



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

EcsAB ATP-binding kassett (ABC) transporter sin funksjon i stressrespons hos *Staphylococcus haemolyticus*

EcsAB ATP-binding cassette (ABC) transporter
function in stress response in *Staphylococcus
haemolyticus*

Emilie Victoria Jensen

Master Bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet som en avsluttende del av masterstudiet i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Arbeidet presentert i denne masteroppgaven ble utført fra august 2022 til mai 2023 på Mikrobiologisk avdeling (MIK) ved Oslo Universitetssykehus, og ved Laboratoriet for mikrobiell genteknologi (LMG) på NMBU, under veiledning av professor Dzung Bao Diep, Dr. Ingrun Alseth, førsteamanuensis Morten Kjos, og Ph.d-kandidat Thomas F. Oftedal.

Først og fremst vil jeg uttrykke min takknemlighet til Dzung for å ha gitt meg muligheten til å skrive denne oppgaven og for å ha introdusert meg for dette spennende temaet. Jeg vil takke han for hans engasjement, som ga meg inspirasjon og kunnskap i den tiden jeg hadde privilegiet av å lære av han. Takk til Ingrun for all støtte og oppmuntring gjennom hele oppgaven. Våre hyggelige samtaler har ikke bare bidratt til å løse konkrete problemer, men også bidratt til å skape et positivt og motiverende miljø rundt masteroppgaven, selv når veien videre til tider virket vanskelig. Videre ønsker jeg å rette en stor takk til Morten for hans verdifulle innspill og positive utstråling underveis i oppgaven. Takk også til Thomas for å påta seg veilederrollen og all ansvaret som det medfølger på kort tid. Spesielt takk for raske tilbakemeldinger, som har vært helt uvurderlige for min fremgang i oppgaven.

Jeg vil gjerne takke de ansatte ved MIK og LMG, dere har bidratt til at denne perioden har vært både lærerik og minneverdig. Fra første dag har dere fått meg til å føle meg trygg og velkommen. Dere har alltid vært tilgjengelige for å hjelpe meg når jeg har hatt behov for det, og det er jeg virkelig takknemlig for.

Til slutt vil jeg takke Linn Ustvedt Brechan for all støtte, det har betydd mye for meg gjennom alle utfordringer under stressende perioder i studiet. Våre diskusjoner underveis har hjulpet meg med å få nye perspektiver og ideer som har vært til stor hjelp.

Sammendrag

Staphylococcus haemolyticus er et økende problem innen humanmedisin hvor den ofte forårsaker hudinfeksjoner i mennesker med svekket immunforsvar. Samtidig gjør dens virulensegenskaper, som biofilmdannelse og antibiotikaresistens, behandling utfordrende. Derfor har alternative behandlingsmetoder som bakteriociner, små antimikrobielle peptider, blitt undersøkt om de kan bidra i å behandle infeksjoner av *S. haemolyticus*. Et nytt konstruert bakteriocin hybrid 1 (H1), er vist å være aktiv mot denne arten. Likevel har det blitt sett at resistente celler er utbredt når bakteriocinet testes *in vitro*, på grunn av celler med spontane mutasjoner i regulator av sigma-E protease (*rseP*) genet og/eller et gen kodende for en ABC-transporter kalt effekt på eksoproteiner, defekt i kompetanse og sporulering AB (*ecsAB*). Bakteriocinet H1 er vist å drepe målceller via en interaksjon med RseP, og EcsAB har en viktig men ukjent kobling til RseP. Genene for disse er vist å være viktige for stressrespons, virulens og biofilmdannelse i flere andre arter, men funksjonen i *S. haemolyticus* er ukjent.

I denne oppgaven var målet å få en økt forståelse for hvilken rolle EcsAB har i biofilmdannelse og stressrespons til *S. haemolyticus*, og som følge undersøke om H1-resistente mutanter har svekket levedyktighet. Dette ble gjort ved å undersøke og sammenligne fenotypiske forskjeller mellom villtype og mutanter med ikke funksjonelt EcsB. Virulensegenskaper, slik som motstandsevne mot ulike antimikrobielle midler og evne til å danne biofilm ble undersøkt. For å få en dypere innsikt i genregulering ble forskjeller i mRNA nivåer av ulike gener hos mutant og villtype undersøkt med og uten stress. Dette ble undersøkt ved å utsette cellene for bakteriocinet garvicin KS (GarKS) og undersøke genuttrykk av et utvalg sentrale gener med revers transkriptase-kvantitativ polymerasekjedereaksjon (RT-qPCR).

Resultatene viste at mutanter av *S. haemolyticus* med ikke fungerende EcsAB hadde en svekket evne til å danne biofilm sammenlignet med villtype og svakere motstandsevne mot GarKS. I tillegg viste RT-qPCR analysen signifikante forskjeller i uttrykk av *DUF418* (protein med ukjent funksjon) og stafylokokk respiratorisk respons A (*srrA*), der villtype hadde en høyere oppregulering av disse genene under stress enn det sett for *ecsB*-mutanten. Dette kan tyde på at reguleringen av disse genene er sterkt knyttet til EcsB og at disse genene er viktig for normal stressregulering hos *S. haemolyticus*.

Abstract

Staphylococcus haemolyticus is an increasing problem in human medicine where it often causes skin infections in people with weakened immune systems. At the same time, its virulence factors such as biofilm formation and antibiotic resistance make treatment challenging. Therefore, alternative treatment options such as bacteriocins, small antimicrobial peptides, have been investigated to see if they can treat *S. haemolyticus* infections. A newly engineered bacteriocin hybrid 1 (H1) has been shown to be active against this species. Nevertheless, it has been observed that resistant cells are prevalent when the bacteriocin is tested *in vitro* due to cells with spontaneous mutations in the regulator of sigma-E protease (*rseP*) and/or an ABC-transporter named effect on exoproteins, defect in competence and sporulation AB (*ecsAB*). These genes have been shown to be important for stress response, virulence, and biofilm formation in several other species, but the functions in *S. haemolyticus* are still unknown.

In this thesis, the aim was to gain an increased understanding of the role EcsAB has in biofilm formation and stress response in *S. haemolyticus*, and as a result investigate whether H1-resistant mutants have impaired fitness. This was done by examining and comparing phenotypic differences between wild type and mutants with non-functional EcsB. Virulence properties, such as resistance to various antimicrobial agents and ability to form biofilm were investigated. To gain a deeper insight into gene regulation, differences in the mRNA level of various genes in mutant and wild type strains were investigated with and without stress. This was investigated by exposing the cells to the bacteriocin garvicin KS (GarKS) and examining gene expression levels of a selection of genes by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

The results showed that mutants of *S. haemolyticus* with non-functioning EcsAB had a weakened ability to form biofilm compared to wild type and weaker resistance to GarKS. In addition, RT-qPCR analysis showed significant differences in the expression of *DUF418* and *srrA*, where wild type had a higher up-regulation of these genes under stressful conditions than seen for the *ecsB* mutant. This may indicate that the regulation of these genes is strongly linked to EcsB and that these genes are important for normal stress regulation in *S. haemolyticus*.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse	IV
Forkortelser	VI
1. Introduksjon	1
1.1 <i>Staphylococcus haemolyticus</i> - økt klinisk betydning.....	1
1.1.2 Biofilmdannelse hos stafylokokker	1
1.1.3 Genomplastisitet i <i>S. haemolyticus</i>	3
1.3 Miljøtilpasning hos bakterier	4
1.3.1 RseP.....	5
1.3.2 RseP og EcsAB – en viktig duo	7
1.4 Bakteriociner- et alternativ til antibiotika	8
1.4.1 LsbB familien med lederløse bakteriociner.....	9
1.5 Mål med oppgaven	12
2. Materiale og metode	13
2.1 Bakteriestammer og kultiveringsforhold.....	13
2.2 Isolering av H1-resistente mutanter	13
2.2.1 PCR og sekvensering av <i>rseP</i>	13
2.2.2 Dataanalyse av <i>rseP</i> sekvenseringsresultater	14
2.2.3 Helgenomsekvensering	14
2.2.4 Predikering og visualisering av RseP struktur	15
2.3 Propidiumjodid poredannelsesanalyse	15
2.4 Antimikrobielltesting	16
2.4.1 Minimum inhiberende konsentrasjon.....	16
2.4.2 Synergi analyse	16
2.4.3 Antibiotikasensitivitet	17
2.4.4 Vekstkurver	17
2.5 Biofilmdannelse	18
2.6 RT-qPCR.....	18
2.6.1 RNA isolering og revers transkribering	18
2.6.2 Primerdesign for RT-qPCR.....	19
2.6.3 Oppsett og program for RT-qPCR	20

2.7 Statistiske analyser	20
3. Resultater	21
3.1 H1-resistente mutanter har mutasjon i <i>rseP</i> eller <i>ecsB</i>	21
3.2 GarKS er aktiv på membranen i <i>S. haemolyticus</i>	22
3.3 EcsB er viktig for motstandsdyktigheten mot stress	23
3.4 EcsB er viktig for normal vekst under stressende forhold	24
3.5 EcsB og RseP påvirker ikke antibiotikasensitivitet i <i>S. haemolyticus</i>	25
3.6 EcsB har liten påvirkning på antibiotikasensitivitet under stress.....	26
3.7 EcsB er viktig for biofilmdannelse.....	27
3.8 EcsB påvirker stress via SrrA og DUF418.....	29
4. Diskusjon.....	31
5. Konklusjon og videre arbeid	36
5. Referanseliste	37
Vedlegg 1	i
Vedlegg 2	i
Vedlegg 3	ii

Forkortelser

aa	Aminosyrer
ABC-transporter	ATP-binding kassett transporter
Agr	Accessory gene regulator
AMPs	Antimikrobielle peptider
BHI	Hjerne hjerteinfusjon
bp	Basepar
cDNA	Komplementær DNA
CoNS	Koagulasenegative stafylokokker
CoPS	Koagulasepositive stafylokokker
ECF	Ekstracytoplasmisk funksjon
EcsAB	Effekt på eksoproteiner, defekt i kompetanse og sporulering AB
eDNA	Ekstracellulært DNA
EntEJ97	Enterocin EJ97
EntK1	Enterocin K1
EPS	Ekstracellulær polymerisk substans
FIC	Fraksjonell hemmende konsentrasjon
g	G-kraft
GarKS	Garvicin KS
gDNA	Genomisk DNA
H1	Bakteriocin hybrid 1
HK	Histidin kinase
HYP	Hypotetisk protein
LMG	Laboratoriet for Mikrobiell Genteknologi
LPS	Lipopolysakkarider
LsbB	Lactococcal small bacteriocin B
MIC	Minimum inhiberende konsentrasjon
min	Minutter
MP1	Micrococcin P1
MRE β -løkke	Membran-gjennomtrengende- β -løkke
NisA	Nisin A
OMP	Ytre membranprotein
ON	Overnatt
ORF	Åpen leseramme
PBP2a	Penicillin bindende protein 2a
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PI-assay	Propidiumjodid basert poredannelsesanalyse
PSM	Fenolløselige moduler
QS	Quorum sensing
RIP	Regulert intramembran proteolyse
RNA	Ribonukleinsyre
RNAP	RNA polymerase
rpm	Omdreining per minutt
RR	Respons regulator
RseP	Regulator av sigma E protease
RT-qPCR	Revers transkriptase-kvantitativ polymerasekjedereaksjon

S1P	Posisjon-1-protease
S2P	Posisjon-2-protease
SCC	<i>Staphylococcus</i> kassettkromosom
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sek	Sekunder
SNPs	Enkeltnukleotid polymorfismer
SrrAB	Stafylokokk respirasjonsrespons AB
TAE	Tris acetat EDTA buffer
TM	Transmembran
TSB-G	Tryptisk soy medium med glukose
WT	Villtype

1. Introduksjon

1.1 *Staphylococcus haemolyticus* - økt klinisk betydning

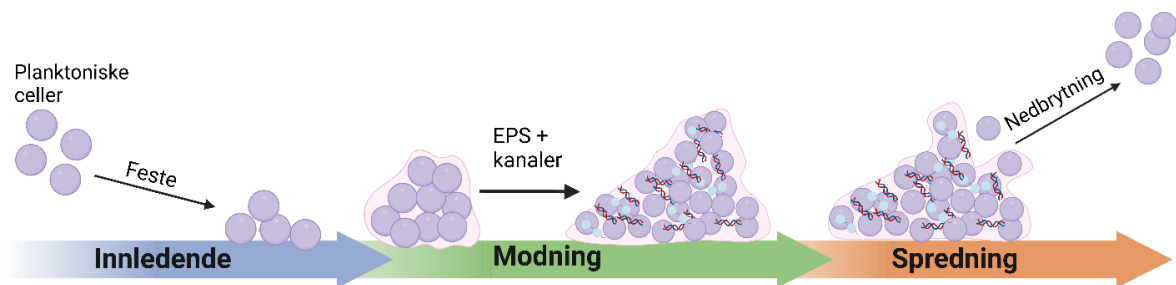
Staphylococcus haemolyticus er en Gram-positiv bakterie som tilhører koagulasenegative stafylokokker (CoNS), og er til stede som en naturlig del av menneskers slimhinner og hudmikrobiota¹. Likevel kan *S. haemolyticus* forårsake infeksjoner i mennesker, spesielt i mellomøret, hud og øyne, men også alvorlige infeksjoner som proteseinfeksjon, hjernehinnebetennelse, endokarditt, peritonitt, og blodforgiftning². Infeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus* er et spesielt økende problem i klinikker og sykehus (nosokomiale infeksjoner), særlig hos individer med nedsatt immunforsvar eller med implantater^{3,4}. I dag er *S. haemolyticus* den nest mest isolerte CoNS etter *Staphylococcus epidermidis* i nosokomiale infeksjoner⁵. På grunn av deres naturlige tilstedeværelse i hudmikrobiotaen, har rollen til CoNS som patogener blitt oversett og forskning har i stor grad fokusert på den mer virulente koagulasepositive stafylokokken (CoPS) *Staphylococcus aureus*⁵. Både *S. aureus*, *S. epidermidis* og *S. haemolyticus* er nært beslektet fylogenetisk og komparative genomiske analyser viser konserverte sekvenser i åpne leserammer (ORFs) hos alle tre arter⁶. På tross av deres nære beslektskap varierer virulensfaktorer betydelig mellom artene, og dermed deres patogenisitet. Virulensfaktorer er cellestrukturer, molekyler, og regulatoriske systemer i cellen som bidrar til infeksjon og sykdom⁷. Sammenlignet med andre stafylokokker har *S. haemolyticus* få kjente virulensfaktorer, likevel er nosokomiale *S. haemolyticus* isolater rangert som den mest antibiotikaresistente arten blant CoNS⁸. Dette medfører utfordringer når det kommer til behandling av infeksjoner forårsaket av denne arten. Dermed kan økningen av sykehusinfeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus* ses i sammenheng med bakteriens virulensfaktorer, som bidrar til økt antimikrobiell motstandsdyktighet og økt egenskap til å overleve i sykehusmiljøer⁹. Evnen *S. haemolyticus* har til å danne og spre resistensgener mot ulike antimikrobielle midler, i tillegg til å produsere biofilm har blitt ansett å være de viktigste virulensfaktorene hos denne arten^{6,10}.

1.1.2 Biofilmdannelse hos stafylokokker

Biofilm er et mikrobielt samfunn organisert i en tredimensjonal struktur omgitt av ekstracellulær polymerisk substans (EPS)¹¹. Hos stafylokokker består EPS av polysakkarider, proteiner og ekstracellulært DNA (eDNA), som bidrar til å feste/forankre cellene og beskytte biofilmen mot antimikrobielle midler og komponenter av vertens immunsystem¹².

Biofilmdannelse er ansett å være en stressrespons på endringer til ugunstige miljøforhold¹³. Biofilmdannelse er en kompleks prosess som kan deles inn i flere trinn, som blant annet reguleres av «accessory gene regulator» (Agr) systemet, som regulerer uttrykk av gener i henhold til celledensitet (quorum sensing; QS)^{14,15}. Quorum sensing er viktig i to av de tre fasene av biofilmdannelse; modning og spredning¹⁶. Agr systemet regulerer produksjonen av proteaser og fenolløselige moduliner (PSM)¹⁴. PSMer er spesielt viktig for dannelsen av kanaler gjennom biofilmen, som kan være viktig for diffusjon av signaliseringsmolekyler for kommunikasjon (feromoner og autoindusere) og forsyne cellene i biofilmen med næring¹⁷⁻¹⁹.

Biofilmdannelse består av tre hovedfaser (Figur 1.1); innledende fase, modningsfase og spredningsfase¹⁹. I den innledende fasen samles planktoniske (frittflytende) celler og fester seg til en biotisk eller abiotisk overflate ved bruk av overflateproteiner^{12,20}. Videre går bakteriene inn i en modningsfase der EPS blir dannet, bakterier opphopes slik at det dannes lag og den tredimensjonale strukturen tar form¹². I spredningsfasen skiller cellene ut proteaser i tillegg til PSMer som bryter ned biofilmen, dette frigjør «klaser» med celler som sprer seg og kan føre til spredning og infeksjon¹.



Figur 1.1. Biofilmdannelse. De tre hovedfasene i biofilmdannelse er; innledende fase, modningsfase og spredningsfase. Planktoniske celler fester seg og deretter dannes EPS og en tredimensjonal struktur tar form, før biofilmen brytes ned og bakteriene sprer seg. Figuren er laget med BioRender.com.

