15, se vedlegg A.25 (uindusert SPH165), A.26 (indusert SPH165), A.27 (uindusert KW15) og A.28 (indusert KW15).

5. Diskusjon

5.1 Ulike peptider induserer til ulik luciferaseaktivitet

Som Figur 4.1 viser, ser man at indusering med ulike peptider gir ulik luciferaseaktivitet for SPH130 ($P_{comX}::luc$). Peptidene S1 og S2 (Tabell 4.1) har tilnærmet lik aktivitet som ComS* ved høye konsentrasjoner (1 μ M). Det mest interessante resultatet i dette forsøket var at luciferaseaktiviteten induisert med 1 μ M S4, synker noe raskere enn for celler induisert med 1 μ M ComS*. S4 har en alanin i posisjon 2, mens ComS* har prolin. Alanin er en enkel aminosyre med en metylgruppe som funksjonell gruppe, mens prolin danner en ringstruktur som gir en knekk på peptidkjeden. Det er ikke kjent hvorfor depletionen tar så lang tid etter at pneumokkene er vasket og overført til et ComS*-fritt medium. En mulighet er at ComS* har en struktur som gjør peptidet lite nedbrytbart av intracellulære proteaser. I teorien er det mulig at ComS* er helt resistent mot intracellulære proteaser, og at den intracellulære konsentrasjonen av peptidet tynnes sakte ut hver gang cellene deler seg. Det kan også tenkes at affiniteten mellom peptidliganden og ComR er svært høy, og at dette komplekset dissosierer sakte. En tredje mulighet er at cytoplasmembranen fungerer som et depot for ComS*. Peptidet er svært hydrofobt, og kan derfor tenkes å være løselig i membranen. Siden S4 er tungt løselig og konsentrasjonen av det løste peptidet følgelig er noe usikker, kan det tenkes at konsentrasjonen av S4 ikke var 1 μ M, men betydelig lavere. I så fall ville luciferaseaktiviteten synke raskere fordi det var mindre av peptidet til å begynne med. Det er også mulig at S4 kløyves lettere av intracellulære proteaser eller har lavere affinitet for ComR og dermed trengs i høyere konsentrasjoner for å gi samme transkripsjonsnivå. I det minste viser resultatene at aminosyren i posisjon 2 kan ha en effekt på hvor hurtig virkningen av induserpeptidet avtar i en kultur. Av Figur 4.1 kunne man også se at peptidene M1 og V1 ikke induiserte til luciferaseaktivitet. Aminosyresekvensen for disse peptidene var svært ulik sekvensen til ComS* (Tabell 4.1). Som nevnt innledningsvis (se avsnitt 1.5.2) er aminosyrene i posisjon 19, 20 og 24 i det native ComS peptidet viktig for binding til bindingssetet i ComR (Fontaine et al. 2013). For de syntetiske peptidene tilsvarer det posisjon 3,4 og 8. M1 er lik ComS* kun ved en leucin i 8. posisjon, mens V1 er lik i posisjon 2 og 4. Resultatene i dette arbeidet bekrefter at bindingen mellom ComR og liganden er spesifikk, uten at spesifisiteten synes å være veldig høy. Selv om M1 og V1 er inaktive kan det likevel tenkes at disse peptidene binder til ComR, uten at det fører til konformasjonsendringen som er nødvendig for at ComR skal binde P_{comX} promoteren og indusere transkripsjonen av luciferasegenet.

Som vist i Figur 4.2, induserer S1 til høy luciferaseaktivitet ved lavere konsentrasjoner enn ComS* og de andre peptidene. S1 skiller seg fra ComS* kun ved at det hos ComS* finnes en fenylalanin i posisjon 4, mens det hos S1 er en tyrosin i tilsvarende posisjon. Disse aromatiske aminosyrene har en veldig lik struktur, men på grunn en ekstra hydroksylgruppe regnes tyrosin for å være blant de polare aminosyrene mens fenylalanin er upolar. Dette kan bidra til økt løselighet hos S1 og/eller mindre hydrofobe interaksjoner med f. eks. cytoplasmamembranen. Økt løselighet og mindre hydrofobisitet kan bidra til at den effektive konsentrasjonen av S1 er høyere enn for ComS*, og at det dermed trengs mindre av S1 for å gi samme aktivitet. En annen grunn til S1's høye induseraktivitet kan være at hydroksylgruppen hos tyrosin gjøre at S1 binder sterkere til bindingsetet i ComR.

Resultatene som er angitt Figur 4.1 indikerer at sammenlignet med ComS*, avtar luciferaseaktiviteten raskere når S4 brukes som induser. Den samme tendensen kan man også se for peptid S9 i Figur 4.3 og S6 i Figur 4.4. Som tidligere nevnt var S9 vanskelig å løse opp i NaAc, og konsentrasjonen av det oppløste peptidet blir derfor usikker. S6 derimot løste seg lett opp og ble derfor valgt til videre undersøkelser. Figur 4.4 viser at aktiviteten for celler indusert med 0,2 μM S4 eller S6 synker raskere enn for celler indusert med 0,2 μM ComS*. S6 er en blanding mellom S1 og S4. Som S1 har S6 tyrosin i posisjon 4, og lik S4 har den alanin i posisjon 2. Tanken med å syntetisere S6 peptidet var at man kunne få en rask nedgang i luciferaseaktivitet ved lave peptidkonsentrasjoner. Resultatene (Figur 4.4) viser at induser-aktiviteten til S6, S4 og ComS* er lik ved en peptidkonsentrasjon på 0,2 μM , samtidig som nedgangen i luciferaseaktivitet er raskest for S6. Siden 0,02 μM S1 ga en topp på rundt 27 000 RLU/OD₄₉₂ (Figur 4.2), mens en ti ganger høyere konsentrasjon (0,2 μM) av S6 gav rundt 34 000 RLU/OD₄₉₂ (Figur 4.4), tyder dette på at utskifting av begge aminosyrene samtidig har hatt en negativ innvirkning på induseringseffektiviteten til S6 peptidet.

5.2 Indusering med peptidene S4 og S6 fører til raskere depletion

For å undersøke om den raske nedgangen i luciferaseaktivitet for S4 og S6 kunne gi en raskere depletion, ble et forsøk satt opp hvor PBP2x skulle depletes. I forkant av forsøket ble et vekstforsøk satt opp for SPH165-stammen ($P_{comX}::p_{bp2x}$). Dette var for å bekrefte at veksten med 0,2 μM S4 og S6 er noenlunde lik veksten med 0,2 μM ComS*. Det er denne konsentrasjonen av ComS* som har blitt brukt i tidligere depletionsstudier (Berg et al. 2013). Figur 4.5 viser resultatet av vekstforsøket. Av figuren kan man se at celler indusert med S6 stoppet å vokse ved en litt lavere celletetthet enn de andre. Dette kan stemme med at

Luciferaseaktiviteten ved indusering med S6 avtok noe fortere enn for celler induert med ComS* og S4 (Figur 4.4). Forskjellene i vekst er ikke veldig store og doblingstiden ved eksponentiell vekst er omtrent den samme for alle tre induserpeptidene.

Ved en depletion lages det som nevnt i metoddelen (se avsnitt 3.5) en fortynningsrekke av celler. Det tilsettes ikke induserpeptid til mediet disse cellene dyrkes i. Det betyr at den eneste tilgangen cellene har til induser er den resterende mengden peptid som fortsatt finnes inne i eller på overflaten av cellene. Disse peptidene vil etter hvert degraderes eller tynnes ut ved celledeling. Siden dette tar tid må cellene vokse en god stund før de har kvittet seg med induserpeptidet. Følgelig vil ekspresjonen av det essensielle målgenet avta langsomt til det kritiske punktet er nådd hvor cellene ikke lenger klarer å vokse. Det kritiske punktet kan variere fra et essensielt protein til et annet. Det kommer an på hvor mye av proteinet som trengs i pneumokokkcellen. Som man kan se av figur 4.6 A og B, synker PBP2x mengden i SPH165-cellene ($P_{comX}::pbp2x$) raskere i kulturene som var fordyrket med 0,2 μM S4 og S6, enn kontrollkulturen som var fordyrket med 0,2 μM ComS*. Dette betyr trolig at S4 og S6 degraderes raskere i cellen enn ComS*. I så fall tyder det på at aminosyrekomposisjonen er avgjørende for hvor raskt peptidet degraderes. Ut fra resultatene i avsnitt 4.4 kan man anta at alanin i posisjon 2 gjør peptidet lettere å degradere i cellen, uten at aminosyren påvirker peptidets evne til å induere transkripsjonen av reportergen merkelig. For S6 kan tyrosinet i fjerde posisjon gjøre at peptidet blir noe vanskeligere å degradere sammenlignet med S4, samtidig som alaninet i posisjon to fører til at det er lettere degraderbart. Det finnes også andre mulige forklaringer på resultatene som er beskrevet i Figur 4.6. Som sagt ovenfor er S4 lite løselig. Derfor er det tenkelig at konsentrasjonen i bruksløsningen er vesentlig lavere enn 0,2 μM , og at det er grunnet til at det degraderes eller forsvinner fortere. Hvis denne forklaringen er riktig, betyr det at S4 er en bedre induser enn ComS*. Siden S6 peptidet i motsetning til ComS* har tyrosin i posisjon 4 er det mer hydrofilt en ComS*. Det kan derfor tenkes at det interagerer mindre med med cytoplasma membranen, og vaskes bedre ut fra overflaten av cellene før disse overføres til induserfritt medium.

En depletion av det essensielle gen *pbp2b* ble også satt opp med stammen SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$). På grunn av at S4 ga den raskeste deplesjonen av peptidene S4 og S6 i forsøket med PBP2x-depletion, ble S4 valgt til depletion av PBP2b. Det er tidligere vist at depletionen av PBP2b går vesentlig senere enn deplesjonen av PBP2x (Berg et al. 2013). Dette er også tydelig i forsøket hvor forskjellen mellom PBP2b-depletete celler fordyrket med S4 eller ComS* er undersøkt (Figur 4.7). Likevel viser Figur 4.7 at ved fordyrking med 0,2 μM S4 skjer

depletionen raskere enn ved fordyrking med 0,2 μM ComS*. Dette forsterker teorien om at S4 degraderes raskere i cellen enn ComS*. Alternativt skyldes det en forskjell i konsentrasjon - som diskutert ovenfor. Ser man på SDS-PAGE Bocillin FL-gelen (Figur 4.8 A) kan man se svake bånd av PBP2b for celler indusert med ComS* ved lave cellefortynninger (til og med ca. 128x). Det kan man ikke for celler indusert med S4 (Figur 4.8 B). Dette tyder også på at en depletion ved fordyrking med S4 skjer raskere.

For å se om den typiske fenotypeforandringen som skjer ved deplesjon av PBP2b kunne påvises tidligere enn vekstinhivering, ble det foretatt mikroskopering av SPH158 celler fordyrket i 0,2 μM S4 og ComS*. Figur 4.9 viser kontrollceller dyrket med 0,2 μM ComS* (A) og 0,2 μM S4 (B). Disse kulturene viser lik vekst og morfologi. Dette viser at SPH158 celler indusert med S4 gir normal vekst og celledmorfologi. Som mikroskopibildene viser (Figur 4.10), kan man ikke med sikkerhet si at morfologien begynte å forandre seg tidligere hos S4-fordyrkede SPH158 celler. Det man kunne se derimot, var at S4-fordyrkede celler tidligere viste en sterkere fenotype enn ComS*-fordyrkede celler. Når cellene først begynte å deplete, viste celler fordyrket med S4 større og raskere endringer i morfologien enn celler fordyrket med ComS*. *S. pneumoniae* celler har en ovoid cellefasong. Når PBP2b depletes skjer det et gradvis tap av den elliptiske fasongen og cellene blir først runde og tilslutt nærmest linseformede (Berg et al. 2013). Denne runde til linseformede celleformen oppsto raskere hos PBP2b-depletede SPH158-celler fordyrket med S4. De runde cellene begynte allerede å dukke opp ved 16x fortynnede celler. Mikroskoperingen viste altså at morfologien til SPH158 celler fordyrket med 0,2 μM S4 begynte å endres allerede i den 4x fortynnede kulturen. Veksthemming derimot ble først påviselig i kulturer som var fortynnet 16x – 32x. Dette tyder på at celleveggsyntesen blir påvirket av det minkende PBP2b nivået i cellene før mangelen av PBP2b påvirker veksten når denne måles som OD₄₉₂.

5.3 Blokkering av ComS*-bindingssetet i ComR med inaktive peptider

Teorien bak inhiberingsforsøkene var at peptider som ikke er i stand til aktivere ComR og indusere transkripsjonen av reportergen (Figur 4.1 og 4.3), likevel binder til ligandbindingssetet i ComR slik som ComS*. På den måten skulle det «inaktive» peptidet konkurrere med det «aktive» peptidet om aktivering av ComR. Peptidene M1, V1 og S12 ble testet uten å vise tegn til inhibering (figur 4.11 og 4.12 A og B). Peptidene M1 og V1 er svært forskjellige fra ComS*, og binder sannsynligvis ikke til ligandbindingsetet. S12 har en positivt

ladet aminosyre (lysin) i posisjon 2. Dette er trolig årsaken til at det ikke er aktivt og heller ikke binder til ligandbindingssetet til ComR. Siden ComS* er et ganske hydrofobt peptid uten ladede aminosyrer, danner ligandbindingssetet trolig en hydrofob kløft eller lomme som ikke binder ladede peptider.

Et inaktivt peptid (S15), hvor kun den siste residuen (posisjon 8) ble fjernet, ble konstruert for å se om dette kunne binde ligandbindingssetet i ComR og blokkere for ComS*. Figur 4.13 viser at luciferaseaktiviteten er noe lavere enn den induerte kontrollen når 5 μM S15 ble tilsatt etter ca. 30 minutters vekst med 0,2 μM ComS* i mediet. Dette tyder på at S15 muligens kan konkurrere med ComS* om binding til ComR når S15 er i stort overskudd. I samme forsøk gir imidlertid andre kombinasjoner av ComS* og S15 ingen inhibering eller til og med stimulering. Tilsetning av 20 μM S15 fra start gir faktisk en tydelig økning i luciferaseaktiviteten (Figur 4.13). Disse uklare og til dels selvmotsigende resultatene gjør det vanskelig å trekke noe konklusjon med hensyn på S15's egenskaper som potensiell inhibitor. Som vist i Figur 4.13 så er S15 fullstendig inaktiv som inducer. Dette stemmer godt med det som er rapportert tidligere, nemlig at den siste residuen i peptidet er essensiell for aktiviteten (Fontaine et al. 2013).

Figur 4.14 viser luciferaseaktiviteten når S15 ble tilsatt fra start og ComS* ble tilsatt omtrent 40 minutter senere. Resultatene indikerer at S15 er i stand til å blokkere for ComS* når S15 tilsettes først og i stort overskudd. Men når mengden ComS* økes fra 0,2 til 2 μM klarer ikke S15 lenger å utkonkurrere ComS*. Disse resultatene tyder på at S15 peptidet er i stand til å binde til ligandbindingssetet, men at det binder med mye lavere affinitet enn ComS*. At tapet av leucin i posisjon 8 fører til en svakere interaksjon mellom peptidet og ComR stemmer godt med det faktum at denne aminosyren er essensiell for induseraktiviteten til ComS*.

Et problem med forsøksoppsettet vist i Figur 4.14, er at det ikke kan brukes i praksis til å «skru av» induksjonen. Håpet var å identifisere et peptid som binder sterkere til ligandbindingssetet enn ComS*. Ideen var at et slikt peptid skulle tilsettes kulturen og utkonkurrere ComS*. Dette skulle føre til en rask terminering av den ektopiske transkripsjonen fra P_{comX} -promoterens. Et slikt peptid ville ha vært et viktig verktøy som ville ha gjort depletionsstudier enklere og mer presise.

5.4 Sammenligning av egenskapene til P_{comX} og P_{czcD} - promoterene

Som beskrevet i avsnitt 4.10 og vist i Figur 4.15 kan man se at SPH130 celler (ComRS-systemet) dyrket i C-medium og induert med 4 μM ComS* har samme luciferaseaktivitet som KW12 celler (Zn^{2+} -systemet) dyrket i såkalt Zn^{2+} -fritt medium og induert med 0,15 mM ZnCl_2 . Dette betyr at P_{comX} og P_{czcD} promoterene er like effektive under disse betingelsene. Når KW12 dyrkes i vanlig C-medium derimot, er maksimum OD_{492} betydelig lavere enn ved dyrking i Zn^{2+} -fritt medium. Dette tyder på at ved jevn tilgang på Zn^{2+} , påvirker genuttrykket fra P_{czcD} og luciferaseaktiviteten negativt. Siden luciferin tilsettes etter inkubering av avlesning av luminescensen, er ikke luciferin den begrensede faktoren. En mulig hypotese kan være at ved jevn tilgang og induering med ZnCl_2 (celler dyrket i vanlig C-medium) kan proteasene allerede være skrudd på når luciferin tilsettes. Dette kan føre til at degraderingen av luciferase skjer raskere i disse cellene, og dermed gi lavere luciferaseaktivitet. Denne teorien er veldig hypotetisk. For å få bekrefte dette kan man eventuelt sette opp immunoblotting mot luciferase. En forskjell er imidlertid at det Zn^{2+} -frie mediet, som er nødvendig for å få god induksjon, fører til dårlig vekst av KW12 cellene (Figur 4.15). Som nevnt tidligere er Zn^{2+} en essensiell co-faktor for mange viktige enzymer, og mangel på Zn^{2+} vil derfor ha negative konsekvenser for cellens fysiologi og evne til å vokse (Hantke 2005). Dette ser man tydelig i Figur 4.15 hvor doblingstiden for cellene dyrket i mediet med suboptimale mengder Zn^{2+} er mye høyere enn for celler dyrket i vanlig C-medium. Samtidig viser Figur 4.16 at høye konsentrasjoner av ZnCl_2 gir veldig lav vekst. Dette betyr at ZnCl_2 i store mengder er skadelig for cellen og hemmer vekst.

5.5 Depletion med Zn^{2+} -systemet

Figur 4.18 viser resultatet av en sammenligning av depletion mellom ComRS- og Zn^{2+} -systemet. KW15 og SPH165 stammene, som henholdsvis har *pbp2x* genet bak P_{czcD} og P_{comX} -promoterene, ble brukt i dette forsøket. Resultatene viser at KW15-celler fordyrket med 0,1 mM ZnCl_2 depleteres raskere mhp. PBP2x enn SPH165 celler fordyrket med 0,2 μM ComS*. Grunnen til dette kan være at konsentrasjonen av Zn^{2+} synker fortere enn ComS* i pneumokokkcellene, etter at disse er vasket og overført til medium uten inducer. Under depletionen opplever cellene lave konsentrasjoner av Zn^{2+} . Så lenge cellene vokser, vil dette lageret trolig forbrukes ganske raskt. Det er fordi Zn^{2+} inngår som en co-faktor i mange proteiner. ComS* derimot har bare en oppgave, nemlig å induere transkripsjonen av gener som er regulert av P_{comX} -promoterene. ComS* har ingen annen funksjon i cellen, og det er høyst

usannsynlig at dette peptidet har noen negativ påvirkning på pneumokokkenes metabolisme og fysiologi. Zn^{2+} -ioner i for høye konsentrasjoner er toksisk for cellen fordi disse ionene interagerer med thiol og blokkerer essensielle reaksjoner i cellen. Bakterier har derfor lagringssystemer og eksportmekanismer som gjør at de til en viss grad kan kvitte seg med toksiske overskudd av spormetaller som for eksempel sink (Hantke 2005). Likevel må man være forsiktig med å tilsette Zn^{2+} i høye konsentrasjoner. Det er tydelig at det påvirker veksten negativt (Figur 4.16). Figur 4.18 viser at fordyrking med 0,1 mM $ZnCl_2$ virker bra til depletion. Det kan også være at fordyrking med 0,05 mM $ZnCl_2$ kunne ha vært et enda bedre alternativ, siden denne konsentrasjonen gir noe bedre vekst av KW15 cellene (Figur 4.17).

