

NATURLIG TRANSFORMASJON HOS STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.

NATURAL TRANSFORMATION IN STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.

GRY BIRKELAND

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIODIVERSITETSSKAP

INSTITUTT FOR KEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP
MÅS TEROPPRÅVE 60 STP. 2 01 1



Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført ved avdelingen for molekylær mikrobiologi ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) ved Univeritetet for miljø og biovitenskap (UMB) i Ås. Laboratoriearbeidet ble utført i perioden august 2010 til februar 2011.

Jeg vil rette en stor takk til:

- Tilleggsveilederen min Daniel Straume for god oppfølging og opplæring ved laboratoriearbeidet og under skriveprosessen.
- Hovedlederen min Leiv Sigve Håvarstein for å fått lov til å skrive masteroppgaven på denne avdelingen.
- Alle de ansatte på avdelingen for en fin tid og for alltid å være hjelpsomme under laboratoriearbeidet.

Ås, 11. mai 2011

Gry Birkeland

Innholdsfortegnelse

FORORD	0
INNHALDSFORTEGNELSE	2
FIGUROVERSIKT	6
FORKORTELSER	11
SAMMENDRAG	12
1. INNLEDNING	13
1.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE.....	13
1.2 FRED GRIFFITHS TIDLIGE FORSØK MED TRANSFORMASJON.....	14
1.3 NATURLIG GENETISK TRANSFORMASJON.....	15
1.3.1 Naturlig transformasjon hos Gram positive bakterier	15
1.4 KOMPETANSE HOS S.PNEUMONIAE	16
1.4.1 Rollen til naturlig genetisk transformasjon	16
1.4.2 Utvikling av kompetanse hos S.pneumoniae.....	17
1.4.3 Viktigheten av CbpD, LytA og LytC.....	19
1.4.4 CbpDs binding til celleveggen til ikke-kompetente celler.....	20
1.5 HETEROLOG PROTEINEKSPRESJON I LACTOCOCCUS LACTIS.....	21
1.6 FORMÅL MED OPPGAVEN.....	22
2. MATERIALER	23
2.1 BAKTERIESTAMMER.....	23
2.2 VEKSTMEDIER	24
2.3 LØSNINGER OG BUFFERERE	25
2.3.1 Løsninger til C-medium:	25
2.3.2 Løsninger og buffere til agarose-gelelektroforese:.....	26
2.3.3 Løsninger og buffere brukt ved støping av SDS-PAGE geler	27
2.3.4 Løsninger og buffere brukt ved SDS-PAGE	27
2.3.5 Løsninger brukt ved Coomassie-farging av gel	28
2.3.6 Løsninger brukt ved sølvfarging av gel.....	28
2.3.7 Buffere til Protino® Ni-TED pakkede kolonner – rensing under native forhold	29
2.3.8 Buffere til histidintag rensing på ÄKTAprime plus	29
2.3.9 Buffere til fjerning av metaller på HisTrap HP kolonne	30
2.3.10 Buffere til ionebyttekromatografi.....	30
2.3.11 Buffer til gelfiltrering	30
2.3.12 Buffere til rensing på DEAE cellulose.....	30
2.4 KIT	31
2.5 ENZYMER.....	31
2.6 STANDARDER	31
2.7 KJEMIKALIELISTE	32
2.8 UTSTYR OG MASKINER	33
3. METODER	36

3.1 RENSING AV CBPD.....	36
3.1.1 Affinitetskromatografi	36
3.1.1.1 Rensing av CbpD med diethylaminoethyl cellulose	36
3.1.2 Videre rensing av CbpD med ionebyttekromatografi.....	37
3.1.3 Rensing av CbpD med bruk av gelfiltrering.	39
3.1.4 Sodium Dodecyl Sulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS-page) av proteiner.....	40
3.1.4.1 Coomassie Brilliant Blue farging av proteingeler.....	41
3.1.4.2 Sølvfarging av proteingeler.....	41
3.2 TILLAGING AV CELLER SOM OVERUTTRYKKER HIS-CBPD.....	42
3.2.1 Amplifisering av his-cbpD ved Polymerase Chain Reaction (PCR).....	42
3.2.2 Rensing av PCR-produkt og plasmid	43
3.2.2.1 Rensing av PCR-produkt	43
3.2.2.2 Rensing av plasmid	44
3.2.3 Agarose gelelektroforese.....	45
3.2.4 Preparering av plasmid og PCR-produkt.....	45
3.2.5 DNA ekstrahering fra gel	46
3.2.6 Ligering av his-cbpD inn i pNZ8037.....	47
3.2.7 Kvalitetsjekk på insertet.	47
3.2.8 Isolering av plasmid.....	48
3.2.9 DNA sekvensering.....	49
3.2.10 Transformasjon av <i>Lactococcus lactis</i> NZ9000.....	50
3.2.11 Testing av transformert <i>L.lactis</i> NZ9000.....	50
3.3 IMMOBILISERT METALLION AFFINITETSKROMATOGRAFI (IMAK).....	51
3.3.1 Rensing av His-CbpD.....	52
3.3.1.1 Rensing av his tag merket CbpD protein med bruk av Protino® NiTED rensemetoden	52
3.3.1.2 Rensing av His-CbpD med HisTrap HP ved bruk av Äkta Prime™ Plus fra GE Healthcare	52
3.4 TESTING AV AKTIVITET TIL HIS-CBPD	54
3.4.1 Testing av aktivitet til His-CbpD etter rensing med Protino Ni-TED kolonne.....	54
3.4.2 Testing av aktivitet til His-CbpD etter rensing med Äkta Prime™ Plus nikkelkolonne	55
3.4.3 Testing av aktivitet til his tag merket CbpD etter DEAE cellulose rensing	55
3.4.4 Testing av de ulike komponentene i bufferne brukt ved Äkta Prime™ Plus.....	56
3.4.5 Testing av aktivitet til CbpD ved tilsetning av ulike toverdige metallioner	57
3.4.6 Testing av aktivitet His-CbpD etter rensing med Äkta Prime™ Plus zinkkolonne	58
3.5 ULIKE TESTER UTFØRT PÅ AKTIVITETEN TIL CBPD	58
3.5.1 Lagringsbetingelser for CbpD.....	59
3.5.2 Testing av EDTA sin påvirkning på aktiviteten til CbpD	59
3.5.3 Testing av aktiviteten til CbpD på katalasebehandlet cellekultur.....	60
3.5.4 Testing av aktiviteten til CbpD på celler i eksponentiellfase og celler i stasjonærfase.....	60
3.5.5 Testing av aktiviteten av CbpD på celler som uttrykker immunitetsproteinet ComM	61
3.5.6 Testing av aktiviteten til CbpD på celledammene RH1, RH14, RH15 og RH16.....	63
3.5.7 Testing av aktiviteten til CbpD på celledammene RH238, RH242 og RH292.....	63
3.5.8 Testing av aktiviteten til CbpD på en Δ ciaR mutant.....	64
3.5.9 Testing av aktiviteten til CbpD på celledammene RH281 og SPH102	64

4. RESULTATER	66
4.1 RENSING AV VILLTYPE CBPD	66
4.1.1 DEAE cellulose.....	66
4.1.2 Ionebyttekromatografi.....	68
4.1.3 Gelfiltrering.....	69
4.2 TILLAGING AV CELLER MED HIS-CBPD	71
4.2.1 Amplifisering av <i>his-cbpD</i>	71
4.2.2 PCR rensing/DNA plasmid rensing.....	72
4.2.3 Kutting av pNZ8037 og <i>his-cbpD</i>	72
4.2.4 DNA rensing fra gel.....	73
4.3 LIGERING OG TRANSFORMASJON	74
4.3.1 Ligere plasmid og insert.....	74
4.3.2 Sjekke lengden til insertet.....	74
4.3.3 Rensing av plasmid og sekvensering av <i>his-cbpD</i>	75
4.3.4 Transformasjon av <i>L. lactis</i> NZ9000.....	77
4.4 RENSING AV HIS-CBPD	77
4.4.1 Aktivitet av <i>his</i> tag merket <i>CbpD</i> etter DEAE cellulose	77
4.4.2 Protino [®] NiTED.....	78
4.4.3 Rensing av <i>His-CbpD</i> ved Äkta Prime Plus.....	80
4.5 TESTING AV AKTIVITET TIL HIS-CBPD	83
4.5.1 <i>His-CbpD</i> renses med Protino Ni-TED kolonne	83
4.5.2 Äkta Prime Plus Ni ²⁺ - kolonne	83
4.5.3 Testing av de ulike komponentene i buffer brukt ved Äkta Prime Plus.....	84
4.5.4 Testing av ulike toverdige metallioner	86
4.5.5 Äkta Prime Plus Zn ²⁺ - kolonne	86
4.6 ULIKE TESTER PÅ AKTIVITETEN TIL CBPD	87
4.6.1 Lagringsmetoder av <i>CbpD</i>	87
4.6.2 Påvirkning av EDTA på aktiviteten til <i>CbpD</i>	88
4.6.3 Aktiviteten til <i>CbpD</i> etter tilsatt katalase.....	89
4.6.4 Aktiviteten til <i>CbpD</i> på celler i eksponentiellfasen og celler i stasjonærfasen	90
4.6.5 Aktivitet av <i>CbpD</i> på celler som uttrykker immunhetsproteinet <i>ComM</i>	90
4.6.6 <i>LytA</i> og <i>LytC</i> bidrar til økt cellelysis.....	93
4.6.7 Aktivitet til <i>CbpD</i> på stammene RH238, RH242 og RH292.....	93
4.6.8 Aktiviteten til <i>CbpD</i> på en Δ <i>ciaR</i> mutant.....	94
4.6.9 Aktiviteten til <i>CbpD</i> på stammene RH281 og SPH102.....	94
5 DISKUSJON	96
5.1 RENSING AV CBPD FOR OPPNÅELSE AV KRYSTALLSTRUKTUR	96
5.2 LAGRING AV CBPD FOR Å BEHOLDE AKTIVITETEN	98
5.3 PÅVIRKNINGEN AV EDTA.....	98
5.4 VIRKNINGEN AV KATALASE PÅ CBPD AKTIVITETEN	99
5.5 CBPD ANGRIPER CELLER I DELINGSFASEN	99
5.6 <i>COMM</i> BESKYTTER CELLENE FRA LYSIS VED CBPD	100

5.7 LYTA OG LYTC I MÅLCELLEN BIDRAR TIL ØKT LYSIS VED CBPD ANGREP	100
5.8 ULIKE MUTASJONER SOM PÅVIRKER OPPBYGGINGEN AVCELLEVEGGEN HAR KONSEKVENSER FOR CBPD- SENSITIVITET.....	101
5.8.1 Påvirkning av ekstra kolin i celleveggen.....	101
5.8.2 Påvirkning av manglende interpeptidbroer i celleveggen.....	101
5.8.3 Påvirkning av manglende O-acetylering i celleveggen.....	102
5.8.4 Påvirkning av færre teikoinsyrer i celleveggen	102
5.8.5 Påvirkning av manglende N-deacetylase.....	102
5.8.6 Påvirkning av færre koliner festet til teikoinsyrene i celleveggen.....	103
6 KONKLUSJON OG FREMTIDIG ARBEID.....	105
7 REFERANSER	106

Figuroversikt

Figur 1: Elektron mikrograf av et par med <i>S.pneumoniae</i> diplokokker.	13
Figur 2: Griffiths transformasjons forsøk (tutorvista.com)	15
Figur 3: Utvikling av kompetans hos <i>S.pneumoniae</i> (Johnsborg og Håvarstein 2009).	18
Figur 4: Skjemastisk fremstilling av NICE operonet (Zhou et al 2006).	22
Figur 5: Äkta Prime™ Plus (GE Healthcare).....	38
Figur 6: Til venstre oppsett over PCR for tillaging av <i>his-cbpD</i> . Til høyre PCR program.	43
Figur 7: Oppsett for kutting av plasmid og PCR-produkt	46
Figur 8:Ligeringsreaksjon	47
Figur 9: PCR miks for kvalitetsjekk av insertet.....	48
Figur 10: PCR reaksjon for å undersøke plasmidet.	48
Figur 13: Til venstre sekvenseringsmiks for sekvenseringsreaksjon. Til høyre sekvenseringsprogrammet.	49
Figur 11: dNTP (berkeley.edu).....	49
Figur 12: ddNTP (berkeley.edu).....	49
Figur 14: Mastermiks for PCR av <i>L.lactis</i> transformanter	51
Figur 15: Äkta Prime™ Plus oppsett (GE Healthcare)	53
Figur 16: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til His-CbpD etter rensing med Protino Ni-TED.....	55
Figur 17: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til His-CbpD etter rensing med nikkelkolonne på Äkta Prime Plus.	55
Figur 18.Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til His-CbpD etter rensing med DEAE-cellulose.	56
Figur 19: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet av CbpD etter tilsetting av de ulike komponentene i buffer brukt ved rensing ved Äkta Prime Plus.	56
Figur 20: Fortynningsrekke av Ni ²⁺ fordelt i de ulike kyvettene spektrofotometrisk analyse for å se hvor stor mengde Ni ²⁺ som skal til for å hemme aktiviteten til CbpD.....	57
Figur 21:Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til CbpD etter tilsetting av ulike toverdige metaller.....	58
Figur 22:Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet av His-CbpD etter rensing med zinkkolonne ved Äkta Prime Plus.	58

Figur 23: Ulike lagringsmetoder av CbpD proteinet for spektrofotometrisk analyse for å finne en måte å bevare aktiviteten til proteinet.	59
Figur 24: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av påvirkningen av å tilsette ulike mengder EDTA til henholdsvis 0,75 og 0,25 µg CbpD.	60
Figur 25: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD etter tilsetting av ulike mengder katalase.	60
Figur 26: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på celler i stasjonær og eksponentiellfasen.	61
Figur 27: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH14 og SPH 106 celler induisert med CSP.	62
Figur 28: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH222 og SPH106 celler som er induert med CSP.	62
Figur 29: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH609 og RH612 celler som har ulik styrke på promoteren for <i>comM</i>	62
Figur 30: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH1, RH14, RH15 og RH16 celler som er ulike <i>LytA/LytC</i> mutanter.	63
Figur 31: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH238, RH242 og RH292 celler som har ulike mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen.	64
Figur 32: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på Δ <i>ciaR</i> som har en mutasjon som påvirker oppbyggingen av celleveggen.	64
Figur 33: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH281 og SPH 102 som har mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen.	65
Figur 34: De første trinnene for rensing av CbpD ved DEAE cellulose presentert ved en SDS page gel etter farging med Coomassie Blue. Brønn 1 1Kb stige, brønn 2 før induksjon, brønn 3 etter induksjon, brønn 4-7 vasketrinn 1-4	67
Figur 35: Eluering av CbpD i 5 trinn ved DEAE cellulose. Gelen fra SDS-page er farget med Coomassie blue. Brønn 1: BR stige, brønn 2-6: eluering 1-5.	67
Figur 36: De ulike kurvene viser de ulike komponentene i rensemetoden. For de ulike kurvene har y-aksen ulike benevninger. Ved den røde kurven som viser proteinutbyttet viser y-aksen verdien i absorpsjon ved 280nm. For den lilla kurven som viser konsentrasjonen av elueringsbufferen er benevningen for y-aksen %. For den grønne kurven som viser konduktiviteten til løsningen er benevningen mS/cm.	68
Figur 37: Sølvfarget protein gel etter rensing av CbpD ved hjelp av ionebyttekromatografi. Elueringsfraksjonene 7-12 (brønn 2-7) fra ionebyttekromatografien ble analysert vha SDS-PAGE. Protein størrelsesmarkør (BR stige) er representert i brønn nr. 1 stige.	69

Figur 38: Proteinutbyttet etter gelfiltreringen. Den blå linjen viser absorbansen til løsningen som kommer gjennom gelfiltreringskolonnen. Toppen etter ca. 8 min viser proteinutbytte.	70
Figur 39: Bilde av gel fra proteinprøver etter gelfiltrering og sølvfarging av gelen. Brønn 1: 1 BR stige, brønn 2-6: eluering 1-5. CbpD og degraderingsprodukt indikert med piler.....	70
Figur 40: Viser PCR produktet fra de to parallelle PCR oppsettene for amplifisering av <i>his-cbpD</i> . I brønn 1 ser man stige mens i brønn 2 og 3 ser man PCR produktene man kan se at begge produktene har samme lengde som er nær den teoretiske lengden.	71
Figur 41: Produktet etter rensing av PCR produktet og plasmid DNA. I brønn 1: 1 Kb stige, brønn 2: plasmid DNA og brønn 3: rensset PCR produkt.	72
Figur 42: Bilde av gel etter kutting av plasmid og PCR produkt. Brønn 1: stige, brønn 2: plasmid DNA og brønn 3: PCR produkt.	73
Figur 43: Bilde av gel etter DNA ble trukket ut av gel. Brønn 1: 1 Kb stige, brønn 2: DNA plasmid og brønn 3: PCR produkt	74
Figur 44: Bilde av gel etter PCR med celler som muligens inneholder det riktige insertet i pNZ8037. Brønn 1: 1 Kb stige, brønn 2-6: mulige ønskede insert. Brønn 2 har PCR produkt med den ønskede teoretiske lengden.	75
Figur 45: Bilde av gel etter PCR på kolonier med innsatt plasmid med <i>his-cbpD</i> . Brønn 1 1Kb stige, brønn 2 PCR produkt.	76
Figur 46: Bilde av gel etter rensing av PCR produktet. Brønn 1: stige og brønn 2: PCR produkt.	76
Figur 47: Bilde av gel etter testing av transformanter. Brønn 1 1 Kb stige, brønn 2-4 PCR av mulige transformanter.....	77
Figur 48: Resultat fra testing av aktivitet til His-CbpD etter rensing med DEAE cellulose. Aktiviteten til His-CbpD er noe lavere enn aktiviteten til villtype CbpD.	78
Figur 49: Bilde av gel etter rensing ved DEAE cellulose og farget med Coomassie blue. Brønn 1: BR stige, brønn 2-6: eluering 1-5. His-CbpD og degraderingsprodukt indikert med piler.	79
Figur 50: Bilde av gel etter rensing ved Protino® NiTED. Brønn 1: stige, brønn 2: flow through, brønn 3: vask 1, brønn 4: vask 2, brønn 5-7: eluering 1-3. His-CbpD og degraderingsprodukt indikert med piler.	79
Figur 51: Graf over rensing av his tag merket CbpD etter Äkta prime plus. Blå linje viser absorbans, grønn linje viser konsentrasjon av elueringsbuffer. Toppen for absorbans viser proteinutbyttet.	80
Figur 52: Bilde av gel etter SDS-page og sølvfarging etter rensing av His-CbpD etter Äkta Prime Plus. Brønn 1: BR stige, brønn 2-7: eluering 9-14. His-CbpD er indikert med pil.	81
Figur 53: Graf over rensing av his tag merket CbpD etter Äkta prime plus med zink kolonne. Blå linje viser absorbans, grønn linje viser konsentrasjon av elueringsbuffer. Toppen for absorbans viser proteinutbyttet for denne rensemetoden.	82

Figur 54: Bilde etter SDS separering og påfølgende sølvfarging av gel etter Äkta Prime Plus med Zn ²⁺ -kolonne. Brønn 1: BR stige, brønn 2: binding av proteinet, brønn 3: vask av kolonnen og brønn 4-8: eluering av proteinet. His-CbpD indikert med pil.	82
Figur 55: Graf over resultat etter testing av aktivitet av His-CbpD etter rensing med protino Ni-TED kolonne.	83
Figur 56: Graf over resultat etter testing av His-CbpD etter rensing med Äkta Prime Plus med Ni ²⁺ -kolonne.	84
Figur 57: Graf over resultat fra testing av påvirkningen til de ulike bufferkomponentene brukt ved Äkta Prime Plus på aktiviteten til CbpD.	85
Figur 58: Aktivitet av CbpD ved ulike konsentrasjoner av Ni ²⁺ -ioner.	86
Figur 59: Hemming av de ulike toverdige metallene.	86
Figur 60: Graf over test av aktiviteten til His-CbpD etter rensing med DEAE cellulose og på Zn ²⁺ -kolonne.	87
Figur 61: Graf over aktiviteten til CbpD etter det har blitt lagret over natt ved ulike lagringsmetoder. RH14 CbpD tilsatt 30% glycerol ved -20°C er den best egnede metoden, da dette bevarer aktiviteten mest.	88
Figur 62: Påvirkning av EDTA på aktiviteten til CbpD ved bruk av 0,75µg CbpD og ulike konsentrasjoner av EDTA.	88
Figur 63: Graf over påvirkning av EDTA med bruk av 0,25µg CbpD med ulike konsentrasjoner av EDTA.	89
Figur 64: Graf etter tilsetning av ulik mengde katalase til CbpD. Tilsetning av 0,5 µl katalase øker aktiviteten mest.	89
Figur 65: Sammenligning av celler i eksponentiellfasen og celler i stasjonærfasen tilsatt CbpD. Aktiviteten til CbpD høy på celler i eksponentiellfasen mens den er gradvis på celler i stasjonærfasen.	90
Figur 66: Graf som viser aktiviteten til CbpD på RH14 induisert og ikke induisert med CSP. CbpD har aktivitet på RH14 celler som ikke har blitt induisert med CSP men har ikke aktivitet etter at de har blitt induisert.	91
Figur 67: Graf som viser aktiviteten til CbpD på SPH106 induisert og ikke induisert med CSP. CbpD har aktivitet på SPH106 som ikke er induisert med CSP men har ikke aktivitet etter at de er blitt induisert.	91
Figur 68: Graf som viser aktiviteten til CbpD på SPH106 og RH222 induisert og ikke induisert med CSP. CbpD er ikke aktiv i SPH106 induisert med CSP mens den er aktivt på RH222 som er induisert men som ikke inneholder <i>comM</i>	92
Figur 69: Graf som viser aktivitet til CbpD på stammer som uttrykker ulike mengder av immunitetsproteinene ComM. RH609 var helt immun mot CbpD mens RH612 viste noe immunitet.	92

Figur 70: Graf som viser aktivitet til CbpD på stammene RH1, RH14, RH15 og RH16 som er ulike <i>lytA/lytC</i> mutanter. Det er høyest aktivitet av CbpD på RH1 og RH14.	93
Figur 71: Graf over aktiviteten til CbpD på stammer (RH238, RH242 og RH292) med ulike mutasjoner i celleveggen. Manglende oksygenacetylase (RH292) ser ut til å ha størst innvirkning på aktiviteten til CbpD.....	94
Figur 72: Graf som viser aktiviteten til CbpD på Δ ciaR sammenlignet med RH14. Aktiviteten er noe lavere ved Δ ciaR enn ved RH14.	94
Figur 73: Graf som viser aktiviteten til CbpD på stammene RH281 og SPH102 med ulike mutasjoner i celleveggen. CbpD har lavest aktivitet mot SPH102.	95

Forkortelser

aa	amino acid (aminosyre)
bp	basepar
BR	Broad Range
CAM	ChlorAMphenicol
CBP	Choline Binding Protein (kolinbindende protein)
CHAP	cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases
CSP	Competance Stimulating Peptide (kompetansestimulerende peptid)
Da	Dalton
DEAE	DiEthylAminoEthyl
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dsDNA	doble stranded DNA (dobbeltrådet DNA)
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
IMAK	Immobilisert Metallion AffinitetsKromatografi
MQ	Milli-Q
NICE	NIsin-Controlled gene Expression
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii
pI	isolektrisk punkt
SDS-page	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAkrylamid Gel Elektroforese
SH3	SRC Homology
ssDNA	single stranded DNA (enkeltrådet DNA)
TED	tris-karboksymetyletylene-diamin

Sammendrag

Denne oppgaven dreier seg om naturlig transformasjon hos *Streptococcus pneumoniae*. Fokuset har vært på rensing og aktivitetstesting av CbpD. CbpD er en av hovedkomponentene i fratricidemekanismen som tillater kompetente celler å lysere ikke-kompetente celler eller celler av nært beslektede arter.

Et av målene med oppgaven var å finne en rensemetode for CbpD som gir rent nok produkt til å oppnå krystallstruktur av dette. Flere metoder ble brukt; DEAE cellulose, ionebyttekromatografi og gelfiltrering. Ingen av disse ga så rent produkt at man kunne oppnå krystallstruktur av CbpD. Derfor ble det festet an His tag til proteinet som muliggjør nye rensemetoder. Det ble funnet av rensing med Zn^{2+} kolonne ved Äkta Prime plus gav et rent produkt, der dessuten proteinet fortsatt beholdt sin aktivitet. Det ble ikke forsøkt å lage krystallstruktur etter denne rensemetoden, men dette er en mulighet for å oppnå dette i senere tid.

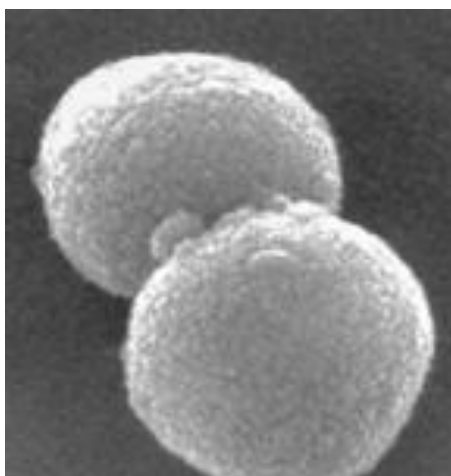
Det ble utført en rekke tester på aktiviteten til CbpD for å prøve å finne ut mer om hvordan denne er med på å lysere ikke kompetente celler. Celler som er kompetente uttrykker et immunitetsprotein ComM som beskytter cellen mot angrep fra CbpD. CbpD sin aktivitet ble høyere ved å tilsette katalase og EDTA. Noe som viser at hydrogenperoksid som dannes under cellevekst er med på å hemme aktiviteten til CbpD. Det samme gjelder for toverdige metaller som er til stede i vekstmediet.

CbpD binder seg til celleveggen til de ikke kompetente cellene for å utføre lysis på disse. Det ble vist at ulike mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen endrer aktiviteten til CbpD. Aktiviteten til CbpD var lavere på alle cellestammene som inneholdt slike mutasjoner enn på en vilttype cellevegg. De ulike faktorene som ble testet var færre/flere koliner festet til teikoinsyrene, manglende O-acetylering, manglende N-deacetylering, manglende interpeptidbroer og færre teikoinsyrer i celleveggen

1. Innledning

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae er en vanlig bakterie i det øvre respiratoriske området hos mennesker. *S.pneumoniae* er gram positive kokker. De blir vanligvis observert som par av kokker, diplokokker som vist i figur 1, men de kan også opptre som enkle celler eller som korte kjeder. Bakterien kan forårsake lungebetennelse, ørebetennelse eller hjernehinnebetennelse. Den er den nåværende vanligste årsaken til invasiv bakteriell sykdom hos barn og eldre (Todar 2011).



Figur 1: Elektron mikrograf av et par med *S.pneumoniae* diplokokker.

De danner ikke sporer og er ikke bevegelige. Pneumokokker er en fermentativ aerotolerant anaerob bakterie som kan fermentere ulike sukkerarter blant annet glukose og fruktose til melkesyre. Siden *S.pneumoniae* mangler katalase vil den produsere hydrogenperoksid som et biprodukt. *S.pneumoniae* er en skjør bakterie som selv innehar den enzymatiske egenskapen til å ødelegge og oppløse cellene. Enzymene som er ansvarlige for dette kalles autolysiner. Den fysiologiske rollen til disse autolysinene fører til at alle cellene blir autolysert når cellene vokser til den stasjonære fasen (Todar 2011).

Celleveggen består hovedsaklig av peptidoglykan og teikoin syrer. Peptidoglykan er bygget opp av N-acetylmuramic og N-acetylglucuronsyrer der teikoin syrer er festet til ca hver tredje N-acetylmuramic syre. Hos pneumokokker er lipoteichion syren og celleveggteicoinsyrere identiske, men lipoteikoinesyrene er forankret til cellemembranen med et lipidmolekyl. Begge disse syrene inneholder fosforylkolin. Dette er essensielt element i biologien til denne bakterien da kolin fungerer som et forankringspunkt for overflateproteiner som har et kolinbindende domene. De fleste *S.pneumoniae* har en kapsel bestående av

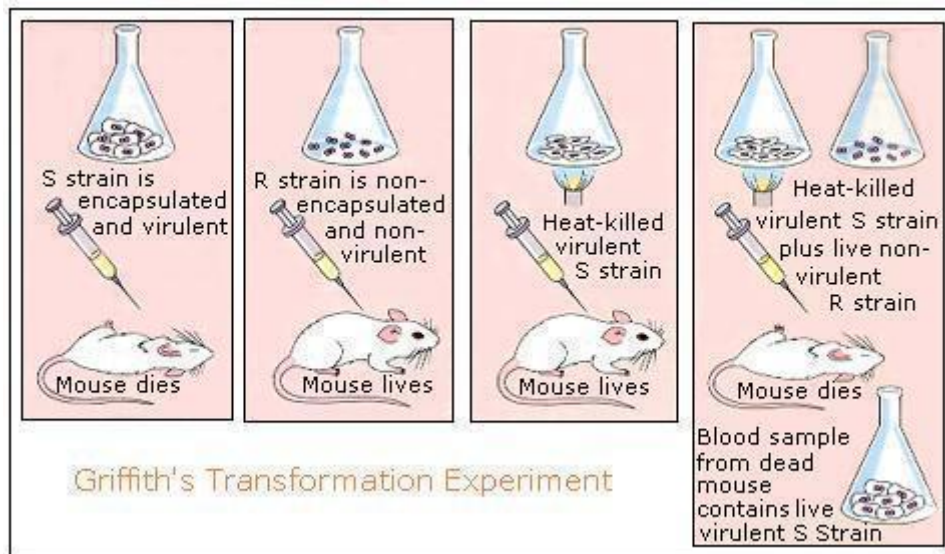
polysakkarider som omslutter cellen totalt, og er vist å være en viktig virulensfaktor ved kolonisering av en vert. Over 90 ulike typer kapsel er til nå kjent (Todar 2011).

På grunnlag av funksjonelle genomiske analyser (og bioinformatikk) er det estimert at pneumokokker har mer enn 500 overflateproteiner. Noen er membranassosierte lipoproteiner mens andre er fysisk assosiert til celleveggen. En unik gruppe av overflateproteiner er en familie av kolinbindende proteiner (CBP). Alle proteinene i denne familien har et kolinbindende domene. Dette domene består av repeterte kolinbindende motiver. CBP assosieres til celleveggen via ikke-kovalente interaksjoner til kolinenehetene på teikoinsyrene i celleveggen. Alle disse har et lignende C-terminalt kolinbindende domene mens de har forskjellige N-terminaler noe som indikerer at de har ulike funksjoner. Denne familien inkluderer for eksempel mureinhydrolasene LytA, LytC og CbpD (Todar 2011).

S.pneumoniae har et naturlig transformasjonssystem som en mekanisme for genetisk utveksling. Denne prosessen er av medisinsk betydning fordi den er en viktig årsak for utviklingen av antibiotikaresistans hos denne bakterien som man har observert over de siste 20 årene. Bakterien har en relativt høy veksthastighet (generasjonstid på ca 20 min under optimale vekstbetingelser) og kan oppnå høye celtall ved en infeksjon. Slike forhold favoriserer ikke bare forekomsten av naturlig transformasjon men også utvikling av spontane mutanter som er resistente mot antibiotika. Gjennom transformasjon skjer binding, opptak og inkorporering av DNA som en rekke av programmerte hendelser i et fysiologisk definert stadium kjent som kompetanse (Todar 2011).