Biofilmdannelse er i stor grad induisert av ugunstige miljøforhold og gir bakteriecellene økt beskyttelse sammenlignet med planktoniske celler. Bakterieceller i biofilm er 10 til 1000 ganger mer motstandsdyktig mot antibiotika enn planktoniske celler²¹. Dette kommer blant annet av at EPS fungerer som en barriere som hindrer antibiotika i å komme ned i de dypere lagene i biofilmen¹². Dermed kan slike mikrobielle samfunn være utfordrende å forstyrre og bekjempe. I tillegg tillater den lagvise organiseringen av biofilmen at cellene blir differensielt utsatt for miljøforhold, noe som fører til ulikt uttrykk av gener avhengig av hvor i biofilmen cellene befinner seg¹². En slik stratifisering av celler i en biofilm fører til stor fysiologisk heterogenitet²². Disse mikromiljøene i biofilmen fører til celler med ulik metabolsk aktivitet,

inkludert en blanding av metabolsk aktive, inaktive og døde celler²³. Dette bidrar til den observerte motstandsdyktigheten mot antibiotika, siden mange antibiotika kun hemmer metabolsk aktive celler¹². I tillegg til at biofilm bidrar til økt motstandsdyktighet mot ulike antibiotika er det observert at celler i biofilm lettere kan spre resistensgener ved horisontal genoverføring¹².

1.1.3 Genomplastisitet i *S. haemolyticus*

Antibiotikaresistens er utbredt i *S. haemolyticus* med isolater som er resistente mot én eller flere klasser av antibiotika som brukes i dag; slik som penicilliner, makrolider, aminoglykosider, glykopeptider og tetrasykliner⁵. Mange av genene for antibiotikaresistens befinner seg på mobile genetiske elementer som gjør at de kan overføres til andre arter i stafylokokk slekten²⁴. Dermed er evnen *S. haemolyticus* har til å utvikle resistens bekymringsverdig, fordi arten kan være et reservoar for resistensgener for den mer virulente arten *S. aureus*²⁵. Spesielt urovekkende er genet for meticillin-resistens i *S. haemolyticus*, da dette har betydning for virkemåten til alle β -laktam antibiotika⁵.

Meticillinresistens kommer av *mecA* genet, som koder for penicillin-bindende protein 2a (PBP2a) som har lav affinitet for β -laktam antibiotika^{5,26,27}. Dette genet ligger på et stafylokokk kassettkromosom *mec* kalt *SCCmec*²⁸. Dette er et genområde (lokus) som kan overføres horisontalt mellom arter, noe som tyder på at *S. haemolyticus* kan spre resistensgener, og være et reservoar for denne kassetten²⁷. Ytterligere bevis for dette er gjort gjennom sekvenseringanalyse av *mecA* som viste en 99,95% sekvenslikhet mellom *S. haemolyticus*, *S. aureus* og *S. epidermidis*⁵.

Hos *S. haemolyticus* er det observert genetiske forskjeller i *SCCmec* kassetten²⁹. Lignende observasjoner er gjort på resten av genomet til *S. haemolyticus*²⁷. En sammenligning av 126 genomer fra *S. haemolyticus* mot et referansegenom ble det gjennomsnittlig funnet 10495 enkelt nukleotid polymorfismer (SNPs), noe som illustrerer den ekstraordinære genomplastisiteten til *S. haemolyticus*²⁷. Det er også observert et stort antall mobile elementer i genomet til *S. haemolyticus*, slik som insersjonssekvenser som kan øke mutasjonsfrekvensen og som en konsekvens bidra til artens tilpasning³⁰. Det har også vært spekulert i at insersjonssekvenser kan føre til genomiske omorganiseringer og bidra til resistens mot glykopeptider⁶.

1.3 Miljøtilpasning hos bakterier

Bakterier er avhengig av å raskt kunne tilpasse seg til stadige endringer i omgivelsene for å overleve og forbli konkurransedyktige³¹. Dette er spesielt viktig der fuktighet, saltinnhold, temperatur osv. ikke er ideelle, eller ved infeksjon hvor bakterier må motstå vertens immunforsvar. Dermed har bakterier utviklet forskjellige strategier for å kunne detektere og respondere til ulike stressfaktorer. Dette gjør bakterien med å endre hvilke gener som til enhver tid uttrykkes³². To slike strategier som er mye brukt av bakterier er alternative sigma-faktorer (σ -faktorer) med ekstracytoplasmisk funksjon (ECF) og to-komponent regulatoriske systemer³². Begge systemene fungerer som en mekanisme for å overføre informasjon fra utsiden av cellen til innsiden, og er involvert i å endre genuttrykk som respons på stress, for eksempel forstyrrelser i cellekonvolutten (cellemembran og cellevegg)^{33,34}.

To-komponent regulatoriske systemer består av en transmembran histidin kinase (HK), og en respons regulator (RR)^{35,36}. HK detekterer miljøsignaler og reagerer med å overføre en fosfatgruppe til RR³⁶. Fosforylering fører til at RR binder på DNAet og endrer transkripsjon av spesifikke gener³⁷. Et slikt system som er beskrevet hos stafylokokker er stafylokokk respirasjonsrespons AB (SrrAB), som har en viktig funksjon i å oppdage og å reagere på endret oksygenivå³⁸. SrrB er den membranbundne HK³⁹. Ved reduserte oksygenivåer blir SrrA fosforylert av SrrB, som så aktiverer transkripsjonen av en rekke gener knyttet til virulens, biofilmdannelse, og overlevelse ved redusert oksygentilgang^{38,40}.

I motsetning til to-komponent regulatoriske systemer, virker σ -faktorer direkte på RNA-polymerasen (RNAP) for å påvirke transkripsjon⁴¹. σ -faktorer binder reversibelt til RNAP og «rekrutterer» RNAP til spesifikke promotorer^{42,43}. I *S. aureus* er det funnet fire σ -faktorer, hvorav én er en primær σ -faktor (σ^A), mens de tre andre σ^H , σ^B og σ^S er alternative σ -faktorer⁴². Blant de tre alternative σ -faktorene er det kun σ^S som er klassifisert som en ECF σ -faktor⁴⁴⁻⁴⁶. Av de tre nevnte alternative σ -faktorene er σ^B mest studert, som er involvert i reguleringen av en generell stressrespons og en del virulensgener i *S. aureus*^{46,47}.

Undersøkelser tyder på at adhesjonsproteiner og katalaseaktivitet er regulert av σ^B ^{48,49}.

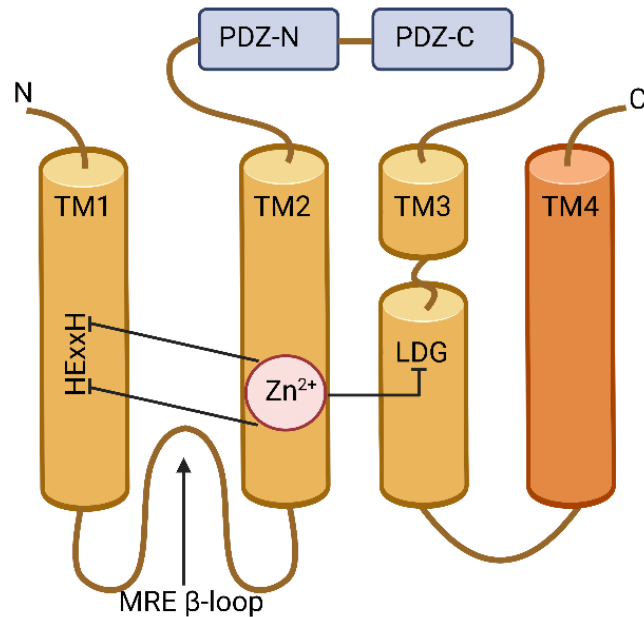
Funksjonen til σ^H i *S. aureus* er ikke godt kjent, men sekvenssammenstilling har vist likheter med en velkjent σ -faktor i *Bacillus subtilis* som involvert i sporulering⁴⁴. Siden *S. aureus* ikke er sporedannende er det derfor naturlig å tenke at denne σ -faktoren har en annen rolle i *S. aureus*. Morikawa *et al.* (2003) viste at overuttrykk av σ^H førte til økt ekspresjon av gener som er involvert i naturlig kompetanse, noe som tyder på at σ^H er involvert i regulering av

denne prosessen⁵⁰. ECF σ^S er viktig for genregulering under ugunstige forhold som en del av stressrespons i *S. aureus*⁵¹. Spesielt viktig er rollen til σ^S i regulering av gener knyttet til sult toleranse, samt vekst ved høye temperaturer⁴⁶.

De fleste ECF σ -faktorer er regulert av en anti- σ -faktor som fungerer som en negativ regulator av sin tilhørende σ -faktor⁵². En vanlig mekanisme for aktivering av en σ -faktor er at den tilhørende anti- σ faktoren spaltes av ved bestemte induserende signaler/miljøforhold⁵³. Den aktive σ -faktoren fører så til transkripsjon av gener som hjelper cellen med å gjenopprette homeostase/balanse⁴². Denne spaltningen foregår ofte via en mekanisme kalt regulert intramembran proteolyse (RIP), der miljøsignaler fører til en to-steps proteolytisk nedbrytning av anti- σ faktoren⁵⁴. RIP skjer ved at en posisjon-2-protease (S2P) kutter en anti- σ faktor inni membranen etter at den først er kuttet av en posisjon-1 protease (S1P) som så frigjør σ -faktoren til cytoplasma⁵⁴.

1.3.1 RseP

En godt beskrevet RIP mekanisme er i reguleringen av σ -faktoren σ^E i *Escherichia coli*. Denne σ -faktoren reguleres av RseP som er en S2P⁵⁵. Felles for alle S2P er at det aktive setet består av de konserverte sink-bindende motivene (HExxH) og XDG lokalisert på transmembrane segmenter av proteinet⁵⁶. Området rundt XDG regionen bidrar også til å binde substrat^{56,57}. Hos *E. coli* består RseP (Figur 1.2) av fire transmembrane segmenter (TM1-TM4), og to PDZ domener (PDZ-N og PDZ-C) som ligger i den periplasmiske regionen mellom TM2 og TM3^{58,59}. Posisjoneringen til disse PDZ domenene antas å fungere som et filter, der substrat med intakte periplasmiske domener blir sterisk hindret i å komme til det katalytiske setet⁶⁰. Dette filteret dannet av PDZ domenene fungerer dermed som et hinder for uønsket S2P spalting under ikke stressende forhold⁶¹. Videre er det karakterisert et annet viktig område i RseP hos *E. coli*, kalt membran-gjennomtrengende- β -løkke (MRE β -løkke) mellom TM1 og TM2⁶². Både LDG og MRE β -løkken bidrar sammen i å interagere med substrat⁶².



Figur 1.2. RseP hos *E. coli*. Fremstilling av de strukturelle elementer i RseP hos *E. coli*. Transmembrane (TM) segmenter er vist i oransje og PDZ-domene er vist i blått. Konservert katalytiske regionen (her TM1-TM3) inneholder zink-koordinerende motiv HEXXH og LDG, i tillegg til MRE β -loop. Figuren er laget i BioRender.com og tilpasset fra Kristensen (2023)⁶³.

Under gunstige forhold blir σ^E holdt inaktiv av anti- σ faktoren RseA (regulator av sigma-E A), men ved stress (ugunstige forhold) som påvirker cellekonvolutten blir det en akkumulering av feilfoldete ytre membranproteiner (OMPer) og frie lipopolysakkarider (LPS) i periplasma⁶⁴. Feilfoldete OMPer interagerer med PDZ-domenet til en periplasmisk protease DegS (S1P)⁶⁴. Dermed starter en kaskadereaksjon der DegS spalter RseA, som fører til at RseP kan spalte RseA videre slik at den C-terminale enden av RseA blir fri fra membranen og frigjort til innsiden av cellen^{61,65,66}. Videre i cytosol blir RseA prosessert av en ATP-avhengig protease (ClpXP) som gir modent σ^E , som videre kan aktivere gener involvert i stressrespons hos bakterien⁶⁷. Denne prosessen er regulert på flere nivå for å sikre at σ^E kun blir aktivert når nødvendig stressrespons er ønskelig. Først er RseP avhengig av at DegS har spaltet RseA⁶⁸. I tillegg er DegS er avhengig av inaktivering av RseB (regulator av sigma-E B), et periplasmisk protein som hindrer DegS å spalte RseA ved å binde til C-terminale enden til RseA⁶⁹. Det er antatt at RseB blir inaktivert når OMP og LPS akkumulerer i periplasma som følge av stresspåvirkning⁷⁰.

En lignende rolle for RseP som beskrevet i *E. coli* er også vist i den Gram-positive arten *Enterococcus faecalis*, der RseP er involvert som en S2P i aktivering av σ^V ⁷¹. Denne σ -faktoren er viktig for toleranse mot mange typer stress, som salt, etanol, tørke, høy

temperatur, men er også involvert i virulens⁷¹. Videre vist i *E. faecalis* er at RseP er viktig for modningen av en type signalmolekyler kalt sex feromoner⁷². Sex feromoner er små peptider som skilles ut av stammer som mangler visse plasmider, og aktiverer konjugasjon med celler som har plasmidet⁷². Det er også vist i *S. aureus*, som er nært beslektet med *S. haemolyticus*, at RseP er viktig for modning og utskillelse av sex feromonet staph-cAM373⁷³. Dette feromonet stimulerer horisontal genoverføring av plasmidet pAM373 fra *E. faecalis* til *S. aureus*⁷³. Av betydning både for modning og utskillelse av feromonene i disse artene er en ABC-transporter kalt EcsAB⁷⁴. En tilknytning og samspill mellom RseP og EcsAB er vist i flere arter, spesielt i *B. subtilis* der RseP ikke fungerer uten EcsAB⁷⁵.

1.3.2 RseP og EcsAB – en viktig duo

I ulike studier har det blitt vist at RseP sin funksjon avhenger av en funksjonell ABC-transporter EcsAB. ABC-transportere utgjør en stor familie av membrantransportere, som kan være både substratspesifikke eller multispesifikke, avhengig av deres rolle i cellen, der noen er viktige for næringsopptak, mens andre har som oppgave å eksportere cellulære komponenter til utsiden av plasmamembranen⁷⁶. Likevel, uavhengig om ABC-transporteren fungerer som en importør eller eksportør består de av den samme generelle strukturen med et transmembran permease og en cytoplasmisk ATP-bindende enhet, som hydrolyserer ATP og gir energi til transporteringsprosessen⁷⁷. ABC-transporteren EcsAB er vist å ha kobling til RseP i flere arter. Denne transporteren er satt sammen av EcsA og EcsB, som har funksjoner som henholdsvis ATPase og transmembran permease⁷⁸. Nøyaktig hvilke funksjon EcsAB transporteren har, om det er en importør eller eksportør, samt hvilke molekyler den frakter er uklart i de fleste arter⁷⁷. I *B. subtilis* er det vist at ikke-fungerende EcsAB fører til ikke-fungerende RseP, og det har dermed blitt foreslått at EcsAB har en «rengjøringsfunksjon» i cellen, som blant annet innebærer at den pumper ut klyøveproduktene fra RseP⁷⁷. Det er da spekulert i at en opphoping av kløyveprodukter i membranen hemmer RseP ved at de fortsatt har bindingsaffinitet til RseP selv etter kløyving.

Undersøkelser i *B. subtilis* med fjernet *ecsAB* viste en reduksjon i utskillelse av ekstracellulære proteiner og prosessering av signalpeptider⁷⁹. I tillegg ga defekt EcsAB akkumulering av forløpere til sekretoriske proteiner, noe som indikerer at EcsAB har en regulatorisk rolle i proteinsekresjon⁷⁹. Samtidig er det vist at EcsAB påvirker virulens i *S. aureus*, der manglende EcsAB førte til redusert virulens⁷⁷. Manglende EcsAB er også vist til å føre til redusert motstandsdyktighet ovenfor antimikrobielle stoffer, mulig grunnet endret eller

forstyrret membran- og cellevegg komposisjon⁷⁷. Videre har det hos *B. subtilis* blitt sett at EcsAB kan påvirke biofilmdannelse⁷⁸.

Gitt viktigheten til RseP i mange arter er denne proteasen foreslått som mål for utvikling av nye antimikrobielle stoffer⁸⁰. Det finnes nemlig en familie med antimikrobielle peptider, kjent som bakteriociner, som angriper RseP for å drepe målcellen⁸⁰. Bakteriociner har generelt sett en virkningsmåte som er forskjellig fra antibiotika, noe som gjør disse peptidene like aktive også mot antibiotika-resistente stammer⁸¹. Bakteriociner har derfor vært foreslått som en erstatning eller tillegg til antibiotika i kampen mot resistente patogener⁸².

1.4 Bakteriociner- et alternativ til antibiotika

Antibiotikaresistens er ansett som et av de mest kritiske globale problemene i dag, og utvikling av nye behandlingsalternativer er nødvendig for å overvinne sykdommer forårsaket av multiresistente bakterier^{83,84}. Av alternative metoder som har blitt sett å ha en mulig økt betydning fremover er bakteriociner⁸². Disse ribosomalt syntetiserte antimikrobielle peptidene er noe bakterier skiller ut med formål å hemme vekst eller drepe andre bakterier i konkurranse om habitat og næringsstoffer⁸⁵. Bakteriociner virker oftest bare mot samme bakterieart som produserer dem eller mot nært beslektede arter⁸⁵. Både Gram-positive og Gram-negative bakterier produserer bakteriociner. Likevel er flertallet av rapporterte bakteriociner produsert av Gram-positive bakterier og spesielt melkesyrebakterier, som kan forklares av deres probiotiske natur og at de generelt blir ansett som trygge, og brukes mye i matindustrien for konservering⁸⁶.