5.6 ComRS-systemet vs. Zn^{2+} -systemet

Et mål med oppgaven var å sammenligne det nyetablerte ComRS-systemet med det veletablerte Zn^{2+} -systemet i *S. pneumoniae*. Under dette arbeidet ble det vist at begge systemene gir omtrent like høyt maksimumsuttrykk ved overekspresjon. Også ved depleksjon av essensielle genprodukter fungerer begge systemene godt. En fordel med Zn^{2+} -systemet er at depleksjonen med dette system går noe fortere enn for ComRS-systemet. Dette kan spare tid og arbeid. Zn^{2+} -systemet har imidlertid også noen store ulemper i forhold til ComRS-systemet. Det må lages et spesialmedium som har et lavt innhold av Zn^{2+} -ioner for å få like godt genuttrykk som ved bruk av ComRS-systemet. Dette kan ikke være et rikt medium, men må være et syntetisk eller semisyntetisk medium der Zn^{2+} blir utelatt eller tilsatt i svært små mengder. Videre så er det ikke til å unngå at depletion med Zn^{2+} vil påvirke cellens fysiologi. Når et essensielt protein depleteres med Zn^{2+} -systemet kan man derfor aldri være helt sikker hva eventuelle fenotypiske endringer skyldes. Skyldes de mangel på målproteinene som undersøkes, mangel på Zn^{2+} , eller den additive effekten av mangelen på begge. Siden ComS* ikke er toksisk for cellene, og heller ikke påvirker cellenes fysiologi, er ComRS-systemet etter min mening bedre egnet til ekspresjon og depletionstudier i *S. pneumoniae* enn Zn^{2+} -systemet.

6. Konklusjon og videre arbeid

Følgende konklusjoner kan trekkes på grunnlag av resultatene i det foreliggende arbeidet. Enkelte av peptidene som ble undersøkt, kan i noen sammenhenger ha en fordel framfor ComS*-peptidet, og dermed bidra til forbedring av ComRS-system i *S. pneumoniae*. Dersom man vil overuttrykke, dvs. uttrykke så mye som mulig av et målprotein, kan man med fordel bruke S1 peptidet. Det er på grunn av peptidets høye aktivitet ved lave konsentrasjoner. S1 gir ikke høyere maksimumsuttrykk enn ComS*, men man kan bruke lavere konsentrasjoner av det og dermed spare på peptidet. Dette er spesielt fordelaktig hvis store kulturvolumer skal induseres. Dersom man skal undersøke hvordan fraværet av et essensielt gen påvirker bakterien og utføre en depleksjon, kan man oppnå en hurtigere effekt ved bruk av peptidene S4 eller S6. S4 gir en enda raskere depleksjon enn S6. En rask depleksjon er fordelaktig fordi man da slipper å vente i mange timer før en ser virkningen av å «skru av» ekspresjonen av et essensielt protein. Hvis depleksjonen går sakte vil kulturen trolig bli mer heterogen. Noen celler vil vise en sterk fenotype fordi depleksjonen i disse har kommet langt, mens andre celler er mindre påvirket fordi de fremdeles uttrykker en del av det essensielle målproteinet.

Selv om det i dette arbeidet ikke lyktes å identifisere peptider med betydelig bedre egenskaper enn ComS*, er det verd å fortsette studiene. I de videre studiene kan man bygge på erfaringer gjort i det foreliggende arbeidet og undersøke enda flere aminosyrekombinasjoner. Ser man på inhiberingsforsøkene er det også et potensiale for å oppnå bedre resultater. Spesielt S15 peptidet ser ut til å ha en liten effekt. I dette arbeidet ble kun et lite utvalg av peptidkonsentrasjoner og kombinasjoner av induser og inhibitor testet. I det videre arbeidet burde det gjøres grundigere undersøkelser for å slå fast om S15 kan blokkere for induseren eller ikke, og om dette i tilfellet kunne ha noen praktisk nytte. Uansett så bør det syntetiseres flere peptidvarianter med tanke på å finne fram til en inhibitor som binder sterkt til ligandbindingssetet uten å aktivere ComR.

Sammenligningen mellom ComRS og Zn²⁺-systemet viser at de begge fungerer godt, og at hvert av systemene har sine fordeler og ulemper. ComRS-systemet er tregere enn Zn²⁺-systemet når det brukes til depleksjonsstudier. Det har imidlertid en stor fordel i at det er vesentlig enklere enn Zn²⁺-systemet å bruke i praktisk arbeid, og det påvirker ikke fysiologien til pneumokokkene. Det sistnevnte er problemet med Zn²⁺-systemet. Sink, som har en essensiell rolle i metabolismen, er svært toksisk i for høye konsentrasjoner. Både for høye og for lave konsentrasjoner er med andre ord skadelig for bakteriecellene. Det gjør at det kan være vanskelig å tolke resultatene av et depleksjonsforsøk hvor cellene kan bli stresset på grunn av

mangelen på Zn^{2+} . En annen fordel med ComRS-systemet er at det i fremtiden kan være mulig å forbedre systemet ved å finne fram til induserpetider som har bedre egenskaper enn den naturlige induseren ComS*.

En spennende mulighet for fremtidige studier er å bruke ComRS og Zn^{2+} -systemet sammen ved at de nødvendige genetiske elementene settes inn i samme pneumokokkgenom. På den måten kan man manipulere ekspresjonen av to målproteiner samtidig. Det ene kan for eksempel overuttrykkes, mens det andre depleteres. Dette vil gi nye muligheter til å studere funksjonen til og samspillet mellom proteiner.

Referanseliste

- Aguilar, M. I. (2004). HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols. *Methods in Molecular biology TM*, 251: 3-8.
- Andrew, P., Kadioglu, A., Weiser, J. & Paton, J. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.*, 6 (4): 288-301.
- Apfel, C., B., Takács, Fountoulakis, M., Stieger, M. & Keck, W. (1999). Use of genomics to identify bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthetase: cloning, expression, and characterization of the essential *uppS* gene. *Journal of bacteriology*, 181 (2): 483-92.
- Austrian, R. (1981). Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev Infects Dis.*, 3 (2): 183-9.
- Avery, O., MacLeod, C. & McCarty, M. (1944). Studies in the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*, 79 (2): 137-158.
- Berg, K., Bjørnstad, T., Straume, D. & Håvarstein, L. (2011). Peptide-Regulated Gene Depletion System Developed for Use in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 193 (19): 5207-15.
- Berg, K., Stamsås, G., Straume, D. & Håvarstein, L. (2013). Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journals of Bacteriology*, 195 (19): 4342-54.
- Chan, P., O'Dwyer, K., Palmer, L., Ambrad, J., Ingraham, K., So, C., Lonetto, M., Biswas, S., Rosenberg, M., Holmes, D., et al. (2003). Characterization of a novel fucose-regulated promoter (PfcS_K) suitable for gene essentiality and antibacterial mode-of-action studies in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 185 (6): 2051-8.
- Chen, I. & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol.*, 2 (3): 241-9.
- Claverys, J., Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Gurial, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B. & Wells, J. (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Molecular Microbiology*, 51 (4): 1071-86.
- Claverys, J. P., Roger, M. & Sicard, A. M. (1980). Excision and repair of mismatched base pairs in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet*, 178 (1): 191-201.

- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., Lereclus, D. & Arold, S. (2007). Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (47): 18490-5.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C. & Claverys, J. (1997). Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Molecular Microbiology*, 25 (4): 727-39.
- Dintilhac, A. & Claverys, J. P. (1997). The adc locus, which affects competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, encodes an ABC transporter with a putative lipoprotein homologous to a family of streptococcal adhesins. *Research in Microbiology*, 148 (2): 119-131.
- Dowson, C., Barcus, V., Pickerill, P., Whatmore, A. & Yeo, M. (1997). Horizontal gene transfer and the evolution of resistance and virulence determinants in *Streptococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83: 42S-51S.
- Eichenbaum, Z., Federle, M., Marra, D., Vos, W. d., Kuipers, O., Kleerebezem, M. & Scott, J. (1998). Use of the lactococcal nisA promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Applied and environmental microbiology*, 64 (8): 2763-9.
- Fan, F. & Wood, K. V. (2007). Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 5 (1): 127-36.
- Ferain, T., Jr, J. H., Richardson, J., Bernard, N., Garmyn, D., Hols, P., Allen, N. & Delcour, J. (1996). Knockout of the two ldh genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology*, 178 (18): 5431-7.
- Finkel, S. & Kolter, R. (2001). DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial Competence Gene Homologs. *Journal of bacteriology*, 183 (21): 6288-93.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10: 226-36.
- Fleuchot, B., Gitton, C., Guillot, A., Vidic, J., Nicolas, P., Besset, C., Fontaine, L., Hols, P., Leblond-Bourget, N., Monnet, V., et al. (2011). Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Molecular Microbiology*, 80 (4): 1102-19.
- Fontaine, L., Boutry, C., Frahan, M. d., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P. & Hols, P. (2010). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development

- of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of bacteriology*, 192 (5): 1444-54.
- Fontaine, L., P., Goffin, Dubout, H., Delplace, B., Baulard, A., Lecat-Guillet, N., Chambellon, E., Gardan, R. & Hols, P. (2013). Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Molecular Microbiology*, 87 (6): 1113-32.
- Gardan, R., Besset, C., Gitton, C., Guillot, A., Fontaine, L., Hols, P. & Monnet, V. (2013). Extracellular life cycle of ComS, the competence-stimulating peptide of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of bacteriology*, 195 (8): 1845-55.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition*.
- Golubchik, T., Brueggemann, A., Street, T., Jr, R. G., Spencer, C., Ho, T., Giannoulatou, E., Link-Gelles, R., Harding, R., Beall, B., et al. (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet*, 44 (3): 352-355.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)*, 27 (2): 113-159.
- Hakenbeck, R. (1999). beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and evolutionary mechanism. *Chemotherapy*, 45 (2): 83-94.
- Hakenbeck, R., Grebe, T., Zähler, D. & Stock, J. B. (1999). b-Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *molecular Microbiology*, 33 (4): 673-8.
- Hakenbeck, R. (2014). Discovery of B-lactam-resistance variants in diverse pneumococcal populations. *Genome Medicine*, 6 (9): 72.
- Hantke, K. (2005). Bacterial zinc uptake and regulators. *Current Opinion in Microbiology*, 8 (2): 196-202.
- Hardie, J. & Whiley, R. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Soc Appl Bacteriol Sump Ser.*, 26: 1-11.
- Henriques-Normark, B. (2007). Molecular Epidemiology and Mechanisms for Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. I: Hakenbeck, R. & Chhatwal, S. (red.) *Molecular Biology of Streptococci*, s. 269-290. Norfolk: Horizon Bioscience.
- Henriques-Normark, B. & Normark, S. (2010). Commensal pathogens, with a focus in *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. . *Experimental Cell Research*, 316 (6): 7351-67.
- Hermans, P., Bogaert, D. & Groot, R. D. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4 (3): 144-54.

- Hiller, N., Janto, B., Hogg, J., Boissy, R., Yu, S., Powell, E., Keefe, R., Ehrlich, N., Shen, K., Hayes, J., et al. (2007). Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insight into the pneumococcal supragenome. *J Bacteriol*, 189 (22): 8186-95.
- Hoskins, J., Alborn, W. J., Arnold, J., Blaszcak, L., Burgett, S., DeHoff, B., Estrem, S., Fritz, L., Fu, D., Fuller, W., et al. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of bacteriology*, 183 (19): 5709-17.
- Håvarstein, L., Coomaraswamy, G. & Morrison, D. (1995a). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (24): 11140-4.
- Håvarstein, L., Diep, B. & Nes, I. (1995b). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*, 16 (2): 229-40.
- Håvarstein, L., Hakenbeck, R. & Gaustad, P. (1997). Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *Journal of bacteriology*, 179 (21): 6589-94.
- Håvarstein, L., Blomqvist, T. & Steinmoen, H. (2006). Natural Genetic Transformation: a Novel Tool for Efficient Genetic Engineering of the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 72 (10): 6751-56.
- Johnsborg, O., Eldholm, V. & Håvarstein, L. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158 (10): 767-78.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjornstad, M. L. & Håvarstein, L. S. (2008). A predatory mechanism dramatically increase the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology*, 69 (1): 245-53.
- Johnsborg, O. & Håvarstein, L. (2009a). Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 191 (18): 5859-64.
- Johnsborg, O. & Håvarstein, L. (2009b). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (3): 627-42.
- Kawamura, Y., Hou, X., Miura, H. & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (2): 406-8.

- Kell, C., Sharma, U., Dowson, C., Town, C., Balganes, T. & Spratt, B. (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 106 (2): 171-5.
- Kilian, M. (1998). *Streptococcus and Lactobacillus*, b. Topey and Wilson's Microbiology and Microbial infections.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. & Sørensen, U. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One*, 16 (3): (7):e2683.
- Kuipers, O., Kloosterman, T., Kooi-Pol, M. v. d. & Bijlsma, J. (2007). The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn²⁺ stress by activation of the Zn²⁺-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 65 (4): 1049-63.
- Kuipers, O. P., Kloosterman, T. G., Witwicki, R. M., Kooi-Pol, M. M. v. d. & Bijlsma, J. J. E. (2008). Opposite Effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-Mediated Expression of the Virulence Genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 190 (15): 5382-93.
- Lawrence, M., Pilling, P., Epa, V. C., Berry, A., Ogunniyi, A. D. & Paton, J. (1998). The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure Cell Press*, 6 (12): 1553-61.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods in Enzymology*, 2 (447-55).
- Lee, M. & Morrison, D. (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *Journal of bacteriology*, 181 (16): 5004-16.
- Levine, O. S., O'Brien, K. L., Knoll, M., Adegbola, R. A., Black, S., Cherian, T., Dagan, R., Goldblatt, D., Grange, A., Greenwood, B., et al. (2006). Pneumococcal vaccination in developing countries. *Lancet*, 367 (9526): 1880-2.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D. & Federle, M. (2010). A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Molecular Microbiology*, 78 (3): 589-606.
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deforia-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S., Cherian, T., et al. (2009). Burden of disease caused by

- Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374 (9693): 893-902.
- Peters, K. (2013). *Der Abbau des essentiellen Penicillin-Bindeproteins 2x in S. pneumoniae durch die Serinprotease HtrA*. Kaiserslautern: Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.
- Peterson, S., Sung, C., Cline, R., Desai, B., Snesrud, E., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., et al. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Molecular Microbiology*, 51 (4): 1051-70.
- Redfield, R. J. (2001). Do bacteria have sex? *Nature Reviews Genetics*, 2: 634-39.
- Riedel, S., Beekmann, S. E., Heilmann, K. P., Richter, S. S., Garcia-de-Lomas, J., Ferech, M., Goosens, H. & Doern, G. V. (2007). Antimicrobial use in Europe and antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26: 485-90.
- Salles, C., Creancier, L., Claverys, J. P. & Mejean, V. (1992). The high level streptomycin resistance gene from *Streptococcus pneumoniae* is a homologue of the ribosomal protein S12 gene from *Escherichia coli*. *Nucleic acid Res*, 20 (22): 6103.
- Sebert, M. E., Stevens, K. E., Chang, D. & Zwack, E. E. (2011). Competence in *Streptococcus pneumoniae* Is Regulated by the Rate of Ribosomal Decoding Errors. *mBio*, 2 (5): e00071-11.
- Sebert, M. E., Cassone, M., Spruce, A. L. & Seeholzer, S. H. (2012). The HtrA Protease from *Streptococcus pneumoniae* Digests Both Denatured Proteins and the Competence-stimulating Peptide. *Journal of Biol Chem*, 287 (46): 38449-59.
- Simonsen, G. (2009). Overvaking og forekomst av antibiotikaresistens i Norge. *Tidsskrift for Den Norske Legeforening*, 129 (7): 623-7.
- Song, J., Ko, K., Lee, J., Baek, J., Oh, W., Yoon, H., Jeong, J. & Chun, J. (2005). Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Molecules and cells*, 19 (3): 365-74.
- Sung, C. K., Li, H. & Claverys, J. P. (2001). An *rpsL* Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and environmental microbiology*, 67 (11): 5190-6.
- Veening, J.-W., Vollmer, W., Eberhardt, A., Wu, L. J. & Errington, J. (2009). Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems *Molecular Microbiology*, 74 (2): 395-408.

- Veening, J.-W., Yuzenkova, Y., Gamba, P., Herber, M., Attaiech, L., Shafeeq, S., Kuipers, O. P., Klumpp, S. & Zenkin, N. (2014). Control of transcription elongation by GreA determinates rate of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids Research*, 42 (17): 10987-99.
- Wilson, T. & Hastings, J. W. (1998). Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14 (1): 197-230.
- Zhang, J., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W. & Tuomanen, E. (1999). Pneumococcal licD2 gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Molecular Microbiology*, 31 (5): 1477-88.
- Zhao, G., Meier, T. I., Kahl, S. D., Gee, K. R. & Blaszcak, L. C. (1999). BOCILLIN FL, a Sensitive and Commercially aviable Reagent for Detection of Penicillin-Binding Proteins. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 43 (5): 1124-8.