1.2 Fred Griffiths tidlige forsøk med transformasjon

Naturlig genetisk transformasjon ble opprinnelig oppdaget i *S.pneumoniae* av Fred Griffith i 1928. Forsøkene hans ble utgangspunktet utført for å finne hva som egentlig var det genetiske materialet. Han fant to ulike stammer av bakterien der den ene viste seg å være patogen dersom den ble injisert i en mus, mens den andre ikke var patogen. Han forsøkte så å drepe den patogene stammen med varme denne, for så å injisere denne i musen. Denne musen overlevde. Deretter blandet han varmedrept patogen med levende apatogen og injiserte denne blandingen inn i en mus. Denne musen døde. Når han undersøkte cellene fra den døde musen fant han bakterier av den patogene stammen. Med dette forsøket viste han at den apatogene stammen kunne ta opp noe fra den drepte patogene stammen slik at denne fikk de patogene egenskapene. Han kalte dette fenomenet transformasjon. Forsøket hans har blitt kalt et paradigme for dette viktige fenomenet og er illustrert i Figur 2 (Wiiley *et al* 2008).



Figur 2: Griffiths transformasjons forsøk (tutorvista.com)

1.3 Naturlig genetisk transformasjon

Komparative analyser av prokaryote genomer viser at ervervelse av genetisk material ved horisontal genoverføring kan være svært viktig for evolusjon av disse organismene. Horisontal genoverføring sammen med mutasjoner, tap av gener, fordobling av eksisterende gener er prosesser som former genomene til disse organismene (Johnsborg *et al* 2007). Flere og flere bevis peker mot at horisontal genoverføring er den dominante mekanismen for evolusjon av bakterier. Av de tre kjente mekanismene naturlig genetisk transformasjon, transduksjon og konjugasjon ser det ut som om naturlig genetisk transformasjon er den minst spredde i naturen (Johnsborg og Håvarstein 2009). Naturlig transformasjon er definert som aktivt opptak og arvbar integrering av ekstracellulært DNA. Til forskjell fra konjugasjon og transduksjon er overføring av DNA ved naturlig transformasjon initiert av mottaker cellen. Naturlig transformasjon er en naturlig del av fysiologien til den kompetente bakterien (Johnsborg *et al* 2007).

1.3.1 Naturlig transformasjon hos Gram positive bakterier

Hos gram positive bakterier kan kompetansegene bli delt inn i to grupper; de som er involvert i å bestemme når forholdene er riktige for utvikling av kompetanse (tidlige gener) og de som er nødvendige for binding, importering og rekombinering av DNA (sene gener). Måten de tidlige genene kontrollerer utviklingen av kompetanse varierer mye mellom arter men involverer ofte celle celle kommunikasjon med spesifikke peptid feromoner. De sene

genene er høyt konserverte i mange AT-rike Gram positive bakterier. Bakterier som er kompetente for genetisk transformasjon uttrykker et sett gener som er dedikerte for opptak og senere homolog rekombinering av det opptatte DNAet. Passering av DNA gjennom den cytoplasmiske membranen involverer membranfestet dsDNA bindende protein ComEA og det polytopiske membranproteinet ComEC. Translokasjonen er også avhengig av en ATPase ComFA som produserer energi som kreves for å føre det enkeltrådede DNAet gjennom ComEC kanalen. Når det enkeltrådede DNAet har kommet inn i cytoplasmaet kan det bli integrert i genomet ved RecA avhengig homolog rekombinasjon (Johnsborg *et al* 2007).

1.4 Kompetanse hos *S.pneumoniae*

Genutveksling ved naturlig transformasjon gir pneumokokkene tilgang til en stor genpool som den deler med andre pneumokokkstammer og andre nært beslektede kommensale streptokokker. Som en konsekvens vil gener tilstede i genpoolen som gir selektive fordeler under visse typer stress spre seg raskt blant disse bakteriene (Eldholm *et al* 2009). Pneumokokker som er kompetente for naturlig genetisk transformasjon uttrykker en rekke proteiner som er involvert i binding, opptak og rekombinasjon av DNA. I tillegg angriper de og lyseser ikke-kompetente søsterceller som er til stede i det samme miljøet. Dette fenomenet har fått navnet fratricide (Eldholm *et al* 2010). Det sene kompetansegenet *cbpD*, som koder for mureinhydrolasen CbpD nevnt ovenfor er vist å spille en nøkkelrolle i denne prosessen ved at den binder til og lyseser ikke-kompetente celler. DNA fra de lyserte cellene kan så bli tatt opp og inkorporert i den kompetente cellens genom. I tillegg er mureinhydrolasene LytA og LytC også vist å ha en rolle for å få effektiv lysis av cellene (Eldholm *et al* 2009).

1.4.1 Rollen til naturlig genetisk transformasjon

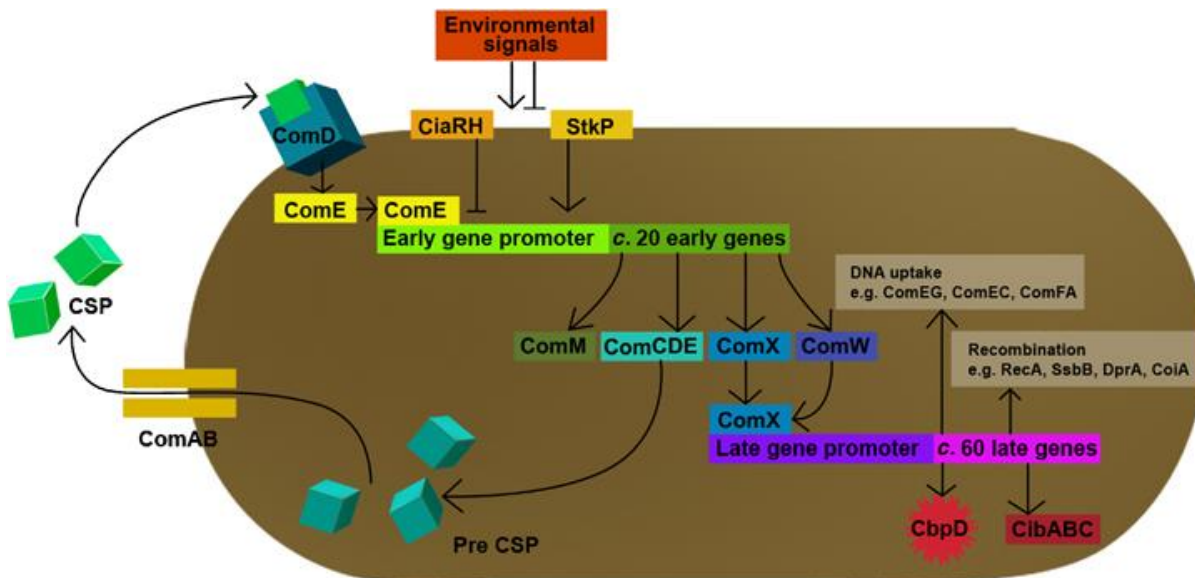
Det er foreslått to ulike modeller for å forklare rollen av naturlig genetisk transformasjon. Den ene sier at grunnen for naturlig genetisk transformasjon er å få tak i genetisk material fra andre celler for å reparere ødelagte gener, generere genetisk diversitet og ervervelse av nye egenskaper. Den andre sier at kompetente bakterier tar opp DNA primært som en næringskilde (Johnsborg *et al* 2007).

I pneumokokker er det største argumentet mot DNA som mat hypotesen skjebnen til det opptatte DNAet. DNA opptaket blir initiert med binding av dsDNA til overflaten av den kompetente cellen. Det celleassosierte DNAet blir prosessert og transportert som enkeltrådet DNA inn i cytoplasmaet. I cytoplasmaet er ssDNAet tett assosiert med proteiner. Dette komplekset av proteiner beskytter det enkeltrådede DNAet mot degradering og forbereder det

for rekombinasjon med mottakerens genom. Innkommende DNA er i tillegg beskyttet av produkter av de sene kompetansegene *recA* og *dprA*, da DNAet raskt blir degradert i celler som ikke har disse proteinene. RecA er kjent å spille en viktig rolle ved reparering av rekombinert DNA og er uten tvil involvert i utbytting av DNA tråder ved transkripsjonell rekombinering. Et annet viktig gen er *coiA*. Pneumokokker som mangler dette genet er i stand til å danne komplekser av DNA og proteiner i cytoplasmaet men er ikke i stand til å inkorporere dette DNAet i kromosomet. Denne observasjonen indikerer sterkt av CoiA spesifikt promoterer rekombinasjon ved naturlig genetisk transformasjon i pneumokokker (Johnsborg *et al* 2007). Selv om det meste av DNAet som blir tatt opp blir degradert uten å bli tatt opp i kromosomet, er ikke prosesseringen av DNAet på en sånn måte som ville vært forventet dersom det primært ble tatt opp for næring. Det kan derfor bli konkludert at opptak av næring ikke er hovedrollen for naturlig transformasjon i *S.pneumoniae* (Johnsborg *et al* 2007). Da er hypotesen at DNAet blir brukt for å fremme genetisk variasjon mer sannsynlig.

1.4.2 Utvikling av kompetanse hos *S.pneumoniae*

Induksjon av det kompetente stadiet blir kontrollert av ComABCDE quorum sensing systemet. Dette systemet består av *comC* som koder for det kompetansestimulerende peptidet CSP, dets sekresjonssystem ComAB og et tokomponent signal transduksjon system ComDE som registrerer den ekstracellulære konsentrasjonen av CSP (Eldholm *et al* 2009). ComD er en histidinkinase reseptor lokalisert i cellemembranen og ComE en responsregulatoren som aktiveres av ComD (Johnsborg *et al* 2007) Binding av CSP gir en endring i konformasjonen til det transmembrane domenet til ComD, noe som resulterer i autofosforylering og aktivering av det intracellulære kinase domenet. Når dette blir aktivert vil kinase domenet fosforylere den transkripsjonale regulatoren ComE. Fosforylering av det regulatoriske domenet til ComE fører til en konformasjonsendring av dets DNA-bindende domene slik at ComE kan binde til spesifikke promoterregioner for et sett med gener som blir kalt de tidlige kompetansegene. Binding av ComE aktiverer transkripsjon fra av de tidlige genene, som inkluderer blant annet *comAB* og *comCDE* operonene. Som en konsekvens vil nivået av ekstracellulært CSP øke og da vil også nivået av ComE øke noe som driver cellen mot et kompetent stadium (Johnsborg og Håvarstein 2009). Fosforylert ComE aktiverer uttrykket av 20 tidlige gener deriblant genet som koder for den alternative sigmafaktoren ComX. ComX dirigerer uttrykket av rundt 60 sene kompetansegener inkludert de som koder for DNA opptak og rekombinasjon, murein hydrolasen CbpD, to bakteriosiner CibAB og amidasen LytA (Johnsborg *et al* 2007). Utviklingen av kompetanse hos disse cellene er illustrert i figur 3.



Figur 3: Utvikling av kompetans hos *S.pneumoniae* (Johnsborg og Håvarstein 2009).

Bakterier regulerer uttrykket av *com* genene som en respons på ulike cellulære eller miljømessige forhold. I en laboratoriekultur vil spontan induksjon av kompetanse foregå i den tidlige eksponentielle fasen (Johnsborg *et al* 2007).

Syntese av kompetansemaskineriet ville vært unødvendig dersom det ikke var homologt transformerbart DNA i nærhet til den kompetente cellen. Tradisjonelt ble det antatt at døde og lyserte celler til stede i det samme miljøet som den kompetente bakterien gir cellen det nødvendige transformerbare DNAet. Det er vist at *S.pneumoniae* ikke bare stoler på opptak av DNA på denne måten. Kompetente pneumokokker har utviklet en metode for å lysere ikke-kompetente celler i nærmiljøet. Denne lytiske prosessen kalt fratricide fungerer sannsynligvis som en aktiv mekanisme for DNA ervervelse (Johnsborg *et al* 2007).

Bare en noen få av genene som blir uttrykt som en følge av CSP induert kompetanse, 7 tidlige og 14 sene er nødvendige for transformasjonsprosessen (Eldholm *et al* 2009). Rollen til de fleste av de andre CSP regulerte genene er ukjent (Johnsborg og Håvarstein 2009). Noen av genene med kjent funksjon er involvert i mekanismen bak lysis av ikke-kompetente celler. Disse inkluderer det tidlige kompetanse genet *comM* og de to sene kompetansegenene *lytA* og *cbpD*. *comM* genet koder for et immunitetsprotein ComM som beskytter de kompetente cellene mot aktiviteten til murein hydrolasen CbpD. Mekanismen bak denne beskyttelsen er ikke kjent. Den eksakte framgangsmåten til CbpD er heller ikke kjent, men det katalytiske domenet til CbpD viser homologi med et såkalt CHAP domene (Cystein Histidine-avhengig Aminohydrolase/Peptidase). Siden det er vist for en rekke andre murein hydrolaser at dette domene katalyserer splittelsen av peptidbåndet innen stammepeptider i bakterielle peptidoglykaner, er det nærliggende å tro at CbpD utfører den samme handlingen. Autolysinet LytA blir uttrykt i ikke-kompetente cellene men uttrykket øker ved utvikling av kompetanse.

Cellevegg hydrolasen LytC er ikke en del av kompetanseregulonet men bidrar også til lysis mekanismen. CbpD, LytA og LytC ser ut til å være de tre proteinene som har hovedansvar for fratricide av ikke-kompetente celler i flytende medium. CbpD kan lysere celler på egen hånd men effekten øker signifikant når LytA og LytC også er til stede. Handling av disse proteinene blir direkte eller indirekte utløst av CbpD (Eldholm *et al* 2009).

1.4.3 Viktigheten av CbpD, LytA og LytC

CbpD blir kun produsert av den kompetente cellen mens LytA og LytC produseres både i den kompetente og ikke-kompetente celler. LytC er den eneste komponenten i fratricidemekanismen som ikke er en del av kompetanseregulonet (Eldholm *et al* 2010). LytC er et lysozym som blir uttrykt fra en konstitutiv promoter i den eksponentielle vekstfasen. LytA er hoved-autolysinet til pneumokokker og blir aktivert sent i den stasjonære fasen og fører til omfattende autolysis av bakteriekulturen. Som med LytC blir amidasen LytA syntetisert i den eksponentielle vekstfasen, men når cellene blir induert til kompetans blir uttrykkningen av LytA oppregulert. Både LytC og LytA er til stede i relativt store mengder under den eksponentielle vekstfasen, men kan ikke hydrolysere celleveggen til celler i normal vekst. Dersom man tilsetter rensset LytC og /eller LytA under vekst vil ikke enzymene utføre skader på celleveggen. Dette viser at CbpD er i stand til aktivere LytA og LytC enten ved direkte interaksjon eller ved en mer indirekte mekanisme. (Johnsborg og Håvarstein 2009).

Cellelysis er mer effektiv når LytA og LytC kommer fra den ikke-kompetente cellen. Når LytA og LytC ikke er tilstede er det bare en liten grad av lysis noe som indikerer at CbpD ikke virker like effektivt alene. I et forsøk utført av Eldholm *et al* (2009) ble det vist at bare 0,4% av cellene ble lysert når genene for både *lytA* og *lytC* ble fjernet fra både de kompetente og de ikke-kompetente cellene. Dette demonstrer at CbpD ikke er særlig effektiv på egen hånd. Uansett er CbpD en essensiell komponent av lysismekanismen, da celler som mangler genet for denne ikke er i stand til å lysere ikke-kompetente celler. LytC bidrar mer enn LytA da flere celler ble drept i kulturer som mangler LytA enn hos dem som mangler LytC. Om LytA og LytC kommer fra den kompetente cellen eller fra den ikke-kompetente cellen påvirker effektiviteten til fratricide prosessen. Nesten fire ganger så mange celler ble lysert da LytA og LytC ble tilsatt *in cis* fra ikke-kompetente celler enn når de ble tilført *in trans* fra de kompetente cellene. Uansett hvordan disse enzymene blir tilført må de på en eller annen måte bli aktivert av CbpD for å kunne angripe og lysere ikke-kompetente celler. Både CbpD, LytA og LytC inneholder et kolinbindende domene hvis funksjon er å feste disse proteinene til celleoverflaten via celleveggsteikoin syrre og lipoteikoin syrre. Når den ikke-kompetente cellen

mangler både LytA og LytC kan disse til en viss grad bli tilført fra den kompetente angrepscellen. Disse enzymene må komme i kontakt med den ikke-kompetente cellen enten via diffusjon gjennom mediet eller ved direkte celle-celle kontakt. Det samme gjelder for CbpD som blir produsert av den kompetente cellen, men som virker på overflaten til den ikke-kompetente cellen. Tester har vist at det sekreterte CbpD proteinet forblir festet til teikoinsyrene i celleveggen, og at bare en liten fraksjon av CbpD blir frigitt til omgivelsene (Eldholm *et al* 2009).

1.4.4 CbpDs binding til celleveggen til ikke-kompetente celler

CbpD er et globulært enzym som består av et N-terminalt enzymatisk CHAP domene etterfulgt av to bakterielle SH3b domener og et C-terminalt kolinbindende domene (CBD). CBD består av fire repeterte kolinbindende motiver. Proteiner som inneholder CBDs binder ikke-kovalent til kolin enheten på teikoinsyrene i celleveggen. CBD vil spesifikt gjenkjenne og reversibelt binde til kolinenheter. Bakterielle SH3-domener er ofte en del av proteiner som binder til overflaten av celler, noe som antyder at denne typen domener gjenkjenner peptidoglykan, teikoinsyrer eller en annen del av celleveggen. Cellulære lokaliseringstudier har vist at SH3b domener til CbpD binder spesifikt til peptidoglykan mens det kolinbindende domenet dirigerer CbpD til delingssonen på cellene. Det er sannsynlig at både CBD og SH3b er involvert i å feste og koordinere enzymet til den ikke-kompetente cellen. Den enzymatiske spesifisiteten til CHAP domenet er ikke kjent, men dette domenet har signifikant homologi til korresponderende domener funnet i en rekke faglysiner og bakterielle murein hydrolaser. Karakteriserte medlemmer av CHAP familien fungerer enten som endopeptidaser som katalyserer et hydrolytisk kutt innen murein stamme peptidene eller som amidaser som splitter *N*-acetylmuramyl-L-Ala båndet i celleveggen. Denne prosessen er ansvarlig for å trigge aktiviteten av amidasen LytA og lysozymet LytC (Eldholm *et al* 2010).

Studier utført av Eldholm *et al* (2010) der man benyttet seg av CbpD fusjonert til Green Fluorescent protein (GFP) viser at CbpD primært angriper delingssonen og polene av cellene, mens svak binding til de resterende delene av overflaten kunne bli detektert når eksponeringstiden i mikroskopet ble økt. Affiniteten til CbpD for den septale regionen kan i prinsippet være på grunn av SH3b domener, det kolinbindende domene eller begge. Da man antar at teikoinsyrene er jevnt fordelt i hele celleveggen er det i utgangspunktet lite sannsynlig at det er det kolinbindende domenet som er ansvarlig for det bindingsmønsteret man observerer for CbpD. Resultater fra tidligere tester utført av Eldholm *et al* (2010) viste derimot at proteiner der SH3b domener er fjernet viste lignende bindingsmønster som det

native proteinet, mens proteinet der CBD var fjernet viste CbpD-binding jevnt fordelt over hele celleoverflaten. Dette indikerer at det sannsynligvis er CBD som dirigerer CbpD til delingssonen på cellen, mens SH3b domenene gjenkjenner spesifikt peptidoglykan-komponenten i celleveggen (Eldholm *et al* 2010).

Ved fratricide vil CbpD produsert trigge en kjede av hendelser som fører til lysis av ikke-kompetente celler. Både binding av CbpD til teikoinisyrene og til peptidoglykan via dets kolinbindende domenet og SH3b domene, respektivt, er essensielt for å få lysis av ikke-kompetente celler. Resultater fra tester utført av Eldholm *et al* (2010) indikerer også at CbpD fungerer mer effektivt når det er festet til den septale regionen enn når den binder til andre deler av celleveggen. Sannsynligvis ville fratricidemekanismen vært enda mer effektiv dersom CbpD var i stand til å binde til og hydrolysere alle deler av celleveggen, og ikke bare den septale regionen. En mulig forklaring på at CbpD angriper delingssonen kan være fordi dette representerer det svakeste punktet i celleveggen. Det blir også spekulert i at den begrensede spesifiteten til CbpD er en viktig del av immunitetsmekanismen som hindrer at cellen begår selvmord ved kompetanseutvikling (Eldholm *et al* 2010).

Det er sannsynlig at det kompetanseinduserte immunitetsproteinene ComM, introduserer en endring i peptidoglykan eller teikoinisyrene til kompetente celler og på den måten blokkerer aktiviteten til CbpD. Da ComM bare blir uttrykt noen minutter før CbpD er det lite trolig at dette er nok tid til å beskytte hele celleveggen. I tillegg kan kjemiske modifikasjoner i hele celleveggen være skadelig for den kompetente cellen. Dersom ComM bare beskytter celledelingssonen kan beskyttelse oppnås raskere og ved at bare en liten del av celleveggen blir påvirket noe som ikke skader cellen (Eldholm *et al* 2010).

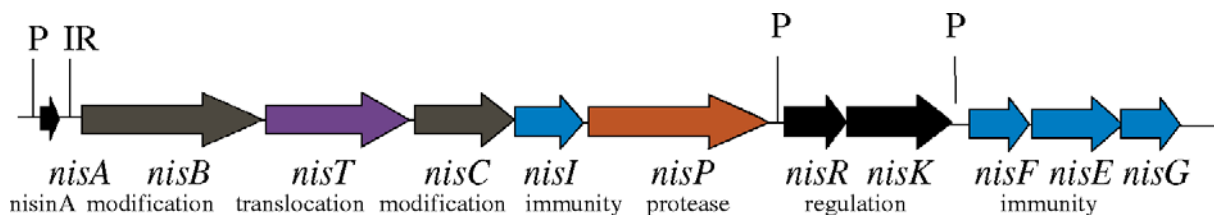
1.5 Heterolog proteinekspressjon i *Lactococcus lactis*

I dette arbeidet var et av målene å oppnå store mengder CbpD for videre rensing og struktur-funksjon studier. Siden tidligere erfaringer har vist at *E.coli* egner seg svært dårlig som ekspressjonvert for CbpD ble det benyttet et Gram-positivt ekspressjonssystem som er utviklet for *Lactococcus lactis*.

L. lactis er en av de melkesyrebakteriene man har best kjennskap til og som man har utviklet effektive genetiske verktøy til (de Ruyter *et al* 1996). Høy produksjon av proteiner i *L.lactis* har blitt oppnådd ved å bruke de etablerte promotorene involvert i nisinproduksjon (bakteriosin) hos *L.lactis*. Siden kontinuerlig høy produksjon av et protein kan føre til intracellulær akkumulering, aggregering eller degradering av proteinet i cytoplasmaet, noe som kan være skadelig for cellen, har man utviklet induserbare systemer der genuttrykket kan

bli kontrollert som oftest ved hjelp av et induser molekyl. I *L.lactis* er det blitt utviklet et system der overuttrykk av et spesifikt gen induseres ved hjelp av nisin (Zhou et al 2006).

Nisin er et posttranskripsjonelt modifisert antimikrobielt peptid som blir produsert av noen *L.lactis* stammer. I tillegg til å være et bakteriosin, fungerer nisin som signalmolekyl i et tokomponent regulatorisk system bestående av NisRK. Nisin vil binde til det ekstracellulære domenet til kinasen NisK som autofosforyleres og videre overfører fosfatgruppen til den intracellulære responsregulatoren NisR. Den aktiverte NisR binder til DNA og aktiverer transkripsjon fra et sett med promoterer i nis lokuset (figur 4) (Zhou et al 2006).



Figur 4: Skjemastisk fremstilling av NICE operonet (Zhou et al 2006).

For å lage et induserbart genuttrykksystem har *nisA* promoteren (P_{nisA}) blitt klonet inn i et høy-kopi plasmid, tokomponentsystemet *nisRK* har blitt integrert inn i kromosomet til en *L.lactis* stamme som ikke produserer nisin (*L.lactis* NZ9000). Når et gen blir klonet inn nedstrøms for P_{nisA} i plasmidet og transformert inn i NZ9000, kan overuttrykking av det klonede genet bli indusert ved tilsetning av nisin i mediet ved log fasen av cellevekst (Zhou et al 2006).

1.6 Formål med oppgaven

I denne oppgaven ble det jobbet med resning av CbpD og aktivitetstesting av dette proteinet. Formålene med dette var som følger:

- Finne en rensemetoden som ga rent nok produkt til å kunne oppnå krystallstruktur av dette proteinet.
- Finne ut mer om hvordan CbpD utfører sin aktivitet på celler.
- Finne ut hva som kan bedre aktiviteten til CbpD og hva som hemmer aktiviteten til dette.

2. Materialer

2.1 Bakteriestammer

Bakteriestamme	Beskrivelse
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Kloningsvert, Novagen
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	Ekspresjonsvert (deRuyter <i>et al</i> 1996)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
R704	R6 derivat, <i>comA::ermAM</i> , Ery ^R
RH1	R704 men <i>ebg::spc</i> , Ery ^R Spc ^R (Johnsborg <i>et al</i> 2008)
RH14	RH1 men Δ <i>lytA</i> : : kan, Ery ^R Spc ^R Kan ^R (Eldolm <i>et al</i> 2009)
RH15	RH1, men Δ <i>lytC</i> : : tet, Ery ^R Spc ^R Tc ^R (Eldolm <i>et al</i> 2009)
RH16	RH14, but Δ <i>lytC</i> : : tet, Ery ^R Spc ^R Kan ^R Tc ^R (Eldolm <i>et al</i> 2009)
SPH106	<i>hirL::lacZ</i> , <i>egb</i> ⁻ , Δ <i>lytA</i> , Δ <i>licD2::Janus</i> , Erm ^R , Spc ^R , Cm ^R , Sm ^R , Kan ^R , (ikke publisert9)
RH222	Δ <i>comA</i> , Δ <i>egb</i> , Δ <i>lytA</i> , Δ <i>lytC</i> , <i>CbpD</i> , Δ <i>hirL::lacZ</i> , Δ <i>comM</i> Str ^R , Kan ^R (ikke publisert)
RH609	Ami R1:: <i>comM</i> , Sm ^R (ikke publisert)
RH612	Ami R4:: <i>comM</i> , Sm ^R (ikke publisert)
RH238	Δ <i>comA</i> , Δ <i>egb</i> , <i>hirL::lacZ</i> , Δ <i>comM</i> , Δ <i>murM::janus</i> , Kan ^R (ikke publisert)
RH242	Δ <i>comA</i> , Δ <i>egb</i> , <i>hirL::lacZ</i> , Δ <i>pce::janus</i> , Kan ^R (ikke publisert)
RH292	<i>hirL::lacZ</i> , Δ <i>Adr::janus</i> Kan ^R (ikke publisert)
Δ <i>ciaR</i>	R704 men Δ <i>ciaR</i> , Sm ^R (ikke publisert)

Bakteriestamme	Beskrivelse
RH281	<i>hirL::lacZ, ΔcomM, pgdA::janus, Kan^R</i> (ikke publisert)
SPH102	<i>hirL::lacZ, egb-, ΔlytA, ΔlicD2::Janus, Erm^R, Spc^R, Cm^R, Sm^R, Kan^R</i> (ikke publisert)

2.2 Vekstmedier

1. **GM17 (Glukose M17) medium** inneholder: 37,25 g M17 broth (Oxoid) blandet med 950 ml vann. Autoklavert og tilsatt 50 ml 10% sterilfiltrert glukose (w/v).

2. **LB (Lysogeny Broth) medium** inneholder: 10 g/l tryptone (Oxoid), 5 g/l gjærekstrakt (Oxoid), 10 g/l NaCl og 15 g agar før autoklavert.

3. **C-medium** ble laget på følgende måte

Pre C-medium

Til 4 liter:

0.045 g L-cystein HCl

8 g Natrium Acetat

20 g Bacto™ Casitone

0,024 g L-tryptofan

34 g di-kaliumhydrogenfosfat (K_2HPO_4)

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 4 l. Løsningen ble fordelt på flasker á 150 ml og autoklavert ved 121°C i 15 min.

C-medium

Til 150 ml pre C-medium tilsettes:

0,4 mM Manganklorid	150 µl
20 % Glukose	1,5 ml
ADAMS III	3,75 ml
3 % Glutamin	110 µl
2 % Natrium pyruvat	2.25 ml
1,5 M Sukrose	95 µl
2 mg/ml Uridin/ Adenosin	1,5 ml

8 % Albumin	1,5 ml
10 % Gjærekstrakt	3,75 ml

4. **SOC (Super Optimal Catabolite Repression Broth) medium** inneholder: 20 g/l Bacto Tryptone (Oxoid), 5 g/l gjærekstrakt (Oxoid), 10 μ M NaCl og 2,5 μ M KCl. Løsningen ble autoklavert. Deretter ble det tilsatt 20 μ M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ og 20 μ M glukose før løsningen ble sterilfiltrert.

2.3 Løsninger og bufferere

2.3.1 Løsninger til C-medium:

Gjærekstrakt

40 g gjærekstrakt

360 ml MQ-vann

6 ml 12 N/37 % HCl

16 g aktivt kull

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

ADAMS I

0,15 ml 0,5 mg/ml Biotin

75 mg Nikotinsyre

87,5 mg Pyridoxine hydroklorid

300 mg Kalsium panthothenate

80 mg Thiamin hydroklorid

35 mg Riboflavin

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

ADAMS II - 10X

500 mg Jernsulfat heptahydrat

500 mg Kobbersulfat pentahydrat

500 mg Sink sulfat heptahydrat

200 mg Mangan(II)- klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert Saltsyre

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

ADAMS III

128 ml ADAMS I

3,2 ml ADAMS II - 10X

1,6 ml Aspargin monohydrate

0,160 g Cholin klorid

0,4 g Kalsium klorid dehydrert

16 g Magnesium klorid hexahydrat

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 800 ml og pH ble justert til 7,6. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C.

2.3.2 Løsninger og buffere til agarose-gelelektroforese:

50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)

242 g Tris base

57,1 ml eddiksyre

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

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 l. Løsningen ble oppbevart ved romtemperatur. 1 x TAE ble benyttet til gelstøping og -elektroforese.

10 mg/ml Etidiumbromid (EtBr)

1 g EtBr

100 ml MQ-vann

Løsningen ble lagret i lystett beholder ved romtemperatur (4°C for langtidsoppbevaring).

10 x loadingbuffer

2 ml 1 % bromfenolblått (0,13 % v/v)

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

8 ml autoklavert MQ-vann. Løsningen ble oppbevart ved 4°C.

1 kb DNA ladder (50 ng/ml)

50 µl 1 kb ladder (Invitrogen)

200 µl 10 x loadingbuffer
750 µl autoklavert MQ-vann
Løsningen ble oppbevart ved 4°C.

2.3.3 Løsninger og buffere brukt ved støping av SDS-PAGE geler

10 % Ammonium persulfat (APS)

0,02 g APS

200 µl MQ-vann

APS ble løst ved vortexing. Løsningen ble laget rett før bruk, da begrenset holdbarhet.

0,5 M Tris-HCl, pH 6.8

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

1,5 M Tris-HCl, pH 8.8

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

10 % SDS

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

2.3.4 Løsinger og buffere brukt ved SDS-PAGE

10 x Tris-Glycin Elektroforesebuffer

30 g Tris Base (0,25 M)

144 g glycin (1,92 M)

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

Sluttvolum ble justert til 1 liter og løsningen ble oppbevart ved romtemperatur. 1 x SDS runningbuffer ble benyttet ved SDS-PAGE.

2 x SDS sample buffer

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

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

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

0,1 ml β -mercaptoetanol (2 % v/v)

0,01 % bromfenolblått

Justeres til sluttvolum 5 ml med MQ-vann. Korttidsoppbevaring ved 4°C

2.3.5 Løsninger brukt ved Coomassie-farging av gel

Fargeløsning – til 500 ml

0,5 g Coomassie Brilliant Blue (0,1 % w/v)

200 ml metanol (40 % v/v)

50 ml eddiksyre (10 % v/v)

250 ml MQ-vann

Avfargingsløsning – til 500 ml

50 ml eddiksyre

50 ml metanol

400 ml MQ-vann

2.3.6 Løsninger brukt ved sølvfarging av gel

Fikseringsløsning – til 1 l

421 ml 95 % etanol (40 % v/v)

100 ml eddiksyre (10 %)

479 ml MQ-vann

Sensitizing solution – til 1 l

40 ml 25 % glutardialdehyd (1 % v/v)

41,02 g natriumacetat (0,5 M)

Sluttvolum justeres til 1 l.