Generelt kan bakteriociner produsert av Gram-positive arter deles inn i to hovedklasser (Tabell 1.1) basert på om bakteriocinet er post-translasjonelt modifisert (klasse I) eller ikke (klasse II)⁸⁷. Begge klassene består av varmemestabile bakteriociner og kan videre deles inn i flere underklasser basert på struktur og/eller biosyntese⁸⁶. Klasse I deles inn i underklasser basert på type post-translasjonell modifikasjon, hvor den mest studerte underklassen er lantibiotika, som også hovedsakelig blir produsert av melkesyrebakterier⁸⁸. En vanlig virkemåte for disse bakteriocinene er poredannelse, som fører til økt membranpermeabilitet, cellelekkasje og celledød⁸⁹. Klasse II deles inn i fire underklasser (a-d), der klasse IIa består av lineære peptider med konsensussekvens (YGNGV)⁸⁸. Videre består klasse IIb av bakteriociner der virkemåten er avhengig av to peptider⁸⁸. Klasse IIc betegnes som lederløse bakteriociner, som betyr at de produseres uten en N-terminal ledersekvens, noe som gjør

denne klassen med bakteriociner spesielt aktuelle som behandling da disse er enkle å syntetisere og modifisere⁸⁸. Den siste klassen, IId, består av peptider uten den karakteristiske pediocin-boksen som er vanlig for klasse II bakteriociner⁸⁸. I tillegg er ofte de større (> 10 kDa) varmelabile antibakterielle proteinene, som bakteriolyser, plassert i klasse III⁹⁰.

Tabell 1.1. Klassifisering av bakteriociner produsert av Gram-positive bakterier⁶³.

Klasse	Underklasse	Kjennetegn	Eksempel
I (Modifisert)	Lantibiotika	Lantionin	Nisin
	Sykliske	Peptidbinding fra C- til N-terminus	Garvicin ML
	Tiopeptider mfl.*	Makrosykliske	Micrococcin P1
II (Ikke-modifisert)	IIa	Lineære pediocin-lignende peptider	Pedocin PA-1
	IIb	To-peptid bakteriociner	Plantaricin JK
	IIc	Lederløs, uten N-terminal	LsbB
	IId	Uten pediocin-boks	Lactococcin A

* mfl.; med flere. Tabellen viser kun et utvalg av underklasser for klasse I.

Bakteriociner har en rekke egenskaper som gjør de spesielt godt egnet som antimikrobielle midler, både som konserveringsmidler og til behandling mot infeksjoner med multiresistente bakterier^{91,92}. En viktig egenskap hos bakteriocin er at de ofte har en annen virkemåte enn antibiotika, og for eksempel kan bakteriociner binde spesifikke membranproteiner på overflaten til målcellen. Dette er ulikt virkemåten til mange antibiotika som forstyrrer ulike steg i celleveggsytelsen⁸⁷. For bakteriociner som forstyrrer celleveggsyntesen, slik som bakteriocinet nisin, så binder dette på andre måter enn antibiotika. Nisin binder til lipid II på et annet område enn bindingsstedet for vankomycin, og dermed har nisin fremdeles antimikrobiell aktivitet mot stammer som er resistente mot vankomycin⁹³. Andre fordelaktige egenskaper til bakteriociner i behandling av infeksjoner er at de i noen tilfeller har høyere effekt enn antibiotika, med antimikrobiell aktivitet selv ved pico- til nanomolar konsentrasjoner⁹⁴. I tillegg har noen bakteriociner enkel struktur som gjør dem enkle å produsere/syntetisere og modifisere^{95,96}. Dette er spesielt tilfelle for klasse IIc bakteriociner, som er små umodifiserte lederløse peptider⁹⁷.

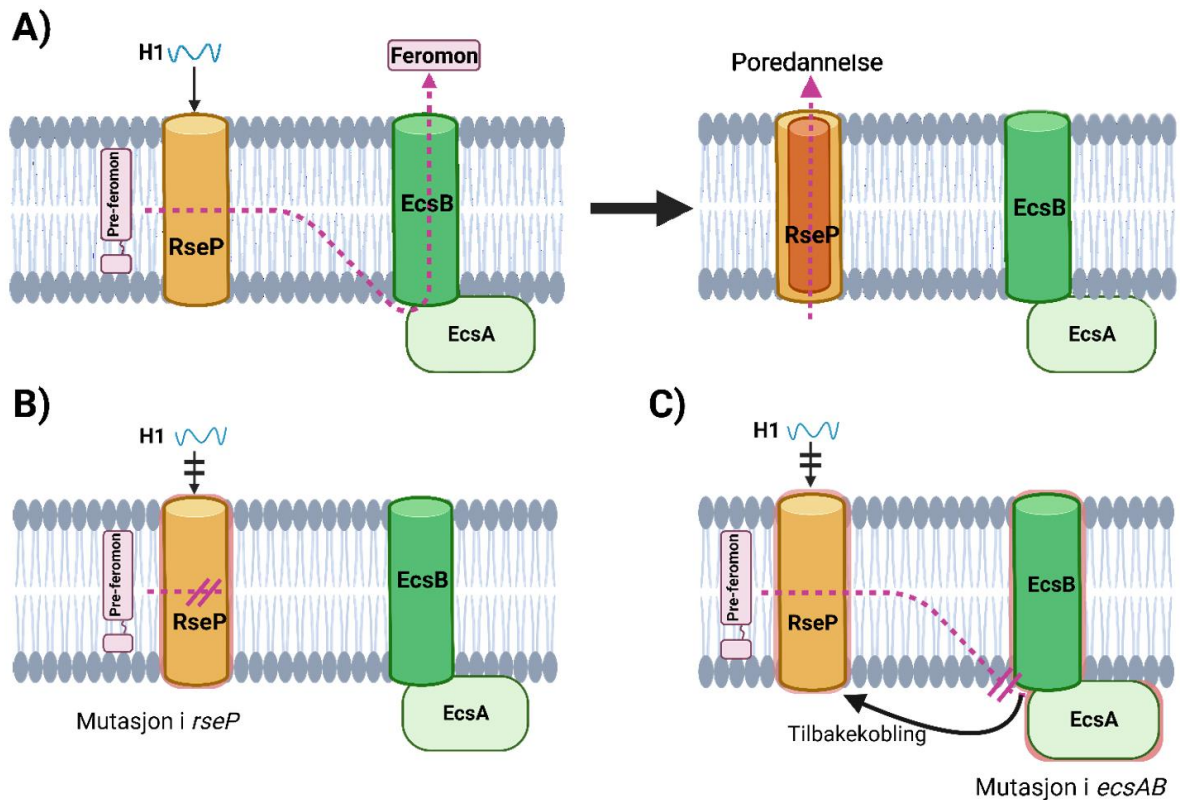
1.4.1 LsbB familien med lederløse bakteriociner

Nesten alle bakteriociner produseres i cellen som et forløperpeptid (precursor peptid) med en ledersekvens som spaltes av under modningen av bakteriocinet⁹⁸. Lederpeptidet har en viktig rolle i immunitet, da bakteriocinet med lederpeptidet ikke er aktivt⁸⁶. I tillegg er lederpeptidet viktig for gjenkjennelse av enzymer og transportere som påfører peptidet post-translasjonelle

modifikasjoner og transporterer bakteriocinet ut av cellen⁸⁶. Lederløse bakteriociner er et unntak, da disse syntetiseres i cellen uten ledersekvens og er derfor aktive så snart de blir translateret i cellen⁹⁹. En familie kjent som LsbB familien av lederløse bakteriociner er vist å binde til RseP for å drepe målceller^{97,100}. Denne familien består av LsbB (lactococcal small bacteriocin B), enterocin Q, enterocin K1 (EntK1) og enterocin EJ97 (EntEJ97)⁹⁷.

Siden disse peptidene er avhengige av en spesifikk interaksjon med RseP, som bakteriocinene utnytter som en reseptor for å drepe cellen, åpner dette muligheten for å endre og konstruere disse peptidene for å forbedre bindingen til RseP hos ulike arter. Et eksempel på dette er konstruksjonen av et hybrid bakteriocin H1 som består av den N-terminale delen av EntK1 og den C-terminale delen av EntEJ97¹⁰¹. H1 har bedre antimikrobiell aktivitet mot *S. haemolyticus* enn det EntK1 eller EntEJ97 alene har mot denne arten¹⁰¹.

Selv om bakteriociner har flere bemerkelsesverdige fordeler, møter de på lignende resistensproblemer som antibiotika. Som nevnt ble det vist at H1 hadde god antimikrobiell aktivitet mot *S. haemolyticus*, likevel ble det sett at *S. haemolyticus* celler resistente mot H1 er utbredt i naturen og blir lett synlig når H1 brukes i laboratorie¹⁰¹. Karakterisering av *S. haemolyticus* mutanter resistente mot H1 viste mutasjoner i *rseP* eller *ecsAB* genene, og mulige forklaringer på dette ble spekulert ut ifra tidligere forskning (Figur 1.3A-C). Der funksjonell EcsAB er antatt å frakte RseP-produkter ut fra cellen, eksempelvis feromoner eller pre-feromoner (Figur 1.3A). Hvis RseP har fått en mutasjon som gjør at H1 ikke klarer gjenkjenne RseP, blir cellene resistente mot H1 (Figur 1.3B). Derimot hvis *ecsAB* er mutert kan disse produktene akkumulere og hemme RseP (Figur 1.3C), denne hemmingen hindrer RseP i å utføre sin naturlige funksjon og hindrer noe med virkningsmekanismen til H1.



Figur 1.3 Samspill mellom RseP og EcsAB med H1 hos *S. haemolyticus*. A) Fungerende samspill mellom RseP og EcsAB, der pre-feromon blir spaltet av RseP og videre blir modent peptid (feromon) eksportert ut av cellen av EcsAB. RseP fungerer normalt og H1 kan binde RseP som kan føre til poredannelse. B) *rseP* er mutert og gjenkjennes ikke lenger av H1, slik at celler blir resistente. C) *ecsAB* er mutert og klarer ikke lenger eksportere modent feromon, som kan føre til tilbakekobling og opphoping av feromon i cellemembranen. Dette gjør RseP inaktivt og blokkerer virkningsmekanismen til H1, slik at celler blir resistente mot bakteriocinet. Figuren er laget i BioRender.com og tilpasset fra Kranjec *et al.* (2021)¹⁰¹.

Resistensutvikling som dette er vanlig mot bakteriociner som angriper et spesifikt reseptorprotein på målcellen, og resistens oppstår da som oftest ved spontane mutasjoner i genet for reseptorproteinet som bakteriocinet utnytter^{87,101}.

1.5 Mål med oppgaven

Ettersom det er knyttet bekymring til *S. haemolyticus* innen humanmedisin er det av stor interesse å finne nye potensielle behandlingsformer mot denne arten. En kandidat til behandling av *S. haemolyticus* har vært H1, men behandlingspotensiale til dette bakteriocinet virker å være begrenset av hyppig resistensutvikling. Dette som følge av mutasjoner i *rseP* og/eller *ecsAB*. Målet med denne oppgaven var å isolere og karakterisere H1 resistente celler av *S. haemolyticus* stammer isolert fra hudinfeksjoner, og få en økt forståelse av hvordan mutasjonene påvirker stressrespons i *S. haemolyticus*. I oppgaven ble det rettet spesielt fokus på hvordan ABC-transporteren EcsAB henger sammen med reguleringen av stressrespons hos *S. haemolyticus*. Dette ble undersøkt ved å se på forskjeller i genuttrykk, og virulensegenskaper som motstandsdyktighet og biofilmdannelse hos mutant med ikke-funksjonell EcsAB sammenlignet med villtype. Dette for å få en dypere innsikt i bakteriens respons på stressende forhold, i tillegg til å få en bedre forståelse av hvordan bakteriociner med RseP som bindingssete kan brukes i behandling.

2. Materiale og metode

2.1 Bakteriestammer og kultiveringsforhold

Alle bakteriestammer håndtert i denne oppgaven er presentert i Tabell 2.1. Bakteriestammene ble dyrket i BHI (hjerne hjerteinfusjon; Oxoid, UK) medium ved 37°C med risting (220 rpm) over natten (ON). Alle stammer ble lagret ved -80°C i vekstmedium med 20% glyserol.

Tabell 2.1. Bakteriestammer. Oversikt over bakteriestammer brukt i denne oppgaven med opphav. Stamme M2 og M7 er derivert av *S. haemolyticus* LMGT 4068. Stamme M9 og M14 er derivert av *S. haemolyticus* LMGT 4070.

Stamme*	Beskrivelse	Kilde
<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4		Novick (1967) ¹⁰²
<i>S. aureus</i> Newman		Duthie og Lorenz (1952) ¹⁰³
<i>S. aureus</i> SH1000		Horsburgh <i>et al.</i> (2002) ⁴⁷
<i>S. haemolyticus</i> LMGT 4068	Villtype	Kranjec <i>et al.</i> (2021) ¹⁰¹
<i>S. haemolyticus</i> LMGT 4070	Villtype	Kranjec <i>et al.</i> (2021) ¹⁰¹
<i>S. haemolyticus</i> M2	H1-resistent mutant	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M7	H1-resistent mutant	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M9	H1-resistent mutant	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M14	H1-resistent mutant	Dette arbeidet

*LMGT; Laboratoriet for Mikrobiell Genteknologi (LMG), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Norge.

S. haemolyticus stammene LMGT 4068 og LMGT 4070 er isolert fra hudsår/hudinfeksjon hos pasienter med spedalskhet¹⁰¹.

2.2 Isolering av H1-resistente mutanter

Bakteriocin H1-resistente mutanter ble isolert ved bruk av en «spot-on-lawn» assay. Dette ble utført ved å fortenne ON-kultur 125 ganger i 5 ml BHI soft agar (0,75% agar) som ble helt over en BHI skål. Etter at agaren var stivnet ble 10 µl av 1 mg/ml bakteriocin H1 påført på fire områder, tørket og satt til inkubering ON ved 37°C. Videre ble totalt 8 kolonier som vokste innenfor hemmingssonen plukket fra hver stamme og renstrøket på hver sin BHI agarskål.

2.2.1 PCR og sekvensering av *rseP*

PCR for amplifisering av *rseP* ble utført i 25 µl reaksjoner ved bruk av GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, USA) og primere (1 µM) listet i Tabell 2.2. For templat i reaksjonen ble celler fra glyserolstock direkte avsatt i PCR-rør med podenål (ca. 1 µl) og satt i

mikrobølgeovn på 600 W i 90 sekunder (sek). PCR ble utført med først denaturering ved 94°C i 3 minutter (min), etterfulgt av 35 sykluser; 94°C i 30 sek (denaturering), 60°C i 20 sek (hybridisering) og 72°C i 90 sek (primerforlengelse). Program ble avsluttet med en endelig trådforlengelse på 72°C i 5 min.

Tabell 2.2 Primere for amplifisering av *rseP* fra *S. haemolyticus*. Forover og revers primer for *rseP*.

Navn	Sekvens (5' → 3')
<i>rseP</i> _forover	TTGAGTGCACATTTGACTAGAC
<i>rseP</i> _revers	ACTCAATGCTTCTGCTTCAGC

For visualisering, ble PCR-produktet analysert på en 1% agarose gel med 10 µl SYBR safe DNA gel stain og TAE (Tris-acetate-EDTA) ble brukt som elektroforesebuffer. Lambda DNA EcoRI+HindIII (5 µl) ble brukt som ladder, og 5 µl PCR-produkt ble applisert. Agarose gelelektroforesen ble kjørt ved 110 V i 30 min. Resultatet av gelelektroforese ble visualisert på Bio-Rad GelDoc.

PCR reaksjoner med bånd på rundt 1522 bp ble renset med QIAquick PCR purification kit (Qiagen, USA) i henhold til produsentens protokoll. Videre ble konsentrasjon av DNA fra renset PCR-produkt målt ved bruk av NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA) og sendt til Eurofins Genomics for Sanger sekvensering.

2.2.2 Dataanalyse av *rseP* sekvenseringsresultater

Kromatogramfilene fra sekvenseringsresultatene ble undersøkt ved bruk av programvaren SnapGene Viewer (v6.2). Kromatogramdataene ble trimmet, slik at baser med lav kvalitet ble tatt bort. Baser av lav kvalitet ble regnet som der deler av sekvensen (start og slutt) ga utslag fra flere baser, slik at det var vanskelig å med sikkerhet bestemme hvilke nukleotid som faktisk var til stede i sekvensen. For å finne eventuelle isolater med mutasjon i *rseP* ble sekvenser til mutanter og tilhørende villtype (WT) sammenstilt med MUSCLE i Jalview (v2.11.2.6) med standardbetingelser.

2.2.3 Helgenomsekvensering

ON-kultur ble fortynnet 50 ganger og inkubert i 2 timer med risting ved 37°C. Dette ble gjort for å hindre at kolonnen ble overbelastet av mengde bakterieceller og gjøre lyseringsprosessen enklere. Isolering av genomisk gDNA (gDNA) ble utført ved bruk av GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, USA) etter produsentens protokoll for Gram-positive bakterier. Kvalitet og konsentrasjon på gDNA ble undersøkt ved henholdsvis NanoDrop™

One (Thermo Scientific, USA) og Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA). Til å måle konsentrasjon ble protokoll til Qubit™ dsDNA BR assay kit (Invitrogen, USA) fulgt. Helgenomsekvenseringen ble utført av Novogene «Microbial whole genome library (PCR-free 350bp)» med dekningsgrad mellom 150 til 200.

Sekvenseringsresultater ble undersøkt ved bruk programvaren PATRIC¹⁰⁴. WT genomet til hver stamme ble brukt som referanse for å finne mutasjoner hos sine respektive mutanter. Verktøyet «Genome Assembly» ble brukt for å sette sammen WT genomet, hvor «paired read library» med forover og revers reads ble benyttet som inputfiler, og «assembly strategy» ble satt til «Auto». Videre ble genomet annotert ved bruk av «Genome Annotation». WT genomet ble brukt som input og «Annotation recipe» ble satt til «Bacteria/Archaea». Taksonomi navnet ble satt til *Staphylococcus haemolyticus* med «taxonomy id 1283». En variasjonsanalyse mellom mutant og WT ble utført med verktøyet «Variation analysis», der «paired read library» ble benyttet med både forover og revers reads for mutanten som inputfiler. «Target genome» ble satt til det annoterte WT genomet med «Aligner» til «BWA-mem», mens «SNP caller» ble satt til FreeBayes.