Vedlegg

Vedleggsinnhold

Vedlegg A – Diagrammer fra forsøkIII

- A.1 Bioluminescens for SPH130 induisert med ComS*
- A.2 Bioluminescens for SPH130 induisert med S1
- A.3 Vekstkurve for SPH165 induisert med ComS*
- A.4 Vekstkurve for SPH165 induisert med S4
- A.5 Vekstkurve for SPH165 induisert med S6
- A.6 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM ComS*
- A.7 Depletion av PBP2x – SPH165 induisert med 0,2 μM ComS*
- A.8 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM S4
- A.9 Depletion av PBP2x – SPH165 induisert med 0,2 μM S4
- A.10 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM S6
- A.11 Depletion av PBP2x –SPH165 induisert med 0,2 μM S6
- A.12 Depletion av PBP2b – uindusert SPH158 fordyrket med 0,2 μM ComS*
- A.13 Depletion av PBP2b –SPH158 induisert med 0,2 μM ComS*
- A.14 Depletion av PBP2b – uindusert SPH158 fordyrket med 0,2 μM S4
- A.15 Depletion av PBP2b –SPH158 induisert med 0,2 μM S4
- A.16 Bioluminescens for SPH130 induisert med ComS* og tilsatt S12 fra start
- A.17 Bioluminescens for SPH130 induisert med ComS* og tilsatt S12 etter 30 min
- A.18 Bioluminescens for KW12 dyrket i vanlig C-medium induisert med ZnCl_2
- A.19 Vekstkurve for KW12 dyrket i vanlig C-medium og induisert med ZnCl_2
- A.20 Bioluminescens for KW12 dyrket i Zn^{2+} -fritt C-medium og induisert med ZnCl_2
- A.21 Vekstkurve for KW12 dyrket i Zn^{2+} -fritt C-medium og induisert med ZnCl_2
- A.22 Bioluminescens for SPH130 induisert med ComS*
- A.23 Vekstkurve for SPH130 og induisert med ComS*
- A.24 Vekstkurve for KW15 induisert med ZnCl_2
- A.25 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM ComS*
- A.26 Depletion av PBP2x – SPH165 induisert med 0,2 μM ComS*

A.27 Depletion av PBP2x – KW15 (fordyrket med 0,1 mM ZnCl₂)

A.28 Depletion av PBP2x – KW15 (indusert med 0,1 mM ZnCl₂)

Vedlegg B – Benevninger, forkortelser og aminosyreforkortelser.....XXXIV

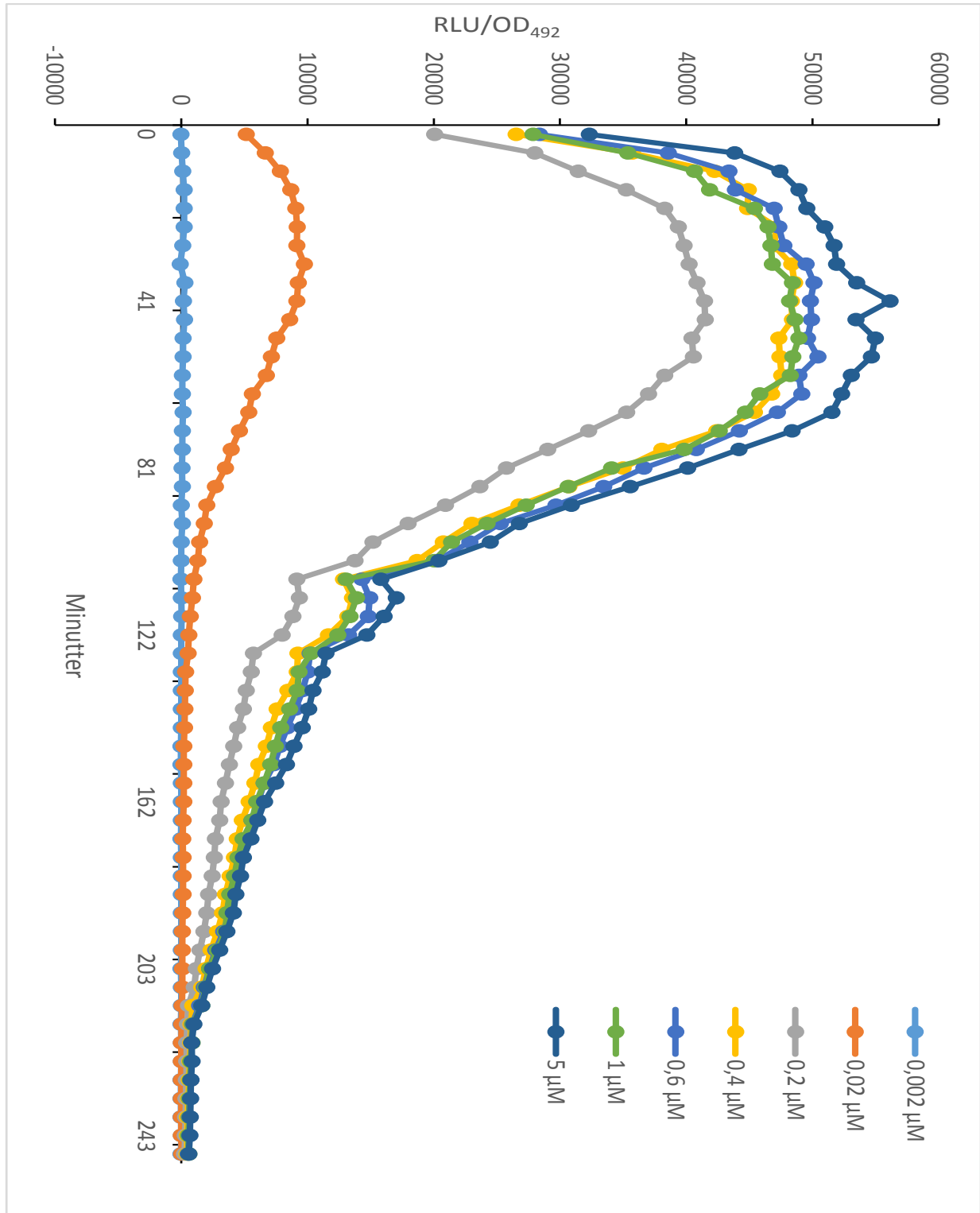
B.1 Benevninger

B.2 Forkortelser

B.3 Aminosyreforkortelser

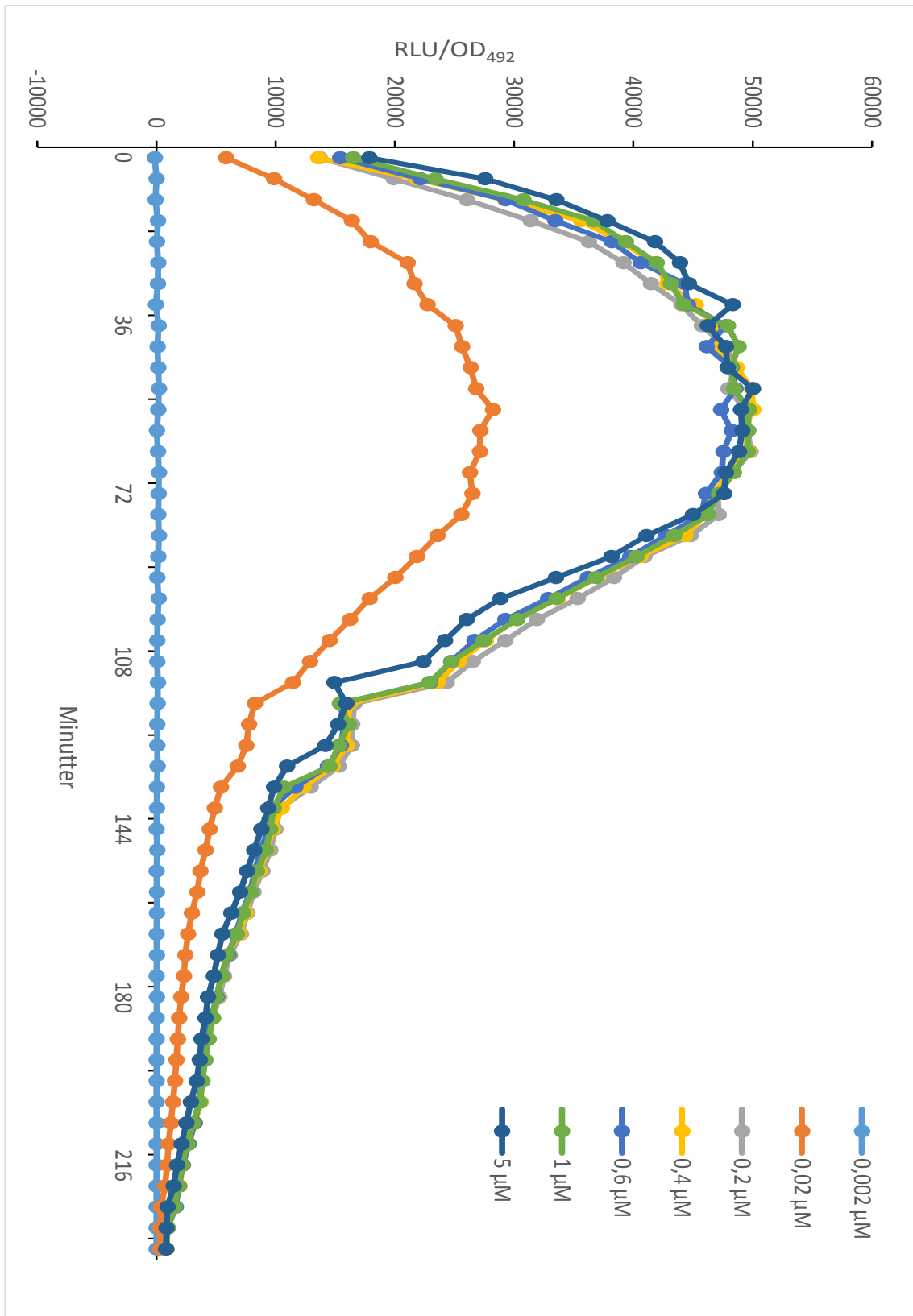
Vedlegg A – Diagrammer fra forsøk

A.1 Bioluminescens for SPH130 induert med ComS*



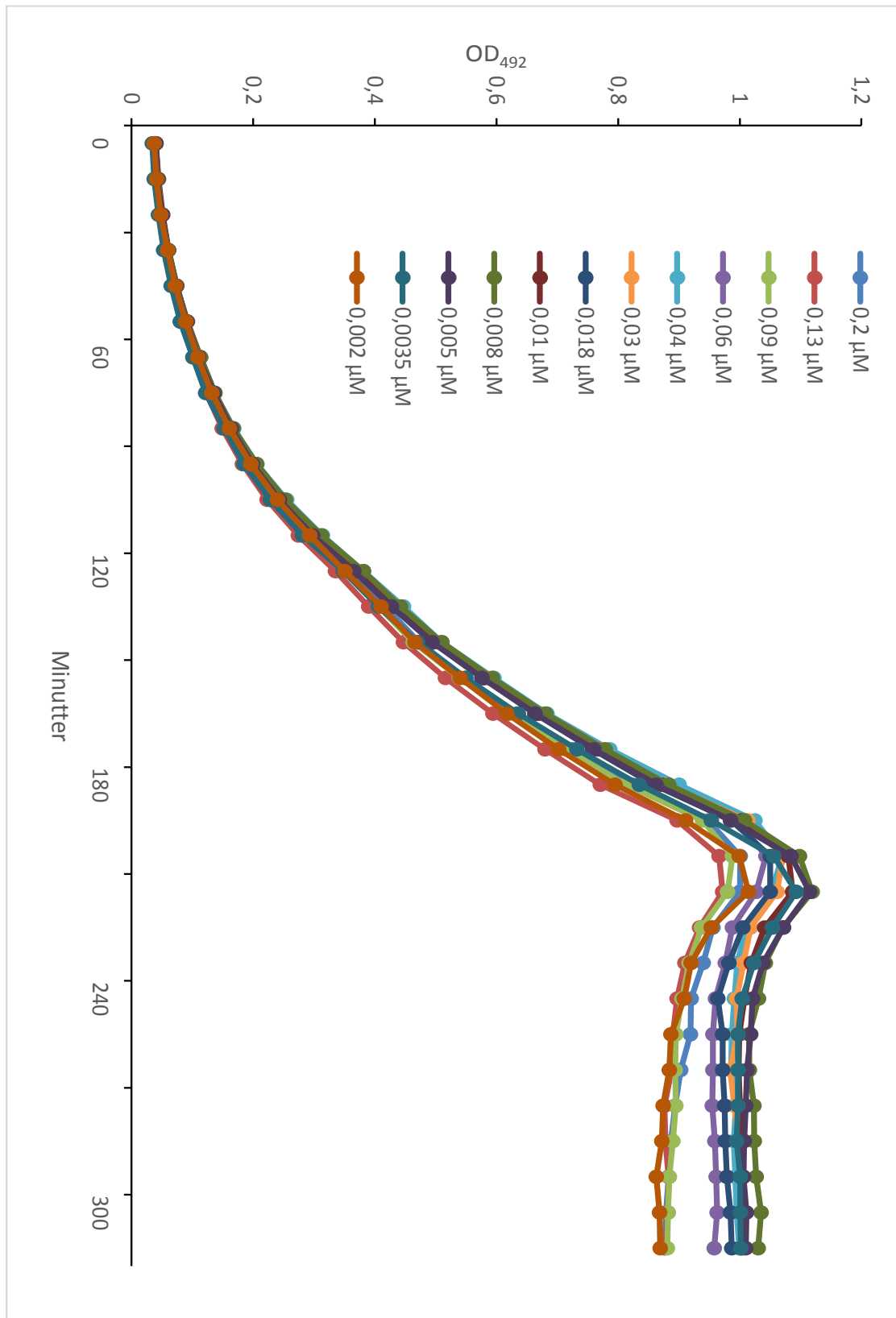
Figur A.1 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 induert med *ComS**. SPH130 (*P_{comX}::luc*) ble fra OD₅₅₀~0,05 induert med ulike konsentrasjoner av *ComS** (0,002-5 µM) og inkubert ved 37 °C. Luminescens (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 4,5 minutt i ca. 250 minutter.

A.2 Bioluminescens for SPH130 indusert med S1



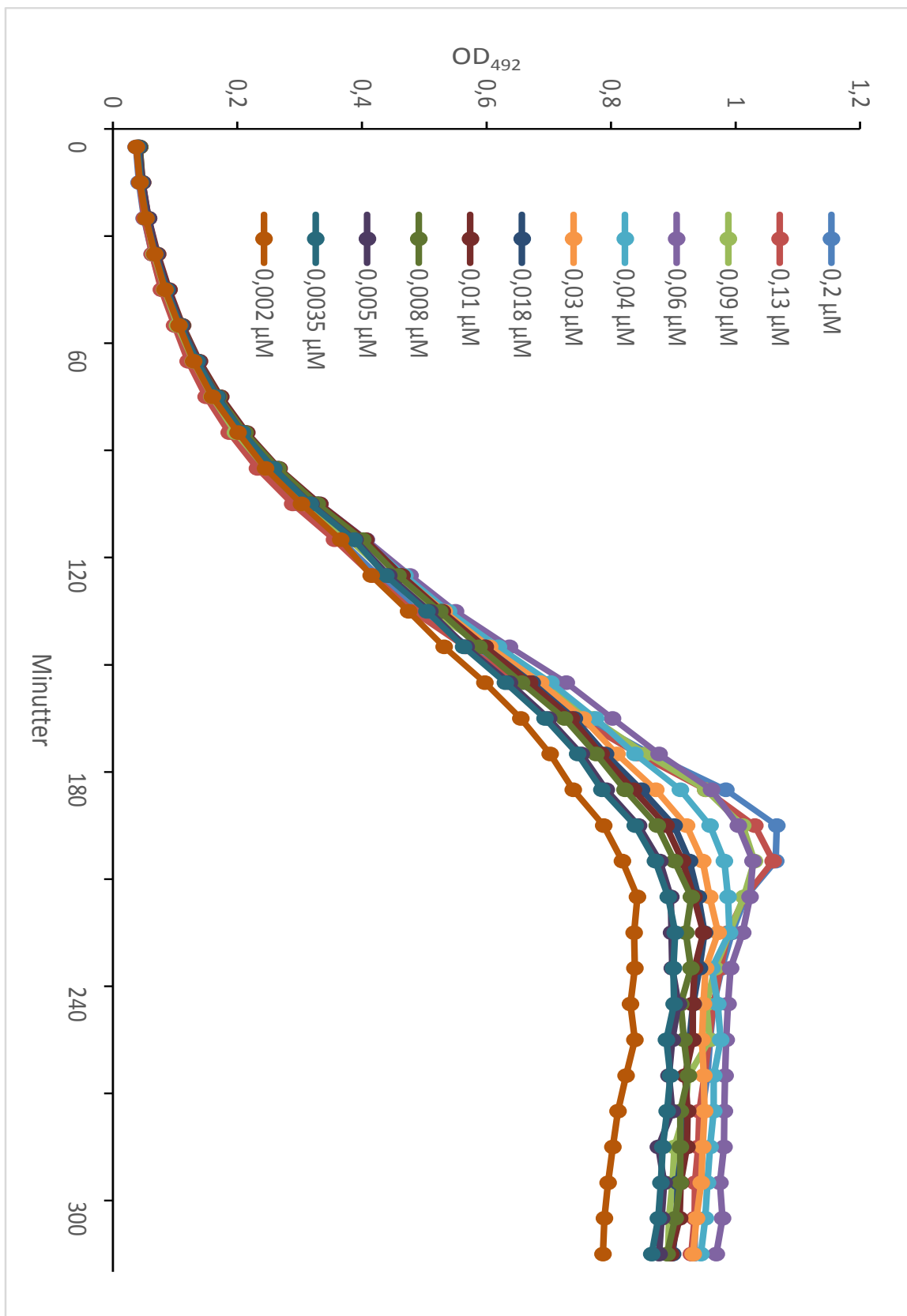
Figur A.2 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 indusert med S1. SPH130 (*P_{comX}::luc*) ble fra OD₅₅₀~0,05 indusert med ulike konsentrasjoner av S1 (0,002-5 µM) og inkubert ved 37 °C. Luminescens (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 4,5 minutt i ca. 230 minutter.

A.3 Vekstkurve for SPH165 indusert med ComS*



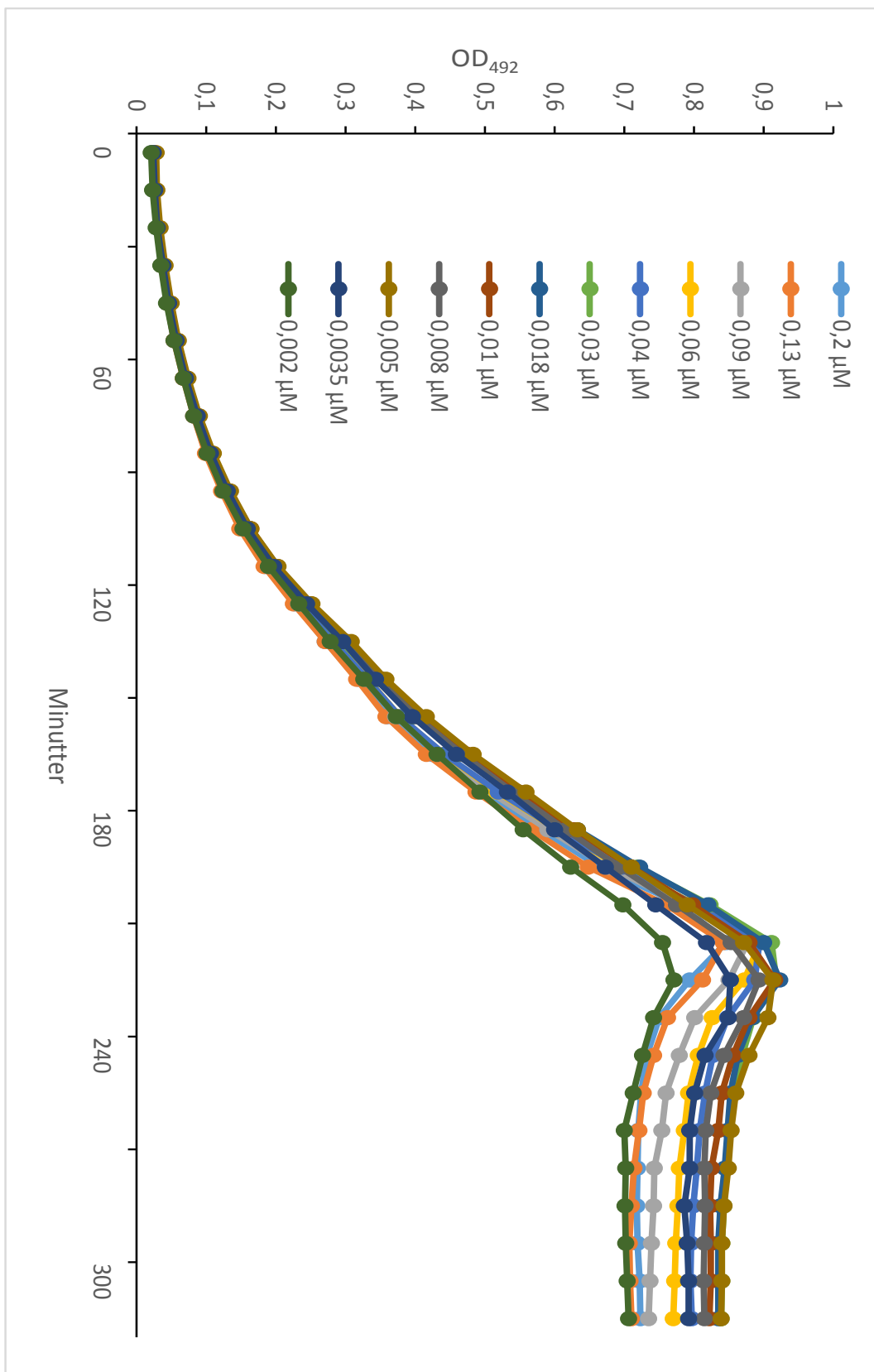
Figur A.3 Vekstkurve for SPH165 indusert med ComS*. SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$) ble ved $OD_{550} \sim 0,05$ indusert med ulike konsentrasjoner av ComS* (0,002-0,2 μM) og inkubert ved 37 °C. Veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 320 minutter.