Sølvfargingsløsning – til 100 ml (NB: lages rett før bruk!)

1,88 ml 1 M NaOH (18,8 mM)

1,2 ml 25 % ammoniumhydroksid (0,3 % v/v)

92,6 ml MQ-vann

20 % AgNO_3 -løsning i MQ-vann (w/v) tilsettes dråpevis på magnetrører til svak fargeendring på løsningen er oppnådd.

Framkallingsløsning - til 1 l

0,154 g sitronsyre (0,8 mM)

1,2 ml 37 % formaldehyd (0,044 % v/v)

Juster sluttvolum til 1 l med MQ-vann.

Avfargingsløsning – til 1 l

70 ml eddiksyre (7 % v/v)

210 ml 95 % etanol (20 % v/v)

10 ml glycerol (1 %)

710 ml MQ-vann

Lagringsløsning – til 1 l

50 ml glycerol (5 %)

950 ml MQ-vann

2.3.7 Buffere til Protino® Ni-TED pakkede kolonner – rensing under native forhold

Ekvilibreringsbuffer/vaskebuffer:

50µl 1M Tris HCl pH 7,4 (10mM)

1,5ml 1M NaCl (300mM)

3,45ml dH₂O

Elueringsbuffer:

50µl 1M TrisHCl pH 7,4 (10mM)

1,5ml 1M NaCl (300mM)

625µl 2M imidazol (250mM)

2,825ml dH₂O

2.3.8 Buffere til histidintag rensing på ÄKTAprime plus

Bindingsbuffer/vaskebuffer:

10mM TrisHCl pH 7,4

500mM NaCl

20mM imidazol

140mM choline

0,5mM DTT

Elueringsbuffer:

10mM TrisHCl pH 7,4

500mM NaCl

500mM imidazol

140mM choline

0,5mM DTT

2.3.9 Buffere til fjerning av metaller på HisTrap HP kolonne

Strippingbuffer:

20mM Tris HCl pH 7,4

0,5M NaCl

50mM EDTA

Bindingsbuffer:

20mM TrisHCl pH 7,4

0,5M NaCl

2.3.10 Buffere til ionebyttekromatografi

Bindingsbuffer:

10mM TrisHCl pH 7,4

35mM Choline

1mM DTT

Elueringsbuffer:

10mM TrisHCl pH 7,4

35mM Choline

500mM NaCl

1mM DTT

2.3.11 Buffer til gelfiltrering

10mM TrisHCl pH 7,4

140mM Choline

2.3.12 Buffere til rensing på DEAE cellulose

Bindingsbuffer:

10 mM TrisHCl, pH 7,4

100 mM NaCl

Vaskebuffer:

10 mM Tris HCl, pH 7,4

1,5 M NaCl

Avsaltingsbuffer:

10 mM Tris HCl, pH 7,4

Elueringsbuffer:

10 mM TrisHCl, pH 7,4

140 mM choline

2.4 Kit

Kit	Leverandør
NucleoSpin [®] Extract II	Machery-Nagel
NucleoSpin [®] Plasmid	Machery-Nagel
Protino [®] Ni-TED	Machery-Nagel

2.5 Enzymer

Enzym	Buffer	Leverandør
DyNAzyme Taq Polymerase	10x DyNAzyme Taq Polymerase Buffer	New England BioLabs
Katalase		Sigma
Lysozyme		Sigma
Phusion Polymerase	5x Phusion Polymerase Buffer	Finnzymes
Quick Ligase	10x Quick Ligase Buffer	New England BioLabs

2.6 Standarder

Standard	Leverandør
1 kb DNA Ladder	Invitrogen
Prestained Broad Range Marker (7-175 kDa)	New England BioLabs

2.7 Kjemikalieliste

Navn	Kjemisk formel	Leverandør
2-merkaptoetanol	$C_{22}H_6OS$	Sigma-Aldrich
Adenosin, minimum 99%	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	Sigma
Agarose		Invitrogen
Akrylamid 4x (40%) 37,5 : 1	C_3H_5NO	Saveen Werner
Aktivit kull	C	Merck
Albumin fra bovint serum, minimum 98%, electrophoresis		Sigma
Ammonium persulfat for elektroforese $\geq 98\%$	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma
BactoTM Agar		Saween Werner
BactoTM Casitone		BD Diagnostic Systems
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma-Aldrich
Brilliant Blue	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S$	Sigma
Bromfenolblå (3',3'',5',5''- Tetrabromophenolsulfonephthalein)	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Sigma
Cholineklorid		Sigma
D(+) Glukose	$C_6H_{12}O_6$	VWR
diethylaminoethyl cellulose		Sigma
di-Kaliumhydrogenfosfat	K_2HPO_4	Merck
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) dinatriumsalt dihydrat	$C_{10}H_{16}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	VWR
Etidiumbromid, EtBr	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich
Formaldehyd (formalin) 36,5-38%	CH_2O	Sigma
Gjærekstrakt, granulert		Merck
Glutardialdehyd, 25 % løsnings	$C_5H_8O_2$	Merck
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Merck
Glyserol 85 % for analysis	$C_3H_5(OH)_3$	Merck
Imidazole (Glyoxaline)	$C_3H_4N_2$	Fluka
Jern(II)sulfat heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka
Kaliumklorid	KCl	Merck
Kalsium panthothenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma
Kalsiumklorid anhydrert	$CaCl_2$	Fluka
Kobberklorid	$CuCl_2$	Fluka
Kobbersulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka

Navn	Kjemisk formel	Leverandør
Koboltklorid	CoCl ₂	Fluka
L-Cystein hydrogenklorid monohydrat	C ₃ H ₇ NO ₂ S.HCl.H ₂ O	Fluka
L-Tryptofan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Fluka
Magnesiumklorid hexahydrat	MgCl ₂ .6H ₂ O	Fluka
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	MnCl ₂ .4H ₂ O	Riedel-de Haën
Metanol	CH ₂ OH	Merck
Natriumacetat	C ₂ H ₃ O ₂ Na	Sigma
Natriumhydroksid	NaOH	Merck
Natriumklorid	NaCl	Merck
Natriumpyruvat	C ₃ H ₃ NaO ₃	Sigma
Nikkelsulfat	NiSO ₄	Fluka
Nikotinsyre	C ₆ H ₅ NO ₂	Fluka
Pyridoxine hydroklorid	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	Fluka
Rektifisert sprit	C ₂ H ₅ OH	Kemetyl
Riboflavin (vitamin B2)	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	Sigma-Aldrich
Saltsyre min. 37 %	HCl	Riedel-de Haën
SDS, Sodium dodecyl sulfat	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	Fluka
Sinkklorid	ZnCl ₂	Fluka
Sinksulfat heptahydrat	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Fluka
Sukrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	BHD
Svovelsyre	H ₂ SO ₄	
Sølvnitrat	AgNO ₃	VWR
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	C ₆ H ₁₆ N ₂	Sigma
Uridin, Minimum 99 %	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	Sigma

2.8 Utstyr og maskiner

Utstyr	Modell	Produsent
ÄKTAprime™ plus		GE Healthcare
Autoklav		Presto®
Bordsentrifuge I (justerbar temp.)	5415R	Eppendorf
Bordsentrifuge II	5424	Eppendorf

Utstyr	Modell	Produsent
Celleknuser	FastPrep [®] -24	M. P. Biomedicals
Elektroforesekar til agarose-gelelektroforese	Mini-Sub Cell [®] GT	BioRad
Filter (0,2 µm)		Sarstedt
Gelfiltreringskolonne	Superdex TM 75 10/300 GL	GE Healthcare
Glass Beads, acid-washed	150-212 µm	Sigma
Histidin kolonne	HisTrapHP 1 ml	GE Healthcare
Inkubatorskap		Termaks
Ionebytte kolonne	HiTrapCMFF 1 ml	GE Healthcare
Kromatografi kolonner	Poly-Prep [®]	BioRad
Magnetrører	MR 3003 K	Heidolph
Mikrobølgeovn		Whirlpool
PCR-maskin	PTC-100 TM Programmable Thermal Controller	MJ Research Inc.
pH-meter	PHM210	MeterLab [®]
Pipetter	Finnpipetter (0,5-10 ul, 10-100 ul, 100-1000 ul, 1-5 ml)	Thermo Scientific
Plastibrand [®] engangskyvetter		Brand
Presisjonskyvetter		Hellma
Ristebord	WS 10	Edmund Bühler
SDS-PAGE-utstyr	Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	BioRad (165-8000)
Sekvensator	ABI prism [®] 3100	Applied Biosystems
Sentrifuge I	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Sentrifuge II	Avanti TM J-25	Beckman coulter
Sentrifugeflasker		Nalgene [®]
Spektrofotometer I	DU [®] 800 UV/Vis	Beckman coulter
Spektrofotometer II	Ultrospec III [®]	Pharmacia
Sprøyter til sterilfiltrering	Div. volum	BD Plastipak TM
Strømforsyning til gelelektroforese/blottecelle	Powe Pac 300 / 1000	BioRad
Vannbad I (max 60 °C)	7A	Julabo
Vannbad II (max 100 °C)	1002	GFL
Vekt for finveiing, 0,0001 g - 200 g		Sartorius
Vekt, 0,5 g -3100 g	PB3002 Delta Range	Mettler Toledo

Utstyr	Modell	Produsent
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA [®]

3. Metoder

3.1 Rensing av CbpD

Rensing av CbpD proteinet ble gjort med to hovedmål for øyet: (i) for å bedre karakterisere de enzymatiske egenskapene og (ii) for å oppnå tilstrekkelige mengder av proteinet for å kunne oppnå krystallstruktur. Flere rensetrinn kan være nødvendig for å oppnå et helt rent produkt. Dette er spesielt viktig med tanke på krystallstrukturstudier siden eventuelle kontaminerende proteiner vil ødelegge for krystalliseringen. Det finnes flere ulike metoder for å rense proteinet, og et lite utvalg av disse metodene er presentert under. Metodene som er brukt er de som laboratoriet har bredest erfaring med og er derfor valgt som utgangspunkt for rensingen.

3.1.1 Affinitetskromatografi

Affinitetskromatografi baserer seg på å separere proteiner ut ifra en spesifikk reversibel interaksjon mellom protein og lignad (GE Healthcare).

3.1.1.1 Rensing av CbpD med diethylaminoethyl cellulose

Siden CbpD inneholder et kolinbindende domene vil dette kunne benyttes i affinitetskromatografi. Diethylaminoethyl (DEAE) cellulose er et materiale der kolinanalogen DEAE er koblet på cellulosefiber. Når CbpD blir satt på en kolonne som består av DEAE cellulose, vil det binde til DEAE med sitt kolinbindende domene, mens proteiner uten dette domenet ikke vil binde, men gå direkte gjennom kolonnen. Proteiner bundet til DEAE kan elueres ved å tilsette et overskudd av kolin som vil utkonkurrere bindingen mellom CbpD og DEAE (Sanchez-Puelles 1992).

Kolonnen bestående av DEAE cellulose ble laget ved å resuspendere 3-4 ml DEAE cellulose i ca. 15 ml 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl med pH 7,4. Dette ble satt på en tom kolonne (BioRad) for å la DEAE cellulosen sedimentere. Etter sedimentering ble et filter plassert på toppen av den ferdig pakke DEAE cellulose kolonnen for å forhindre at sedimenteringen ble forstyrret ved tilsetning av nye løsninger.

DEAE cellulose rensingen av CbpD ble utført etter følgende metode:

1. Cellestammen NZ9000 med pNZ8037 CbpD ble dyrket over natten ved 30 °C i 50 ml GM17 medium tilsatt 10 µg/ml chloramphenicol (CAM).
2. Et volum på 50ml overnatt kultur ble tilsatt i 950 ml GM17 medium med 10 µg/ml CAM. Kulturen ble dyrket videre ved 30 °C i ca. 1,5 timer til OD = 0,3-0,4.

3. Overuttrykk av CbpD ble induisert ved å tilsette nisin løst i 10 mM HCl til kulturen hadde en sluttkonsentrasjon på 20 ng/ml.
4. Etter induksjon i 3 timer ved 30 °C ble cellene høstet ved å sentrifugere kulturen ved 7 000 rpm i 5 min. ved 4°C for å få dannet en cellepellet.
5. Cellepelleten ble resuspendert i totalt 8 ml 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl med pH 7,4 og overført til fastpreprør som inneholdt ca 0,5 g syrevaskede 106 ≤ μm glasskuler (Sigma).
6. Cellene ble lysert i en FastPrep-24 med en hastighet på 6,5 m/s i 30 s. Dette ble gjentatt 5 ganger. Mellom hver fastprepping ble rørene satt på is i to minutter for å forhindre proteindegradering.
7. Fastpreprørene ble sentrifugert ved 13 200 rpm ved 4 °C i 5 min. Supernatanten med løselig protein ble satt på DEAE cellulose kolonnen.
8. Proteinekstraktet fikk renne dryppvis gjennom kolonnen for å få bundet proteinet til DEAE.
9. Kolonnen ble deretter vasket 4 ganger med 10 ml 1,5 M NaCl, 10mM TrisHCl med pH 7,4 for å fjerne proteiner som binder uspesifikt til kolonnematerialet.
10. Kolonnen ble deretter vasket en gang med 10ml 10mM TrisHCl med pH 7,4 for å unngå høy saltkonsentrasjon i eluatet.
11. CbpD ble eluert med ca 15 ml 140 mM kolin, 10 mM TrisHCl med pH 7,4 i totalt fem fraksjoner.
12. 20μl av hver av de fem fraksjonene ble tatt ut og blandet med 20 μl 2xSDS sample buffer og separert på en Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) page gel (se delkapittel 3.1.4).

For å prøve å oppnå nok mengder (ca 5 mg/ml) CbpD til krystallisering ble CbpD rensset med DEAE cellulose fra totalt 12 liter GM17 medium som beskrevet ut fra metoden over.

3.1.2 Videre rensing av CbpD med ionebyttekromatografi

Ionebyttekromatografi er basert på binding av ladede molekyler til motsatt ladede grupper som er festet til en uløselig matriks. Molekyler blir bundet til ionebytteren når de har en netto ladning som er motsatt av den til ionebytteren. Bindingen som oppstår er elektrostatisk og reversibel. pH-verdien der molekyler har en ladning lik null kalles isoelektrisk punkt (pI). Når molekylet blir utsatt for en pH som er under dets pI vil molekylet ha en netto positiv ladning og vil binde til en kationbytter som har negativt ladde grupper (GE Healthcare).

Ionebytte av CbpD ble utført ved hjelp av maskinen Äkta Prime™ Plus. Äkta Prime™ Plus (se figur 5) er et et-trinns rensesystem for de fleste klargjorte kolonner, slik som kolonnen HiTrap™. Systemet har programmerte metoder for typiske applikasjoner, slik som rensing av affinitetsmerkede proteiner og antistoffer. Det fleksible systemet kan også brukes til mer generelle rensemetoder som gelfiltrering og ionebytting som er presentert i oppgaven (GE Healthcare).



Figur 5: Äkta Prime™ Plus (GE Healthcare)

Rensing av CbpD ble gjort etter at proteinet var renses med DEAE cellulose for å prøve å få et renere produkt enn det som ble oppnådd med DEAE cellulose metoden. Kolonnene som ble benyttet i forsøket var av typen 1 ml HiTrapCMFF. HiTrapCMFF der kolonnene er laget av polypropylen som er et inert materiale. Kolonnematerialet er basert på en robust høytkryssbindende agarose matriks som har høy evne til rask væskegjennomstrømming og som kan binde store mengder protein (GE Healthcare).

Den videre rensingen av CbpD proteinet ble utført etter følgende metode:

1. Fraksjonen som ut i fra SDS page separasjonen inneholdt mest protein ble valgt for videre rensing.
2. Fraksjonen inneholder 140mM kolin fra første rensetrinn, mens bufferene til ionebyttekromatografen inneholder 35mM. For å oppnå samme kolin konsentrasjon ble fraksjonen fortynnet 1:3 med 10mM TrisHCl med pH 7,4. Dette ble gjort for å redusere konduktiviteten til prøven før den ble applisert på ionebytteren,
3. Slange B ble klagjort ved å suge opp 25 ml med binding/vaskebuffer med en strømningshastighet på 40 ml/min.
4. Slange A1 ble klagjort ved å suge opp 35 ml med elueringsbuffer med en strømningshastighet på 40 ml/min.

5. Ekvilibrerte HiTrap kolonnen med 10 ml binding/vaskebuffer med en strøminingshastighet på 1 ml/min.
6. Systemet ble nullstilt av UV-absorpsjon (280 nm) før påsetting av protein prøven på kolonnen.
7. 5 ml prøvevolum ble applisert på kolonnen med en strøminingshastighet på 0,5 ml/min. Protein prøven (5 ml) består av de fraksjonene som inneholdt mest protein etter DEAE cellulose rensingen og fortynnet 1:3 med 10mM TrisHCl med pH 7,4.
8. Kolonnen ble vasket med 20 ml binding/vaskebuffer med en strøminingshastighet på 1ml/min.
9. CbpD ble eluert ved hjelp av en elueringsgradient der 20 ml elueringsbuffer i økende grad (fra 0-100%) ble tilsatt kolonnen med en strøminingshastighet under eluering på 1 ml/min.
10. Fraksjonene som basert på kromatogrammet generert i Äkta PrimeTM Plus inneholdt mest protein ble separert ved hjelp av SDS-PAGE (se del kapitel 3.1.4).

3.1.3 Rensing av CbpD med bruk av gelfiltrering.

Da ønsket renhet for krystallisering av CbpD ikke ble oppnådd etter rensing med DEAE cellulose og ionebyttekromatografi ble proteinet videre rensert med bruk av gelfiltrering. Gelfiltrering er en enkel og skånsom kromatografisk metode for å separere molekyler med hensyn på størrelse. Gelen inneholder en rekke porer av varierende størrelse. Molekyler som er større enn porene er ikke i stand til å diffundere inn i gelen og forblir i løsningen som omgir gelen. Molekyler som har mindre størrelse penetrerer porene i varierende grad og vil derfor bruke lengre tid på å vandre gjennom gelen enn molekyler som er større. Molekyler som er mindre enn de minste porene i gelen vil kunne penetrere det totale porevolumet og vil trenge lengst tid på å komme gjennom gelen (GE Healthcare).

Gelfiltrering ble utført med en Superdex 75 10/300 GL area TricornTM high performance kolonne (GE Healthcare) ved hjelp av Äkta PrimeTM Plus. Kolonnen består av kryssbundet agarose og dextran med en gjennomsnittlig porestørrelse på 13 µm. Optimalt separerer kolonnen globulære proteiner i størrelsesorden 3000-70000 Da.

Rensingen av CbpD ble utført etter følgende metode:

1. Fraksjonene fra ionebyttekromatografien som inneholdt mest CbpD ble slått sammen til en fraksjon.

2. Den samlede fraksjonen ble oppkonsentrert til et totalt volum på mellom 250-500 μ l ved hjelp av et amicon filter (10000 Da cutoff) fra Milliporer, som sentrifugeres til det ønskede volume er oppnådd.
3. Først ble kolonnen ekvilibrert med 30 ml TrisHCl pH 7,4 med 140 mM kolin
4. Den oppkonsentrerte fraksjonen (ca 500 μ l) ble applisert på gelfiltreringskolonnen.
5. Gelfiltreringen ble utført med TrisHCl pH 7,4 med 140 mM kolin med en strømningshastighet på 0,5 ml/min.
6. Fraksjoner ble samlet opp etter 7,5 ml til og med 25 ml.
7. Kolonnen ble til slutt vasket med 30 ml vann med en strømningshastighet på 0,5 ml/min.
8. 20 μ l av hver av fraksjonene fra toppen av kromatogrammet ble tatt ut og blandet med 20 μ l 2 x SDS sample buffer og separert på en SDS page gel (se delkapittel 3.1.4).

3.1.4 Sodium Dodecyl Sulfat polyakrylamid gel elektroforese (SDS-page) av proteiner

De fleste analytiske elektroforeser av proteiner blir utført i polyakrylamid geler under forhold der man sikrer dissosiering av proteinene og som minimerer aggregering. Mest vanlig er SDS brukt i en kombinasjon med et reduserende stoff for å hindre dannelse av eller bryter disulfidbroer mellom sulfhydrylgruppen på cycteiner. De denaturerte proteinene binder SDS som lineariserer proteinet og gjør dem negativt ladet. På grunn av mengden SDS som binder proteinet er proporsjonal med den molekylære vekten til polypeptidet vil proteinene migrere gjennom polyakrylamid gelen avhengig av deres størrelse. Når det blir tilført elektrisk spenning vil klorid ionene bevege seg rasket og glycinmolekylene saktest. Mellom disse finnes det en sone der konduktiviteten er lavere og høyere spenning som gjør at proteinene blir liggende ved toppen av separeringsgelen. Da det er høyere pH-verdi i separeringsgelen vil denne favorisere ionisering av glycin der de resulterende glycin-ionene vil migrere gjennom stablet polypeptid og bevege seg gjennom separeringsgelen rett etter klorid-ionene Proteinene som er dekket av SDS er nå fri til å bevege seg gjennom separeringsgelen som er en sone med lik spenning og pH gjennom hele gelen og vil bli separert i samsvar med størrelse. En 12% gel er godt egnet til å separere proteiner med en størrelse fra 12-60 kDa (Sambrook og Russel 2001, A8.40-A8.42).

Gelseperasjon av proteinene på SDS page gel ble gjort etter følgende metode:

1. 15 μ l av fraksjonene fra de ulike rensemetodene tilsatt 2 x SDS sample buffer og ble plassert i brønnene på gelen.

2. 6 µl BR ladder ble plassert i en brønn på gelen for å kunne estimere størrelse til og mengde av proteinet.
3. Gelelektroforesen ble utført ved 200 V i 45 min.
4. Deretter farges gelen med bruk av enten Coomassie brilliant blue farging eller sølv farging (se delkapittel 3.1.4.1 og 3.1.4.2).

3.1.4.1 Coomassie Brilliant Blue farging av proteingeler

Coomassie Brilliant Blue er en aminotriarylmelan farge som danner sterke, men ikke kovalente komplekser med proteiner. Kompleksene er sannsynligvis en kombinasjon av van der Waals krefter og elektrostatiske interaksjoner med NH^{3+} gruppene på proteinene. Binding av farge er tilnærmet proporsjonal med mengde protein (Sambrook og Russel 2001, A 8.46).

Coomassie blue fargingen blir utført etter følgende metode:

1. Proteingelen etter SDS-page ble dekket med Coomassie Brilliant Blue.
2. Den fargede gelen ble varmet opp til rett før kokepunkt for raskere opptak av farge.
3. Gelen ble inkubert på ristebord med svak risting i romtemperatur i ca. 20 min eller til tilstrekkelig farge var oppnådd.
4. Resterenes væske ble helt av og gel ble skyllet raskt med vann.
5. Avfargingsløsning ble tilsatt gelen til denne var tilstrekkelig dekket og ble satt på ristebord med svak risting i romtemperatur til ønsket avfarging av gel var oppnådd.

3.1.4.2 Sølvfarging av proteingeler

Sølvfarging er den mest sensitive kolirimetriske metoden for detektering av totalmengde proteiner. Denne teknikken innebærer å deponere sølvioner på overflaten av gelen for å lokalisere proteinband. Sølvionene vil interagere og binde seg til visse funksjonelle grupper på proteinet, der de sterkeste interaksjonene vil forekomme sammen med karboksylsyrergrupper (Asp og Glu), imidazole (His) og aminer (Lys). Ulike sentitizer og løsninger er essensielle for å kontrollere spesifisitet og effektivitet for binding av sølvioner til proteiner. Dette vil også effektivisere framkallingen av bundne sølvioner til metallisk sølv. Fremkallingsprosessen kan sammenlignes med prosessen for framkalling av fotografisk film, der sølvioner blir redusert til metallisksølv, noe som resulterer i en brunlig farge (piercnet.com).

Proteiner som har blitt separert ved bruk av SDS page kan med sølvfarging bli detektert ned til en konsentrasjon på 2-5 ng/proteinband. Etter å blitt fiksert og sentitized i

etanol, eddiksyre og glutaraldehyd ble proteingelen utsatt for sølvnitrat.

Sølvfargingen ble utført etter følgende metode:

1. SDS page gelen ble dekket i fikseringsløsning og varmet opp og fiksert i 30 min ved svak risting på ristebord.
2. Gelen ble vasket 10 min i milli-Q (MQ) vann ved svak risting.
3. Gelen ble så inkubert i sensitizing løsning i 30 min ved svak risting.
4. Gelen ble vasket to ganger i MQ vann i 10 min ved svak risting.
5. Sølvfargingsløsning ble tilsatt og gelen ble farget i 20 min ved svak risting.
6. Gelen ble vasket i 3 x 5 min i MQ vann ved svak risting
7. Gelen ble dekket med fremkallingsløsning til ønsket intensitet var oppnådd
8. Avfarging pågikk i en time eller til ønsket avfarging var oppnådd

3.2 Tillaging av celler som overuttrykker His-CbpD

Siden vi ikke oppnådde et helt rent produkt av nativt CbpD med de tre overnevnte rensetrinnene, ble His-CbpD laget for å kunne ta i bruk mer spesifikke rensemetoder. For dette forsøket ble seks histidin aminosyrer (aa) koblet N-terminalt til villtype CbpD for å danne His-CbpD.

3.2.1 Amplifisering av *his-cbpD* ved Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR gjør det mulig å raskt syntetisere mange kopier av et spesifikt DNA sekvens. For en PCR reaksjon trengs flere ulike komponenter. Disse er DNA som skal bli amplifisert (templat), primere, en termostabil DNA polymerase og hver av de fire dNTPene (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). En PCR består av en serie av repeterte sykluser som hver består av tre trinn:

1. I det første trinnet blir DNAet denaturert ved høy varme slik at det blir enkelttrådet.
2. Temperaturen senkes for å tillate binding av primere
3. DNA polymerasen med startpunkt fra primerene syntetiserte kopier av DNAet ved bruk av de fire dNTPene.

Disse tre trinnene blir så gjentatt flere ganger for å generere en stor nok mengde DNA til videre arbeid. I teorien vil antall DNA-kopier doubles for hver syklus (Willey *et al* 2008). PCR ble brukt ved flere anledninger først for å amplifisere et templat som inneholdt *cbpD*. I dette tilfelle var dette templatet et plasmid som inneholdt *cbpD*. Det ble satt opp en 50 µl PCR

reaksjon for denne amplifisering på følgende måte, se figur 6 og PCR program i samme figur ble utført med 25 sykluse:

	95 °C	5 min
2,5µl Primer F		
	95 °C	30 s
2,5 µl Primer R		
	52 °C	15 s
10 µl 5x buffer		
	72 °C	40 s
0,5 µl Taq polymerase		
	72 °C	7 min
1 µl 10mM dNTP		
0,5 µl templat		
32,5 µl dH₂O		
<hr/>		
50 µl total volum		

Figur 6: Til venstre oppsett over PCR for tillaging av *his-cbpD*. Til høyre PCR program.

3.2.2 Rensing av PCR-produkt og plasmid

3.2.2.1 Rensing av PCR-produkt

For rensing av PCR-produkter ble NucleoSpin® Extract II kolonner fra Macherey-Nagel benyttet. Metoden er basert på at DNA binder til en silica membran ved tilstedeværelse av chaotropic salt som blir tilført gjennom Binding Buffer NT. Denne blandingen blir så satt på NucleoSpin kolonnen. Kontaminasjoner, som salter og løselige makromolekylære komponenter blir fjernet ved å vaske med en buffer som inneholder etanol. Primere blir fjernet fra PCR reaksjonsblanding mens små DNA fragmenter fortsatt binder og blir rensed med høyt utbytte. Rent DNA blir så eluert under forhold med lav ionestyrke og svakt basisk pH. Kolonnene kan rens PCR-produkter ned til 65bp (Macherey-Nagel). PCR-produktet fra amplifisering av CbpD ble rensed i hendhold til produsent (Macherey-Nagel) på følgende måte før separering ved hjelp av agarose gelelektroforese for å sjekke lengden på PCR-produktet.

Metode for PCR rensing:

1. Først ble forholdene for DNA binding justert. Dette ble gjort ved å blande prøven med to volumenheter med Buffer NT.
2. For å binde DNAet ble prøven satt på kolonnen og sentrifugert ved 11 000 x g i 1 min. Flow-through etter sentrifugering ble fjernet fra oppsamlingsrøret.
3. Silicamembranen ble vasket og det ble tilsatt 700 µl Buffer NT3. Prøven ble igjen sentrifugert ved 11 000 x g i 1 min. Flow-through fra sentrifugering ble fjernet fra oppsamlingsrøret.
4. Silicamembranen ble tørket ved sentrifugering ved 11 000 x g i 2 min.
5. DNAet ble eluert ved å plassere kolonnen i et rent eppendorfrør. Tilsatte 15-50 µl Buffer NE og innkuberte kolonnen i eppendorfrøret i romtemperatur i 1 min.
6. Prøven ble sentrifugert 1min ved 11 000 x g.
7. Prøven var nå klar til å separeres ved hjelp av en elektroforese gel

3.2.2.2 Rensing av plasmid

Rensing av plasmid ble utført på NucleoSpin[®] Plasmid kolonner fra Macherey-Nagel. Bakterier i pelletform ble resuspendert i buffer A1 og plasmid DNA blir frigjort fra *E.coli* vertscellen ved SDS/alkalisk lysis i buffer A2. Buffer A3 nøytraliserer lysatet og gir de riktige forholdene for binding av plasmidet til silica membranen på kolonnen. Utfelt protein, genomisk DNA og cellerester blir fjernet med sentrifugering ved 10000 x g. Supernatanten blir satt på kolonnen. Kontaminasjon som salter, metabolitter og løselige makromolekylære cellekomponenter blir fjernet ved å vaske med buffer A4 som inneholder etanol. Rent plasmid DNA blir eluert under forhold med lav ionestyrke og somer svakt basiske. Rensingen av pNZ8037 ble utført i henhold til produsent (Macherey-Nagel). Etter rensing ble produktet separert på en 1% agarosegel for å sjekke mengde DNA.

Metode for plasmid rensing:

1. 1-5 ml med overnattskultur av *E.coli* som inneholdt ønsket plasmid (pNZ8037) ble brukt for å høste bakterieceller. Celler ble høstet ved å sentrifugere 30 s ved 11 000 x g for deretter å fjerne supernatant.
2. Celle lysis ble utført ved å tilsette 250 µl Buffer A1 og resuspendere cellene fullstendig i denne.
3. 250 µl Buffer A ble blandet forsiktig inn for å unngå fragmentering av genomisk DNA.
4. Prøven ble innkubert ved romtemperatur til lysatet virket gjennomskiktig

5. Det ble tilsatt 300 µl Buffer A3 og blandet forsiktig.
6. Lysatet ble sentrifugert i 5 min ved romtemperatur ved 11000 x g for å fjerne cellerester.
7. For å binde DNAet ble supernatant overført til kolonnen og sentrifugert i 1 min ved 11000 x g. Etter sentrifugering ble flow-through fjernet.
8. Silica membranen ble vasket ved å tilsette 600 µl Buffer A4 og sentrifugert i 1 min ved 11000 x g. Etter sentrifugering ble flow-through fjernet.
9. Silica membranen ble tørket ved å sentrifugere prøven i 2 min ved 11000 x g. For å eluere DNAet ble kolonnen plassert i et rent eppendorfrør og tilsatt 50 µl Buffer AE. Kolonnen i eppendorfrøret ble innkubert ved romtemperatur i 1 min og deretter sentrifugert 1 min ved 11000 x g.
10. Prøven klar til å separeres ved hjelp av en agarose gel elektroforese.