2.2.4 Predikering og visualisering av RseP struktur

Strukturer for RseP til WT og mutanter (se Tabell 2.1) ble predikert av AlphaFold2 ved hjelp av ColabFold¹⁰⁵ (med standard parametere). Visualisering av strukturer og feilestimering ble utført i ChimeraX (v1.4). På lignende måte ble predikering av RseP med H1 utført, hvor H1 sekvens ble hentet fra Kranjec *et al.* (2021)¹⁰¹.

2.3 Propidiumjodid poredannelsesanalyse

Virkningsmekanismen til bakteriocinene H1 og GarKS ble undersøkt med en propidiumjodid basert poredannelsesanalyse (PI-assay). *S. haemolyticus* WT 4070 ble inokulert i 50 ml BHI og inkubert overnatt. Cellene ble så høstet ved sentrifugering (4500g, 2 min) og vasket én gang i PBS (4500g, 2 min). Deretter ble cellepelleten resuspendert i PBS til en OD₆₀₀ på 3. Cellesuspensjonen (100 µl) ble så tilsatt en sort 96-brønns mikrotiterplate med en seriefortynning av bakteriocinene GarKS, H1, nisin A og micrococcin P1 i 100 µl PBS med 40 µM propidiumjodid (20 µM endelig konsentrasjon). Nisin A og micrococcin P1 ble brukt som hhv. positiv og negativ kontroll, ettersom nisin A er en kjent poredanner mens micrococcin P1 hemmer proteinsyntesen. Fluorescens ble målt med med Fluostar Omega (BMG LABTECH, Tyskland) med parameterne; eksitasjon 535/20 nm og emisjon 630/40 nm

hvert 5. min i 2 timer. I tillegg ble det utført spot-on-lawn test av hvert bakteriocin ved å fortynne (50 ganger) ON-kultur av WT 4070 til 5 ml BHI soft agar (0,75% agar) og påføre 10 µl av hvert bakteriocin (1 mg/ml) i soner på agaren.

2.4 Antimikrobielltesting

2.4.1 Minimum inhiberende konsentrasjon

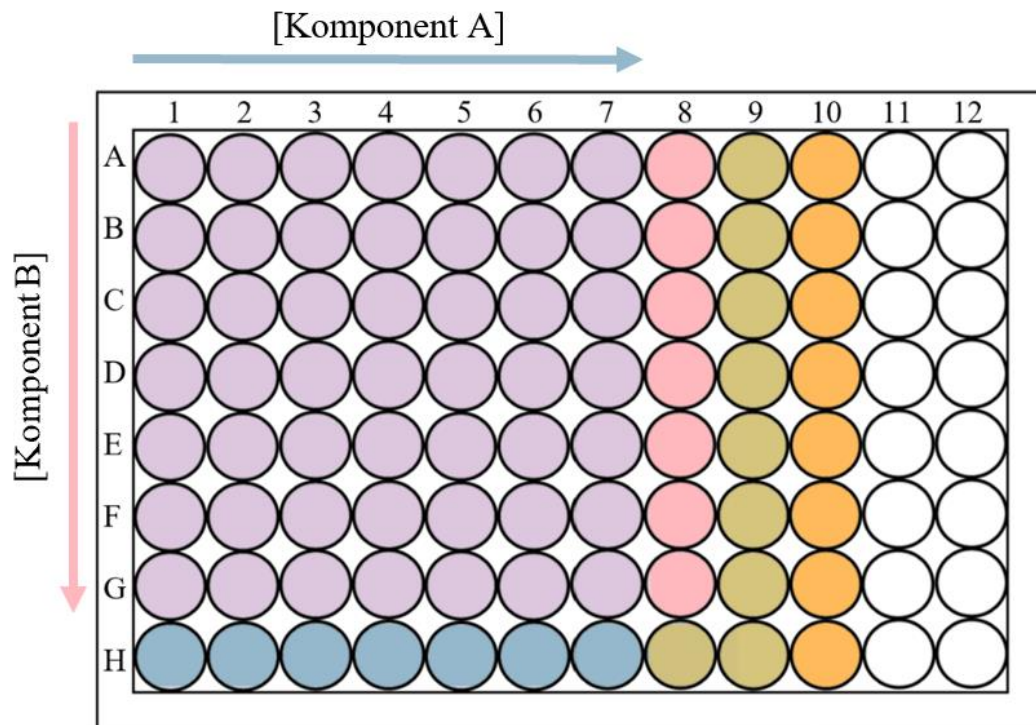
Motstandsdyktigheten til WT og mutantene for ulike stoffer ble undersøkt ved bruk av minimum inhiberende konsentrasjon metoden (MIC_{50}). MIC_{50} ble bestemt til å være konsentrasjonen der halvparten av bakterieveksten ble hemmet sammenlignet med en positiv kontroll uten tilsatt hemmende stoff. Dette ble utført i 96-brønns mikrotitetplater som ble inkubert ved 37°C i 6 timer før måling av OD_{600nm} i en Victor ® Nivo™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA). Stoffer som ble testet var etanol, fusarsyre, GarKS, H1, kloramfenikol, lysozym, NaCl (natriumklorid) og SDS (natriumlaurylsulfat). En seriefortynning av de ulike stoffene ble forberedt i platen (100 µl) før 100 µl ON-kultur ble tilsatt brønnene (50-ganger fortynnet i brønnen).

2.4.2 Synergi analyse

Interaksjoner mellom antimikrobielle stoffer ble undersøkt ved sjakkbrett-metoden, hvor en fortynningsgradient mellom to komponenter ble forberedt. På denne måten kan fraksjonelle hemmende konsentrasjon (FIC-verdi) bestemmes, noe som gir en mulighet for å se om det er synergisk interaksjon mellom komponentene som undersøkes. FIC-verdien ble beregnet ved å ta $A/MIC_A + B/MIC_B$, der A og B er MIC for hver av komponentene i kombinasjon, mens MIC_A og MIC_B er MIC for komponentene hver for seg¹⁰¹. Hvis FIC-verdien var $<0,5$ ble effekten av de to komponentene ansett å være synergisk, mens en FIC-verdi mellom 0,5 og 4 ble ansett å være additiv. Hvis FIC-verdien var >4 ble effekten av de to komponentene ansett å være antagonistisk.

Mikrotiterplaten (Figur 2.1) ble satt opp med en fortynningsgradient av den ene komponenten (komponent A) som forklart for MIC_{50} -test med en halvering av konsentrasjonen mellom hver kolonne. For komponent B ble det laget en fortynningsgradient utenfor platen, der likt volum ble overført til hver rad, slik at det ble en halvering av konsentrasjonen for komponent B mellom hver rad. Hver komponent ble fortynnet i BHI medium, og til slutt ble 4 µl ON-kultur tilsatt med BHI-medium til et sluttvolum på 200 µl. Kombinasjonene som ble undersøkt var

GarKS sammen med enten vankomycin, erytromycin eller H1. I tillegg ble kombinasjonen vankomycin og erytromycin undersøkt. OD_{600nm} ble målt ved bruk av Victor ® Nivo™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA) etter 6 timer inkubasjon ved 37°C.



Figur 2.1. Oppsett for mikrotiterplate for undersøkelse av FIC-verdier. Platen ble satt opp med en fortynningsgradient mellom komponent A og B (illustrert med lilla farge). For komponent A ble det laget en fortynningsgradient i kolonne 1-7, der kolonne 1 hadde størst konsentrasjon og kolonne 7 hadde lavest konsentrasjon av komponent A. I rad A-G ble det lagt en fortynningsgradient for komponent B, der rad A inneholdt størst konsentrasjon og rad G inneholdt lavest konsentrasjon av komponent B. Brønn 1H-7H (blå) inneholdt kun fortynningsgradient av komponent A og brønn 8A-8G (rød) inneholdt kun komponent B. Kolonne 9 og brønn H8 (grønn) fungerte som positiv kontroll og kolonne 10 (gul) fungerte som negativ kontroll. Hver av brønnene i platen med unntak av negativ kontroll, ble tilsatt ON-kultur (fortynnet 50 ganger i brønnen). Hver brønn hadde et sluttvolum på 200 μ l.

2.4.3 Antibiotikasensitivitet

Sensitivitet for antibiotika ble testet med disk-diffusjons metoden. ON-kultur (50-ganger fortynnet) ble støpt inn i BHI soft-agar og deretter ble antibiotika diskere (Oxoid, UK) lagt på agaren. Skålene ble satt til inkubering ON ved 37°C og eventuelle hemmingssoner ble undersøkt dagen etter.

2.4.4 Vekstkurver

ON-kulturer ble fortynnet 50 ganger i BHI medium med og uten GarKS (sluttkonsentrasjon på 0,01 mg/ml) i en 96-brønnsplate til et sluttvolum på 200 μ l. Deretter ble platen inkubert ved 37°C i totalt 17 timer og OD_{600nm} ble målt med en Victor ® Nivo™ Multimode Plate

Reader hvert 30 minutt. Før hver måling ble platen ristet med dobbelorbitalbevegelse ved 300 rpm i 1 minutt.

2.5 Biofilmdannelse

Evnen til å danne biofilm ble undersøkt i en 96-brønn mikrotiterplate (Sarstedt, produkt: 82.1581.001) der ON-kultur ble fortynnet 10 ganger i 3% Tryptic Soy medium med 1% glukose (TSB-G) og satt til inkubering ved 37°C i 24 timer. Mikrotiterplaten ble satt opp med åtte tekniske replikater for hver av bakteriestammene i Tabell 2.1. Til positiv kontroll ble stammene *S. aureus* NCTC8325-4, *S. aureus* SH1000 og *S. aureus* Newman anvendt.

Brønnene ble vasket med 100 µl 0,9% NaCl, deretter ble biofilmen farget ved å tilsette 150 µl 0,4% krystallfiolett. Etter 15 min ble krystallfioletten pipettert bort og hver brønn ble vasket med 200 µl NaCl minst tre ganger eller til negativ kontroll var ren for farge. Deretter ble 100 µl 96% etanol tilsatt i hver brønn og etter 10 min ble innholdet overført til en ny 96 brønn mikrotiterplate. Ekstraheringen av krystallfioletten ble utført to ganger, slik at mikrotiterplaten inneholdt 200 µl etanol med oppløst krystallfiolett. Til slutt ble OD₆₀₀ målt med Victor ® Nivo™ Multimode Plate Reader.

2.6 RT-qPCR

S. haemolyticus WT 4070 og M14 ble utsatt for GarKS for å undersøke påvirkningen av membranstress på uttrykk av ett utvalg gener. ON-kultur ble fortynnet 50 ganger i 1 ml BHI medium og satt til inkubering ved 37°C med risting (220 rpm) i 2 timer. Deretter ble GarKS (sluttkonsentrasjon på 0,005 mg/ml) tilsatt i kulturene, som ble satt til videre inkubering i 30 minutter. Like antall celler fra kulturene ble brukt videre ved å måle OD_{600nm} til 1 med NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA). Celler ble høstet ved sentrifugering (12300g, 4 min). Supernatant ble kastet og cellepellet ble enten brukt direkte i videre forsøk eller lagret ved -80°C til senere bruk.

2.6.1 RNA isolering og revers transkribering

Cellepellet ble resuspendert i 200 µl PBS og tilsatt 0,5 mm silica kuler i et 50/50 forhold. Celler ble lysert ved 5000 rpm i totalt 4 min ved bruk av Precellys 24 homogenisator (Bertin Technologies, Frankrike). Etter hvert minutt kjøring, ble cellene satt på is i 1 min. Deretter ble nukleinsyrer ekstrahert ved bruk av Kingfisher Duo Prime og NAXtra™ nukleinsyreekstraksjonssett fra Lybe Scientific (Norge). En KingFisher 96-dybbrønns plate

ble satt opp og kjørt som beskrevet i Tabell 2.3. For å ta bort gDNA ble eluatet behandlet med 50 µl DNase I (0,27 U/µl), inkubert i 10 min ved romtemperatur før videre behandling med RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research Corp., USA) med ny DNase behandling på kolonne i henhold til produsentens protokoll. RNA konsentrasjoner ble målt med NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA) for normalisering til 1 µg RNA og deretter ble RNA reverstranskribert til cDNA ved bruk av QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, USA) i henhold til produsentens protokoll.

Tabell 2.3. Plateoppsett og program for ekstrahering av nukleinsyrer på KingFisher Duo Prime. Oversikt over hvilke reagenser, mengde av hver reagens, blandeparametere og hvilke rad de ulike reagensene skal tilsettes og komponentene skal utføres. Alle trinn ble utført ved 37°C med unntak av eluering.

Rad	Reagens	Volum (µl)	Trinn	Blandeparametere	
				Tid (sek)	Hastighet
A	Kam (KingFisher™ 96 Tip Comb for Deep Well Magnets)	-			
	NAxtra lysis buffer	200		30	Medium
B	NAxtra kulemix	400	1. Bland	30	Halvblanding
	Cellelysat	100		30	Bunnblanding
C	Isopropanol (100%)	400	2. Vask	20	Rask
D	Etanol (80%)	400	3. Vask	20	Rask
E	Etanol (80%)	400	4. Vask	20	Rask
			5. Tørk*	120	-
			6.	30	Medium
Strip	Vann	50	Eluering**	30	Bunnblanding

* Tørking over brønn

** Eluering ble gjort ved 50°C

2.6.2 Primerdesign for RT-qPCR

Primere (Tabell 2.4) til RT-qPCR ble designet ved bruk av verktøyet qPCR Primer & Probe Design Tool (Eurofins Genomics, Germany) for å designe primere som ga produkt av ønsket lengde (< 200 bp) og med lignende smeltepunkt rundt 60°C.

Tabell 2.4. Primere til RT-qPCR. Oversikt over forover og revers primer for måling av genuttrykk med RT-qPCR.

Primer	Sekvens 5' → 3' retning
<i>rcsC</i> _forover	TCGGAGAAAGCAACGTTTATG
<i>rcsC</i> _revers	ATGAAAGTCGCAAGTTAGGG
<i>srrA</i> _forover	CCAATCAACCTTACGAATCGC
<i>srrA</i> _revers	AGCCGCTTCAATCTTCTTAC
DUF418_forover	GCCAATAATATATCGCCTTCCC
DUF418_revers	TGCAATACTCTTCGGCTTTTC
Hypotetisk_protein_forover	CGCCAGCGAATAAAATAACAG
Hypotetisk_protein_revers	ACAACAGGGAATGAAAAGGAG
<i>rseP</i> _forover	GTGCTGGAATAATGTGTCCTG
<i>rseP</i> _revers	TGGCTCTTCTAAACCGTCTC
<i>ecsB</i> _forover	GCTATCGTTTCCGATTGTTTC
<i>ecsB</i> _revers	AGCCTTTAATCACTTCGACATC
<i>gyrB</i> _forover	TGCATAACCAGCAAGTGCC
<i>gyrB</i> _revers	GAAGCCGTTTCGTAAAAGACC

2.6.3 Oppsett og program for RT-qPCR

For hver prøve ble det satt opp triplikater for hvert av primerparene (Tabell 2.4) og hver reaksjonsblanding ble satt opp til et totalvolum på 10 µl med 1 µl (10 ng) cDNA (templat), 0,1 µl (10 pmol/µl) primer, og 5 µl (2x) PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, USA). RT-qPCR ble utført ved bruk av QuantStudio™ Design & Analysis (v1.5.2) med følgende program: «holding» temperatur ved 95°C i 10 min, etterfulgt av 40 sykluser; 95°C i 15 sek og 60°C i 1 min. Smeltekurveanalyse for å undersøke primerspesifisitet ble utført med følgende program; 95°C i 15 sek, 60°C i 1 min og avsluttet med 95°C i 15 sek. Resultater fra RT-qPCR ble analysert ved bruk av komparative C_T Metoden ($\Delta\Delta C_T$).

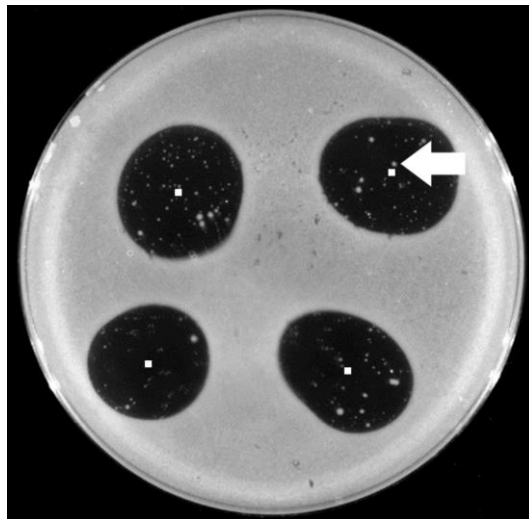
2.7 Statistiske analyser

Alle eksperimenter ble utført minst tre ganger og statistiske analyser ble utført i GraphPad Prism (v9.5.1) eller Microsoft Office Excel (v2303). Resultatene i Figur 3.5 ble analysert ved Excel sin en-faktor-variensanalyse. Resultatene vist i 3.6 ble analysert ved uparet parametrisk t-test i GraphPad Prism. For alle statistiske analyser ble en p-verdi mindre enn 0,05 (p<0,05) ansett som statistisk signifikant.