A.4 Vekstkurve for SPH165 indusert med S4



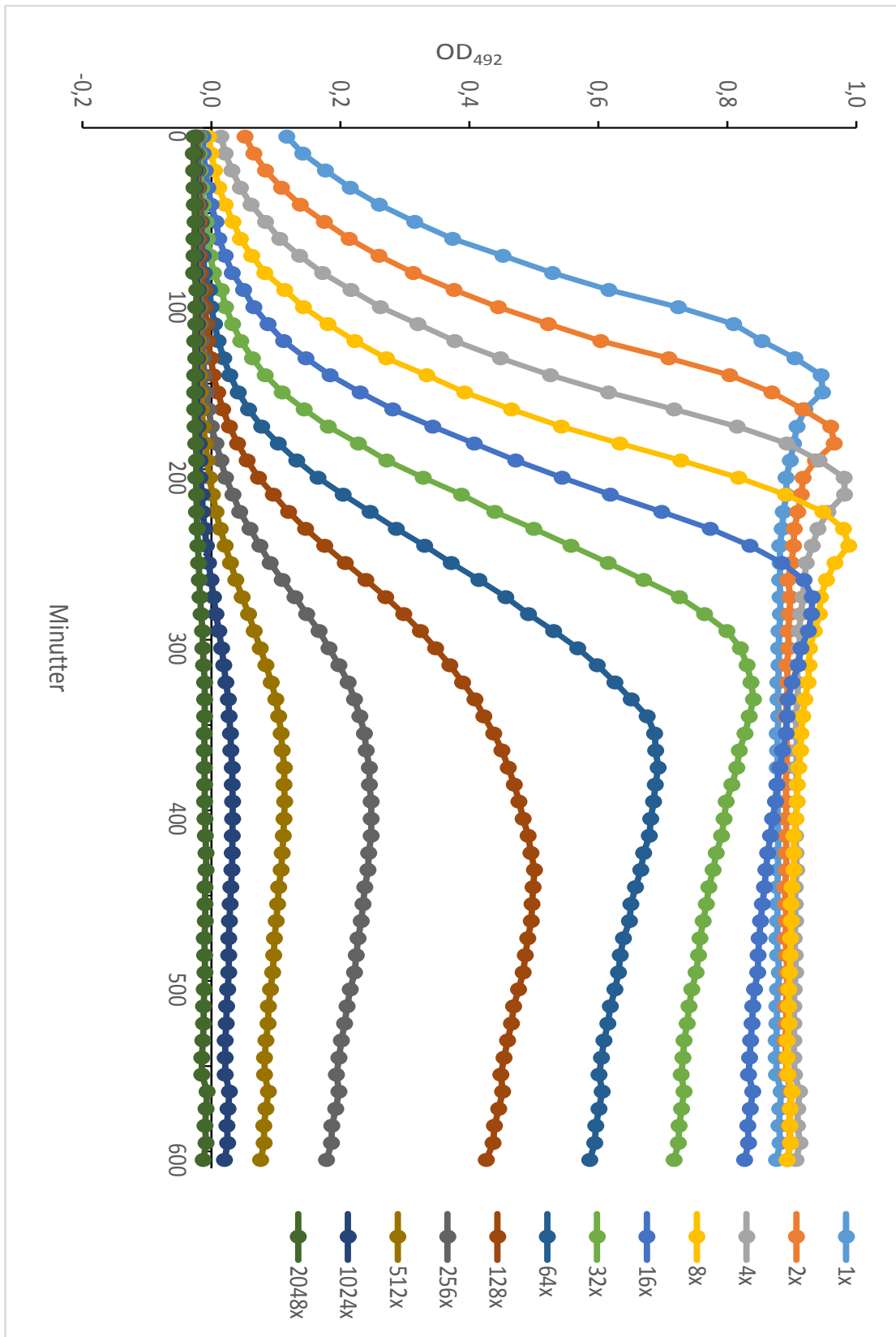
Figur A.4 Vekstkurve for SPH165 indusert med S4. SPH165 ($P_{\text{comX}}::\text{pbp2x}$) ble ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ indusert med ulike konsentrasjoner av S4 (0,002-0,2 μM) og inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$. Veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 320 minutter.

A.5 Vekstkurve for SPH165 indusert med S6



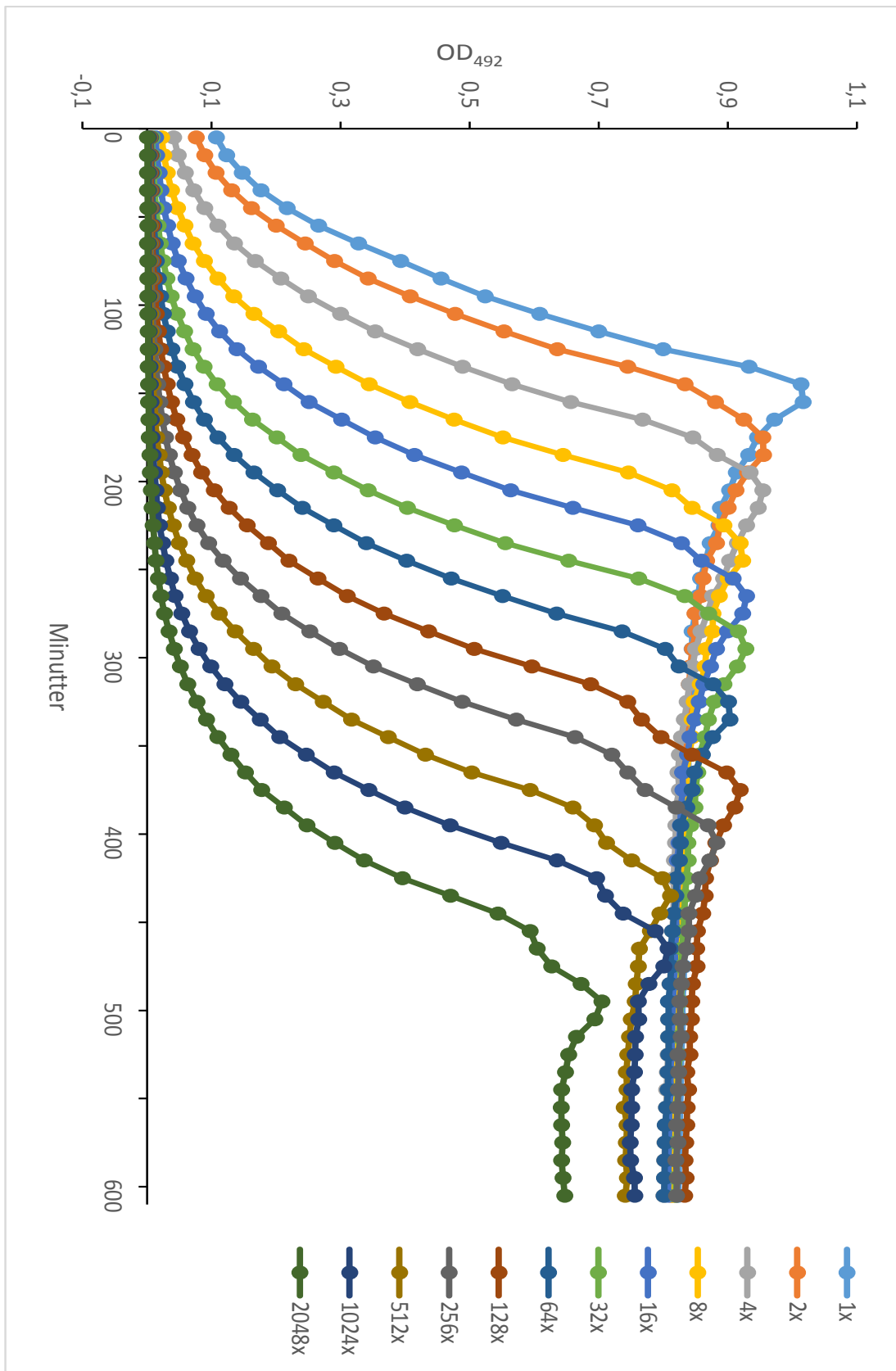
Figur A.5 Vekstkurve for SPH165 indusert med S6. SPH165 ($P_{comX}::p_{bp2x}$) ble ved $OD_{550} \sim 0,05$ indusert med ulike konsentrasjoner av S6 (0,002-0,2 μM) og inkubert ved 37 °C. Veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 320 minutter.

A.6 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM ComS*



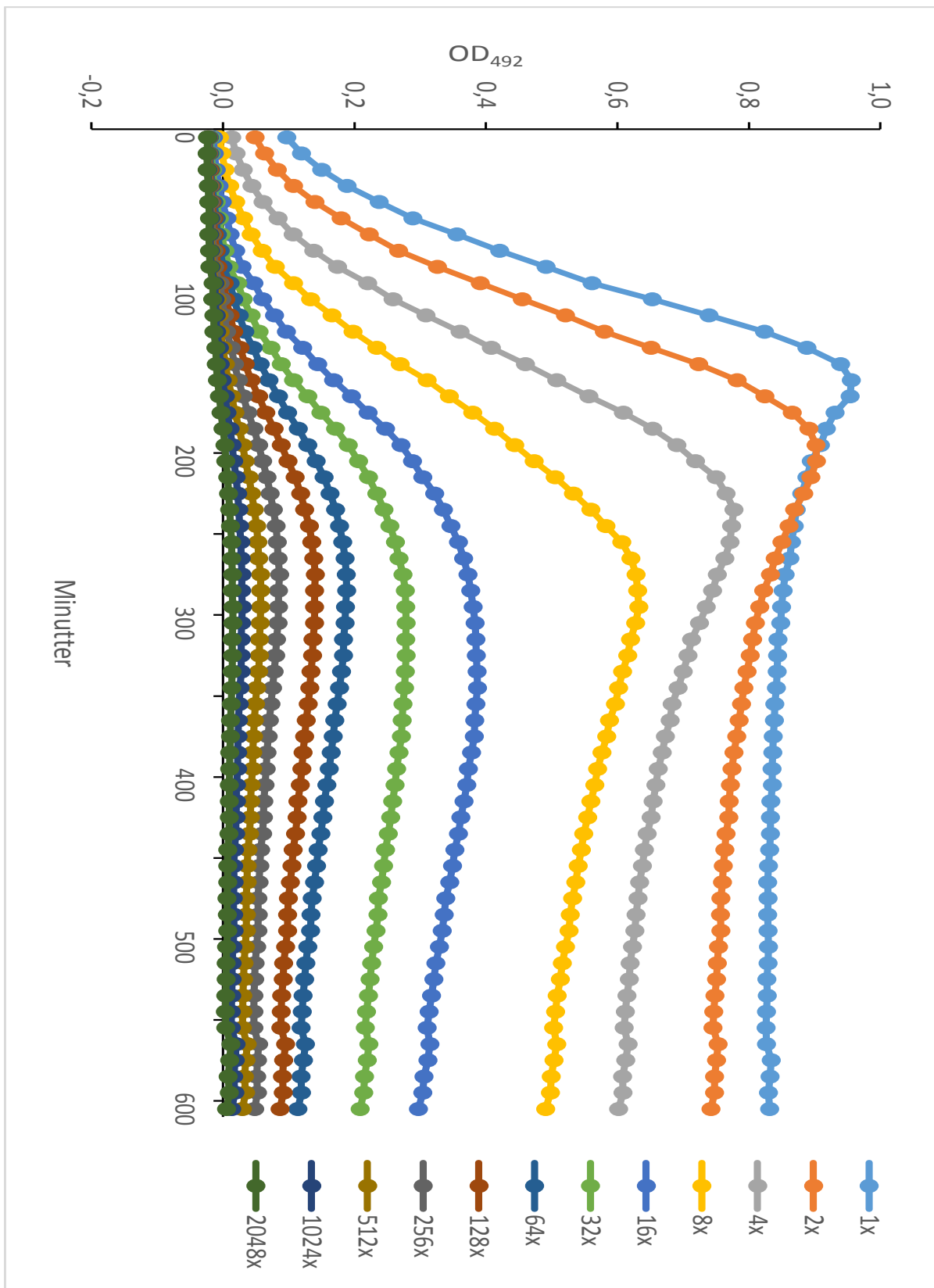
Figur A.6 Vekstkurve for SPH165 fordyrket med ComS*. SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$) ble fordyrket med 0,2 μM ComS* og ved $OD_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.7 Depletion av PBP2x – SPH165 indusert med 0,2 μM ComS*



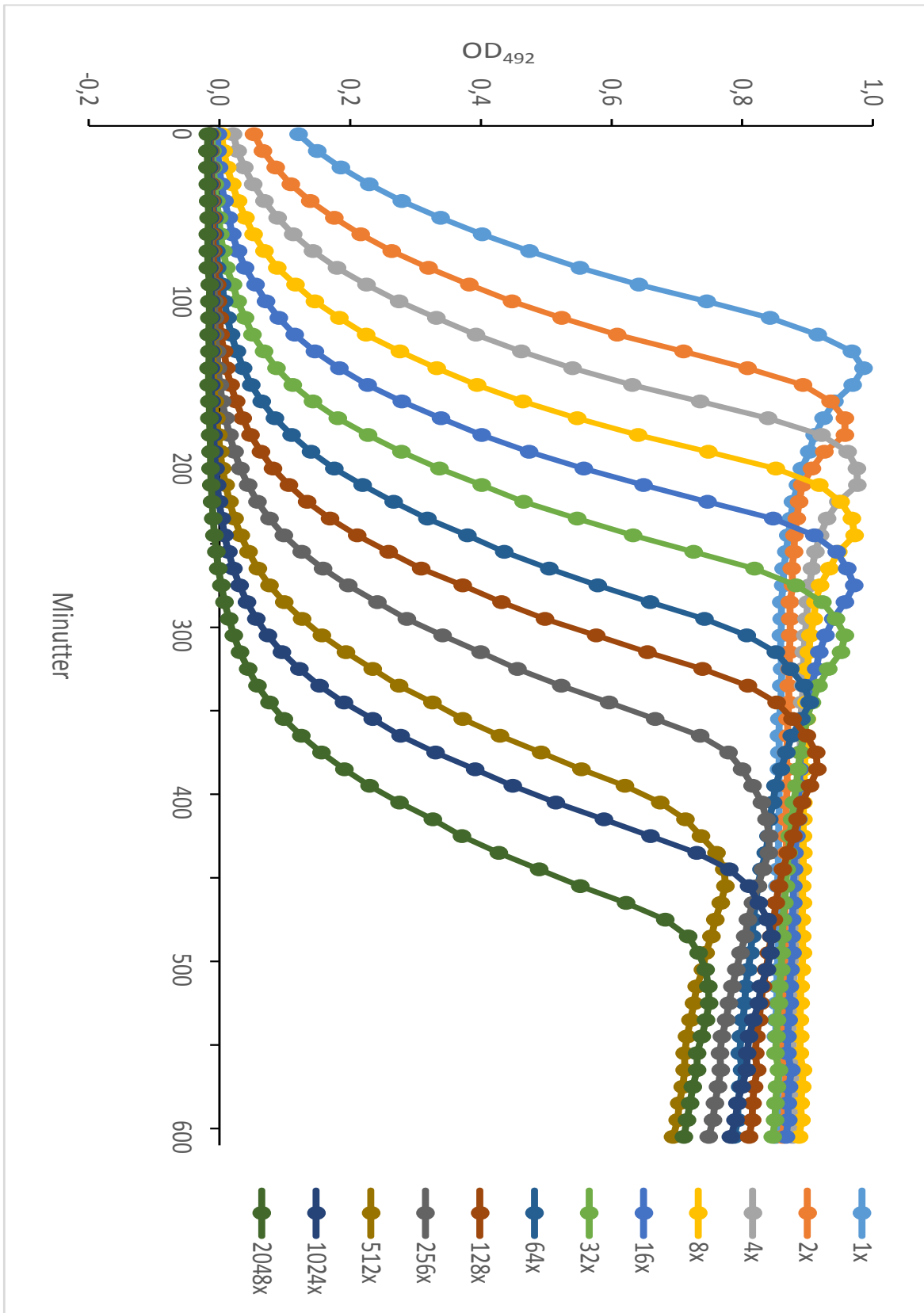
Figur A.7 Vekstkurve for SPH165 dyrket med ComS*. SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$) ble fordyrket med 0,2 μM ComS* og ved $OD_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble indusert med 0,2 mM ComS* og inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$ og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.8 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM S4



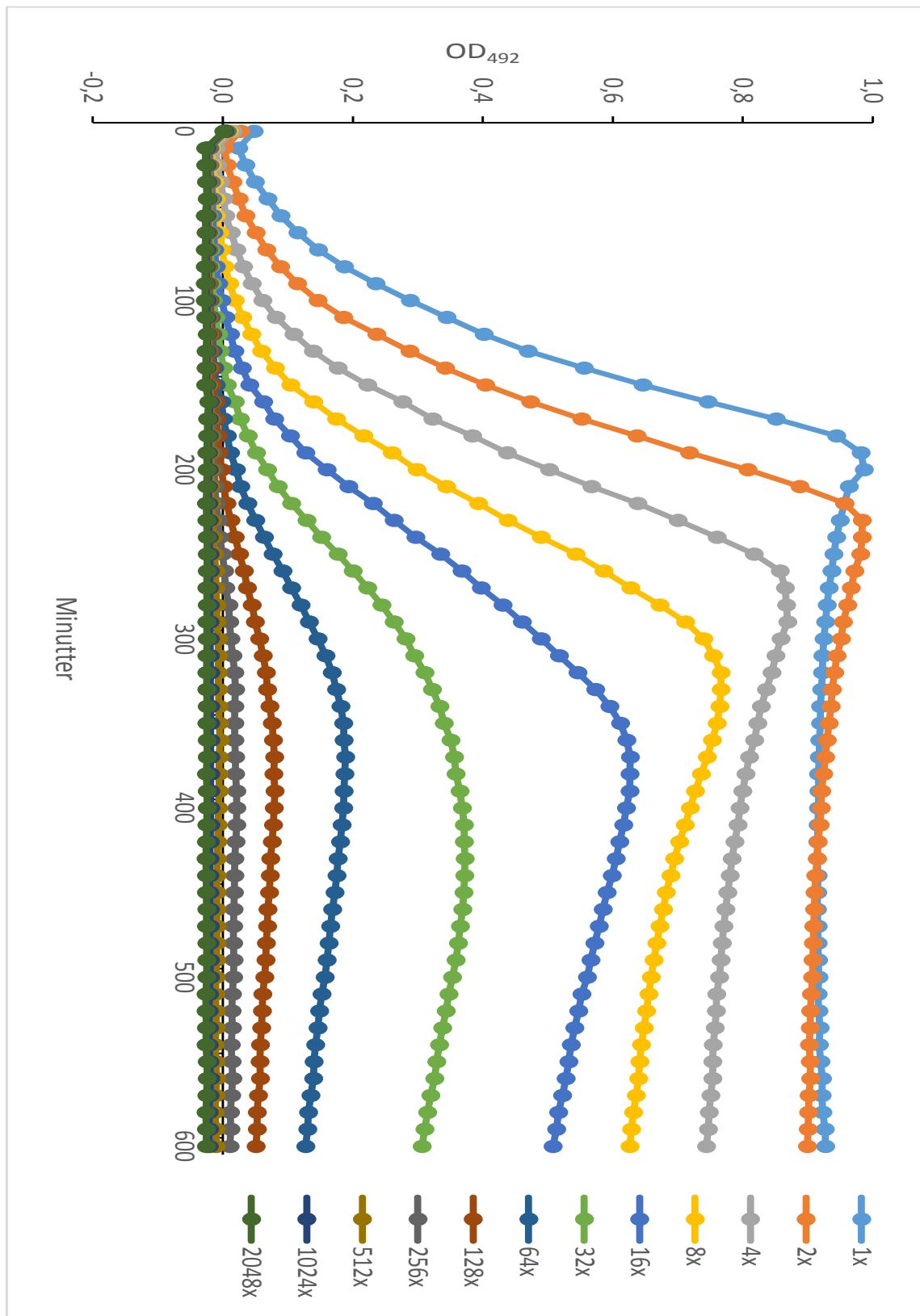
Figur A.8 Vekstkurve for SPH165 fordyrket med S4. SPH165 ($P_{\text{comX}}::pbp2x$) ble fordyrket med 0,2 μM S4 og ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds forfynningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$ og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.9 Depletion av PBP2x – SPH165 induert med 0,2 μM S4