3.2.3 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese blir brukt til å separere, identifisere og rens DNA fragmenter. Agarose består av D- og L-galaktose enheter. Kjeder med agarose danner heliske fiber som aggregerer til en supercoiled struktur. Når det blir dannet gel av agarose får man et tredimensjonalt nett med kanaler med diameter som går fra 50-200nm. Dobbeltrådet DNA vil migrere gjennom dette nettverket med en hastighet som er omvendt proporsjonal med \log_{10} til antall basepar. Større molekyler vil vandre saktere på grunn av større friksjon og fordi de kommer seg gjennom porene i gelen mindre effektivt. DNA i gelen kan visualiseres ved å tilsette etidium bromid (EtBr) og eksponere gelen i Ultra Violette (UV)-lys (Sambrook og Russel 2001, 5.2-5.8). I den oppgaven har agarose gelelektroforese blitt utført ved å bruke en 1 % gel og en spenning på 1 V/cm². Prøvene ble tilsatt 10x loadingbuffer før de ble satt på gel.

3.2.4 Preparering av plasmid og PCR-produkt

På grunn av den sirkulære utformingen av plasmidet sin oppbygging hindrer det at PCR-produktet blir tatt opp direkte. For at plasmidet skal kunne ta opp PCR-produktet må produktene prepareres og det gjøres etter følgende metode:

1. Plasmid og PCR-produkt ble kuttet ved hjelp av restiksjonsenzymmer som kutter DNA ved spesifikke kuttsteder. Kutting av plasmid og PCR-produkt ble utført som oppgitt i figur 7. Plasmidet og PCR-produkt ble kuttet hver for seg.
2. Plasmidet og PCR-produktet ble innkubert i 1 time ved 37°C.

3. Deretter ble 1 µl alkalisk fosfatase (Promega) tilsatt til røret som inneholdt plasmid DNAet. Dette ble gjort for å fjerne fosfat fra 5' ende av DNA for å hindre at plasmidet religerer med seg selv.
4. Plasmid DNAet og PCR-produktet ble innkubert videre ved 37 °C i 1 time før de kuttete DNA-fragmentene ble separert ved hjelp av agarose gelelektroforese.
5. DNA ekstrahering fra gel (se avsnitt 3.2.5)

<hr style="width: 100%;"/>
1 µl XmaI
1 µl XbaI
2 µl 10x buffer nr.4
2 µl 10x BSA
1 µg DNA
<hr style="width: 100%;"/>
6 µl + 1 µg total
volum
<hr style="width: 100%;"/>

Figur 7: Oppsett for kutting av plasmid og PCR-produkt

3.2.5 DNA ekstrahering fra gel

Etter kutting og gelelektroforese av DNA ble de ønskede båndene kuttet ut av gelen og DNAet trukket ut av gelen på følgende måte ved NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel) før det igjen ble separert på agarose gel for å estimere mengden rensset DNA.

1. De ønskede DNA båndene oppnådd gelenseparasjonen i del kapittel 3.2.4 ble kuttet ut fra gelen.
2. Gelbitene ble tilsatt 200 µl Buffer NT pr 100 µg gel
3. Prøven ble inkubert ved 50 °C til gelen var fullstendig oppløst.
4. Prøven ble satt på kolonnen for å binde DNAet og sentrifugert i 1 min ved 11000 x g. Etter sentrifugering ble flow-through fjernet.
5. Prøven ble tilsatt 700 µl Buffer NT3 for å vaske silicamembranen og sentrifugerte i 1 min ved 11000 x g. Etter sentrifugering ble flow-through fjernet.
6. For å tørke silicamembranen ble prøven sentrifugert i 2 min ved 11000 x g.
7. For å eluere DNAet ble kolonnen plassert i et rent eppendorfrør. 15-50 µl Buffer NE ble tilsatt og kolonnen innkubert ved romtemperatur i 1 min og deretter sentrifugert i 1 min ved 11000 x g.
8. Prøven var nå klar til å separeres ved hjelp av en agarose gelelektroforese.

3.2.6 Ligering av *his-cbpD* inn i pNZ8037.

For å kunne plassere PCR-produktet (*his-cbpD*) inn i plasmidet (pNZ8037) ble en ligeringsreaksjon satt opp i henhold til Figur 8 for å lage pNZ8037-*his-cbpD*. Når PCR-produktet settes inn i plasmidet blir det ofte kalt et ”insert” og vil bli omtalt som dette videre i teksten.

100 ng plasmid
100 ng insert
10 µl 2x buffer
1 µl ligase
11 µl + 200 ng
total volum

Figur 8:Ligeringsreaksjon

1. Ligeringsmiksen som inneholder plasmidet og insert ble satt 5 min ved romtemperatur for deretter å bli plassert på is for å stoppe reaksjonen.
2. Kjemisk kompetente *E.coli* DH5α celler ble tint på is.
3. 50 µl *E.coli* DH5 α celler ble blandet med 6 µl ligeringsmiks.
4. Blandingen ble satt på is i minimum 30 min.
5. Deretter ble blandingen satt i vannbad i 30 s ved 42 °C, før den igjen ble satt på is i 2 min.
6. 450µl SOC medium ble tilsatt blandingen.
7. Blandingen ble satt i risteinkubator ved 37 °C i ca 1 time før den ble platet ut på plater med LB medium og 20 ng/µl CAM.
8. Platene ble innkubert over natten ved 37 °C.

3.2.7 Kvalitetsjekk på insertet.

For å verifisere at transformantene hadde et insertet med ønsket lengde ble det laget en PCR miks og fordelt i 5 PCR-rør ut fra Figur 9. PCR program fra figur 6 ble utført med 25 sykluser. Verifikasjonen ble gjort etter følgende metode:

1. Bakteriekolonier fra platene som var innkubert over natten (se del avsnitt 3.2.6) ble plukket med tannpirker og dyppet i PCR miksen.
2. Tannperkerene med bakterier ble så overført til falconrør med flytende LB medium med 34 µg/ml CAM.

3. Etter at PCR ble utført på PCR miksen ble produktene separert på 1% agarose gel for å undersøke lengden på insertet. Totalt 5 bakteriekolonier ble plukket ut for PCR analyse.

<hr/>
1µl primer F
1µl primer R
0,5 µl dNTP
4 µl 5x phusionbuffer
0,2 µl enzym phusion
12,3 µl dH₂O
1 µl templat
(kolonier)
<hr/>
20 µl totalt volum
<hr/>

Figur 9: PCR miks for kvalitetsjekk av insertet.

3.2.8 Isolering av plasmid

Plasmid (pNZ8037-*his-cbpD*) ble isolert (se del kapittel 3.2.2.2) fra overnattkulturen fra bakteriekolonien som gav riktig lengde på insertet for å kunne overføre plasmidet til *L.lactis* NZ9000. For å undersøke plasmidet ble det utført en PCR reaksjon som i figur 10 og PCR program fra figur 6 ble utført med 25 sykluser. Produktet av denne reaksjonen ble undersøkt på en agarosegel. PCR-produktet ble deretter renset (se del kapittel 3.2.2.1) og på ny separert på agarosegel for å estimere mengden DNA for DNA-sekvenseringen.

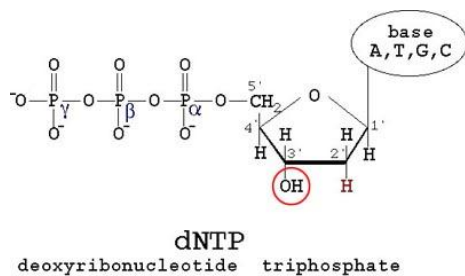
<hr/>
2,5 µl Primer F
2,5 µl Primer R
10 µl 5x phusionbuffer
1 µl 10mM dNTP
0,5 µl enzym phusion
0,5 µl plasmidtemplat
33 µl dH₂O
<hr/>
50 µl total volum
<hr/>

Figur 10: PCR reaksjon for å undersøke plasmidet.

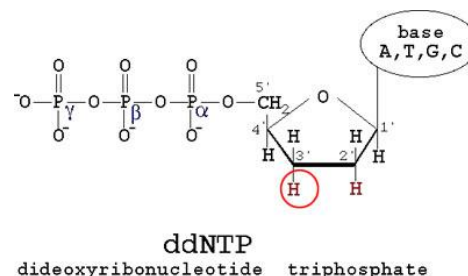
3.2.9 DNA sekvensering

PCR-amplifisert *his-cbpD* fra pNZ8037-*his-cbpD* isolert fra *E. coli* DH5a ble brukt som templat for å verifisere at det klonede *his-cbpD* hadde riktig sekvens.

Sekvenseringsreaksjonen krever enkeltrådet DNA sammen med en primer, DNA polymerase, de fire dNTPene (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) og de fire ddNTPene (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). ddNTP er ulik fra dNTP ved at 3' karbon mangler en hydroksylgruppe (se Figur 11 og Figur 12).



Figur 11: dNTP (berkeley.edu)



Figur 12: ddNTP (berkeley.edu)

En DNA syntese vil fortsette til en ddNTP bli inkorporert i DNA tråden. De fire ulike ddNTPene er merket med hver sin fluoriserende farge for å kunne bli detektert i sekvenseringsmaskinen. Fragmentene etter sekvenseringsreaksjonen blir separert ved hjelp av elektroforese gjennom en polyakrylamid gel og laseren i sekvenseringsmaskinen detekterer rekkefølgen fragmentene kommer ut. Basert på disse resultatene kan rekkefølgen av nukleotider i DNA fragmentet bestemmes (Willey *et al* 2008). Følgende sekvenseringsmikros (figur 13) og sekvenseringsprogram ble benyttet med 25 sykluser:

3,2 µl primer	95 °C	5 min
3 µl 5x big dye	95 °C	30 s
buffer	60 °C	15 s
2 µl Big Dye 3,1	60 °C	4 min
50 ng PCR produkt	60 °C	7 min
10,8 µl dH₂O	60 °C	7 min
19 µl + 50 ng total volum		

Figur 13: Til venstre sekvenseringsmikros for sekvenseringsreaksjon. Til høyre sekvenseringsprogrammet.

Etter endt sekvenseringsreaksjon må DNAet felles ut. Det gjøres etter følgende metode:

1. 2 µl 125 mM EDTA og 2 µl 3 M natriumacetat ble tilsatt hver av DNA prøvene.

2. Dette ble overført til eppendorfrør og 52 µl 96% etanol ble tilsatt og blandet til prøven var homogen.
3. Eppendorfrøret ble innkubert ved romtemperatur i 15 min.
4. Sentrifugerte eppendorfrøret ved 4 °C i 30 min ved maks hastighet, 13200 rpm.
5. Supernatanten ble raskt fjernet fra eppendorfrøret for å forhindre at DNAet kom ut i løsnings igjen.
6. 70µl iskald 70% etanol ble tilsatt i eppendorfrøret.
7. Sentrifugerte prøven ved 4°C i 10min ved maks hastighet, 13200 rpm.
8. Pellet ble tørket på benk. DNAet er presipitert og klart for sekvensering.

3.2.10 Transformasjon av *Lactococcus lactis* NZ9000

Transformasjonen av *L.lactis* NZ9000 ble utført for å kunne ta opp pNZ8037-*his-cbpD*. Dette vil muliggjøre overuttrykking ogrensing av his-CbpD proteinet. Celler av *L. lactis* av stammen NZ9000 ble dyrket over natten ved 30 °C i 10 ml GM17 medium som inneholdt 1,5% glycin for å gjøre dem elektrokompetente. Deretter ble følgende metode fulgt:

1. *L. lactis* celler ble sentrifugert ved 4 °C ved 4000 rpm i 4 min. Supernatant ble fjernet fra den sentrifugerte prøven.
2. Cellene ble resuspendert i 5 ml iskald 0,5 M sukrose og sentrifugert ved 4000 rpm i 2 min ved 4 °C. Supernatant ble fjernet fra den sentrifugerte prøven.
3. Trinn 2 ble repetert to ganger til.
4. Cellene ble resuspendert i 0,5 ml iskald 0,5 M sukrose + 10% glyserol.
5. 5 µl plasmid DNA (pNZ8037-*his-cbpD*) ble tilsatt i 40 µl kompetent cellesuspensjon. Dette ble blandet forsiktig.
6. Blandingen ble overført til en iskald 2 mm kyvette for å bli elektroporert ved 2 kV.
7. 960 µl SGM17 ble straks tilsatt blandingen og overført til nytt eppendorfrør.
8. Eppendorfrørene ble innkubert i 2 timer ved 30 °C.
9. Blandingen i eppendorfrørene ble platet ut på GM17 skåler med 10 µg/ml CAM for å se om transformert *L.lactis* var oppnådd. Mulige transformanter viser seg som kolonier på GM17 skålene. Transformantene er klar for testing (se del kapittel 3.2.11).

3.2.11 Testing av transformert *L.lactis* NZ9000.

For å verifisere at transformantene hadde riktig plasmid, ble det plukket tre transformanter som ble dyrket opp over natten i flytende GM17 medium tilsatt 10 µg/ml CAM. Det ble deretter utført en PCR reaksjon på transformantene for å sjekke om disse hadde tatt opp

pNZ8037-*his-cbpD*. PCR reaksjonen ble utført på hele celler og disse måtte derfor prepareres før reaksjonen kunne gjennomføres. Dette ble utført etter følgende metode:

1. 1 ml av hver av de tre *L.lactis* kulturene ble tatt ut og sentrifugert ved 4 °C ved 13200 rpm i 5 min. Supernatanten fra den sentrifugerte kulturen ble fjernet.
2. Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml dH₂O.
3. 2 µl ble tatt ut fra den resuspenderte løsningen og overført til PCR rør, som ble varmet opp i 2 min i mikrobølgeovn på full styrke for å lysere cellene.
4. Hver av de tre prøvene ble tilsatt 18 µl mastermiks som vist i figur 14.
5. PCR program ble deretter utført med 25 sykluser som vist i figur 6

1 µl primer F

1 µl primer R

0,5 µl dNTP

4 µl 5x phusionbuffer

0,2 µl enzym phusion

11,3 µl dH₂O

18 µl total volum

Figur 14: Mastermiks for PCR av *L.lactis* transformanter

3.3 Immobilisert metallion affinitetskromatografi (IMAK)

IMAK er en robust metode for rensing av polyhistidinmerket rekombinerte proteiner. Metoden utnytter den naturlige egenskapen histidin har, ved nøytral pH-verdi, til å danne komplekser med divalente metallioner. Ved å immobilisere metallioner på en kromatografisk resin ved kjelatering tillates separasjon av histidinmerkede proteiner fra proteiner som ikke er merket. Binding av merkede proteiner er pH avhengig. Fra resinet kan det bundne proteinet bli eluert ved å redusere pH verdien og øke ionestyrken i bufferen, eller ved å tilsette EDTA eller imidazole i bufferen (pall.com).

3.3.1 Rensing av His-CbpD

His-CbpD ble renset ved hjelp av DEAE-cellulose som første rensetrinn. Deretter ble His-CbpD renset ved hjelp av IMAK ved å bruke to ulike systemer; Protino® Ni-TED fra Macherey-Nagel eller HisTrap HP fra GE Healthcare som presentert i 3.3.1.1 og 3.3.1.2.

3.3.1.1 Rensing av his tag merket CbpD protein med bruk av Protino® NiTED rensemetoden

Protino® Ni-TED er basert på tørr silica som er ladet med Ni²⁺ ioner. Proteinene binder basert på interaksjon mellom polyhistidin tag og de immobiliserte Ni²⁺ ionene. Den kjelaterende gruppen er basert på TED (tris-karboksymetyletylene-diamin). TED tar opp 5 av de 6 bindingssetene i sfæren til Ni²⁺ ionene. Det gjenværende setet er tilgjengelig for proteinbinding. Dette øker spesifisiteten for polyhistidin taggede proteiner His-CbpD rensing med Protino® Ni-TED kolonne ble utført i henhold til produsentens protokoll (Macherey-Nagel) for rensing under native forhold:

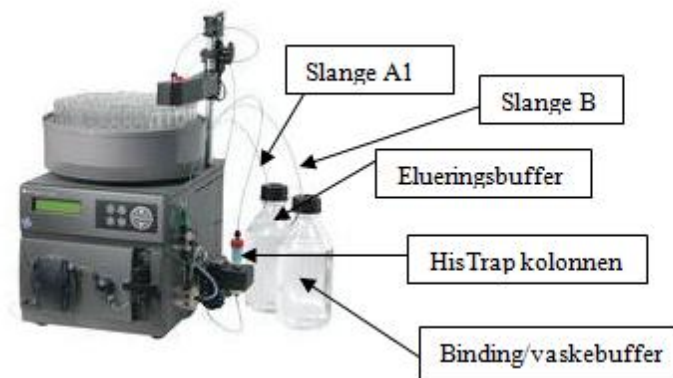
1. Proteinet var først blitt renset på DEAE cellulose (se del kapittel 3.1.1).
2. Ren kolonne ble ekvilibrert ved å tilsette 320 µl ekvilibreringsbuffer.
3. Prøven med His-CbpD ble tilsatt NaCl til en sluttkonsentrasjonen ble 300 mM.
4. Prøven ble satt på kolonnen og renset ved å la prøven vandre dråpevis gjennom kolonnen.
5. Proteiner som var bundet uspesifikt til kolonnen ble fjernet ved å vaske to ganger med 320 µl vaskebuffer.
6. His-CbpD ble eluert i tre fraksjoner med 240 µl elueringsbuffer. Proteinet var nå renset og klar til å separeres på SDS page gel (se del kapittel 3.1.4)

3.3.1.2 Rensing av His-CbpD med HisTrap HP ved bruk av Äkta Prime™ Plus fra GE Healthcare

Kolonnene er pakket med 1ml NiSepharose High Performance. Innholdet i kolonnen består av høyt kryssbindende agarosekuler med en immobilisert kjelaterende gruppe. Metallionet Ni²⁺ har blitt koblet til det kjelaterende matrikset i kolonnen. Flere aminosyrer, blant annet histidin, kan danne komplekser med flere metallioner som f.eks Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ og Cu²⁺. Ni Sepharose High Performance vil selektivt binde proteiner til kolonne matrikset dersom de kompleksdannende aminosyrene befinner seg på proteinets overflate. Ved å tagge proteiner med flere histidiner vil dette øke affiniteten for Ni²⁺ og vil i teorien

gjøre det histidintaggede (His-tag) proteinet til det sterkest bindende blant proteiner som ikke har en slik histidintag (GE Healthcare).

Programmet som ble brukt for rensemetoden ved bruk av Äkta Prime™ Plus er som følger:



Figur 15: Äkta Prime™ Plus oppsett (GE Healthcare)

Slange B inneholder bindings/vaskebuffer mens slange A1 inneholder elueringsbuffer (se figur 15).

1. Proteinet er først blitt rensert på DEAE cellulose (se del kapittel 3.1.1)
2. Slange B ble klagjort ved å suge opp 25 ml med binding/vaskebuffer med en strømnigshastighet på 40 ml/min.
3. Slange A1 ble klargjort ved å suge opp 35 ml med elueringsbuffer med en strømningshastighet på 40 ml/min.
4. Ekvilibrerte HisTrap kolonnen med 10 ml binding/vaskebuffer med en strøminingshastighet på 1 ml/min.
5. Systemet ble nullstilt av UV-absorbsjon (280 nm) før påsetting av protein prøven på kolonnen.
6. 5 ml prøvevolum ble applisert på kolonnen med en strøminigshastighet på 0,5 ml/min. Protein prøven (5 ml) består av de fraksjonene som inneholdt mest protein etter DEAE cellulose rensingen.
7. Kolonnen ble vasket med 20 ml binding/vaskebuffer med en strømningshastighet på 1ml/min.

8. His-CbpD ble eluert ved hjelp av en elueringsgradient der 20 ml elueringsbuffer i økende grad (fra 0-100%) ble tilsatt kolonnen med en strømningshastighet under eluering på 1 ml/min.
9. Fraksjonene som basert på kromatogrammet generert i Äkta PrimeTM Plus inneholdt mest protein ble separert på SDS page gel (se del kapitel 3.1.4).

Det ble også benyttet HisTrap kolonner der sepharosematerialet var kjelatert med Zn^{2+} eller Co^{2+} . Preparering av disse kolonnene ble utført ved å fjerne Ni^{2+} -ioner fra kolonnen ved hjelp av EDTA for deretter å tilsette det ønskede metallionet, enten Zn^{2+} og Co^{2+} , bundet på kolonnen. Dette ble gjort i henhold til følgende prosedyre fra produsent:

1. Ni^{2+} ble fjernet fra kolonnen og vasket med 5-10 kolonnevolum med strippingbuffer.
2. Kolonnen ble vasket med 5-10 kolonnevolum bindingsbuffer.
3. Kolonnen ble deretter vasket med 5-10 kolonnevolum dH_2O .
4. 0,5 ml 0,1 M metallsalt løst i dH_2O ble tilsatt kolonnen.
5. Kolonnen ble så vasket med 5 kolonnevolum dH_2O .
6. Kolonnen ble deretter vasket med 5 kolonnevolum bindingsbuffer.
7. Samme rensemetode ble brukt for Zn^{2+} og Co^{2+} kolonnene, som Ni^{2+} . Metode for Ni^{2+} er beskrevet over.

3.4 Testing av aktivitet til His-CbpD

Aktiviteten til His-CbpD testes for å undersøke dets aktivitet sammenlignet med aktiviteten til villtype CbpD.

Felles for alle testene som ble utført for aktivitet til proteinet er at den/de aktuelle stammene ble dyrket i C-medium fra en OD_{550} på 0,05 til OD_{550} ca 0,2. Tre ml av denne kulturen ble tilsatt i kyvetter plassert i spektrofotometeret (Beckman Coulter DU@800 UV/Vis) som inneholder proteinet og/eller andre additiver blandet i 100 μ l C-medium. Spektrofotometeret har plass til totalt seks prøver og måler celletettheten automatisk hver 30 s ved 37 °C .

Et spektrofotometer brukes til å måle absorpsjon eller lysbryting ved en bestemt bølglengde, i dette forsøket 550nm (snl.no).

3.4.1 Testing av aktivitet til His-CbpD etter rensing med Protino Ni-TED kolonne

For å se om proteinet har beholdt sin aktivitet etter å ha blitt rensert med protino Ni-TED ble aktiviteten til proteinet testet spektrofotomerisk i et Beckman Coulter DU@800 UV/Vis spektrofotometer. For å kunne bedømme aktiviteten til proteinet ble His-CbpD

sammenlignet med villtype CbpD. Oppsettet i kyvetter som ble plassert i spektrofotometeret kan ses i Figur 16.

1	RH14 3 ml
2	RH14 3 ml, 0,75 µg His-CbpD protino Ni-TED
3	RH14 3 ml, 0,75 µg villtype CbpD

Figur 16: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til His-CbpD etter rensing med Protino Ni-TED

3.4.2 Testing av aktivitet til His-CbpD etter rensing med Äkta Prime™ Plus nikkelkolonne

For å se om proteinet har beholdt sin aktivitet etter å ha blitt rensed med en nikkelkolonne på Äkta Prime™ Plus ble aktiviteten til proteinet testet ved å observere grad av cellelysis spektrofotomerisk med DU®800 UV/Vis spektrofotometeret. For å kunne bedømme aktiviteten til His-CbpD sammenlignet med aktiviteten til villtype CbpD. Oppsettet i kyvetter som ble plassert i spektrofotometeret kan ses i figur 17.

1	RH14 3 ml
2	RH14 3 ml, 0,75 µg His-CbpD nikkelkolonne
3	RH14 3 ml, 0,75 µg villtype CbpD

Figur 17: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til His-CbpD etter rensing med nikkelkolonne på Äkta Prime Plus.

3.4.3 Testing av aktivitet til his tag merket CbpD etter DEAE cellulose rensing

For å se om His-CbpD har aktivitet etter rensing med DEAE cellulose ble proteinet sammenlignet med villtype protein. Sammenligningen av de to CbpD proteinene ble gjort etter rens med DEAE cellulose, men før bruk av enten rensing med Äkta Prime™ Plus eller Protino Ni-TED kolonne. Aktiviteten ble testet spektrofotometrisk med DU®800 UV/Vis spektrofotometeret. Oppsettet i kyvetter som ble plassert i spektrofotometeret kan ses i figur 18.

-
- 1** RH14 3 ml
 - 2** RH14 3 ml, 0,75 µg His-CbpD DEAE
–cellulose
 - 3** RH14 3 ml, 0,75 µg villtype CbpD
-

Figur 18. Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til His-CbpD etter rensing med DEAE-cellulose.

3.4.4 Testing av de ulike komponentene i bufferne brukt ved Äkta Prime™ Plus

De ulike komponentene i bufferne brukt ved rensing av His-CbpD ved Äkta Prime™ Plus ble testet for å se om noen av dem har en hemmende effekt på aktiviteten til CbpD proteinet. Denne testen ble utført spektrofotometrisk med DU®800 UV/Vis spektrofotometeret ved å tilsette de ulike bufferkomponentene til celler i figur 19 som har nådd den eksponentielle fasen. Deretter ble det tilsatt CbpD for å se om cellene fortsatte å vokse eller lyserte. For dette forsøket ble det benyttet villtype CbpD. Forsøket ble satt opp i 6 kyvetter som i Figur 19.

-
- 1** RH14 3 ml
 - 2** RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
 - 3** RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 250 mM imidazol
 - 4** RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 500 mM NaCl
 - 5** RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM NiSO₄
 - 6** RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 2 mM NiSO₄
-

Figur 19: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet av CbpD etter tilsetning av de ulike komponentene i buffer brukt ved rensing ved Äkta Prime Plus.

Videre ble det testet om tilsetning av EDTA kunne forhindre at nikkel virket hemmende på aktiviteten til CbpD. Dette ble gjort ved å først blande CbpD med nikkel for deretter å tilsette EDTA for så å teste aktiviteten spektrofotometrisk med DU®800 UV/Vis spektrofotometeret.

For å se hvor mye nikkel som skal til for å hemme aktiviteten av CbpD ble det satt opp

en fortynningsrekke av nikkelløsning som ble fordelt i de ulike kyvettene før det ble tilsatt CbpD og deretter RH14 celler som vist i Figur 20.

-
- 1 RH14 3 ml
 - 2 RH14 3 ml, 0,75 μg CbpD
 - 3 RH14 3 ml, 0,75 μg CbpD, 0,5 mM
NiSO₄
 - 4 RH14 3 ml, 0,75 μg CbpD, 0,05 mM
NiSO₄
 - 5 RH14 3 ml, 0,75 μg CbpD, 0,01 mM
NiSO₄

Figur 20: Fortynningsrekke av Ni²⁺ fordelt i de ulike kyvettene spektrofotometrisk analyse for å se hvor stor mengde Ni²⁺ som skal til for å hemme aktiviteten til CbpD.

3.4.5 Testing av aktivitet til CbpD ved tilsetning av ulike toverdige metallioner

For å se hvilke toverdige metaller som ikke hemmer aktiviteten til CbpD og som derfor kunne bli brukt til å rense den histidi-taggede versjonen av CbpD, ble CbpD utsatt for ulike metallioner og dets aktivitet ble analysert som beskrevet ovenfor. Metallionene som ble testet var Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ og Mn²⁺. De divalente kationene ble blandet med CbpD før RH14 celler med OD₅₅₀ ca 0,2 ble tilsatt. Forsøket ble satt opp i to forsøk som vist i Figur 21.

1 RH14 3 ml	1 RH14 3 ml
2 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD	2 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
3 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM NiSO ₄	3 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM ZnCl ₂
4 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM CuCl ₂	4 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM CaCl ₂
5 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM CoCl ₂	5 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM MgCl ₂
	6 RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 0,5 mM MnCl ₂

Figur 21: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet til CbpD etter tilsetning av ulike toverdige metaller.

3.4.6 Testing av aktivitet His-CbpD etter rensing med Äkta Prime™ Plus zinkkolonne

For å se om proteinet har beholdt sin aktivitet etter å ha blitt rensset med en zinkkolonne på Äkta Prime™ Plus ble aktiviteten til proteinet testet spektrofotomerisk med DU@800 UV/Vis spektrofotometeret som beskrevet i 3.4.4. For å kunne bedømme aktiviteten til His-CbpD sammenlignet med villtype CbpD. Forsøket ble satt opp i tre kyvetter som i figur 22.

1	RH14 3 ml
2	RH14 3 ml, 0,75 µg His-CbpD rensset med zinkkolonne
3	RH14 3 ml, 0,75 µg villtype CbpD

Figur 22: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktivitet av His-CbpD etter rensing med zinkkolonne ved Äkta Prime Plus.

3.5 Ulike tester utført på aktiviteten til CbpD

For og ytterligere karakteriese enzymaktiviteten til CbpD ble det først forsøkt å finne en egnet måte å lagre enzymet uten å miste enzymaktivitet. Videre ble det forsøkt å endre

betingelser for CbpD-mediert lysis som for eksempel senke nivå av divalente kationer, senke mengde H_2O_2 (pneumococcer produserer H_2O_2) samt å teste dets aktivitet mot ulike mutanter

3.5.1 Lagringsbetingelser for CbpD

For å unngå å måtte rense nytt CbpD for hvert nye eksperiment som skulle utføres ble det testet ulike lagringsmetoder for å bevare enzymaktiviteten til CbpD. Det ble benyttet ulike lagringstemperaturer og ulike tilsetningsstoffer. Enzymet ble lagret ved de ulike lagringsmetodene over natten før aktiviteten ble testet mot RH14 celler. De ulike lagringsmetodene og oppsett i kyvetter er oppgitt i figur 23.

1	RH14 3 ml
2	RH14 3 ml, 0,75 μ g CbpD, 4 °C
3	RH14 3 ml, 0,75 μ g CbpD, -80 °C
4	RH14 3 ml, 0,75 μ g CbpD, 30% glycerol, -20 °C
5	RH14 3 ml, 0,75 μ g CbpD, 1 mg/ml BSA, -20 °C
6	RH14 3 ml, 0,75 μ g CbpD, 30% glycerol, 1 mg/ml BSA, -20 °C

Figur 23: Ulike lagringsmetoder av CbpD proteinet for spektrofotometrisk analyse for å finne en måte å bevare aktiviteten til proteinet.

3.5.2 Testing av EDTA sin påvirkning på aktiviteten til CbpD

Det ble gjort tester for å se om EDTA har noen påvirkning på aktiviteten til CbpD. Dette ble gjort ved å blande henholdsvis 0,25 og 0,75 μ g CbpD i to separate forsøk med varierende konsentrasjoner av EDTA. Deretter ble enzymaktiviteten til CbpD analysert på RH14 celler. Begge forsøkene ble satt opp i fem kyvetter som i Figur 24.

1	RH14 3 ml	1	RH14 3 ml
2	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD	2	RH14 3 ml, 0,25 µg CbpD
3	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 1 mM EDTA	3	RH14 3 ml, 0,25 µg CbpD, 1 mM EDTA
4	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 2 mM EDTA	4	RH14 3 ml, 0,25 µg CbpD, 2 mM EDTA
5	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD, 5 mM EDTA	5	RH14 3 ml, 0,25 µg CbpD, 5 mM EDTA

Figur 24: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av påvirkningen av å tilsette ulike mengder EDTA til henholdsvis 0,75 og 0,25 µg CbpD.

3.5.3 Testing av aktiviteten til CbpD på katalasebehandlet cellekultur

For å se om katalase kan øke aktiviteten til CbpD ble katalase tilsatt til en RH14 cellekur og innkubert i 2 min ved 37 °C før cellene ble utsatt for spektrofotometrisk testing. Det ble brukt ulike mengder med katalase i de tre kyvettene som oppgitt i figur 25.

1	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
2	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD 3 µl katalase
3	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD 0,5 µl katalase

Figur 25: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD etter tilsetting av ulike mengder katalase.