3. Resultater

3.1 H1-resistente mutanter har mutasjon i *rseP* eller *ecsB*

For å få en bedre forståelse av rollen til EcsAB og RseP, og samspillet mellom disse ble det isolert mutanter der genene for disse var slått ut. Forskjeller mellom mutantene og WT vil gi viktig informasjon om funksjonen til disse proteinene. For å isolere mutantene ble det utført en spot-on-lawn test med hybrid bakteriocin H1 (Figur 3.1). H1 ga, som forventet, en stor og tydelig hemmingssone på begge stammene som ble testet; *S. haemolyticus* WT 4068 og WT 4070. Som tidligere vist med denne familien bakteriociner ble det vekst av resistente kolonier i hemmingssonen. Dette er antatt å være spontane mutanter som har fått endret noe som er viktig for virkningsmåten til H1. For å undersøke mutasjonene disse hadde, ble det plukket åtte resistente kolonier fra hver WT for sekvensering av *rseP*. Siden H1 er avhengig av tilstedeværelsen av RseP for å fungere, var det sannsynlig at resistens mot H1 skyldes mutasjon i *rseP*. Av de 16 isolatene som ble undersøkt ble det funnet at kun seks av dem hadde mutasjon i *rseP* (Vedlegg 1). To av mutantene hadde aminosyresubstitusjoner og de resterende hadde mutasjoner som ville føre til et trunkert proteinprodukt (tidlig stopp-kodon og/eller rammeskift).



Figur 3.1. Spot-on-lawn og vekst av H1-resistente mutanter. *S. haemolyticus* WT 4070 innstøpt på agarskål med tilsatt bakteriocin H1 (1 mg/ml) på fire punkter indikert med hvite firkanter. Resistente bakteriekolonier (hvit pil) er tydelige inni hemmingssonen.

Siden sekvenseringsresultatene av *rseP* kun viste at et utvalg av de H1-resistente isolatene hadde mutasjon i *rseP*, var det sannsynlig at de resterende isolatene kunne ha mutasjon i *ecsA* eller *ecsB*. Mutasjoner i *ecsAB* har tidligere vært knyttet til H1 resistens i noen stammer av *S. haemolyticus*¹⁰¹. For å undersøke om dette var tilfellet eller om potensielt andre mutasjoner

også kunne gi resistens mot H1, ble to isolater uten mutasjon i *rseP* helgenomsekvensert og sammenlignet med WT-sekvens. Mutasjoner identifisert i disse mutantene er presentert i Tabell 3.1.

Tabell 3.1. Mutasjoner hos to H1-resistente isolater av *S. haemolyticus*. Oversikt over mutasjoner funnet i *ecsB* og hvor mutasjonene ligger i nukleotid-og proteinsekvens. Mutant M7 tilhører stamme LMGT 4068, M14 tilhører stamme LMGT 4070.

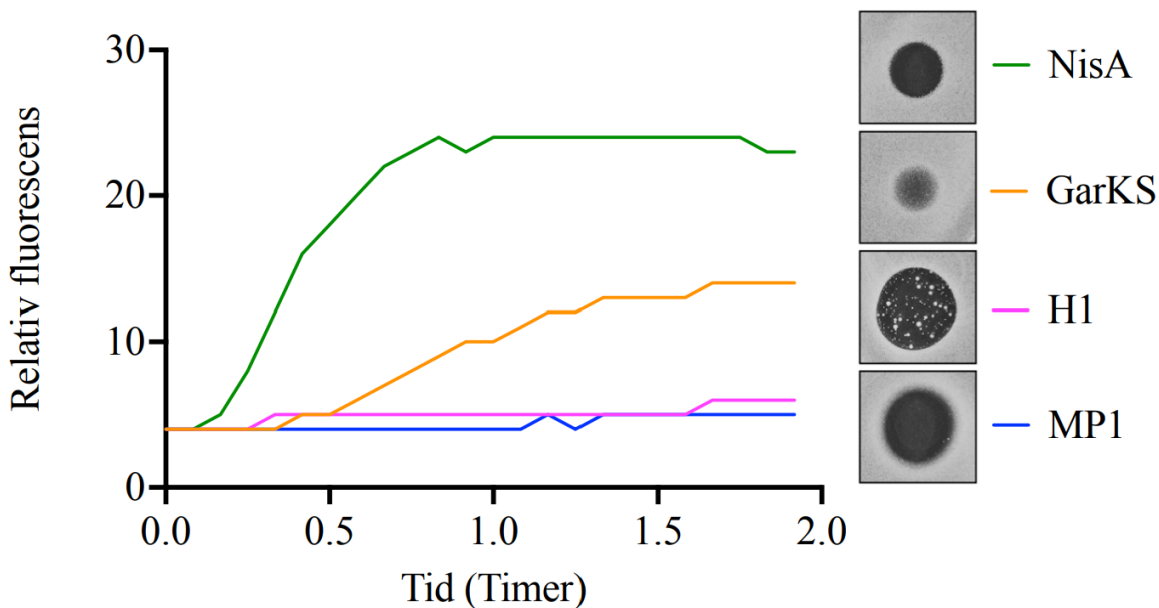
Mutant	Mutasjon i <i>ecsB</i> (konsekvens)
M7	c.985C>T (p.Gln329*)
M14	c.290delA (p.Asn97fs)

c: kodende DNA, p: protein, del:delesjon, fs: rammeskift, >: substitusjon, *: stoppkodon.

Basert på helgenomsekvenseringen ble det funnet at begge isolater hadde mutasjoner i *ecsB*, én mutant var fra *S. haemolyticus* LMGT 4068 (M7) og én fra LMGT 4070 (M14). Der M7 hadde substitusjon av cytosin 985 til tymin som førte til en nonsens mutasjon som ga et trunkert proteinprodukt på 329 aminosyrer (aa). Mutanten M14 hadde et rammeskift som førte til tidlig stopp-kodon og derfor også trunkert protein (98 aa).

3.2 GarKS er aktiv på membranen i *S. haemolyticus*

RseP er antatt å være involvert i en generell stressrespons mot forstyrrelser i cellekonvolutten, uten at noen spesifikk inducer er kjent. GarKS er et bakteriocin som er antatt å angripe cellemembranen uten å utnytte et spesifikt protein. Dette bakteriocinet er også vist å påvirke stressrespons-systemer i andre arter¹⁰⁶. GarKS ble derfor valgt som en god kandidat for å inducere stress i *S. haemolyticus*. For å sjekke at GarKS er membran-aktiv i denne arten ble det utført en PI-assay. PI er et molekyl som får økt fluorescens når det binder DNA, og intakt cellemembran er ugjennomtrengelig for PI. En økning i fluorescens fra PI over tid vil derfor være en indikasjon på skadet/ødelagt membran som gjør at PI kan diffundere inn i cellen hvor det er DNA. Denne undersøkelsen ble utført på *S. haemolyticus* WT 4070, med nisin A (NisA) som positiv kontroll, som er et kjent poredannende bakteriocin. Til negativ kontroll ble micrococcin P1 (MP1) brukt, dette er et bakteriocin som hemmer proteinsyntese uten å påvirke membranen. Bakteriocinet H1 ble inkludert for å lære noe om hva mekanismen til dette bakteriocinet kan være, da det er ukjent. Hver av bakteriocinene brukt i undersøkelsen hadde en konsentrasjon på 0,05 mg/ml. Forsøket viste en økning fluorescenssignal over tid for NisA og GarKS, men ikke for MP1 (Figur 3.2).



Figur 3.2. Poredannelsesanalyse med propidiumjodid. Relativ fluorescensintensitet over tid av PI sammen med *S. haemolyticus* WT 4070 med 0,05 mg/ml av bakteriocinene; GarKS, H1, NisA og MP1. Til høyre vises hemmingssonen fra hver av bakteriocinene (1 mg/ml, 10 μ l).

For H1 var det en liten økning i fluorescerende signal sammenlignet med negativ kontroll, men denne økningen var lav sammenlignet med NisA og GarKS. Videre ble det utført en spot-on-lawn test (Figur 3.2, høyre panel) for å vise at alle bakteriocinene er aktive mot *S. haemolyticus* og fører til dreping/hemming, men på forskjellige måter. Etter å ha vist at GarKS er aktiv mot cellemembranen til *S. haemolyticus*, vil dette bakteriocinet høyst sannsynlig påføre cellene en form for stress.

3.3 EcsB er viktig for motstandsdyktigheten mot stress

Det at mutasjoner i *ecsAB* gir resistens mot H1 tyder på en tett kobling mellom EcsAB og RseP, men det eneste som er kjent om samspillet mellom disse to er i modning og utskillelse av feromon-peptider. Siden ingenting er kjent om en mulig rolle av EcsAB i stressrespons ble de to *ecsB*-mutantene karakterisert videre for motstandsdyktighet mot forskjellige stoffer som kunne være stressende. Dette ble undersøkt ved bruk av MIC-assay der det ble satt opp en fortynningsgradient for de forskjellige komponentene for å bestemme MIC₅₀ for stammene. MIC₅₀ ble bestemt som den konsentrasjonen av stoff som hemmet vekst av stammen med 50% eller mer sammenlignet med kontroll. Forholdet mellom MIC₅₀ til mutant og villtype er vist i Tabell 3.2.

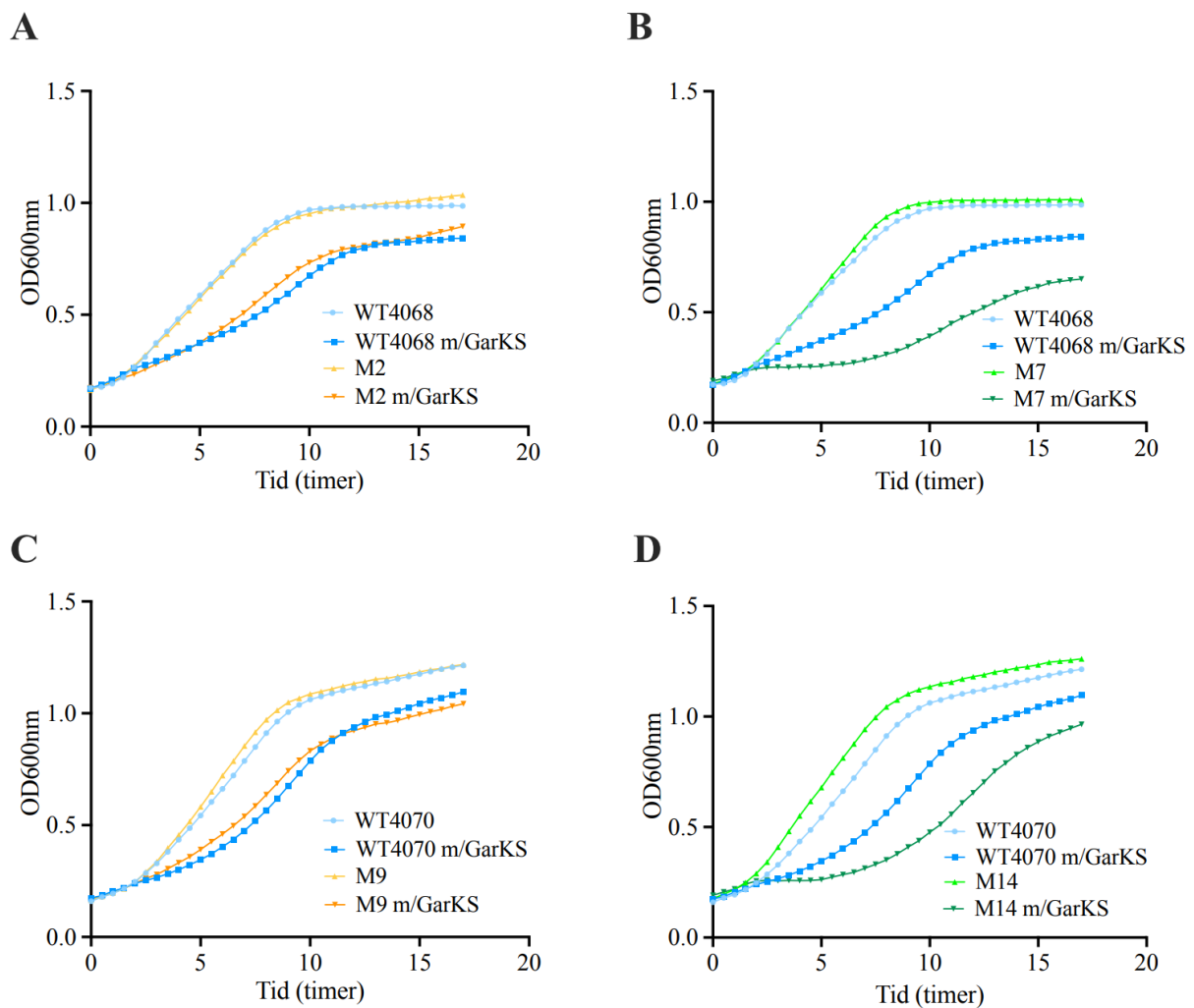
Tabell 3.2. Stoff og forholdstall mellom mutant/WT. Oversikt over stoffene brukt til testing av MIC₅₀, der det oppgis hvor mange ganger mer motstandsdyktig mutanten er enn WT (mutant/WT). En verdi > 1 indikerer at mutanten er mer motstandsdyktig enn WT og en verdi < 1 indikerer at WT er mer motstandsdyktig enn mutant for det gitte stoffet.

Stoff testet	M7	M14
Etanol (Mut/WT)	1,2	1
Fusarsyre (Mut/WT)	0,8	0,7
GarKS (Mut/WT)	0,5	0,5
H1 (Mut/WT)	>116	>121,9
Kloramfenikol (Mut/WT)	0,9	0,7
NaCl (Mut/WT)	1	1
SDS (Mut/WT)	0,8	0,6

Mutantene M7 og M14 var mer sensitive mot fusarsyre, GarKS, kloramfenikol og SDS enn tilhørende WT. Forskjellen var størst mot GarKS, der begge mutantene hadde en halvert motstandsdyktighet sammenlignet med WT (mut/WT = 0,5). Motstandsdyktighet mot lysozym ble også testet, men alle stammene var resistente ved alle testede konsentrasjoner (opptil 45 mg/ml).

3.4 EcsB er viktig for normal vekst under stressende forhold

Den reduserte motstandsdyktigheten til mutantene for GarKS ble videre undersøkt med vekstforsøk over tid ved 37°C. Til sammenligning ble det inkludert to *rseP* mutanter (M2 og M9), siden produktet av dette genet er kjent å være involvert i stressrespons i mange arter. Både *rseP*- og *ecsB*- mutanter vokste tilnærmet likt WT når GarKS ikke var tilsatt (Figur 3.3A-D). Derimot vokste alle *ecsB*-mutantene betydelig dårligere med tilsatt GarKS sammenlignet med WT (Figur 3.3B og C).

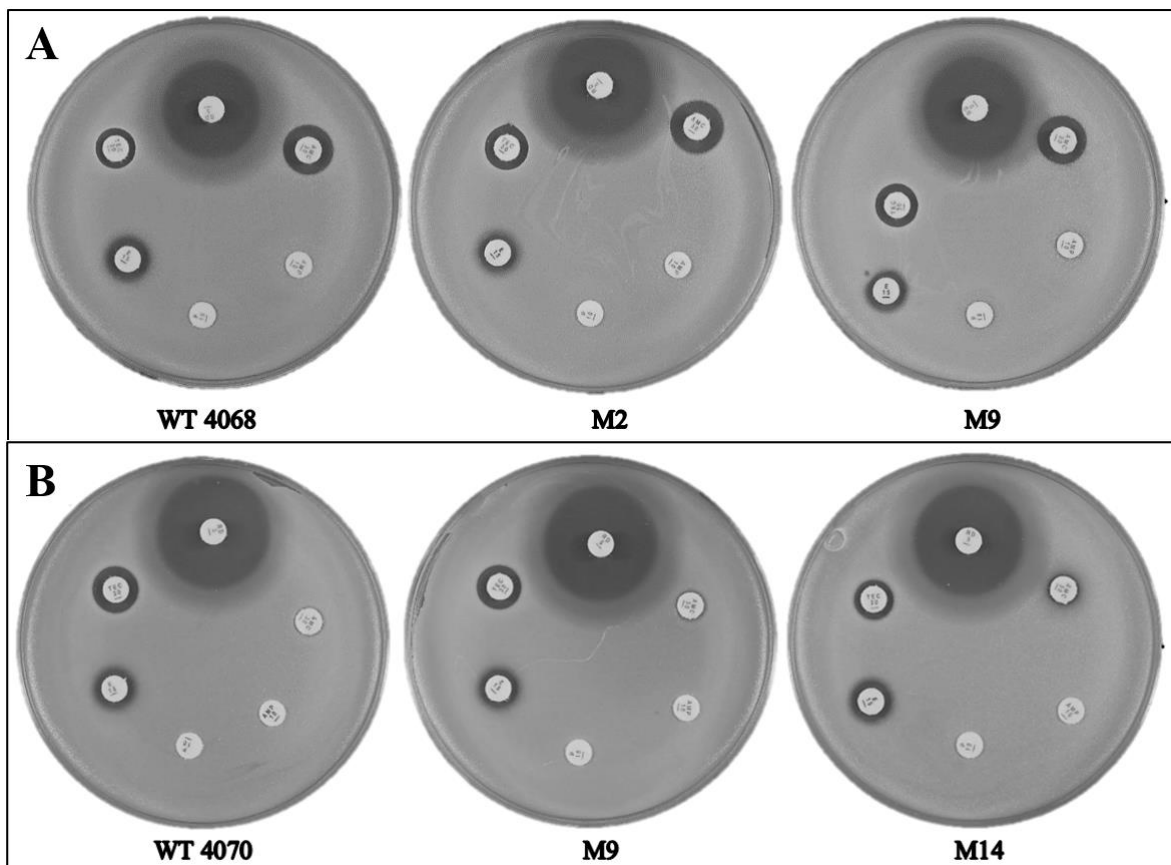


Figur 3.3. Vekstforsøk med og uten GarKS ved 37°C. Vekstkurver med og uten GarKS (0,01 mg/ml) for WT og mutanter. (A) *S. haemolyticus* WT 4068 og M2 (RseP Leu361Val). (B) WT 4068 med M7. (C) WT 4070 med M9 (RseP Pro289Arg). (D) WT 4070 med M14. Dataene presentert for alle grafene viser gjennomsnittet av fire tekniske replikater.