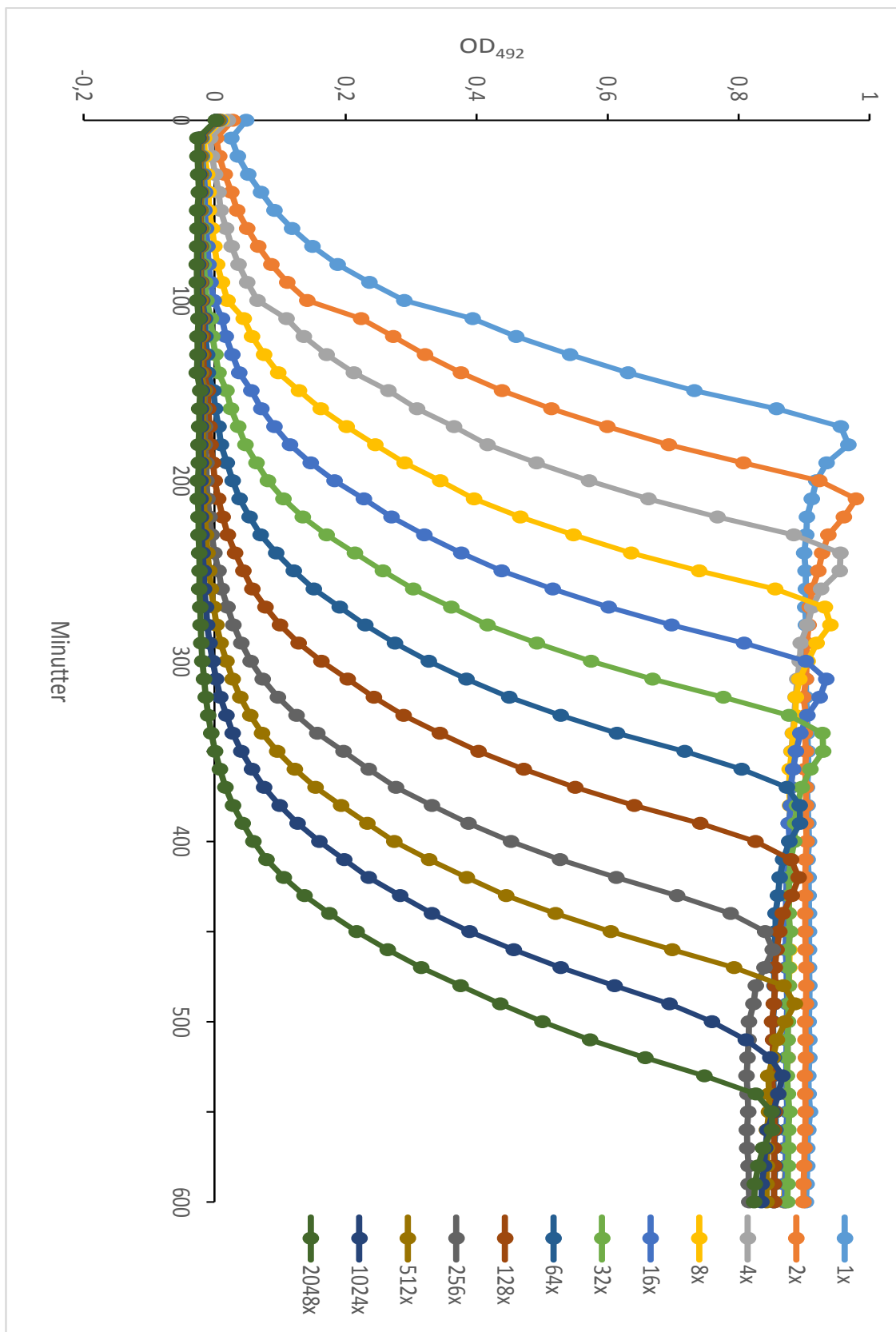
Figur A.9 Vekstkurve for SPH165 dyrket med ComS*. SPH165 ($P_{\text{comX}}::p\text{bp}2x$) ble fordyrket med 0,2 μM S4 og ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds forfynningsrekke av celler. Cellene ble induert med 0,2 μM S4 og inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.10 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM S6



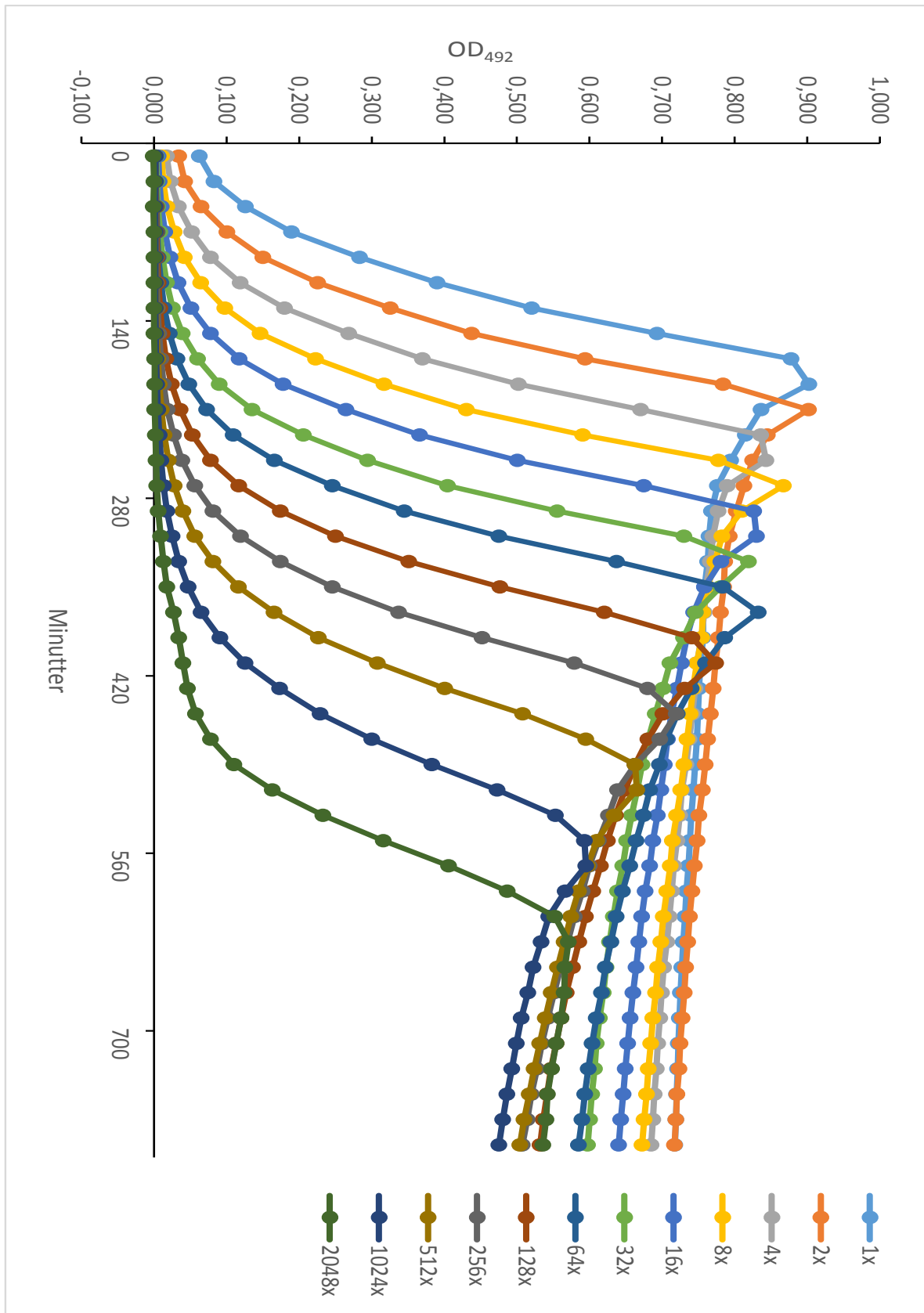
Figur A.10 Vekstkurve for SPH165 fordyrket med S6. SPH165 ($P_{\text{comX}}::p_{\text{bp2x}}$) ble fordyrket med 0,2 μM S6 og ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.11 Depletion av PBP2x –SPH165 induisert med 0,2 μM S6



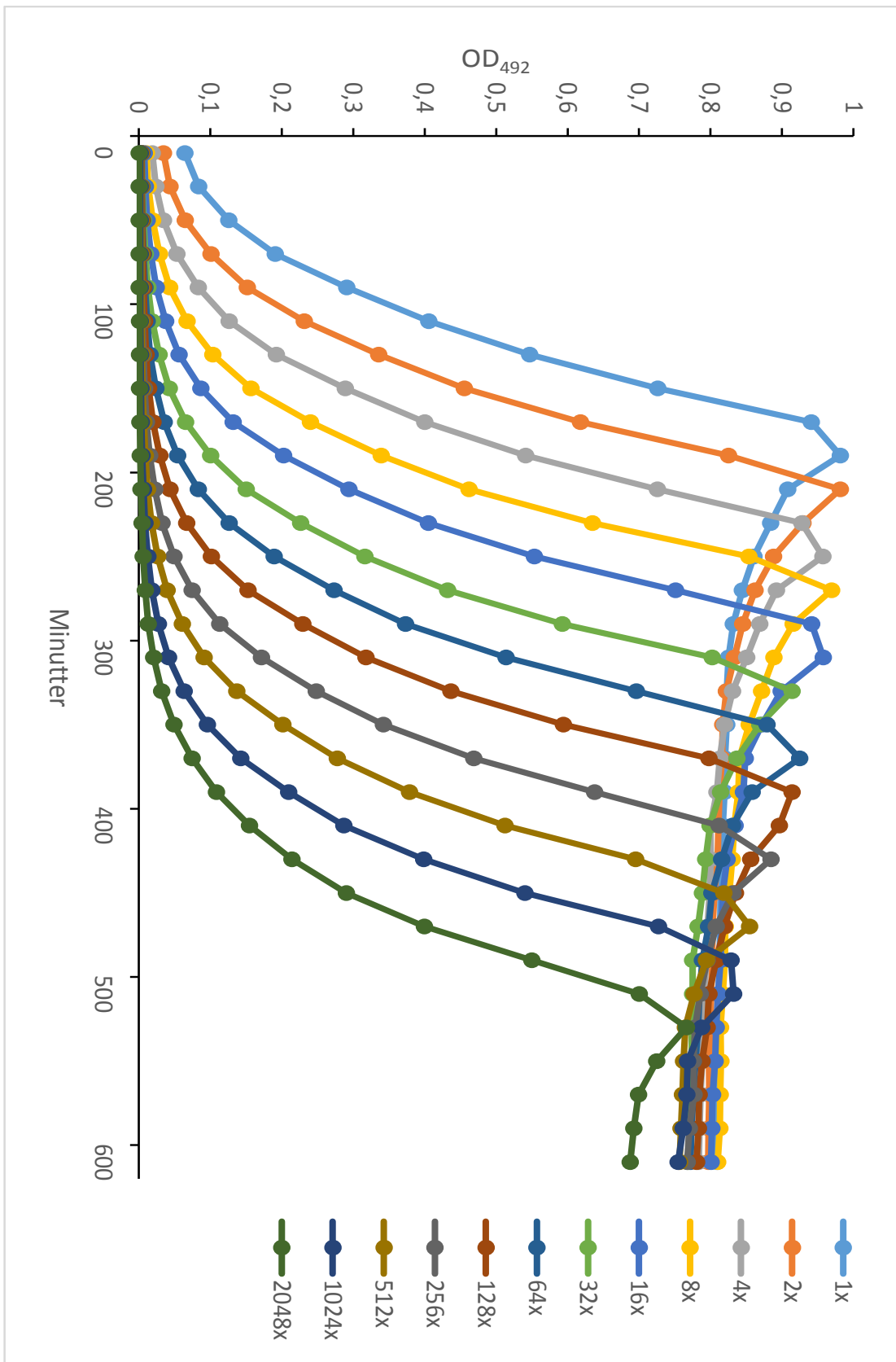
Figur A.11 Vekstkurve for SPH165 dyrket med S6. SPH165 ($P_{\text{comX}}::p_{\text{bp2x}}$) ble fordyrket med 0,2 μM S6 og ved $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble induisert med 0,2 μM S6 og inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter

A.12 Depletion av PBP2b – uindusert SPH158 fordyrket med 0,2 μM ComS*



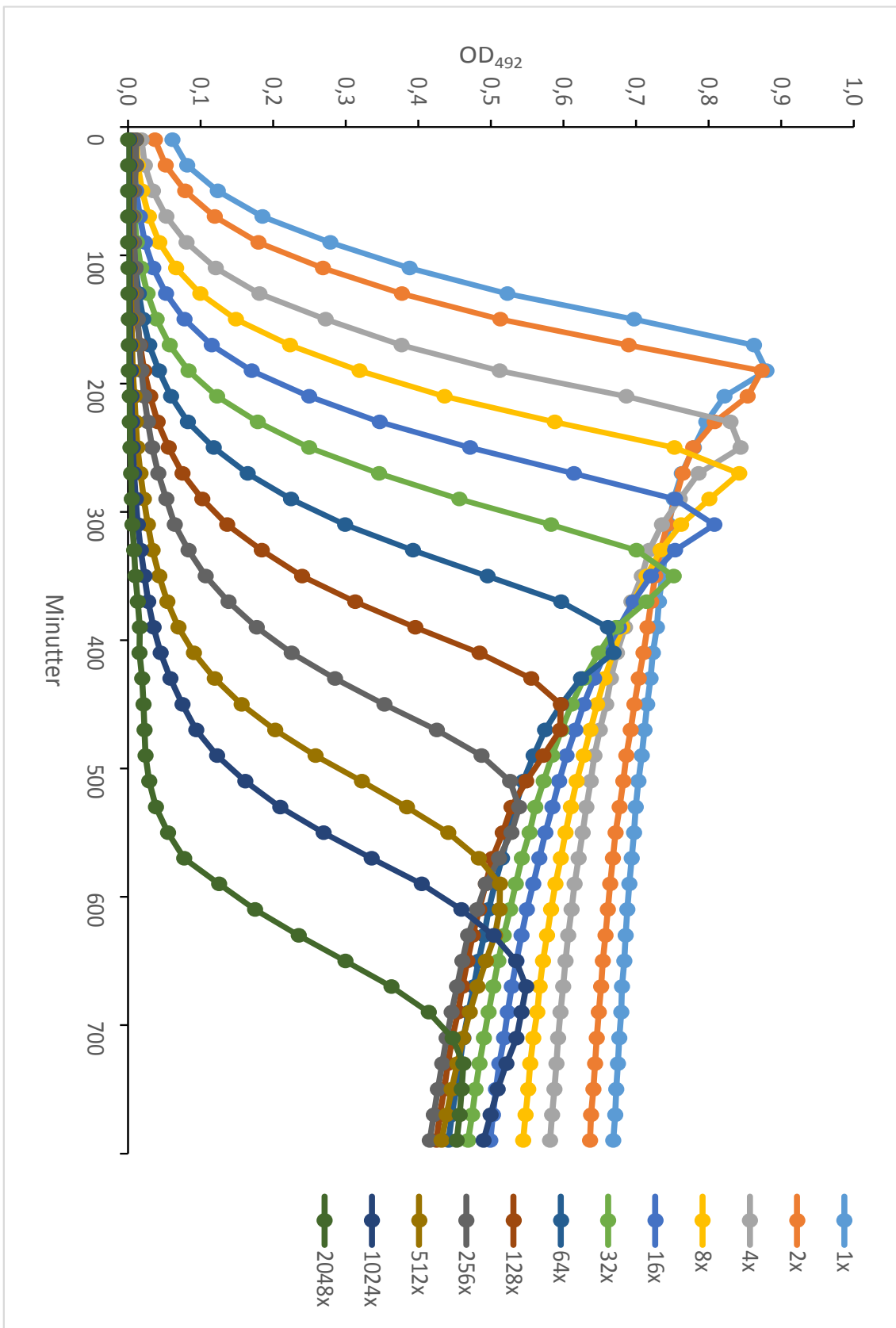
Figur A.12 Vekstkurve for SPH158 fordyrket med ComS*. SPH158 ($P_{\text{comX}}::pbp2b$) ble fordyrket med 0,2 μM ComS* og ved $OD_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$ og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt ca. 800 minutter.