3.5.4 Testing av aktiviteten til CbpD på celler i eksponentiellfase og celler i stasjonærfase

For å bedre forstå hvordan CbpD utøver sin aktivitet ble det satt opp et forsøk der celler i den stasjonære og den eksponentielle fasen ble sammenlignet med hensyn til CbpD-sensitivitet. For å utføre forsøket ble følgende metode fulgt (se Figur 26):

1. RH14 celler ble dyrket over natten
2. RH14 cellene ble sentrifugert og supernatanten etter sentrifugering ble tatt vare på.

3. Det ble tilsatt RH14 celler til en OD_{550} på 0,05 i nytt C-medium og disse ble vokst opp til OD_{550} ca 0,2. RH14 celler ble også tilsatt til det brukte C-mediet til en OD_{550} på ca 0,2.
4. Deretter ble det tilsatt CbpD og aktiviteten til proteinet ble testet som beskrevet i 3.4.4.

-
- 1 RH14 3 ml, brukt medium
 - 2 RH14 3 ml, brukt medium, 0,75 μ g CbpD
 - 3 RH14 3 ml, nytt medium
 - 4 RH14 3 ml, nytt medium, 0,75 μ g CbpD

Figur 26:Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på celler i stasjonær og eksponentiellfasen.

3.5.5 Testing av aktiviteten av CbpD på celler som uttrykker immunitetsproteinene ComM

For å vise at celler av stammene RH14 og SPH106 uttrykker ComM er immune mot CbpD ble disse induisert med CSP-1. For å utføre forsøket ble følgende metode fulgt (se Figur 27):

1. RH14 og SPH106 cellene ble dyrket fra OD_{550} 0,05 til OD_{550} ca 0,18.
2. Cellekulturen ble delt i to, der den ene delen forble uendret mens den andre ble tilsatt 250ng/ml CSP-1.
3. Begge cellekulturene ble dyrket videre i 8 min ved 37 °C.
4. Cellekulturene ble tilsatt CbpD

1	RH14 3 ml	1	SPH106 3 ml
2	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD	2	SPH106 3 ml, 0,75 µg CbpD
3	RH14 3 ml, 250 ng/ml CSP	3	SPH106 3 ml, 250 ng/ml CSP
4	RH14 3 ml, 250 ng/ml CSP, 0,75 µg CbpD	4	SPH106 3 ml, 250 ng/ml CSP, 0,75 µg CbpD

Figur 27: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH14 og SPH106 celler induisert med CSP.

I tillegg ble det gjort en sammenligning av induisert og ikke induisert RH222 og SPH106 etter samme metode som over. Kyvettene ble oppsatt som vist i figur 28.

1	RH222 3 ml, 0,75 µg CbpD
2	RH222 3 ml, 250 ng/ml CSP, 0,75 µg CbpD
3	SPH106 3 ml, 0,75 µg CbpD
4	SPH106 3ml, 250 ng/ml CSP, 0,75 µg CbpD

Figur 28: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH222 og SPH106 celler som er induisert med CSP.

Det ble også utført test av de to stammene RH609 og RH612, som uttrykker ulike mengder ComM, for CbpD-sensitivitet. Test av RH14 ble utført som referansepunkt for aktivitet. RH609 har en sterk promoter før *comM*, mens RH612 har svak promoter før *comM*. De ulike stammene ble dyrket opp fra en OD₅₅₀ på 0,05 til 0,2 for deretter å bli analysert spektrofotometrisk med DU[®]800 UV/Vis spektrofotometeret. Kyvettene for analysen ble satt opp som vist i figur 29.

1	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
2	RH609 3 ml, 0,75 µg CbpD
3	RH612 3 ml, 0,75 µg CbpD

Figur 29: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH609 og RH612 celler som har ulik styrke på promoteren for *comM*.

3.5.6 Testing av aktiviteten til CbpD på celledammene RH1, RH14, RH15 og RH16

CbpD-mediert lysis av RH1, RH14, RH15 og RH16 ble sammenlignet. RH1 er villtypestamme, RH14 er en LytA mutant, RH15 en LytC mutant, mens RH16 er en LytA, LytC mutant.

De ulike stammene ble dyrket opp fra en OD₅₅₀ på 0,05 til 0,2 for deretter å bli analysert spektrofotometrisk med DU@800 UV/Vis spektrofotometeret. Kyvettene for analysen ble satt opp som vist i Figur 30.

1	RH1 3 ml
2	RH13 ml, 0,75 µg CbpD
3	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
4	RH15 3 ml, 0,75 µg CbpD
5	RH16 3 ml, 0,75 µg CbpD

Figur 30: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH1, RH14, RH15 og RH16 celler som er ulike LytA/LytC mutanter.

3.5.7 Testing av aktiviteten til CbpD på celledammene RH238, RH242 og RH292

Testen ble utført på celledammer som har ulike mutasjoner som har deletert gener involvert i celleveggstrukturen i pneumokokker, for å se på hvilken innvirkning dette vil ha på aktiviteten til CbpD. Celledammen RH242 har en mutasjon som gjør at det finnes flere kolinresiduer på tekoinsyrene i celleveggen enn normalt. Celledammen RH238 mangler interpeptidbroer, og celledammen RH292 mangler O-acetylering.

De ulike stammene ble dyrket opp fra en OD₅₅₀ på 0,05 til 0,2 for deretter å bli analysert spektrofotometrisk med DU@800 UV/Vis spektrofotometeret. Kyvettene for analysen ble satt opp som vist i Figur 31.

1	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
2	RH238 3 ml, 0,75 µg CbpD
3	RH242 3 ml, 0,75 µg CbpD
4	RH292 3 ml, 0,75 µg CbpD

Figur 31: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH238, RH242 og RH292 celler som har ulike mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen.

3.5.8 Testing av aktiviteten til CbpD på en *ΔciaR* mutant

Testet aktiviteten til CbpD på *ΔciaR* mutant, der *ciaR* er fjernet fra genomet. *ciaR* har med innsetting av tekoinsyrer i celleveggen.

Cellestammene ble dyrket opp fra en OD₅₅₀ på 0,05 til 0,2 for deretter å bli analysert spektrofotometrisk med DU®800 UV/Vis spektrofotometeret. Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse er vist i Figur 32.

1	RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD
2	<i>ΔciaR</i> 3 ml, 0,75 µg CbpD

Figur 32: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på *ΔciaR* som har en mutasjon som påvirker oppbyggingen av celleveggen.

3.5.9 Testing av aktiviteten til CbpD på cellestammene RH281 og SPH102

Aktiviteten til CbpD ble testet med de to cellestammene RH281 og SPH102, som begge har mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen. RH281 har deletert genet *pgdA* som koder for en N-deacetylase. SPH102 er en *ΔlicD1* mutant. *licD1* koder for et enzym som kobler kolinenheter til tekoinsyrene i celleveggen. Cellestammen RH14 ble brukt som referanseverdi for aktiviteten til CbpD.

Cellestammene ble dyrket opp fra en OD₅₅₀ på 0,05 til 0,2 for deretter å bli analysert spektrofotometrisk med DU®800 UV/Vis spektrofotometeret. Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse er vist i Figur 33.

-
- | | |
|----------|---------------------------|
| 1 | RH14 3 ml, 0,75 µg CbpD |
| 2 | RH281 3 ml, 0,75 µg CbpD |
| 3 | SPH102 3 ml, 0,75 µg CbpD |
-

Figur 33: Oppsettet i kyvettene for spektrofotometrisk analyse av aktiviteten til CbpD på RH281 og SPH 102 som har mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen.

4. Resultater

4.1 Rensing av villtype CbpD

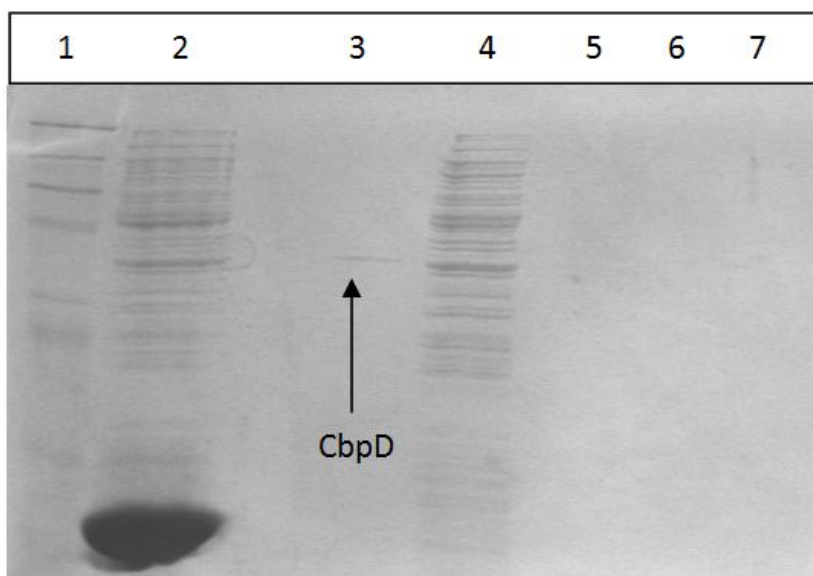
For å bli naturlig kompetent inducerer *S. pneumoniae* uttrykk av ca 90 gener involvert i blant annet lysering av mål-celler, DNA-opptak -og rekombinasjon (Eldholm *et al* 2010)). Et av nøkkelgenene er *cbpD* som koder for en murin hydrolase. Dette enzymet er involvert i lysering av målceller og er derfor en viktig brikke for å forstå mekanismen bak naturlig kompetanse og horisontal genoverføring i *S. pneumoniae*. I dette arbeidet ønsket vi å utvide vår forståelse av CbpD med hensyn på dets biologiske aktivitet og funksjon. For å studere proteiners funksjon og aktivitet er det i de fleste tilfeller fordelaktig å studere proteinet i rensset form. Vårt første mål var derfor å oppnå et rent produkt av CbpD. Siden CbpD har et kolinbindende domene kunne dette bli utnyttet ved proteinrensing i form av affinitetskromatografi.

4.1.1 DEAE cellulose

For å oppnå høyt utbytte av CbpD ble enzymet overuttrykt i *L. lactis* NZ9000 ved hjelp av et induserbart ekspresjonssystem. Denne ekspresjonsverten ble valgt siden tidligere forsøk på å overuttrykke CbpD i *E. coli* resulterte i at tilnærmet all CbpD dannet inklusjonslegemer i tillegg til at den lille fraksjonen med løslig CbpD raskt ble degradert av proteolytiske enzymer i *E. coli*. I NZ9000 ble en større fraksjon av CbpD uttrykt i løselig form og enzymet var mer stabilt. Ved første rensing ble det tatt ut prøver både før og etter at overuttrykking av CbpD ble indusert med nisin. I tillegg ble prøver tatt ut fra alle vasketrinnene under rensing med DEAE cellulose. Det ble tatt ut 1 ml cellekultur før induksjon, sentrifugert og tilsatt 50µl 10mM TrisHCl 100mM NaCl pH 7,4 og 2,5µl lysozym for å lysere cellene. Prøven fra etter induksjon ble tatt ut fra cellelysate etter at cellene var lysert ved hjelp av fastprep. Etter SDS-PAGE ble gelene farget med Coomassie blue.

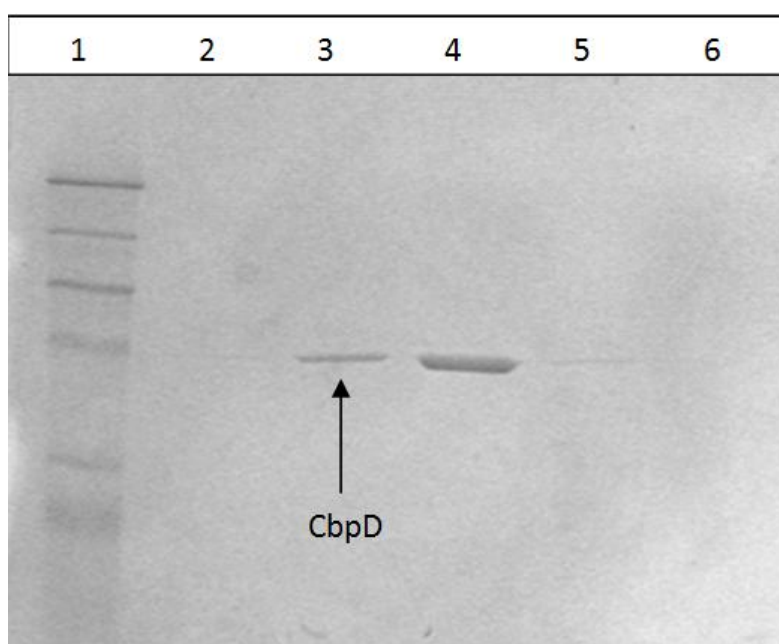
I

Figur 34 kan et bånd med størrelse på ca 45 kDa ses (indikert med pil) for prøven etter induksjon (brønn 3). Denne størrelsen korrelerer godt med den teoretiske størrelsen til CbpD (45,9 kDa). Prøvene fra vasketrinnene (brønn 5-7 i figur 34) viser at majoriteten av uspesifikke proteiner vaskes bort i vasketrinn nr. 1 (brønn 4).



Figur 34: De første trinnene for rensing av CbpD ved DEAE cellulose presentert ved en SDS page gel etter farging med Coomassie Blue. Brønn 1 1Kb stige, brønn 2 før induksjon, brønn 3 etter induksjon, brønn 4-7 vasketrinn 1-4

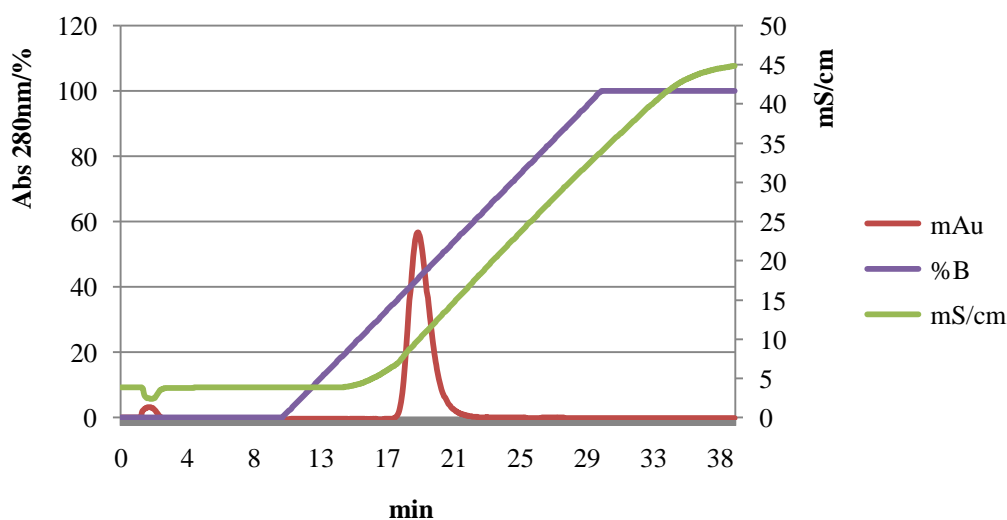
SDS-Page gelen som er presentert i Figur 35 viser utbytte av CbpD etter de 5 elueringstrinnene fra DEAE cellulose rensing. Selv om produktet ser veldig rent ut på gelbildet kunne man skimte kontamineringer fra andre proteiner samt et degraderingsprodukt (tidligere identifisert på laboratoriet ved hjelp av MALDI-TOF-MS) av CbpD ved å studere gelen med øyesyn. Det ble derfor testet om et ekstra rensetrinn som f. eks. ionebytte-kromatografi ville fjerne disse kontamineringene fra det DEAE cellulose rensede CbpD.



Figur 35: Eluering av CbpD i 5 trinn ved DEAE cellulose. Gelen fra SDS-page er farget med Coomassie blue. Brønn 1: BR stige, brønn 2-6: eluering 1-5.

4.1.2 Ionebyttekromatografi

Ionebyttekromatografi ble utført ved hjelp av Äkta Prime Plus og en sepharose CM FF kolonne, kolonne er beskrevet i delkapittel 3.1.2. Rensingen ble utført ved å bruke CbpD eluatet fra DEAE cellulose. Eluering fra brønn 3 og 4 fra figur 35 ble brukt. For å eluere CbpD av ionebytterkolonnen ble det brukt en saltgradient fra 0 til 500 mM NaCl. Basert på Figur 36 kan en klar topp ses etter ca 19 min. Det ser ut til at proteintoppen kommer ut når konsentrasjonen av elueringsbufferen er på ca 40%.

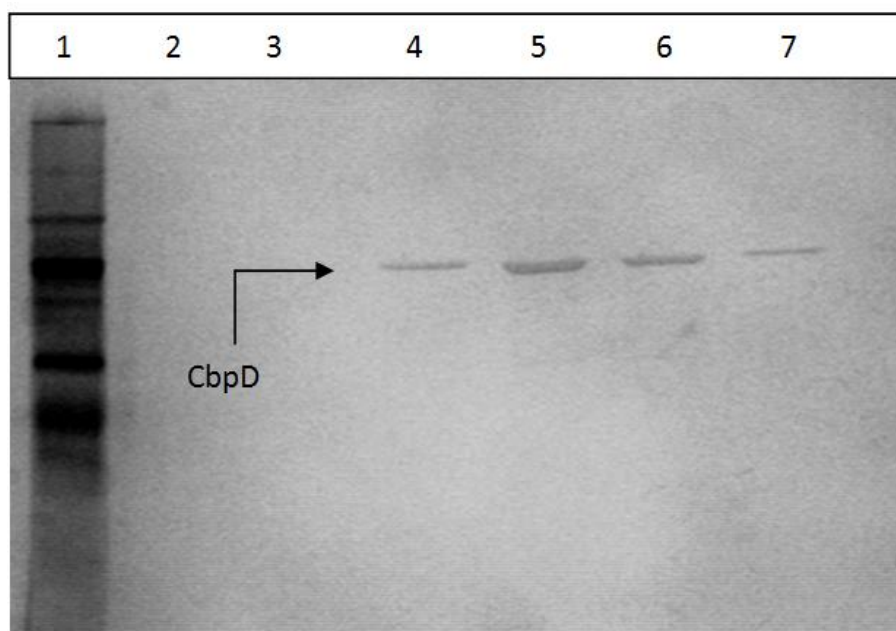


Figur 36: De ulike kurvene viser de ulike komponentene i rensemetoden. For de ulike kurvene har y-aksen ulike benevninger. Ved den røde kurven som viser proteinutbyttet viser y-aksen verdien i absorbans ved 280nm. For den lilla kurven som viser konsentrasjonen av elueringsbufferen er benevningen for y-aksen %. For den grønne kurven som viser konduktiviteten til løsningen er benevningen mS/cm.

For å se om produktet ble renere etter ionebyttekromatografi ble de ulike fraksjonene, hentet rundt toppen sett i figur 36, analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Gelen ble deretter sølvfarget da denne metoden er mer sensitiv enn farging med Coomassie blue. Gelen kan man se i Figur 37. Med det blotte øye kunne man se at produktet fortsatt ikke er helt rent, selv om dette var vanskelig å fange i Figur 37. Ett ekstra proteinbånd med størrelse på ca 30 kDa var tilstede også etter ionebyttekromatografi. Tidligere analyser gjort på vårt laboratoriet har vist at dette proteinet er et degraderingsprodukt av CbpD.

Siden prøven fortsatt inneholdt degraderingsprodukt etter ionebyttekromatografi, måtte proteinet renses videre for å oppnå ønsket renhet. Vi valgte å ta i bruk gelfiltrering siden

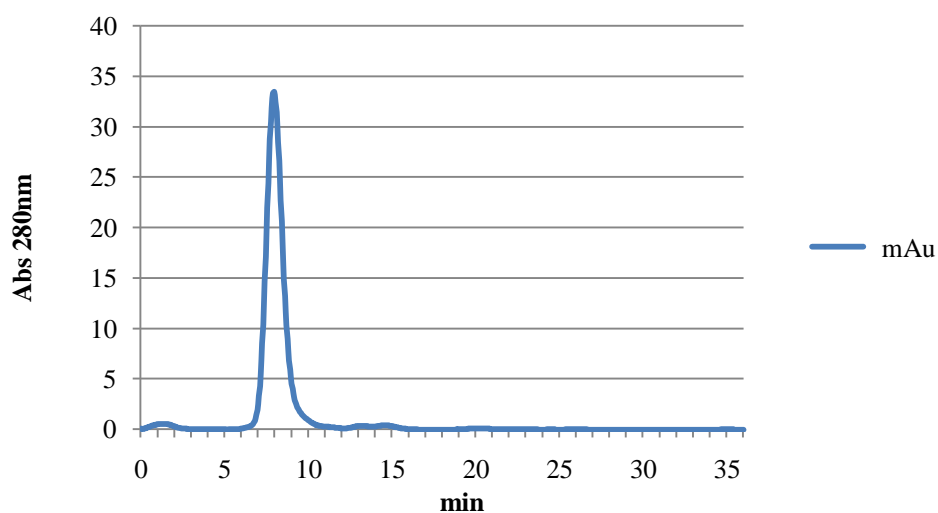
denne metoden separerer på grunnlag av størrelsen til proteiner og det var derfor en mulighet for at fullengde CbpD kunne skilles fra degraderingsproduktet da disse er av ulik størrelse.



Figur 37: Sølvfarget protein gel etter rensing av CbpD ved hjelp av ionebyttekromatografi. Elueringsfraksjonene 7-12 (brønn 2-7) fra ionebyttekromatografien ble analysert vha SDS-PAGE. Proteinstørrelsesmarkør (BR stige) er representert i brønn nr. 1 stige.

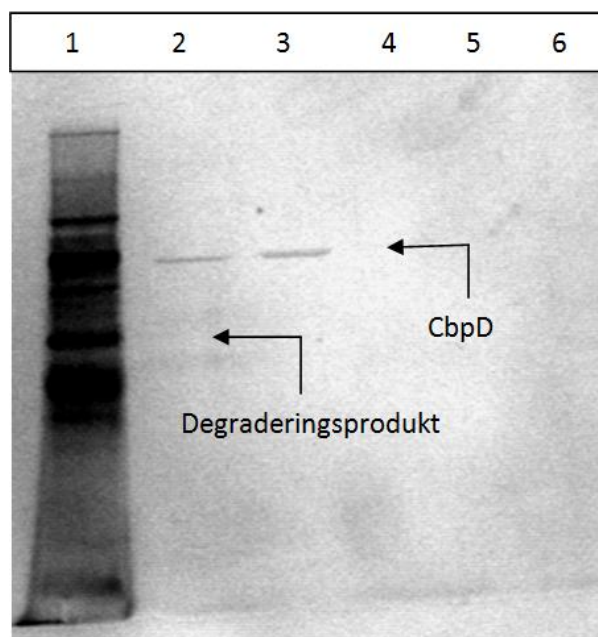
4.1.3 Gelfiltrering

Siden CbpD ikke ble helt rent (inneholdt et degraderingsprodukt) etter ionebyttekromatografien ble det lagt til et siste rensetrinn, gelfiltrering. Gelfiltrering ble også utført ved hjelp av Äkta Prime Plus. Resultatet fra gelfiltrering av CbpD kan ses i Figur 38. Etter ca 8 min blir proteinet eluert og dette vises ved at absorbansen øker. Absorbansen øker på grunn av visse aminosyrer (Trp, Tyr og Phe) i proteinet vil absorbere UV-lys ved 280 nm.



Figur 38: Proteinutbyttet etter gelfiltreringen. Den blå linjen viser absorbansen til løsningen som kommer gjennom gelfiltreringskolonnen. Toppen etter ca. 8 min viser proteinutbytte.

For å bedre kunne se på proteinutbyttet og for å se på renheten til produktet ble produktet separert ved hjelp av SDS-PAGE gel og proteinene farget med sølvfarging. Vanskelig å se ut i fra Figur 39, men degraderingsproduktet var fortsatt tilstede sammen med fullengde CbpD etter gelfiltrering. Siden degraderingsproduktet ikke er synlig i figuren, er omtrentelig plasseringen indikert i figuren med pil.



Figur 39: Bilde av gel fra proteinprøver etter gelfiltrering og sølvfarging av gelen. Brønn 1: 1 BR stige, brønn 2-6: eluering 1-5. CbpD og degraderingsprodukt indikert med piler.

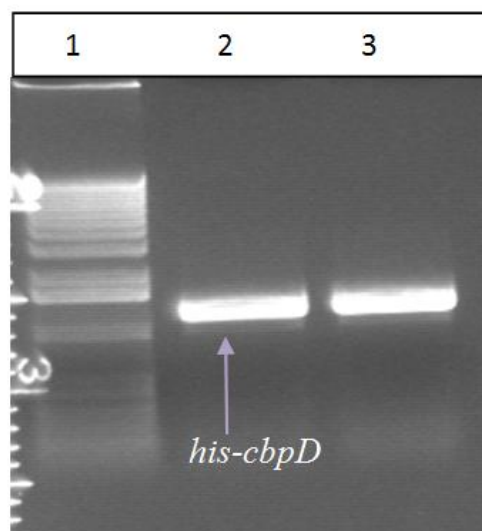
Siden utbytte av CbpD reduseres for hvert rensetrinn, og det fortsatt er degraderingsprodukt til stedet etter tre ulike rensemetoder, ble det bestemt å finne en helt annen metode for å prøve å rense proteinet. Metoden som ble valgt for videre rensing, innebar å feste en polyhistidin-hale til proteinet. Tanken var å benytte dette som et rensetrinn etter DEAE cellulose trinnet for å fjerne degraderingsproduktet av CbpD. Siden tidligere studier på vårt laboratorie har vist at dette degraderingsproduktet mangler det N-terminale CHAP domenet ville det også mangle en eventuell N-terminal His-tag. Som følge ville det degraderte CbpD ikke kunne binde til en Ni^{2+} kolonne, mens fullengde His-CbpD vill binde.

4.2 Tillaging av celler med *his-cbpD*

For å kunne ta i bruk andre rensemetoder ble polyhistidin festet N-terminalt til CbpD, og det ble dannet et His-CbpD. Resultatene fra de ulike kloningstrinnene for å komme frem til det ønskede His-CbpD er presentert i delkapitlene 4.2 og 4.3.

4.2.1 Amplifisering av *his-cbpD*

For å amplifisere *his-cbpD* ble det brukt en forward primer der his-tag-kodende sekvens var inkludert. Denne primeren var designet til å binde i *cbpD* genet slik at *his-cbpD* ble amplifisert uten CbpD's signalsekvens. For å sjekke om PCR produkt hadde den riktige lengden ble det analysert i en 1% agarosegel. Resultatet kan ses i Figur 40, der det vises et produkt som har en tilnærmet lengde som det teoretiske produktet på 1467 bp.



Figur 40: Viser PCR produktet fra de to parallelle PCR oppsettene for amplifisering av *his-cbpD*. I bønn 1 ser man stige mens i brønn 2 og 3 ser man PCR produktene man kan se at begge produktene har samme lengde som er nær den teoretiske lengden.

Etter at *his-cbpD* var amplifisert inneholdt prøven flere uønskede stoffer som for eksempel ubrukt dNTP og enzym, som måtte fjernes. For å fjerne disse stoffene ble det først utført PCR rensing av produktet. PCR produkt skulle settes inn i plasmid, og derfor måtte DNA plasmidet renses.

4.2.2 PCR rensing/DNA plasmid rensing

PCR produktet fra Figur 40 ble rensert som beskrevet i delkapittel 3.2.2.1 før produktet ble separert ved hjelp av en 1% agarosegel. På den samme gelen ble rensert plasmid (pNZ8037) fra *E.coli* DH5 α separert, rensemetode er beskrevet i delkapittel 3.2.2.2. Figur 41 viser at etter rensing er PCR produktet beholdt og rensert DNA plasmid ble oppnådd.



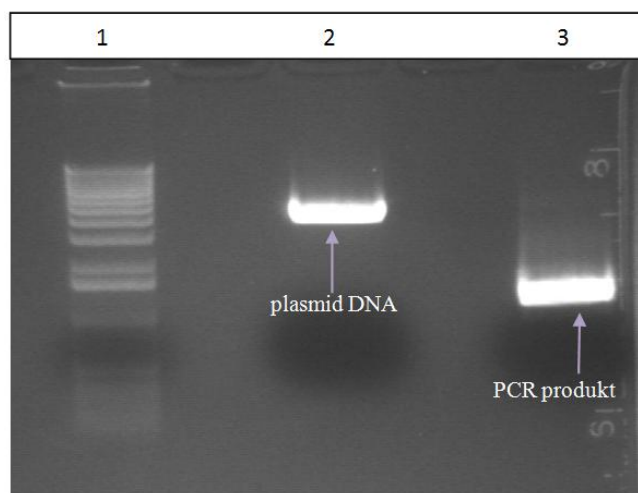
Figur 41: Produktet etter rensing av PCR produktet og plasmid DNA. I bønn 1: 1 Kb stige, brønn 2: plasmid DNA og brønn 3: rensert PCR produkt.

Etter at det var verifisert at PCR produktet var beholdt og rensert DNA plasmid tillaget, var disse klar til å bli kuttet for muliggjøre opptak av PCR produkt i plasmid.

4.2.3 Kutting av pNZ8037 og *his-cbpD*

For å kunne ligere sammen plasmid og PCR produkt ble begge disse kuttet, ved hjelp av spesifikke kutteteser, for å ha frie ender til å ligere sammen. For å sjekke at produktet fortsatt var inntakt og for å estimere mengde DNA ble begge prøvene separert ved hjelp av en

agarosegelelektroforese (Figur 42) Man kan se at man fortsatt har begge produktene inntakt.

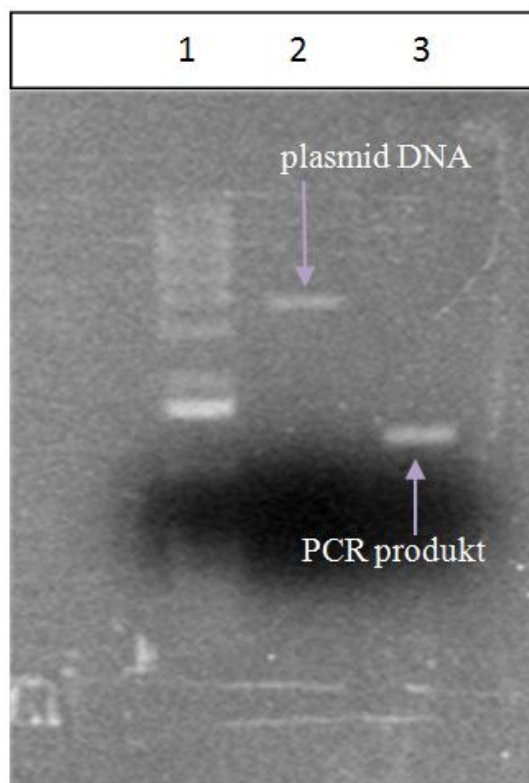


Figur 42: Bilde av gel etter kutting av plasmid og PCR produkt. Bønn 1: stige, brønn 2: plasmid DNA og brønn 3: PCR produkt.

Når frie ender på plasmid DNAet og PCR produktet var oppnådd, måtte disse renses ut fra gelen for å kunne senere ligere dem sammen.

4.2.4 DNA rensing fra gel

Båndene fra Figur 42 ble kuttet og rensset ut fra metode beskrevet i delkapittel 3.2.5 før de igjen ble separert på en 1% agarosegel for å estimere mengde produkt fra gelen (Figur 43). Man kan se at man har tilnærmet lik mengde av plasmid DNA og PCR produkt derfor ble like mengder av disse brukt i liggeringsreaksjonen.