For *rseP*-mutantene (Figur 3.3A og C) observeres at både med og uten stress til stede har mutant og WT overlappende vekstmønster.

3.5 EcsB og RseP påvirker ikke antibiotikasensitivitet i *S. haemolyticus*

Siden *ecsB*-mutantene var mer påvirket av GarKS enn WT, kunne det være at de også var mer sensitive mot andre stoffer som kan være stressende. Spesielt relevant er antibiotika som brukes for å bekjempe infeksjoner hos mennesker. Antibiotika vil forårsake en type stress i cellen, spesielt interessant for RseP og EcsAB er antibiotika som er aktive mot cellekonvolutten (celleveggsyntese). Motstandsevnen til mutantene og WT mot antibiotika ble testet med en disk diffusjonstest (Figur 3.4).



Figur 3.4. Antibiotika sensitivitet hos WT og mutanter. Antibiotikadisker ble påsatt på agaren i følgende rekkefølge (fra toppen, med klokka); rifampicin (5 µg), amoxicillin/klavulansyre (30 µg), ampicillin (10 µg), penicillin G (10 IU), erytromycin (15 µg) og teicoplanin (30 µg). (A) *S. haemolyticus* WT 4068 med mutanter M2 og M7. (B) WT 4070, med mutanter M9 og M14.

Av de undersøkte antibiotikaene ble det for begge stammer (Figur 3.4A og B) observert hemmingssoner hos både WT og mutanter for rifampicin, erytromycin og teicoplanin. Videre for stamme LMGT 4068 (Figur 3.4A) ble det dannet en tydelig hemmingssone for amoxicillin/klavulansyre for både WT og mutanter. Dette var derimot ikke tilfelle for stamme LMGT 4070 (Figur 3.4B), da det kun observeres en svak hemmingssone for M14 og mulig antydning til hemmingssone hos M9 for amoxicillin/klavulansyre. Hemmingssonene var av tilnærmet samme størrelse for både mutanter og WT for de to stammene.

3.6 EcsB har liten påvirkning på antibiotikasensitivitet under stress

Om EcsAB er del av et stressrespons system i *S. haemolyticus* er det forventet at mutanter har svekket stressrespons, noe som den økte sensitiviteten til mutanten mot GarKS kan tyde på. En av de mest lovende måtene å anvende bakteriociner i behandling er som del av en kombinasjon sammen med antibiotika og/eller andre bakteriociner^{101,107}. For å se om svekket

stressrespons også påvirker motstandsdyktighet mot antibiotika ble det utført en to-komponent behandling, der GarKS ble brukt i kombinasjon med antibiotika. Bakteriocinet H1 har god aktivitet mot *S. haemolyticus*, men har med det problemet at resistente celler kan fortsette å vokse. Siden resistente celler har dårligere motstandsdyktighet mot GarKS ble det undersøkt en kombinasjon av GarKS og H1 kunne hemme fremvekst av resistente celler. Effekten av kombinasjonene ble bestemt som den fraksjonelle hemmende konsentrasjon (FIC) (Tabell 3.3).

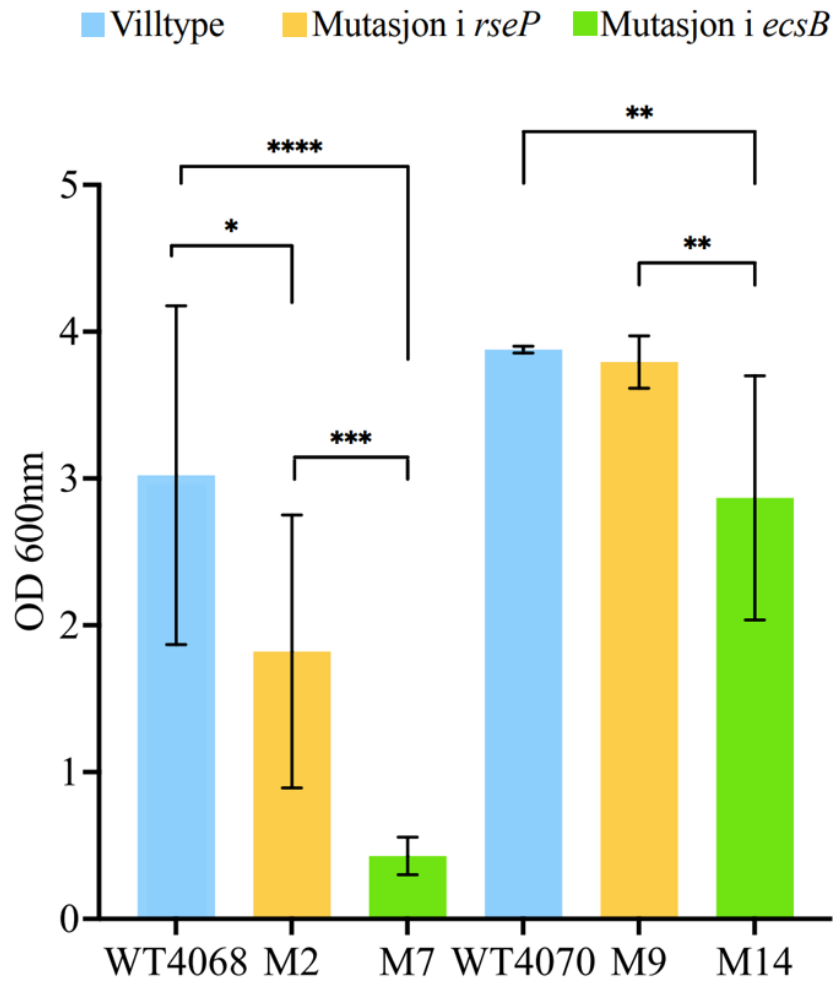
Tabell 3.3. FIC-verdi for WT4070 og M14. Oversikt over beregnede FIC verdier for WT4070 og M14 ved behandling med kombinasjon av ulike komponenter. Synergisk effekt er bestemt ved $FIC < 0,5$, mens verdier mellom 0,5 og 4 tyder på additiv effekt.

Kombinasjon	WT 4070	M14
GarKS x H1	0,6	-
GarKS x Vankomycin	2	0,8
GarKS x Erytromycin	1,3	0,8
Erytromycin x Vankomycin	0,6	0,6

To-komponent behandling med GarKS og H1 på WT ga en FIC verdi på 0,6 (Tabell 3.3), noe som tyder på en additiv effekt. Etter 24 timer fremdeles ble funnet resistente kolonier. Videre ble det sett en additiv effekt med GarKS og vankomycin for både mutant og WT, likevel ble det observert at mutanten hadde en dårligere (2,5x) motstandsdyktighet mot kombinasjonen. Liknende funn ble gjort ved to-komponentbehandling med GarKS og erytromycin der det ble bestemt å være additiv effekt for både WT og M14, mens M14 viste noe dårligere motstandsdyktighet mot denne type behandling enn det sett for WT. Uten påført stress i form av GarKS ble det sett at kombinasjonen erytromycin og vankomycin hadde en FIC på 0,6 som var lik for M14 og WT.

3.7 EcsB er viktig for biofilmdannelse

Evnen til å danne biofilm er en viktig egenskap hos bakterien for å motstå og håndtere ytre stresspåvirkning. På bakgrunn av dette ble det undersøkt om mutanter hadde endret evne til å danne biofilm. Undersøkelse av biofilmdannelse utført ved krystallfiolett farging og OD-måling, viste tydelig reduksjon i biofilmdannelse hos *ecsB*-mutantene (Figur 3.5).



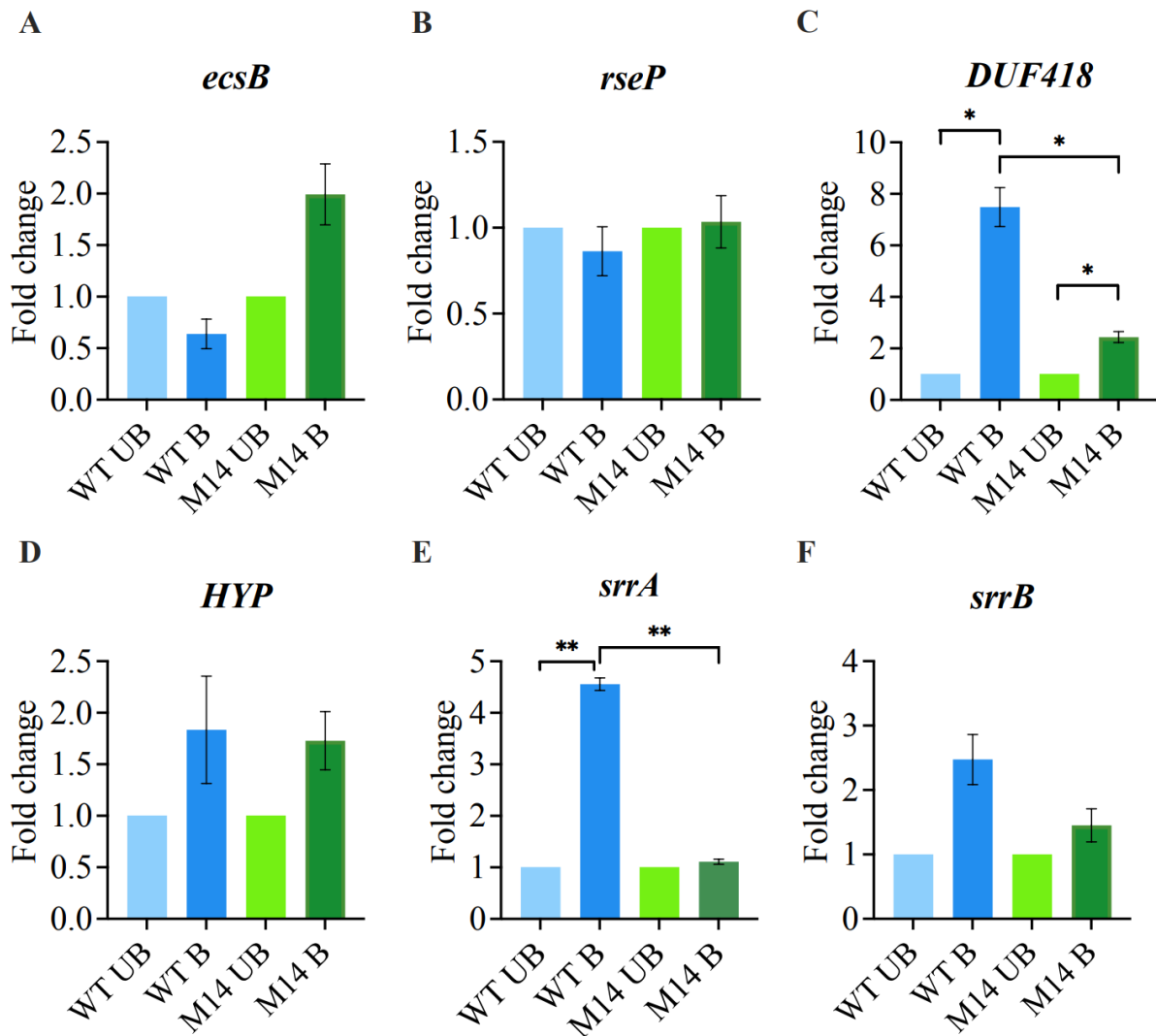
Figur 3.5. Biofilmdannelse hos WT og mutanter av *S. haemolyticus*. Gjennomsnittlig OD og standardavvik for WT 4068, WT 4070, M2, M7, M9 og M14. Statistisk analyse ble utført med Excel sin en-faktor-variansanalyse med åtte tekniske replikater i Excel. * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$.

Målinger viste en tydelig forskjell mellom stammenes evne til å danne biofilm. Der stamme LMGT 4070 virker å være en bedre biofilmdanner enn LMGT 4068, som hadde større OD for WT og mutanter. For begge stammer var *ecsB*-mutantene dårligere til å danne biofilm enn både WT og *rseP*-mutant. Dette var spesielt tydelig hos M7, som hadde den mest signifikante forskjellen i biofilmdannelse. Av funnene var det signifikante forskjeller mellom WT og mutanter innenfor begge stammer med unntak av M9.

3.8 EcsB påvirker stress via SrrA og DUF418

For å få bedre forståelse om hvordan EcsB bidrar i regulering av stressrespons hos *S. haemolyticus*, ble transkripsjonsnivå med og uten stress i form av GarKS undersøkt (Figur 3.6A-F). Gener ble valgt på bakgrunn av tidligere utført transkripsjonsanalyse¹⁰⁸. Blant disse er genene *srrA* og *srrB* som koder for henholdsvis SrrA og SrrB (NCBI WP_011274925 og WP_248687498). SrrAB er et to-komponentsystem knyttet til den globale regulering av virulensfaktorer og biofilmdannelse hos stafylokokker, i tillegg til to gener med ukjent funksjon her navngitt *DUF418* (WP_016930538) og hypotetisk protein (*HYP*) (WP_048667836). Transkripsjonsnivå av *rseP* (WP_011275938) og *ecsB* (WP_011275427) ble undersøkt ettersom disse genene er vist å være koblet sammen. I tillegg var det ønsket å se om EcsB er involvert i sin egen regulering. Nivået av transkripsjon ble kvantifisert med RT-qPCR og $\Delta\Delta C_T$ -metoden med *gyrB* (WP_046308840) som referanseggen.

Resultatene fra RT-qPCR-analysen viste signifikant forskjell i transkripsjon av *DUF418* og *srrA* mellom WT 4070 og M14 (Figur 3.6C og E). *DUF418* er i WT signifikant oppregulert med GarKS tilsatt. De samme observasjonene gjøres for M14, med en dobling i ekspresjon under stressende forhold. Det er en signifikant forskjell i oppreguleringen hos WT sammenlignet med mutanten, der WT oppregulerer transkripsjon av *DUF418* ca. 4 ganger mer enn det sett for M14. For *srrA* ble det observert en signifikant oppregulering under stressende forhold for WT, mens disse observasjonene ikke ble sett for mutanten, der dette genet tilsynelatende ikke oppreguleres ved stress (Figur 3.6E).



Figur 3.6 Forskjeller i genuttrykk til WT 4070 og M14 av et utvalg gener. Hver graf representerer et gen og viser genuttrykk (fold change) med standardavvik for WT 4070 og M14 med GarKS (0,005 mg/ml) og uten GarKS påvirkning. UB (ubehandlet) indikerer at cellene ikke ble utsatt for GarKS og B (behandlet) indikerer at cellene ble utsatt for GarKS i 30 minutter før cellene ble høstet. Statistisk analyse bestemt med uparet t-test i GraphPad Prism med gjennomsnitt av to biologiske replikater (n = 2). *p<0,05; **p<0,01.

Blant de resterende genene som ble undersøkt (Figur 3.6A, B, D, og F), ble det ikke funnet noe signifikante forskjeller med stress og uten stress til stede verken innenfor- eller mellom WT og mutant.

4. Diskusjon

Innen humanmedisin er hudinfeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus* et økende problem, spesielt hos mennesker med svekket immunforsvar. Samtidig er antibiotikaresistens stadig mer utbredt i denne arten, og det er derfor blitt undersøkt om bakteriociner kan bidra i å behandle infeksjoner av *S. haemolyticus*. Et nytt konstruert lederløst bakteriocin H1 er særdeles aktivt mot denne arten, men i laboratoriet (*in vitro*) er det sett at resistente celler lett forekommer og vokser opp selv ved høye konsentrasjoner av H1. Det er uvisst om slike resistente celler vil være et problem dersom H1 brukes til for eksempel behandling av infeksjoner. Det er tidligere vist at mutasjoner som gir resistens mot H1 er assosiert med *rseP* og/eller *ecsAB*, der RseP er en viktig komponent i cellemembran/cellevegg-assosiert stressrespons til bakterier og EcsAB er kjent å være tett tilknyttet RseP. I oppgaven ble det isolert H1-resistente kolonier for å få en innsikt i konsekvensene til disse mutasjonene i *S. haemolyticus*, ettersom lite er kjent om funksjonen til RseP og EcsAB i denne arten. Et utvalg av resistente kolonier ble isolert og sekvensert for å finne mutasjoner i *rseP*, i tillegg ble det utført helgenomsekvensering av resistente stammer uten mutasjon i *rseP*. Det ble sett at isolatene hadde mutasjon enten i *ecsB* eller *rseP*, noe som bekrefter tidligere funn der resistens mot H1 er sterkt knyttet til disse genene¹⁰¹.

GarKS er et bakteriocin som er antatt å være membran-aktiv (poredannende) mot bakterier, uten at dette er vist eksperimentelt¹⁰⁹. GarKS er derfor foreslått å kunne indusere den type stressrespons som RseP sannsynligvis er involvert i å regulere¹⁰⁸. For å kunne studere om RseP og/eller EcsAB er involvert i stressrespons vil det hjelpe å kunne indusere denne responsen. For å se om GarKS kan være egnet til dette ble det utført en PI-assay. Forsøket viste at bakteriocinet fører til poredannelse, selv ved lav konsentrasjon (Figur 3.2). Videre indikerer resultatene at H1 ikke virker ved å danne porer i cellemembranen, noe som motstrider det tidligere forskning har antydnet. Det kan likevel ikke utelukkes at poredannelse er virkemåten til H1, siden metoden som ble brukt (PI-assay) krever at porer dannes med en viss størrelse som tillater at PI kan lekke inn i cellen og binde til DNA. Dette betyr at mindre porer ikke kan oppdages med denne metoden. Under behandlingen med H1 ble det observert en gradvis økning i fluorescens, som antyder at noe PI har klart å lekke inn i cellen. Dette tyder på en viss permeabilisering av cellemembranen, men videre undersøkelser er nødvendige for å bestemme den nøyaktige virkemåten til H1.