A.13 Depletion av PBP2b –SPH158 induisert med 0,2 μ M ComS*



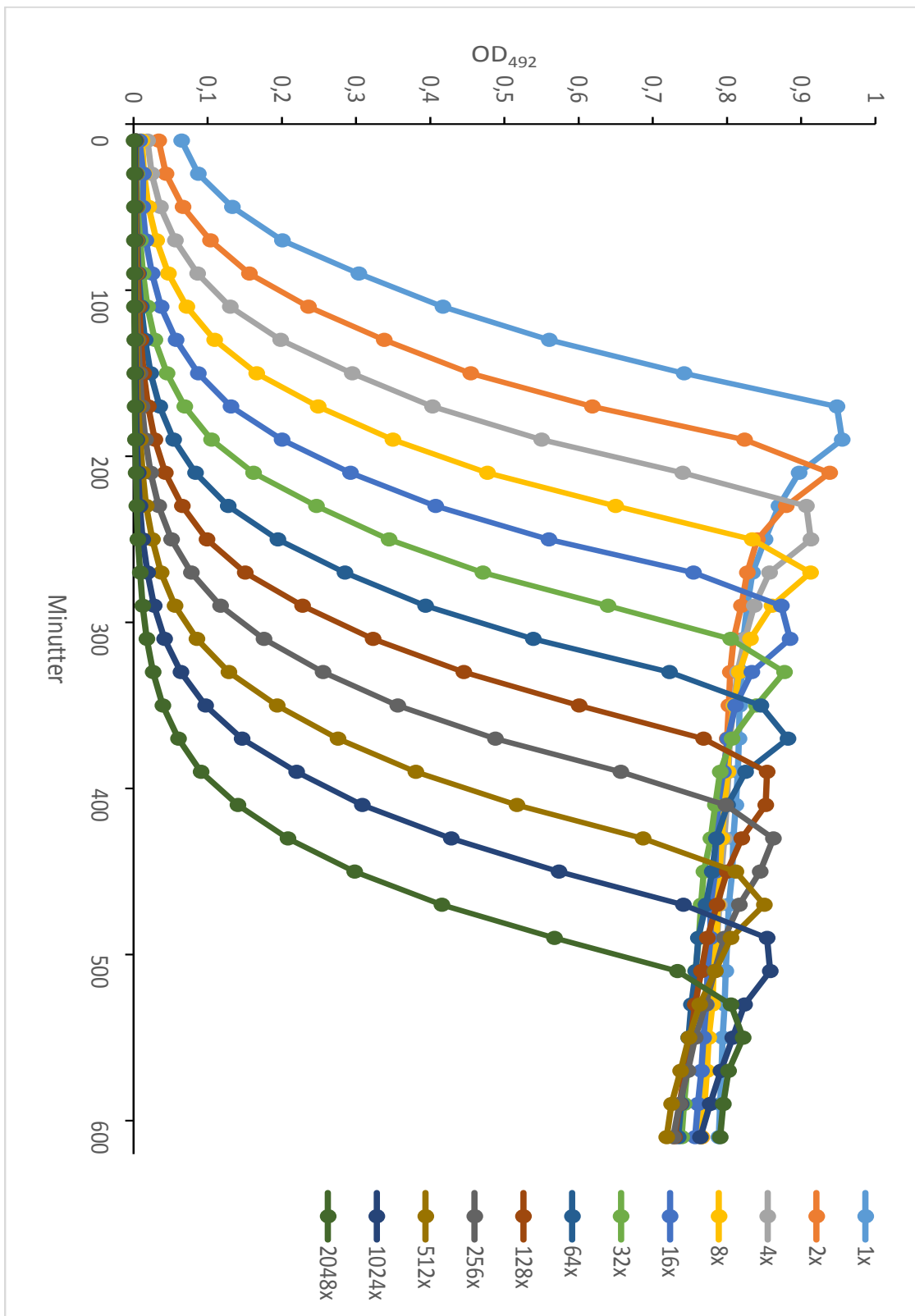
Figur A.13 Vekstkurve for SPH158 dyrket med ComS*. SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$) ble fordyrket med 0,2 μ M ComS* og ved OD₅₅₀~0,05 ble det laget en 2-folds fortyningsrekke av celler. Cellene ble induisert med 0,2 μ M ComS* og inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.14 Depletion av PBP2b – uindusert SPH158 fordyrket med 0,2 μM S4



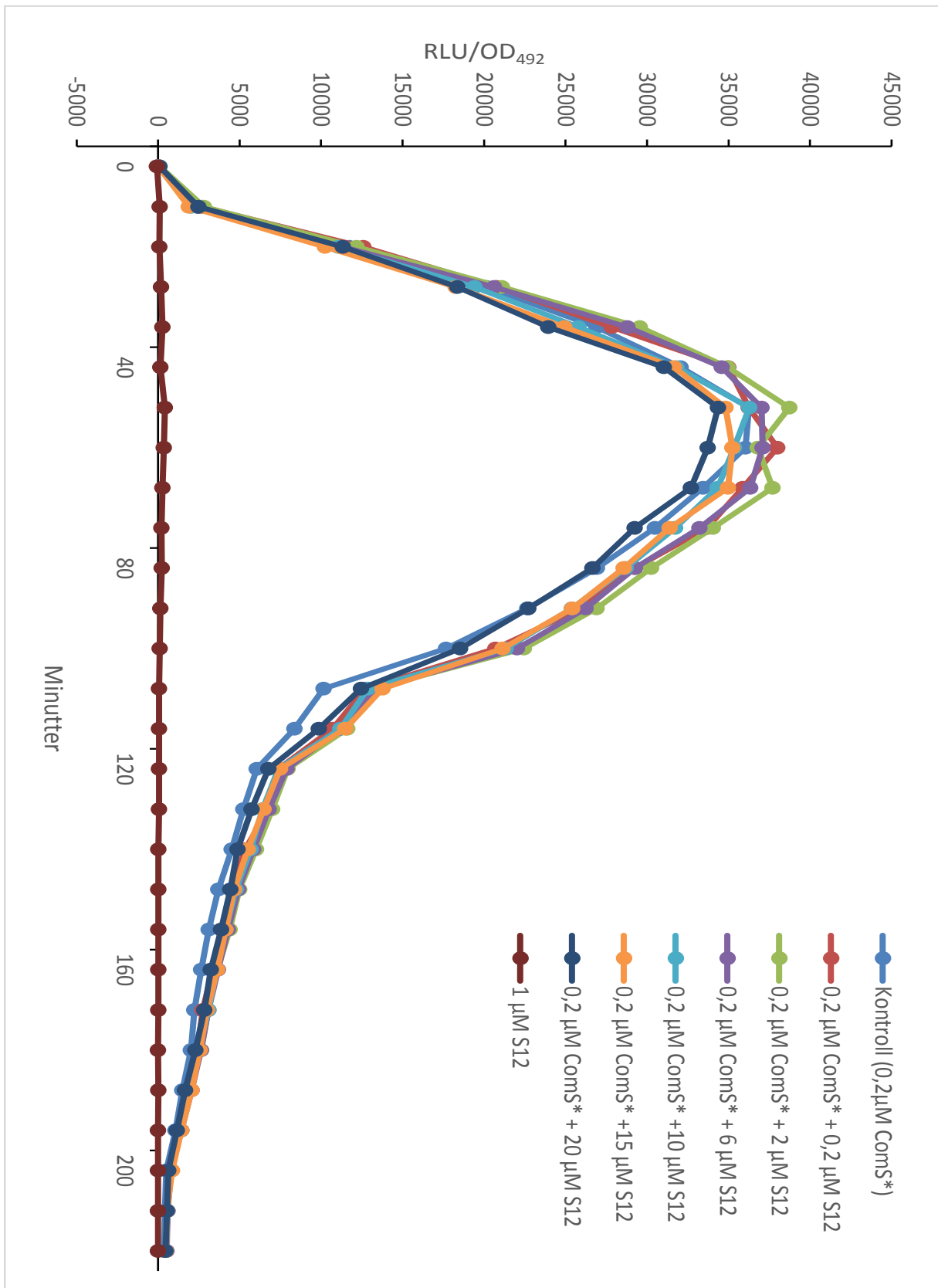
Figur A.14 Vekstkurve for SPH158 fordyrket med S4. SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$) ble fordyrket med 0,2 μM S4 og ved $OD_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortyningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt ca. 800 minutter.

A.15 Depletion av PBP2b –SPH158 induisert med 0,2 μM S4



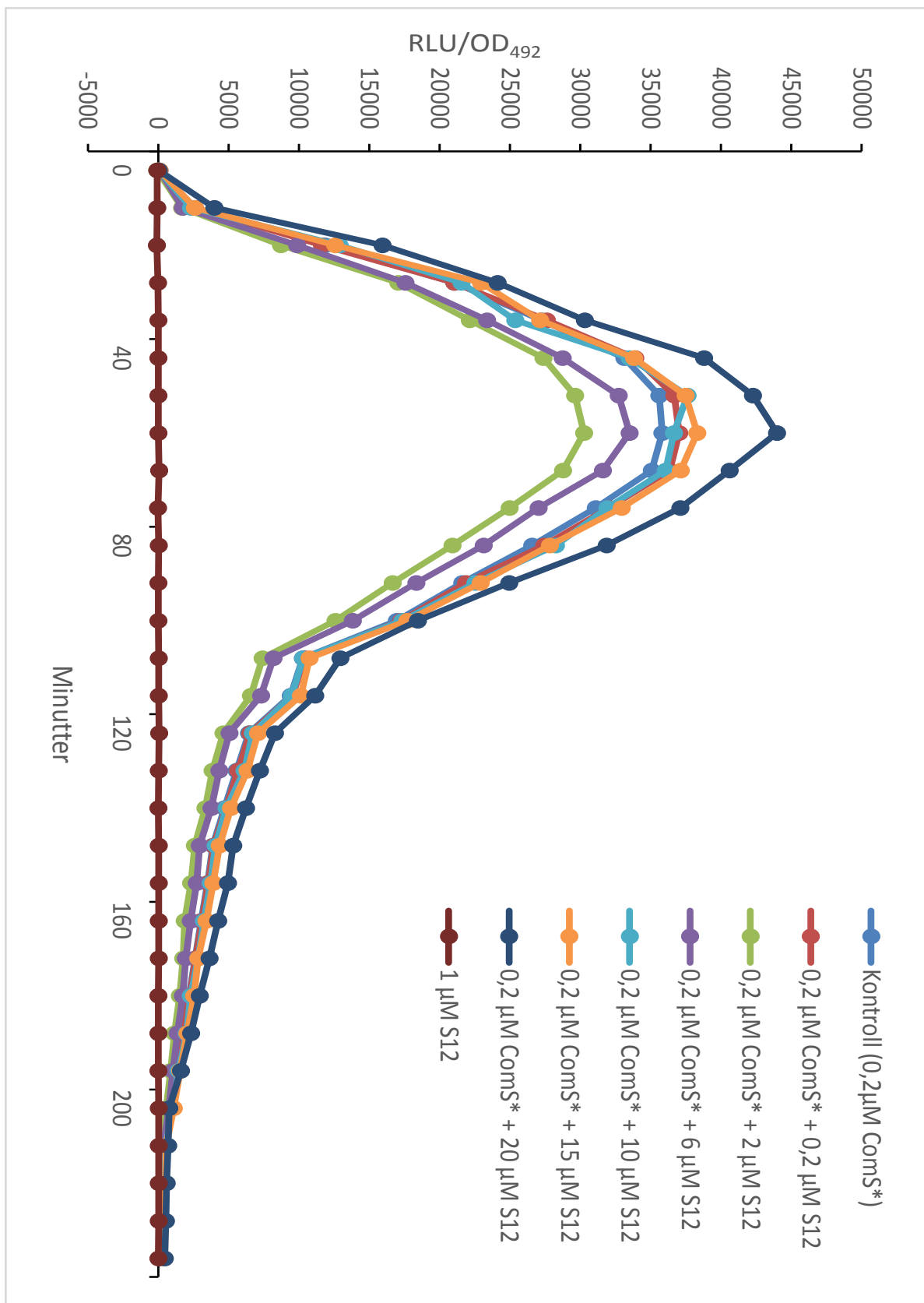
Figur A.15 Vekstkurve for SPH158 dyrket med S4. SPH158 ($P_{comX}::pbp2b$) ble fordyrket med 0,2 μM S4 og ved $OD_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble induisert med 0,2 μM S4 og inkubert ved 37 $^{\circ}\text{C}$ og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 10 minutt i totalt 600 minutter.

A.16 Bioluminescens for SPH130 induisert med ComS* og tilsatt S12 fra start



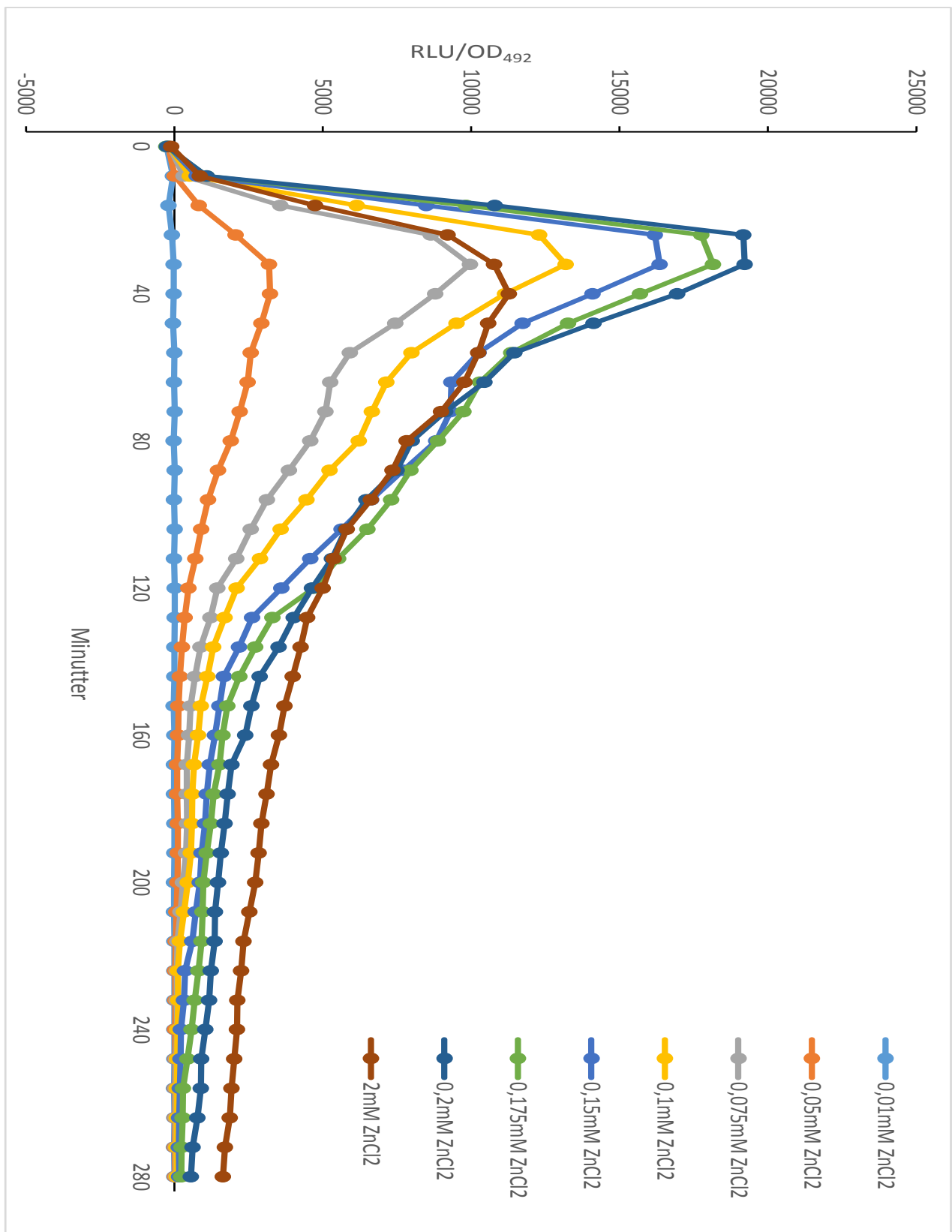
Figur A.16 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 induisert med ComS* og S12. SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble fra $OD_{550} \sim 0,05$ induisert med $0,2 \mu\text{M}$ ComS* og ulike konsentrasjoner av S12 ($0,2$ - $20 \mu\text{M}$) og inkubert ved 37°C . Luminescens (RLU) og vekst (OD_{492}) ble målt hvert 8 minutt i ca. 200 minutter.

A.17 Bioluminescens for SPH130 induisert med ComS* og tilsatt S12 etter 30 min



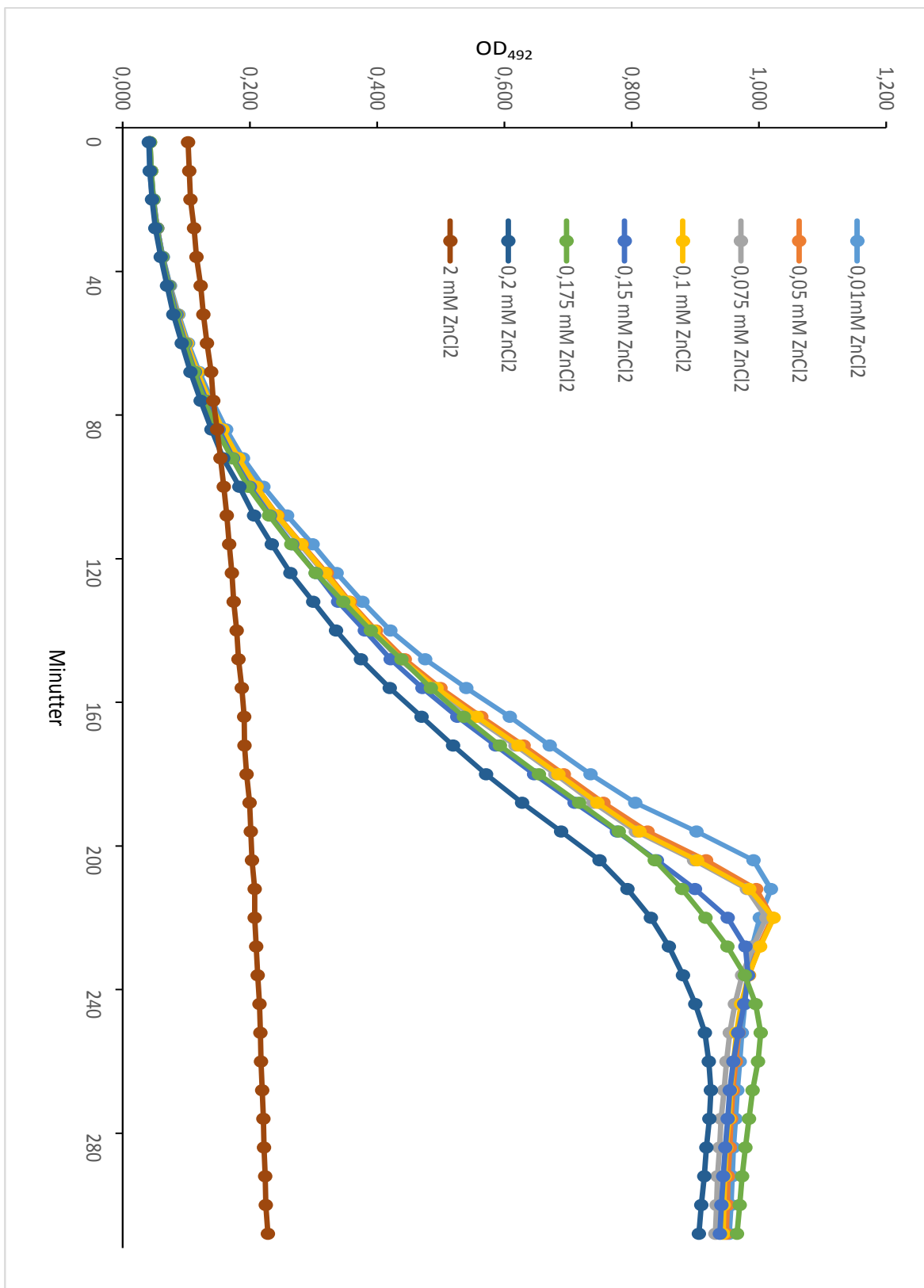
Figur A.17 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 induisert med ComS* og S12. SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble fra OD₅₅₀~0,05 induisert med 0,2 μM ComS* eller 1 μM S12 og inkubert ved 37 °C. Etter ca. 30 minutter ble S12 (0,2-20 μM) tilsatt. Luminescens (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 8 minutt i ca. 250 minutter.