Figur 43: Bilde av gel etter DNA ble trukket ut av gel. Brønn 1: 1 Kb stige, brønn 2: DNA plasmid og brønn 3: PCR produkt

4.3 Ligering og transformasjon

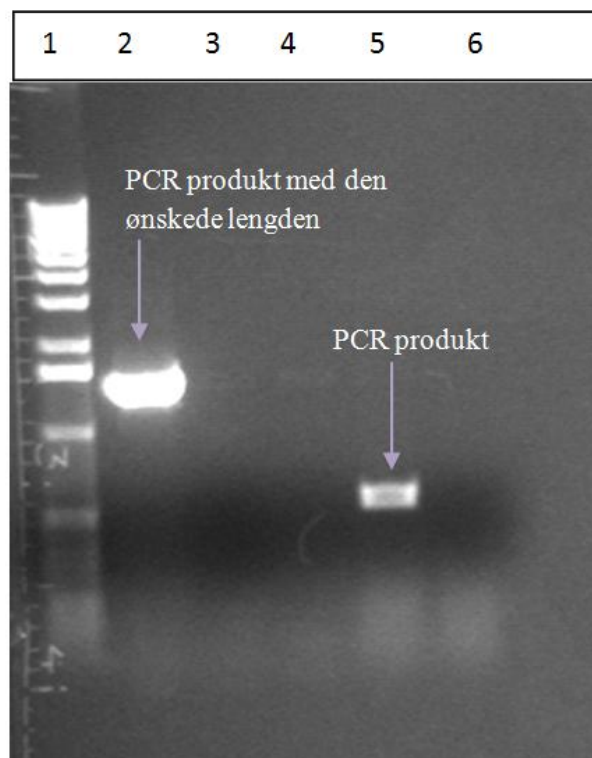
Etter at det var estimert at tilstrekkelig mengde DNA plasmid og PCR produkt var oppnådd skulle disse ligeres sammen slik at pNZ8037 med *his-cbpD* ble dannet.

4.3.1 Ligere plasmid og insert

På petriskålene der blandingen av ligeringsmiks og de kompetente celler ble sådd ut kunne en rekke store og små kolonier av *E.coli* DH5 α observeres. Det ble plukket ut noen av de store og noen av de små koloniene for å se om noen av disse hadde den korrekte lengden på insertet.

4.3.2 Sjekke lengden til insertet

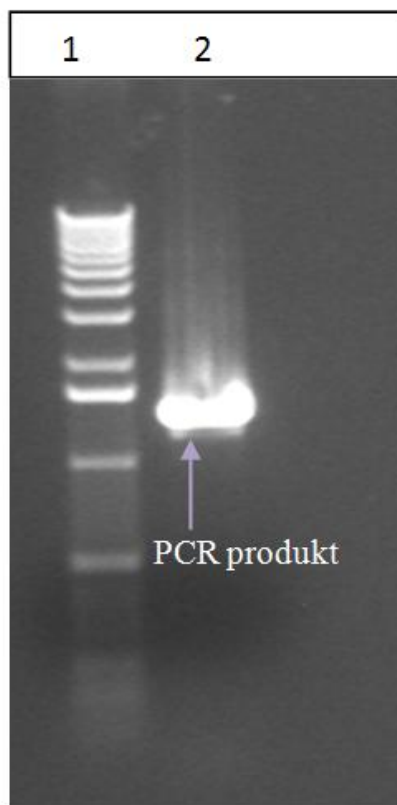
For å verifisere at klonen inneholdt *his-cbpD* ligert inn i pNZ8037 (pNZ8037-*his-CbpD*) ble det utført PCR som beskrevet i delkapittel 3.2.7 på 5 ulike kolonier. Primerene var designet til å binde i pNZ8037 på hver side av insertet. PCR produktene ble deretter sjekket på en 1% agarosegel. Resultatet er presentert i Figur 44 der det kan ses PCR produkt fra bare to av de fem koloniene som ble testet og at bare den fra brønn 2 har den ønskede teoretiske lengden. PCR produktet i brønn 5 hadde for kort lengde sammenlignet med den ønskede teoretiske lengden. Derfor ble videre arbeid utført på PCR produktet fra brønn 2.



Figur 44: Bilde av gel etter PCR med celler som muligens inneholder det riktige insertet i pNZ8037. Brønn 1: 1 Kb stige, brønn 2-6: mulige ønskede insert. Brønn 2 har PCR produkt med den ønskede teoretiske lengden.

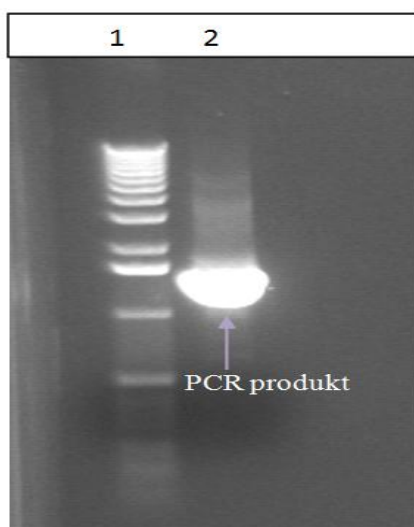
4.3.3 Rensing av plasmid og sekvensering av *his-cbpD*

Plasmid ble rensset fra overnattkultur fra celler som gav PCR produkt i brønn 2 i Figur 44. Rensingen ble utført i henhold til metode i delkapittel 3.2.2.2. For å sjekke at plasmidet inneholdt det riktige genet ble det utført en PCR. Ut fra Figur 45 kan man se at man har fått rensset plasmid fra denne kulturen og at dette plasmidet inneholder et DNA-fragment med den ønskede teoretiske lengden.



Figur 45: Bilde av gel etter PCR på kolonier med innsatt plasmid med *his-cbpD*. Brønn 1 1Kb stige, brønn 2 PCR produkt.

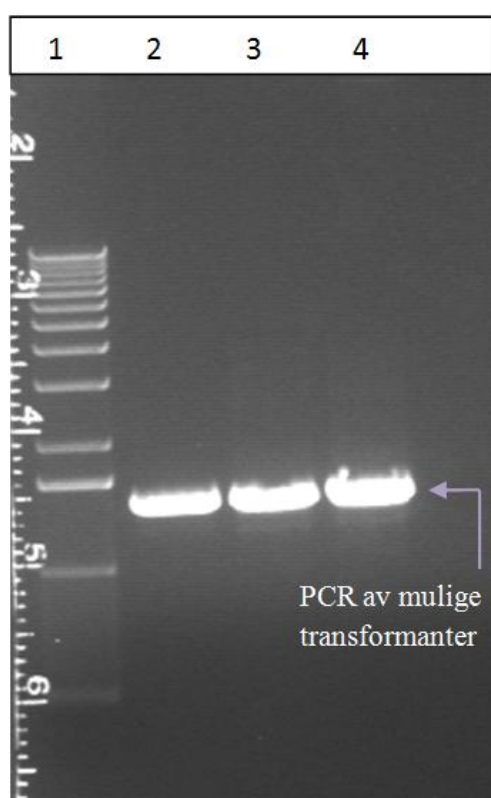
For å verifisere at pNZ8037-*his-cbpD* hadde riktig sekvens ble PCR-produktet beskrevet ovenfor rensset for så å bli sekvensert. Fra sekvenseringen kunne man se at PCR produktet i figur 46 var det ønskede *his-cbpD*. Da man hadde fått det ønskede genet inn i pNZ8037 gjenstår det å få pNZ8037-*his-cbpD* inn i den ønskede stammen, *L.lactis* NZ9000.



Figur 46: Bilde av gel etter rensing av PCR produktet. Brønn 1: stige og brønn 2: PCR produkt.

4.3.4 Transformasjon av *L. lactis* NZ9000

NZ9000 ble transformert som beskrevet i delkapittel 3.2.10. Transformanter ble analysert ved hjelp av PCR for å sjekke at de inneholdt pNZ8037-*his-cbpD* og for at *his-cbpD* ikke hadde rekombinert med genomisk DNA fra NZ9000. Analysen ble utført ved å separere PCR produktene ved hjelp av en 1% agarose gel. Resultatet er presentert i Figur 47, hvor det kan ses at alle de tre utvalgte koloniene inneholdt et riktig pNZ8037-*his-cbpD* plasmid basert på den riktige lengden på PCR-produktet.



Figur 47: Bilde av gel etter testing av transformanter. Brønn 1 1 Kb stige, brønn 2-4 PCR av mulige transformanter.

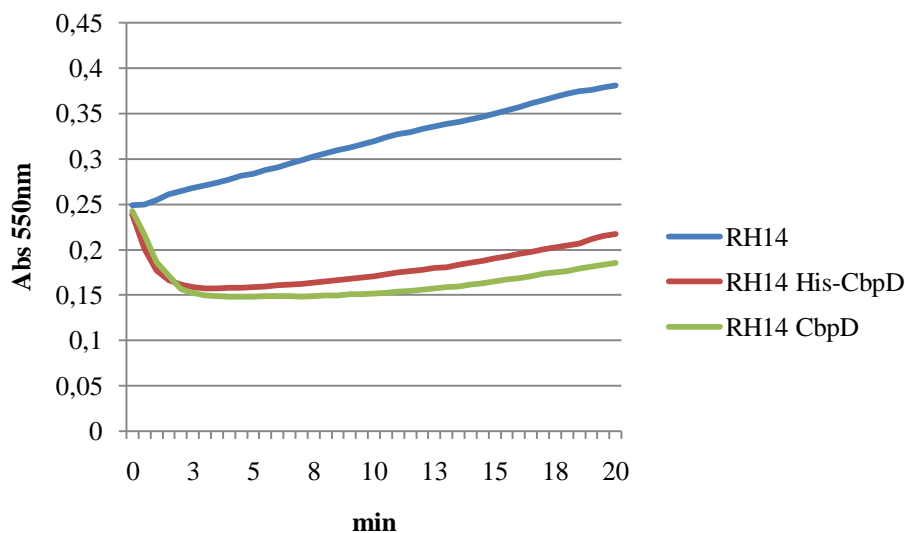
4.4 Rensing av His-CbpD

pNZ8037-*his-cbpD* er nå blitt transformert inn i *L. lactis* NZ9000 og His-CbpD ble overuttrykt og renset som beskrevet i delkapittel 3.1.1.1 og 3.3

4.4.1 Aktivitet av his tag merket CbpD etter DEAE cellulose

For å undersøke His-CbpD folder seg korrekt ble aktiviteten til proteinet testet etter rensing med DEAE cellulose. RH14 uten tilsatt enzym ble brukt som kontroll. RH14 tilsatt CbpD eller His-CbpD viser en reduksjon i OD_{550} , mens RH14 uten tilsatt enzym vokser som normalt. Dette viser at det er CbpD som lyserer cellene. Figur 48 viser at His-CbpD fortsatt

har aktivitet selv om denne er noe lavere enn villtype CbpD. Basert på resultatene kan det regnes ut at His-CbpD har rundt 87% av aktiviteten til villtype CbpD etter DEAE cellulose rensing.

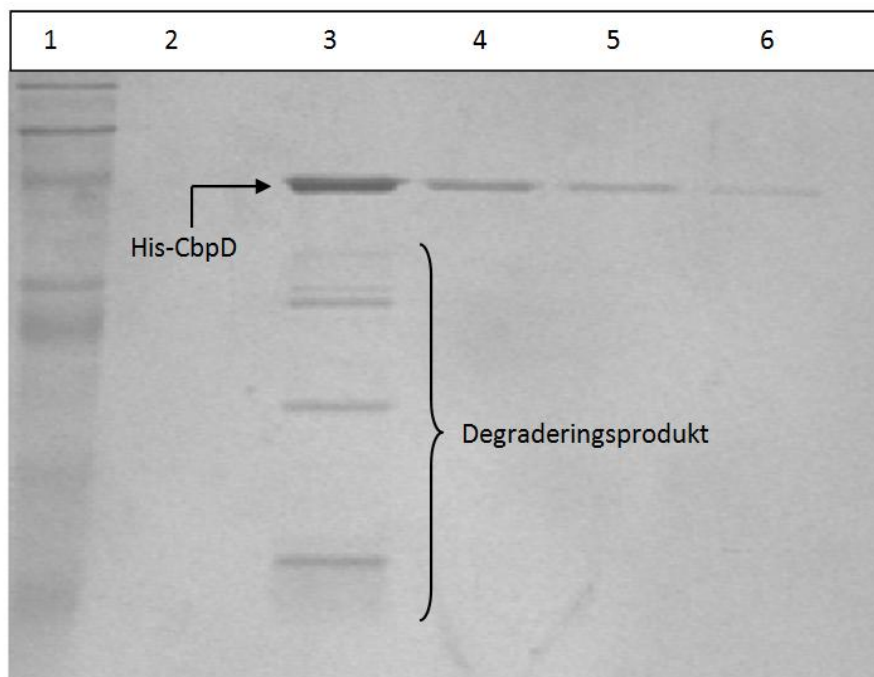


Figur 48: Resultat fra testing av aktivitet til His-CbpD etter rensing med DEAE cellulose. Aktiviteten til His-CbpD er noe lavere enn aktiviteten til villtype CbpD.

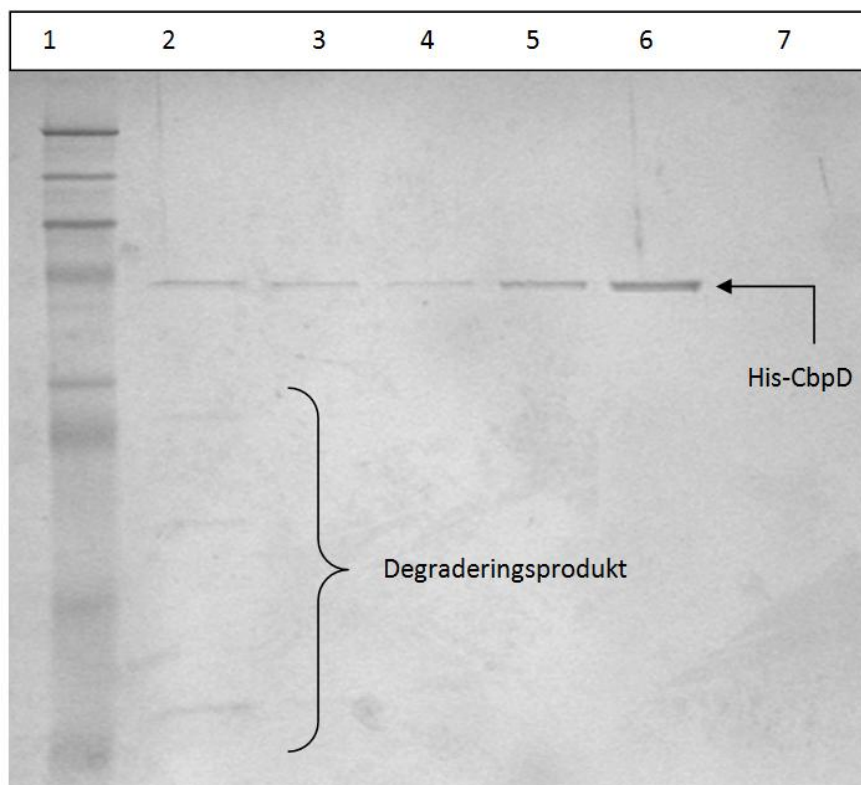
Basert på dette resultatet, som viser at His-CbpD har tilnærmet lik enzymaktivitet som det native CbpD, kunne man gå videre med His-CbpD for både struktur og aktivitetsstudier. Ytterligere rensing av His-CbpD ble utført for å forsøke å fjerne degraderingsproduktet ac CbpD beskrevet tidligere. IMAK av His-CbpD med Protino[®] NiTED eller Äkta Prime Plus.

4.4.2 Protino[®] NiTED

Før rensing med Protino[®] NiTED kolonne ble proteinet rensert ved hjelp av DEAE cellulose. For å se på renheten etter rensing ble proteinprøvene separert ved hjelp av SDS page og deretter farget ved hjelp av Coomossie blue. Ut fra Figur 49 der proteinet er rensert med DEAE cellulose kan man se at det finnes degraderingsprodukt i tillegg til det ønskede proteinbåndet i prøven. Figur 50, som presenterer gel etter rensing med Protino[®] NiTED kolonne, viser at mye av degraderingsproduktene forsvinner ved binding av proteinet til kolonn. I tillegg viser figuren at man mister en del His-CbpD ved binding til kolonnen og ved vask av kolonnen. Selv om det er lite tydelig på i figur 50, er det fortsatt degradeingsprodukt tilstedet i de ulike elueringstrinnene.



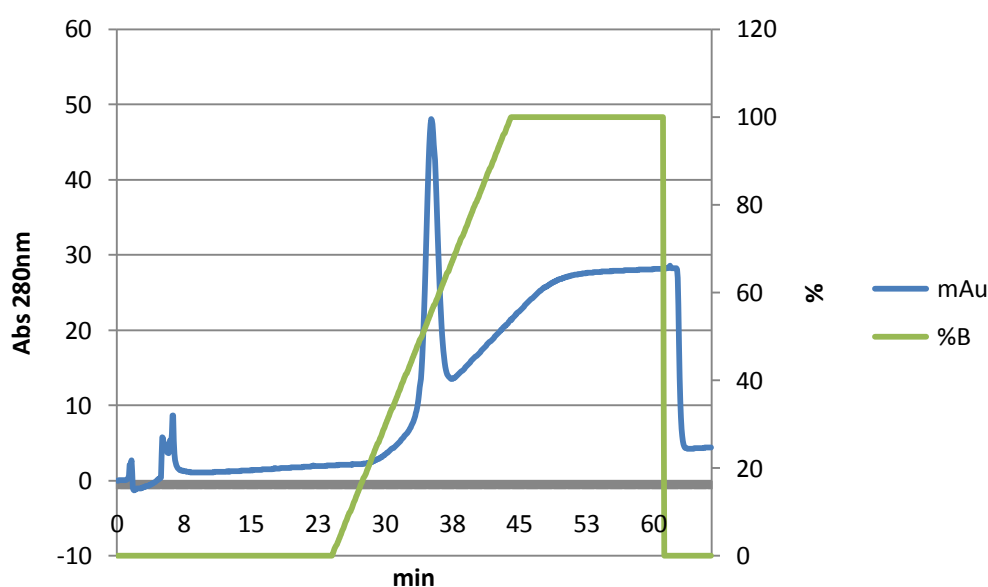
Figur 49: Bilde av gel etter rensing ved DEAE cellulose og farget med Coomassie blue. Brønn 1: BR stige, brønn 2-6: eluering 1-5. His-CbpD og degraderingsprodukt indikert med piler.



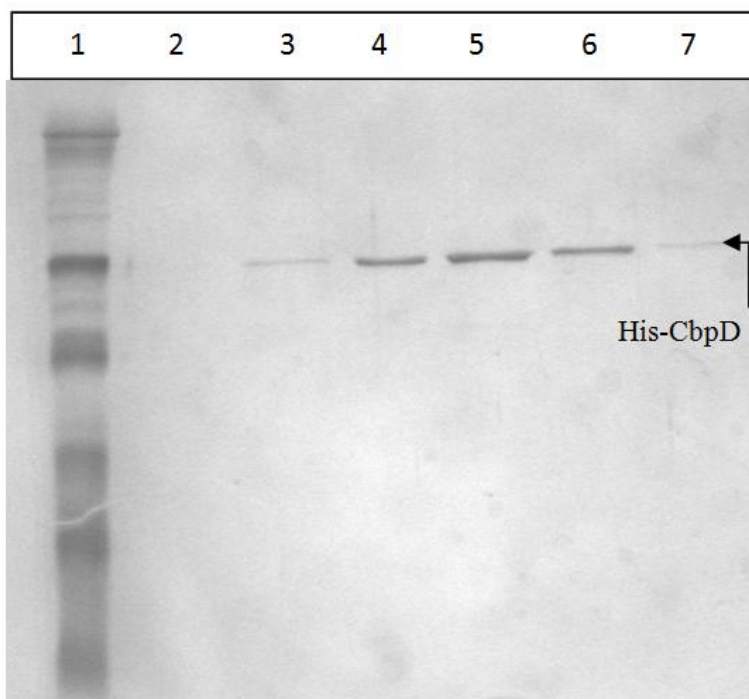
Figur 50: Bilde av gel etter rensing ved Protino® NiTED. Brønn 1: stige, brønn 2: flow through, brønn 3: vask 1, brønn 4: vask 2, brønn 5-7: eluering 1-3. His-CbpD og degraderingsprodukt indikert med piler.

4.4.3 Rensing av His-CbpD ved Äkta Prime Plus

Ved hjelp av Äkta Prime Plus og en Ni^{2+} -kolonne ble His-CbpD rensset etter rensing med DEAE cellulose. Ut fra Figur 51 kan man se at man har fått ut en absorbanstopp som muligens inneholder det ønskede proteinet. Denne absorbanstoppen oppnås ved en elueringsbufferkonsentrasjon på ca 55%. Prøver ble tatt ut fra elueringer rundt denne toppen og separert ved hjelp av SDS page og farget ved hjelp av sølvfarging. Det kunne da bekreftes at denne absorbanstoppen inneholdt det ønskede proteinet vist i Figur 52. Ut i fra figuren ser nå proteinet ut til å være rent (>95% renhet), det vil si ingen degraderingsprodukter.

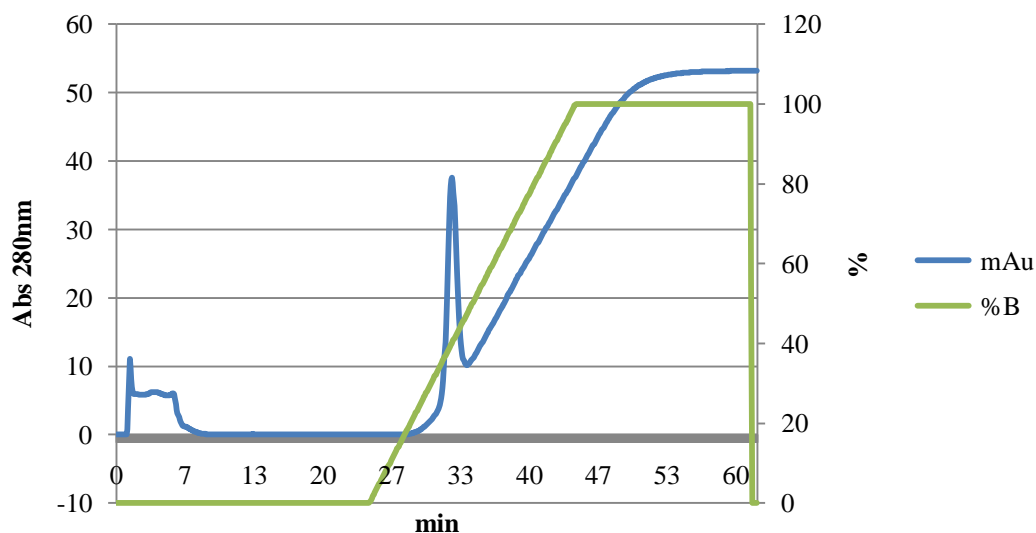


Figur 51: Graf over rensing av his tag merket CbpD etter Äkta prime plus. Blå linje viser absorpsjon, grønn linje viser konsentrasjon av elueringsbuffer. Toppen for absorpsjon viser proteinutbyttet.

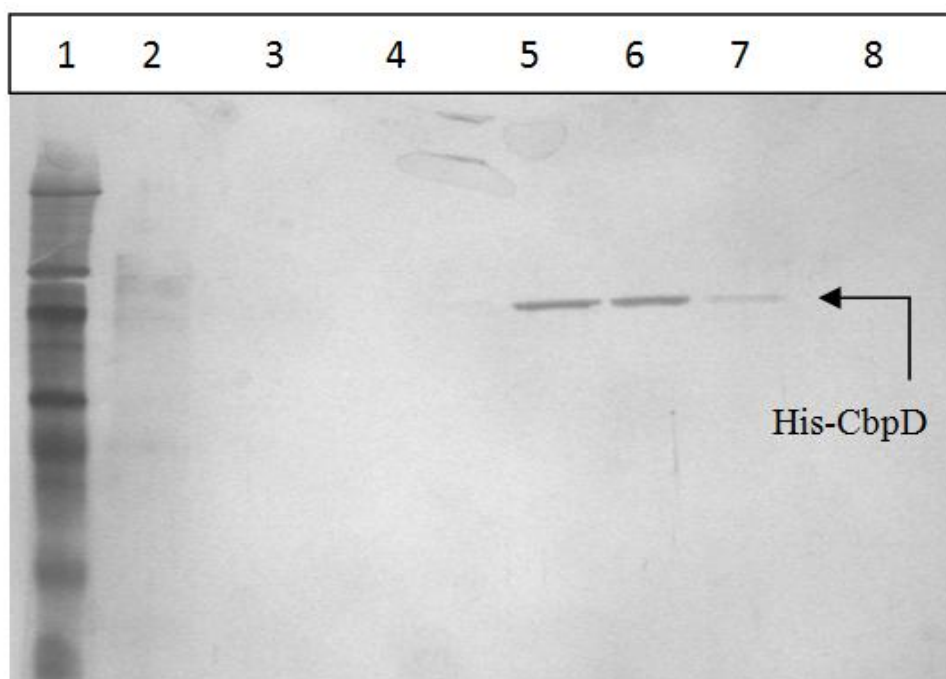


Figur 52: Bilde av gel etter SDS-page og sølvfarging etter rensing av His-CbpD etter Äkta Prime Plus. Brønn 1: BR stige, brønn 2-7: eluering 9-14. His-CbpD er indikert med pil.

Det viste seg at His-CbpD mister aktivitet i nærvær av Ni^{2+} -ioner (se resultater i delkapittel 4.5.3 og 4.5.4), og det ble derfor benyttet en Zn^{2+} -kolonne i stedet for Ni^{2+} -kolonne på Äkta Prime Plus. Dette ble gjort for å få produktet enda renere og for å prøve å beholde aktiviteten av His-CbpD slik at man vet at proteinet er riktig foldet da man skal finne krystallstrukturen. I Figur 53 er resultatet fra da proteinet ble rensert med Äkta prime plus med Zn^{2+} -kolonne. Ut fra resultatene kan man se at His-CbpD elueres av Zn^{2+} -kolonnen ca ved samme imidazolkonsentrasjonen som for Ni^{2+} -kolonnen. Figur 54 viser at eluatet inneholder det ønskede proteinet, og det meste av degraderingsproduktet ser ut til å komme ut i flow through.



Figur 53: Graf over rensing av his tag merket CbpD etter Äkta prime plus med zink kolonne. Blå linje viser absorbans, grønn linje viser konsentrasjon av elueringsbuffer. Toppen for absorbans viser proteinutbyttet for denne rensemetoden.

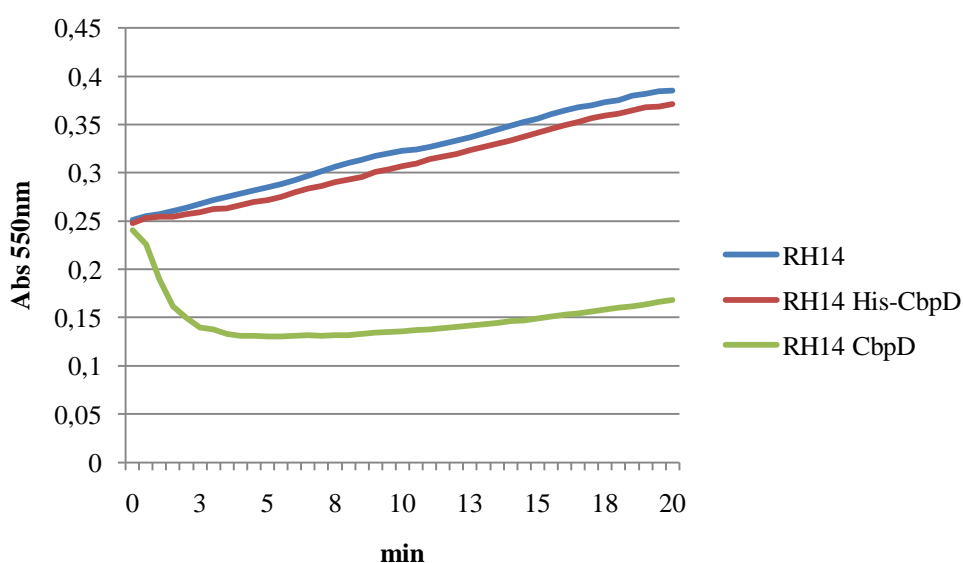


Figur 54: Bilde etter SDS separering og påfølgende sølvfarging av gel etter Äkta Prime Plus med Zn^{2+} -kolonne. Brønn 1: BR stige, brønn 2: binding av proteinet, brønn 3: vask av kolonnen og brønn 4-8: eluering av proteinet. His-CbpD indikert med pil.

4.5 Testing av aktivitet til His-CbpD

4.5.1 His-CbpD rensset med Protino Ni-TED kolonne

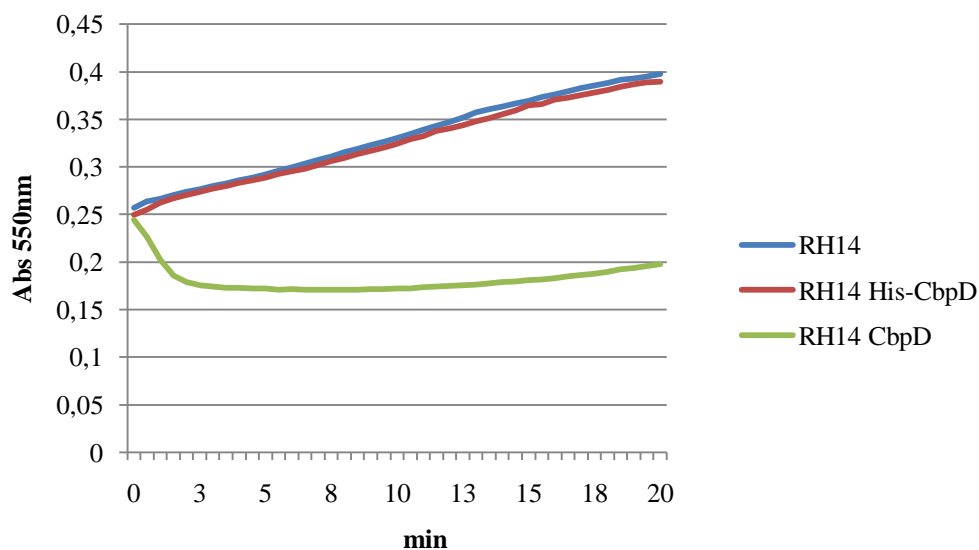
Først ble His-CbpD rensset ved hjelp en protino Ni-TED kolonne for å se om enzymet beholdt sin aktivitet etter denne rensemetoden. Aktiviteten ble testet på RH14 celler for å se om disse vil lysere. Resultatet er presentert i Figur 55 og viser at det er liten eller ingen aktivitet i His-CbpD sammenlignet med villtype CbpD rensset med DEAE cellulose. Dette vises ved at RH14 celler tilsatt His-CbpD fortsetter å vokse, mens RH14 tilsatt villtype CbpD som ikke er rensset ved hjelp av IMAK gir en grad av lysis som vises som reduksjon i absorbansen.



Figur 55: Graf over resultat etter testing av aktivitet av His-CbpD etter rensing med protino Ni-TED kolonne.

4.5.2 Äkta Prime Plus Ni²⁺- kolonne

His-CbpD ble renere etter rensing med Äkta Prime Plus med Ni²⁺-kolonne i forhold til bruk av Protino Ni-TED kolonne, men som vist i figur 56 har His-CbpD har mistet sin aktivitet etter rensing på en Ni²⁺- kolonne. Siden His-CbpD har mistet sin aktivitet er det usikkert om det har beholdt sin struktur og kan derfor ikke brukes til storskala rensing av proteinet for videre krystallstrukturstudier.

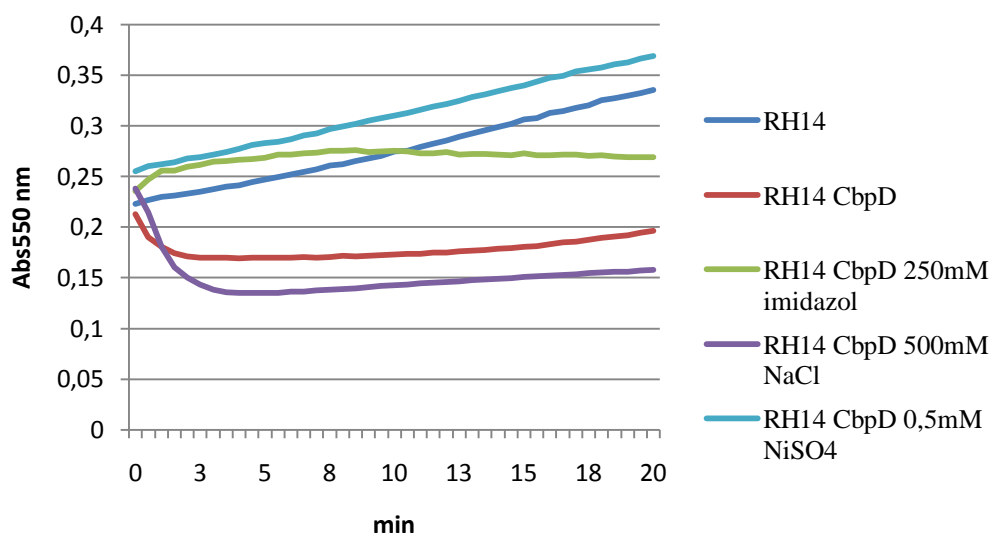


Figur 56: Graf over resultat etter testing av His-CbpD etter rensing med Äkta Prime Plus med Ni²⁺- kolonne.

4.5.3 Testing av de ulike komponentene i buffer brukt ved Äkta Prime Plus

Siden det ble vist at His-CbpD fortsatt har aktiviteten sin etter rensing med DEAE cellulose, men mistet sin aktivitet etter IMAK ble de ulike komponentene i bufferene til Äkta Prime Plus testet for å se hvilken påvirkning de har på aktiviteten til CbpD.

I forsøket ble det brukt villtype CbpD for å se om bufferkomponentene brukt ved Äkta Prime Plus har noen negativ virkning på proteinet. Ut fra Figur 57 kan det se ut som Ni²⁺-ioner og muligens imidazol har en negativ virkning på aktiviteten til CbpD. RH14 utsatt for CbpD og NiSO₄ og RH14 utsatt for CbpD og imidazol fortsetter å vokse, mens absorbansen til RH14 utsatt for CbpD og RH14 utsatt for CbpD og NaCl reduseres. Det kan se ut som om NaCl kan ha en positiv innvirkning på aktiviteten, når NaCl er tilsatt med en konsentrasjon på 500 mM.



Figur 57: Graf over resultat fra testing av påvirkningen til de ulike bufferkomponentene brukt ved Äkta Prime Plus på aktiviteten til CbpD.

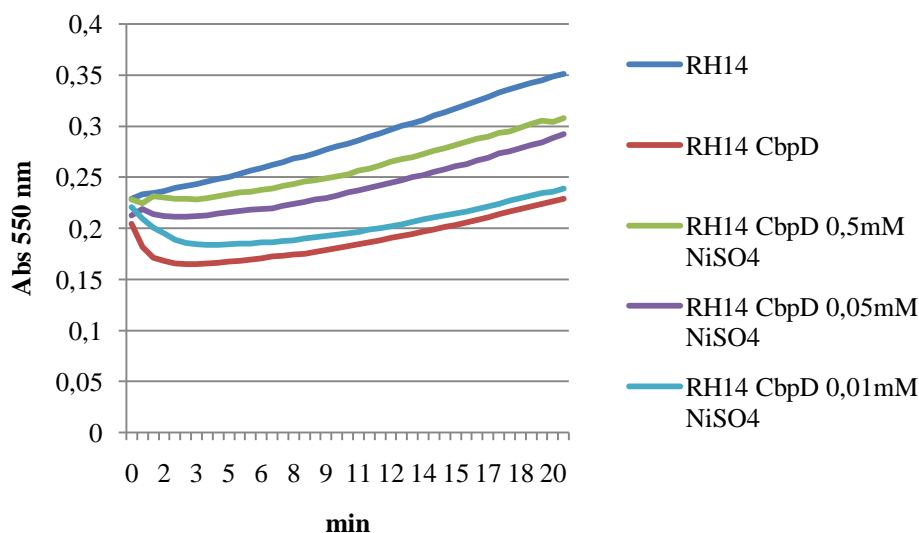
Det var tydelig at Ni^{2+} -ioner hadde en negativ effekt på aktiviteten til CbpD. For å estimere hvor store mengder av Ni^{2+} -ioner som skulle til for å hemme aktiviteten ble CbpD utsatt for ulike konsentrasjoner av Ni^{2+} for så å teste enzymets aktivitet. Ut fra Figur 58 kan man se at man har oppnådd nesten ingen hemming ved å tilsette 0,01mM NiSO_4 . For å finne forholdet mellom CbpD og Ni^{2+} -ioner som skal til for å hemme aktiviteten ble konsentrasjonen av CbpD først funnet basert på A280 og CbpDs ekstinsjonskoeffesient (139580 M/cm). Basert på disse resultatene ble det ut fra en omregningsfaktor funnet at 3ml RH14 celler er tilsatt $2,44 \times 10^{-11}$ mol CbpD. Mengde Ni^{2+} -ioner i 3 ml RH14 celler er ut fra beregninger 3×10^{-8} mol, som gir et forhold på ca 1:1200 mellom CbpD og Ni^{2+} -ioner.

$$0,01 \text{ mM } \text{Ni}^{2+} = 0,01 * 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ni}^{2+}$$

$$3 \text{ ml RH14 celler} = 3 * 10^{-3} \text{ l RH14 celler}$$

$$\text{Mengde } \text{Ni}^{2+} = \left(0,01 * 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \right) * (3 * 10^{-3} \text{ l}) = 3 * 10^{-8} \text{ mol}$$

$$\frac{3 * 10^{-8} \text{ mol}}{2,44 * 10^{-11} \text{ mol}} = 1229 \approx 1200$$



Figur 58: Aktivitet av CbpD ved ulike konsentrasjoner av Ni²⁺-ioner.

4.5.4 Testing av ulike toverdige metallioner

Da det ble vist at Ni²⁺-ioner hadde en hemmende effekt på aktiviteten til CbpD ble ulike toverdige metallioner testet for å vise hvilke av disse som kan brukes til å rense proteinet uten at det mister sin aktiviteten. Figur 59 viser at Ni²⁺-ioner og Cu²⁺-ioner hemmer aktiviteten til CbpD mens de andre toverdige metallene har varierende grad av hemming.

	% dropp/vekst i forhold til RH14 CbpD/bare RH14
nikkel	92*
kobber	105*
kobolt	95**
zink	66**
mangan	91**
magnesium	119**
kalsium	101**

* mye hemming % vekst i forhold til RH14 ikke tilsatt CbpD

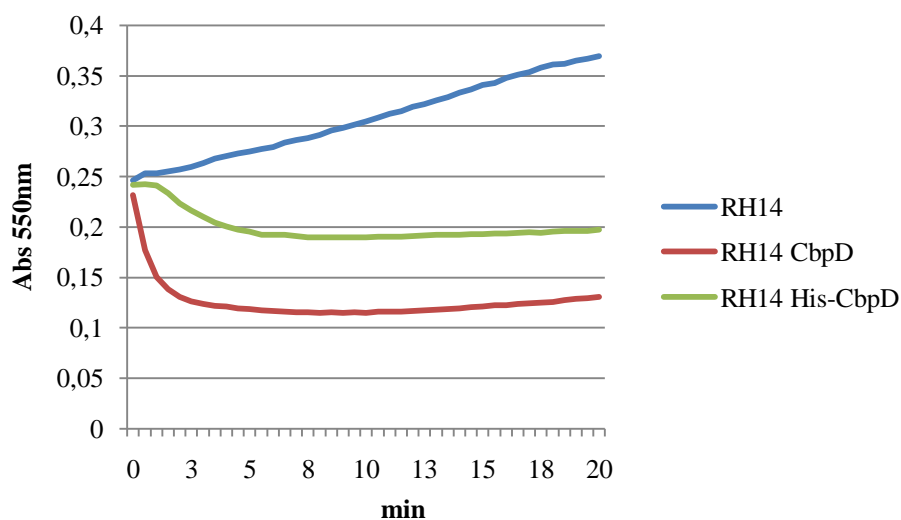
** lite hemming % dropp i forhold til RH14 tilsatt CbpD

Figur 59: Hemming av de ulike toverdige metallene

4.5.5 Äkta Prime Plus Zn²⁺- kolonne

His-CbpD hadde aktivitet etter DEAE cellulose, men ikke etter IMAK basert på en Ni²⁺- kolonne siden Ni²⁺-ionene hadde en hemmende effekt på aktiviteten (Fig 56). Zn²⁺ derimot var blant de toverdige metallene som hadde mindre hemmende effekt på aktiviteten

til His-CbpD (figur 59). Derfor ble det brukt en Zn^{2+} -kolonne i stedet for en Ni^{2+} -kolonne ved bruk av Äkta Prime Plus. Figur 60 viser at His-CbpD har fått aktivitet etter at proteinet er blitt rensset med en Zn^{2+} -kolonne på Äkta Prime Plus. Man kan også se at aktiviteten er noe lavere enn hos villtype CbpD.

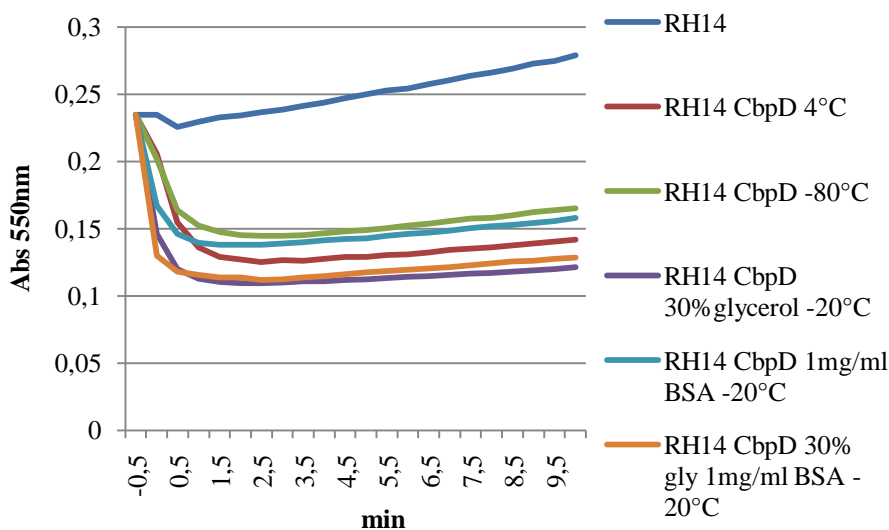


Figur 60: Graf over test av aktiviteten til His-CbpD etter rensing med DEAE cellulose og på Zn^{2+} -kolonne.

4.6 Ulike tester på aktiviteten til CbpD

4.6.1 Lagringsmetoder av CbpD

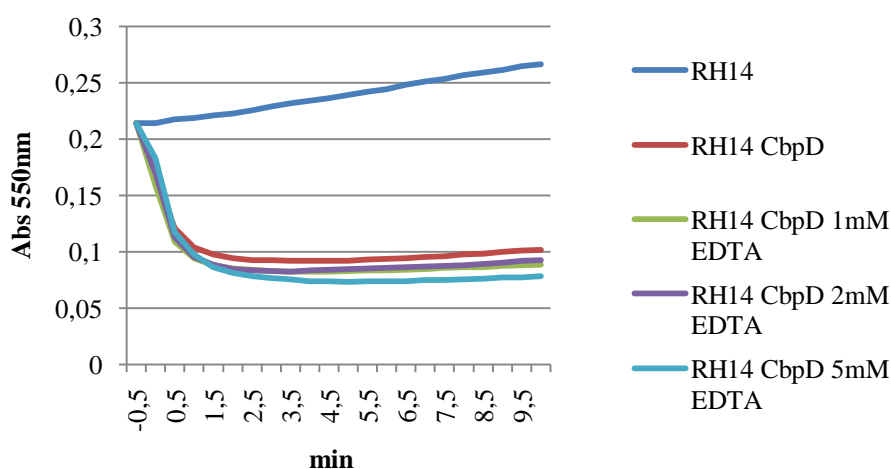
For å slippe å rense nytt CbpD for å utføre hver test ble det utforsket hvordan man kunne lagre proteinet uten at enzymet mistet aktiviteten over tid. Det ble testet å lagre enzymet ved 4 °C, -80 °C og ved -20 °C tilsatt bovine serum albumine (BSA) eller 30% glycerol. Figur 61 viser at alle lagringsmetodene gjør at proteinet fortsatt beholder aktiviteten sin, men at den beste lagringsmetoden var å fryse proteinet ned med 30% glycerol ved -20 °C. Lagring ved 4 °C var noe dårligere og det er tidligere vist at proteinet gradvis mister aktivitet ved lagring på denne måten.



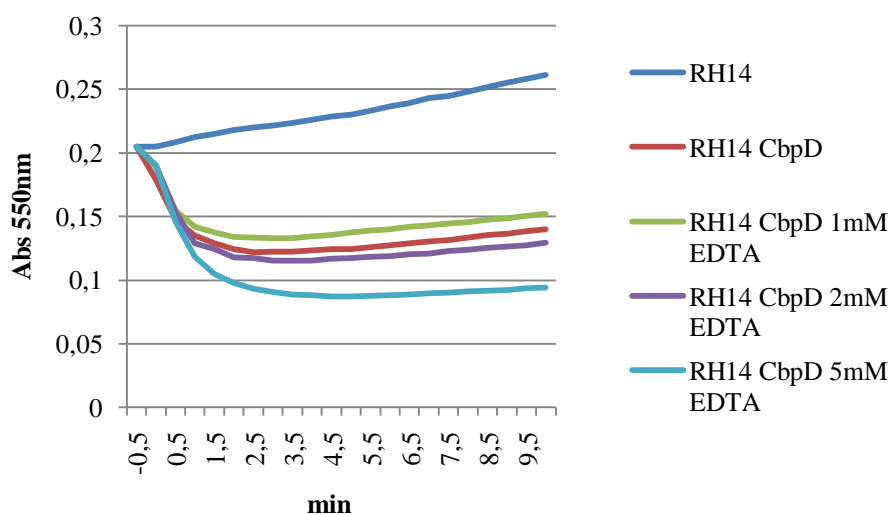
Figur 61: Graf over aktiviteten til CbpD etter det har blitt lagret over natt ved ulike lagringsmetoder. RH14 CbpD tilsatt 30% glycerol ved -20°C er den best egnede metoden, da dette bevarer aktiviteten mest.

4.6.2 Påvirkning av EDTA på aktiviteten til CbpD

Det har tidligere blitt vist at EDTA kan øke effekten av fratricide hos pneumokokker (Eldholm *et al* 2009). For å se om EDTA har noen positiv/negativ påvirkning på aktiviteten til CbpD ble det testet med ulike konsentrasjoner av EDTA og ulike mengder med CbpD. Figur 62 viser at når det er $0,75\ \mu\text{g}$ CbpD virker det som om EDTA ikke har noen stor påvirkning på aktiviteten. Til sammenligning så viser Figur 63 at når det er brukt $0,25\ \mu\text{g}$ CbpD virker det som at EDTA øker aktiviteten til proteinet betraktelig. Tilsetning av $5\ \text{mM}$ EDTA til $0,25\ \mu\text{g}$ CbpD øker aktiviteten til proteinet med ca. 30%, mens med tilsetning av $5\ \text{mM}$ EDTA til $0,75\ \mu\text{g}$ CbpD økte aktiviteten med ca. 13%.



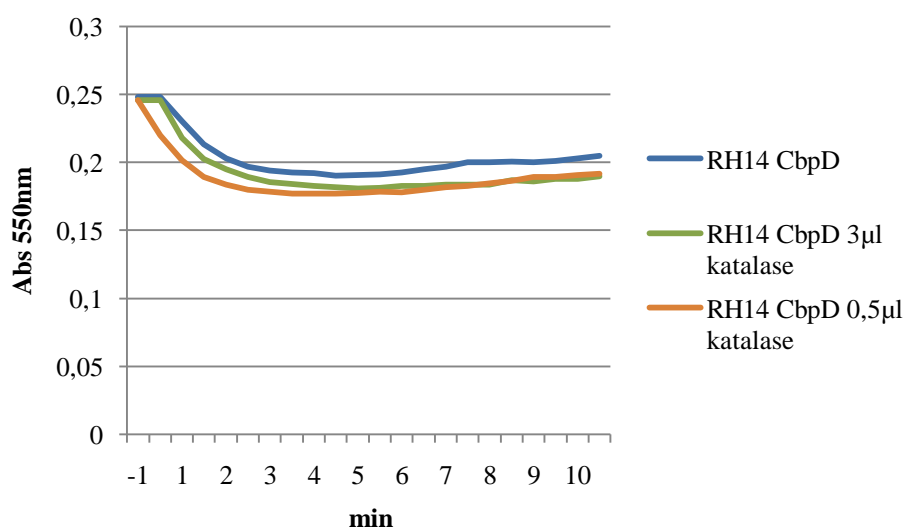
Figur 62: Påvirkning av EDTA på aktiviteten til CbpD ved bruk av $0,75\ \mu\text{g}$ CbpD og ulike konsentrasjoner av EDTA



Figur 63: Graf over påvirkning av EDTA med bruk av 0,25µg CbpD med ulike konsentrasjoner av EDTA.

4.6.3 Aktiviteten til CbpD etter tilsatt katalase

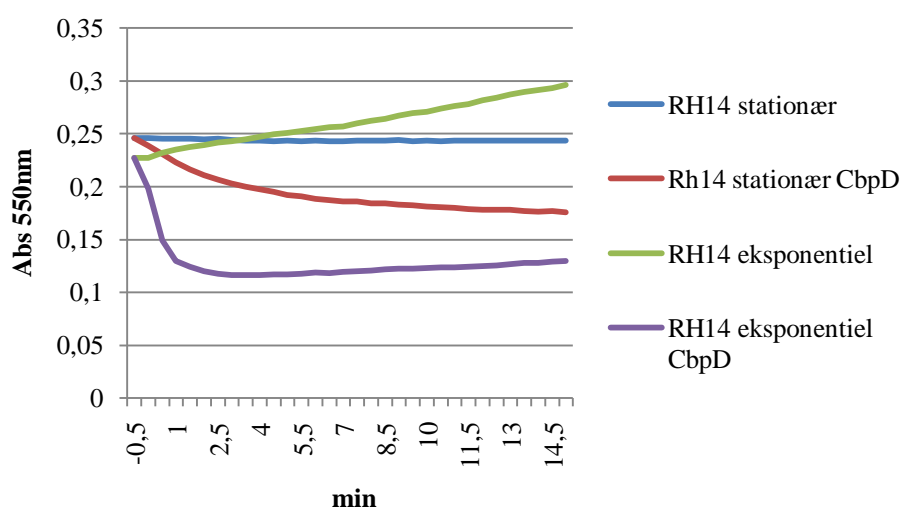
S. pneumoniae produserer hydrogenperoksid (H_2O_2) ved normal vekst. Siden H_2O_2 er et oksiderende stoff og vi hadde resultater som indikerte at cysteinresiduen i det aktive setet til CbpD lett oksideres (DTT gjenoppretter aktiviteten til inaktivt CbpD) ville vi teste om katalase kunne øke aktiviteten til CbpD. Katalase er et enzym som spalter H_2O_2 til vann og oksyngengass. Ulike mengder katalase ble tilsatt cellekulturer før CbpD ble tilsatt. Figur 64 viser at katalase øker aktiviteten til CbpD, og aktiviteten blir ca. 16% høyere ved å tilsette 0,5 µl katalase, mens den blir ca. 10% høyere ved å tilsette 3 µl katalase.



Figur 64: Graf etter tilsetning av ulike mengder katalase til CbpD. Tilsetning av 0,5 µl katalase øker aktiviteten mest.

4.6.4 Aktiviteten til CbpD på celler i eksponentiellfasen og celler i stasjonærfasen

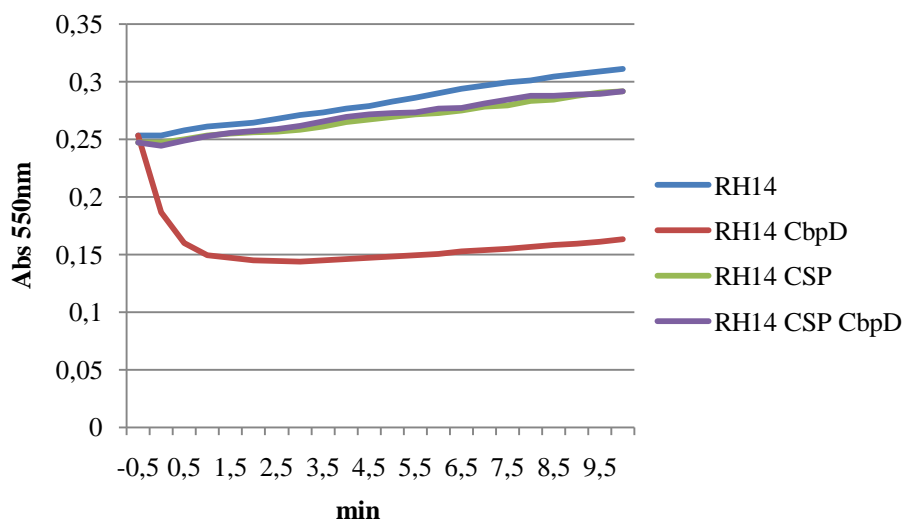
For å vite litt mer om CbpD har ulik aktivitet på celler fra forskjellig vekstfase ble det satt opp et forsøk der celler som var i eksponentiellfasen og celler som var i stasjonærfasen ble sammenlignet. Figur 65 viser at CbpD har høy aktivitet på celler som er i eksponentiellfasen, mens den har lavere aktivitet på celler som er i stasjonærfasen.



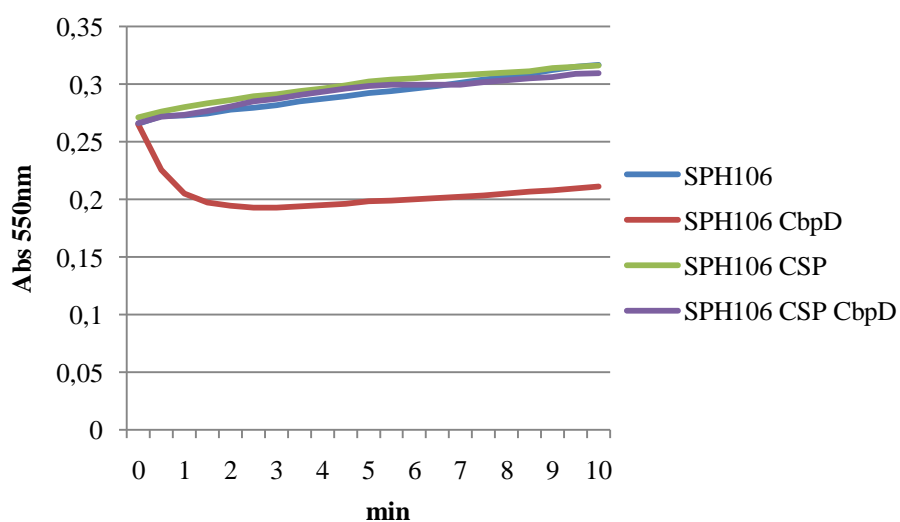
Figur 65: Sammenligning av celler i eksponentiellfasen og celler i stasjonærfasen tilsatt CbpD. Aktiviteten til CbpD høy på celler i eksponentiellfasen mens den er gradvis på celler i stasjonærfasen.

4.6.5 Aktivitet av CbpD på celler som uttrykker immunittetsproteinene ComM

For å se om immunittetsgenet *comM* hindrer CbpD i å utøve sin aktivitet på cellene ble to ulike cellestammer (RH14 og SPH106) induisert med CSP-1 for å få uttrykt dette genet. Figur 66 og Figur 67 viser at både RH14 og SPH106 blir immune mot aktiviteten til CbpD når de uttrykker *comM*.

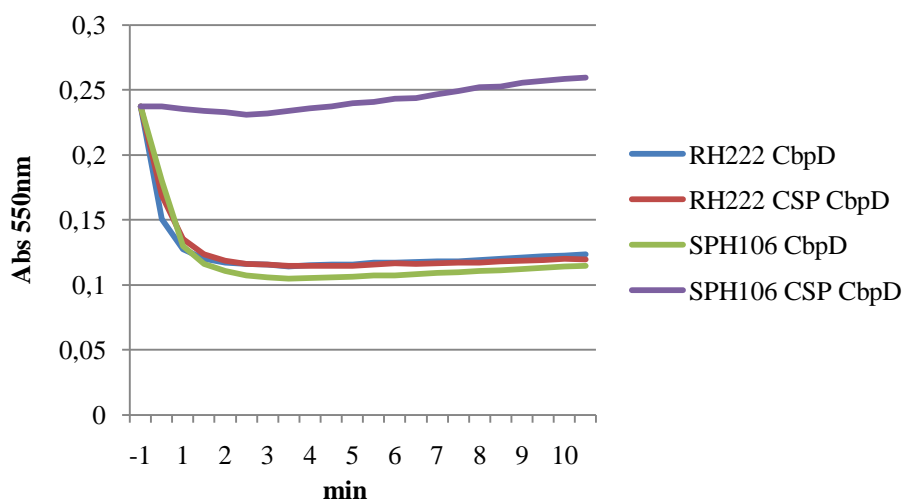


Figur 66: Graf som viser aktiviteten til CbpD på RH14 induisert og ikke induisert med CSP. CbpD har aktivitet på RH14 celler som ikke har blitt induisert med CSP men har ikke aktivitet etter at de har blitt induisert.



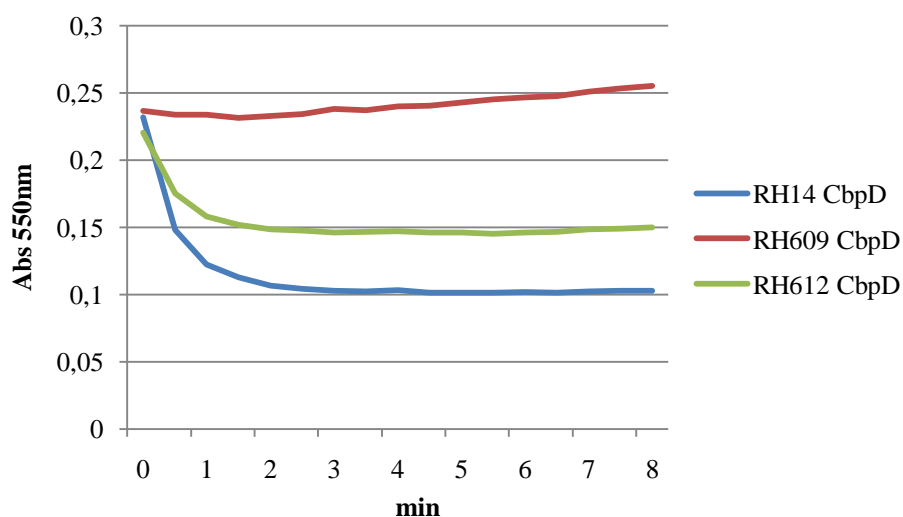
Figur 67: Graf som viser aktiviteten til CbpD på SPH106 induisert og ikke induisert med CSP. CbpD har aktivitet på SPH106 som ikke er induisert med CSP men har ikke aktivitet etter at de er blitt induisert.

I tillegg til disse to testene utført på celler som uttrykker *comM* ble det gjort en sammenligning mellom kompetanse-indusert SPH106 og RH222. Forskjellen på disse to er at RH222 ikke har immunitetsgenet, mens SPH106 har dette. Ut fra figur 68 kan man se at induisert RH222 ikke er immun mot aktiviteten til CbpD, mens SPH106 viser immunitet.



Figur 68: Graf som viser aktiviteten til CbpD på SPH106 og RH222 induisert og ikke induisert med CSP. CbpD er ikke aktiv i SPH106 induisert med CSP mens den er aktiv på RH222 som er induisert men som ikke inneholder *comM*.

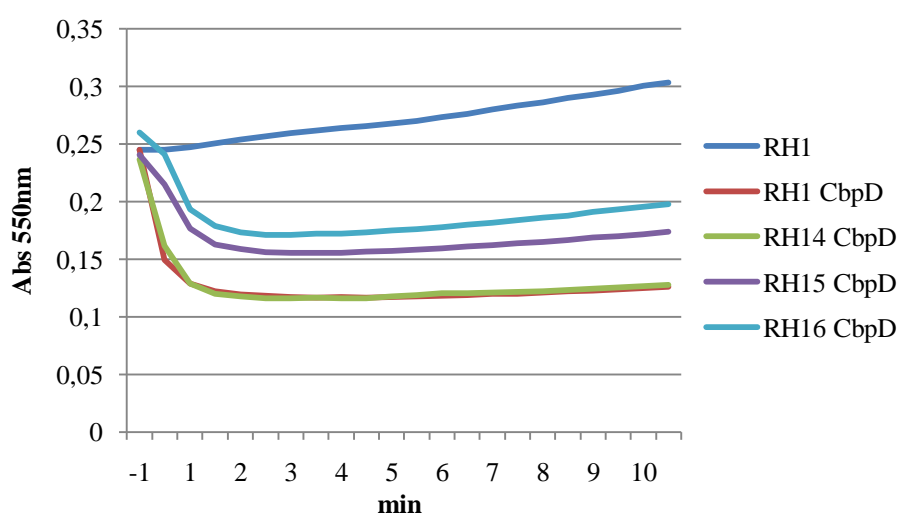
ComM mediert immunitet mot CbpD ble også testet på celler som uttrykte *comM* fra konstitutive promotorer av varierende styrke. Stamme RH609 har sterk promotor for *comM* og RH612 har svak promotor for *comM*. Aktiviteten av CbpD på disse stammene ble sammenlignet med RH14. Figur 69 viser at RH609 er helt immun mot aktiviteten til CbpD mens CbpD har noe aktivitet på RH612.



Figur 69: Graf som viser aktivitet til CbpD på stammer som uttrykker ulike mengder av immunitetsproteinene ComM. RH609 var helt immun mot CbpD mens RH612 viste noe immunitet.

4.6.6 LytA og LytC bidrar til økt cellelysis

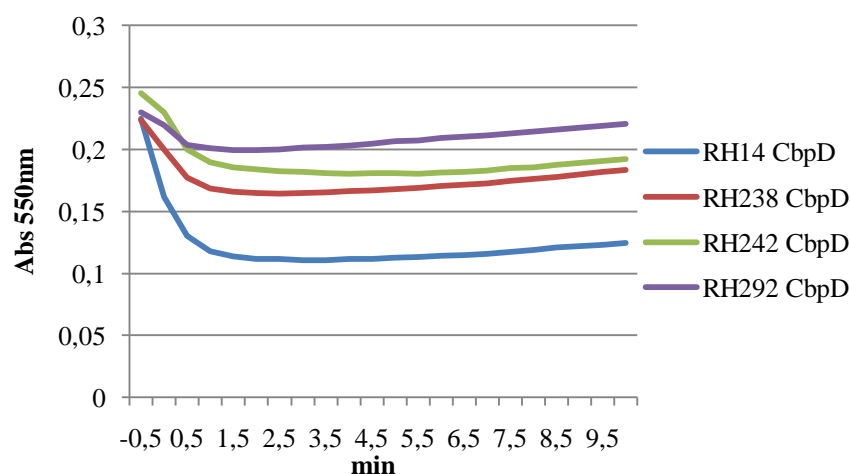
For å se om LytA og/eller LytC kunne bidra til å øke CbpD mediert cellelysis ble mutanter som manglet *lytA* (RH14), *lytC* (RH15) eller både *lytA* og *lytC* (RH16) behandlet med CbpD. Både LytA og LytC er murin hydrolaser. LytA kutter interpeptidbroer i celleveggen, mens LytC kutter glycosidbindingene mellom N-acetyl muramicyre (NAM) og N-acetyl-glukuronsyre (NAG). Figur 70 viser at høyest grad av CbpD-mediert cellelysis oppnås på RH1 og RH14 som begge uttrykker LytC og lavest grad på RH16 som mangler både LytA og LytC.



Figur 70: Graf som viser aktivitet til CbpD på stammene RH1, RH14, RH15 og RH16 som er ulike *lytA/lytC* mutanter. Det er høyest aktivitet av CbpD på RH1 og RH14.

4.6.7 Aktivitet til CbpD på stammene RH238, RH242 og RH292

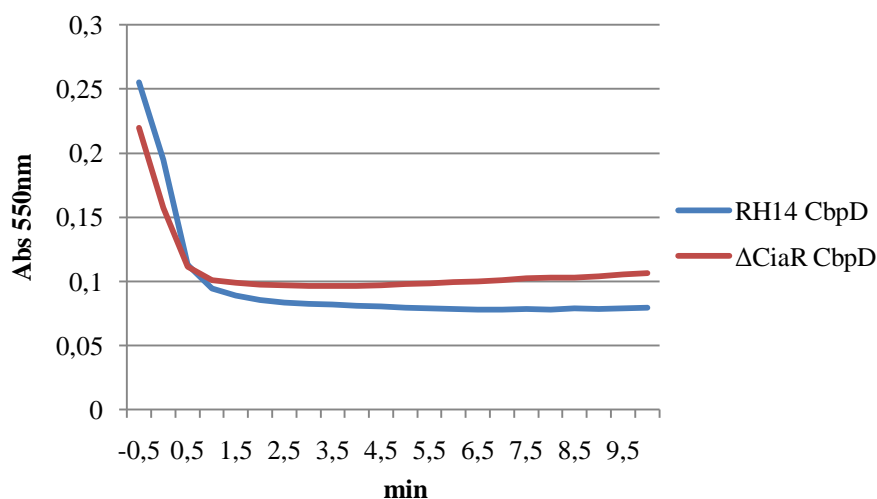
For å se om ulike modifiseringer av celleveggen har en positiv eller negativ effekt på aktiviteten til CbpD ble et utvalg av stammer med nettopp slike mutasjoner testet. Mutasjonene som ble testet var ekstra koliner på teikoinsyrene (RH242), manglende interpeptidbroer (RH238) og manglende oksygenacetylering av peptidoglykan (RH292). Figur 71 viser at aktiviteten til CbpD er lavere på alle stammene med mutasjoner som påvirker oppbygningen av celleveggen, sammenlignet med RH14 som ikke har slike mutasjoner. CbpD viser lavest effekt på RH292 som mangler acetylering av celleveggen.



Figur 71: Graf over aktiviteten til CbpD på stammer (RH238, RH242 og RH292) med ulike mutasjoner i celleveggen. Manglende oksygenacetylase (RH292) ser ut til å ha størst innvirkning på aktiviteten til CbpD.

4.6.8 Aktiviteten til CbpD på en $\Delta ciaR$ mutant

Aktiviteten til enda en stamme med mutasjon som påvirker oppbygningen av celleveggen ble testet, nemlig $\Delta ciaR$ som har en mutasjon som har med innsetting av teikoinsyrer i celleveggen. Figur 72 viser at aktiviteten til CbpD er noe lavere på $\Delta ciaR$ mutanten enn på RH14.

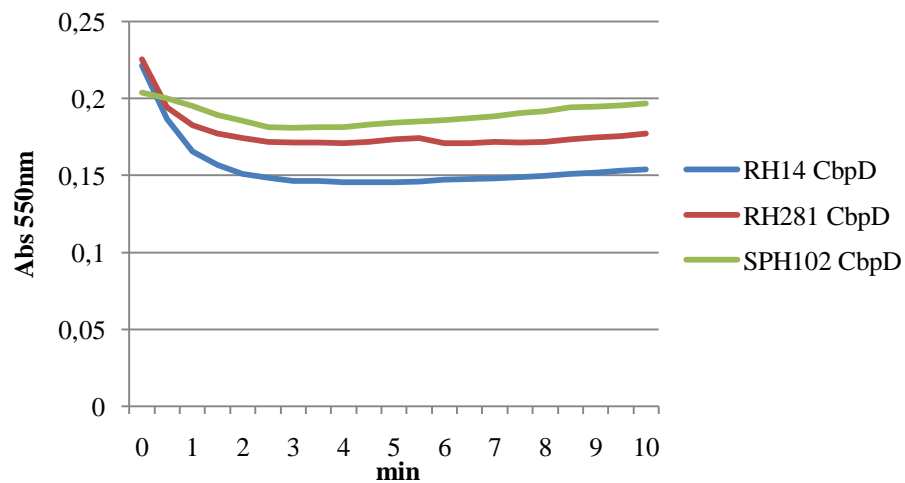


Figur 72: Graf som viser aktiviteten til CbpD på $\Delta ciaR$ sammenlignet med RH14. Aktiviteten er noe lavere ved $\Delta ciaR$ enn ved RH14.

4.6.9 Aktiviteten til CbpD på stammene RH281 og SPH102

Aktiviteten til CbpD ble testet på en stamme (RH281) som har deletert genet *pgdA* som koder for en n-deacetylase og en stamme som mangler genet *licD2* som koder for et enzym

som fester koliner til teikoidsyrene. Figur 73 viser at CbpD ikke har mye aktivitet mot SPH102, men at den har noe mer aktivitet mot RH281.



Figur 73: Graf som viser aktiviteten til CbpD på stammene RH281 og SPH102 med ulike mutasjoner i celleveggen. CbpD har lavest aktivitet mot SPH102.

5 Diskusjon

5.1 Rensing av CbpD for oppnåelse av krystallstruktur

Et av delmålene for denne oppgaven var å finne en rensemetode som gjorde CbpD rent nok for å kunne oppnå en krystallstruktur. Rensing ble først utført på villtype CbpD ved hjelp av DEAE cellulose affinitetskromatografi. Fra 12 liter cellekultur ble det rensset ca 4 mg CbpD. Initielle forsøk på å lage krystaller ut av dette rensede CbpD endte uten resultat. I følge Sedelnikova (proteincrystallography.org) bør et protein være minst 95% rent for å ha mulighet til å danne gode krystaller som gir høy oppløselighet på strukturdataene. Proteiner kan også miste sin aktivitet og evne til å danne krystallstruktur dersom den blir lagret ved 4 °C (proteincrystallography.org). Grunnen til at det ikke ble oppnådd krystaller var sannsynligvis at det rensede produktet ikke var rent og/eller at proteinkonsentrasjonen var for lav. Analyser av DEAE cellulose-renset CbpD ved hjelp av SDS page og sølvfarging viste at prøven inneholdt et degraderingsprodukt av CbpD i tillegg til andre kontaminanter. Disse kan ha forstyrret CbpD i å kunne danne krystaller. Erfaring med dette proteinet viser at CbpD mister aktiviteten svært raskt dersom det blir lagret ved 4 °C. aktiviteten blir nesten halvert i løpet av 24 timer. Dermed er det mulig at frakt på is kan ha minsket aktiviteten til proteinet og da også evnen det kan ha til å danne krystaller.

For å fjerne degraderingsproduktet og andre kontaminerende proteiner for og på denne måten øke sannsynligheten for å oppnå krystaller ble proteinet først rensset ved DEAE cellulose, før det ble rensset ved bruk av ionebyttekromatografi for til slutt ved gelfiltrering. De fleste kontaminerende proteinene ble rensset bort med suksess med unntak av degraderingsproduktet av CbpD som fortsatt kunne detekteres. Grunnen til at man ikke blir kvitt degraderingsproduktet etter ionebyttekromatografi er at degraderingsproduktet til CbpD har tilnærmet lik pI (8,92) som fullengde CbpD (8,63) og vil derfor bli eluert ved samme saltkonsentrasjon. Gelfiltrering skulle i teorien kunne separere CbpD fra degraderingsproduktet da disse har ulik størrelse. Grunnen til at dette ikke ble observert kan være at proteinet degraderer etter at det har blitt eluert fra kolonnen. I tillegg ble proteinutbyttet mindre for hvert trinn i rensprosessen. Det at proteinutbyttet ble sterkt redusert når man sammenligner det siste trinnet (gelfiltrering) med det første trinnet (DEAE cellulose) er ikke fordelsmessig da man trenger en stor mengde (5-10 mg) protein for å kunne oppnå en krystallisering av disse. Da disse tre rensetrinnene gav lav proteinutbytte samtidig som at dette produktet fortsatt inneholdt degraderingsprodukter gjorde det praktisk vanskelig å utføre en storskala rensing av CbpD på denne måten.

Da det ikke ble oppnådd CbpD uten degraderingsprodukt ble det funnet en annen måte å rense proteinet, ved å fusjonere en polyhistidinhale til N-terminal ende av CbpD som ga opphav til His-CbpD. Ved å rense His-CbpD med IMAK ville degraderingsproduktet av CbpD kunne bli rensset bort siden dette manglet den N-terminale His-taggen. Rensing av His-CbpD ved hjelp av en Ni^{2+} HisTrap HP kolonne resulterte i et meget rent produkt (>95%) uten detekterbare (SDS page og påfølgende sølvfarging) kontaminasjoner. Likevel støtte man på andre problemer ved å rense His-CbpD på denne måten. Proteinets beholdt sin aktivitet etter rensing med DEAE cellulose, men etter rensing på en Ni^{2+} -basert IMAK kolonne kunne ingen aktivitet i proteinet detekteres. Tester utført på villtype CbpD viste at blant annet Ni^{2+} ioner hemmer aktiviteten til dette proteinet. Årsaken til et inaktivt enzym etter Ni^{2+} -basert IMAK er mest sannsynlig at Ni^{2+} ioner løsner fra kolonnen og kommer med ut i løsningen noe som igjen resulterer i at proteinet ikke lenger er aktivt. Da proteinet ikke har aktivitet kan man ikke studere dets enzymatiske aktivitet og det ville heller ikke egne seg til krystalliseringsforsøk siden det kan ha endret struktur.

For å prøve å reversere bindingen av Ni^{2+} til CbpD og dermed få aktivitet i proteinet ble det Ni^{2+} inaktiverte enzymet behandlet med EDTA. EDTA har evnen til å binde toverdige metaller (snl.no). Ved å tilsette EDTA til His-CbpD ønsket man å fjerne toverdige metallioner som er frie i løsningen eller som bare er svakt bundet til His-CbpD. Resultatet viste derimot at His-CbpD fortsatt var inaktivt. Dette vil si at Ni^{2+} ionene enten binder sterkt til proteinet slik at disse ikke kan løsnes ved hjelp av EDTA, eller at Ni^{2+} inducerer en konformasjonsendring i His-CbpD som ikke er reversibel når man fjerner Ni^{2+} . Da man ikke kan være sikker på at proteinet er riktig foldet, med bakgrunn av manglende aktivitet, var det ikke fordelsaktig å foreta en storskala rensing av His-CbpD ved å bruke en Ni^{2+} kolonne med tanke på strukturanalyse.

IMAK kolonnen som ble brukt for rensing av His-CbpD kan bli ladet med andre toverdige metallioner enn Ni^{2+} . Derfor ble det utført tester for å se om bruk av andre toverdige metaller lot CbpD beholde sin aktivitet. Det ble utført tester med villtype CbpD der det ble tilsatt ulike toverdige metallioner. Resultatene viste Co^{2+} og Zn^{2+} som mulige kandidater. Disse to toverdige metallionene hadde ikke stor hemming på aktiviteten til CbpD i tillegg til at de binder spesifikt til His-taggen slik at man har muligheten for å oppnå et rent proteinprodukt. Det ble først brukt en kolonne som var ladet med Co^{2+} . Ved bruk av denne kolonnen fant man at proteinet bandt for sterkt til kolonnen og det var derfor ikke mulig å eluere proteinet fra denne kolonnen.

Ved bruk av en Zn^{2+} kolonne ble det oppnådd et His-CbpD produkt med ca >95%

renhet estimert ut fra sølvfarging av proteingel. Aktivitetassay av dette proteinet viste at det hadde noe lavere aktivitet enn villtype CbpD. Selv om aktiviteten var lavere gir det likevel grunnlag til å tro at dette proteinet er riktig foldet. Siden det ble oppnådd et meget rent proteinprodukt som beholdt noe av sin opprinnelige aktivitet, er dette en rensemetode som i fremtiden kan bli brukt til storskala rensing av His-CbpD for strukturanalyser som krystallografi eller NMR.

5.2 Lagring av CbpD for å beholde aktiviteten

Tidligere ble CbpD lagret ved 4 °C. Dette viste seg å være et problem da proteinet raskt mistet sin aktivitet ved lagring på denne måten. Ut fra egne erfaringer ved tester utført på dette proteinet (resultater ikke vist) vil ikke proteinet ha særlig mye av den opprinnelige aktiviteten etter å ha blitt lagret ved 4°C i 48 timer.

Siden mange ulike tester skulle utføres på dette proteinet var det upraktisk å rense CbpD på nytt for hver ny test som ble utført. For å lette arbeidet ble flere mulige lagringsmetoder testet. Etter lagring i 24 timer ved de ulike lagringsbetingelsene ble det funnet at lagring ved -20 °C tilsatt 30% glycerol beholdt tilnærmet 100% av aktiviteten til et ferskt enzym. CbpD lagret på denne måten hadde høyere aktivitet enn CbpD lagret både ved 4 °C og ved -80 °C. Tester utført to uker etter med protein lagret ved denne metoden, viste at proteinet hadde beholdt det meste av sin opprinnelige aktivitet (resultater ikke vist). Det ble ikke utført aktivitetstester på CbpD lagret lenger enn to uker, men ble CbpD lagret lenger enn dette sank aktiviteten noe. Ved å tilsette 1 mM DTT kunne CbpD bli reaktivert igjen (resultat ikke vist).

5.3 Påvirkningen av EDTA

Tidligere forsøk har vist at aktiviteten til CbpD ikke avhenger like mye av tilstedeværelse av LytA og LytC dersom det blir tilsatt EDTA til proteinet (Eldholm *et al* 2009). Dette indikerer at divalente kationer er involvert i denne prosessen. I dette arbeidet har det blitt vist at ulike toverdige metaller hemmer aktiviteten til CbpD. EDTA har evnen til å binde divalente kationer. Derfor ble det utført forsøk med å tilsette EDTA for å se om det kunne øke aktiviteten til CbpD selv når LytA eller LytC var tilstede. Det ble utført tester på RH14, som er en LytA mutant (inneholder ikke LytA). Ut fra disse resultatene kan man se at EDTA har evnen til å øke aktiviteten til CbpD selv når cellen inneholder LytC. EDTA hadde størst effekt når det er tilsatt 0,25 µg CbpD sammenlignet med 0,75 µg av proteinet. Dette kan bety at EDTA muligens kun har en positiv virkning på CbpD dersom celledøsningen ikke er

mettet med proteinet. Dersom løsningen ikke er mettet kan det være at noe av proteinet blir inhibert av toverdige metallioner som er tilstede i løsningen. For å få lysis av celler der det er lite CbpD kan det derfor være en fordel å tilsette EDTA til løsningen. Dersom proteinet er til stede i store nok mengder vil sannsynligvis ikke tilsetning av EDTA ha noen positiv virkning på aktiviteten til proteinet siden systemet er mettet med CbpD..

5.4 Virkningen av katalase på CbpD aktiviteten

S.pneumonia er en katalase negativ bakterie. Det vil si at denne ikke produserer katalase (Todar 2011). Katalase er et enzym som omdanner hydrogenperoksid (H_2O_2) til vann og oksygen. Hydrogenperoksid blir dannet under cellevekst og kan ved høye konsentrasjoner være skadelig for cellen og hemme celleveksten. Ved å tilsette katalase blir hydrogenperoksid fjernet slik at denne faktoren ikke hemmer celleveksten. Ved å tilsette DTT til proteinet kunne man gjenopprette aktiviteten til inaktivt CbpD. Dette indikerer at cysteinresiduen i det aktive setet til CbpD lett oksideres.

Ut fra resultatet (figur 64) gir tilsetning av katalase til cellekulturen noe høyere grad av lysis når CbpD tilsettes. Grunnen til at man ser denne virkningen av katalase kan være at katalase muligens kan bedre forholdene for aktivitet av CbpD ved at den fjerner H_2O_2 slik at denne ikke kan påvirke det aktive setet til CbpD. Det kan også være at katalase bedrer forholdene for cellevekst, da denne ikke blir hemmet av høy konsentrasjon av hydrogenperoksid.

5.5 CbpD angriper celler i delingsfasen

Eldholm *et al* (2009) har vist at CbpD primært angriper delingssonen og polene til cellene, mens svak binding til de resterende delene av overflaten kunne bli detektert når eksponeringstiden blir økt. For å undersøke om CbpD har ulik effekt på celler i vekst og celler som ikke deler seg ble CbpD tilsatt til celler i log-fase og celler i stasjonærfase. Resultatene viste tydelig at når cellene befinner seg i den stasjonære fasen vil det bare være en gradvis lysis av cellene og ikke hurtig lysis av cellene som man observerer når CbpD tilsettes til celler som er i den eksponentielle vekstfasen. Da det ble observert høyere grad av lysis for celler i eksponentiell vekstfase tyder dette på at disse cellene har egenskaper som gjør dem mer sensitive for CbpD i forhold til celler som er i stasjonærfasen. En av hovedforskjellene mellom celler i vekstfase og celler i stasjonærfase er at celler i vekstfase vil ha en aktiv delingssone.. Basert på resultater (figur 65) er det mulig å anta at CbpD primært vil angripe delingssonen til cellene. Grunnen til at man ser noe lysis fra cellene som er i stasjonærfasen

kan være at det finnes noen celler som deler seg også i denne kulturen som blir angrepet av CbpD. Man ser ikke vekst av cellene i den stasjonære fasen da celleveksten er like høy som celledød. Det er også en mulighet for at CbpD har evnen til å lysere celler som ikke er i delingsfasen. Dette kan tas ut fra tidligere funn av at CbpD kan bli detektert utenom delingssonen når eksponeringstiden blir økt (Eldholm *et al* 2010).

5.6 ComM beskytter cellene fra lysis ved CbpD

Det er sannsynlig at immunitetsproteinet ComM, som er kodet for av et tidlig kompetansegen, introduserer en endring i peptidoglykan eller teikoin syrene til kompetente celler og på den måten blokkerer aktivitet av CbpD (Eldholm *et al* 2010). En annen mulighet er at ComM spesifikt interagerer med CbpD og blokkerer dets aktivitet, men den hypotesen er mindre sannsynlig siden ComM mest sannsynlig er et membranprotein og CbpD lokaiserer på overflaten til cellene. Det ble ved hjelp av testing av ulike stammer vist at ComM er det proteinet som beskytter cellen mot CbpD-mediert lysis. Dette ble gjort ved å indusere cellestammer som innehar *comM* genet og cellestammer som ikke har dette genet. Cellene ble indusert med CSP ca 8 min før de ble tilsatt CbpD. På denne tiden er *comM* genet blitt transkribert og translatert og ComM utfører sin funksjon i cella som gir beskyttelse mot CbpD. Dette viser at celler som uttrykker ComM har en total beskyttelse mot aktiviteten til CbpD. Ut fra resultat (figur 66-68) kan man også se at beskyttelse mot CbpD er eliminert i cellene som mangler *comM* genet. Disse stammene viser like mye lysis som de stammene som ikke er blitt indusert. Disse resultatene viser at er involvert i beskyttelsen av celler mot angrep av CbpD.

For å få full beskyttelse mot CbpD er det viktig at det blir produsert tilstrekkelig mengde av ComM. Dette ble demonstrert i et forsøk med to stammer som har ulik styrke på promoteren foran *comM* genet. Stammen som har sterk promoter foran *comM* ga full immunitet mot aktiviteten til CbpD mens stammen som har svak promoter foran *comM* bare ga delvis beskyttelse mot aktiviteten til CbpD. Dette viser at nivået av ComM må nå en viss terskel for at dette skal gi 100% beskyttelse mot CbpD.

5.7 LytA og LytC i målcellen bidrar til økt lysis ved CbpD angrep

I et forsøk utført av Eldholm *et al* (2009) ble det vist at bare 0,4% av cellene ble lysert av CbpD når genene for *lytA* og *lytC* ble slettet hos både kompetente og ikke-kompetente celler. For å vise bidraget av LytA og LytC til aktiviteten til CbpD ble det satt opp forsøk med stammer som inneholdt LytA og LytC, bare LytA, bare LytC eller ingen av disse. Resultatet

av dette forsøket viste (figur 70) at CbpD er like aktivt på stammen som bare inneholder LytC som den stammen som inneholder både LytA og LytC. Til sammenligning med tidligere resultater ble det i dette forsøket oppnådd høyere grad av lysis av celler som ikke inneholder verken LytA eller LytC. CbpD hadde riktignok lavere aktivitet på denne stammen enn på stammen som inneholder LytA og/eller LytC. Dette resultatet indikerer at LytC alene er nok til å oppnå samme lysis som både LytA og LytC sammen. Dersom LytC ikke er til stede kan muligens LytA spille en større rolle da lysis fortsatt oppnås om enn ikke like mye som når LytC er til stede. Resultatene bekrefter likevel det tidligere studier har vist; CbpD er mer aktivt ved tilstedeværelse av LytA og/eller LytC og at LytC bidrar mer til CbpD-mediert lysis enn LytA.

5.8 Ulike mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen har konsekvenser for CbpD-sensitivitet

CbpD inneholder ulike domener som binder proteinet til overflaten av celleveggen. Cellulære lokaliseringsstudier har demonstrert at SH3b domenenene på CbpD binder spesifikt til peptidoglykan mens det cholinbindende domenet (CBD) dirigerer CbpD til delingssonen. Det er sannsynlig at både CBD og SH3b er involvert i å feste og koordinere proteinet til den ikke-kompetente cellen. (Eldholm *et al* 2010).

5.8.1 Påvirkning av ekstra kolin i celleveggen

Aktiviteten til CbpD ble testet på en *S.pneumoniae* stamme som inneholder flere kolinresiduer på teikoinisyrene i celleveggen (RH242) enn villtypen. Resultatet viste (figur 71) at CbpD har lavere aktivitet på denne stammen. Ut fra tidligere studier ville det vært nærliggende å tro at aktiviteten til CbpD ville vært høyere på en slik stamme når det er vist at det er det CBD som dirigerer CbpD til delingssonen til cellen (Eldholm *et al* 2010). Det er mulig at flere koliner i celleveggen fører til mer uspesifikk binding på hele celleveggen til cellen, eller en endring i fordelingen av teikoinisyrene i celleveggen som vil interferere med binding av CbpD til celleoverflaten. Når CbpD er bundet til andre steder enn delingssonen er det mulig at enzymet ikke i like stor grad er i stand til å lysere cellen.

5.8.2 Påvirkning av manglende interpeptidbroer i celleveggen

Hos Gram positive bakterier er ikke kryssbinding en direkte kontakt mellom sidekjedene til peptidene ved D,D-peptide/amide bånd, men involverer en interpeptidbro. Hos *S.pneumoniae* vil denne bestå av en L-Ala-L-Ala dipeptidbro (König *et al* 2010). CbpD inneholder et CHAP domene. Karakteriserte medlemmer av CHAP familien fungerer enten

som endopeptidaser som splitter innen murein stamme peptidene eller som amidaser som splitter *N*-acetylmuramyl-L-Ala båndet (Eldholm *et al* 2010). Resultater viser (figur 71) lavere aktivitet av CbpD mot stammen som mangler interpeptidbroer. Dette kan bety at CbpD ikke har like stor evne til å utføre det første kuttet i celleveggen og på den måten aktivere LytA/LytC for å få full lysis av cellen. CbpD kan muligens fortsatt feste seg til celleveggen men får lavere aktivitet når den ikke kan kutte i interpeptidbroene.

5.8.3 Påvirkning av manglende O-acetylering i celleveggen

Tidligere forsøk på *Enterococcus faecalis* har vist at peptidoglykan O-acetylering har en liten inhiberende virkning på autolysinaktiviteten hos denne cellen (Emirian *et al* 2009). I dette forsøket ble det testet om det å fjerne O-acetylering i celleveggen kan påvirke cellens sensitivitet for øke CbpD. Ut fra resultatene gjort på *E.faecalis* ble det spekulert i om O-acetylering av celleveggen til *S.pneumoniae* også til en viss grad vil hemme aktiviteten til CbpD. Resultatene fra dette forsøket (figur 71) viste at denne mutanten var mindre sensitiv for CbpD enn villtypeceller. aktiviteten til CbpD ble betraktelig redusert da cellen manglet O-acetylering i celleveggen. Grunnen til dette kan være at CbpD har vanskeligere for å gjenkjenne bindingssetet på celleoverflaten når denne mangler O-acetylering noe som kan føre til mindre hydrolyse av celleveggen.

5.8.4 Påvirkning av færre teikoinsyrer i celleveggen

CbpD inneholder et CBD. Proteiner som inneholder CBD vil spesifikt gjenkjenne og reversibelt binde til kolinenheter på teikoinsyrene i cellveggen (Eldholm *et al* 2010). Et forsøk ble satt opp for å analysere om mengden teikoinsyrer i celleveggen hos *S.pneumoniae* ville påvirke grad av CbpD-mediert cellelysis. Forsøket ble utført på celler som har en mutasjon som minsker innsettingen av teikoinsyrer i celleveggen. Aktiviteten til CbpD mot denne stammen var nesten like stor som mot referansestammen (figur 72). Da aktiviteten nesten var like høy kan det være at teikoinsyrene ikke er det som avgjør om CbpD binder til celleveggen. Mindre teikoinsyrer kan likevel endre celleveggstrukturen på en måte som gjør at CbpD ikke så lett gjenkjenner bindingssetet og dette resulterer i noe lavere CbpD-mediert cellelysis.

5.8.5 Påvirkning av manglende N-deacetylase

I *L.lactis* er peptidoglykan *N*-acetylglucosamine deacetylase (PgdA) vist å påvirke bakteriens sensitivitet mot lysozymer. Inaktivering av *pgdA* som førte til fullt acetylerert peptidoglykan førte til en lysozymsensitiv fenotype (Watterlot *et al* 2010). Ut fra disse tidligere funnene ville man teste om aktiviteten til CbpD-mediert cellelysis kunne øke ved å

fjerne acetylering i celleveggen siden hydrolyse av celleveggen med CbpD er vist å aktivere LytC. Resultatene fra forsøkene (figur 73) viste at aktiviteten til CbpD var lavere på celler som manglet deacetylase enn de som har denne. Grunnen til dette ligger sannsynligvis i at denne mutasjonen forårsaker en endring i celleveggen som gjør det vanskeligere for CbpD å binde seg til og lysere cellen og på denne måten aktivere LytC.

5.8.6 Påvirkning av færre koliner festet til teikoinsyrene i celleveggen

CbpD inneholder et CBD. Proteiner som inneholder CBD binder ikke kovalent til kolin enheten på teikoin og lipoteikoin syrene i celleveggen. CBD vil spesifikt gjenkjenne og reversibelt binde til kolinheter på teikoin og lipoteikoin syrene i celleveggen (Eldholm *et al* 2010). Resultatet viser (figur 73) at aktiviteten til CbpD er dårligere mot celler som inneholder færre kolinheter på teikoinsyrene. Dette kan bety at CbpD må binde til kolinheter på teikoinsyrene for å utføre sin aktivitet på cellene. Dersom det er færre koliner i celleveggen vil dette resultere i at færre CbpD-molekyler kan binde til celleveggen noe som igjen resulterer i mindre grad av lysis. Dette ble observert i dette resultatet.

6 Konklusjon og fremtidig arbeid

Ut fra arbeidet med rensing og aktivitetstester har det vist seg at CbpD er et vanskelig protein å arbeide med. Det ble funnet en mulig måte å rense His-CbpD ved hjelp av Zn^{2+} IMAK basert kolonne som ga et rent protein og der proteinet fortsatt var riktig foldet. Dette gjør det mulig i fremtiden å utføre en storskala rensing av proteinet på denne måten for å kunne utføre strukuranalyser av det. Aktiviteten til CbpD blir påvirket av mange ulike faktorer. Det får bedret aktivitet ved å tilsette katalase og EDTA, mens aktiviteten blir lavere ved å introdusere ulike mutasjoner som påvirker oppbyggingen av celleveggen, som manglende interpeptidbroer, manglende O-acetylering, manglende deacetylase, færre/flere kolinenheter festet til teikoinsyrene og færre teikoinsyrer i celleveggen. Mye arbeid gjenstår fortsatt for å få full forståelse av hvordan CbpD virker.

7 Referanser

Berkeley university og California <http://www.ocf.berkeley.edu/~edy/genome/sequencing.html>

de Ruyter, P.G.G.A., Kuipers, O.P., de Vos, W.M. 1996. Controlled Gene Expression Systems for *Lactococcus lactis* with the Food-Grade Inducer Nisin. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3662-3667

Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H.S., Håvarstein, L.S. 2009. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae* and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* 155, 2223-2234

Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H.S., Berg, K.H., Hermoso, J.A., Håvarstein, L.S. 2010. Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Molecular Microbiology* 905-917.

Emirian, A., Fromentin, S., Eckert, C., Chau, F., Dubost, L., Delepierre, M., Gutmann, L., Arthur, M., Mesnage, S. 2009. Impact of peptidoglykan O-acetylation on autolytic activities of the *Enterococcus faecalis* N-acetylglucosaminidase AtlA and N-acetylmuramidase AtlB. *FEBS Letters*, 583, 3033-3038

GE Healthcare:

<http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=164008>

http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/content/protein_purification~education~gelfiltration_desalting#

<http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=165701>

http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/content/protein_purification~affinity

http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein_purification~ion_exchange?OpenDocument&hometitle=search

<http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=163395>

<http://gelifescience.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleid=165422>

Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjørnstad, M.L., Håvarstein, L.S. 2008. a predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology* 69, 245-253.

- Johnsborg, O., Eldholm, V., Håvarstein, L.S. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Mikrobiologi* 158, 767-778
- Johnsborg, O., Håvarstein, L.S. 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Mikrobiol Rev* 33, 627-642
- König, H., Claus, H., Varma, A. 2010. *Procaryotic Cell Wall Compounds, Structure and Biochemistry*. s 18
- Pall Corporation http://www.pall.com/laboratory_34505.asp
- Sambrook, J, Russel, D.W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. 5.2-5.8, A 8.40-A 8.42, A 8.46.
- Sanchez-Puelles, J.M, Sanz, J.M, Garcia, J.L, Garcia, E. 1992. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE- cellulose. *Eur. J. Biochem.* 203, 153-159
- Sedelnikova, S.E. <http://www.proteincrystallography.org/>
- Store norske leksikon: <http://snl.no/spektrofotometer>
- http://www.snl.no/.sml_artikkel/EDTA
- Thermo scientific Pierce Protein Research Products
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=B06FFE8F-5056-8A76-4E15-AF49E5F5A91F>
- Todar,K, 2011, Todars online textbook of bacteriology
<http://www.textbookofbacteriology.net/S.pneumoniae.html>
- Tutorvista <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/nucleic-acids/griffith-effect.php>
- Wattelot, L., Meyrand, M., Gaide, N., Kharrat, P., Blugeon, S., Gratadoux, J.J., Flores, M.J., Langella, P., Chopot-Chartier, M.P., Bermúdez-Humarán, L.G. 2010. Variations of N-acetylation level of peptidoglykan do not influence persistence of *Lactococcus lactis* in the gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 29-34.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J. 2008. Prescott, Harley, and Klein`s *Microbiology*. s 249
- Zhou, X.X., Li, W.F., Ma, G.X, Pan, Y.J. 2006. The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements. *Biotechnology Advances* 24. 285-295.