Videre ble det vist at *ecsB*-mutanter hadde halvert motstandsdyktighet mot GarKS enn WT (Tabell 3.2), selv om forskjellen mellom disse stammene kun var en mutasjon i *ecsB* (Tabell 3.1). Det var også tydelige forskjeller i veksthastighet mellom stammene med GarKS i mediet (Figur 3.3). Til sammen viser dette at *ecsB*-mutantene (M7 og M14) har en svekket evne til å motstå effekten av GarKS. Det ble også undersøkt om denne forskjellen var tilstedeværende med andre potensielt stressende stoffer, men det ble ikke observert store forskjeller i motstandsdyktighet ved eksponering for de fleste forbindelsene (Tabell 3.2). Selv om forskjellen var størst med GarKS var motstandsdyktigheten til M14 mot fusarsyre, kloramfenikol og SDS redusert med hhv. 30%, 30% og 40% fra WT. Endringen hos M7 var noe lavere med en reduksjon på 20%, 20% og 10% av WT for hhv. SDS, fusarsyre, og kloramfenikol. En mulig forklaring på denne forskjellen mellom de to *ecsB*-mutantene er at M7 har en mutasjon mot slutten av genet, som fører til en trunkering av proteinet fra 409 til 329 aa. Det kan tenkes at trunkert versjon av proteinet fortsatt kan ha noe funksjon, men mest sannsynlig svært svekket. Derimot har M14 mutasjon tidlig i genet, som ga trunkert proteinprodukt (98 aa) og antageligvis fører til et ikke-funksjonelt EcsB protein i denne stammen.

Det ble også undersøkt om WT og mutant hadde forskjeller i motstandsdyktighet mot ulike typer antibiotika. Det ble ikke funnet tydelige forskjeller mellom WT og mutanter, men enkelte stammeforskjeller mellom *S. haemolyticus* LMGT 4068 og LMGT 4070 ble sett (Figur 3.4). Det er derfor lite sannsynlig at EcsB eller RseP er involvert i regulering av prosesser som påvirker sensitivitet mot de testede antibiotika i disse stammene. Begge stammene viste seg å være resistente mot flere av antibiotikaene testet, noe som kanskje er forventet av kliniske isolater.

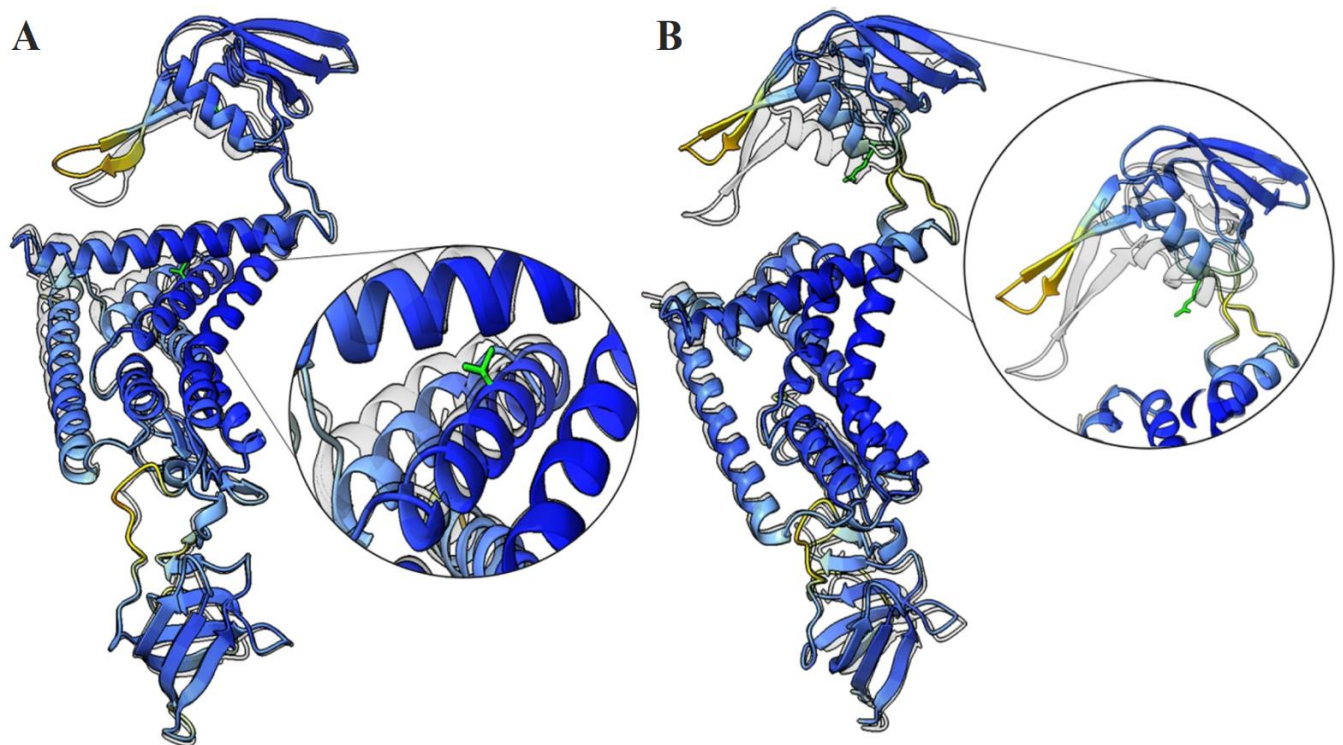
Ettersom stammene var resistente mot en rekke antibiotika ble det undersøkt om induert stress med GarKS kunne virke synergisk med H1 eller antibiotika, siden en synergisk effekt potensielt kan gi effektiv behandling selv ved lavere doser. I tillegg ble det undersøkt om to-komponentbehandling med GarKS og H1 kunne hindre fremvekst av resistente celler (Tabell 3.3). En kombinasjon av GarKS og H1 hadde en additiv effekt med en FIC på 0,6, og hindret ikke vekst av resistente celler. Videre ble det funnet forskjeller mellom M14 og WT ved to-komponentbehandling med GarKS og vankomycin, der WT hadde en FIC-verdi på 2 og mutanten hadde en FIC-verdi på 0,8, noe som tyder på at antibiotika kan ha bedre effekt i kombinasjon med bakteriociner. Det er vist tidligere at bakteriociner kan øke aktiviteten til hverandre når de brukes i kombinasjon¹⁰¹. Lignende funn ble gjort ved behandling med

GarKS og erytromycin, der WT viste bedre motstandsdyktighet med FIC-verdi på 1,3 sammenlignet med mutanten M14 på 0,8. Dette tyder på at antibiotikabehandling ved stressende forhold induisert av GarKS er en mer effektiv behandling mot H1-resistente kolonier, som i gjengjeld tyder på at resistente kolonier potensielt kan være enklere å behandle enn WT. Dette tyder igjen på at *ecsB* er viktig i regulering av gener som bidrar til bakteriens evne til å motstå forhold som virker stressende på cellen.

I denne studien ble GarKS brukt med hensikten å påføre cellene generell membran-assosiert stress. Dette bakteriocinet er antatt å drepe målceller med en uspesifikk interaksjonen med membranen som fører til forstyrrelser og poredannelse. Mennesker produserer og skiller ut et stort antall antimikrobielle peptider (AMPs) som hemmer bakterier med en lignende mekanisme som GarKS¹¹⁰. Mennesker skiller ut AMPs i de fleste kroppsvæsker, og de finnes på hud, iblant annet øyene, ører, munn, lunger og urinveiene, der infeksjoner av *S. haemolyticus* oftest skjer. Disse peptidene er en viktig del av det medfødte immunforsvaret, og motkjemper bakterieinfeksjon¹¹⁰. AMPs er typisk kationiske og amfifile korte peptider, slik som GarKS, og som også binder og forstyrrer bakteriemembranen på en uspesifikk måte. Det er høyst sannsynlig at H1 resistente mutanter med svekket motstandsdyktighet mot GarKS også vil være mer sårbare for AMPs. Det gjenstår å undersøke hvordan AMPs fra mennesker påvirker H1 resistente mutanter og villtype forskjellig.

I arbeidet ble det i tillegg isolert to *rseP*-mutanter som ble undersøkt i de samme testene som *ecsB*-mutantene, men ingen betydelige forskjeller i sensitivitet mot stress ble funnet (Figur 3.3 og Vedlegg 2). Funnene gjort for *rseP*-mutantene kan muligens forklares med konsekvensen av aminosyreendringene forårsaket av disse mutasjonene. Der *ecsB*-mutantene hadde mutasjoner som fører til forkortet aminosyresekvens, hadde *rseP*-mutantene kun enkle aminosyresubstitusjoner (Leu361Val og Pro289Arg) utenfor det aktive setet. Disse mutasjonene vil da mest sannsynlig ikke påvirke den proteolytiske aktiviteten og funksjonen til RseP. Det er mer sannsynlig at disse mutasjonene er viktig i interaksjonen mellom RseP og bakteriocin H1. For å undersøke dette ble det utført strukturprediksjon av RseP med AlphaFold2/ColabFold¹⁰⁵, og som forventet befant de muterte aminosyrene seg utenfor områder som er essensielle for den proteolytiske funksjonen til RseP (Figur 4A og B). Ved å predikere interaksjonen mellom RseP og H1 (Vedlegg 3), kan det ses at den N-terminale delen av H1 interagerer med de transmembrane heliksene i RseP. Dette kan forklare hvordan mutasjonen i M2 fører til økt motstandsdyktighet mot H1, da også denne mutasjonen kan forstyrre interaksjonen mellom bakteriocinet og RseP (Figur 4A). Mutasjon i M9 er nær PDZ-

domenet og er predikert til å føre til endret orientering av det ekstracellulære domenet (Figur 4B). Dette kan forklare den observerte motstandsdyktigheten mot H1, da det antas at mutasjonen svekker H1 sin evne til å binde til RseP. Dette viser viktigheten av å forstå detaljert interaksjonen mellom bakteriociner og RseP. Slik kunnskap er essensielt for å kunne utvikle nye og effektive bakteriociner.



Figur 4. Strukturprediksjon av RseP fra mutantene. Proteinet er farget etter konfidens-nivå (pLDDT) fra blå (høyest), lyseblå (lavere) til gul (lavest). Grå figur i bakgrunnen viser WT RseP. (A) Viser predikert RseP struktur for mutant M2 (Leu361Val), der mutert aminosyren valin vises i grønn. (B) Predikert RseP struktur for M9 (Pro289Arg), der den muterte aminosyren arginin vises i grønn.

Biofilmdannelse er en viktig virulensfaktor, og både RseP og EcsAB er vist å være viktig for biofilmdannelse i andre arter ¹¹¹. Undersøkelse av biofilmdannelse viste at stamme LMGT 4070 hadde bedre evne til å danne biofilm enn stamme LMGT 4068 (Figur 3.5), og at *ecsB* mutantene til begge arter hadde svekket evne til å danne biofilm. Forskjellen var mest betydelig hos M7, hvor WT viste god evne til biofilmdannelse ($OD_{600} \sim 3$) mens mutanten var en dårlig biofilmdanner ($OD_{600} < 1$). Disse observasjonene kan ses i sammenheng med vekstforsøk over tid med GarKS, der begge *ecsB* mutantene hadde betydelig lavere vekst med stress til stede (Figur 3.3). Samtidig vokste *ecsB*-mutanten i stamme LMGT 4070 (M14) vesentlig bedre enn *ecsB*-mutanten for stamme LMGT 4068 (M7) (Figur 3.3B og D).

Biofilmdannelse kan muligens henge sammen med veksthastighet. Dermed kan det indikere at den bedre biofilmdannelsen hos 4070 gjør at både WT og mutanter av denne stammen er bedre egnet for å motstå stressende forhold enn det som observeres for stamme LMGT 4068.

Ettersom eksisterende behandling mot *S. haemolyticus* er svært utfordrende på grunn av utbredt antibiotikaresistens, finnes det et ønske om å bruke H1 i behandling av slike bakterielle infeksjoner. Det er mye sannsynlig at behandlingspotensialet til H1 er betydelig svekket på grunn av resistensutvikling. På tross av dette ble det sett at mutantene med fullstendig resistens mot H1 hadde dårligere evne til å danne biofilm, i tillegg til at de tilsynelatende hadde dårligere evne til å regulere stressrespons. Disse funnene kan brukes til å argumentere for at resistente kolonier har lavere virulens enn det sett for WT, og den dårlige biofilmdannelsen kan potensielt gjøre disse bakteriene mer sårbare for en immunrespons fra verten. Det ble sett av Jonsson *et al.* (2010) at mus infisert med *S. aureus* uten *ecs* utviklet mildere infeksjoner enn de infisert med WT-stammer⁷⁷. Dersom denne kunnskapen kan overføres til *S. haemolyticus* kan dette være med på å styrke potensialet H1 har som behandlingsmetode, ettersom mutantene potensielt har dårligere patogenisitet.

For å få dypere innsikt i genreguleringen styrt av EcsB hos *S. haemolyticus* ble det utført RT-qPCR for å kvantifisere uttrykk av et utvalg gener knyttet til stressrespons (Figur 3.6A-F). Genene undersøkt ble valgt med utgangspunkt i en transkripsjonsanalyse utført i en tidligere masteroppgave av *S. haemolyticus* villtype og *rseP*-mutant med og uten stress¹⁰⁸. I den analysen ble det funnet at genene *DUF418*, hypotetisk protein, *srrA* og *srrB* ble høyere uttrykt hos WT under stress induert av GarkS enn hos *rseP*-mutanten. Ettersom det virker å være en tett kobling mellom RseP og EcsB, ble det antatt at *ecsB*-mutant ville ha lignende regulering av disse genene som sett for *rseP*-mutanten. I denne oppgaven ble det derimot kun funnet signifikante forskjeller mellom mutant og WT i uttrykk av *DUF418* og *srrA* (Figur 3.6C og E), der WT hadde en høyere oppregulering av disse genene under stressende forhold enn det sett for *ecsB*-mutanten. Dette tyder på at reguleringen av disse genene er sterkt knyttet til EcsB og at disse genene er viktig for normal stressregulering hos *S. haemolyticus*. Det ble sett at genet *srrA* ikke ble differensielt uttrykt hos mutant uten funksjonelt *ecsB* med og uten stress, mens dette genet ble oppregulert hos WT under stressende forhold. Ettersom dette genet er kjent for å være koblet til biofilmdannelse kan denne observasjonen forklare den reduserte biofilmdannelsen hos mutanter med manglende EcsB. I tillegg er det foreslått at SrrAB systemet er involvert i regulering av flere andre virulensfaktorer når den aktiveres som følge av redusert oksygentilgang. Dermed spekuleres det i at mutasjoner i *ecsB* svekker

virulensen til bakterien under stressende forhold, som følge av en dårligere regulering av *SrrAB*. Det ble også sett at genet *DUF418* ble oppregulert hos WT under stress, mens denne oppreguleringen var dårligere hos *ecsB*-mutanten. Disse funnene tyder på at funksjonelt EcsB er viktig for riktig regulering av disse genene for normal stressrespons i *S. haemolyticus*. Etersom funksjonen til *DUF418* er ukjent, vil det være av stor interesse å få dypere innsikt i funksjonen og reguleringen av dette genet, siden funnene i dette arbeidet tyder på at dette genet er viktig i stressresponsen til *S. haemolyticus*.

5. Konklusjon og videre arbeid

Funnene gjort i dette arbeidet indikerer at en mutasjon i *ecsB* svekker *S. haemolyticus* sin evne til å overleve under stressende forhold. Viktigst er det sett at evnen til å danne biofilm er svært redusert hos *ecsB* mutanter, i tillegg til redusert vekst og overlevelse under påvirkning av GarKS. Videre er det oppnådd dypere innsikt i hvordan *ecsB* regulerer stressrespons gjennom endret transkripsjon av utvalgte gener. Funnene tyder på at reguleringen av genene *srrA* og *DUF418* er kontrollert av *ecsB* ved stress induisert av GarKS. Det vil være av interesse å få ytterligere kunnskap om hvordan *srrA* videre regulerer gener ved stress. I tillegg er *DUF418* et protein uten kjent funksjon, og ytterlige undersøkelser av dette proteinet er nødvendig for bedre forståelsen av stressreguleringen utført av *ecsB*. I tillegg bør forsøkene reproduseres med flere replikater for å styrke funnene som er gjort. Det vil også være av stor interesse å undersøke om det er flere gener som styres av *ecsAB* for eksempel ved å utføre en full transkriptomanalyse. Det vil kunne gi en mer fullstendig forståelse av prosessen. Noen gener som kan være interessant å undersøke er *agr* og *PSM*, fordi disse er kjent å være koblet til normal biofilmdannelse.

5. Referansliste

1. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014).
2. Eltwisy, H. O. *et al.* Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus* on primary human skin fibroblast cells. *Virulence* **11**, 1142–1157 (2020).
3. Barros, E. M., Lemos, M., Souto-Pradrón, T. & Giambiagi-deMarval, M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Biofilm Formation in *Staphylococcus haemolyticus*. *Curr. Microbiol.* **70**, 829–834 (2015).
4. Silva, P. V. *et al.* The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 812–813 (2013).
5. Czekaj, T., Ciszewski, M. & Szewczyk, E. M. *Staphylococcus haemolyticus* - an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiol. Read. Engl.* **161**, 2061–2068 (2015).
6. Takeuchi, F. *et al.* Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J. Bacteriol.* **187**, 7292–7308 (2005).
7. Rasmi, A. H., Ahmed, E. F., Darwish, A. M. A. & Gad, G. F. M. Virulence genes distributed among *Staphylococcus aureus* causing wound infections and their correlation to antibiotic resistance. *BMC Infect. Dis.* **22**, 652 (2022).
8. Cavanagh, J. P. *et al.* Comparative exoproteome profiling of an invasive and a commensal *Staphylococcus haemolyticus* isolate. *J. Proteomics* **197**, 106–114 (2019).
9. Eltwisy, H. O., Twisy, H. O., Hafez, M. H., Sayed, I. M. & El-Mokhtar, M. A. Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms* **10**, 1130 (2022).
10. Fredheim, E. G. A. *et al.* Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1172–1180 (2009).
11. Di Martino, P. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiol.* **4**, 274–288 (2018).
12. Kranjec, C. *et al.* Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiot. Basel Switz.* **10**, 131 (2021).
13. Kaplan, J. B. *et al.* Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide resistance on pig skin in vivo. *PLoS ONE* **13**, e0205526 (2018).
14. Vuong, C. *et al.* Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* **6**, 753–759 (2004).
15. Muhammad, M. H. *et al.* Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).
16. Solano, C., Echeverz, M. & Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* **18**, 96–104 (2014).