A.18 Bioluminescens for KW12 dyrket i vanlig C-medium induert med ZnCl₂



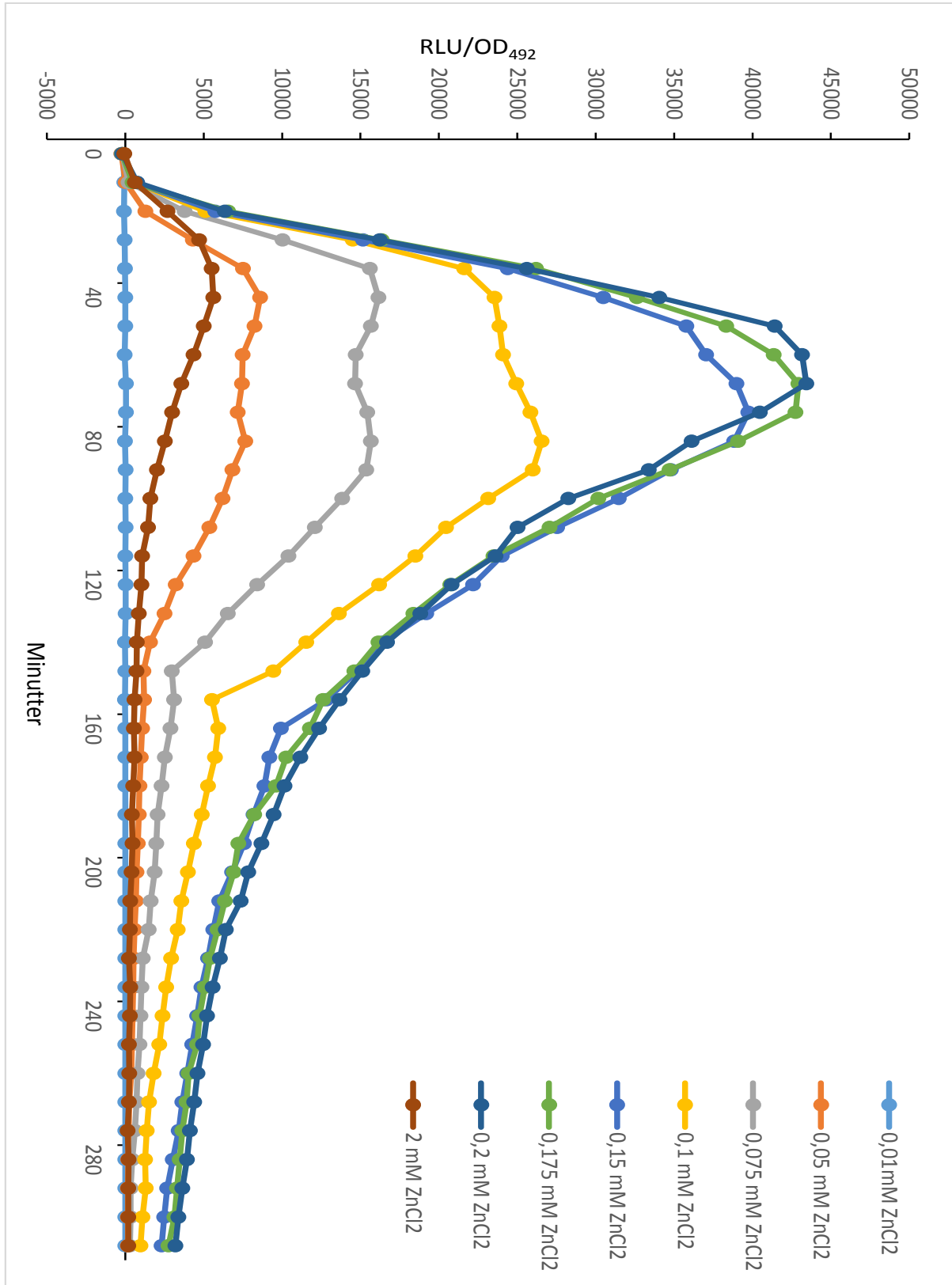
Figur A.18 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for KW12 induert med ZnCl₂. KW12 (*P_{czcd}::luc*) ble dyrket i vanlig C-medium og fra OD₅₅₀~0,05 induert med ZnCl₂ og inkubert ved 37 °C. Luminescens (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 8 minutt i ca. 280 minutter.

A.19 Vekstkurve for KW12 dyrket i vanlig C-medium og indusert med ZnCl₂



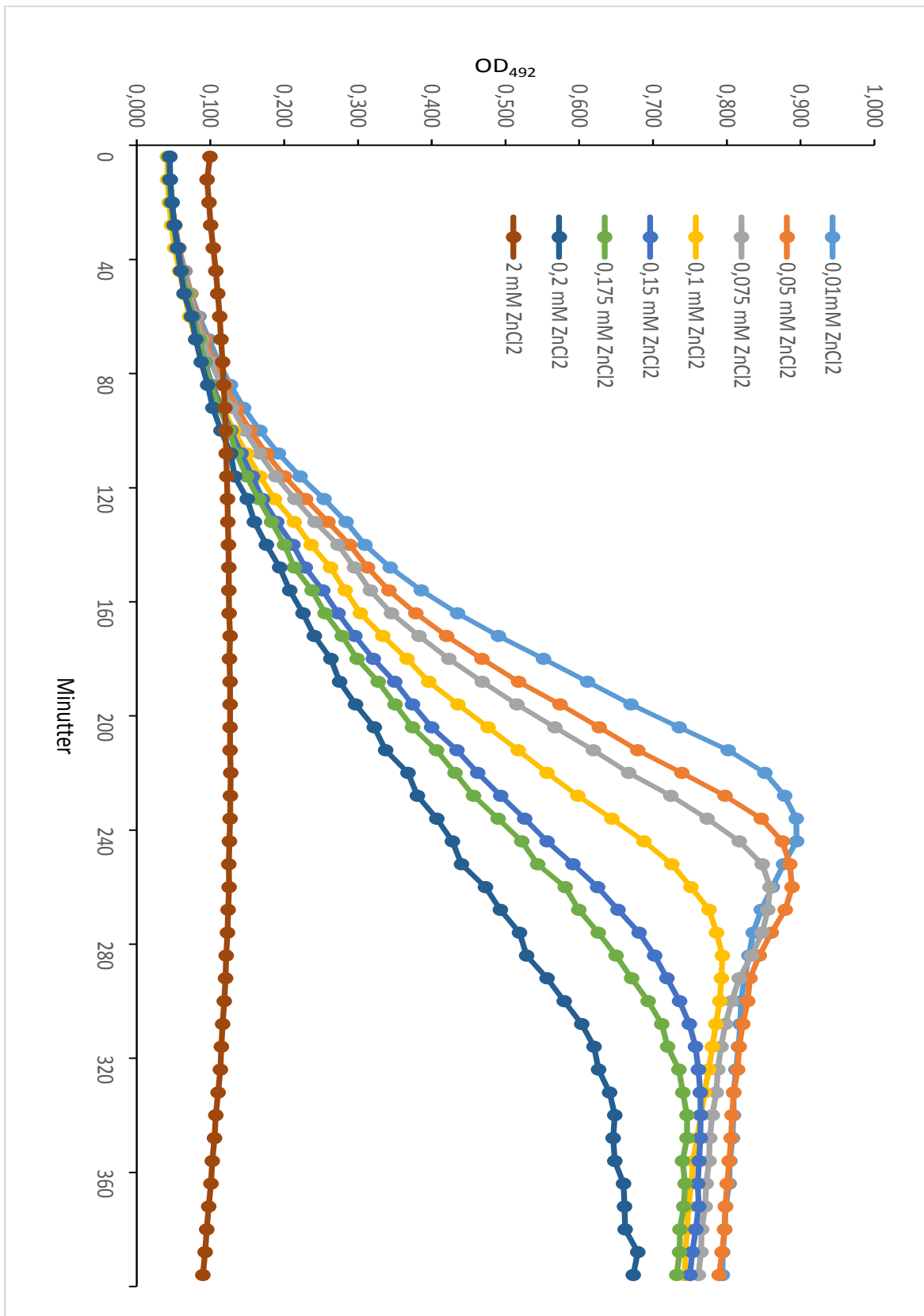
Figur A.19 Vekstkurve for KW12 indusert med ZnCl₂. KW12 (*P_{czd}::luc*) ble dyrket i vanlig C-medium og fra OD₅₅₀~0,05 indusert med ulike konsentrasjoner av ZnCl₂ og inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 8 minutt i totalt 300 minutter.

A.20 Bioluminescens for KW12 dyrket i Zn²⁺-fritt C-medium og industert med ZnCl₂



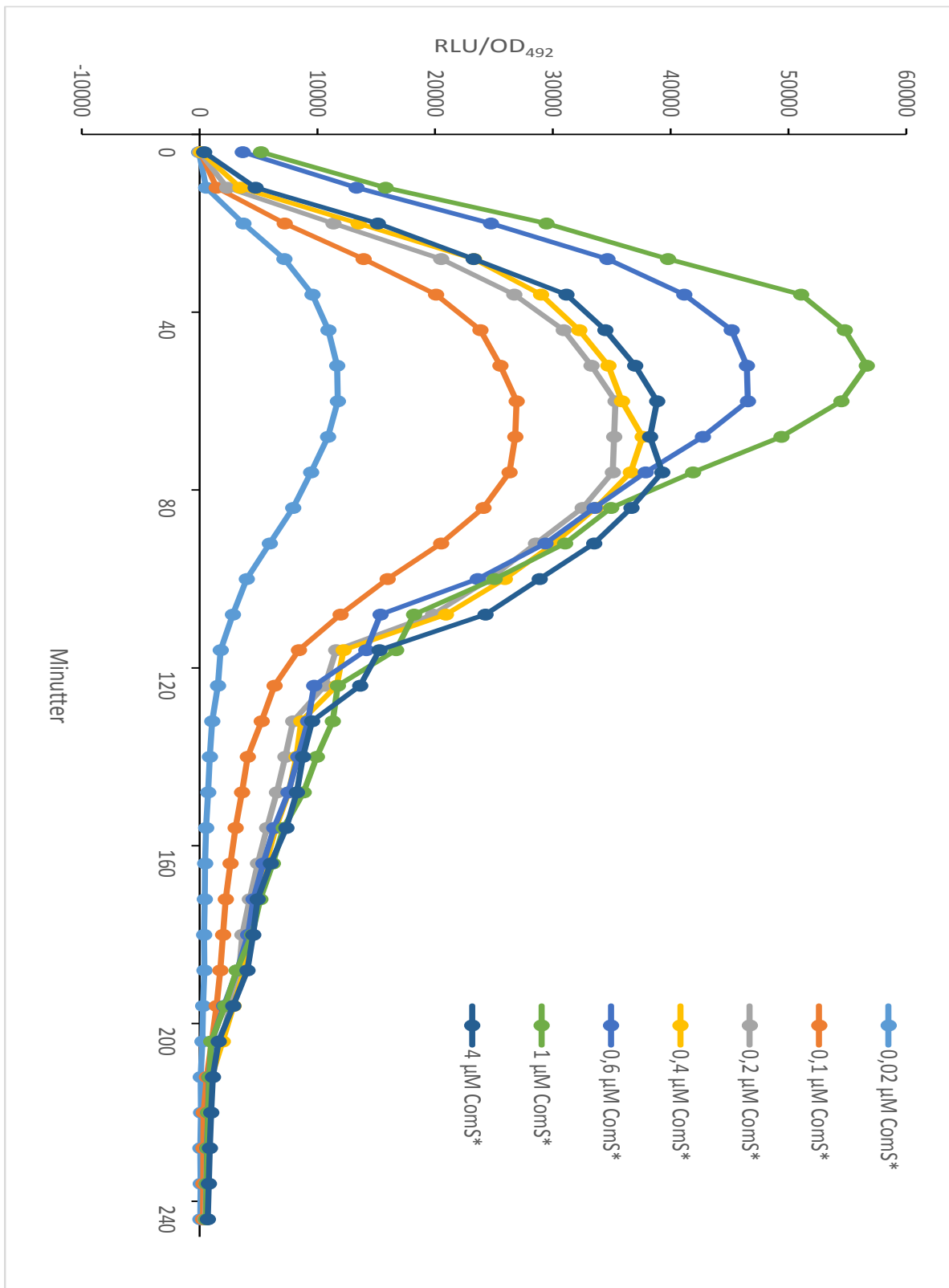
Figur A.20 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for KW12 industert med ZnCl₂. KW12 (*P_{ccd}::luc*) ble dyrket i Zn-fritt C-medium og fra OD₅₅₀~0,05 industert med ZnCl₂ og inkubert ved 37 °C. Luminescens (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 8 minutt i ca. 300 minutter.

A.21 Vekstkurve for KW12 dyrket i Zn²⁺-fritt C-medium og induisert med ZnCl₂



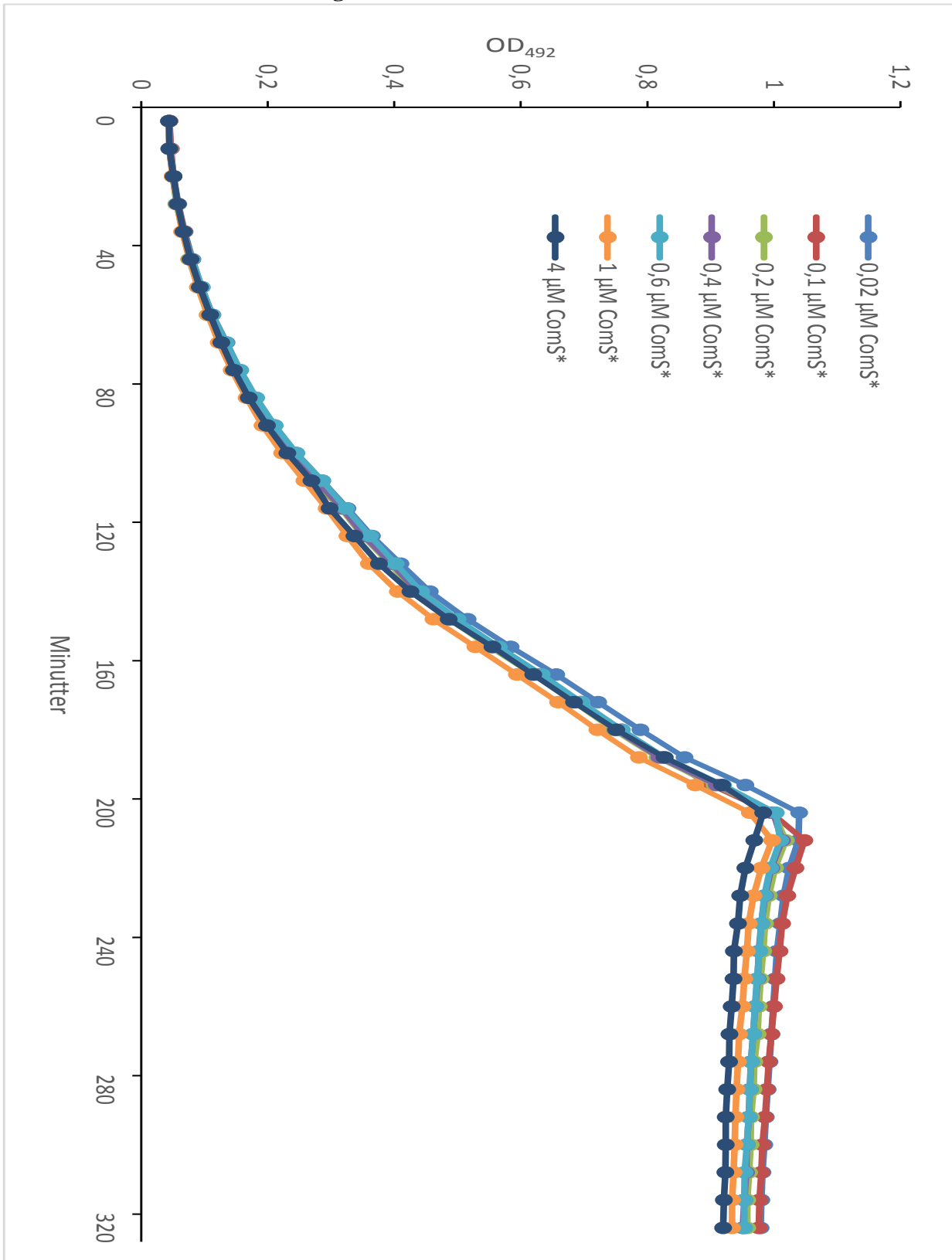
Figur A.21 Vekstkurve for KW12 induisert med ZnCl₂. KW12 (*P_{czcD}::luc*) ble dyrket i Zn-fritt C-medium og fra OD₅₅₀~0,05 induisert med ulike konsentrasjoner av ZnCl₂ og inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 8 minutt i totalt 400 minutter.

A.22 Bioluminescens for SPH130 induert med ComS*



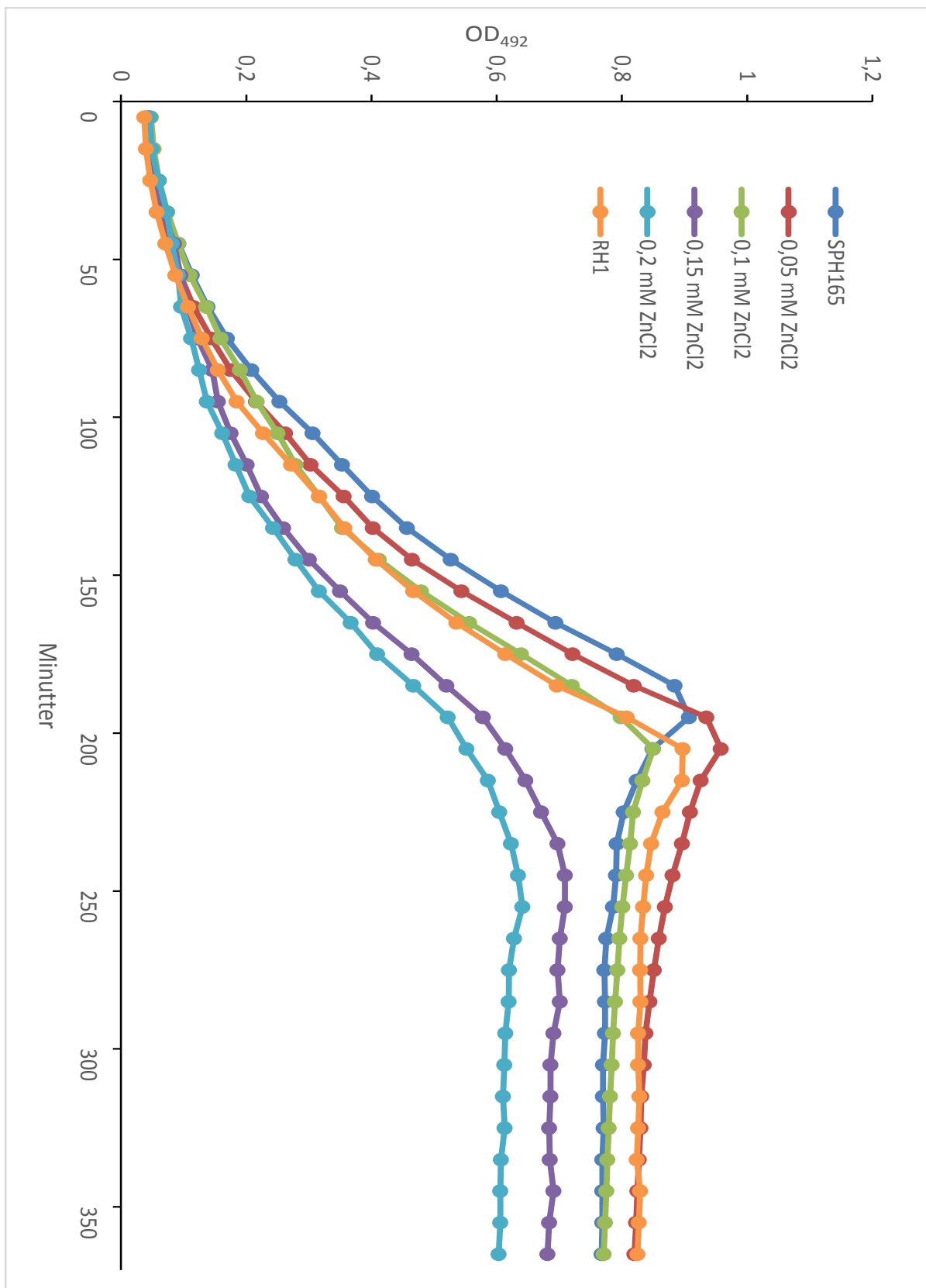
Figur A.22 Bioluminescens (RLU/OD₄₉₂) for SPH130 induert med ComS*. SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble ved OD₅₅₀~0,05 induert med ComS* og inkubert ved 37 °C. Luminescens (RLU) og vekst (OD₄₉₂) ble målt hvert 8 minutt i ca. 240 minutter.

A.23 Vekstkurve for SPH130 og induisert med ComS*



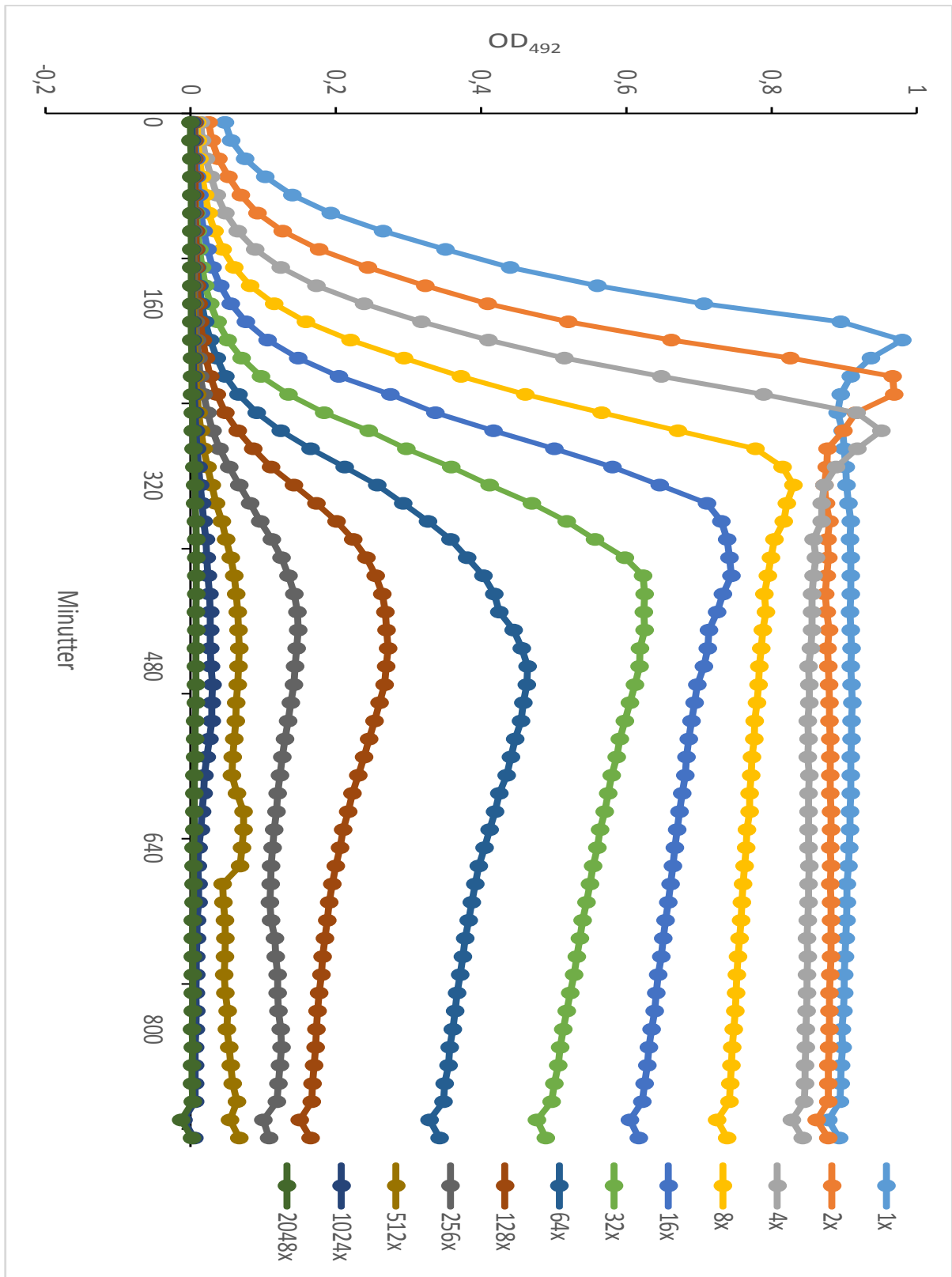
Figur A.23 Vekstkurve for SPH130 induisert med ComS*. SPH130 ($P_{comX}::luc$) ble fra $\text{OD}_{550} \sim 0,05$ induisert med ulike konsentrasjoner av ComS* og inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 9 minutt i ca. 320 minutter.

A.24 Vekstkurve for KW15 indusert med ZnCl₂



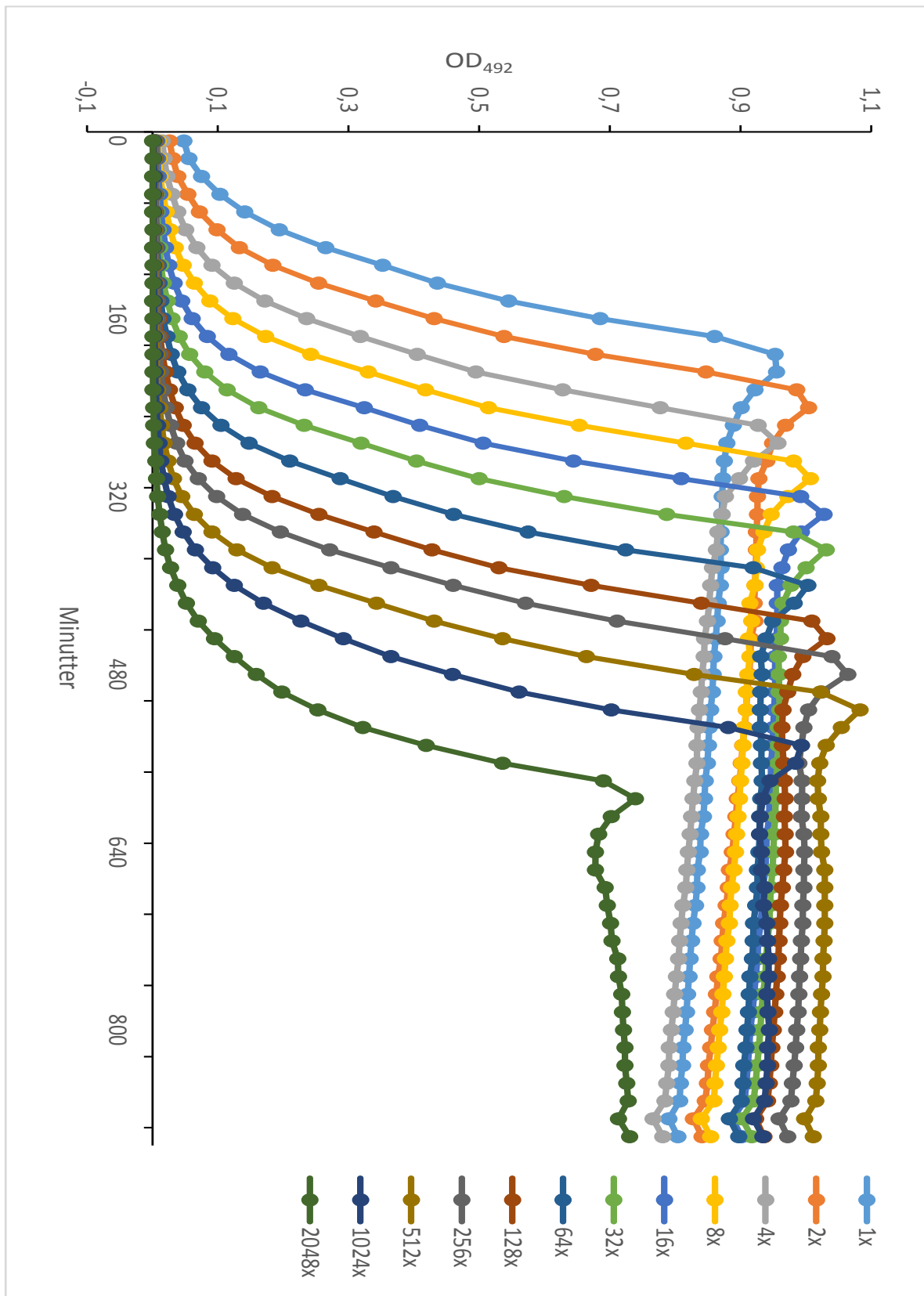
Figur A.24 Vekstkurve for KW15, SPH165 og RH1. Fra OD₅₅₀~0,05 ble KW15 (*P_{ccdB}::p_{bp2x}*) indusert med ZnCl₂, SPH165 indusert med ComS* og RH1, og inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 10 minutt i ca. 360 minutter.

A.25 Depletion av PBP2x – uindusert SPH165 fordyrket med 0,2 μM ComS*



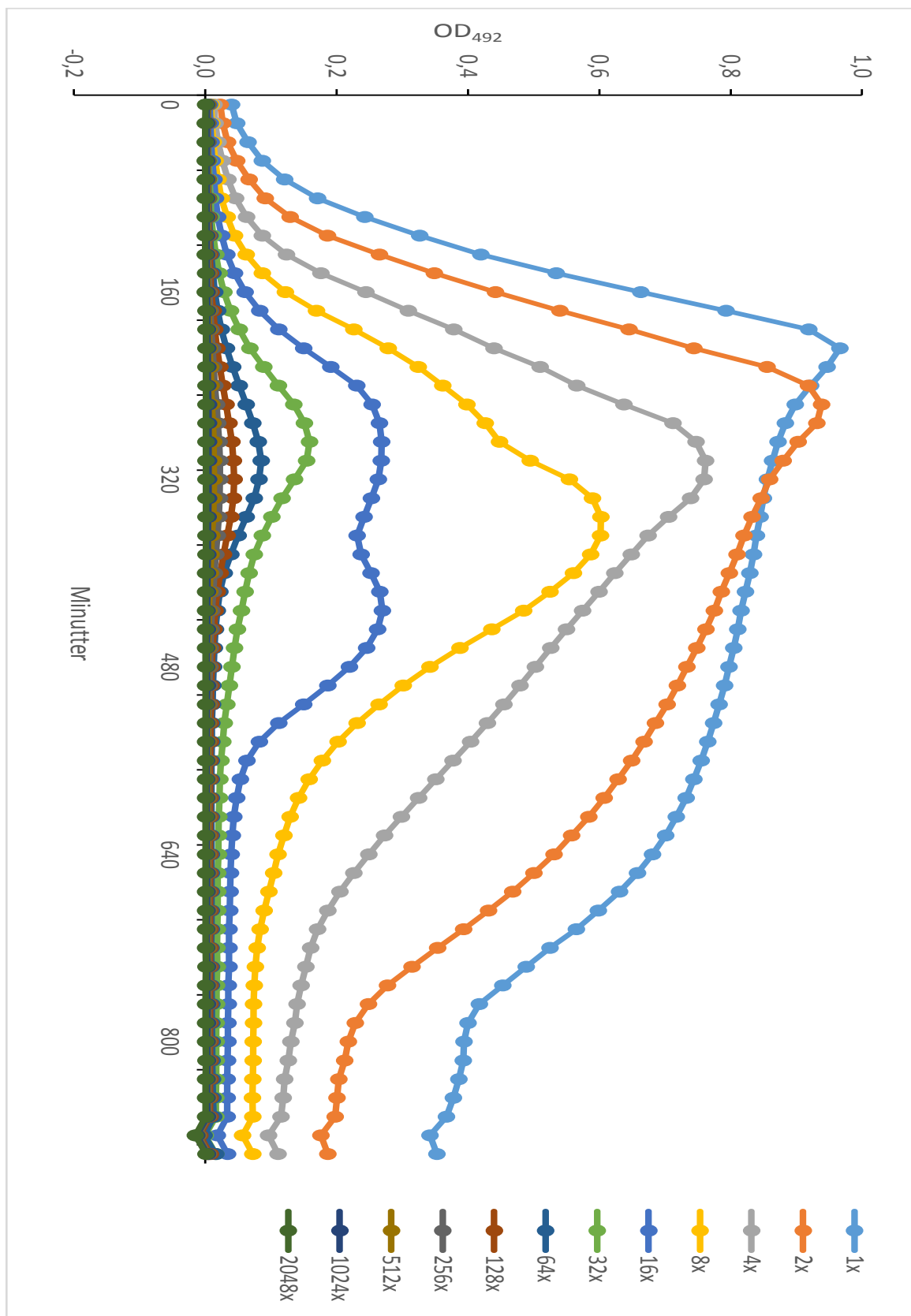
Figur A.25 Vekstkurve for SPH165 fordyrket med ComS*. SPH165 (*P_{comx}::p_{bp2x}*) ble fordyrket med 0,2 μM ComS* og ved OD₅₅₀~0,05 ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 15 minutt i ca. 850 minutter.

A.26 Depletion av PBP2x – SPH165 indusert med 0,2 μM ComS*



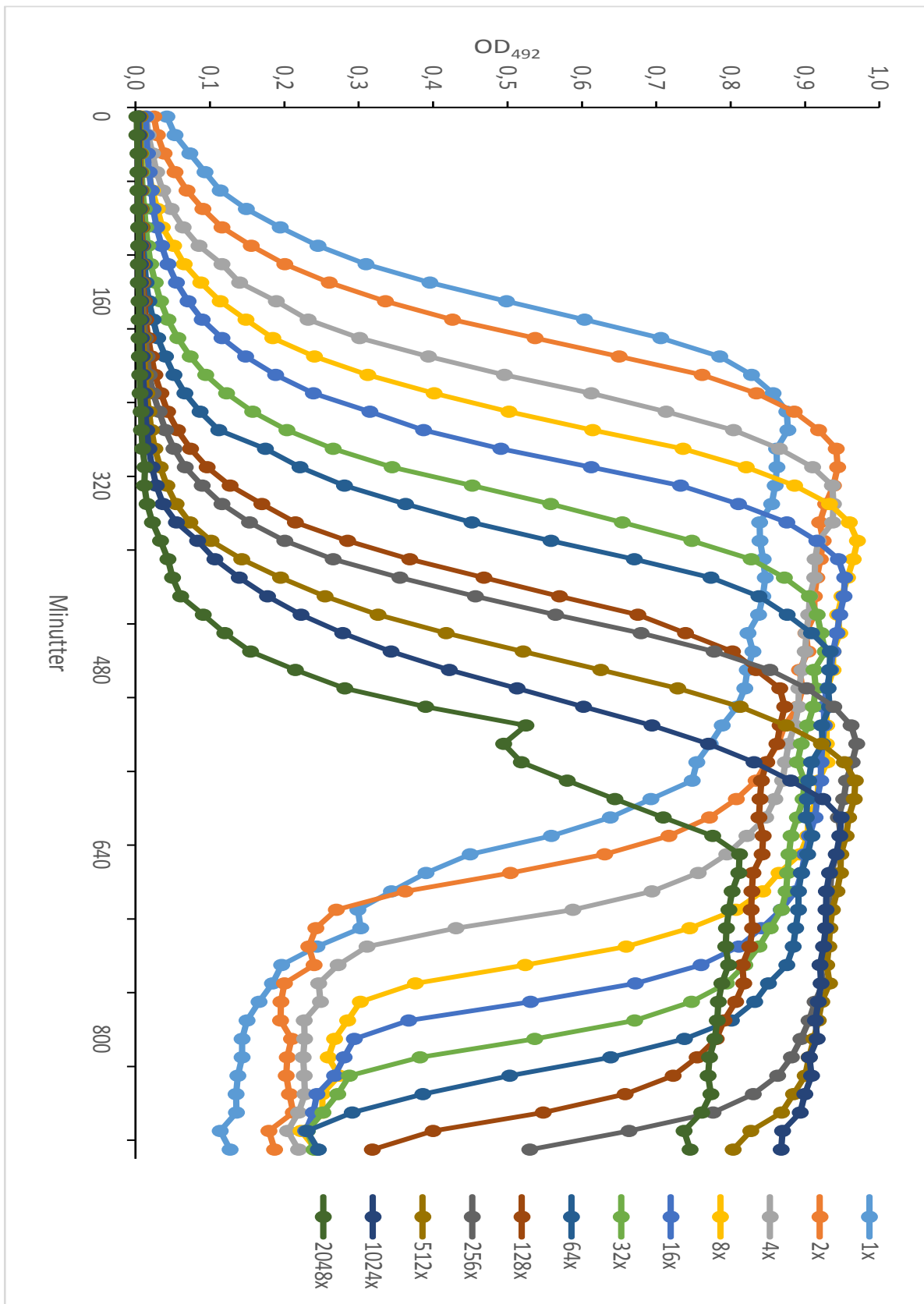
Figur A.26 Vekstkurve for SPH165 dyrket med ComS*. SPH165 ($P_{comX}::pbp2x$) ble fordyrket med 0,2 μM ComS* og ved $OD_{550} \sim 0,05$ ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble indusert med 0,2 μM ComS* og inkubert ved 37 °C og veksten (OD_{492}) ble målt hvert 15 minutt i ca. 900 minutter.

A.27 Depletion av PBP2x – KW15 (fördyrket med 0,1 mM ZnCl₂)



Figur A.27 Vekstkurve for KW15 fördyrket med ComS*. KW15 (*P_{c_zD::pbp2x}*) ble fördyrket med 0,1 mM ZnCl₂ og ved OD₅₅₀~0,05 ble det laget en 2-folds fortynningsrekke av celler. Cellene ble inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 15 minutt i ca. 900 minutter.

A.28 Depletion av PBP2x – KW15 (indusert med 0,1 mM ZnCl₂)



Figur A.28 Vekstkurve for KW15 dyrket med ZnCl₂. KW15 (*P_{comX}::p_{bp2x}*) ble fordyrket med 0,1 mM ZnCl₂ og ved OD₅₅₀~0,05 ble det laget en 2-folds fortyningsrekke av celler. Cellene ble indusert med 0,1 mM ZnCl₂ og inkubert ved 37 °C og veksten (OD₄₉₂) ble målt hvert 15 minutt i ca. 900 minutter.

Vedlegg B – Benevninger, forkortelser og aminosyreforkortelser

B.1 Benevninger

°C	Grader celcius
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
bp	Basepar
g	gram
Kb	Kilobaser
l	Liter
M	Molar
mM	millimolar
Mm	Molar masse
mg	milligram
min	Minutter
mL	Milliliter
ng	nanogram
nm	Nanometer
rpm	Revolutions per minutt
sek	sekunder
U/µl	Units per mikroliter
V	Volt

B.2 Forkortelser

Δ (f.eks $\Delta pbp2x$)	Delta, symboliserer delesjon av et gen/genelement
:: (for eksempel. $\Delta pbp2x::janus$)	Betegner elementet som er satt inn i posisjonen til genet/elementet som er deletert.
~	Tilnærmet/ca.
aa	Aminosyre
ACN	Acetonitrill
C	Cytosin
CSP	Competence simulating peptide

dNTP	Deoksynukleosid trifosfat
ddATP	Dideoksy-adenosintrifosfat
ddCTP	Dideoksy-cytidintrifosfat
ddGTP	Dideoksy-guanintrifosfat
ddNTP	Dideoksy-nukleosidtrifosfat
ddTTP	Dideoksy-thymintrifosfat
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Ery ^R	Erytromycin resistens
HPLC	<u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
Kan ^R	Kanamycin resistant
Kan ^S	Kanamycin sensitiv
G	Guanin
gDNA	Genomisk DNA
GFP	Green fluorescent protein
MQ-vann	Milli-Q-vann
NaAc	Natriumacetat
OD	Optisk tetthet
OD ₄₉₂	Optisk tetthet ved 492 nm
OD ₅₅₀	Optisk tetthet ved 550 nm
PBP	Penicillinbindende protein
PCR	Polymerase chain reaction
Rgg	regulator gene of glucosyltransferase
RLU	Relative Light Units
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat <u>p</u> olyakrylamid <u>g</u> e <u>l</u> ektroforese
Sm ^R	Streptomycin resistant
Sm ^S	Streptomycin sensitiv
Spc ^R	Spectinomycin resistant
TAE-buffer	Tri-Acetate-EDTA-buffer
Tet ^R	Tetracyclin resistens
TCA-syklus	Tricarboxylic acid syklus
TEMED	Tetrametylendiamin

T _m	Smeltetemperatur
TH-agar	Todd Hewitt agar
UV	ultrafiolett
WHO	World Health Organisation
wt	Villtype

B.3 Aminosyreforkortelser

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
F	Fenylalanin
G	Guanin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Metionon
N	Aspargin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptofan
Y	Tyrosin



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no