17. Kretschmer, D., Nikola, N., Dürr, M., Otto, M. & Peschel, A. The Virulence Regulator Agr Controls the Staphylococcal Capacity to Activate Human Neutrophils via the Formyl Peptide Receptor 2. *J. Innate Immun.* **4**, 201–212 (2012).
18. Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E. & Horswill, A. R. Peptide Signaling in the Staphylococci. *Chem. Rev.* **111**, 117–151 (2011).
19. Le, K. Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V. & Otto, M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
20. Berlanga, M. & Guerrero, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb. Cell Factories* **15**, 165 (2016).
21. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332 (2010).
22. Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 199–210 (2008).
23. Rani, S. A. *et al.* Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J. Bacteriol.* **189**, 4223–4233 (2007).
24. Hosseinkhani, F. *et al.* Variable number of tandem repeat profiles and antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from blood cultures in children. *Infect. Genet. Evol.* **38**, 19–21 (2016).
25. Rossi, C. C. *et al.* Transfer of mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* clinical strains to *Staphylococcus aureus* through conjugative and mobilizable plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw121 (2016).
26. Fluit, A. C., Carpaij, N., Majoor, E. A. M., Bonten, M. J. M. & Willems, R. J. L. Shared reservoir of *ccrB* gene sequences between coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1707–1713 (2013).
27. Cavanagh, J. P. *et al.* Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 2920–2927 (2014).
28. Katayama, Y., Ito, T. & Hiramatsu, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1549–1555 (2000).
29. Yu, D. *et al.* Characterization of the Staphylococcal Cassette Chromosome Composite Island of *Staphylococcus haemolyticus* SH32, a Methicillin-Resistant Clinical Isolate from China. *PLOS ONE* **9**, e87346 (2014).
30. Bouchami, O., Lencastre, H. de & Miragaia, M. Impact of Insertion Sequences and Recombination on the Population Structure of *Staphylococcus haemolyticus*. *PLOS ONE* **11**, e0156653 (2016).
31. Tollerson, R. & Ibba, M. Translational regulation of environmental adaptation in bacteria. *J. Biol. Chem.* **295**, 10434–10445 (2020).
32. Dawan, J. & Ahn, J. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. *Microorganisms* **10**, 1385 (2022).

33. Heinrich, J. & Wiegert, T. Regulated intramembrane proteolysis in the control of extracytoplasmic function sigma factors. *Res. Microbiol.* **160**, 696–703 (2009).
34. Tierney, A. R. & Rather, P. N. Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* **14**, 533–552.
35. Maslennikov, I. *et al.* Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10902–10907 (2010).
36. Tiwari, S. *et al.* Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
37. Mitrophanov, A. Y. & Groisman, E. A. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* **22**, 2601–2611 (2008).
38. Tiwari, N. *et al.* The SrrAB two-component system regulates *Staphylococcus aureus* pathogenicity through redox sensitive cysteines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 10989–10999 (2020).
39. Pragman, A. A., Yarwood, J. M., Tripp, T. J. & Schlievert, P. M. Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 2430–2438 (2004).
40. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* - PMC.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5380435/>.
41. Extra cytoplasmic sigma factors in *Staphylococcus aureus*; their role and significance in the survival of Cocci. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* **Volume 1**, (2016).
42. Helmann, J. D. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. in *Advances in Microbial Physiology* vol. 46 47–110 (Academic Press, 2002).
43. Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A. & MacLellan, S. R. The essential activities of the bacterial sigma factor. *Can. J. Microbiol.* **63**, 89–99 (2017).
44. Tao, L., Wu, X. & Sun, B. Alternative Sigma Factor σ H Modulates Prophage Integration and Excision in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathog.* **6**, e1000888 (2010).
45. Tuchscher, L. *et al.* Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLoS Pathog.* **11**, e1004870 (2015).
46. Shaw, L. N. *et al.* Identification and Characterization of σ S, a Novel Component of the *Staphylococcus aureus* Stress and Virulence Responses. *PLOS ONE* **3**, e3844 (2008).
47. Horsburgh, M. J. *et al.* σ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* **184**, 5457–5467 (2002).
48. Kullik, I., Giachino, P. & Fuchs, T. Deletion of the Alternative Sigma Factor σ B in *Staphylococcus aureus* Reveals Its Function as a Global Regulator of Virulence Genes. *J. Bacteriol.* **180**, 4814–4820 (1998).
49. Entenza, J.-M. *et al.* Role of σ B in the Expression of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Adhesins ClfA and FnbA and Contribution to Infectivity in a Rat Model of Experimental Endocarditis. *Infect. Immun.* **73**, 990–998 (2005).
50. Morikawa, K. *et al.* A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **8**, 699–712 (2003).

51. Burda, W. N. *et al.* Investigating the genetic regulation of the ECF sigma factor σ S in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* **14**, 280 (2014).
52. Pinto, D., Liu, Q. & Mascher, T. ECF σ factors with regulatory extensions: the one-component systems of the σ universe. *Mol. Microbiol.* **112**, 399–409 (2019).
53. Brooks, B. E. & Buchanan, S. K. Signaling Mechanisms for Activation of Extracytoplasmic Function (ECF) Sigma Factors. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1930–1945 (2008).
54. Paget, M. S. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* **5**, 1245–1265 (2015).
55. Akiyama, Y., Kanehara, K. & Ito, K. RseP (YaeL), an *Escherichia coli* RIP protease, cleaves transmembrane sequences. *EMBO J.* **23**, 4434–4442 (2004).
56. Kinch, L. N., Ginalski, K. & Grishin, N. V. Site-2 protease regulated intramembrane proteolysis: Sequence homologs suggest an ancient signaling cascade. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15**, 84–93 (2006).
57. Cheng, D. *et al.* Roles of the Site 2 Protease Eep in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **202**, (2020).
58. Inaba, K. *et al.* A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**, 35042–35052 (2008).
59. Yokoyama, T. *et al.* The *Escherichia coli* S2P intramembrane protease RseP regulates ferric citrate uptake by cleaving the sigma factor regulator FecR. *J. Biol. Chem.* **296**, (2021).
60. Hizukuri, Y. *et al.* A structure-based model of substrate discrimination by a noncanonical PDZ tandem in the intramembrane-cleaving protease RseP. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **22**, 326–336 (2014).
61. Parrell, D., Zhang, Y., Olenic, S. & Kroos, L. *Bacillus subtilis* Intramembrane Protease RasP Activity in *Escherichia coli* and In Vitro. *J. Bacteriol.* **199**, e00381-17 (2017).
62. Akiyama, K. *et al.* Roles of the membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. *eLife* **4**, e08928 (2015).
63. Kristensen, S. S. The site-2-protease RseP as a novel antimicrobial target. (Norwegian University of Life Sciences, 2023).
64. Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A. & Sauer, R. T. OMP Peptide Signals Initiate the Envelope-Stress Response by Activating DegS Protease via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain. *Cell* **113**, 61–71 (2003).
65. Alba, B. M., Leeds, J. A., Onufryk, C., Lu, C. Z. & Gross, C. A. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ E-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* **16**, 2156–2168 (2002).
66. Kanehara, K., Ito, K. & Akiyama, Y. YaeL (EcfE) activates the σ E pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- σ E, RseA. *Genes Dev.* **16**, 2147–2155 (2002).
67. Chen, G. & Zhang, X. New insights into S2P signaling cascades: Regulation, variation, and conservation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **19**, 2015–2030 (2010).
68. Li, X. *et al.* Cleavage of RseA by RseP requires a carboxyl-terminal hydrophobic amino acid following DegS cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14837–14842 (2009).

69. Kim, D. Y. Two stress sensor proteins for the expression of sigmaE regulon: DegS and RseB. *J. Microbiol.* **53**, 306–310 (2015).
70. Lima, S., Guo, M. S., Chaba, R., Gross, C. A. & Sauer, R. T. Dual Molecular Signals Mediate the Bacterial Response to Outer-Membrane Stress. *Science* **340**, 837–841 (2013).
71. Varahan, S., Iyer, V. S., Moore, W. T. & Hancock, L. E. Eep Confers Lysozyme Resistance to *Enterococcus faecalis* via the Activation of the Extracytoplasmic Function Sigma Factor SigV. *J. Bacteriol.* **195**, 3125–3134 (2013).
72. Chandler, J. R. & Dunny, G. M. Characterization of the Sequence Specificity Determinants Required for Processing and Control of Sex Pheromone by the Intramembrane Protease Eep and the Plasmid-Encoded Protein PrgY. *J. Bacteriol.* **190**, 1172–1183 (2008).
73. Schilcher, K., Caesar, L. K., Cech, N. B. & Horswill, A. R. Processing, Export, and Identification of Novel Linear Peptides from *Staphylococcus aureus*. *mBio* **11**, e00112-20 (2020).
74. Varahan, S., Harms, N., Gilmore, M. S., Tomich, J. M. & Hancock, L. E. An ABC transporter is required for secretion of peptide sex pheromones in *Enterococcus faecalis*. *mBio* **5**, e01726-01714 (2014).
75. Heinrich, J., Lundén, T., Kontinen, V. P. & Wiegert, T. The *Bacillus subtilis* ABC transporter EcsAB influences intramembrane proteolysis through RasP. *Microbiology* **154**, 1989–1997 (2008).
76. Higgins, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res. Microbiol.* **152**, 205–210 (2001).
77. Jonsson, I.-M. *et al.* Inactivation of the Ecs ABC transporter of *Staphylococcus aureus* attenuates virulence by altering composition and function of bacterial wall. *PloS One* **5**, e14209 (2010).
78. Branda, S. S. *et al.* Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **186**, 3970–3979 (2004).
79. Leskelä, S. *et al.* Ecs, an ABC transporter of *Bacillus subtilis*: dual signal transduction functions affecting expression of secreted proteins as well as their secretion. *Mol. Microbiol.* **31**, 533–543 (1999).
80. Kristensen, S. S. *et al.* The extracellular domain of site-2-metalloprotease RseP is important for sensitivity to bacteriocin EntK1. *J. Biol. Chem.* **298**, 102593 (2022).
81. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials - Darbandi - 2022 - Journal of Clinical Laboratory Analysis - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.24093>.
82. Gradisteanu Pircalabioru, G. *et al.* Bacteriocins in the Era of Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. *Pharmaceutics* **13**, 196 (2021).
83. Fair, R. J. & Tor, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Med. Chem.* **6**, PMC.S14459 (2014).
84. Gupta, V. & Datta, P. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids. *Indian J. Med. Res.* **149**, 97–106 (2019).
85. Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 (2005).

86. Simons, A., Alhanout, K. & Duval, R. E. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms* **8**, 639 (2020).
87. Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95–105 (2013).
88. Antoshina, D. V., Balandin, S. V. & Ovchinnikova, T. V. Structural Features, Mechanisms of Action, and Prospects for Practical Application of Class II Bacteriocins. *Biochem. Mosc.* **87**, 1387–1403 (2022).
89. Oscáriz, J. C. & Pisabarro, A. G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **4**, 13–19 (2001).
90. Zimina, M. *et al.* Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics* **9**, 553 (2020).
91. Lahiri, D. *et al.* Bacteriocin: A natural approach for food safety and food security. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 1005918 (2022).
92. Benítez-Chao, D. F., León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J. A. & Morones-Ramírez, J. R. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
93. Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 546–551 (2009).
94. Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F. & Drider, D. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms* **9**, 2107 (2021).
95. Fields, F. R. *et al.* Synthetic Antimicrobial Peptide Tuning Permits Membrane Disruption and Interpeptide Synergy. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **3**, 418–424 (2020).
96. O’Shea, E. F., O’Connor, P. M., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Synthesis of Trypsin-Resistant Variants of the Listeria-Active Bacteriocin Salivaricin P. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5356–5362 (2010).
97. Ovchinnikov, K. V. *et al.* The Leaderless Bacteriocin Enterocin K1 Is Highly Potent against *Enterococcus faecium*: A Study on Structure, Target Spectrum and Receptor. *Front. Microbiol.* **8**, 774 (2017).
98. Zhang, T. *et al.* Biosynthesis and Production of Class II Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Fermentation* **8**, 217 (2022).
99. Perez, R. H., Zendo, T. & Sonomoto, K. Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
100. Uzelac, G. *et al.* A Zn-dependent metallopeptidase is responsible for sensitivity to LsbB, a class II leaderless bacteriocin of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMN1-5. *J. Bacteriol.* **195**, 5614–5621 (2013).
101. Kranjec, C. *et al.* A bacteriocin-based treatment option for *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. (2021) doi:10.1038/s41598-021-93158-z.
102. Novick, R. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* **33**, 155–166 (1967).

103. Duthie, E. S. & Lorenz, L. L. Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *Microbiology* **6**, 95–107 (1952).
104. Wattam, A. R. *et al.* Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Res.* **45**, D535–D542 (2017).
105. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682 (2022).
106. Reinseth, I. S., Ovchinnikov, K. V., Tønnesen, H. H., Carlsen, H. & Diep, D. B. The Increasing Issue of Vancomycin-Resistant Enterococci and the Bacteriocin Solution. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **12**, 1203–1217 (2020).
107. Ovchinnikov, K. V., Kranjec, C., Thorstensen, T., Carlsen, H. & Diep, D. B. Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e00829-20 (2020).
108. Solberg, K. K. Cost of resistance : stress tolerance and gene expression in wild type and mutant strains of *Staphylococcus haemolyticus* LMG4071. (Norwegian University of Life Sciences, 2022).
109. Thapa, R. K., Winther-Larsen, H. C., Diep, D. B. & Tønnesen, H. H. Preformulation studies on novel garvicin KS peptides for topical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **151**, 105333 (2020).
110. Wang, G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals* **7**, 545–594 (2014).
111. Frank, K. L. *et al.* AhrC and Eep Are Biofilm Infection-Associated Virulence Factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* **81**, 1696–1708 (2013).

Vedlegg 1

Tabell V1. Gensekvenseringsresultater av *rseP*. Oversikt over hvilke mutanter som hadde mutasjon i *rseP* og hvor denne mutasjonen lå i nukleotid og proteinsekvens *til rseP*.

Mutant	Mutasjon
M2	c.1081C>G, p.Leu361Val
M4	c.729delT, p.243fs
M8	c.874G>T, p.Glu292*
M9	c.866C>G, p.Pro289Arg
M10	c.283G>T, p.Glu95*
M13	c.205A>T, p.69Arg*

c: Kodende DNA, p: Protein, fs: Rammeskift, >: Substitusjon, del: delesjon, *: Stoppkodon.

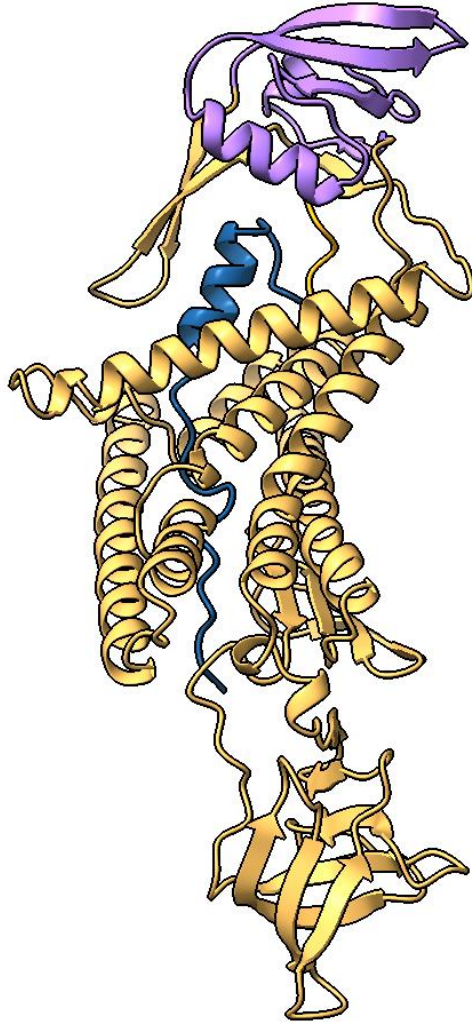
Vedlegg 2

Tabell V2. Stoff og forholdstall mellom *rseP* mutant/WT. Oversikt over stoffene brukt til testing av MIC₅₀, der det oppgis hvor mange ganger mer motstandsdyktig mutanten er enn villtype (mutant/WT). En verdi > 1 indikerer at mutanten er mer motstandsdyktig enn WT og en verdi < 1 indikerer at WT er mer motstandsdyktig enn mutant for det gitte stoffet.

Stoff testet	M2	M9
Etanol (Mut/WT)	1,2	1
Fusarsyre (Mut/WT)	0,6	1,3
GarKS (Mut/WT)	0,9	1,1
H1 (Mut/WT)	9,5	15,2
Kloramfenikol (Mut/WT)	1,3	1
NaCl (Mut/WT)	1	1
SDS (Mut/WT)	1,2	0,8

Vedlegg 3

Figur V3. Strukturprediksjon av RseP med H1. RseP vises i oransje, H1 i blå og PDZ-domenet i lilla. Sekvens for H1 hentet fra Kranjec *et al.* (2021)¹⁰¹.





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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway