

STUDIER AV IMMUNITETSPROTEINET ComM HOS
Streptococcus pneumoniae

STUDIES ON THE IMMUNITY PROTEIN ComM IN
Streptococcus pneumoniae

Thura Akrem Omran

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM)
Masteroppgave 60 stp. 2013



Forord

Denne oppgaven ble gjennomført som en del av to-årlige masterstudiet i mikrobiologi ved Universitet for Miljø- og Biovitenskap (UMB). Arbeidet ble utført ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM), seksjon for molekylær mikrobiologi i periode august 2012 til mai 2013.

Jeg vil rette først en stor takk til min hovedveileder Prof. Leiv Sigve Håvarstein, for at jeg fikk gjennomføre min masteroppgave i hans gruppe, god oppfølging og teoretisk veiledning. Det har vært en ære for meg.

Jeg vil også rette en spesiell takk til Dr. Daniel Straume for en særdeles god veiledning gjennom lab-arbeidet og i skriveprosessen. Takk for at har vært der når jeg trengte, alt hjelp jeg fikk og at du svarte på alle mine spørsmål. Det har vært en inspirerende å samarbeide med deg og jeg har lært veldig mye dette året takket være deg.

En stor takk til stipendiater Gro Stamsås og Kari Helene Berg for at dere har tatt imot meg og vært der når jeg trengte det. Takk for den hyggelig tiden og ønsker dere lykke til med deres prosjekter.

Ellers vil jeg takke alle på laben for god hjelp og samarbeid under lab-arbeidet.

Til slutt og aller mest vil jeg takke min familie og spesiell takk til min mor for alt støtte, tålmodighet og oppmuntring under arbeidet med denne oppgaven.

Thura Akrem Omran

Ås, mai 2013

Forkortelser

aa	Amino acid (aminosyre)
ATP	Adenosin 5'-trifosfat
bp	Basepar
CbpD	Choline-binding protein D
ComS*	Kompetanse stimulerende peptid i <i>S. thermophilus</i>
CSP-1	kompetanse stimulerende peptid Peptid i <i>S. pneumoniae</i>
dsDNA	Double stranded DNA (dobblettrådet DNA)
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EtBr	Etidiumbromid
Km ^{S/R}	Kanamycin sensitiv/resistent
MQ	Milli-Q
OD	Optical Density
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-galactoside
PCR	Polymerase chain reaction
PG	PeptidoGlykan
PVDF	Polyvinylidenfluorid membran
Sm ^{S/R}	Streptomycin sensitiv/resistent
ssDNA	Single stranded DNA (enkelttrådet DNA)
TAE-buffer	Tris-acetate-EDTA buffer
TBS(T)	Tris-buffered saline (Tween 20)
Tm	Smeltepunktet til et oligonukleotid
UV	Ultraviolet
WT	Villtype

Sammendrag

Streptococcus pneumoniae er kompetente for naturlig genetisk transformasjon, og har evnen til å ta opp DNA fra omgivelsen og inkorporere dette i sitt eget genom ved homolog rekombinasjon. Kompetansen er en forbigående tilstand som er strengt regulert av konsentrasjonen til et umodifisert signalpeptid (feromon) gjennom en quorum sensing mekanisme. Denne mekanismen er viktig for spredning av antibiotikaresistens- og virulensgener. Dette er et problem i forbindelse med behandling og vaksineutvikling.

Under kompetansen produserer cellene murinhydrolasen CbpD for å lysere andre ikke kompetente nær slektende streptokokker. Lysis av målcellene frigjør homologt DNA for transformasjon. Denne mekanismen kalles fratricide (brodermord). Kompetente *S. pneumoniae* beskytter seg mot celleveggsdegradering forårsaket av CbpD ved å produsere immunitetsproteinet ComM. ComM er kompetanse regulert og er en del av såkalte tidlig kompetanse gener. ComM er predikert å være et integralt membranprotein, men mekanismen bak immunitet er ennå ukjent. Målet med denne oppgaven var å utvikle et verktøy for å kunne detektere ComM, samt og øke forståelsen av hvordan funksjonen til ComM er regulert.

Gjennom dette prosjektet ble transkripsjonen av *comM* kontrollert ved hjelp av ComRS-systemet utviklet av Berg et al (2011). Ved å plassere *comM* bak promotor P_{comX} ble uttrykket av ComM kontrollert ved hjelp av induksjonspeptidet ComS* på en doseavhengig måte. Det ble påvist at nivået av ComM i cellene er kritisk for at de skal bli immune mot CbpD. For høye konsentrasjoner av ComM hadde en tydelig toksisk effekt på cellene, spesielt morfologiske endringer. For å detektere ComM ble det fusjonert med en Flag-tag, og ved hjelp av immunoblotting ble uttrykk av ComM for første gang detektert. Deteksjonen viste at i tillegg til fullengde Flag-tagget ComM ble det også detektert flere mindre degraderingsprodukter. Dette indikerte at ComM brytes raskt ned i cellen, noe som stemmer godt med observasjonen at akkumulering av ComM er veldig toksisk for cellene.

For å få en idé om hvilke proteaser som kunne være involvert i ComM-degradering ble fire potensielle kandidater studert. Disse var serin proteasen HtrA og sink proteasene HtpX, RseP og FtsH. Delesjon av RseP resulterte i en signifikant reduksjon av ComM degradering. Dette var en sterk indikasjon på at RseP er involvert i degraderingen og turnover av ComM for at nivået av ComM ikke skal nå toksiske konsentrasjoner under kompetanse.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is competent for natural genetic transformation, and it has the ability to take up DNA from the environment and incorporate it in its own genome by homologous recombination. Competence is a transient state that is strictly regulated by the concentration of an unmodified signal peptide (pheromone) through a quorum sensing mechanism. This mechanism is important for the spread of antibiotic resistance and virulence genes. This is a problem related to treatment and vaccine development.

During competence cells produce the murin-hydrolase CbpD to lysis closely related streptococci. Lysis of target cells would free homologous DNA for transformation. This mechanism is called fratricide. Competent *S. pneumoniae* protects itself against cell wall degradation, caused by CbpD, by producing the immunity protein ComM. ComM are competence regulated and it is a part of the early competence genes. ComM is predicted to be an integral membrane protein, but the mechanism of immunity is not yet known.

The aim of this study was to develop a tool to detect ComM and expand our knowledge of how ComM is regulated. Through this project, the transcription of ComM was controlled by ComRS-system developed by Berg et al (2011). By placing ComM behind promoter P_{comX} the expression of ComM was controlled by induction peptide ComS* in a dose-dependent manner. It was demonstrated that the level of the ComM in the cells is critical to be immune from CbpD. Excessive amounts of ComM had a significant toxic effect on pneumococci, especially morphological changes. In order to detect ComM, the protein was labelled with a Flag-tag. By immunoblotting Flag tagged ComM was detected for the first time. It was shown that in addition to full length Flag-tagged ComM, several smaller degradation products was also present in the cells. This indicates that the ComM degrades rapidly in the cell, which corresponds well with the observation that an accumulation of ComM is toxic to cells.

To get an idea of the proteases that could be involved in ComM-degradation, four potential candidates were studied. These were the serine protease HtrA and zinc proteases HtpX, RseP and FtsH. Deletion of RseP resulted in a significant reduction of ComM degradation. This indicated that RseP somehow is involved in the degradation and turnover of ComM so that the level of ComM do not reach toxic concentrations during competence.

Innholdsfortegnelse

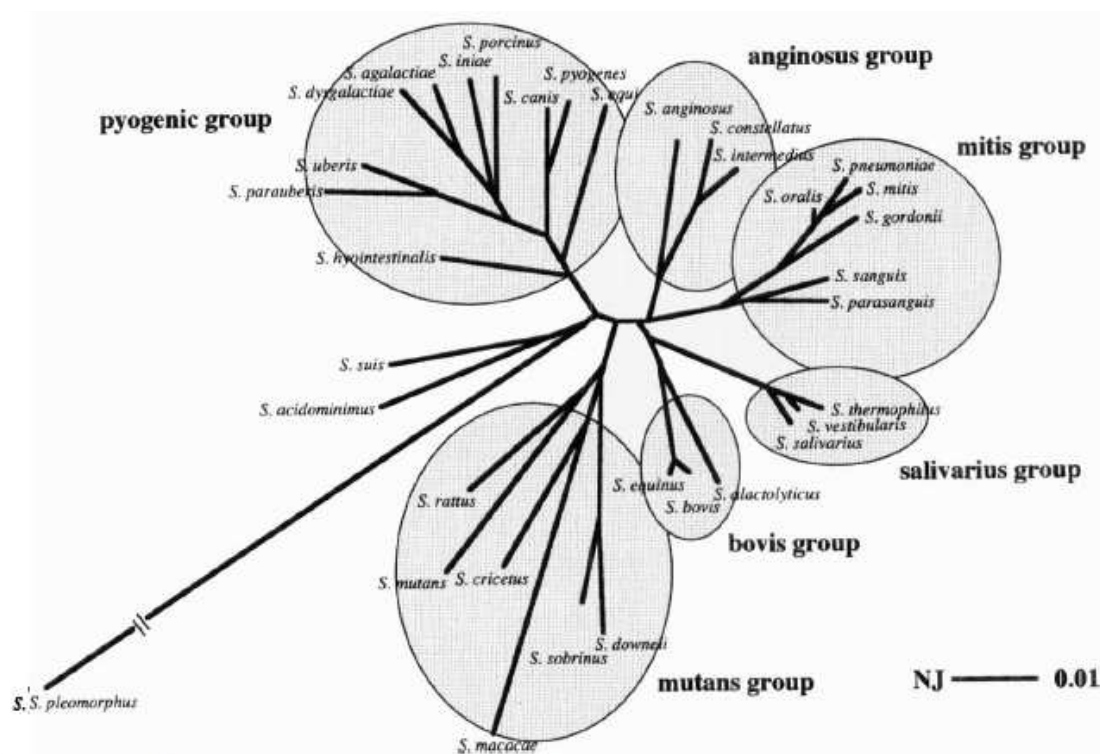
Forord.....	2
Forkortelser	3
Sammendrag	4
Abstract.....	5
1. Innledning	8
1.1 Generelt om slekten <i>Streptococcus</i>	8
1.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
1.2 Horisontal genoverføring.....	11
1.2.1 Naturlig genetisk transformasjon.....	12
1.3 Induksjon av naturlig kompetanse hos <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
1.4 Fratricide (brodermord)	15
1.4.1 Kort om oppbygning av cellevegg i <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
1.4.2 CbpD.....	18
1.5 Immunitetsproteinene ComM	19
1.6 Oppgavens målsetning	21
2. Materialer	22
2.1 <i>S. pneumoniae</i>-stammer.....	22
2.2 Primere og plasmid og peptidoforon	23
2.3 Molekylvektsstandarder, enzymer og nukleotider	26
2.4 Antibiotika.....	26
2.5 Kjemikaler	27
2.6 Utstyr og maskiner	29
2.7 Dyrkningsmedier, løsninger og buffere	30
2.7.1 C-medium	30
2.7.2 TH-agarskål.....	32
2.7.3 Løsninger til β -galaktosidase-assay	32
2.7.4 Løsninger og buffere for støping av SDS-PAGE geler	33
2.7.4.1 Løsninger brukt ved SDS-PAGE.....	34
2.7.4.2 Løsninger brukt ved Coomassie-farging av gel	34
2.7.5 Løsninger og buffere for Western blot.....	35
2.7.6 Løsninger og buffere til agarose-gelelektroforese:	35
2.7.7 Løsningen til cellefiksering for DIC/ Fluorosensmikroskop.....	36
2.7.8 Løsninger og buffer for formaldehyd kryssbinding.....	37
3. Metoder	38
3.1 Oppbevaring og dyrkning av <i>S. pneumoniae</i>.....	38
3.1.1 Frysestock og langtidsoppbevaring	38
3.2 Polymerase kjedereaksjon / Polymerase Chain Reaction (PCR).....	39
3.2.1 Overlapp ekstensjon-PCR.....	40
3.2.2 Prosedyren for PCR-amplifisering av DNA	42
3.2.3 Primer design.....	44
3.3 Agarosegel elektroforese	44
3.3.1 Prosedyren for agarosegel elektroforese	45
3.3.2 DNA-Gelekstraksjon med NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (NucleoSpin® 2012).....	46
3.4 Transformasjon av <i>S. pneumoniae</i>.....	47
3.4.1 prosedyren for transformasjon av <i>S. pneumoniae</i>	47
3.4.2 Janus-kassetten.....	48
3.5 Flag-tag	49
3.6 β-galaktosidase assay	50
3.6.1 Prosedyre β -galaktosidase assay	51
3.7 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)	52
3.7.1 Prøvepreparering for SDS-PAGE	52
3.7.2 Prosedyre for støping av SDS-PAGE gel	53
3.7.3 Coomassiefarging.....	54
3.8 Western blotting (immunblotting)	55

3.8.1	Prosedyre for Western blotting	56
3.9	Differensial interferens kontrast (DIC) og fluorescens mikroskopi	57
3.9.1	prosedyre for fiksering av celler til DIC og fluorescens	58
3.10	<i>in vivo</i> formaldehyd kryssbinding	59
3.10.1	Prosedyre for formaldehyd kryssbinding.....	59
4.	Resultater	60
4.1	Riktig mengde ComM er kritisk for immunitet mot CbpD i kompetente pneumokokker	60
4.2	Merking ComM-proteinet med Flag-Tag™	62
4.2.1	Plassering av FLAG-tag i ComM	63
4.2.2	Konstruksjon av Flag-tagget ComM	64
4.3	Funksjonalitet til 1x, 2x og 3x-Flag-ComM.....	68
4.4	Overuttrykk av 3xFlag-ComM fører til unormal morfologi hos <i>S. pneumoniae</i>	70
4.5	Immunodeteksjon av 3xFlag- ComM	71
4.6	Lokalisering av 3xFlag-ComM ved fluorescensmikroskopi.....	72
4.7	Identifisering av proteaser involvert i ComM-degradering.	74
4.7.1	Putative sink metalloprotease <i>spr0242</i> i <i>S. pneumoniae</i> R6.....	74
4.7.2	Varmesjokk protein HtpX gen <i>spr1162</i>	75
4.7.3	Celledeling protease <i>spr0012</i> FtsH	75
4.7.4	Serine protease, HtrA(<i>spr2045</i>).....	75
4.7.5	Konstruksjon av $\Delta rseP$, $\Delta htpX$, $\Delta ftsH$ og $\Delta htrA$	76
4.7.6	Påvirkes degraderingen av 3xFlag-ComM ved fravær av RseP, HtpX eller HtrA?	77
4.8	RseP er involvert i degradering av ComM	79
4.9	Lavere <i>comM</i>-uttrykk behøves for å gi immunitet mot CbpD etter fjerning av RseP.....	80
4.10	β-galaktosidase-assay av mutant ($\Delta comM_{wt}::comM_{3xFlag}$).....	82
4.10.1	Immunoblotting av mutanten ($\Delta comM_{wt}::3xFlag-comM$)	83
4.10.2	Delesjon av <i>rseP</i> fra stammen th010 ($\Delta comM_{wt}::comM_{3xFlag}$)	84
4.10.3	β -galaktosidase-assay av $\Delta rseP$ -mutant	84
4.10.4	Immunoblotting av mutanten ($\Delta comM_{wt}::comM_{3xFlag}$, $\Delta rseP$)	85
4.11	Konkurrans-assay av ComM inaktivert/ punktmutert	86
4.11.1	β -galaktosidase-assay av mutanter ($\Delta comM_{wt}$, 191HèA $comM_{PcomX}$) og ($\Delta comM_{wt}$, SSA-0195 $comM_{PcomX}$)	87
4.12	Formaldehyd kryssbinding av ComM	89
5.	Diskusjon	91
5.1	Konsentrasjonen av ComM er kritiske for å gi full immunitet mot CbpD.	91
5.2	ComM blir utsatt for proteolytisk degradering.	93
5.3	Proteolytisk kløyving av 3xFlag-ComM.	94
5.4	Konkurrans-assay av ComM.....	96
5.5	Mengde ComM er avgjørende for immunoblotting deteksjon	97
5.6	Interagerer ComM med andre proteiner?	97
6.	Konklusjon og videre arbeid.....	98
7.	Referanser	99
8.	Vedlegg	104
Vedlegg A:	Aminosyre- og nukleotidsekvens av ComM/<i>comM</i> i <i>S. pneumoniae</i> R6	104
Vedlegg B	1,2,3xFlag-<i>comM</i> sekvens.....	105
Vedlegg C:	Aminosyrer	106

1. Innledning

1.1 Generelt om slekten *Streptococcus*

Slekten *Streptococcus* tilhører klassen Firmicutes og er Gram-positive, sfæriske/runde eller ovale bakterier som vokser i par eller i korte kjeder. *Streptococcus* er ikke sporedannende eller bevegelige og har et lavt GC innhold (33-46%) i genomet. De er fakultative anaerobe, dvs at de vokser anaerobt, men tåler nærvær av oksygen. *Streptococcus* er kjemoorganotrofe homofermentative og danner melkesyre som endeprodukt av glukosefermentering (Hardie and Whiley 1997). Det er også viktig å vite ved identifisering av *Streptococcus* at bakterien er katalase og oksidase negative. Bakterier innen slekten *Streptococcus* er utbredt hovedsakelig i slimhinnene, overflater av mennesker og dyr, fordøyelse/tarmsystem, men kan også finnes i jord, vann, meieri produkter og andre matvarer (Hardie and Whiley 1997).



Figur 1.1: Fylogenetisk tre for slekten *Streptococcus*. Figuren viser at slekten er delt inn i seks forskjellige grupper og viser slektskap til 34 streptokokker basert på 16S rRNA. *S. pneumoniae* tilhører mitis gruppen. Figuren er hentet fra Kawamura *et al.* (1995).

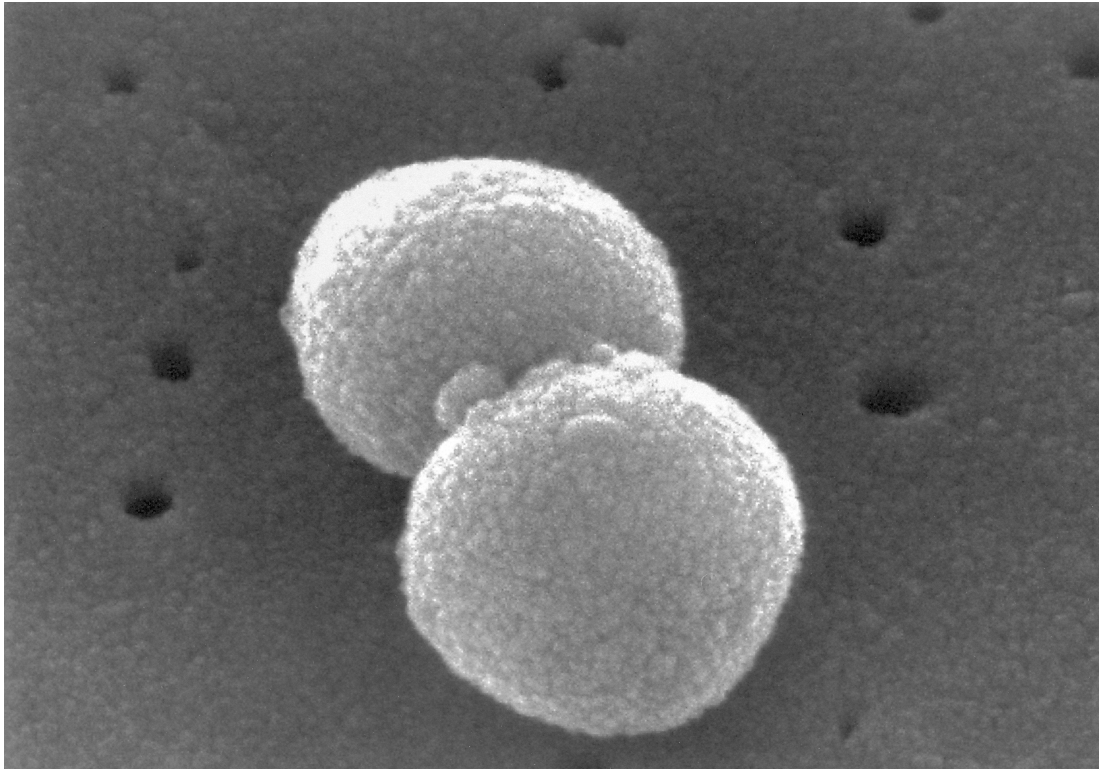
Differensiering av de forskjellige *Streptococcus*-artene var et viktig tema i mange år før 16S-rRNA-sekvensering metoder ble utviklet. Forskerne prøvde å finne en rask og effektiv metode hvordan de kunne identifisere *Streptococcus*-arter, samt differensiere mellom de forskjellige stammer. Dette startet i 1903 av Shottmuller. Han brukte blodagar for å skille beta-hemolytiske *Streptococcus* fra andre *Streptococcus* arter. Frem til 1933 ble også gjæring og toleransetest brukt til dette formålet. I året 1933 demonstrerte Lancefield de spesifikke karbohydrat "gruppe" antigener som befant seg i beta-hemolytiske stammer. Disse antigener ble kalt for (A, B, C, D, E, F og G). I 1937 forslo Sherman en ordning for å plassere Streptococci i fire kategorier. Disse fire kategoriene ble delt etter hemolytisk reaksjon, karbohydrat grupper (antigener) og fenotypiske tester. Kategoriene eller divisjoner var delt i pyogenic divisjoen, viridans divisjon, melkesyre divisjon og enterokokker. Pynogenic divisjon inkludert beta-hemolytiske stammer med bestemte gruppe antigener (A, B, C, E, F og G) (Facklam 2002). Senere ble *Streptococcus* delt i seks hovedgrupper basert på 16S-rRNA-sekvensering. Disse er pyogenic-, mitis-, salivarius-, bovis-, anginosus- og mutans-grupper (Hardie and Whiley 1997). I følge denne klassifiseringen ble *S. pneumoniae* plassert i mitis-gruppen (Figur 1.1) sammen med andre streptokokkarter som koloniserer de øvre luftveiene (Kilian, Poulsen et al. 2008)

1.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Noen arter av *Streptococcus* er grundig studert. En av disse er *Streptococcus pneumoniae* som er en av de viktigste humanpatogene bakterier. *S. pneumoniae*, også kalt pneumokokker, finnes normalt i øvre del av luftveiene hos 5-10 % av friske voksne og 20-40 % hos friske barn (Ryan KJ 2004). Pneumokokker kan forårsake en rekke sykdommer som ørebetennelse, bihulebetennelse, bronkitt og lungebetennelse, samt være en dominerende årsak til hjernehinnebetennelse og bakteriemi (Jedrzejewski 2001). *S. pneumoniae* forårsaker over 100 millioner infeksjoner per år hvorav 1-2 millioner har dødelig utfall (Kadioglu, Weiser et al. 2008). Denne bakterien er blant annet en viktig årsak til barnedødelighet i utviklingsland (Obaro and Adegbola 2002).

Som andre arter i slekten *Streptococcus* er *S. pneumoniae* 1-2 µm lange 0,5-1 µm brede, celler opptrer ofte som par og kan også danne kortere kjeder (Figur 1.2) (Kilian, Poulsen et al. 2008). *S. pneumoniae* har flere virulensfaktorer som polysakkaridkapsel, IgA1-protease, cytotoxinet pneumolysin (Ply), autolysin (lytA) og en rekke overflateproteiner som gjør at

bakterien kan feste seg til vertens epitelceller. En av de viktigste virulensegenskapene til pneumokokker er polysakkaridkapselen. Polysakkaridkapselen syntetiseres av proteiner kodet av såkalte kapselgener, og den har en viktig funksjon i forhold til å unngå immunforsvaret ved en infeksjon (Garcia-Suarez, Vazquez et al. 2006). Ulike pneumokokkstammer kan ha flere variasjoner i oppbygningen av kapselen som klassifiseres i såkalte serotyper. Hva slags serotype en pneumokokk har avhenger av hva slags kapselgener bakterien har i genomet.



Figur 1.2 *Streptococcus pneumoniae*. Elektronmikroskop bilde som viser diplokokkstruktur av pneumokokker. Størrelse er 1-2 μm lange 0,5-1 μm brede. Bildet er hentet fra internett (wikipedia)

Siden kapselgenene ligger samlet i ett operon på genomet muliggjør dette utveksling av disse genene mellom stammer av ulike serotyper (Garcia-Suarez, Vazquez et al. 2006). Slik kan pneumokokker hyppig endre serotype. Hittil er det identifisert mer enn 90 ulike serotyper blant pneumokokker (Brito, Ramirez et al. 2003). De fleste pneumokokkvaksiner som brukes i dag er rettet mot polysakkaridkapsel til sykdomskallende pneumokokker. I Norge ble en 7-valent polysakkarid-protein konjugatvaksine (PCV-7) lisensiert i 2001. I 2006 ble denne innført som en del av barnevaksinasjonsprogrammet i Norge og ga gode resultater (Vestheim, Lovoll et al. 2008). Likevel står dagens pneumokokkvaksiner ovenfor flere

utfordringer som; serotypeskift og overføring av andre virulensgener ved naturlig transformasjon (Brueggemann, Pai et al. 2007)

Pneumokokkinfeksjoner blir behandlet med antibiotika spesielt penicilliner (β -laktamer). Penicillin, som hemmer celleveggsyntesen hos bakterier, er normalt meget effektivt for å behandle pneumokokkinfeksjoner, men på grunn av omfattende bruk av antibiotika siden 1940-tallet og frem til i dag har mange pneumokokkstammer utviklet antibiotikaresistens (Tomasz 1997). Allerede i 1967 kom den første rapporten om penicillinresistente pneumokokker i Australia (Jamal, Tirathram et al. 1983). De siste årene har det blitt registrert en betydelig økning i antall tilfeller av antibiotikaresistente pneumokokker verden over. Tilfeller av såkalt multiresistents, det vil si resistens mot to eller flere antimikrobielle stoffer, har også blitt registrert (Jenkins, Brown et al. 2008). Økning av antall multiresistente pneumokokker skyldes i stor grad den unike evnen *S. pneumoniae* har til å overføre/ta opp gener fra miljø og nært beslektede streptokokker. Et eksempel på dette er forandringer i PBP (Penicillinbindende proteiner). Det er beskrevet flere punktmutering i det penicillinbindende domenet til ulike PBPer som fører til at affiniteten for β -laktamantibiotika reduseres (Spratt 1994). Man antar at slike mutasjoner har først oppstått i *S. oralis* og *S. mitis* ved eksponering for β -laktamer og at disse genene har blitt overført ved naturlig transformasjon til pneumokokker ved et senere tidspunkt. Sekvenslikheten mellom penicillinbindende domener hos PBPer i *S. oralis* og *S. mitis* og tilsvarende domene hos PBPer i penicillinresistente pneumokokker styrker hypotesen om at det har skjedd genutveksling av *pbp*-gener fra *S. oralis* og *S. mitis* til *S. pneumoniae* (Johnsborg and Havarstein 2009b).

1.2 Horisontal genoverføring

Horisontal genoverføring er overføring av genetisk materiale fra en organisme til en annen uten at det involverer nedarving til avkom. Horisontal genoverføring i bakterier kan skje gjennom et av tre følgende genetiske overføringsmekanismer: naturlig genetisk transformasjon, konjugasjon eller transduksjon (Tenover 2006). Forandring av arvestoffet på grunn av mutasjoner eller horisontal overføring, kan gi bakterien nye egenskaper som kan være fordelaktige for levedyktigheten. Et eksempel på dette er ervervelse av gener som gir bakterien resistens mot bestemte typer antibiotika. Dette kalles for ervervet resistens. Disse

egenskapene har stor betydning for bakterien slik at den kan overleve i nærvær av antibakterielle midler.

Transduksjon er overføring av DNA fra en celle til en annen via bakteriofager (virus). Overføring av DNA skjer ved at en bakterie produserer bakteriofag med nye gener, hvor de ble injisert i en annen bakterie. Transduksjon er et eksempel på horisontal genoverføring, men overføringen kan være begrenset/spesifikk på grunn av spesifisiteten hos bakterievirus (Maiden 1998)

Konjugasjon er overføring av plasmider eller deler av et kromosom fra en bakteriecelle til en annen gjennom cellekontakt. Konjugasjon skjer ved at to bakterier, en donor og en akseptorcelle, lager en såkalt pilus mellom hverandre (konjugasjonsbro). På denne måten kan bakteriene utveksle ulike gener/plasmider (Tenover 2006).

Transformasjon er innføring av et fremmed DNA i en celle. Bakterier har evne til å ta opp naken-DNA fra lyserte celler i nære miljø. Transformasjon ble først påvist av Griffith i 1928, og Oswald Avery og hans kollegaer viste senere i 1944 at det var DNA som ble tatt opp av de transformerte cellene. Alle mulige genetiske egenskaper kan overføres på denne måten (Ryan KJ 2004).

1.2.1 Naturlig genetisk transformasjon

Naturlig genetisk transformasjon er evnen noen bakterier har til å aktivt ta opp ekstracellulært DNA. Denne mekanismen er viktig for horisontal genoverføring. En annen potensiell fordel av naturlig transformasjon, er at eksogent DNA kan brukes som næringskilde for bakterier. Derfor er evnen til å "spise" DNA fordelaktig for konkurransedyktig overlevelse i miljøer som inneholder begrenset tilgang på næringsstoffer (Claverys, Martin et al. 2009)

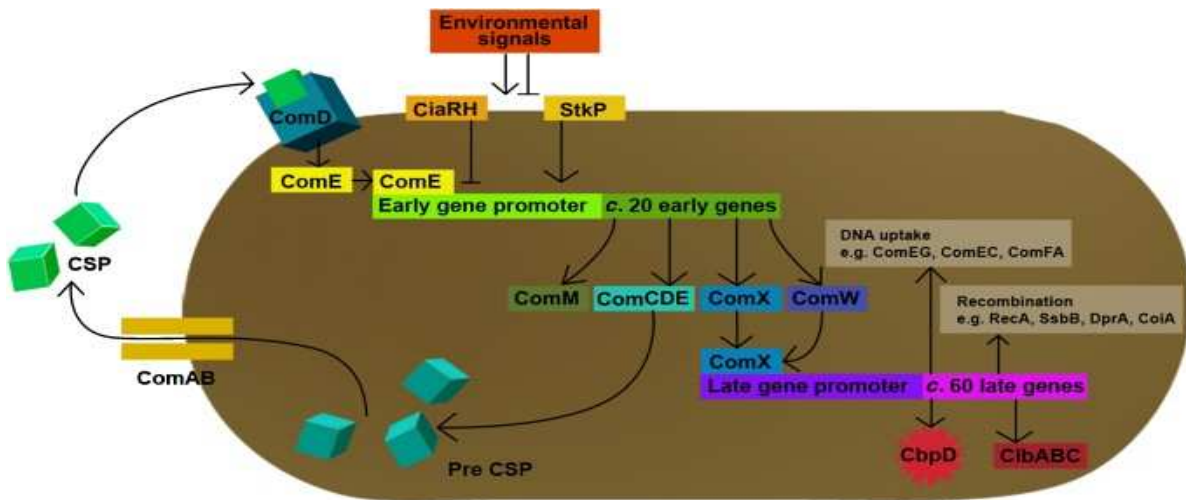
Naturlig kompetanse, en fysiologisk tilstand der bakterier er i stand til å ta opp eksogene DNA, for eksempel i *S. pneumoniae*, *S. mitis* og *S. oralis*, *Neisseria gonorrhoeae* og *Bacillus subtilis* (Johnsborg and Havarstein 2009b). Kompetente bakterier vil gjenkjenne og binde nakent dsDNA som finnes i sitt miljø, og transportere DNAet som ssDNA over membranen inn i cytoplasma. Når DNA-fragmentet er tatt opp av en kompetent bakterie settes det inn i

cellens kromosom ved rekombinasjon. Dette kan permanent endre cellens genotype (Johnsborg and Havarstein 2009b).

Det ble tidligere antatt at genetisk materiale som ble tatt opp av kompetente bakterier som *S. pneumoniae* kom bare fra lyserte, døde bakterier. Det viste seg at denne teorien ikke stemmer i alle tilfeller (Johnsborg, Eldholm et al. 2008). Nyere forskning har vist at mange kompetente bakterier har evnen til og regulere kompetanse via autoregulatoriske systemer kalt beslutningsdyktig-sensing eller quorum-sensing (Claverys and Havarstein 2002). Quorum-sensing system overvåker celletetthet på en indirekte måte, nemlig ved å måle konsentrasjon av spesifikke signalmolekyler som skilles ut av cellene. De vanligste signalmolekyler som finnes i Gram-positive bakterier er umodifiserte oligopeptider og post-translatert modifiserte oligopeptider. Disse peptidferomoner kontrollerer flere ulike biologiske prosesser, for eksempel naturlig genetisk transformasjon, bakteriocin produksjon, virulens, sporulering, og biofilmdannelse (Claverys and Havarstein 2002). Utviklingen og regulering av kompetanse kan være betydelig varierende mellom arter, men som ofte innebærer det celle-celle kommunikasjon ved hjelp av spesifikke peptidferomoner (Johnsborg, Eldholm et al. 2007). Quorum sensing er en måte bakterier kan kommunisere og koordinere genuttrykk i respons på ekstracellulære signaler.

1.3 Induksjon av naturlig kompetanse hos *Streptococcus pneumoniae*

Naturlig kompetanse har blitt studert mest i *S. pneumoniae* (Johnsborg, Eldholm et al. 2007). Helt siden Griffith oppdaget fenomenet transformasjon hos *S. pneumoniae* i 1928 har forskere forsøkt å avdekke hvilke faktorer som trigger bakterien til å ta opp ekstracellulært DNA. Gjennombruddet for å forstå hvordan pneumokokker regulerer kompetanse kom først i 1995 da Havarstein et al oppdaget at kompetanse hos pneumokokker blir slått på ved hjelp av et peptideferomon via en quorum sensing-basert mekanisme. Peptidferomonet kalt «competence inducing peptide» (CSP) sekreteres og registreres av bakteriene i nærheten og ved en kritisk konsentrasjon trigges en autoinduserende signalkaskade hos produsentcellen så vel som hos naboceller av samme art eller nær slekt.



Figur 1.3 fremstilling av kompetanse regulering mekanismen i *S. pneumoniae*. Regulering skjer først med basal transkripsjon av genet *comC* som koder for CSP og transporters ut av cellen gjennom membrantransport proteinetkomplekset ComAB. CSP vil binde reseptor ComD. Dette vil videre påføre fosforelering av ComE. ComE-p vil binde seg til promotoren til tidlige gen oppon og aktivere transkripsjon av ca 20 gener. Fosforylert ComE aktiverer uttrykk av den alternative sigma faktor ComX og andre tidlige kompetanse gener. ComX aktiverer deretter transkripsjon på sene (late) kompetanse gener, hvorav noen koder for proteiner involvert i DNA prosessering, opptak, og rekombinasjon. Det vil også transkriperet ComW og ComM som koder for fratricide (brodermord) og celle immunitet (Johnsborg and Havarstein 2009b).

Signalkaskaden ender med at transkripsjonen av et sett spesifikke gener skrur på. Kompetanse i *S. pneumoniae* aktiveres ved at et umodifisert peptidferomon kalt kompetansestimuleringspeptid (CSP) sekreteres via sekresjonsapparatet ComAB (Figure 1.3). CSP produseres først ved et lavt basalnivå, men det lokale nivået av ekstracellulært CSP vil øke i takt med celletettheten (Johnsborg, Eldholm et al. 2007). Ved en kritisk konsentrasjon vil CSP binde til den transmembrane histidine kinasen ComD. Binding av CSP til ComD reseptor fører til autofosforylering av ComD etterfulgt av overføring av en fosforylgruppe til respons regulatoren ComE som da blir aktiv (Johnsborg, Eldholm et al. 2007). ComD og ComE danner et to-komponent system som overvåker og reagere på konsentrasjon av ekstracellulær CSP (Johnsborg and Havarstein 2009b). Aktivt ComE fungerer som en transkripsjonsfaktor (aktivator) og binder seg til et sett promotorer på genomet for å aktivere transkripsjon. (Johnsborg and Havarstein 2009b). ComE-P aktiverer uttrykk av 20 såkalte tidlige gener som inkluderer *comX*, *comW* og immunitetsgenet *comM* (Johnsborg and Havarstein 2009b), (Claverys and Havarstein 2002). Transkripsjon av sene gener er avhengig av uttrykk av ComX i tidlig gener. ComX er en alternativ sigma faktor som aktiverer uttrykk av sene gener. Ved aktivering av ComX-promoterer, vil det bli uttrykt ca 60

gener. En del av disse er ansvarlig for opptak (*comEC*) av eksogent DNA og rekombinasjon (*recABCD*) (Johnsborg, Eldholm et al. 2007). ComW som er kodet av et tidlig kompetanse gen, har evnen til å hindre nedbrytning av ComX. Den er involvert i regulering av ComX-aktivitet og eventuelt endre ComX til aktiv form. Siden ComW er regulert av ComE-P er det viktig verktøy for å hindre cellen i å indukere kompetanse ved feil tid eller sted (Johnsborg and Havarstein 2009b).

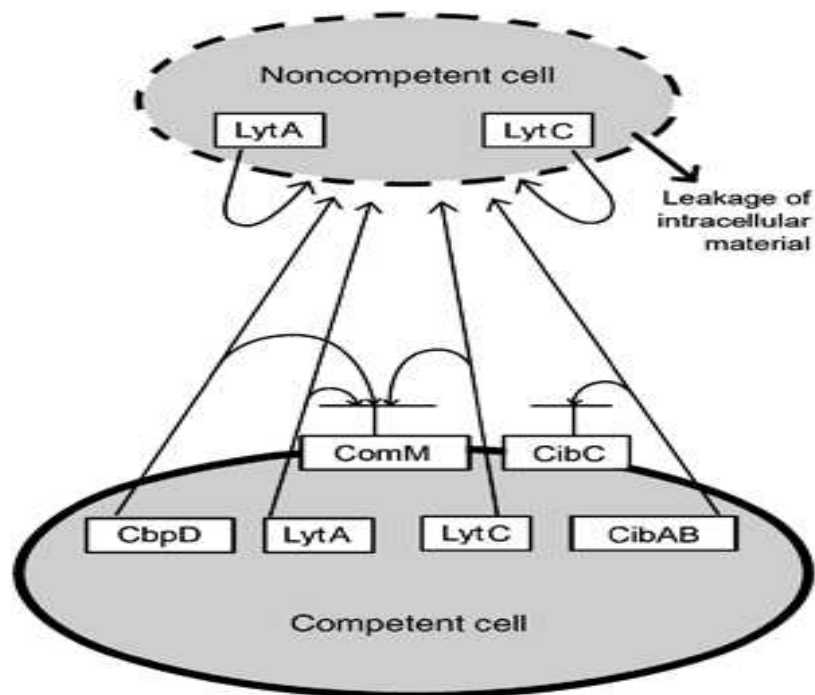
1.4 Fratricide (brodermord).

Under kompetanse produserer *S. pneumoniae* murein hydrolasen CbpD som dreper og lyserer ikke kompetente pneumokokker og nært beslektede arter (Berg, Ohnstad et al. 2012). Deretter tar de kompetente cellene opp DNA fra lyserte celler og inkorporerer det i sitt eget genom via homolog rekombinasjon. Hele denne prosessen kalles fratricide (brodermord). *cbpD* og *comM* er de to sentrale gener som er direkte involvert i denne prosessen. Når pneumokokker utvikler den kompetente tilstanden, uttrykkes det og skilles ut et sent gen produktet CbpD. CbpD er en murein hydrolase og angriper celleveggen til ikke kompetente celler slik at de blir lysert og drept. Dette gjøres for å skaffe homologt DNA fra nært beslektede bakterier. kompetente *streptococcus* beskytter seg selv ved å produsere immunitetsprotein ComM. ComM er en membranprotein som nøytraliserer murein hydrolase aktiviteten CbpD med en ukjent mekanisme. Siden ComM er produktet av en tidlig kompetanse gen, vil det kun kompetente pneumokokker som har denne immunitet protein blir beskyttet mot CbpD (Berg, Ohnstad et al. 2012).

Lysering av ikke-kompetente celler er vist å være avhengig av aktiviteten til flere murein hydrolaser (CbpD, LytA og LytC), men CbpD er enzymet som spiller hovedrollen for fratricide (Kausmally et al 2005, Eldholm et al 2010). CbpD produseres kun av kompetente celler som angriper, mens autolysinene LytA og LytC kan produseres av kompetent og / eller målcellene. Studier indikerer at i tillegg til å lysere målceller på egenhånd, så angrep fra CbpD også utløse den lytiske aktiviteten til murein hydrolasen LytA og lysozymet LytC hos målcellen og på den måten effektivisere lyseringen (Figur 1.4). Kompetente celler beskytter seg mot virkningen til CbpD ved å produsere et immunitet protein, ComM. I tillegg er det observert at cellelysis forsterkes av to-peptid bakteriocin produksjonen CibAB. Denne bakteriocin

produksjonen er co-uttrykt med en bakteriocin immunitetsprotein CibC, som beskytter de kompetente cellene fra lyse på fast medium (Johnsborg, Eldholm et al. 2007).

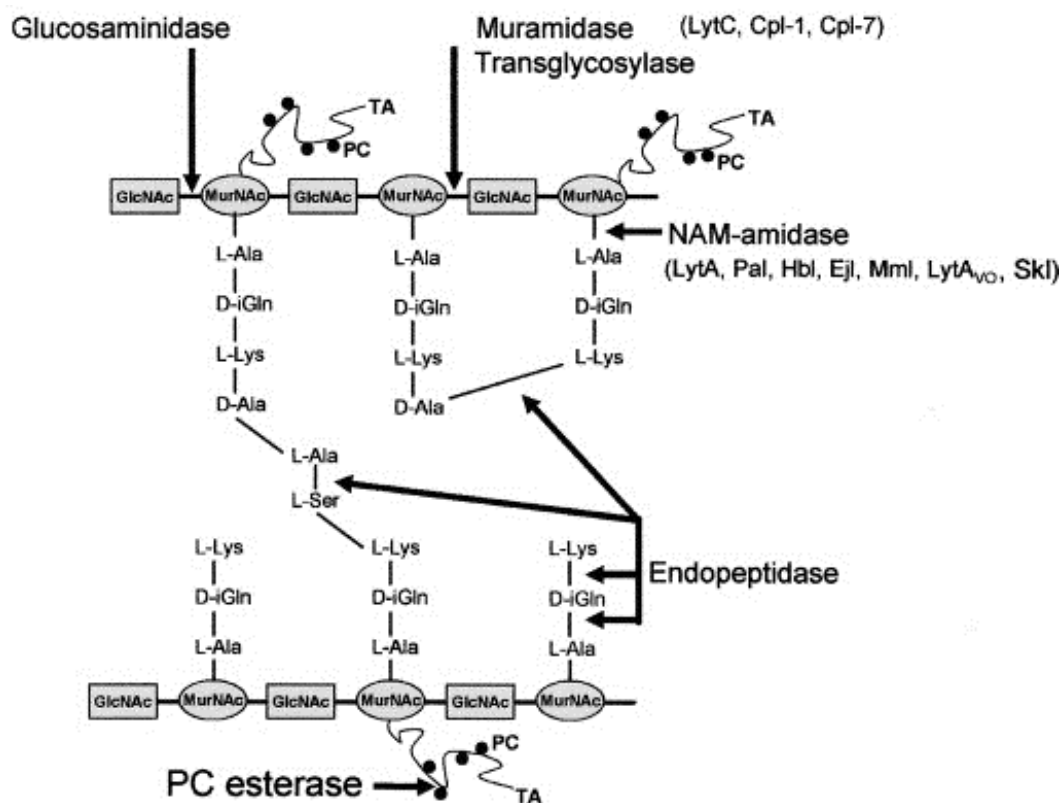
Mange Streptokokkarter har gener som koder for CbpD-lignende proteiner. I tillegg finner man et ComM-liknende protein hos disse bakteriene som kan være et immunitetsprotein. Dette tyder på at fratricide er en utbredt mekanisme hos streptokokker, og ikke bare for *S. pneumoniae* (Berg, Ohnstad et al. 2012).



Figur 1.4 Fratricide komponenter. Figuren viser skjematiske hvordan autolyseringsproteiner som CbpD, LytA, LytC (i flyttende medium) lysere celleveggen i ikke kompetente celler. Kompetente cellen beskytter seg med ComM-immunitetsproteinet. CibAB lysere celleveggen til ikke-kompetente cellen på fast medium og kompetente cellen beskytter seg selv med immunitetsproteinet CibC. I ikke-kompetente cellen blir LytA og LytC også aktivert trolig av CbpD/CibAB og dermed bidrar til lysing av cellen (Johnsborg and Havarstein 2009b).

1.4.1 Kort om oppbygning av cellevegg i *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae har en typisk cellevegg som Gram-positive bakterier, og består hovedsakelig av av murin som bygget opp av flere tykke peptidoglykan lag (murein) og teikoin syrer. Mureinlaget er bygget opp av glykankjeder som består av alternerende N-acetylglukosamin (NAG) og N-acetylmuraminsyre (NAM). Glykankjedene kryss bindes av pentapeptider med sekvensen L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala direkte eller via forgreining av pentapeptidene L-Ser-L-Ala eller L-Ala-L-Ala (Garcia-Bustos, Chait et al. 1987). Teikoin syrene, bestående hovedsakelig av ribitolkjeder og kolin, er enten koblet til N-acetylmuramic syre i peptidoglykanet (veggteikoin syre) eller til cellemembranen via et fosfolipid (lipoteikoin syre). Celleveggen består av 10-20 peptidoglykanlag. (Tomasz 1967).



Figur 1.5 Skjematisk fremstilling av *S. pneumoniae* celleveggen og mureinhydrolase-kuttseter. Peptidoglykan består av glykankjeder, cellevegg peptider, og kryss-broer (CB). Vanligvis er glykankjedene består av en gjentatt disakkarid, GlcNAc-MurNAc. Glykankjedene kryss bindes av pentapeptider med sekvensen L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala direkte eller via forgreining av pentapeptidene L-Ser-L-Ala eller L-Ala-L-Ala. Peptidoglykanet kjeder er forbundet ved kryss-broer. Figuren også viser kuttsetene cellevegg hydrolaser inkludert N-acetylmuramoyl-L-alanin amidasen LytA og N-acetylmuramidasen LytC. Kuttsete til CbpD er ikke kjent (Llull, Lopez et al. 2006).

Det er anslått at *S. pneumoniae* inneholder mer enn 500 overflateproteiner. Noen er membran-assosierte lipoproteiner, mens andre er fysisk forbundet til celleveggen. Overflateproteiner som er bundet til celleveggen inkluderer fem penicillin bindende proteiner (PBP), to neuraminidaser og en IgA-protease. En unik gruppe av proteiner i *S. pneumoniae* overflaten er kolin-bindende proteiner (CBPs). CBPs er ikke-kovalent bundet til kolin enheter som dekorerer teikoinsyrene i celleveggen (Kenneth Todar 2008-2012). CbpD, som er nøkkelenzymet som angriper celleveggen til ikke-kompetente celler, hører til i gruppen CBP og er helt avhengig av å binde til kolin på teikoinsyrene til målceller for å utøve sin aktivitet.

1.4.2 CbpD

CbpD er et sekretert protein som omfatter et N-terminal cystein, histidin-avhengig amidohydrolase/peptidase (CHAP) domene, to src-homology 3b (SH3b) domener og et C-terminalt kolin-bindende domene (CBD) (Eldholm, Johnsborg et al. 2010). CBD-domenet gjør at CbpD binder til overflaten på *S. pneumoniae* via kolin på teikoinsyrene. Denne bindingen er helt essensiell for at CbpD skal kunne utøve sin murein hydrolaseaktivitet.

Det N-terminale CHAP domenet mest sannsynlig funksjon enten som en amidase, som kløyver N-acetylmuramyl-L-Ala bindingen eller som en endopeptidase, som spalter innenfor peptiddelen av peptidoglykan. C-terminale ende av CbpD består av fire repeterte kolin-bindende motiver. Disse utgjør til sammen et kolin-bindende domene (CBD). (Sanchez-Puelles, Sanz et al. 1990). Mellom CHAP og CBD domenet inneholder CbpD to SH3b domener som er vist å binde til peptidoglykan delen av celleveggen (Eldholm, Johnsborg et al. 2010).

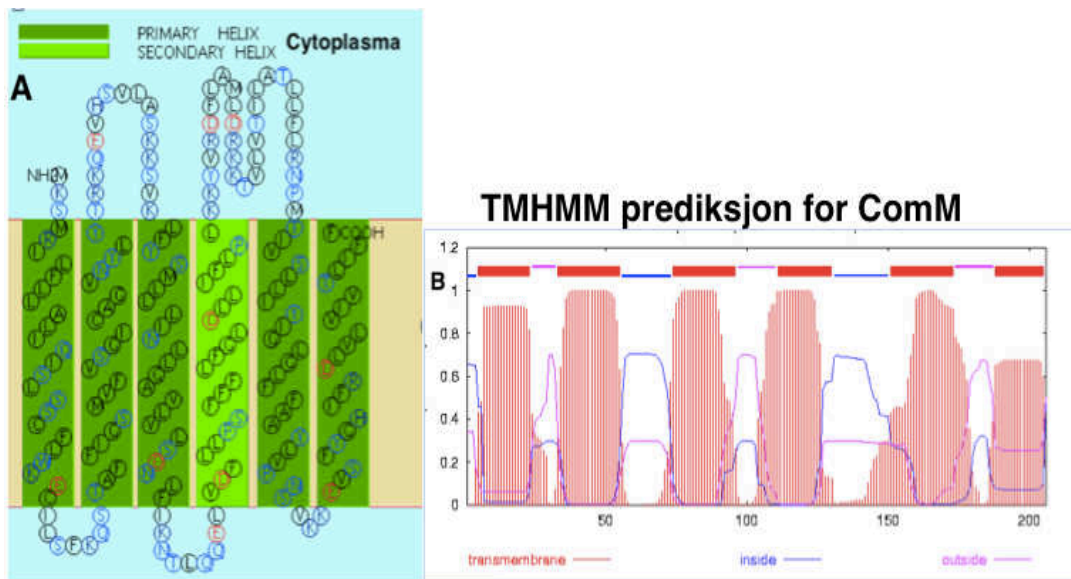
CbpD sin rolle i fratricidemekanisme ble påvist ved at kompetente celler mistet evnen til å lysere ikke-kompetente-celler uten CbpD tilstede (*ΔcbpD*) (Kausmally, Johnsborg et al. 2005). Ved fratricide vil CbpD sannsynlig trigge aktivitet av LytC og i tillegg frigjør og aktivere LytA som fører til lysis av ikke-kompetente celler. Både binding av CbpD til teikoinsyrene og til peptidoglykan via dets kolinbindende domenet og SH3b domene er essensielt for å få lysis av ikke-kompetente celler (Eldholm, Johnsborg et al. 2009). Resultater fra forskning utført av Eldholm et al (2010) indikerer også at CbpD fungerer mer effektivt når det er festet til den septum regionen enn når den binder til andre steder i celleveggen (Eldholm, Johnsborg et al. 2010).

1.5 Immunitetsproteinet ComM

CbpD lyserer kun celler som har kolin-enheter på teikoinsyrene i cellevegg. Dette begrenser utvalget av målceller for kompetente *S. pneumoniae* til andre ikke kompetente pneumokokker og nært beslektede streptococcus- (Eldholm, Johnsborg et al. 2010). Stammer som har lik cellevegg som pneumokokker er *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, (Kilian, Poulsen et al. 2008) (Berg, Biornstad et al. 2012). Dette gjør at *S. pneumoniae* får opptak av mest homolog DNA under kompetanse. Samtidig må *S. pneumoniae* beskytte sin cellevegg fra selvprodusert CbpD under kompetanse. Dette gjøres ved å uttrykke immunitetsproteinet ComM (Havarstein, Martin et al. 2006). *comM* er et tidlig gen under ComE regulering av kompetanse tilstand (Knutsen, Ween et al. 2004). Siden *comM* tilhører tidlig kompetanse gener, uttrykkes det ca 5 min før CbpD. Dette ville gi cellene tid å bli immune (Berg, Biornstad et al. 2012)

ComM kodes av genet *comM* (*spr1759*) og er en del av *comM*-operon som består av fire gener *comM* (*spr1762*), *spr1761*, *spr1760* og *lytR* (*spr1759*) (Havarstein, Martin et al. 2006). Under normal vekst transkriberes gene nedstrøms for *comM* *spr1761-spr1759* fra konstitutive promoter uavhengig av *comM*. Under kompetanse begynner *comM*-promoterer som er avhengig av ComE å uttrykke *comM*, samt oppreguleres transkripsjon av gener *spr1761*, *spr1760* og *lytR* (*spr1759*) (Johnsborg and Havarstein 2009). ComM beskytter cellen mot mureinhydrolyse aktiviteten forårsaket av CbpD med en ukjent mekanisme. ComM er et integralt membranprotein og inneholder 206 aminosyrer, men har ukjent struktur og har ingen nære homologer i proteindatabaser (Berg, Biornstad et al. 2012). Nukleotidsekvensen og proteinsekvens for *comM* /ComM ble gitt i vedlegg A.

Ved hjelp av en rekke dataprogrammer for prediksjon av membranproteintopologi ble det prediktert antall transmembranhelikser og deres orientering i membranen. Eksempler på topologiprediksjonsprogrammer SOSUI (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998) og TMHMM (Krogh, Larsson et al. 2001). Basert på disse programmene predikeres ComM å ha en topologi som består av seks transmembranhelikser med både N-terminal og C-terminal passert inn i cytoplasma (Figur 1.6).



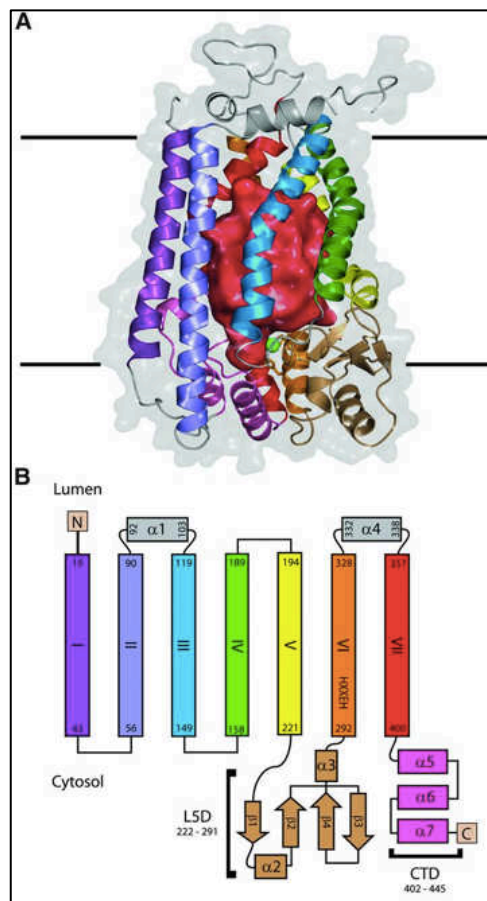
Figur 1.6 Topologiprediksjon av ComM. Figuren viser topologiprediksjon av ComM med to prediksjonsprogrammer. (A) Programmet SOSUI (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998), viser at ComM proteinet har seks transmembran helikser. Det ser ut som ComM har en N-terminal som starter inn i cytoplasma og C-terminal som også slutter inn i cytoplasma. (B) Programmet TMHMM (Krogh, Larsson et al. 2001) predikere også at ComM har seks transmembran helikser. Dette samsvarer med prediksjon fra SOSUI i A.

ComM proteinsekvens har likheter med en gruppe integral membranproteiner kalt CAAX amino-terminal protease. Hos eukaryoter er CAAX proteaser (hvor C er cystein, A er vanligvis en alifatisk aminosyre og X er en hvilken som helst residus) lokalisert i membranen av det endoplasmatiske retikulum, og fjerner den C-terminale ende av proteiner som har blitt prenylerte ved den cystein (C) residuet av deres CAAX motiv (Pei and Grishin 2001). CAAX protease-familier gjenkjennes med tre høyt konserverte motiver; motiv 1 består av to nærliggende og invariant glutamat-resider og en konservert arginin adskilt med tre residuer (EEXXR, hvor X er hvilken som helst aminosyre); motiv 2 bestående av en konservert fenylalanin og et konservert histidin separert med tre residuer (FXXH), og motiv 3 med en invariant histidin. De tre konserverte motiver er tenkt å utgjøre det aktive området av CAAX proteasen, og deres betydning i proteolytisk aktivitet (Kjos, Snipen et al. 2010) (Pei and Grishin 2001).

Nylig ble en CAAX protease fra gjær, Ste24p, krystallisert ved X-Ray krystallografi (Figur 1.7) (Pryor, Horanyi et al. 2013). Funksjonen til Ste24p er å fjerne AAX-tripeptidet fra prenylerte CAAX-proteiner (Pei and Grishin 2001). CAAX-protease finnes hos eukaryoter og er godt studert. Lignende proteiner med samme konserverte motivene finnes også hos prokaryoter, men med mindre grad kjennskap til funksjonen. Det er funnet proteiner som

tilhører CAAX prenyl proteasefamilien som trolig har en rolle i immunitet mot bakteriociner hos *Lactobacillus plantarum* og *S. pyogenes* (Kjos, Snipen et al. 2010).

Hvis ComM har en reell slektskap med CAAX kan det tenkes at den har en proteolytisk aktivitet, men dette har til nå ikke blitt påvist eksperimentelt, samtidig mangler ComM glutamatresiduet som er konserverert hos CAAX proteasefamilier.



Figur 1.7 SmSte24p er en integrert membranprotein som omfatter syv transmembrane (A) helikser som omgir et stort hulrom (~ 14 000 Å³) som nesten fullstendig inne i indre membranen. Den transmembran helikser range 28-44 resider i lengde og danner en overflate med hull på opptil 10 Å diameter mellom heliksene. Hulrommet er tilstrekkelig til å inneholde et 10-kD-protein eller 450 vannmolekyler. (B) Helikser III til VII er bøyd eller sterkt buet, helikser III og IV inneholder proline residu. Heliks VI inneholder sink metallprotease HEXXH motiv. To luminal looper, mellom helikser II og III og mellom helikser VI og VII, inneholder korte α -helikser består av henholdsvis 12 og 7 resider (Pryor, Horanyi et al. 2013).

1.6 Oppgavens målsetning

ComM-immunitetsprotein har både ukjent struktur og mekanisme som beskrevet i avsnitt 1.5. I denne oppgaven var målet å finne ut mer om dette proteinet ved å se nærmere på hvordan påvirker cellen ved overuttrykking. Målet var også å kunne detektere ComM ved å plassere Flag-tag i *comM*-genet. Dette kunne være et steg nærmere til å forstå dette proteinet.

2. Materialer

2.1 *S. pneumoniae*-stammer

Tabell 2.1 *S. pneumoniae*-stammer: oversikt over stammer som ble benyttet i dette arbeidet.

Stammenavn	Genotype	Referanse / kilde
RH1	$\Delta egb::spc$, Ery ^R , Spc ^R	johnsborg et al (2008)
RH2	RH1, men $hirL::pLhirL$, Cm ^R Ery ^R Spc ^R	johnsborg et al (2008)
RH4	RH2, men Sm ^R , Cm ^R Ery ^R Spc ^R Sm ^R	Eldholm et al. (2009)
RH420	RH4, men $\Delta comM::Janus$, Cm ^R Ery ^R Spc ^R Kan ^R	Eldholm et al. (2009)
SPH131	SPH130, men $\Delta luc::Janus$ Kasette; Ery ^R Kan ^R	Berg, Biornstad et al. 2011
GS90	SPH131 men $\Delta janus::comM(191HèA)$	Stip. Gro Stamsås
GS106	SPH131 men $\Delta janus::SSA_0195$	Stip. Gro Stamsås
ds106	GS94 men $hirL::lacZ$	Dr. Daniel Straume
RH12	RH2, men $\Delta comM::Janus$, Cm ^R Ery ^R Spe ^R Kan ^R	Eldholm et al. (2009)
ds108	ds106 men <i>janus</i> fjernet	Dr. Daniel Straume
GS31	SPH131 men $\Delta janus::comM$	Stip. Gro Stamsås
GS94	GS31 men $\Delta comM_{WT}::janus$	Stip. Gro Stamsås
ds129	ds108 men $\Delta spr0242::janus$	Dr. Daniel Straume

Tabell 2.2 *S. pneumoniae*-stammer konstruert i dette arbeidet

Stammenavn	Genotype	Referanse / kilde
th001	ds108 men $\Delta comM::janus$ kanamycin ^R .	Denne oppgaven
th002	th001 men $\Delta janus::1xFlag$ i posisjon 174 <i>comM</i>	Denne oppgaven
th003	th001 men $\Delta janus::2xFlag$ i posisjon 174 <i>comM</i>	Denne oppgaven
th004	th001 men $\Delta janus::3xFlag$ i posisjon 174 <i>comM</i>	Denne oppgaven
th005	GS90 men $hirL::lacZ$	Denne oppgaven
th006	GS106 men $hirL::lacZ$	Denne oppgaven
th007	th004 men $\Delta htrA::janus$ Kanamycin ^R	Denne oppgaven
th008	th004 men $\Delta spr0242::janus$ Kanamycin ^R	Denne oppgaven
th009	th004 men $\Delta spr1162::Janus$ Kanamycin ^R	Denne oppgaven

th010	RH420 men Δ Janus:: 3xFlag i posisjon 174 <i>comM</i>	Denne oppgaven
th011	th010 men Δ spr0242:: <i>janus</i> Kanamycin ^R	Denne oppgaven
th012	RH4 men Δ spr0242:: <i>janus</i> Kanamycin ^R	Denne oppgaven

2.2 Primere og plasmid og peptidoforomon

Tabell 2.3 primerliste.

Primere	Sekvens (3'-5')	beskrivelse	Referanse/kilde
ComMF	CTGCTCGCCTATTAGATGAC	<i>comM</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Johnsborg et al (2008)
ComM1R	CCCCACGCTCTTGGCTAC	<i>comM</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Johnsborg et al (2008)
khb31	ATAACAAATCCAGTAGCTTTG G	<i>cpsO</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Berg et al. (2011)
khb34	CATCGGAACCTATACTCTTTA G	<i>cpsO</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Berg et al. (2011)
112	CTTGTAAGCTAACTTACAAAA AC	<i>htrA</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Stip. Gro Stamsås
113	CCACAGGTTGGGGATAAAAAG	<i>htrA</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Stip. Gro Stamsås
114	CACATTATCCATTA AAAATCA AACATGTTTGAATTACTGAAA GTATAAA	<i>htrA</i> oppstrøms R med <i>janus</i>	Stip. Gro Stamsås
115	CGTCCAAAAGCATAAGGAAA GTTGACATCTATGTAAAGAAA GCT	<i>htrA</i> nedstrøms F med <i>janus</i>	Stip. Gro Stamsås
th001	ATGGTATCTTGCCACTTG CAG	<i>bgaA</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Denne oppgaven
th002	ATATGCCATGTTTGATAAGAA AC	<i>bgaA</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Denne oppgaven

Primere	Sekvens (3'-5')	beskrivelse	Referanse/kilde
th003	GATTATAAAGATGATGATGAT AAACAAGAAGTCCATAGTGTC CTAG	Fwd <i>comM</i> Flag174	Denne oppgaven
th004	TTTATCATCATCATCTTTATAA TCCTTACGGGTATAAAGATAA TTTAC	Rev <i>comM</i> Flag174	Denne oppgaven
th005	GATTATAAAGATCATGATATT GATTATAAAGATGATGATGAT AAACAAGAAGTCCATAGTGTC CTAG	Fwd <i>comM</i> 2xFlag17	Denne oppgaven
th006	AATCAATATCATGATCTTTAT AATCCTTACGGGTATAAAGAT AATTTAC	Rev <i>comM</i> 2xFlag174	Denne oppgaven
th007	GATTATAAAGATCATGATGGT GATTATAAAGATCATGATATT GATTATAAAGATGATGATGAT AAACAAGAAGTCCATAGTGTC CTAG	Fwd <i>comM</i> 3xFlag174	Denne oppgaven
th008	CACCATCATGATCTTTATAATC CTTACGGGTATAAAGATAATT TAC	Rev <i>comM</i> 3xFlag174	Denne oppgaven
th009	ACGTTTGAGCAATTTCTTCC	<i>spr0242</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Denne oppgaven
th010	CACATTATCCATTAATAATCA AACAGCGTTTCCTCCGTCTTTT G	<i>spr0242</i> R med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th011	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGT CGAGGAATATTATGAAACAAA G	<i>spr0242</i> F med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th012	CATTTCCAAGTAGAAGGGCTG	<i>spr0242</i> R \approx 1000 bp oppstrøms	Denne oppgaven
th013	CAATAATGGTCACATCTAACT	<i>spr1162</i> F \approx 1000 bp	Denne oppgaven

Primere	Sekvens (3'-5')	beskrivelse	Referanse/kilde
	C	nedstrøms	
th014	CACATTATCCATTA AAAATCA AACCTAAACCGCTAAAATCAA CTTTAG	<i>spr1162</i> R med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th015	GTCCAAAAGCATAAGGAAAG AATGAAGGCTGGAAAAAAGT C	<i>spr1162</i> F med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th016	CGCTTCGAGCTACCAAAGATA G	<i>spr1162</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Denne oppgaven
th017	AGATTTGTAAAATCAGTCCGC	<i>spr0012</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Denne oppgaven
th018	CACATTATCCATTA AAAATCA AACTAAAGATTATTCTTTCTA ATTTG	<i>spr0012</i> R med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th019	GTCCAAAAGCATAAGGAAAG CCCTGAGAGAGGCTGGAGC	<i>spr0012</i> F med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th020	CAACTATATTAGTATATCACA GC	<i>spr0012</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Denne oppgaven
th021	ATGAAATCAATGAGAATCTTA TTTTTG	<i>comM</i> F \approx 1000 bp oppstrøms	Denne oppgaven
th022	CTAAAAGAAAATGAGCGTAAC AATG	<i>comM</i> R \approx 1000 bp nedstrøms	Denne oppgaven
th023	CAAAAATAAGATTCTCATTGA TTTCATCTTCTCTCTCCCTTCC TAC	<i>comM</i> R med <i>janus</i>	Denne oppgaven
th024	CATTGTTACGCTCATTTTCTTT TAGAGAAAGCCTGTTTTTTAT GGATG	<i>comM</i> F med <i>janus</i>	Denne oppgaven

Tabell 2.4 Plasmid

Plasmid	Egenskapene	kilde
pTOPO-pLhirL	<i>lacZ</i> (bet-gal)	fra <i>E. coli</i> Steinmoen et al 2002 DH10B og kloramfenikolmarkør

Tabell 2.5 Peptidoforomon

Feromon	aa-sekvens	Stockløsning	Produsent
CSP-1	EMRLSKFFRDFILQRKK	100 µg/ml	Research Genetics Inc.

2.3 Molekylvektsstandarder, enzymer og nukleotider

Tabell 2.6 Molekylvektsstandarder, enzymer og nukleotider

Navn	Stock-konsentrasjon/ buffer	Produsent
1 kb ladder	50 ng/µl i loadingbuffer	Invitrogen
dNTP mix	10 med med mer	Finnzymes
Phusion Polymerase	5x Phusion Polymerase Buffer	Finnzymes
DyNAzyme Polymerase	Taq 10x DyNAzyme Taq Polymerase	New England BioLabs
Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)		BioLabs (Neb)

2.4 Antibiotika

Tabell 2.7 Antibiotika som ble brukt for seleksjonsdyrking på THA

Antibiotikum	Brukskonsentrasjon	Produsent
Streptomycin	200 µg/ml	Sigma
Spectinomycin	200 µg/ml	Sigma
Kanamycin	400 µg/ml	Sigma

2.5 Kjemikaler

Tabell 2.8 Kjemikaler

Navn	Kjemisk formel	Produsent
Acrylamide + 0,8% bis-acrylamide	C_3H_5NO	Saveen Werner
Agar-agar		Merck
Agarose		Invitrogen
Aktivt kull	C	Merck
Albumin		Sigma
Ammonium persulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma
Bacto™ Casitone		BD Diagnostic
Bacto™ Todd Hewitt Broth (TH)		BD Diagnostic
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma
Bromfenolblått	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	Sigma
di-Kaliumhydrogenfosfat	K_2HPO_4	Merck
di-Natriumhydrogenfosfat-Dihydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Merck
Eddiksyre	CH_3COOH	Merck
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	VWR
Etidiumbromid (EtBr)	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma
Formaldehyd	CH_2O	Sigma
Gjærekstrakt		Merck
Glycin	$C_2H_5NO_2$	Merck
Glyserol 86-89%	$C_3H_5(OH)_3$	Merck
Jern(II)sulfat heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka
Kaliumdihydrogenfosfat	KH_2PO_4	Merck
Kaliumklorid	KCl	Merck
Kalsium panthothenate	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma
Kalsiumklorid anhydre	$CaCl_2$	Fluka
Kobbersulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka
Kolin Klorid	$C_5H_{14}NO \cdot Cl$	Sigma
L-Asparagine. H_2O	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma
L-cystein HCl	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka
L-Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	Fluka

Navn	Kjemisk formel	Produsent
L-tryptofan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Fluka
Magnesiumklorid hexahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Fluka
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Sigma
Mangan(II)-klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Riedel-de Haën
Metanol	CH_2OH	Merck
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine(TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Sigma
Na Acetat	$C_2H_3O_2Na$	Sigma
Natirumdihydrogenfosfat-Monohydrat	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Merck
Natriumhydroksid	$NaOH$	Merck
Natriumkarbonat	Na_2CO_3	AppliChem
Natriumklorid	$NaCl$	Merck
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	Fluka
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	$C_{12}H_{15}NO_8$	Sigma
Paraformaldehyd	$(CH_2O)_n$	Sigma
Pyridoxine hydroklorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Fluka
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma
Saltsyre	HCl	Riedel-de Haën
SDS	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	Fluka
Sinksulfat heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Fluka
Skummamelk-pulver		Merck
Sukrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	BHD
Thiamin hydrokloride	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	Sigma
Tris base	$NH_2C(CH_2OH)_3$	Sigma
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	Sigma
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	BioRad
Urea	CH_4N_2O	Promega
Uridin	$C_9H_{12}N_2O_6$	Sigma
β -mercaptoetanol	$C_{22}H_6OS$	Sigma

2.6 Utstyr og maskiner

Tabell 2.9 Utstyr og maskiner

Utstyr	Modell	Produsent
Anaerobe dyrkingsposer	AnaeroGen TM	Oxoid
Autoklav		Presto
Anaerobe dyrkingsbeholder		Oxoid
Bordsentrifuge I	5415R	Eppendorf
Bordsentrifuge II	5424	Eppendorf
Elektroforesekar	Mini-Sub Cell [®] GT	BioRad
Filter (0,2 µm)		Sarstedt
Fluorescensmikroskop	Observer.Z1, HAL 100	Zeiss
Geldokumentasjon	GelDoc	BioRad
Inkubatorskap		Termaks
Magnetrører	MR 3003 K	Heidolph
Mikrobølgeovn		Whirlpool
Nitrocellulosemembran	Trans-Blot, Medium, Pure Nitocellulose Membrane (0,45 µm)	BioRad
PCR-maskin	PTC-100TM 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, 2-10 ml)	Thermo Scientific
Plastbrand, engangskyvetter		Brand
Ristebord	WS 10	Edmund Bühler
SDS-PAGE-utstyr	Mini-PROTEAN [®] Tetra cell	BioRad
Sentrifuge I	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Sentrifuge II	Avanti [™] J-25	Beckman coulter
Sentrifugeflasker		Nalgene
Spektrofotometer I	DU [®] 800 UV/Vis	Beckman coulter
Sprøyter til filtrering		BD Plastipak
Vannbad I (max 60 °C)	7A	Julabo
Vannbad II (max 100 °C)	1002	GFL
Vekt 0,0001 g - 200 g		Sartorius
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA [®]

2.7 Dyrkningsmedier, løsninger og buffere

2.7.1 C-medium

Pre C-medium:

For 2 liter :

L-cystein HCl	0,045 g
Na Acetat	8 g
Bacto™ Casitone	20 g
L-tryptofan	0,024 g
K ₂ HPO ₄	34 g
H ₂ O	4 L

Pre C-medium fordeles i 150 ml i 200 ml flasker.

C-medium(lages samme dag):

For 150 ml Pre C-medium tilsettes det:

0,4 mM MnCl ₂	150 µl
20 % Glukose	1,5 ml
ADAMS III*	3,75 ml
3 % Glutamin	110 µl
2 % Na-pyruvat	2,25 ml
1,5 M Sukrose	95 µl
2 mg/ml Uridin	1,5 ml
8 % Albumin (BSA)	1,5 ml
10% Gjærekstrakt	3,75 ml

Løsningen sterilfiltrert og oppbevart ved 4C°. Holdbarheten er kun en dag.

ADAMS III

ADAMS I	128 ml
ADAMS II -10 X	3,2 ml
L-Asparagine. H ₂ O	1,6 g
Choline	160 mg
CaCl ₂ anhydre	0,4 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	16 g

H₂O fylles opp til 800 ml og pH justert til 7,6. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C

ADAMS I

Biotin 0,5 mg/ml	0,15 ml
Nikotinsyre	75 mg
Pyridoxine hydroklorid (4°C)	87,5 mg
Ca panthothenate (4°C)	300 mg
Thiamin hydrokloride	80 mg
Riboflavin	35 mg

H₂O opp til 500 ml og juster til pH=7. Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C

ADAM II – 10X

FeSO ₄ .7H ₂ O	500 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	500 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	500 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	200 mg
HCl	10 ml

H₂O tilslutt volum 100 ml. Løsningen sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C

Gjærekstrakt

Gjærekstrakt	40 g
dH ₂ O	360 ml
12 N/37 % HCl	6 ml
aktivt kull	16 g

Z-buffer

<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	4 mg
250 mM β -mercaptoethanol	17,86 μ l
MQ-vann til sluttvolum 1ml	

Stoppløsningen

1 M Na ₂ CO ₃	5,3 g
MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 50 ml	

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

APS	0,04 g
dH ₂ O	400 μ l

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

Tris base	30,28 g
dH ₂ O	400 ml

pH ble justert til 6,8 med HCl og tilsatt dH₂O til slutt volum 500 ml.

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

Tris base	90,83 g
dH ₂ O	400 ml

pH ble justert til 8,8 med HCl og tilsatt dH₂O til slutt volum 500 ml.

10 % SDS

20% SDS	50 ml
dH ₂ O	100 ml

2.7.4.1 Løsninger brukt ved SDS-PAGE

10 x Tris-Glycin Runningbuffer

Tris base	30 g
Glycin	144g
20 % SDS	50 ml

dH₂O tilført til 1000 ml. Løsningen ble videre fortynnet til 1 x SDS for kjøring av SDS-PAGE gel.

2 x SDS sample buffer

10 % SDS	4 ml/4 %
Tris-HCl, pH 6,8	1,250 ml/125 mM
50 % Glyserol	4 ml/20 %
β-mercaptoetanol	0,2 ml / 0,15 eller 2%
Bromfenolblått	0,01 %

Løsninger ble justert til sluttvolum 10 ml med dH₂O. Løsningen oppbevart ved 4°C.

2.7.4.2 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

2.7.5 Løsninger og buffere for Western blot

TBS-T

10 mM Tris-HCl pH 7,4 10 ml
0,15 M NaCl 8,7 g
0,05% Tween 20 0,5 ml
MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 L.

Blokkeringsløsning

3% Skummamelk løses i TBS-T

Transferbuffer

Tris-base 3.0 g
Glycine 14.4 g
Methanol 200 mL
MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 L.

2.7.6 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.

2.7.7 Løsningen til cellefiksering for DIC/ Fluorosensmikroskop**PBS**

137 mM NaCl 8 g

2.7 mM KCl 0.2 g

10 mM Na₂HPO₄ 1.44 g

1.8 mM KH₂PO₄ 0.24 g

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 L

GTE Buffer

50 mM Glucose 4,5 g

25 mM Tris, pH 8.0 12,5 ml

10 mM EDTA, pH 8.0 10 ml

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 500 ml

2.7.8 Løsninger og buffer for formaldehyd kryssbinding

PBS

137 mM NaCl 8 g

2.7 mM KCl 0.2 g

10 mM Na₂HPO₄ 1.44 g

1.8 mM KH₂PO₄ 0.24 g

MQ-vann ble tilsatt til sluttvolum 1 L

10 % formaldehyd

Fortynnes med MQ-vann

3. Metoder

3.1 Oppbevaring og dyrkning av *S. pneumoniae*

S. pneumoniae vokser best i anaerobe forhold ved 37°C. I denne oppgaven ble *S. pneumoniae* dyrket i flytende C-medium ved 37°C på vannbad. C-medium skulle være dags-ferskt (Lacks and Hotchkiss 1960). Dyrkning på Todd Hewitt (TH) agar ble stort sett gjort i forbindelse med seleksjon av nye transformanter. TH-agarskålene ble inkubert anaerobt ved 37°C i varmeskap. Antibiotika konsentrasjoner i TH-agar som ble brukt, avhengig av hva slags antibiotikamarkør som ble brukt ved transformasjon, var som følger: 200 µg/ml streptomycin, 200 µg/ml spectinomycin og 400 µg/ml kanamycin.

For å ha riktig anaerobe forhold ble brukt lukket beholder med Oxoid poser. Oxoid (AnaeroGenTM) trekker oksygen fra omgivelsen og i løpt av 30 min ville oksygen nivå synke til 1%. Karbondioksidnivå ville stige mellom 9% og 13%. Det var viktig at beholderen med oxoid-pose lukkes fort, innen et minutt, siden Oxoid-pose reaksjonen startet umiddelbart etter åpning av forseilet pose (Oxoid 2002).

3.1.1 Frysestock og langtidsoppbevaring

For langtidsoppbevaring lagte vi frysestocken som består av 1 ml bakteriekultur i vekstfasen ($OD_{550} \approx 0,3$) og 50 % glyserol til sluttkonsentrasjon på 15%. Frysestocken ble oppbevart i -80°C fryser.

3.2 Polymerase kjedereaksjon / Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) er en biokjemisk teknologi som brukes for *in vitro* amplifisering av et spesifikt DNA-fragment. I en PCR kan det genereres tusenvis til millioner kopier av en bestemt DNA-sekvens. Metoden ble først oppfunnet av den norske forskeren Kjell Kleppe på 60-tallet, videre ble den utviklet i 1983 av Kary Mullis (Bartlett and Stirling 2003). PCR-teknikk er en vanlig metode som ofte brukes i medisinske og biologiske forskningslaboratorier.

PCR-metoden er basert på sykluser med gjentatt oppvarming og avkjøling av en reaksjonsblanding. Reaksjonens blandingen består av bestemte komponenter som DNA-templat, primere, varmestabil polymerase og deoksynukleosid trifosfat (dATP, dTTP, dGTP og dCTP) samt en reaksjonsbuffer med Mg^{2+} som virker som kofaktor for polymerasen og øker stabiliteten under lengere inkubasjoner. Vanligvis går PCR-reaksjonen i tre trinn som gjentas i 25-35 sykluser. disse trinnene er, i) denaturering av dobbeltrådet mål-DNA ved å øke temperaturen til rundt 94-97°C, ii) hybridisering av oligonukleotid primerne til den komplementære enkeltrådet mål-DNA ved å senke temperaturen til smeltepunktstemperaturen for primere, iii) elongering skjer ved å øke temperaturen til 72°C slik at varmestabil polymerase forlenger primene ved å feste på dNTPer i 5'→3' retning. (Rychlik, Spencer et al. 1990). Elongeringstiden er avhengig av lengden på mål-DNA fragmentet, og kompleksitet av templatet, samt effektiviteten av polymerasen.

Etter hver syklus vil i teorien antall amplifiserte DNA-molekyl dobles og man får en eksponentiell økning av antall amplifiserte DNA-kopier i henhold til formelen 2^n der n er antall sykluser.

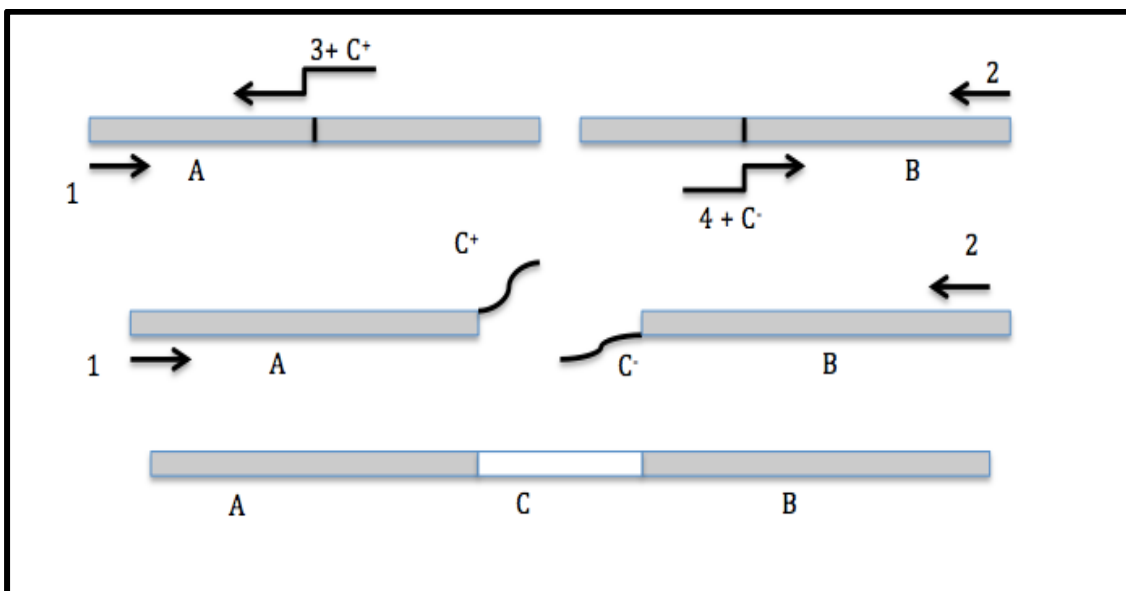
I dette prosjektet ble to DNA-polymeraser benyttet etter hvilket formål. For å amplifisere DNA-fragmenter som skulle brukes til transformasjon eller til overlapp PCR ble Phusion High-Fidelity polymerase benyttet. Phusion DNA polymerase er rask og kan bli brukt for lange eller vanskelig PCR, med en feilrate 50 ganger lavere enn Taq DNA polymerase. Phusion DNA Polymerase har 5'→3' polymerase aktivitet og 3'→5' eksonukleaseaktivitet (Finnzymes 2007)

For screening av transformanter ble Taq DNA polymerase benyttet. Taq DNA polymerase inneholder en polymeriserings avhengige av 5'→ 3' eksonuklease aktivitet. Det har ikke en 3'→5' eksonuklease og dermed ingen proof reading funksjon (Lawyer, Stoffel et al. 1993).

3.2.1 Overlapp ekstensjon-PCR

Overlapp ekstensjon PCR er en metode som gjør det mulig å fusjonere DNA fragmenter ved å innføre overlappende sekvenser i fragmentene. Dette betyr at det er mulig å innføre punktmutasjoner, sette sammen to gener bak hverandre, bytte ut et gen eller fjerne et gen. En skjematisk fremstilling av denne metoden er vist i Figur 3.1 og 3.2.

For hver konstruksjon kreves minimum to separate PCRs, i) i første runde med PCR amplifiseres DNA-fragmenter med komplementære 5' og 3' ender, ii) i neste PCR-runde blandes disse PCR-produktene og de fusjoneres til ett lenger PCR-produkt ved at 3' ende på PCR-produkt 1 hybridiserer til 5' ende av PCR-produkt 2 (Warrens, Jones et al. 1997). De komplementære overhengene innføres via primer overheng (se Figur 3.1). Revers primer for PCR-produkt 1 har et overheng som er komplementær enten direkte til forward primer for PCR-produkt 2 eller til dens eventuelle overheng.



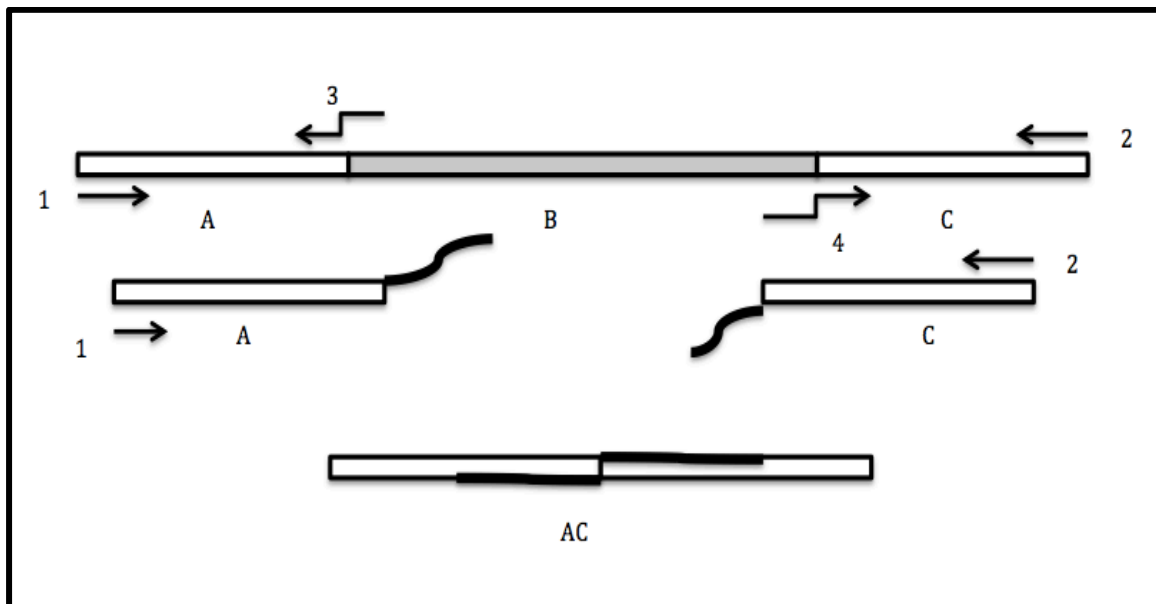
Figur 3.1 Overlapp ekstensjon-PCR. Skjematisk fremstilling av overlapp PCR hvor en sekvens/gen *C* ble satt inn mellom sekvens/gen *A* og *B*. I første runde amplifiseres fragmentene *A* og *B* i separate PCR-reaksjoner. *A* amplifiseres med primer 1 og 3 der primer 3 har overhengen *C*, mens *B* amplifiseres med primer 2 og 4 der 4 har overhengen *C*. Begge fragmentene blandes i andre PCR-runde og primer 1 og 2 benyttes for amplifisering. I trinnet der primerne annealer til templatet i PCR-programmet vil også området *C* fra fragment *A* og *B* hybridisere siden dette området er komplementært. Når polymerasen starter DNA-syntesen fra primer 1 og to vil derfor fragment *A* og *B* fusjoneres via *C*.

Ved å blande de to fragmentene sammen i en PCR og bruke forward primer for PCR-produkt 1 og revers primer for PCR-produkt 2 vil det resultere at disse to DNA-fragmentene fusjonerer.

I denne oppgaven ble overlapp ekstensjon-PCR benyttet i flere anledninger. For eksempel ved konstruksjon av 1x Flag-tag $comM_{PcomX}$, 2x Flag-tag $comM_{PcomX}$, 3x Flag-tag $comM_{PcomX}$, samt for å konstruere Janus-kassett til å fjerne med $comM_{wt}$ osv.

Delesjoner i DNA er også mulig med overlapp ekstensjon-PCR ved å bruke primere som er komplementære med oppstrøm og nedstrøms regionen av den sekvensen som man ønsker fjernet (Li, Qiu et al. 2008). I eksemplet i Figur 3.2 har man sekvens/gen A , B og C der gen B deleteres ved hjelp av overlapp ekstensjons-PCR. Prinsippet er likt som beskrevet ovenfor, bortsett fra at primer 3 og 4 er fullstendig komplementære til hverandre. På denne måten vil A og C fusjonerer i siste PCR runde og sekvens B er deletert.

I denne oppgaven ble denne teknikken benyttet for å fjerne Janus:: $comM_{wt}$ i stammen ds106.



Figur 3.2 overlapp ekstensjon deleksjon. Figuren viser deleksjon av et bestemt sekvens region/gen. I første PCR brukes primere 1 og 3, hvor 3 har et overheng med sekvens som er komplementær med nedstrøms region for sekvens/gen B . Andre PCR med primere 2 og 4 hvor 4 er komplementær med oppstrøms region for sekvens/gen B . Tredje PCR hvor bare primere 1 og 2 brukes vil de to fragmenter fusjonere og danne ett DNA-fragment med bare AC område.

3.2.2 Prosedyren for PCR-amplifisering av DNA

PCR ble benyttet for å lage DNA-fragmenter som skulle transformeres inn i ulike *S. pneumoniae* stammer og for å screene transformanter. Fragmenter til transformasjon ble brukt til å slå ut, sette inn eller endre gener. Primere brukt til å produsere DNA-sekvenser i dette arbeidet er listet i tabell 2.3. For å konstruere fragmenter til å transformere *S. pneumoniae* ble Phusion DNA polymerase brukt både fordi dette enzymet er godt egnet til overlapp ekstensjons-PCR og fordi den har høy grad av korrekturlesning.

PCR reaksjonen ble utført med reaksjonsmiksen vist i tabell 3.1

Tabell 3.1: PCR- reaksjonsblanding av 50 µl reaksjonsvolum

Reagens	Volum (µl)
Forward-primer (10µM)	2,5
Revers-primer (10µM)	2,5
dNTP (10 mM)	1,0
5x Phusion® HF-buffer	10,0
Phusion DNA polymerase (2 U/µl)	0,5
templat-DNA	1,0
dH2O	32,5
total volum	50,0

PCR-reaksjonen ble utført i en PCR-maksin med PCR-program som er tilpasset templatet (lengde og tilgjengelighet) og primere smeltepunkt TM, men følgende oppsett ble brukt som utgangspunkt (Tabell 3.2).

Tabell 3.2: PCR-program ved bruk av Phusion DNA polymerase.

Trinn	Temperatur og tid
1. Initiell denaturering	94 °C, i 5 min
2. Denaturering	94 °C, 30 sek
3. Primerhybridisering*	58-60 °C, 30 sek
4. Elongering	72 °C, x sek
5. Gå til trinn 2 x ganger	25-35 sykler totalt
6. Utfylling av ender	72 °C, 5 min
7. Midlertidig oppbevaring i PCR-maskin	4 °C, ∞

Etter PCR-amplifisering ble PCR-produktet som skulle brukes videre til transformasjonen eller konstruksjon av DNA-fragment separert med hensyn på størrelse ved hjelp av agarose gelelektroforese og deretter rensset ut fra agarosegelen. Detaljer om agarose gelelektroforese er beskrevet i avsnitt 3.3. Transformater ble kontrollert ved hjelp av PCR med Taq-polymerase som beskrevet i tabell 3.3

Tabell 3.3: Taq-polymerase PCR- reaksjonsblanding av 20 µl reaksjonsvolum

Reagens	Volum (µl)
Forward-primer (10µM)	1,0
Revers-primer (10µM)	1,0
dNTP (10 mM)	0,5
Thermo pol buffer (10 x)	2,0
Taq polymerase	0,5
templat-DNA	1,0
dH ₂ O	14,0
total volum	20,0

3.2.3 Primer design

Primere ble designet og bestilt fra invitrogen for de fleste mutanter i denne oppgaven. Primere bør være mellom 18-24 nukleotider med en GC innhold som gir en effektiv annealing til templat DNA. Ideelt bør primerne ha en nær tilfeldig blanding av nukleotider med G eller C avslutningsvis i 3'-enden for å sikre en stabil binding der polymerasen skal initiere DNA syntesen. Forward og revers primere ble utformet slik at de hadde lik smeltetemperatur, ca 58-60°C. Primere for konstruksjon av Flag-tag ComM ble designet ved at Flag-tag-kodende sekvens ble inkludert i 5' overheng for forward primer brukt for å amplifisere nukleotid 175-687 av *comM*.

3.3 Agarosegel elektroforese

Agarose gelelektroforese er en metode som brukes for å separere, identifisere eller bestemme størrelse av et DNA fragment. Nukleinsyremolekyler separeres ved å innføre et elektrisk felt for å flytte de negativt ladede molekyler gjennom en agarose matrise mot den positive anoden. DNA-molekylene er negativt ladet på grunn av fosfatgruppene som forbinder deoksyriboseenhetene i DNA-molekylene. I et elektrisk felt vil derfor DNA-molekylene bevege seg mot den positive polen (anoden). Kortere DNA fragmenter vil migrere lettere gjennom porene i gelen og dermed med større hastighet enn lange DNA fragmenter. På denne måten kan DNA-molekylene bli separert basert på størrelse (Sambrook J 2001).

En agarosegel består av agarose (polysakkarider fra alger) som løses i elektroforesebuffer 1xTAE til den ønskede konsentrasjon og varmes til kokepunktet for ”å løse” agarosen, så avkjøles blandingen til ca 60°C før etidiumbromid (EtBr) tilsettes. Blandingens helles i et såkalt støpekar for at gelen skal avkjøles og stivne. Etidiumbromid binder seg til dobbeltrådig DNA og fluorescerer ved belysning mellom 302 nm og 366 nm. Siden Etidiumbromid fluorescerer bare når det er bundet til DNA vil kun områder med DNA fluorescere i gelen når den belyses med UV-lys.

DNA som skal separeres ved hjelp av agarose gelelektroforese tilsettes loadingbuffer. Loadingbuffer inneholder glyserol som øker tettheten til prøven og gjør at den synker ned i gelbrønnene. I tillegg inneholder den et fargestoff (bromfenolblått) som migrerer sammen med prøvene i gelen, fargestoff binder seg ikke til DNA i seg selv, men migrerer raskere enn

DNA slik at det blir mulig å stoppe elektroforese før DNA vandrer ut av gelen. For å kunne estimere størrelsen på DNA og mengde DNA sammenlignes DNA i prøven med en molekylvektsstandard. 1 kb-ladder som var løst i loadingbuffer og TE-buffer til slutt konsentrasjon 50 ng/ μ l ble brukt i denne oppgaven.

3.3.1 Prosedyren for agarosegel elektroforese

1. 1 % agarosegel ble fremstilt med 0,5 g agarose og 50 ml 1 x TAE-buffer. Blandingen ble kokt opp i mikrobølgeovn til alt agarosen var løst.
2. Etidiumbromid (EtBr) ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,5 μ g/ml etter at løsningen var avkjølt til ca. 60 °C.
3. Gelen ble støpt i støpekar med brønnkammer av ønsket størrelse. Etter ca 20 min var gelen var stivnet og den ble lagt over i et elektroforesekar og dekket av 1 x TAE buffer.
4. 10 μ l 1 kb DNA-ladder (Invitrogen) ble applisert i brønn 1 som en referanse. Prøver ble tilsatt 6x loadingbuffer før de ble applisert i gelen
5. Elektroforesen ble utført ved 90 V i 25-35 minutter.
6. DNA ble visualisert ved å belyse gelen med UV-lys og tatt bilde av med Gel Doc-1000 (BioRad).
7. UV-lyset i Gel Doc-100 ble benyttet for visualisere DNA-bånd direkte på gel slik at det ble mulig å skjære det ut.

3.3.2 DNA-Gelekstraksjon med NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (NucleoSpin® 2012)

1. Ønsket DNA-fragmentet ble skåret ut av gelen med et sterilt skalpellblad og overført til et eppendorfrør. UV-lys eksponeringstid må være minimalt for å unngå å skade DNA
2. For hver 100 mg 1 % agarosegel ble det tilsatt 200 µl buffer NTI (bindingsbuffer med høyt saltinnhold). Deretter ble løsningen inkubert ved 50°C i ca 10 min eller til alt agarosegel ble løst opp.
3. Løsningen ble deretter overført til en NucleoSpin® 2 ml spinnkolonne og sentrifugert ved 11000 x g i 30 sek. NucleoSpin® spinnkolonne har en silika membran som binder DNA. Den optimale pH for å binde DNA-fragmenter til silika membran er ca. 5,0 til 6,0. Bindingsbuffer NTI er tilstrekkelig bufret for å opprettholde denne pH.
4. Membranen i kolonnen ble så vasket ved å tilsette 700 µl buffer NT3 og sentrifugere i 30 sekunder ved 11000 x g to ganger. Deretter sentrifugere i 1 minutt ved 11000 x g for å fjerne alt NT3 buffer og tørke silikamembran.
5. Spinnkolonne settes inn i ny 1,5 ml eppendorfrør og 30 µl elueringsbuffer NE (5 mM Tris / HCl, pH 8,5) ble tilsatt for å eluere DNA. Deretter ble det inkubert ved romtemperatur i 1 min og sentrifugert i 1 min ved 11000 x g.
6. Eluatet ble kontrollert med med agarosegel elektroforese, der ble 5 µl rensed DNA blandet med 1 µl 6x loadingsbuffer. For å se at fragmentet hadde riktig størrelse og estimere konsentrasjonen av DNA.

3.4 Transformasjon av *S. pneumoniae*

Transformasjon er innføring av et fremmed naken DNA i en celle. *S. pneumoniae* har evne til å ta opp naken-DNA fra miljø og inkorporere det i genomet ved homolog rekombinasjon. Dette kalles for naturlig genetisk transformasjon. Denne egenskapen ble utnyttet for å lage alle transformantene i denne oppgaven. *S. pneumoniae* har en kompetansetilsand som avhengig av egenproduserende CSP (kompetanse-stimulerende peptid). I dette arbeidet var alle *S. pneumoniae*-stammene $\Delta comA$, og derfor kunne ikke transportere egen CSP ut av cellen. På denne måten ble det mulig å kontrollere kompetansen ved å tilsette syntetisk framstilt CSP til vekstmediet. Transformasjonen ble utført i C-medium ved 37°C. *S. pneumoniae*-stammene ble dyrket til $OD_{550} \approx 0,1$ før de ble induert til kompetanse med CSP til en sluttkonsentrasjon på 250 ng/ml. Deretter ble DNA tilsatt, og kulturen ble inkubert i 120 min ved 37°C.

3.4.1 Prosedyren for transformasjon av *S. pneumoniae*

1. Den aktuelle stammen for transformasjon ble dyrket i C-medium til $OD_{550} \approx 0,05-0,1$.
2. 1 ml cellekultur ble overført til eppendorfrør som inneholdt 2,5 μ l CSP-1 (100 ng/ μ l) og 10 μ l DNA for transformasjon. Det ble benyttet også en negativ kontroll av cellekulturen som var induert med 2,5 CSP-1, men uten tilsatt DNA. Kulturene ble inkubert i 2 timer ved 37°C vannbad.
3. Transformanter ble selektert ved å så ut 30 μ l cellekultur på THA-skåler med tilsatt aktuelle antibiotikum for seleksjon. Skålene ble inkubert anaerobt over natt ved 37°C. Ved vekst av negativ kulturen på THA-skål må ny transformasjon vurderes.
4. Dagen etter ble eventuelle transformanter plukket og dyrket opp i C-medium ved 37°C vannbad med tilsatt antibiotika. Når cellene hadde vokst til $OD_{550} \approx 0,3$ ble det laget frysestock av kulturene.
5. Kontroll av transformantene ble gjort ved PCR og/eller sekvensering

3.4.2 Janus-kassett

Ved naturlig genetisk transformasjon i *S. pneumoniae* er det enkelt å transformere konstruerte genet direkte, men det blir umulig å selektere de nye transformater så lenge de endrer ikke fenotype. Derfor ble det utviklet en 1300 bp DNA-kassett kalt Janus. Janus-kassetten inneholder en kanamycin resistent gen *kan*⁺ og streptomycin sensitiv gen *rpsL*⁺ (Sung, Li et al. 2001). Fordelen med bruken av Janus er at man aldri går tom for seleksjonsmarkører. Med Janus-kassetten kan man ta den ut og utføre negativ seleksjon. På den måten kan man knocke ut gener fortløpende. Janus inn, ut, inn, ut osv. Janus kan brukes i stammer som har satt inn mutert *rpsL*-gen og dermed streptomycin resistente.

I *S. pneumoniae* kan spontant streptomycinresistens forekomme ved mutasjon i genet *rpsL* (Salles, Creancier et al. 1992). Dette betyr at innsatt Janus med *rpsL*⁺ vil være dominant sensitiv mot streptomycin (Sm^s). Bruk av Janus krever to transformasjon. Først innsetting av Janus med flankerende oppstrøms- og nedstrømsregion av mål sekvens ved homolog rekombinasjon. Ny transformantene vil bli kanamycin resistente (Km^r) samtidig som stammen blir streptomycin sensitiv (Sm^s) fordi *rpsL*⁺ allelet overstyrer den recessive mutasjonen i utgangsstammen. Ved å erstatte Janus-kassetten med et annet DNA fragment som er flankert med oppstrøms- og nedstrømsregioner for Janus, vil i ny transformasjon gjenopprettes Sm^r og Km^s fenotypen. Dette gjør det mulig å systematisk fjerne et gen, sette inn et gen, eller gjøre andre endringer på gener som ellers ikke gir oss en selekter bar fenotype (Sung, Li et al. 2001).

3.5 Flag-tag

Flag-tag brukes hovedsakelig til deteksjon og rensing av proteiner som ikke har antistoff mot. Ved å fusjonere et målprotein med Flag-tag kan dette proteinet detekteres ved hjelp av antistoff mot FLAG sekvensen. Detektering kan være for eksempel med immunfluorescens eller Western blotting. Flag-tagen er et hydrofilt oligopeptid som består av åtte aminosyrer, DYKDDDDK, med en størrelse på 1,01 kDa. Flag-tagens fysiokjemiske egenskaper som at den er hydrofil og relativt liten gjør at målproteinets funksjon ofte blir upåvirket. Det er også mulig å fjerne taggen fra sin fusjonspartner ved proteolytisk kløyving med enterokinase (Thomas P. Hopp 1988). 3xFlag-tag er en forbedring av den originale Flag-systemet. 3xflag-tag består av totalt 22 aminosyrer (2,73 kDa). Påvisningen av 3xFlag-tag er 200 ganger bedre enn originalen og den er derfor ideel for deteksjon lav uttrykket proteiner. I likhet med Flag-tag, er 3xFlag hydrofil, har en enterokinase spaltingssete og er relativt liten. Flag-tag kan være plassert til C-terminus, N-terminus eller et annet sted i et protein. Det er tilgjengelig noen kommersielt antistoffer (f.eks, M1/4E11) som gjenkjenner Flag-tagget bare når det er til stede ved N-terminus. Andre tilgjengelige antistoffer som f.eks, M2 gjenkjenner taggen uavhengig av plassering i fusjonspartneren. (Einhauer and Jungbauer 2001).

3.6 β -galaktosidase assay

Enzymet β -galaktosidase i *Escherichia coli* er kodet av *lacZ*-genet som er en del av *lac*-operon. (Fowler and Zabin 1970). Funksjon til β -galaktosidase er å spalte laktose til enkle sukker komponenter, glukose og galaktose. β -galaktosidase katalyserer også transglykosylasjon, dvs. overføringen av sukker residuet fra en til en annen glykosid altså fra glukose til allolaktose (Juers, Huber et al. 1999). *lacZ*-genet ble transformert inn i pneumokokker stammer som ble benyttet i denne oppgaven. *lacZ* ble plassert midt i *hirL* genet. Genet *hirL* har ukjent funksjon, men uttrykkes strekt gjennom logaritmisk vekstfasen. Genet *hirL* har ingen effekt for naturlig kompetanse eller veksten av cellene. Ved å plassere *lacZ*-genet bak *hirL*-promoter, vil *hirL*-genet og *lacZ* blir konstitutivt uttrykt når pneumokokkene vokser. β -galaktosidase som ble produsert kan ikke transporteres ut av *S. pneumoniae* på grunn av manglende et signalpeptid for transport ut av cellen. Derfor blir β -galaktosidase inni cellen så lenge cellen er intakt. (Steinmoen, Knutsen et al. 2002). β -galaktosidaseaktivitet kan bli analysert ved å måle hydrolyse av det kromogene substrat, *o*-nitrofenyl- β -D-galaktosid (ONPG) (Miller 1972). Mengden av *o*-nitrofenol dannet avgir gul farge og kan måles ved absorbansen på 420 nm. Hvis øker ONPG er mengden av *o*-nitrofenol som produseres proporsjonal med mengden av β -galaktosidase i reaksjonen. Reaksjonen stoppes ved tilsetning Na_2CO_3 som endrer reaksjonsblandingen til pH 11. Ved pH 11 er β -galaktosidase inaktivert. Ved å bestemme β -gal aktiviteten i vekstmediet til pneumokokkene kunne man beregne prosentandelen av cellene i den gitte kulturen som har lysert.

I de fleste mutantene som benyttet i denne oppgaven ble *lacZ* transformert inn i *hirL*-genet. *S. pneumoniae* har et eget gen for β -galaktosidase kalt *bgaA*. Ideelt sett så skulle dette genet fjernes for at vi får kun β -galaktosidase fra *lacZ*-genet. Etter flere mislykket forsøk for å fjerne *bgaA* og siden den har svært liten aktivitet (Zahner and Hakenbeck 2000), ble *bgaA* værende i alle *S. pneumoniae* -stammene.

3.6.1 Prosedyre β -galaktosidase assay

1. Startkultur av stammen vi ønsker å undersøke ble tinet opp og sentrifugerte. Cellepelleten ble resuspendert i ca. 10 ml ferskt C- medium. Cellene ble dyrket ved 37°C til $OD_{550} \approx 0,3$
2. 5 ml av cellekulturen ble induert med CSP-1 til slutt konsentrasjon på 250 ng/ml. Resten av uindusert cellekulturen behandles parallelt som negativ kontroll.
3. Cellekulturene ble deretter inkubert ved 30°C i 30 minutter. Etter inkuberingen ble OD_{550} målt. Hver prøve ble behandlet på to måter, supernatantprøve og lysatprøve. i) supernatantprøve: 1 ml celleprøve filtrert gjennom 0,2 μm filter. Dette gjorde vi for å få cellefri supernatantprøve. ii) lysatprøve: 1 ml celleprøve ble lysert ved å tilsette 10 % Triton X-100 til sluttkonsentrasjon på 0,1 %. Prøven ble inkubert i 10 min ved 37°C. Pneumokokkenes endogene autolysin, LytA, aktiveres av Triton-X100 slik at cellene lyses.
4. β -galaktosidaseaktivitet ble undersøkt ved å tilsette 240 μl Z-buffer til både 80 μl lysatprøve og 500 μl supernatantprøve. I alle prøvene ble volumet justert til 1200 μl med C-medium. En blankprøve ble laget med 960 μl C-medium og 240 μl Z-buffer.
5. Deretter ble prøvene og blanken inkubert i ca. 20 min ved 30°C
6. Etter inkuberingen ble reaksjonen stanset ved tilsetning av 500 μl 1M Na_2CO_3 . Til slutt ble Abs_{420} målt

For beregning av enzymaktivitet i prøvene ble en formel av Miller (1972) brukt.

$$1000 \times \frac{OD_{420}}{(OD_{550} \times v \times t)}$$

v = volum prøve

t = tid inkubert

For beregning av prosent frigjøring av β -galaktosidase ble følgende formel brukt:

$$100 \% \times \frac{\text{Miller Units av supernatant}}{\text{Miller Units av lysat}}$$

3.7 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

SDS-PAGE er en metode som brukes for separasjon av proteiner basert på deres størrelse. Polyakrylamid, er en polymer av akrylamid monomere. Når denne polymer er dannet, blir den til en gel, og ved bruk av elektrisk felt, trekke proteiner gjennom gelen slik at hele prosessen kalles polyakrylamid gelelektroforese (PAGE). Siden proteiner opptrer med forskjell i nettoladning, sekundær, tertiær eller kvaternær struktur vil det ikke være mulig å separere dem etter størrelse under native betingelser. For å løse dette behandles proteiner med β -merkaptøetanol og SDS. β -merkaptøetanol har en reduserende sulfid-gruppe som vil redusere og dermed bryter eventuelle disulfidbroer i proteinene. SDS er en anionisk detergent som binder til og denaturerer proteiner til primære/linjær struktur og gjøre dem ensartet negativladet. Når proteiner er linearisert og dekket med SDS vil proteinene ha en netto negativ ladning relativ til deres størrelse og de kan separeres kun avhengig av størrelsen ved hjelp av SDS-PAGE (Shapiro, Vinuela et al. 1967). SDS-PAGE ble utført som beskrevet av Laemmli (1970) (Laemmli 1970).

3.7.1 Prøvepreparering for SDS-PAGE

1. Celler ble dyrke fra ny startkultur i fersk C-medium ved 37°C til $OD_{550} \approx 0,3$.
2. 1 ml celler ble høstet ved 4000 x g i 5 min .
3. Supernatant ble fjernet og cellene ble resuspendert i 50 μ l dH₂O og 50 μ M 2 x SDS-prøvebuffer (1:1). Mengde vann og SDS buffer kunne variere avhengig av hvor stor cellepelletten.
4. Prøvene ble kokt ved 100° C i 10 min. Prøvene ble deretter applisert på gel eller lagret ved -20C.

3.7.2 Prosedyre for støping av SDS-PAGE gel

1. To glassplater ble montert sammen i en støperamme. Deretter ble de plassert i et støpestativ fra Biorad.
2. Reagenser ble blandet både for separasjonsgel (12% eller 15%)og stacking-gel (4%) som beskrevet under. TEMED tilsettes rett før støping.
3. Et volum på 3,2 ml separasjonsgel ble applisert mellom glassplatene. Deretter fylles glassplatene med stackingsgel. Brønnkammene ble satt inn og gelen inkuberes i 20-30 min for polymerisering.
4. Glassplatene ble tatt ut fra støpestativet og plassert i et gelkar og brønnkammere ble fjernet. Det indre kammeret i gelkaret ble fylt opp med runningbuffer hel opp mellom gelplatene, så ble ytre brufferkammeret fylt opp til det dekker nedre kant av gelene.
5. 15 µl prøvene ble applisert på gelen og 5 µl molekylvektstandard (broad range protein marker fra NEB) ble applisert i første brønn.
6. Gelelektroforesen ble utført ved 1,5 V/cm² V i 45 min, eller til fronten hadde vandret til bunn av gelen.

Hver prøve ble separert i to parallelle geler; en gel farges med Coomassie blue for å sjekke mengde protein i prøvene, den andre gelen ble brukt for immunoblotting.

Tabell 3.4 Reagenser for separasjonsgel

Separasjonsgel	12 %	15 %
ddH ₂ O	4,3 ml	3,55 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
40 % acrylamide:bis-acrylamide (29:1)	3,0 ml	3,75 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml
Total volum	10 ml	10 ml

Tabell 3.5 Reagenser for stackingsgel

Stacking gel	4 %
ddH ₂ O	3,15 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml
10 % SDS	0,05 ml
40 % acrylamide:bis-acrylamide (29:1)	0,5 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
Total volum	5 ml

3.7.3 Coomassiefarging

For å visualisere totalprotein i en polyacrylamidegel ble Coomassie blue brukt. Dette ble gjort for å kontrollere utgangsmengde protein. Coomassie blue binder sterkt spesifikt til alle proteinene i gelen. Coomassie blue danner sterkt, men ikke-kovalente komplekser med proteiner dette skyldes sannsynligvis på grunn av en kombinasjon av van der Waals krefter (krefter som virker mellom elektrisk nøytrale molekyler) og elektrostatiske interaksjoner. Dannelsen av proteinet / fargestoff komplekset stabiliserer den negativt ladede anioniske form av fargestoffet og produserer blåfargen. Fargen kan ses deretter på gelen. Den bundne antall fargestoffmolekyler er ca. proporsjonal med mengden av protein til stede per bånd (Diezel, Kopperschlager et al. 1972).

3.7.3.1 Prosedyre for Coomassiefarging

1. Gelen ble overført til en beholder og dekket med Coomassiefarge (0,2 % w/v Coomassie blue løst i 50 % metanol og 7,5 % eddiksyre) i 1 time.
2. For å fjerne overflødig Coomassiefarge ble gelen skylt med MQ-vann og dekket med avfargingsløsning (50 % metanol i 7,5 % eddiksyre). Avfarging ble utført til gelen var fullstendig avfarget, kun proteinbånd var synlige blåfarget.

3.8 Western blotting (immunblotting)

Western blotting er en teknikk som brukes for å detekte et bestemt protein. Western blotting er avhengig tre trinn, i) separasjon av proteiner etter størrelse ved hjelp av gelelektroforese (SDS-PAGE), ii) effektiv overføring av separerte proteiner til en fast proteinmembran og iii) påvisning av et målprotein med antistoffer som er rettet spesifikt mot målproteinet (Towbin 1988).

I denne oppgaven ble immunblotting brukt for å detektere ComM som var merket med Flag-tag. For å detektere Flag-ComM ble immunoblot inkubert med primære antistoffet ANTI-FLAG[®] (Sigma) produsert i kanin benyttet, og deretter sekundærantistoff anti-kanin konjugert med alkalisk fosfatase brukt. ANTI-FLAG[®] binder spesifikt til Flag-taggen, mens det sekundære antistoffer binder seg til FC-regionen til ANTI-FLAG[®]. Sekundære antistoffer som benyttet var konjugert til alkalisk fosfatase (AP). Målproteinet ble visualisert direkte på membran med alkalisk fosfatase substrat som inneholder 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP). Substratet er fargeløs, men avgir blå-pigmenter på membranen med sekundære konjugert alkalisk fosfatase antistoffer.

3.8.1 Prosedyre for Western blotting

1. SDS-PAGE gelelektroforese ble det utført prøvene ble implisert i to geler parallelt. Den ene gelen ble farget med Coomassie og den andre til immunoblotting.
2. Seks stykker 3MM Wathman papir og en Polyvinylidene fluoride -membran (PVDF) ble klippet til en størrelse tilsvarende proteingelen.
3. PVDF-membran ble dekket i 100% metanol i ca 30 sekunder for aktivering.
4. Filtrepapirene ble dekket i kald transferbuffer (Towbin TB).
5. Blotting ble utført med Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad) hvor anode var bunnplate og katode var topplaten.
6. Tre enheter 3MM Wathman-papir ble plassert på bunnplate hvor alt luftbobler ble fjernet godt. Så ble membran plassert som fjerde lag over filterpapir. Deretter ble gelen plassert forsiktig over membranen og til slutt ble tre stk 3 MM Wathman-papirer plassert over.
7. Etter at det kontrollert at det er ingen luftbobler mellom alle lagene, ble det blottet i 1 time ved 15 V.
8. Etter blotting ble membranen overført til rent kar med 3 % (w/v) skummamelk/TBS-T i en time under svak risting for blokkering av ledige bindingseter.
9. Etter blokkering ble membranen vasket 3 ganger med TBS-T i 10 minutter før tilsetting av primær antistoffer.
10. Membranen ble inkubert i 1 time med primær antistoffer (ANTI-FLAG[®]) i TBS-T (1:2000). Deretter ble den vasket 3 ganger med TBS-T i 10 min for å fjerne ubundet antistoff.
11. Membranen ble deretter inkubert med sekundær antistoffer (anti-kanin) i TBS-T (1:1000) i 1 time. Antistoffer som ikke hadde bundet til primærantistoffet ble fjernet ved vasking 3 ganger med TBS-T i 10 minutter.
12. Til slutt ble målproteinet visualisert med ca 5 ml substrat BCIP/NBT under risting til det blir tilstrekkelig framkalt. For å stoppe reaksjonen ble membranen skylt med vann.

3.9 Differensial interferens kontrast (DIC) og fluorescens mikroskopi

DIC mikroskopi ble benyttet i denne oppgaven for å se på morfologien til *S. pneumoniae* når cellene med over-uttrykket ComM sammenlignet med *S. pneumoniae* som uttrykker villtype nivå av ComM.

Det ble også benyttet fluorescens mikroskopi for å prøve detektare signal fra Flag-tagget ComM. I DIC mikroskopi er polarisert lys delt opp i to stråler, som tar litt forskjellige baner gjennom en prøve avhengig av dens optiske tetthet. Når de kombineres, vises det grensesnitt mellom områder av forskjellig tykkelse og / eller brytningsindeks og gir illusjon av et tredimensjonalt bilde. DIC gir mulighet for høyoppløselig avbildning av fikserte og levende celler og organismer, og for 'optisk seksjonering' av tykke prøver (Rosenthal 2009).

Fluorescens-mikroskop er basert på det fenomen at noe materiale avgir energi som er når de bestråles med lys av en bestemt bølgelengde. Prøven kan enten være fluorescerende i sin naturlige form som klorofyll og noen mineraler, eller behandlet med fluorescerende kjemikalier. Alle fluorescensmikroskopi metoder har samme prinsipp. En prøve belyses med lys av en bølgelengde som eksiterer fluorescens i prøven. Det fluorescerte lyset, som vanligvis er ved en lengre bølgelengde enn den belysning, blir deretter fotografert gjennom et mikroskopobjektiv (Lichtman and Conchello 2005). Dette teknologien ble brukt for å lokalisere 3xFlag-ComM protein med fluoriserende antistoffer Alexa (488).

3.9.1 Prosedyre for fiksering av celler til DIC og fluorescens

1. Startkultur ble tinet opp av stammen vi ønsker å undersøke
2. Cellene ble høstet ved 4000 x g i 5 min og deretter resuspendert i ca. 10 ml ferskt C-medium.
3. Cellene ble dyrket opp ved 37°C til OD₅₅₀ ≈ 0,3
4. 4 ml ble høstet og sentrifugert ved 16000 x g i 5 min
5. Supernatant kastet og cellene ble resuspendert i 1 ml PBS.
6. Prøvene ble sentrifugert ved 16000 x g i 5 min.
7. Supernatant hellet ut og cellene ble resuspendert i 1 ml 4 % paraformaldehyd og så ble inkubert først ved romtemperatur i 15 min, deretter på is i 45 min.
8. Cellene ble deretter vasket 3 ganger med PBS, ved å sentrifugere ned ved 16000 x g i 5 min og så ble PBS tilsatt ved 4°C. Etter 3. vask ble kun cellepellet beholdt.
9. Etter vasking ble cellene resuspendert i 0,3 ml GTE (4°C). Cellene kunne da oppbevares opptil 20 timer ved 4°C.
10. 50 µl fikserte celler ble overført til et objektglass og inkubert i 5 min ved romtemperatur. Det ble brukt en hydrofob tusj for å sette en ring rundt cellene slik at de holder seg på et bestemt plass på objektglasset.
11. Deretter ble glassplaten vasket med PBS for å fjerne celler som ikke hadde festet seg.
12. Så behandles cellene som festet seg med 50 µl 0,2% TritonX-100 i PBS (PBS-T) i 10 sekunder.
13. Etter at PBS-T ble fjernet ble hele glassplate dekket med iskaldt -20°C metanol og inkubert ved -20°C i to min.
14. Så ble glassplatene tørket ved romtemperatur.
15. Cellene ble behandlet med 50 µl PBS-T i 5 min. PBS-T ble fjernet med finpipette
16. Celleprøvene ble blokkert med 50 µl 5% skummetmelk i PBS-T (PBS-T-M) i 60 min. Det ble brukt fuktkammer slik at PBS-T-M ikke tørkes under inkuberingen.
17. Etter en time inkubering ble PBS-T-M fjernet og cellene ble vasket 2 x 10 sek med 50 µl PBS.
18. Så ble cellene inkubert med 50 µl ANTI-FLAG[®] polyklont antistoff i PBS-M (1:200) i 60 min i fuktkammer.
19. Etter en time inkubering ble det tilsatt 50 µl PBS i 10 sek. to ganger, og så en gang i 5 min.
20. Så ble 50 µl sekundært anti-Kanin-Alexa (488) antistoff i PBS-M (1:100) tilsatt og inkubert i 60 min i fuktkammer.

21. Etter en time inkubering ble preparatene vasket 2 x 10 sek. Med 50 µl PBS, og så en gang i 5 min.
22. Til slutt ble glassplatene lufttørket og 7 µl vann eller Slowfade Gold antifade reagens ble tilsatt. Deretter ble dekkglass plassert over preparatet og forseglet med negllakk.

3.10 *in vivo* formaldehyd kryssbinding

Formaldehyd kryssbinding ble utført for å undersøke om ComM proteinet interagerer med andre membranproteiner. Metoden er basert på kryssbinding av proteiner kjemisk. Formaldehyd med sin enkle kjemiske struktur (CH₂O) har den korteste kryssbindingsavstand (~ 2-3 Å) av alle kryssbindingsreagenser (Klockenbusch and Kast 2010). Kryssbindingen involverer en kovalent binding av den reaktive gruppen i et aminosyreresidu som binder et aminosyreresidu i et annet protein innenfor 2-3 Å. Dermed blir en kryssbinding mellom proteiner som interagerer med hverandre (Nadeau and Carlson 2007)

3.10.1 Prosedyre for formaldehyd kryssbinding

1. Celler fra startkultur ble dyrket opp i 100 ml C-medium til OD₅₅₀ ≈ 0,3 og høstet ved sentrifugering i 8000 × g for 10 min ved 25 °C
2. Cellene ble vasket med 5 ml 1 x PBS ved 25 °C og cellene ble høstet 8000 × g i 10 min ved 4 °C
3. Cellene ble deretter tilsatt 5 ml PBS med 500 µl vann og 50 µl 10 % formaldehyd.
4. Celler med løsningen ble blandet godt og inkubert ved 37°C i 1 time.
5. Kryssbindingsreaksjonen ble stoppet ved å tilsette 1 ml 1,0 M glycine og inkubert i 10 min ved 25 °C
6. Cellene ble høstet ved sentrifugering i 8,000 × g i 10 min ved 25 °C og vasket med 5 ml 1xPBS ved 25 °C og sentrifugert igjen. Alt PBS ble fjernet med fin pipette.
7. Prøvene ble deretter analysert videre ved hjelp av SDS-PAGE, se 3.7.1.

4. Resultater

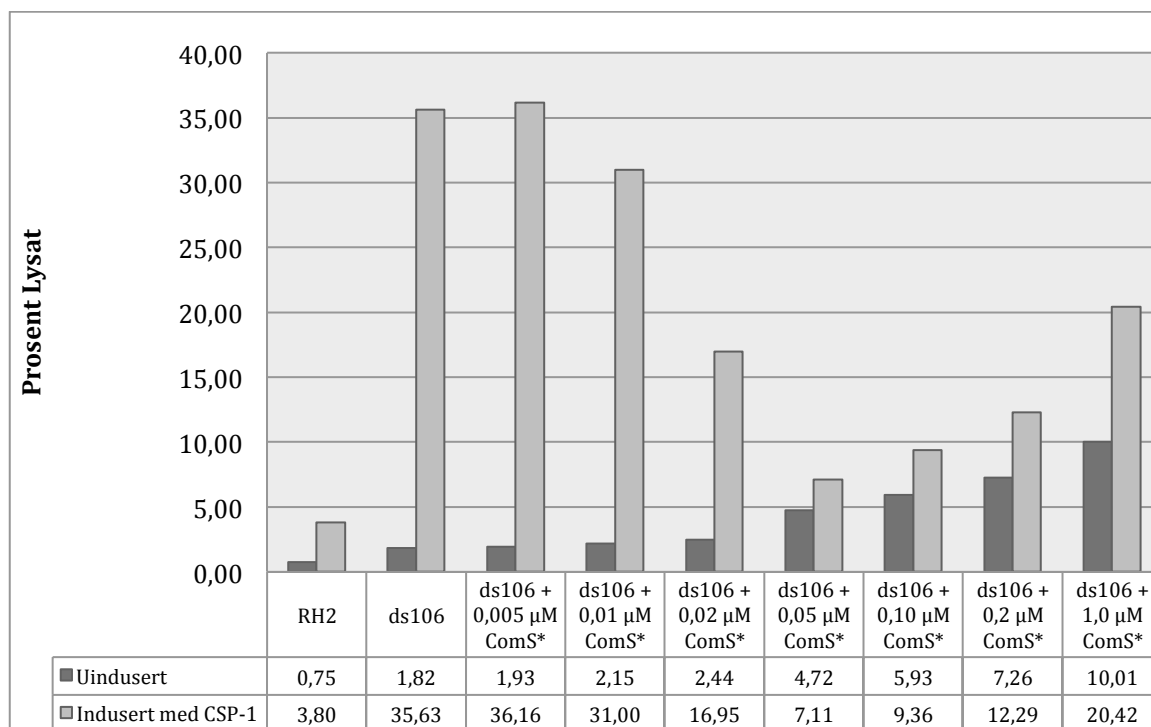
4.1 Riktig mengde ComM er kritisk for immunitet mot CbpD i kompetente pneumokokker

ComM uttrykkes i den tidligste fasen av kompetanse hos *S. pneumoniae* (et såkalt «early gene») og er nøkkelfaktoren som gir immunitet mot CbpD-mediert cellelysis. Tilstanden der ComM uttrykkes i kompetente pneumokokker er transient (20 minutter), og det har til nå ikke vært mulig å detektere ComM i kompetente pneumokokker. Dette har gjort det svært vanskelig å studere funksjonen til ComM og hvordan dette proteinet reguleres.

For å ha bedre kontroll på ekspresjonen av ComM valgte vi å benytte et genekspresjon/depletion system kalt ComRS utviklet for *S. pneumoniae* (Berg, Biornstad et al. 2011). Dette systemet er basert på tre komponenter fra kompetansesystemet i *S. thermophilus*: responsregulatoren ComR, induksjonspeptidet ComS* og promoteren P_{comX} . ComS* tas opp via det native oligopeptidtransportsystemet Ami til *S. pneumoniae* og vil binde til og aktivere ComR i cytoplasma. Aktivert ComR binder til en såkalt ECom-boks i P_{comX} promoteren og aktiverer transkripsjon. ComRS har ikke homologi med andre proteiner i *S. pneumoniae*, og vil derfor ikke forstyrre den normale fysiologien hos *S. pneumoniae*. P_{comX} er en sterk titrerbar promoter og genekspresjon fra P_{comX} og kan finjusteres avhengig av mengde ComS* som tilføres vekstmediet til cellene (Berg, Biornstad et al. 2011). ComRS-systemet ble brukt i denne studien for å kunne uttrykke ulike nivå av ComM i *S. pneumoniae* på en kontrollert måte over lenger tid.

For å bli kjent med ekspresjonssystemet og bestemme hvilken ComS*-konsentrasjon som ga høyest grad av ComM-mediert immunitet mot CbpD ble stamme ds106 ($\Delta comM_{wt}$, $hirL::lacZ$, $comM_{P_{comX}^+}$) dyrket med økende mengder ComS* (0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 og 1,0 μM) i vekstmediumet. I denne stammen er *comM*-genet klonet bak P_{comX} , mens det native *comM*-genet, heretter kalt *comM_{wt}*, er fjernet. På denne måten kunne ekspresjonsnivået av *comM* reguleres ved å indusere med ulik mengde syntetisk ComS*, og immunitet skyldes kun ComM uttrykt fra P_{comX} . I tillegg var genet *lacZ* (β -galaktosidase) fra *Escherichia coli* klonet og transformert inn i *hirL* genet på kromosomet til ds106 som beskrevet av Steinmoen et al (2002). Ved å måle mengde frigjort β -galaktosidase etter induksjon med CSP-1 kan prosent cellelysis bestemmes (se seksjon 3.6 og 3.6.1 i metoder for detaljert beskrivelse).

Genet *hirL* har ukjent funksjon, men uttrykkes strekt gjennom logaritmisk vekstfasen. Genet *hirL* har ingen effekt for naturlig kompetanse eller veksten av cellene (Steinmoen, Knutsen et al. 2002). Stamme RH2 (*comM_{wt}⁺, hirL::lacZ*) ble benyttet som villtype kontroll. Cellene ble dyrket i C-medium ved 37°C og da celledettheten var nådd $OD_{550} \approx 3,0$, ble kompetanse induisert ved å tilsette CSP-1 (250 ng/ml). Kompetanseinduserte celler ble inkubert i 30 minutter ved 30 °C før β -galaktosidaseaktivitet ble målt i Miller units i supernatant og totalt cellelysat både før og etter induksjon av kompetanse. Prosent cellelysis ble beregnet ut i fra Miller units (Figur 4.1).



Figur 4.1 Immunitet mot CbpD ved økende mengder ComM. Diagrammet viser cellelysis i prosent før og etter induksjon av kompetanse. ds106 ($\Delta comM_{wt}$, *hirL::lacZ*, *comM_{PcomX}⁺*) ble dyrket med økende mengde ComS* i vekstmedium for å gradvis øke mengde ComM uttrykk. Stamme RH2 (*comM_{wt}⁺, hirL::lacZ*) ble brukt som kontroll på villtype immunitet. Mengde ComS* som ga immunitet tilsvarende villtype mot CbpD var 0,05 μM, mens konsentrasjoner over og under dette resulterte i lavere immunitet.

Resultatene viser at 0,05 μM ComS* gir immunitet nærmest villtype. Dvs. at mengde *comM_{PcomX}* som blir uttrykt med 0,05 ComS* i vekstmediumet gir best immunitet. I tillegg ser det ut som at overuttrykk av ComM øker lekkasjen eller cellelysis før induksjon av kompetanse. Dette kan tyde på at overuttrykk av *comM_{PcomX}* ikke er gunstig for normal cellefunksjon. Eksperimentet ble utført i flere replikater og ga samsvarende resultat.

4.2 Merking ComM-proteinet med Flag-TagTM

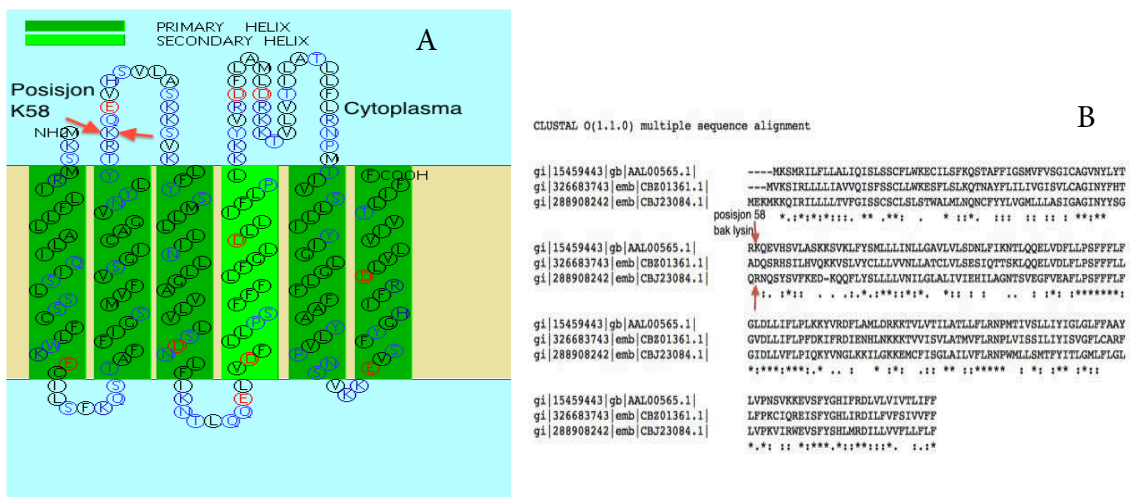
Ekspresjon av ComM ved hjelp av ComRS-systemet (Figur 4.1) viste at pneumokokkene ble gradvis immune mot CbpD med økende ComM-ekspresjon som forventet, men at for høye nivå av ComM var skadelig for cellene. For å kunne detektere mengden ComM som behøves for immunitet og som fører til skade på cellene valgte vi å introdusere en tag i ComM. Et slikt system som muliggjør deteksjon av ComM vil også være et viktig verktøy for å studere hvor mye ComM som uttrykkes i kompetente celler og hvordan funksjonen til ComM reguleres. Et funksjonelt tagget protein kan også i mange tilfeller lokaliseres i cellen ved hjelp av immunofluorescens. Det er ønskelig og benytte en tag som har lav deteksjonsgrense og som ikke påvirker den native funksjonen til målproteinene. Basert på tidligere erfaringer valgte vi å benytte Flag-tag for å tagge ComM.

Flag-tagen er et hydrofilt oligopeptid som består av åtte aminosyrer (DYKDDDDK) med en størrelse på 1,01 kDa. Flag-tag brukes hovedsakelig til deteksjon og rensing av proteiner. Egenskaper som at størrelsen på peptidet er relativt liten og at den er hydrofil gjør at målproteinets funksjon ofte blir upåvirket. Det er også mulig å fjerne taggen fra sin fusjonspartner ved proteolytisk kløyving med enterokinase (Thomas P. Hopp 1988). For å senke deteksjonsgrense og øke spesifisiteten til Flag-systemet er det også blitt utviklet såkalte 2xFlag- og 3xFlag-systemer (Bertrand, West et al. 2010). Disse taggene består av henholdsvis to (DYKDHDIDYKDDDDK) og tre (DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) repeterte Flag-sekvenser. 3xFlag-tag har 200 ganger lavere deteksjonsgrense enn originalen (1xFlag). Derfor er den godt egnet for lav-uttrykk proteiner. I likhet med 1xFlag-tag, er 2x og 3xFlag hydrofil, har et enterokinase spaltingssete og er relativt små, henholdsvis 1,89 og 2,73 kDa (Terpe 2003) (se metoder 3.5). For å teste hvilket Flag-system som er egnet seg best til å tagge ComM valgte vi å klonere inn både 1x-, 2x-, og 3xFlag-tag bak K58 i ComM.

4.2.1 Plassering av FLAG-tag i ComM

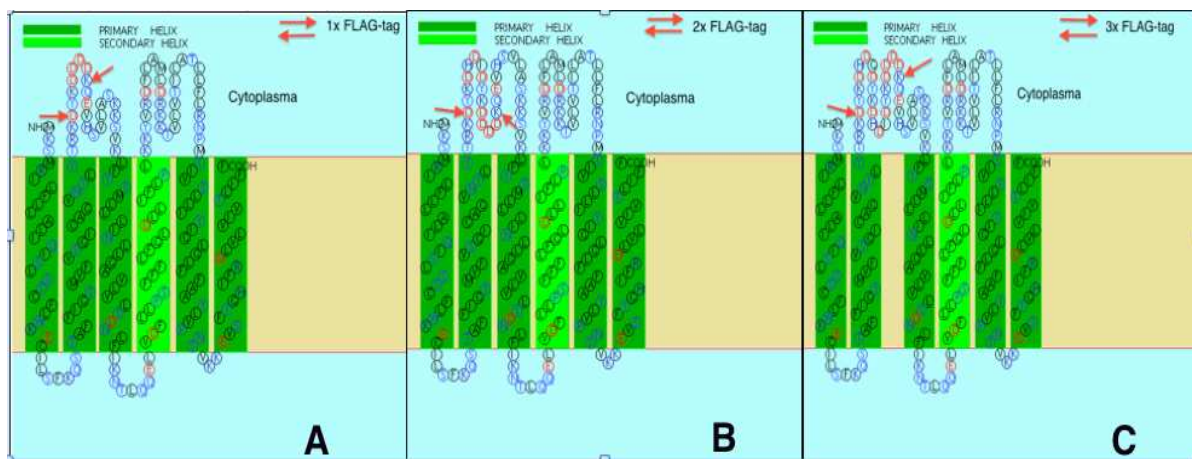
Når man tagger et protein for å studere dets funksjon er det viktig at dette fusjonsproteinet bevarer sin biologiske funksjon. For å oppnå dette med ComM, var det viktig å velge en plassering av Flag-tag i ComM der det var lite sannsynlig at konserverte aminosyrer blir forstyrret. Det har tidligere blitt laget en His-taget versjon av ComM som hadde full funksjonalitet *in vivo* (Berge 2010). Basert på en sammenstilling av aminosyresekvensene til 8 ComM homologer fra ulike streptokokkarter - ble posisjon 58 (etter lysin58) valgt som egnet plassering av en tag (Berge 2010). Dette ble tatt som utgangspunkt for plassering av Flag-taggen i dette prosjektet.

Som beskrevet tidligere er strukturen til ComM ukjent, men det finnes bioinformatiske verktøy som kan gi en topologiprediksjon av membranproteiner. SOSUI prediksjonsprogram ble brukt i denne sammenheng (Figur 4.2). SOSUI predikerer ComM til å være et integralt membranprotein med 6 transmembrane områder. Topologiprediksjonen av ComM indikerte at Lysin58 (K58) var en potensiell egnet plassering av Flag-taggen. De flankerende områdene til K58 er ikke spesielt konserverte sammenlignet med andre streptokokker arter (Figur 4.2). I tillegg predikeres K58 til å være del av et relativt hydrofilt område i den første intracellulære loopen.



Figur 4.2 Topologiprediksjon av ComM og Sekvenssammenligning i ClustalW. Figuren viser i (A) topologiprediksjon av ComM ved hjelp av programmet SOSUI (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998). ComM predikeres til å være et membranprotein med seks transmembran helikser. Det ser ut som både N-terminal og C-terminal enda av ComM er rettet inn i cytoplasma . K58 der Flag-taggen skulle plasseres er indikert med røde piler. Hydrofobe aminosyrer er vist i svart og polare residuer i blått. Positiv og negativt ladde aminosyrer er indikert med henholdsvis lilla. (B) Sammenligning av ComM i ClustalW: tre comM-sequens fra tre ulike streptokokker arter ble sammensatt slik at det en oversikt over konserverte områder. En * (stjerne) angir posisjoner som har en enkel, fullstendig konservert residu. En (:) (kolon) angir konservering mellom grupper av sterkt lignende egenskaper. En (.) (punktum) indikerer konservering mellom grupper av svakt lignende egenskaper. Posisjon 58 bak lysin hos *S. pneumoniae* er merket med piler.

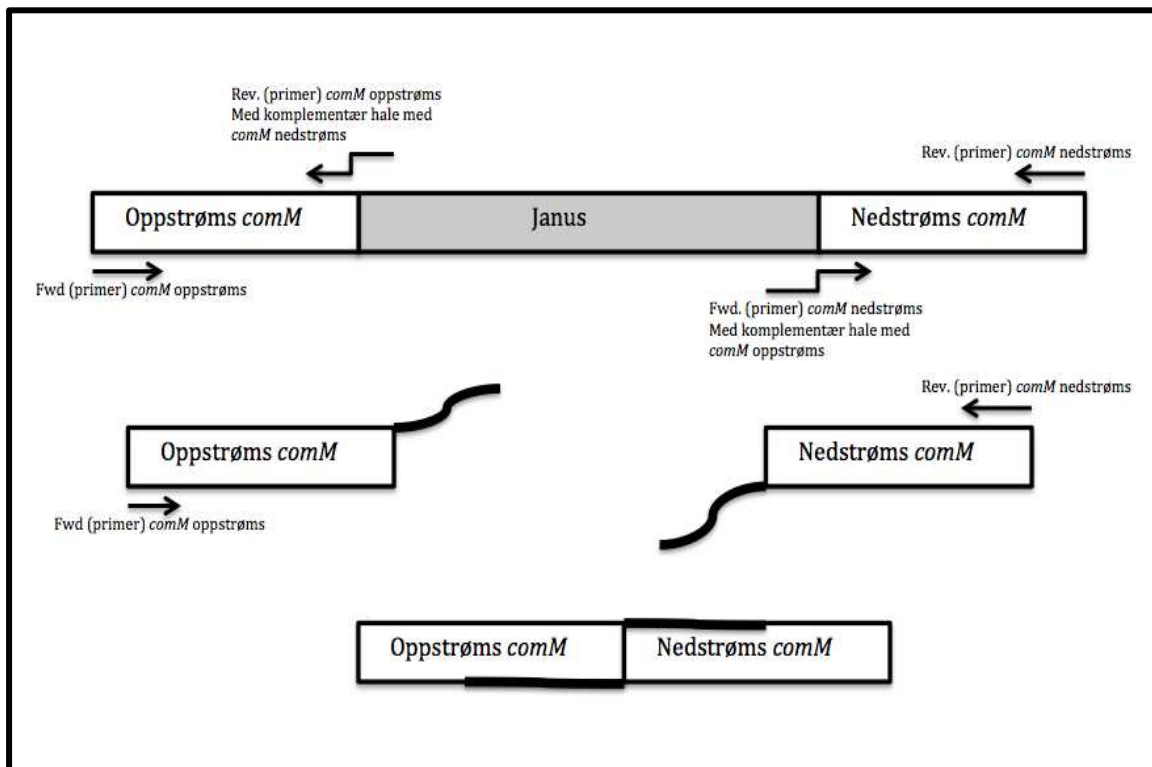
Det var sannsynlig at en Flag-tag kunne påvirke proteins funksjon, og derfor valgte vi å lage konstruksjoner av ComM med både 1xFlag, 2xFlag og 3xFlag bak K58, heretter referert til som 1xFlag-ComM, 2xFlag-ComM og 3xFlag-ComM. Se Figur 4.3 Dette ble gjort for å kunne finne den versjonen som beholdt mest av sin native funksjon, samtidig som den skulle kunne detekteres.



Figur 4.3 Topologiprediksjon av membranprotein ComM med innsatt Flag-tag. Prediksjon av topologi av ComM med innsatt Flag-tag i Prediksjonsprogram SOSUI (Hirokawa, Boon-Chieng et al. 1998). A: predikerer for 1xFlag-ComM. B: predikerer for 2xFlag-ComM og C: predikerer for 3xFlag-ComM. Røde piler peker på starten og slutten av Flag-tagget i A, B og C. Flag-taggene predikeres til å forlenge den første intracellulære loopen i ComM.

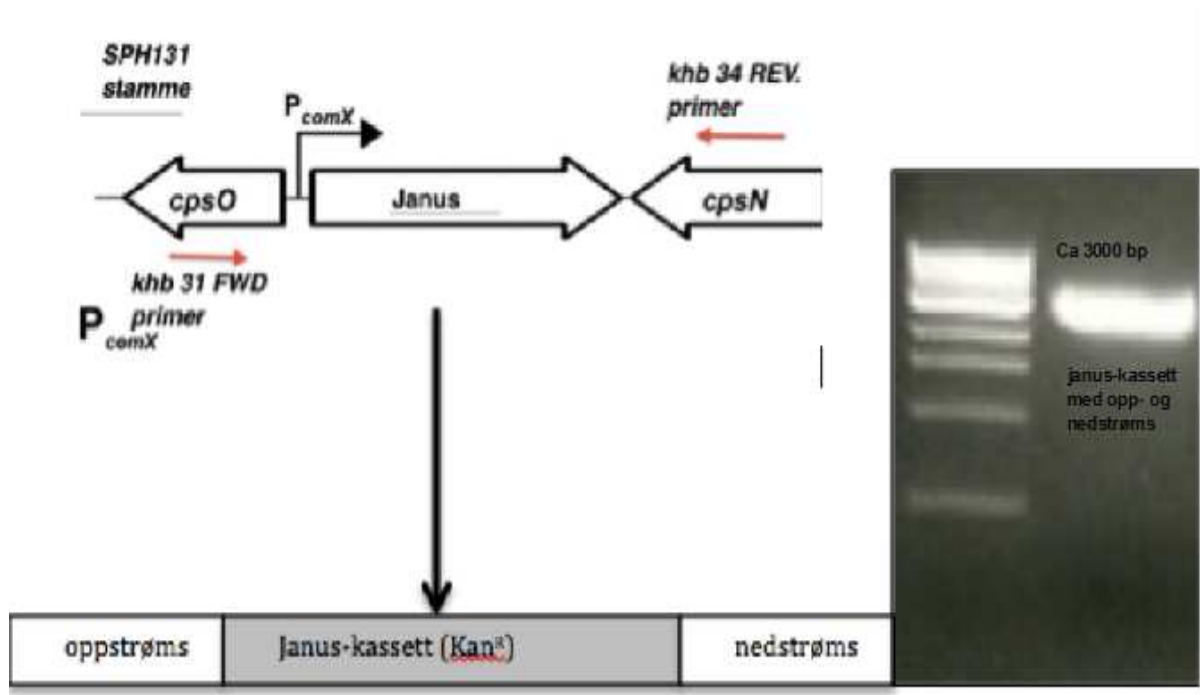
4.2.2 Konstruksjon av Flag-tagget ComM

Flag-tag ble plassert bak K58, dvs. Posisjon 174 i nukleotidsekvens til *comM*. Ved å plassere Flag-ComM bak promotor P_{comX} , ville det var mulig å kontrollere ekspresjon ved hjelp av mengden ComS* tilsatt vekstmediumet. Konstruksjon ble gjort i flere steg som følger. Stamme ds106 som hadde deletert nativt *comM* ($comM_{wt}$) ved hjelp av en Janus kassett ($\Delta comM_{wt}::janus, hirL::lacZ, comM_{P_{comX}^+}$) ble brukt som utgangspunkt. Stamme ds106 ble transformert med et DNA-fragment hvor de to regionene ~ 1000 bp oppstrøms for $comM_{wt}$ og ~ 1000 bp nedstrøms for $comM_{wt}$ var satt sammen uten genet eller Janus-kassetten mellom regionene. Etter denne transformasjonen var Janus-kassetten fjernet fra ds106 og stamme ds108 ($\Delta janus, hirL::lacZ, comM_{P_{comX}^+}$) var dannet. se Figur 4.4. Nye transformanter ble selektert ved dyrking på Todd-Hewitt agar tilsatt med 200 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. Koloniene ble plukket og dyrket opp i C-medium tilsatt 200 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin og bekreftet med PCR. (se metode 3.4.1).



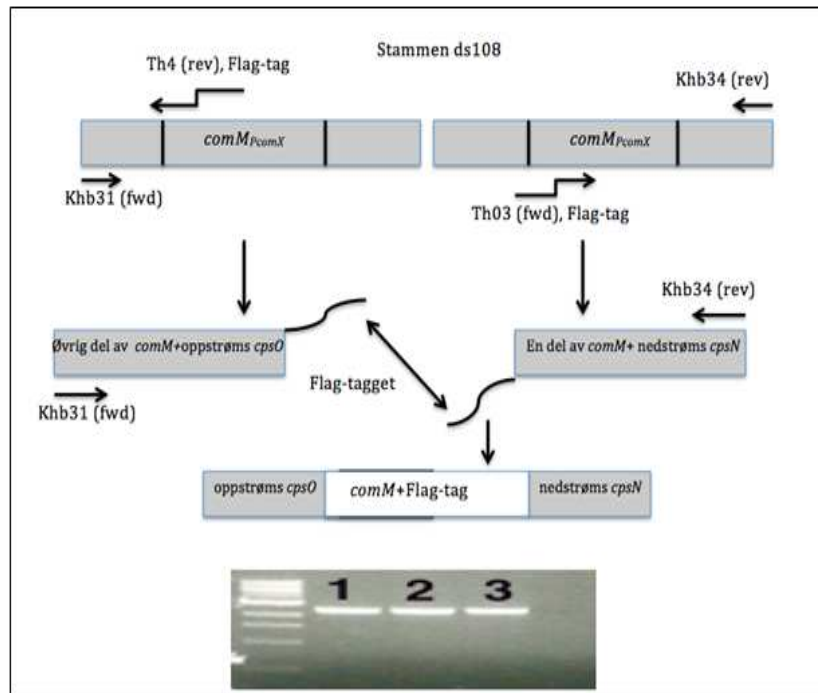
Figur 4.4 Fjerning av Janus-kassett fra stammen ds106. Figuren viser en skjematisk fremstilling av hvordan fjerning av Janus-kassett fra stamme ds106. Å bruke primere med 5' overheng som er komplementære med oppstrøms og nedstrøms gjør det mulig å fusjonere disse fragmentene ved hjelp av ekstensjon-overlapp PCR (Metoder 3.2.1). Dermed får vi produkt som inneholder kun opp- og nedstrøm regioner.

Videre ble $comM_{P_{comX}^+}$ i stammen ds108 byttet ut med Janus. I dette tilfellet ble Janus-kassetten amplifisert fra stammen SPH131 som hadde Janus bak promoter P_{comX} . Primere som ble brukt var khb31(Fwd) og khb34 (Rev), som var primer for oppstrøms og nedstrøms for Janus-Kan^R (Figur 4.5). Etter at Janus-PCR produkt ble separert i agarosegel og rensert ble det transformert inn i ds108. Transformasjonen ble utført i C-medium ved 37°C. Stamme ds108 ble dyrket til $OD_{550} \approx 0,1$. CSP-1 (syntetisk kompetanse-stimulerende peptid) ble induert til kompetanse til en konsentrasjon på 250 ng/ml. Deretter ble DNA (Janus) tilsatt, og kulturen ble inkubert i 120 min ved 37°C. Seleksjon av riktig mutanter ble utført på Todd-Hewitt agar med tilsatt antibiotika konsentrasjon, kanamycin (Kan) 400 µg/ml. For seleksjon av ny stammen (th001) mutanter med Janus, ble de dyrket i kanamycin 400 µg/ml agarskål anaerobt ved 37°C over natt. Den nye stammen kalt th001 ($\Delta comM_{wt}$, $hirL::lacZ$, $Janus_{P_{comX}^+}$). Th001 ble bekreftet med PCR med primere Khb31 (Fwd) og JanusR (Rev).



Figur 4.5 amplifisering av janus-kassetten fra SPH131. Janus ble amplifisert med primere kbh31 (Fwd, oppstrøm fra janus i *cpsO*) og kbh31(Rev. Nedstrøms fra janus i *cpsN*). Produktet Janus med oppstrøms og nedstrøms ble transformert i stammen ds108. Figuren er modifisert etter (Berg, Biorstad et al. 2011)

DNA-fragmentet ($comM_{P_{comX}}$ + Flag-tag) ble konstruert ved å bruke forward og revers *comM* primere med Flag-tagoverheng (se primerliste, tabell 2.3). *1xFlag-comM*, *2xFlag-comM* og *3xFlag-comM*. DNA-fragment ble dannet med tre trinn PCR Se Figur 4.6.

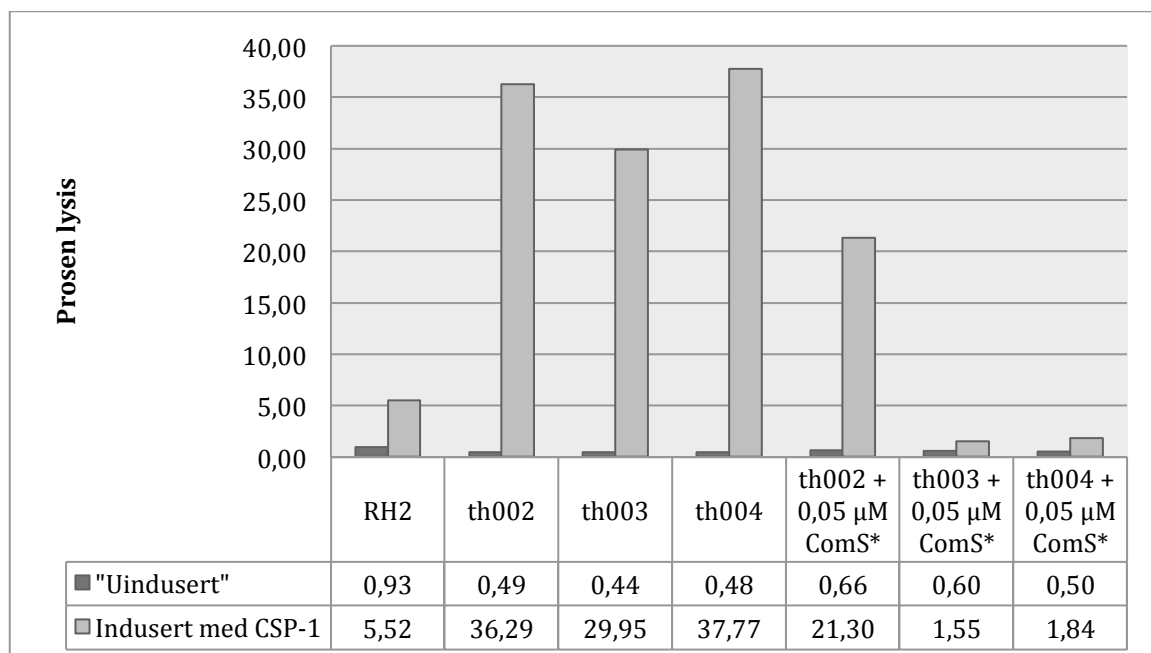


Figur 4.6 konstruksjon av $comM_{Flag-tag}$ DNA-fragment. Figuren viser en skjematisk fremstilling av konstruksjon $comM$ med 1xFlag-tag bak promotor P_{comX} med overlapping PCR. Primerpar khb31/th04 ble brukt for amplifisere oppstrøms region ($cpsO$) med inkludert sekvensen som koder for aminosyre 1-58 av ComM. Flag-taggen ble introdusert ved at th04-primer inneholdt Flag-kodende sekvens i 5' ende. På samme måte ble sekvensen som koder for aminosyre 59-206 og nedstrøms region ($cpsN$) amplifisert med primere par th03/khb34. Primer th03 har en 5' hale som er komplementær til Flag-tag kodende sekvens i 5' ende av primer th04. Disse fragmentene ble deretter fusjonert ved hjelp av overlap-ekstensjon PCR og primerpar khb31/khb34 (se seksjon 3.2.1 metodedel). Samme metode brukt for å konstruere $comM$ med 2xFlag-tag og 3xFlag-tag. Gel bildet viser renset PCR-Produkt 1. 1xFlag- $comM$ med opp- og nedstrøms. 2. 2xFlag- $comM$ med opp- og nedstrøms og 3. 3xFlag- $comM$ med opp- og nedstrøms.

DNA-fragmenter ble transformert i stammen th001 ($\Delta comM_{wt}$, $hirL::lacZ$, $janus$). Transformasjon ble utført i C-medium med tilsatt CSP-1. For seleksjon av nye mutanter (th002, th003 og th004) ble de dyrket i agarskål med tilsatt 200 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. th002, th003 og th004 ble bekreftet med PCR og sekvensering.

4.3 Funksjonalitet til 1x, 2x og 3x-Flag-ComM..

For å kontrollere om aktiviteten av ComM var bevart etter innsetting av Flag-tag og hvilket størrelse Flag-tag-versjon som ga best immunitet ble β -galaktosidase-assay utført med stammene th002 ($\Delta comM_{wt}$, *hirL::lacZ*, *1x-Flag-comM_{P_{comX}}⁺*), th003 ($\Delta comM_{wt}$, *hirL::lacZ*, *2xFlag-comM_{P_{comX}}⁺*), th004 ($\Delta comM_{wt}$, *hirL::lacZ*, *3xFlag-comM_{P_{comX}}⁺*) og RH2 (*comM_{wt}⁺*, *egb⁻*, *hirL::lacZ*) som kontroll. Th002, th003 og th004 har Flag-tagget *comM* bak promotor *P_{comX}*. Derfor kunne uttrykket justeres med ComS*. Basert på resultatet fra Figur 4.1 som viste at 0,05 μ M ComS* var optimal konsentrasjonen for høyest grad av immunitet, ble denne konsentrasjonen av ComS* benyttet for å teste immuniteten til de tre Flag-taggede versjonene av ComM. ComS* ble tilsatt i dyrket C-medium med OD₅₅₀ \approx 0,05 til OD₅₅₀ \approx 3,0. For metoden se metoder avsnitt 3.6.1.



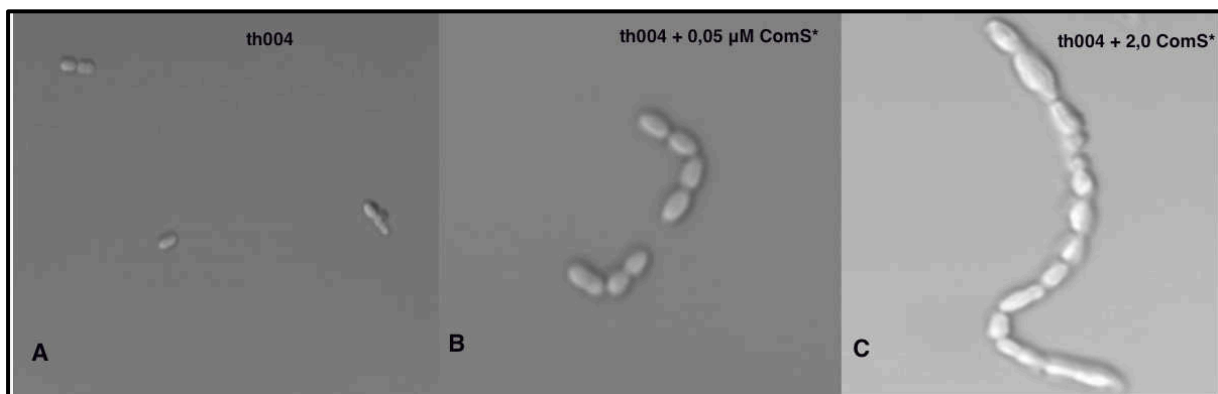
Figur 4.7 β -galaktosidase-frigjøring fra th002, th003 og th004 for kontroll av ComM aktivitet med Flag-tagget. Diagrammet viser prosentandel cellelysis av stammene th002, th003 og th004 før og etter induksjon med CSP-1. RH2 (*comM_{wt}⁺*, *egb⁻*, *hirL::lacZ*) ble brukt som kontroll. Diagrammet viser at stammene th002, th003 og th004 er ikke immune uten ComS*. th002 med 0,05 μ M ComS* gir dårlig immunitet, mens th003 og th004 gir en utmerket immunitet med 0,05 μ M ComS* i vekstmediet.

Resultatet av β -galaktosidase-assay (Figur 4.7) viser at 2xFlag-ComM (th003) og 3xFlag-ComM (th004) gir beskyttelse mot CbpD. 1xFlag-ComM gir lite eller ingen immunitet. Ingen av stammene th002, th003 og th004 var immune uten ComS* tilsatt i vekstmediet. Dette bekrefter også at *comM_{wr}* er fjernet og kun Flag-ComM uttrykt fra *P_{comX}* ga immunitet etter induksjon med ComS*. Eksperimentet ble utført to ganger og ga lignende resultater.

Både 2xFlag-ComM (th003) og 3xFlag-ComM (th004) viste å ha tilnærmet villtype funksjonalitet med hensyn på å gjøre cellene immune mot CbpD (se Figur 4.7), men siden 3xFlag-ComM har lavest deteksjonsgrense (200 ganger lavere enn 1xFlag-tag) så ble det valgt å gjøre videre studier med denne versjonen av Flag-ComM.

4.4 Overuttrykk av 3xFlag-ComM fører til unormal morfologi hos *S. pneumoniae*

Siden det ble påvist at overuttrykk av ComM øker lekkasjen eller cellelysis (Figur 4.1), kunne dette tyde på at overuttrykk av ComM ikke er gunstig for normal cellefunksjon. For å undersøke dette nærmere valgte vi å analysere hvordan overuttrykk av ComM påvirket morfologien til *S. pneumoniae*. I dette eksperimentet ble 7 μ l celler tatt direkte fra oppdyrket kulturmedia og sett i mikroskopet. Stammen th004 ($\Delta comM_{wt}$, $3xFlag-comM_{P_{comX}}$) ble dyrket til $OD_{550} = 0,3$ ved $37^{\circ}C$ med tilsatt 0, 0,5 og 2,0 μ M ComS*. Hos th004 er uttrykk av 3xFlag-ComM avhengig av mengde ComS* tilsatt vekstmediumet. Ved 0 μ M ComS* i vekstmediumet ville derfor cellene ha normal morfologi og det ble kun observert diplokokker med en typisk ovoid fasong og septumdannelse i midten (Figur 4.8, A).

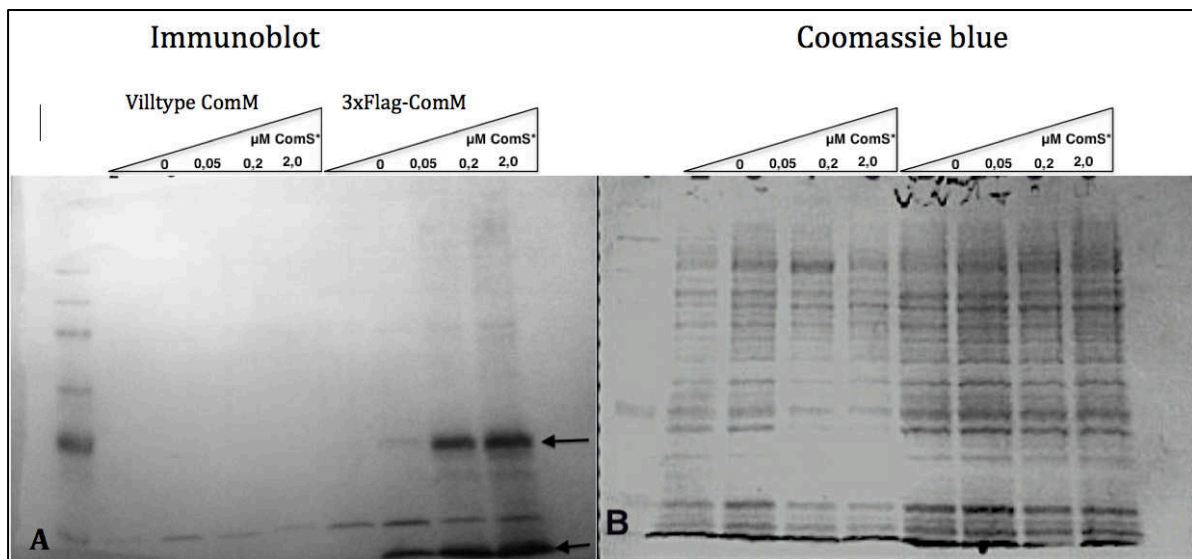


Figur 4. 8 Overuttrykk av 3xFlag-ComM fører til dramatiske forandringer i morfologien til *S. pneumoniae*. Figuren viser morfologien til *S. pneumoniae* (th004) med økende uttrykk av 3xFlag-ComM. . A viser th004 uten tilsatt ComS* og dermed uttrykker ikke 3xFlag-ComM og cellene viser normal morfologi ved å opptre som ovoid formede diplokokker. B viser th004 med tilsatt 0,05 μ M ComS* og der ble det observert enkle, diplokokker og kjeder med normal cellemorfologi. C viser th004 med tilsatt 2,0 μ M ComS* og det ble observert kjeder med misformede celler som var enten forstørret eller minket i størrelsen. Bilder ble tatt ved hjelp av Zeiss LSM 700 konfokal laser scanning mikroskop.

For th004 som var dyrket med 0,05 μ M ComS* ble det observert normal cellemorfologi, men det ble også sett lengre kjeder med celler (Figur 4.8, B). Mens i th004 med tilsatt 2,0 μ M ComS* ble det observert flere lengre cellekjeder med forstørrende, avlange og misformede fasong (Figur 4.8, C). Det så ut som septumdannelse forskjøvet fra midten. En lignende morfologiendring ved overuttrykk av villtype ComM fra P_{comX} ble også observert men det ble dessverre ikke tatt med i denne oppgaven.

4.5 Immunodeteksjon av 3xFlag- ComM

For å undersøke ComM-proteinet mengde og størrelse litt nærmere ble immunoblotting analyse utfør. ComM ble detektert indirekte med anti-Flag-antistoffer som ville binde seg til Flag-ComM i membran og sekundære antistoffer (anti-kanin) konjugert til alkalisk fosfatase som videre binder seg til anti-Flag-antistoffer (Metoder 3.8.1). To *S. Pneumoniae*-mutanter ds108 (*comM_{P_{comX}}*) og th004 (*3xFlag-comM_{P_{comX}}*) ble sammenlignet. Begge stammene uttrykker ComM fra ECom-system kontrollert med ComS* (Berg, Biornstad et al. 2011) men th004 uttrykker 3xFlag-ComM fra ComX promotor. ComS* ble tilsatt til begge mutantene i forskjellig konsentrasjoner (0, 0,05 , 0,2 og 2,0 μM). Etter at membranen ble framkalt med BCIP-substrat kom det til syne et bånd med estimert størrelse $\sim 25\text{-}26$ kDa. Størrelsen på dette båndet samsvarte med den teoretiske massen til 3xFlag-ComM som er 26,3 kDa (Figur 4.9). Ds108-mutanten som uttrykte ComM uten 3xFlag-tag viste ingen bånd ved denne størrelsen noe som beviste at det var 3xFlag-ComM som var detektert for th004. En interessant observasjon for th004-mutanten var at det i tillegg kom til syne flere bånd med laver masse enn fullengde 3xFlag-ComM, spesielt et sterkt bånd med masse < 10 kDa. Mengden 3xFlag-ComM uttrykt i th004 økte proporsjonalt med mengde ComS* i vekstmediet.

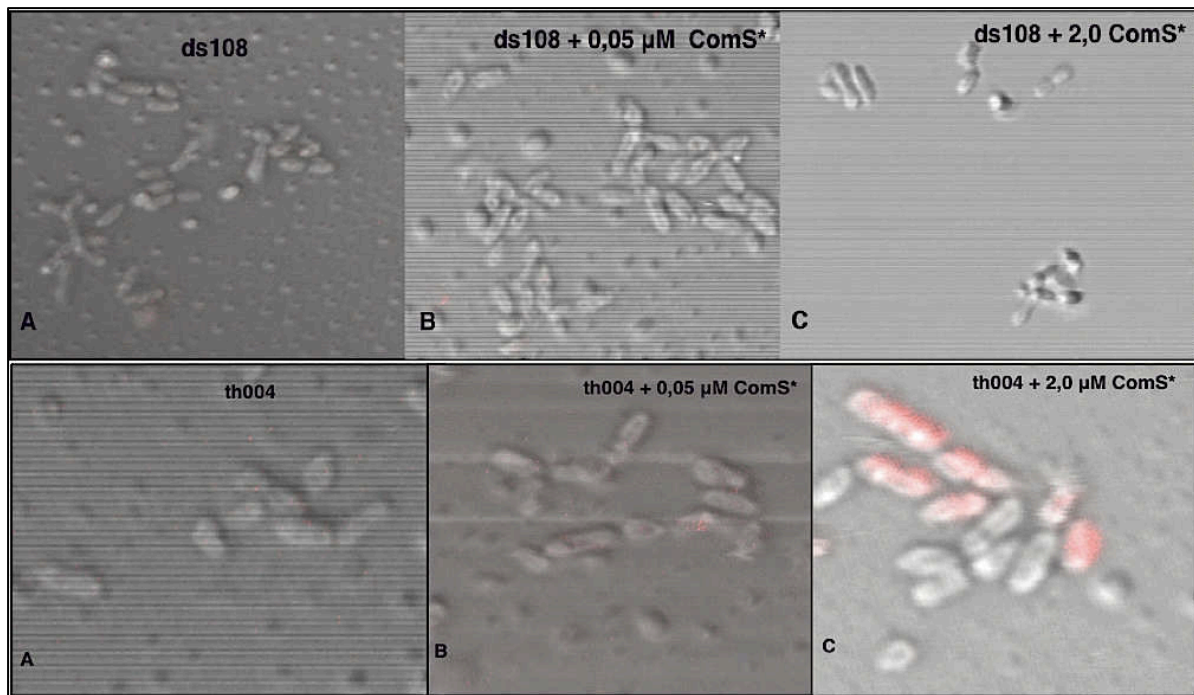


Figur 4.9 Deteksjon av 3xFlag-ComM ved hjelp av immunoblotting. Villtype ComM og 3xFlag-ComM ble uttrykt i økende mengder ved hjelp av med ComRS-systemet og økende konsentrasjoner av induserpeptidet ComS* i vekstmediet. Stamme ds108 (*comM_{wt}*) og th004 (*3xFlag-comM*) ble inokulert til $OD_{550} = 0,05$ i C-medium som inneholdt 0, 0,05, 0,2 og 2 μM ComS*. Ved $OD_{550} = 0,3$ ble cellene høstet og total proteinekstrakt ble separert ved hjelp av SDS-PAGE og blottet over på en PVDF-membran. Lik protein mengde ble benyttet i alle prøvene. Økende uttrykk av *ComM_{wt}* og 3xFlag-ComM er vist i henholdsvis brønn 2-5 og 6-9. 3xFlag-ComM ble detektert med ANTI-FLAG® primær antistoff og anti-kanin-AP sekundært antistoff. En parallell gel ble farget med Coomassie blå for å kontrollere mengde totalprotein påsatt for hver prøve. Molekylvektsstandard (Broad range protein marker fra NEB) er applisert i brønn 1.

At det kommer et bånd med lavere masse enn ComM kan tyde på at ComM blir degradert. Ved 0,05 μM ComS* ble nesten alt ComM degradert. Siden det ble påvist at overuttrykk av ComM kan være skadelig for pneumokokkene (se Figur 4.8 ovenfor) kan det tenkes at cellene har et system som sikrer at ComM ikke får tid til å akkumulere i kompetente pneumokker.

4.6 Lokalisering av 3xFlag-ComM ved fluorescensmikroskopi

Murein hydrolasen CbpD er vist å angripe celleveggen hos pneumokker i den septale regionen. Det var da naturlig å tenke at ComM på en eller annen måte beskytter denne regionen mot angrep fra CbpD. Det var derfor av interesse å prøve og lokalisere ComM i cellen. Siden 3xFlag-tag har bevart mesteparten av sin native funksjon er det sannsynlig at denne lokaliserer samme sted i cellene som villtype ComM. Lokalisering av 3xFlag-ComM ble utført ved å bruke immunofluorescensmikroskopi og antistoff spesifikt rettet mot Flag-taggen. Stammene ds108 ($\Delta comM_{wt}$, $comM_{PcomX}$) og th004 ($\Delta comM_{wt}$, $3xFlag-comM_{PcomX}$) ble dyrket i C-medium tilsatt 0, 0,05 og 2,0 μM ComS*. Stammene ble fiksert og innkubert med primærantistoff ANTI-FLAG og sekundær antistoff Anti-Flag Alexa[®] 488 som beskrevet i Metoder seksjon 3.9.1 (Brizzard, Chubet et al. 1994). Ds108 ble analysert som negativ kontroll for å avdekke falske-positive signaler. Fluorescensmikroskopi av ds108 ga ingen signal, noe som viste at bakgrunnssignalet fra negativ kontroll var veldig lav (Figur 4.10).



Figur 4.10 fluorescensmikroskopi analyse av ds108. Figuren viser fluorescensmikroskopi bilder av ds108 i A , ds108 + 0,05 μM ComS* i B og ds108 + 2,0 μM i C øverst. Nederste viser det fluorescensmikroskopi bilder av th004 i A , th004 + 0,05 μM ComS* i B og th004 + 2,0 μM i C. Det var tidlig signal i C og denne fordeler seg over hele cellen. Det viser seg at det kom ingen signal i A og B. Alle stammene ble fiksert og innkubert med primærantistoff ANTI-FLAG og sekundær antistoff Anti-Flag Alexa® 488

Resultater fra fluorescensmerking av th004 ga signal fordelt i hele cellen ved 2,0 μM ComS* (Figur 4.10, C). Eksperimentet ble utført to ganger: (i) første gangen ble cellepreparatet tørket for lenge og det var vanskelig å finne cellene, (ii) andre gangen ble for lav konsentrasjon av Anti-Flag Alexa® 488 benyttet. For sistnevnte ble det derfor brukt høyere eksitasjonssignal for å fange opp Alexa-signalet. I begge forsøkene ble resultat at det var signal over hele cellen, men på bakgrunn av usikkerhetene ved prøveprepareringen bør forsøket repeteres for å fastslå at lokaliseringen av 3xFlag-ComM observert i dette arbeidet er reelt.

4.7 Identifisering av proteaser involvert i ComM-degradering.

Western blot analysene av 3xFlag-ComM (Figur 4.9) viste at dette proteinet er utsatt for relativt kraftig degradering i *S. pneumoniae*. Siden høye konsentrasjoner av ComM virker å ha en toksisk effekt på pneumokker, virker det naturlig at dette proteinet må fjernes før det akkumulerer til toksiske nivåer. En hypotese er at ComM blir spesifikt degradert av en protease. Proteaser er enzymer som katalyserer hydrolyse av peptidbindinger i proteiner eller peptider. De er enten eksopeptidases, hvis handlinger er begrenset til de amino eller karbonyl terminal av proteiner, eller endopeptidases, som spalter interne peptidbindinger (Hase and Finkelstein 1993). Det var usikkert hvilken protease som kunne være kandidater til å bryte ned ComM. Siden ComM mest sannsynlig er et integralt membranprotein ble fire membranassosierte proteaser valgt som første mulige kandidater. Disse var RseP (*spr0242*, putative zinc metalloprotease), HtpX (*spr1162*, peptidase) og FtsH (*spr0012*, cell division protein) og HtrA (*spr2045*, serine protease).

4.7.1 Putative sink metalloprotease RseP i *S. pneumoniae* R6

Putative sink metalloprotease *spr0242* består av 419 aa. Det finnes ingen artikler eller dokumenterte eksprimenter på funksjonen eller lokalisering av *spr0242* i *S. pneumoniae* kun en genomalalyse som bekrefter eksistensen av genet (Hoskins, Alborn et al. 2001)

Spr0242 ble identifisert som putative sink metalloprotease i genomet etter homologi, dvs. eksistensen av dette er sannsynlig fordi klart orthologer eksisterer i nært beslektede arter. I KEGG database er *spr0242* ortholog med K11749 (*rseP*) regulator av Sigma E protease i *E. coli*. Proteasen tilhører MEROPS familie M50 med PDZ-dimer (Kanehisa and Goto 2000). Genet *rseP* som finnes i andre streptokokkartet og i andre pneumokokker serotyper som *S. pneumoniae* *gamPNI0373*, *S. pneumoniae* serotype 2 (strain D39 / NCTC 7466) og *S. pneumoniae* D39 (Lanie, Ng et al. 2007) som er 100% homologt med *spr0242*. Funksjonen til *spr0242* er metalloendopeptidase og metallion-binding (Magrane and Consortium 2011).

4.7.2 Varmesjokk protein HtpX gen *spr1162*

Varmesjokk proteiner uttrykkes i respons til en cellestress, inkludert hypertermi, oksygenradikaler, tungmetaller, etanol og aminosyre analoger (De Maio 1999). Varme-sjokk proteiner kan også oppstå under ikke-stressende forhold, bare "overvåking" i cellen proteiner. Disse aktivitetene er en del av en celle eget reparasjonssystem, kalt cellular stressrespons eller varme-sjokk respons (De Maio 1999).

HtpX består av 302 aa og 7 motifer. I KEGG database er *spr1162* ortholog med K03799 *htpX* i *E.coli* (Kanehisa and Goto 2000). HtpX er sink Metallo peptidases og tilhører MEROPS familie M48: Ste24 endopeptidase familie. HtpX fungere som hydrolyse av peptidbindinger. HtpX er en sink-avhengig endoprotease medlem av membranen-lokalisert proteolytisk system i *E. coli* (Sakoh, Ito et al. 2005).

4.7.3 Celledeling protease *spr0012* FtsH

Genet *ftsH* (*spr0012*) koder for en ATP-og Zn^{2+} -avhengig metallprotease. *ftsH* (*spr0012*) består av *ftsH* (*spr0012*) 652 aa og er ortholog med K03798 (*ftsH*, *hflB*) i *E. coli* (Kanehisa and Goto 2000). FtsH proteinet er forankret til cytoplasmiske membran via to transmembrane regioner med korte N-terminal og lange C-terminal eksponerte til cytoplasma. FtsH er medlem av AAA familien (ATPases associated with a variety of cellular activities) som er kjennetegnet ved en modul med ca 200 aminosyrerester ATP-bindingssetet (Schumann 1999).

Foruten å være en protease, fungere FtsH også som en molekylær anstand. Det påvirker protein montering i og gjennom den cytoplasmiske membran og forbinder med denaturert alkalisk fosfatase uten å nedbryte det. Derfor kan FtsH fungere for å opprettholde kvaliteten av noen cytoplasmatiske og membran proteiner (Schumann 1999).

4.7.4 Serine protease, HtrA(*spr2045*)

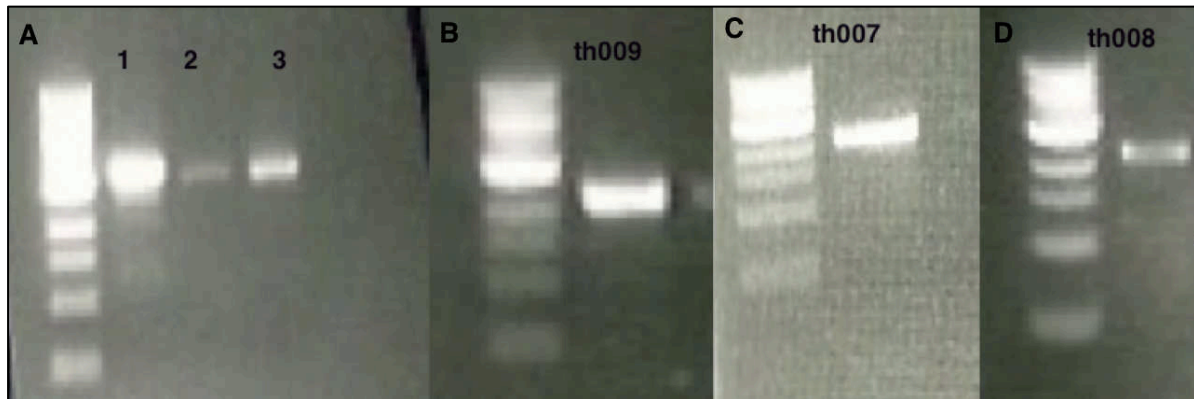
S. pneumoniae R6 HtrA består av 397 aa og karakterisert ved en serin protease domene etterfulgt av en eller flere PDZ domener. *S. pneumoniae* R6 HtrA er ortholog med DegS i *E. coli* (Cassone, Gagne et al. 2012). I tillegg til HtrA funksjon som stress-respons protease fungere som anstand for å redusere av kompetansen hos *S. pneumoniae* ved nedbrytning av CSP (kompetanse stimulerende peptid) (Cassone, Gagne et al. 2012).

For å teste om disse kunne ha med ComM-degradering å gjøre ble genene *spr0242*, *spr1162*, *spr0012* og *spr2045* deletert enkeltvis fra genomet til stamme th004 for å bestemme om dette økte stabiliteten til 3xFlag-ComM. Detaljert beskrivelse av konstruksjonen av mutant th007 ($\Delta htrA::janus$), th008 ($\Delta rseP::janus$) og th009 ($\Delta htpX::janus$) er beskrevet i metoddelen seksjon 3.2.1 og 3.4.1. En $\Delta ftsH$ -mutant ble forsøkt laget flere ganger, men delesjon av dette genet var letalt for cellene.

4.7.5 Konstruksjon av $\Delta rseP$, $\Delta htpX$, $\Delta ftsH$ og $\Delta htrA$

Utgangsstammen var th004, hvor fire startkultur ble brukt. Proteaser ble fjerner med Janus-kassett og overlapp PCR se (metoder 3.2.1). Forward og Revers primere ble designet med hengende Janus Forward og Revers primere (se tabell 2.3 i materialer). Først ble ca 1000 bp fragment oppstrøms for proteasegenet i stammen RH1 amplifisert med primere th009 og th010-J (*rseP*), th013 og th014-J (*htpX*), th017 og th018-J (*ftsH*) med Janus-overheng i reversprimere. Etter PCR ble amplifisering-produkt rensset og isolert. Dette PCR-fragmentet ble satt sammen med 5'ende av Janus-kassetten som var allerede amplifisert fra stammen SPH131 med primere JanusF og JanusR. Begge PCR-produktene ble satt sammen i en PCR med primere th09/th013/th017(for hver protease) og RpsL41R. Deretter ble ca 1000 bp fragment nedstrøms for proteaser amplifisert med primere th011-J og th012(*rseP*), th015-J og th016 (*htpX*) og th019-J og th020 (*ftsH*) med Janus overheng på Forward primere. Dette PCR-produktet ble satt sammen med 3'enden oppstrøms-Janus PCR-fragmentet ved hjelp av primere th009 og th0012 (*rseP*), th013 og th016 (*htpX*) og th017 og th020 (*ftsH*). Slutt produkt var PCR-fragment med bestod av Janus-kassetten flankert av oppstrøm- og nedstrømsekvensen for mål proteaser. $\Delta htrA::janus$ med oppstrøms og nedstrøm var allerede konstruert på samme måte av doktorgrad stipendiat Gro Stamsås. Disse PCR-fragmentet ble transformert inn i th004 og th007($\Delta htrA::janus$), th008 ($\Delta rseP::janus$), th009 ($\Delta htpX::janus$) ble dannet. Flere mislykket forsøk for å transformere th004 med $\Delta spr0012::janus$, men det ble ingen vekst. Dette kan være a fjerne *spr0012* er letal for cellen.

Alle nye transformanter fikk en fenotype Kan^R på grunn av Janus-kassetten. Transformantene ble selektert ved dyrkning på THA-skåler med 400 µg/ml kanamycin. Kolonier ble plukket opp og dyrket i fersk flyttende C-medium tilsatt 400 µg/ml kanamycin ved 37°C. Deretter ble de verifisert med PCR med primer Kan484F og RpsL41R (Metoder 3.4.1).

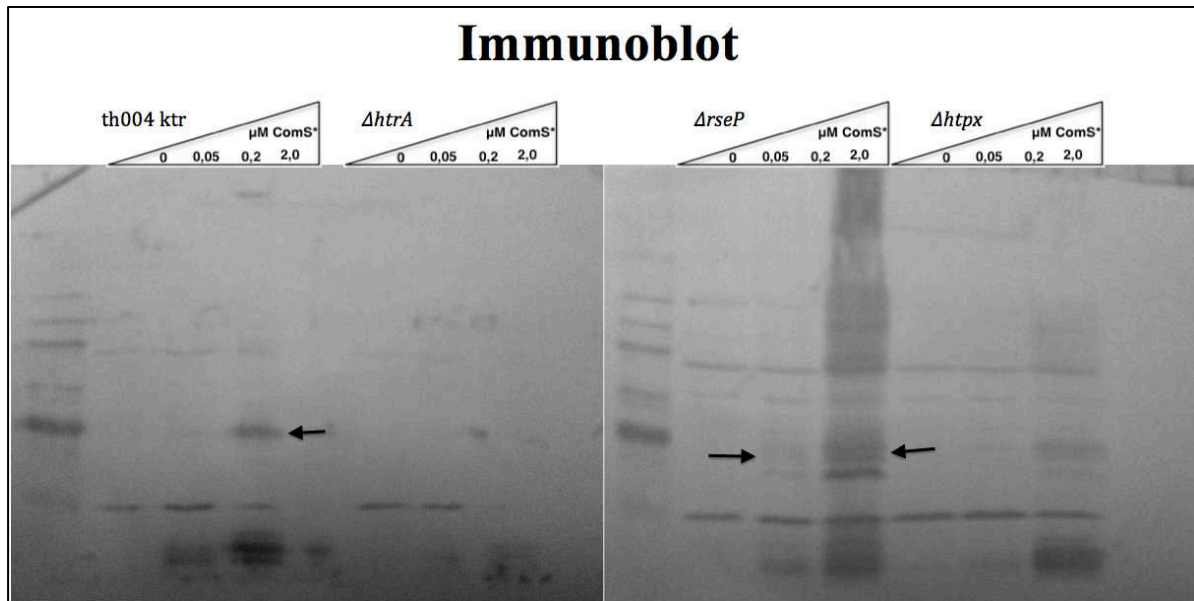


Figur 4.11 DNA-fragmenter fra konstruksjon av th007, th008 og th009. Figuren viser agarosegel bilder for A: Renset PCR-produkt av Janus med oppstrøms og nedstrøms for 1) *rseP*, 2) *htpX* og 3) *ftsH*. B: verifisering av stammen th009 (Δ *htpX::janus*) PCR bånd viser Janus-kassetten. C: verifisering av stammen th007 (Δ *htrA::janus*) båndet viser Janus-kassetten. D: verifisering av stammen th008 (Δ *rseP::janus*) båndet viser Janus-kassetten i stammen. All verifisering ble amplifisert med primere Kan484F og RpsL41R for å detektere Janus og se om transformasjonen var vellykket.

4.7.6 Påvirkes degraderingen av 3xFlag-ComM ved fravær av RseP, HtpX eller HtrA?

Siden stammene th007, th008 og th009 stammer fra stammen th004 hadde alle stammene 3xFlag *comM* bak promotor P_{comX} -promoteren og manglet villtype *comM*. Dette betyr at mengde 3xFlag-ComM uttrykket kan justeres med konsentrasjonen av ComS*. Ved å detektere 3xFlag-ComM med immunodeteksjon kunne man analysere hvordan fravær av HtrA, RseP og HtpX påvirket nedbrytningen av 3xFlag-ComM. Totalprotein fra th004, th007, th008 og th009 ble analysert ved hjelp av immunoblotting og antistoffene ANTI-FLAG[®] (primær) og Anti-kanin-AP (sekundær). Alle stammene ble først tilsatt ulike mengder ComS* (0, 0,05 og 0,2 µM) ved OD₅₅₀ = 0,05 og dyrket ved 37°C til OD₅₅₀ = 0,3 før SDS-PAGE og elektroblotting. Immunodeteksjon er beskrevet i detaljer i metoder 3.8.1 Resultater viste at fravær av RseP (*Δspr0242*) hadde en betydelig effekt på degraderingen av 3xFlag-ComM (figur 4.12). Fravær av de andre proteasene HtpX (*Δspr1162*) og HtrA

(*Δspr2045*) hadde ingen synlig effekt på degraderingen av 3xFlag-ComM i følge dette eksperimentet.



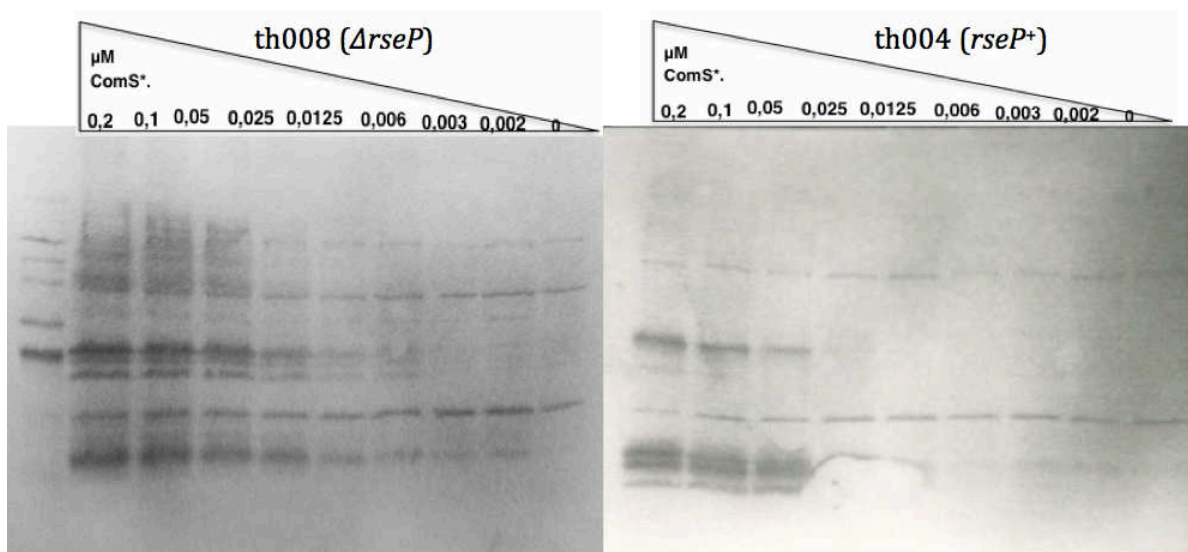
Figur 4.12 Immunodeteksjon av 3xFlag-ComM i stammer th004, th007 (*ΔhtrA*), th008 (*ΔrseP*) og th009 (*ΔhtpX*). Figuren viser i membranbilde av th004 (0, 0,05 og 0,2 μM ComS*), stammen th007 (*ΔhtrA::janus*) med tilsatt ComS* (0, 0,05 og 0,2 μM) her ser vi ingen betydelig bånd tilsvarende ComM-bånd i th004, stammen th008 (*ΔrseP::janus*) med tilsatt ComS* i rekkefølge (0, 0,05 og 0,2 μM). Det klart betydelig sterkere bånd tilsvarende ComM i stammen th004. Tilslutt vises det stammen th009(*Δhtpx::jauns*) og her er det ingen betydelig forskjell i ComM tilsvarende th004. Mengde protein ble brukt er likt i alle prøvene.

I dette eksperimentet ble stammen th004 benyttet som kontroll på 3xFlag-ComM degradering. Graden av degradering i denne stammen ble sammenlignet med de tre stammene som manglet proteaser (th007, th008 og th009). Resultatet viste at th007 (*ΔhtrA::janus*) (Figur 4.12) uten noe 3xFlag-ComM-bånd sammenlignet med th004. Dette var uforventet og transformasjon må gjentas for å kunne trygt si at dette var riktig resultat. Mens th009 (*ΔhtpX::jauns*) (Figur 4.12) ga tilsvarende resultat som th004 dette tyder på at HtpX hadde ingen eller ubetydelig effekt på stabiliteten av 3xFlag-ComM. Stammen th008 (*ΔrseP::janus*) ga et betydelig sterkere ComM bånd sammenlignet med th004. Likevel ser man at proteinet fortsatt er utsatt for degradering, men i lavere grad enn når *rseP* er tilstede i genomet. I th004 hadde majoriteten av ComM degradert med 0,05 μM ComS*, mens det et tydelig bånd var synlig i th008 ved tilsvarende mengde ComS*. Eksperimentet ble utført to ganger og ga tilsvarende like resultat.

4.8 RseP er involvert i degradering av ComM

Resultatet i Figur 4.12 viste at fravær av proteasen RseP ga en betydelig økning av mengde fullengde 3xFlag-ComM. For å få et mer detaljert inntrykk av hvor mye mindre degradering 3xFlag-ComM var utsatt for i en $\Delta rseP$ -mutant, ble th004 og th008 dyrket i medium med en 2-fold fortynningsrekke av ComS* (0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,006, 0,003, 0,002 og 0 μM). Deretter ble 3xFlag-ComM detektert ved hjelp av immunodeteksjon som tidligere beskrevet (metoder 3.8.1). Resultatene viste tydelig at mengde fullengde 3xFlag-ComM i th008. 3xFlag-ComM i $\Delta rseP$ kunne detekteres i celler dyrket med bare 0,006 μM ComS* sammenlignet med th004 hvor 0,05 μM ComS* var nødvendig for å uttrykke proteinet over deteksjonsgrensen (Figur 4.13). Basert på dette resultatet degraderes 3xFlag-ComM ~10 fold mindre i en $\Delta rseP$ -mutant enn i en $rseP$ -positiv stamme.

Immunoblot

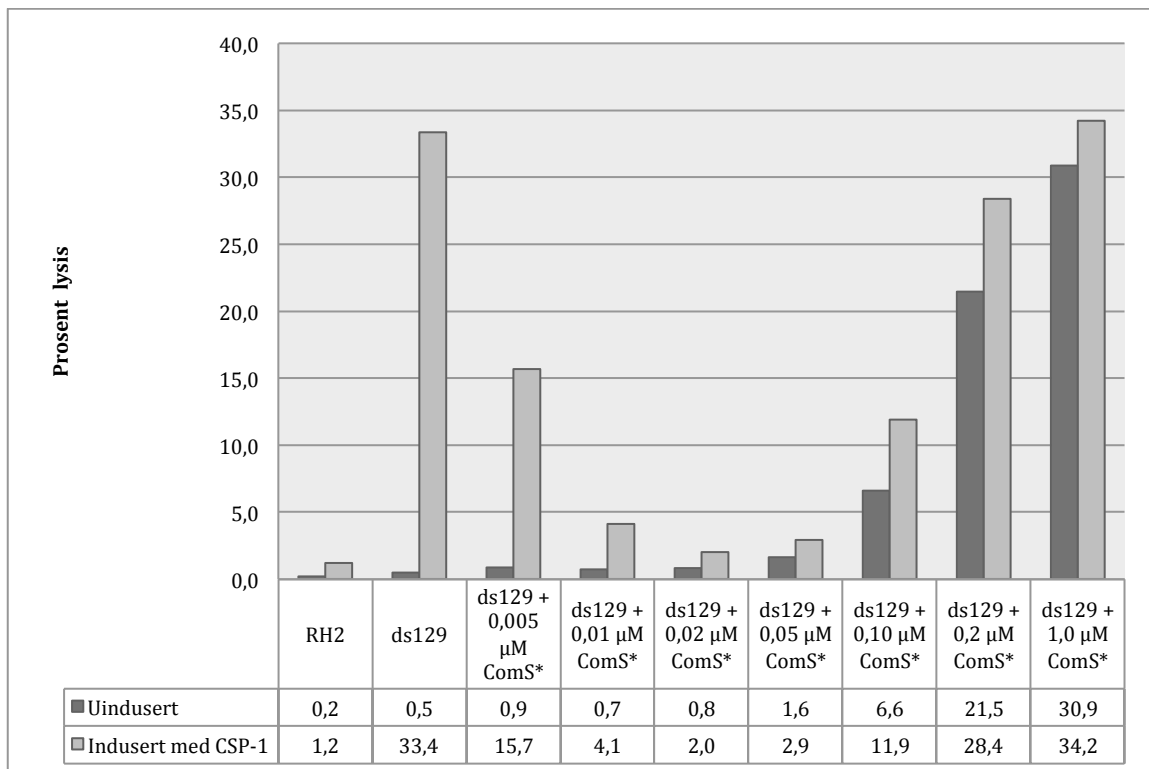


Figur 4.13 Immunoblotting av stammer th008 og th004 med fortynningsrekke av ComS*. Figuren viser deteksjon av 3xFlag-ComM uttrykt i th008 og th004 dyrket med 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,006, 0,003, 0,002 og 0 μM ComS* i vekstmediumet. 3xFlag-ComM uttrykket ble detektert med anti-Flag og Anti-Flag Alexa[®] 488. En tydelig bånd med ca 26 kDa i stammen th008 ved 0,006 μM ComS*. For stamme th004 kom det første med svak bånd ved 0,05 μM ComS*. Det ble brukt like mengde totalprotein i alle prøvene.

4.9 Lavere *comM*-uttrykk behøves for å gi immunitet mot CbpD etter fjerning av RseP

Det ble påvist i Figur 4.13 at fjerning av protease RseP økte mengden fullengde 3xFlag-ComM med immunoblotting. Derfor ble det viktig å vite at dette ville også påvirke immunitet mot CbpD. ComRS-systemet gjorde det mulig å kunne justere mengde uttrykket av *comM* i *S. pneumoniae* (Berg, Biornstad et al. 2011). Mengden økes ved økning av ComS*-konsentrasjon. For å bestemme hvilken ComS*-konsentrasjon som ga høyest grad av ComM-mediert immunitet mot CbpD etter fjerning av protease RseP (*spr0242*) ble stamme ds129 ($\Delta comM_{wt}$, *hirL::lacZ*, $comM_{P_{comX}^+}$, $\Delta rsep::janus$) dyrket med økende mengder ComS* (0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 og 1,0 μ M) i vekstmedium. I denne stammen er *comM*-genet klonet bak P_{comX} , mens $comM_{wt}$ er fjernet. På denne måten kunne ekspresjonsnivået av *comM* reguleres ved å indusere med ulik mengde syntetisk ComS*, og immunitet skyldes kun ComM uttrykt fra P_{comX} . Proteasen RseP ble byttet ut med Janus. I tillegg var genet *lacZ* (β -galaktosidase) fra *Escherichia coli* klonet og transformert inn i *hirL* genet beskrevet av Steinmoen et al (2002).

Ved å måle mengde frigjort β -galaktosidase etter induksjon med CSP-1 kan prosent cellelysis bestemmes (se seksjon 3.6.1 i metoder for detaljert beskrivelse). Stamme RH2 ($comM_{wt}^+$, *hirL::lacZ*) ble benyttet som villtype kontroll. Prosent cellelysis ble beregnet ut i fra Miller units (Figur 4.14).



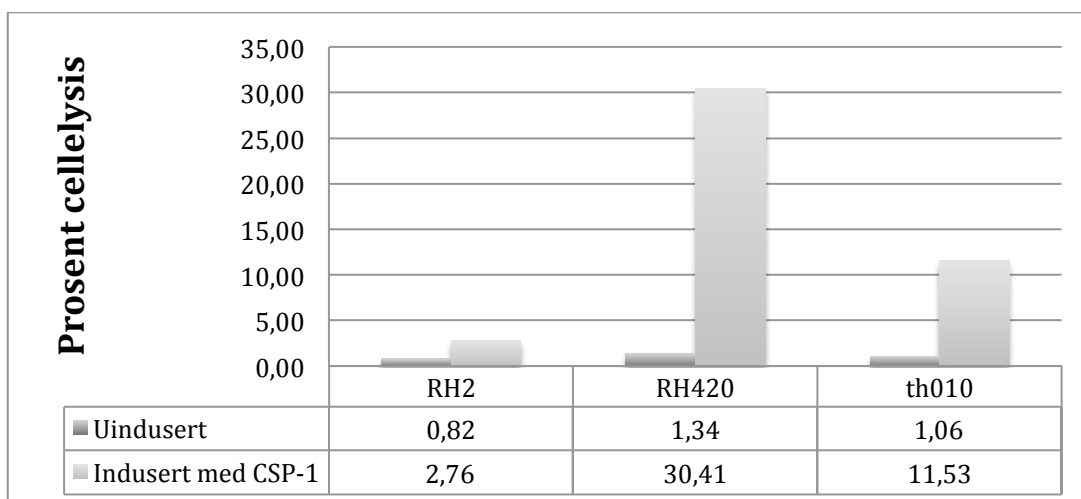
Figur 4.14 Immunitet mot CbpD etter fjerning av RseP og økende mengder ComM. Diagrammet viser cellelysis i prosent før og etter induksjon av kompetanse. ds129 (*ΔcomM_{wt}*, *hirL::lacZ*, *comM_{P_{comX}+}*, *ArseP*) ble dyrket med økende mengde ComS* i vekstmedium for å gradvis øke mengde ComM uttrykk. Stamme RH2 (*comM_{wt}*⁺, *hirL::lacZ*) ble brukt som kontroll på villtype immunitet. Mengde ComS* som ga immunitet tilsvarende villtype mot CbpD var (0,01, 0,02 og 0,05 µM), mens konsentrasjoner over og under dette resulterte i lavere immunitet.

Resultatene viste at 0,01, 0,02 og 0,05 µM ComS* gir immunitet nærmest villtype. Dvs. at mengde *comM_{P_{comX}+}* som blir uttrykt med 0,02 ComS* i vekstmediumet gir best immunitet. I tillegg viser cellene klare tegn på at ComM blir toksisk fra 0,1 µM ComS* og høyere konsentrasjoner. Cellene lekker eller lyserer i stor grad uavhengig av om CbpD er uttrykt (indusert med CSP) eller ikke. Ved 1 µM ComS* har ca. 30% av cellene lysert før induksjon av kompetanse. Til sammenligning har bare 10% av cellene lysert før kompetanse når RseP uttrykkes i cellene (Figur 4.1). Dette indikerer at ComM akkumulerer i større grad når RseP ikke er uttrykt.

4.10 β -galaktosidase-assay av mutant ($\Delta comM_{wt}::comM_{3xFlag}$)

I *S. pneumoniae* er *comM* genet en del av tidlig *com*-operon og transkriberes fra en ComE-avhengig promotor (Havarstein, Martin et al. 2006). Gene som ligger nedstrøms for *comM* transkriberes uavhengig av *comM* og kun fjerning av *comM* medvirker på immunitet under fratricide (Johnsborg and Havarstein 2009a). Derfor ble bestemt å bytte ut ComM_{wt} med 3xFlag-ComM. Til dette formålet ble stammen RH420 ($\Delta comM_{wt}::janus$) som utgangsstamme.

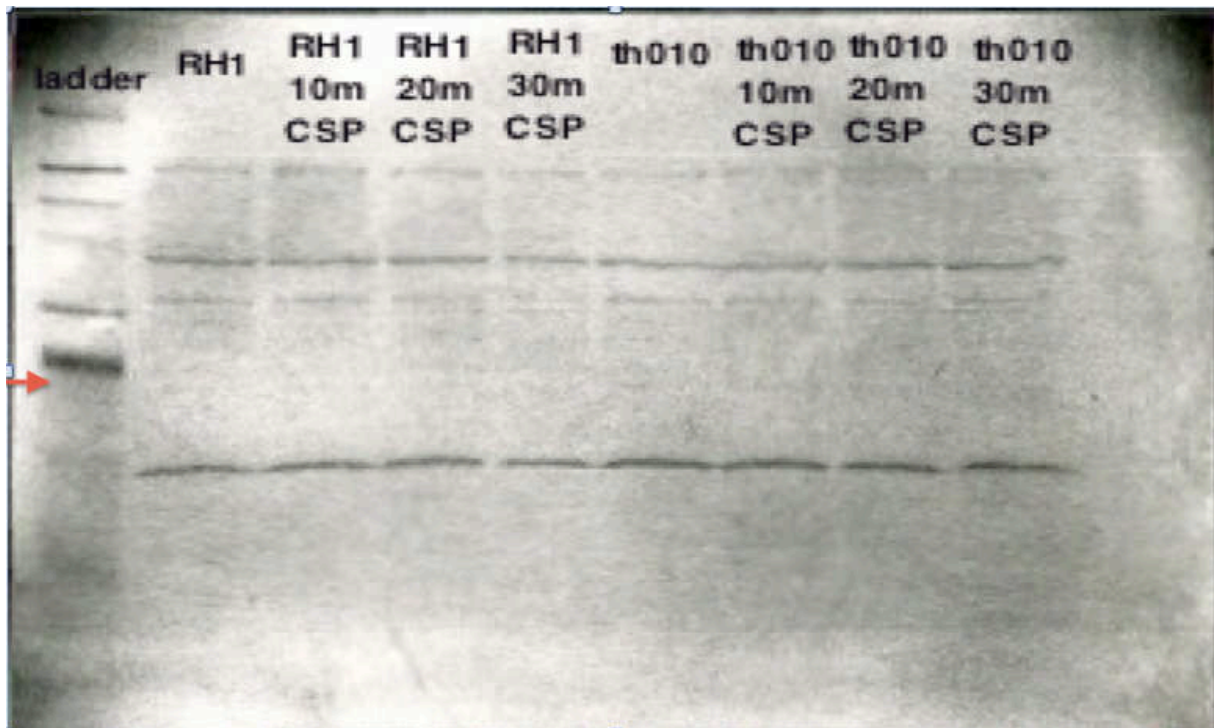
Genet *3xFlag-comM* ble satt sammen med ca 1000 nukleotider oppstrøms- og nedstrøms for *comM_{wt}* og transformert inn i RH240. Dette resulterte stammen th010 (*3xFlag-comM_{3xFlag}*). Th010 ble verifisert med PCR ved hjelp av primer ComMF og ComMR og sekvensering. Denne stammen ble konstruert for å kunne se effekten av 3xFlag-ComM ved normal kompetanse. Etter konstruksjon ble stammen th010 analysert med β -galaktosidase og sammenlignet med RH2 (*comM_{wt}⁺, egb⁻, hirL::lacZ*) som kontroll og RH420. Stammene ble dyrket opp til OD₅₅₀ \approx 3,0 ved 37°C og analysert med β -galaktosidase-assay i følge metode beskrevet i 3.6. Resultater viste at 3xFlag-ComM i stammen th010 ga til en viss grad immunitet (ca. 20%), men ikke så god som kontrollstammen RH2 (Figur 4.15). Dette eksperimentet ble utført to ganger og th010 ga cellelysis fra 10-20 % sammenlignet med RH2 som ga mindre enn 5%. Dette kan tyde på 3xFlag-tag kan påvirke ComM-funksjonen til en vis grad. Stammen RH420 ga ingen immunitet siden den mangler ComM_{wt}.



Figur 4.15 β -galaktosidase-assay av stammen th010($\Delta comM_{wt}::ComM_{3xFlag}$). Diagrammet viser β -galaktosidaseaktivitet for supernatant- og cellelysatprøver av stammer RH2 (*comM_{wt}⁺, egb⁻, hirL::lacZ*), RH420 (RH2 men $\Delta comM_{wt}::janus$) og th010(RH420 men $\Delta janus::3xFlag-comM$). Cellene ble indusert til kompetanse med CSP-1. Ut ifra diagrammet så hadde th010 immunitet, men ikke så god som kontrollstammen RH2. RH420 ble som analysert som kontroll.

4.10.1 Immunoblotting av mutanten ($\Delta comM_{wt}:: 3xFlag-comM$)

Etter at ble påvist at 3xFlag-ComM bak promotor P_{comX} kunne detekteres med immunoblotting ved øverst i Figur 4.9. Ble det også nødvendig å se om 3xFlag-ComM kunne detekteres når den uttrykkes fra den native *comM*-promotern under kompetanse. Eksperimentet ble utført som beskrevet i metoder under avsnitt 3.7 og 3.8. Cellene ble dyrket opp ved 37°C til en $OD_{550} \approx 0,3$. Cellene ble induisert til kompetansen med CSP-1 og høstet ved sentrifugering etter 10, 20 og 30 minutter for Western analyse. Immunoblottet ble inkubert med Anti-Flag antistoffer og som ville binde seg til 3xFlag-ComM og sekundære antistoffer (anti-kanin) konjugert til alkalisk fosfatase som videre binder seg til anti-Flag-antistoffer (metoder 3.8). RH1-stamme ble benyttet som kontroll. Resultater i Figur 4.16 at det ikke lyktes med å detekte 3xFlag-ComM uttrykt fra den native kompetanseinduserbare P_{comM} -promoteren.



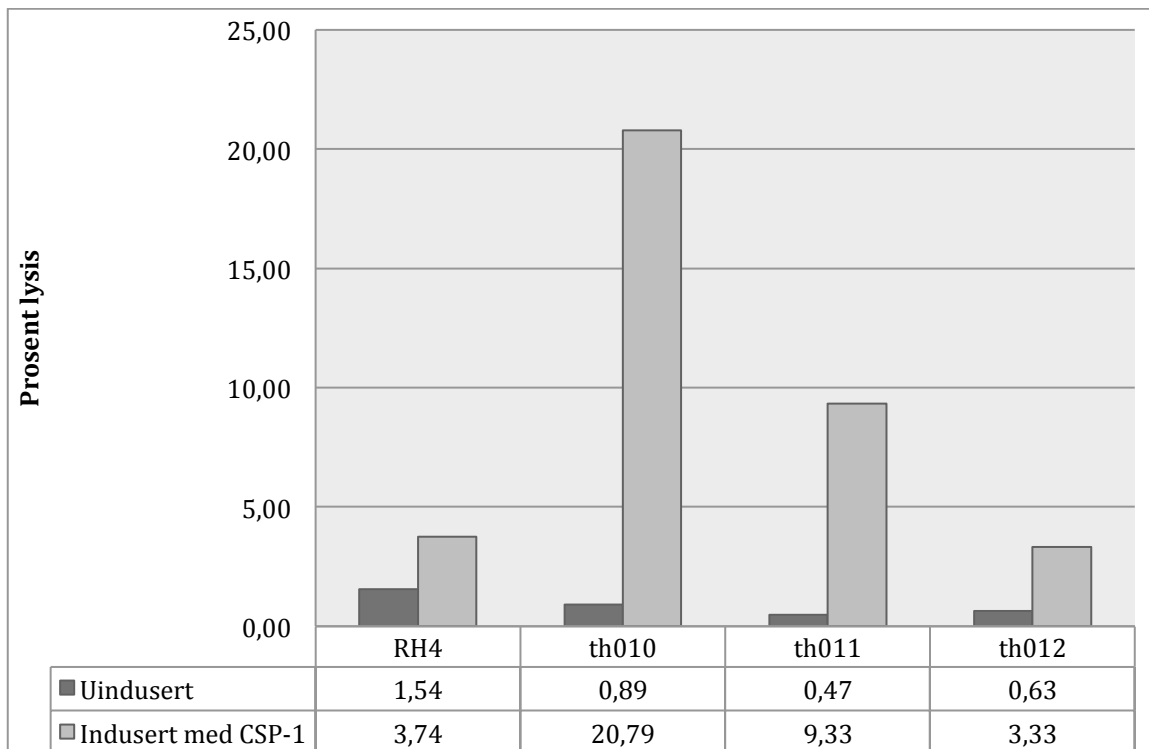
Figur 4.16 ComM_{3xFlag} deteksjon med Anti-Flag antistoffer. Deteksjon av ComM_{3xFlag} i stammene RH1 og th010 indirekte med Anti-Flag antistoffer og som ville binde seg til Flag-ComM i membran og sekundære antistoffer (anti-kanin) konjugert til alkalisk fosfatase som videre binder seg til anti-Flag-antistoffer. Ap anti-stoffer kan detekteres kromogent med BCIP. Utgangsmengde protein var lik i alle prøvene. Eksperimentet ble gjentatt 2 ganger med lignende resultat. Pilen på gelbildet viser hvor kunne 3xFlag-ComM detekteres i fullengde. Det er ingen indikasjon på 3xFlag-ComM i alle prøvene.

4.10.2 Delesjon av *rseP* fra stammen th010 ($\Delta comM_{wt}::comM_{3xFlag}$).

Resultater i Figur 4.13 ble det påvist at fjerning av proteasen *rseP* (*spr0242*) ville forbedre deteksjonen av 3xFlag-ComM med immunoblotting. For å kunne se om fjerning av protease *rseP* (*spr0242*) hadde en effekt på ComM_{3xFlag} i stammen th010 ble ny stamme konstruert. Stammen th011($\Delta comM_{wt}::3xFlag-comM$, $\Delta rseP$). Dette ble gjort ved å transformere PCR-fragmentet med Janus flankert med oppstrøms og nedstrøms region for *rseP* i stammen th010. PCR-fragmentet som ble benyttet var det samme som benyttet i stammen th008 (Resultater 4.7.5). PCR og transformasjon ble utført som beskrevet i metoder 3.4.1. DNA-fragmenter ble også transformert i stammen RH4 til th012 slik at det mulig å kunne sammenlignes med den nye mutanten th011. De nye stammene th011 og th012 ble verifisert med PCR ved hjelp av primere Kan484F og RpsL41R.

4.10.3 β -galaktosidase-assay av $\Delta rseP$ -mutant

For å undersøke om delesjon av protease *rseP*-genet påvirker immunitet av 3xFlag-ComM uttrykt fra P_{comM} under kompetanse, ble th011 ($\Delta rseP::janus$) undersøkt i et β -galaktosidase-assay. Stammene som ble undersøkt var RH4 (*hirL::lacZ*, $comM_{wt}$), th010 (*hirL::lacZ*, $\Delta comM_{wt}::3xFlag-comM$), th011 (th010 men $\Delta rseP::Janus$) og th012 (RH4 men $\Delta rseP::Janus$). β -galaktosidase-assay metode er beskrevet i avsnitt 3.8.1. Resultatet av eksperimentet er vist i Figur 4.17. Resultatet indikere at fjerning av protease RseP forbedret immunitet mediert fra 3xFlag-ComM i stamme th010 under normal kompetanse.

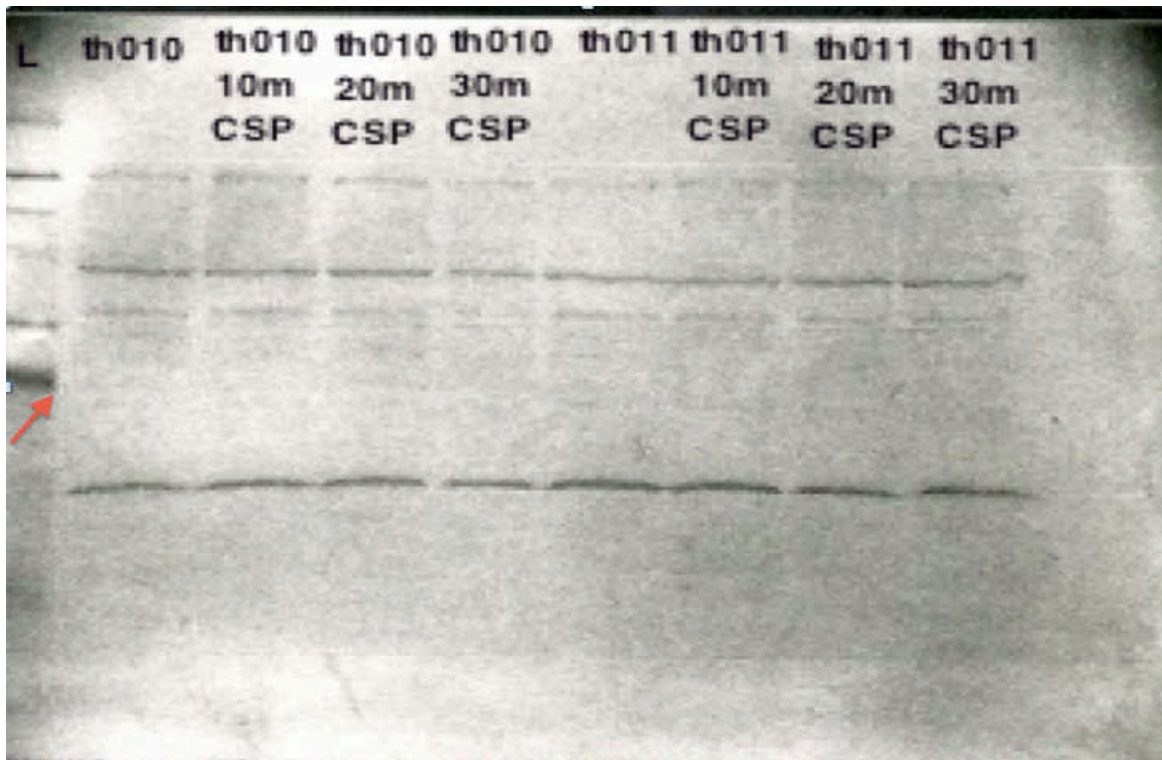


Figur 4.17 β -galaktosidase-frigjøring (%). Diagrammet viser β -galaktosidaseaktivitet for supernatant- og cellelysatsprøver av stammer RH4 (*comM_{wi}⁺, egb⁻, hirL::lacZ*), th010 (*hirL::lacZ, $\Delta comM_{wi}::3xFlag-comM$*), th011 (th010 men *$\Delta rseP::janus$*) og th012 (RH4 men *$\Delta rseP::janus$*). Cellene ble indusert til kompetanse med CSP-1. Ut ifra diagrammet så hadde th010 immunitet, men ikke så god som kontrollstammen RH2. Th011-stammer viser en forbedring av immunitet. Th012 ble som analysert som kontroll. Analysen ble utført to ganger med lignende resultat.

4.10.4 Immunoblotting av mutanten ($\Delta comM_{wi}::comM_{3xFlag}$, *$\Delta rseP$*)

Siden stammen th011 hadde 3xFlag-ComM bak sin nativ promoter og mangler *rseP* protease kunne det tenkes at mengde fullengde 3xFlag-ComM kunne detekteres med immunoblotting. Tidligere ble stammen th010 ($\Delta comM_{wi}::comM_{3xFlag}$) analysert med immunoblotting, men resultatet viste at 3xFlag-ComM kunne ikke detekteres (Figur 4.16). Siden tidligere resultat i figur 4.13 påviste at delesjon av proteasen RseP ga en betydelig økning av mengde fullengde 3xFlag-ComM. Immunoblotting analyse ble utført av stammene th010 ($\Delta comM_{wi}::comM_{3xFlag}$) og th011 (th010 men *$\Delta rseP$*) for å sammenligne om det mulig å detektere 3xFlag-ComM uttrykt med nativ *comM*-promotor etter fjerning av proteasen RseP. Stammene ble dyrket opp ved 37°C til $OD_{550} \approx 0,3$. Deretter ble det tilsatt CSP-1 til vekstmediet til sluttkonsentrasjon 250 $\mu\text{g/ml}$. Cellene ble høstet ved sentrifugering etter 0 min, 10 min, 20 min og 30 min.

Det ble kjørt SDS-PAGE og Westernblott som beskrevet i metoder avsnitt 3.8.1. Resultatet ble vist i Figur 4.18 og ga ingen indikasjon på 3xFlag-ComM.



Figur 4.18 ComM_{3xFlag} deteksjon med Anti-Flag antistoffer. Deteksjon av 3xFlag-ComM i stammene th010 og th011 indirekte med Anti-Flag antistoffer og som ville binde seg til Flag-ComM i membran og sekundære antistoffer (anti-kanin) konjugert til alkalisk fosfatase som videre binder seg til anti-Flag-antistoffer. Ap anti-stoffer kan detekteres kromogent med BCIP. Utgangsmengde protein var lik i alle prøvene. Eksperimentet ble gjentatt 2 ganger med lignende resultat. Pilen på gelbildet viser hvor kunne 3xFlag-ComM detekteres i fullengde. Det er ingen indikasjon på 3xFlag-ComM i alle prøvene.

4.11 Konkurrans-assay av ComM inaktivert/ punktmutert

I et forsøk på å bestemme om ComM utøver sin funksjon via en annen interaksjonspartner i cellen ble en konkurranse-assay utført. Planen var å konkurrere ut villtype ComM med attenuert ComM. I dette eksperimentet ble det benyttet to stammer: (i) den ene skulle overuttrykke en ComM-homolog (SSA-0195) fra stammen *S. sanguinis* (Rodriguez, Callahan et al. 2011) som man antar ikke kan gi immunitet mot CbpD i *S. pneumoniae*, (ii) den andre stammen skulle en punktmutert versjon av ComM (posisjon H191 til A) overuttrykkes. Disse ble transformert bak promotor P_{ComX} og ble overuttrykket ved hjelp av ComS*. Deretter ble uttrykk av nativt ComM induisert med CSP og immunitet hos cellene ble

analysert ved hjelp av β -galaktosidase assay. Hvis de ikke-aktive ComM versjonene hemmet funksjonen til villtype ComM ville dette indikere at ComM spesifikt interagerer med et annet protein eller en annen komponent for å utføre sin immunitetsfunksjon. Hensikten var å finne om overuttrykt punktmuntert eller ikke-funksjonell ComM ville ta plassen til villtype ComM. Til dette formålet ble to stammer GS90 (SPH131 men $\Delta janus::comM_{191H\ddot{e}A}$) og GS106 (SPH131 men $\Delta janus::comM_{SSA_0195}$) benyttet. Stammene ble konstruert av Stip. Gro.

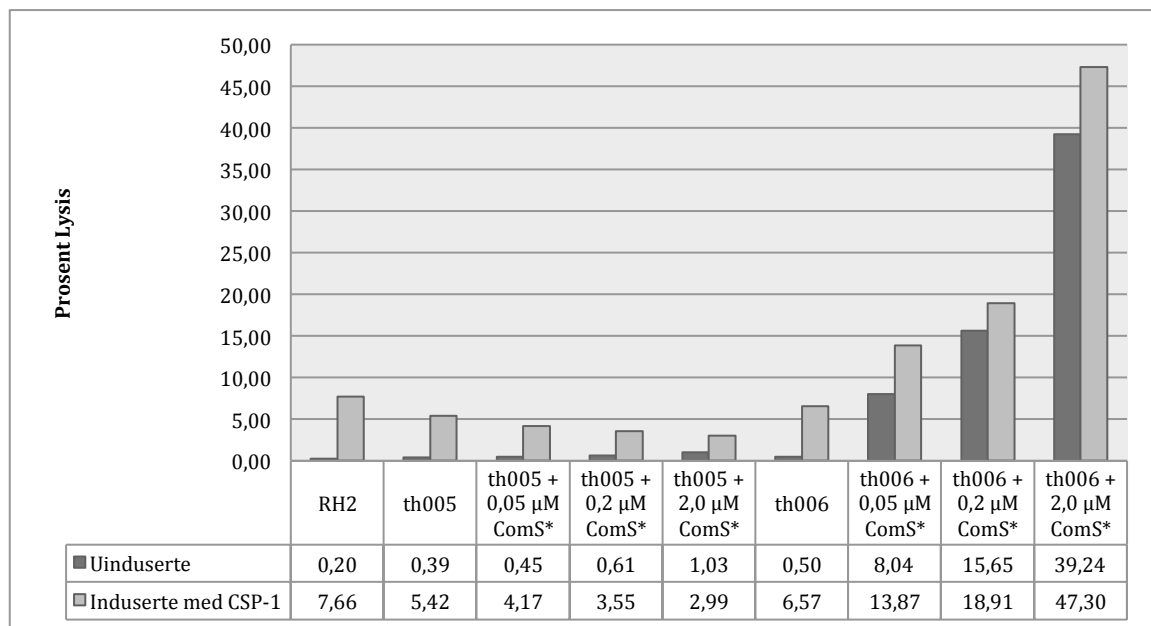
4.11.1 β -galaktosidase-assay av mutanter ($\Delta comM_{wt}$, 191HèA $comM_{PcomX}$) og ($\Delta comM_{wt}$, SSA-0195 $comM_{PcomX}$)

Stammene som skulle benyttes til konkurranse-assay av ComM har utgagningspunkt fra stammen SPH131. SPH131 inneholder promotor P_{comX} fra *S. thermophilus* og transkripsjon aktiveres og justeres med ComS*, men mangler *lacZ*-genet (β -galaktosidase) fra *Escherichia coli*. Genet *lacZ* ble inført ved å transformere SPH131 med plasmidet pTOPO-pLhirL, som inneholder en kassett som settes inn *lacZ* i *hirL* genet i *S. pneumoniae* sammen med en kloramfenikolmarkør. På samme måte ble *lacZ* transformert inn i stammene GS90 og GS106. Nye stammer ble kalt th005 (GS90 men *hirL::lacZ*) og th006 (GS106 men *hirL::lacZ*).

Ved å måle mengde frigjort β -galaktosidase etter induksjon med CSP-1 kan prosent cellelysis bestemmes (se seksjon 3.6.1 i metoder for detaljert beskrivelse). Stamme RH2 ($comM_{wt}^+$, *hirL::lacZ*) ble benyttet som villtype kontroll. th005 og th006 ble dyrket med økende mengder ComS* (0, 0,05, 0,2 og 2,0 μ M) i vekstmedium. Kompetanse ble induert ved å tilsette CSP-1 (250 ng/ml). Kompetanseinduserte celler ble inkubert i 30 minutter ved 30°C før β -galaktosidaseaktivitet ble målt i Miller units i supernatant og totalt cellelysat både før og etter induksjon av kompetanse. Prosent cellelysis ble beregnet ut i fra Miller units. resultatet ble viset i Figur 4.19

Resultatet ble vist i Figur 4.19 og tyder på at stammen th005 fortsatt immune selv etter overuttryk av punktmuntert ComM. Det viste seg at punktmuntert ComM i stammen th005 ikke var fullstendig inaktiv, dvs. at den er funksjonell til en grad (V. Dr. Straume pers. komm.).

I stammen th006 som overuttrykte en ComM-homolog (SSA0195) fra *S. sanguinis* cellene svært syke og lyserte som følge av økning i SSA0195 uttrykk.. Dette gjorde det vanskelig å avgjøre om det var noen form for konkurranse mellom SSA0195 og ComM, men basert på at andel celler som lyserte etter CSP-induksjon så var det ingen konkurranse Figur 4.19.

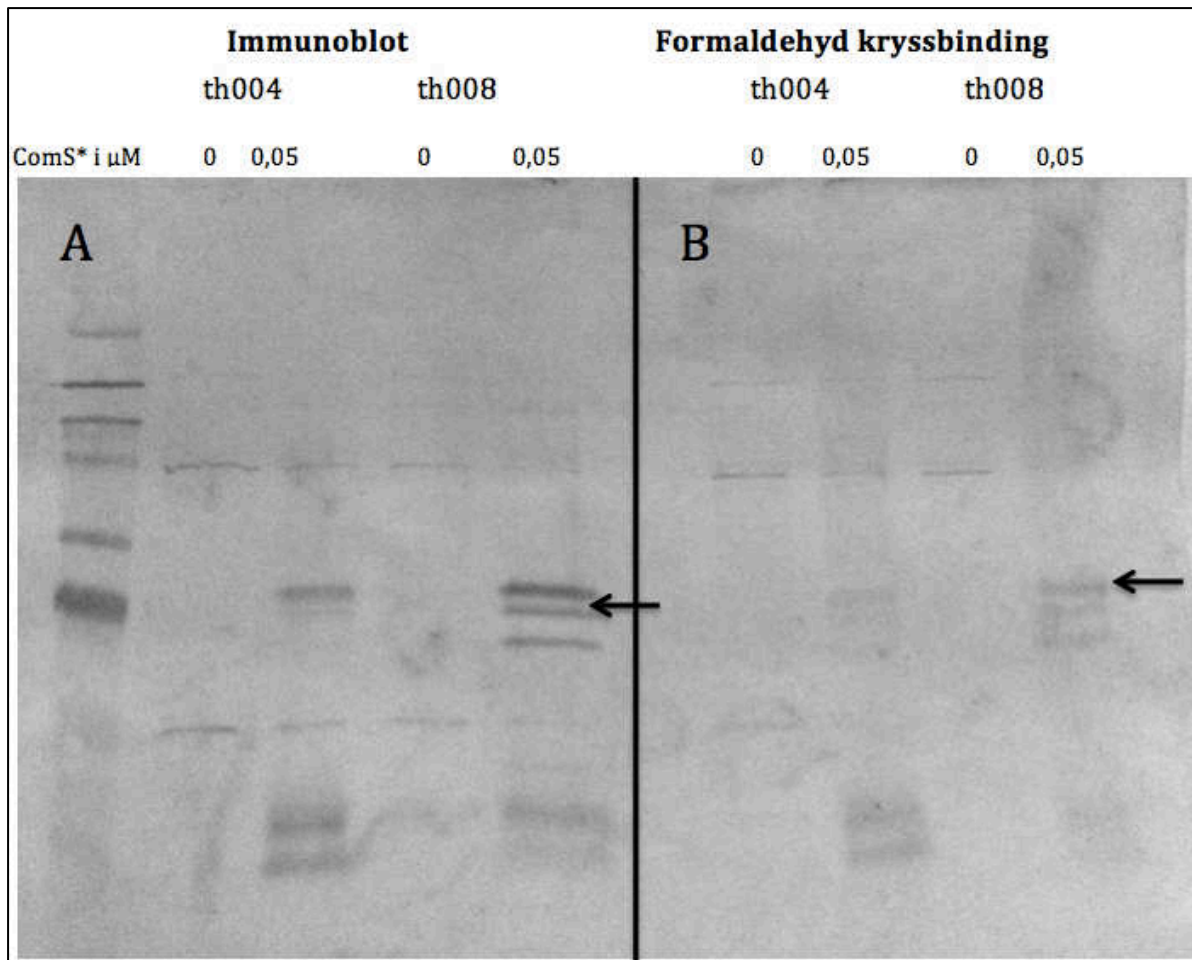


Figur 4.19 Immunitet mot CbpD ved overuttrykke punkt muntert / inaktivert ComM. Diagrammet viser cellelysis i prosent før og etter induksjon av kompetanse. th005 (*hirL::lacZ*, *comM*_{191H-A P_{comX+}) og th006 (*hirL::lacZ*, *comM*_{SSA_0195, P_{comX+}) ble dyrket med økende mengde ComS* i vekstmedium for å gradvis øke mengde ComM uttrykk. Stamme RH2 (*comM*_{wt+}, *hirL::lacZ*) ble brukt som kontroll på villtype immunitet. Mengde ComS* som ga immunitet tilsvarende villtype mot CbpD var 0,05-2,0 µM i th005, mens i stammen th006 ga svakere immunitet med økning av ComS* og cellene lyses før induksjon med CSP-1.}}

4.12 Formaldehyd kryssbinding av ComM

Ved å bruke kjemisk kryssbindingen kunne det undersøkes om ComM proteinet interagerer med andre membranproteiner. Kryssbindingen involverer en kovalent binding av den reaktive gruppen i et aminosyreresidu som binder en aminosyreresidu i et annet protein innenfor 2-3 Å. Dermed blir en kryssbinding mellom proteiner som interagerer med hverandre (Nadeau and Carlson 2007).

I dette eksperimentet ble det stammene th004 ($\Delta comM_{wt}$, 3xFlag- $comM_{P_{comX}}$) og th008 ($\Delta rseP$, $\Delta comM_{wt}$, 3xFlag- $comM_{P_{comX}}$) benyttet. Stammene ble dyrket til $OD_{550} \approx 0,3$ ved 37°C med tilsatt ComS* (0, 0,05 μM). Cellene ble høstet og vasket med PBS og fiksert med formaldehyd metoden er beskrevet i avsnitt 3.10.1. For optimal resultat skulle det dyrkes opp 50 ml cellekultur men i denne eksperimentet ble kun 10 ml dyrket. Prøvene ble preparert parallelt til formaldehyd kryssbinding og vanlig immunoblotting og analysert med 15% SDS-PAGE (metoder 3.7.1-3.7.3) og deretter ble Westernen boltting utført (metoder 3.8.1). Til slutt detekteres 3xFlag-ComM indirekte ved hjelp av anti-Flag antistoffer, sekundær antistoffer (anti-kanin) og visualisert med ca 5 ml substrat BCIP/NBT. Resultatet vist i Figur 4.20 viser at det er ingen forskjell på 3xFlag-ComM størrelse før og etter fiksering.



Figur 4.20 Immunoblotting. figuren viser immunoblotting i A av stammene th004 (0, 0,05 μM ComS*) og th008 (0, 0,05 μM ComS*) sammenlignet med *in vivo* formaldehyd kryssbinding blotting av samme stammer i B. Pilene peker på detekterte 3xFlag-ComM som er lik stor før og etter kryssbinding. 3xFlag-ComM ble indirekte detektert med Anti-Flag antistoffer og som ville binde seg til Flag-ComM i membran og sekundære antistoffer (anti-kanin) konjugert til alkalisk fosfatase som videre binder seg til anti-Flag-antistoffer. Ap anti-stoffer kan detekteres kromogent med BCIP. Utgangsmengde protein var lik i alle prøvene.

5. Diskusjon

Målet med denne studien har vært å utvikle et assay for å detektere ComM samt å øke forståelsen av ComM proteinet i *S. pneumoniae*. ComM er et integralt membranprotein som beskytter kompetente celler mot aktiviteten til den kompetanseinduserte murein hydrolasen CbpD (Havarstein, Martin et al. 2006). Siden ComM er produktet av et tidlig kompetanseggen, vil det bare være kompetente pneumokokker som har dette immunitetsproteinet og dermed blir beskyttet mot CbpD (Berg, Ohnstad et al. 2012) (Havarstein, Martin et al. 2006). CbpD, som sekreteres ut av kompetente celler, består av fire domener; et N-terminalt CHAP-domene, to etterfølgende SH3b domener og et C-terminalt kolinbindende domene (CBD). CbpD's muralytiske aktivitet krever funksjonelle CBD og SH3b domener. SH3b domener gjenkjenner og binder spesifikt peptidoglykan, mens CBD-domenet binder kolinenhetene som er kovalent bundet til teikoinsyrene hos *S. pneumoniae*. Man antar at det er CBD-domenet som i hovedsak dirigerer CbpD til den septale regionen i pneumokokker (Eldholm, Johnsborg et al. 2010). Basert på aktivitet og lokalisering av CbpD har flere hypoteser om virkningsmekanismen til ComM blitt foreslått.

De mest aktuelle hypotesene er at ComM direkte eller indirekte modifierer celleveggen slik at den ikke gjenkjennes av CbpD. Dette kan være modifiering eller endring i komposisjonen av peptidoglykanlaget eller endringer i teikoinsyrekomposisjonen i celleveggen. En annen hypotese er at ComM fungerer som en pore som senker turgor trykket i cellene. Man kan tenke seg at det reduserte turgortrykket gjør at cellene ikke lyserer når de får en skade i celleveggen i septum. I denne studien ble flere eksperimenter utført for å få en bedre forståelse av virkningsmekanismen til ComM.

5.1 Konsentrasjonen av ComM er kritiske for å gi full immunitet mot CbpD.

I denne oppgave ble ekspresjonen av ComM kontrollert ved å benytte ComRS systemet utviklet for *S. pneumoniae*. Systemet er basert på tre komponenter: responsregulatoren ComR, induser peptidet ComS* og promotor P_{comX} , hentet fra *Streptococcus thermophilus*. ComR aktiveres av ComS* og binder deretter P_{comX} og aktiverer transkripsjon. Genuttrykk fra P_{comX} er doseavhengig med mengde ComS* og kan finjusteres avhengig av ComS* konsentrasjon (Berg, Biornstad et al. 2011).

Resultater fra β -gal-analyse i Figur 4.1 viste at riktig nivå av ComM er helt essensielt for at cellene skal oppnå full immunitet. En konsentrasjon på 0,05 μ M ComS* uttrykte ComM på et nivå som ga immunitet tilsvarende kompetente villtype pneumokokker. Resultatene viste også at for lite ComM gir dårlig immunitet, mens for høye mengder av ComM førte til at cellene begynte og lekke eller spontanlyser uavhengig av angrep fra CbpD. Dette indikerer at ComM kan være toksisk for cellene hvis nivået av ComM overstiger et bestemt nivå. Denne konklusjonen ble forsterket av studier av morfologien til celler med overuttrykket ComM ved hjelp av DIC-mikroskopi. Det ble observert en avvikende fenotype med forstørrende eller uregelmessige celler Figur 4.8.

Det ble også observert unormal septumdannelse og lange kjeder sammenlignet med celler som uttrykte lavere mengder av ComM og stammer med villtype ComM. DIC-bilder i Figur 4.8 viste også cellene ikke klarer fullstendig celledeling og det dannes enten forstørret celler eller små, runde celler. Disse resultatene indikerer at ComM ikke bør akkumulere i kompetente pneumokokker da dette blir toksisk. Cellene har sannsynligvis en mekanisme for å håndtere ComM forløpende ved enten å binde det til et sted i cellen eller ved raskt turnover. Når vi ved hjelp av ComRS-systemet økte ComM-uttrykket til et kunstig høyt nivå vil denne mekanismen forstyrres og ComM akkumulerer til toksiske nivå i cellen. Man kan tenke seg at den toksiske effekten av ComM som ble observert kun skyldtes unaturlige høye mengder av et protein i cellemembranen, men kontrollforsøk utført av andre forskere på laboratoriet viste at det er aktiviteten til ComM som gjør at høye mengder ComM er toksisk. I disse forsøkene ble en punktmutert attenuert versjon av ComM (D119A og R194A) uttrykt i tilsvarende mengder som aktivt ComM. Disse cellene viste ingen anormal fenotype eller spontanlysis som når aktivt ComM ble overuttrykt. Dette viser at det er aktiviteten til ComM som fører til at høye mengder ComM er toksisk. β -gal resultater i Figur 4.1 og mikroskopibilder 4.8 peker i retning av at det overuttrykke av ComM medfører endringer på celleveggsyntesen til *S. pneumoniae*. Men om dette er en direkte eller indirekte effekt av ComM-aktivitet kan ikke konkluderes.

En studie av Eldholm et al. (2010) viste at CbpD må binde til både teikoin syrer via CBD-domenet og til peptidoglykan via de to SH3b-domenene for å effektivt lysere ikke-kompetente celler via fratricide. Man antar at CBD-domenet dirigerer proteinet i septum hos *S. pneumoniae*. Lokalisering av CbpD til septum kan skyldes at dette er det svakeste punktet i celleveggen (Eldholm, Johnsborg et al. 2010). Dersom ComM skulle virke raskt og effektivt

så må den påvirke målområde for CbpD, nemlig septum. Et kunstig høyt nivå av ComM kunne påvirke septumdannelse eller celleveggsyntesen slik at cellen klarer ikke dele seg normalt og dermed blir forstørret og endrer morfologien.

5.2 ComM blir utsatt for proteolytisk degradering.

Selv om man vet at ComM er nøkkelfaktoren for immunitet har ingen hittil klart å detektere ComM uttrykt fra hverken sin native promoter eller fra en konstitutiv promoter. Å ha muligheten til å detektere ComM vil være et svært viktig verktøy for å studere funksjonen til ComM og hvordan aktiviteten til ComM er regulert. I denne studien valgte vi å benytte Flag-tag for å detektere ComM. Som vist i resultater i avsnitt 4.2 ble det gjort en vellykket konstruksjon av 3xFlag plassert mellom K58 og Q59 i ComM. Videre ble fusjonsgenet *3xFlag-comM* klonet bak promotoren P_{comX} . 3xFlag-ComM ble vist å være funksjonell ved at den ga full immunitet ved 0,05 μM ComS* på lik linje som villtype ComM (Figur 4.7). Immunoblotanalyse av 3xFlag-ComM viste for første gang vellykket deteksjon av ComM (Figur 4.9). I tillegg til fullengde 3xFlag-ComM ble det observert flere proteiner med lavere masse enn ComM. Disse proteinene reagerte spesifikt med anti-Flag antistoffet og viser at dette var degraderingsprodukter fra fullengde 3xFlag-ComM. Ved 0,05 μM ComS* ble nesten alt ComM degradert (Figur 4.9). Dette indikerer at ComM har en rask turnover i cellen eller at 3xFlag-ComM er ustabil.

Siden det ble påvist at overuttrykk av ComM kan være skadelig for pneumokokkene (se Figur 4.1 og 4.8) kan det tenkes at cellene har et system som sikrer at ComM ikke får tid til å akkumulere i kompetente pneumokkker. Disse hypoteser ble styrket med observasjonen at 3x-Flag-ComM er utsatt for høy grad av degradering. Likevel kan man ikke utelukke at det er 3xFlag-taggen som gjenkjennes som noe fremmed i *S. pneumoniae* og at dette fører til proteolytisk kløyving av 3xFlag-ComM. Den høye graden av 3xFlag-ComM degradering kan også forklare hvorfor det var vanskelig å detektere dette fusjonsproteinet ved hjelp av fluorescensmikroskopi. Fluorescens spesifikt for 3xFlag-ComM ble kun observert i celler som overuttrykte proteinet med 2,0 μM ComS* (Figur 4.10). Mikroskopi bilder viser at overtrykket 3xFlag-ComM var jevnt spredd over hele cellen. Ved å overuttrykke ComM i store mengde klarer sannsynligvis ikke cellen å degradere eller håndtere alt av ComM like

raskt som ved lavere ekspresjonsnivåer. At ComM ikke kunne detekteres ved lavere uttrykk, samsvarer med Western blot resultatene som indikerte at ComM har en rask turnover..

3xFlag-ComM ble også satt bak den native P_{comM} -promoteren og deretter uttrykt ved å inducere kompetanse med CSP-1. Det lyktes ikke å detektere 3xFlag-ComM uttrykt fra P_{comM} -promoteren ved hjelp av immunodeteksjon (Figur 4.16). I tillegg var det heller ikke mulig å detektere degraderingsproduktene av 3xFlag-ComM. Dette viser at ComM under normal kompetanse er uttrykt i relativt lave mengder. Dette stemmer overens med at for mye ComM er toksisk for pneumokokkus.

5.3 Proteolytisk kløyving av 3xFlag-ComM.

Siden resultater i denne oppgaven (Figur 4.9) har vist at ComM kunne være utsatt for degradering i cellen, var vi interessert i å finne ut om hvilke protease(r) som kunne være involvert i denne prosessen. Tanken var å deletere potensielle proteaser for å se om dette ville øke mengden fullengde ComM. ComM er en integralt membranprotein som nøytraliserer muralytic aktiviteten til CbpD via en ukjent mekanisme (Havarstein, Martin et al. 2006) (Berg, Ohnstad et al. 2012). Siden ComM er et integralt membranprotein var det naturlig å tenke at en membranassosiert protease kløyver ComM. Intramembranproteaser er enzymer som har egenskapen til å spalte transmembrane domener av membranproteiner (Brown, Ye et al. 2000). Alle kjente intramembranproteaser er selv integrerte membranproteiner med flere transmembrane domener, og de har sine aktive områder begravet innenfor lipidbilag. Basert på bioinformatisk informasjon og studier utført på intramembranproteaser i andre bakterier (Dalbey, Wang et al. 2012) ble metalloproteasen RseP, serin endopeptidasen HtrA og celledeling proteasen FtsH testet mot ComM stabilitet i *S. pneumoniae*. En studie av Eldholm et al. (2010b) vist at under kompetansen aktiveres stressresponsystemet LiaFSR som beskytter kompetente celler mot fratricide (Eldholm, Gutt et al. 2010b). Derfor ble tenkt at varmesjokk protease HtpX kan være en potensiell protease. Fjerning av potensielle proteaser var vellykket unntatt fra celledeling protease FtsH som var essensiell for *S. pneumoniae*.

Av de fire proteasene RseP, FtsH, HtpX og HtrA resulterte fravær av RseP i en signifikant reduksjon i degradering av 3xFlag-ComM (Figur 4.12). I *E. coli* er RseP et membranprotein med sink metallprotease aktiv og fire transmembrane segmenter (Kanehara, Akiyama et al. 2001). I *E. coli* er RseP vist å være essensiell for celle levedyktighet gjennom sin evne til å aktivere σE vei av ekstracytoplasmic stressresponser (Kanehara, Ito et al. 2002). σE er en alternativ sigma faktor og ansvarlig for transkripsjon av gener for celleoverflaten proteiner involvert i biogenesis og kvalitetskontroll av membranstruktur (Ades 2004). Siden RseP lot seg fjerne fra genomet til *S. pneumoniae* tyder dette på at RseP ikke har samme essensielle rolle i pneumokokker.

I Figur 4.12 ble det observert en betydelig økning av fullengde ComM, likevel ser man at proteinet fortsatt er utsatt for degradering, men i lavere grad i en RseP⁻-stamme sammenliknet med en RseP⁺-stamme. I RseP⁺-stammen var majoriteten av 3xFlag-ComM degradert med 0,05 μM ComS* i vekstmediet, mens et tydelig bånd tilsvarende 3xFlag-ComM var synlig i RseP⁻ stamme ved tilsvarende mengde ComS*. En titreringsrekke av mengde 3xFlag-ComM uttrykket i RseP⁻ -stammen ble analysert med Westernen blott og sammenliknet med RseP⁺ stammer (figur 4.13). Fullengde 3xFlag-ComM kunne detekteres med kun 0,006 μM ComS* i RseP⁻ -stammen. Til sammenligning var det ikke mulig å detektere fullengde 3xFlag-ComM i en RseP⁺ stamme ved samme ComS*-konsentrasjon. I en β -galaktosidase-assay analyse ble utført visert at full immunitet ble oppnådd ved lavere ComS*-konsentrasjon i en RseP⁻ -stamme enn i en RseP⁺-stamme (figur 4.14 og 4.1).

Interessant nok at immunoblotting, vist i figur 4.13, viser at RseP ikke alene degradere ComM fordi vi får flere bånd. Dette kan tyde at det er flere faktorer enn RseP som er involvert i denne mekanismen. Man kan derfor spekulere i at den reduserte degraderingen av 3xFlag-ComM derfor er en indirekte effekt av mangel på RseP, og at en annen ukjent protease utfører den initielle kløyvingen av ComM. Denne hypotesen stemmer også med at man tror RseP-liknende proteaser i mange tilfeller fungerer som uspesifikke housekeeping proteaser i membranen og har som funksjon å degradere missfoldede eller skadde proteiner i membranen (Koide, Ito et al. 2008). Som tidligere påpekt kan degraderingen av 3xFlag-ComM være en konsekvens av Flag-taggen. På den annen side viste β -galaktosidase-eksperimentene der villtype ComM ble overuttrykt ved hjelp av ComRS-systemet at cellene

ble syke ved en lavere ComS* konsentrasjon i en RseP⁻ -stamme sammenlignet med en RseP⁺-stamme (Figur 1.4 og 1.14).

5.4 Konkurrans-assay av ComM

Funksjonell ComM ville gi kompetente *S. pneumoniae* immunitet mot CbpD under fratricide (Havarstein, Martin et al. 2006). Dette ble påvist ved at $\Delta comM$ mutanter mister immuniteten under kompetansen. En hypotese er at ComM interagerer med en komponent i celleveggsyntesemaskineriet. For å teste dette ble det utført et såkalt konkurranse-assay. I dette eksperimentet var målet å teste om villtype ComM lot seg utkonkurrere med en attenuert ComM med punktmutasjonen H191A eller med en ComM-homolog fra *S. sanguinis* ssa 0195 (Rodriguez, Callahan et al. 2011). Disse ble transformert i to pneumokokker mutanter bak promotor P_{ComX} og ble overuttrykket ved hjelp av ComS*. Deretter ble kompetanse og uttrykk av nativt ComM induert med CSP1. Hensikten var å finne om overuttrykket ComM_{H191A} eller ComM fra *S. sanguinis* ville ta plassen til villtype ComM.

Resultatet viste at ComM_{H191A} ikke klarte å utkonkurrere aktiviteten til nativt ComM (Figur 4.19). Grunnen til dette kan være at ComM ikke har noen spesifikk interaksjonspartner eller at nivået av ComM_{H191A} ikke var høyt nok til å gi konkurranse. Affiniteten til en eventuell interaksjonspartner kan være betydelig redusert for ComM_{H191A}. Det ble også uttrykket ComM fra stammen *S. sanguinis* ssa 0195 satt inn bak promoter P_{comX} kontrollert med ComS*. Det viste seg at den har en veldig toksisk effekt i *S. pneumoniae*. *S. pneumoniae* som overuttrykte ComM fra *S. sanguinis* begynte å lysere før induksjon med CSP-1 (Figur 4.19). Det ble diskutert ovenfor at ComM nedbrytes forløpende i cellen og at overskuddet kan være toksisk for cellen. Å uttrykke ComM fra en annen streptokokker art kan gjøre at ComM akkumuleres i cellen uten at for eksempel RseP proteasen gjenkjenner den. Immunoblott utført av andre på laboratoriet bekreftet at dette var tilfelle da ComM fra *S. sanguinis* var utsatt for mindre degradering en *S. pneumoniae*'s endogene ComM. Årsaken til at ComM fra *S. sanguinis* har en særdeles toksisk effekt men ingen immunitetseffekt i *S. pneumoniae* er ikke påvist.

5.5 Mengde ComM er avgjørende for immunoblotting deteksjon

Siden 3xFlag-ComM ikke lot seg detektere når den ble uttrykt fra P_{comM} under kompetanse i en $RseP^+$ -stamme ble det forsøkt å detektere det i en $RseP^-$ -stamme. Villtype ComM ble erstattet med 3xFlag-ComM og stammen ble analysert med hensyn på immunitet ved hjelp av β -galaktosidase assay (Figur 4.15). Dette ble gjort for sjekke at 3xFlag-ComM uttrykt fra P_{comM} ga immunitet. Resultatet i Figur 4.15. viser at det er 3xFlag-ComM immunitet til en vis grad men ikke så god som villtype ComM. Flag-tagget kan ha en negativ virkning på ComM funksjonen. Samme mutanter ble analysert med immunoblotting og 3xFlag-ComM kunne ikke detekteres (Figur 4.16). Etter delesjon av *rseP* ble det analysert igjen med β -galaktosidase-assay (Figur 4.18) og forbedring av immunitet ble observert. Immunoblotting ga ingen indikasjon av 3xFlag-ComM bånd. Dette viser at ComM er uttrykt i relativt små mengder under kompetanse.

Som observert i Figur 4.13 så lav ComM konsentrasjon degraderes fullstendig forløpende i cellen selv etter fjerning av RseP proteasen. Dette kan også forsterke hypotesen at RseP ikke er eneste faktor for håndtering av ComM i cellen.

5.6 Interagerer ComM med andre proteiner?

ComM er en integralt membranprotein (Berg, Ohnstad et al. 2012), men om det interagerer med andre membranprotein er ikke kjent. For å undersøke dette ble en formaldehyd kryssbinding forsøk utført (Figur 4.20). Det å identifisere en eventuell interaksjonspartner til ComM kan fortelle mye om funksjonen. Resultatet i figur 4.20 viste at det er ingen kryssbinding. Selv om det ble påvist kryssbinding i denne studien ligger det en stor usikkerhet i det eksperimentelle oppsettet, og optimalisering av kryssbindingsforsøket er nødvendig. 3xFlag-ComM ble overuttrykt fra promoter P_{comX} . Som diskutert tidligere akkumuleres overuttrykket ComM i cellen (Figur 4.10). Derfor er det strekt mistanke at overuttrykket ComM ikke klarer å binde interagere. Samtidig i dette eksperimentet ble brukt kun 10 ml cellekultur og det som anbefalt er 50 ml. Selv om deteksjon var vellykket så er det sannsynlig at mengde kryssbundet ComM ikke kunne detekteres

6. Konklusjon og videre arbeid

I dette arbeidet ble ComM tagget med 3xFlag for å muliggjøre deteksjonen med immunoblotting og fluorescensmikroskopi. Uttrykk av ComM ble kontrollert med ComS* og P_{comX} eller CSP1 og P_{comM} . Ved hjelp ComRS-systemet ble det påvist at overuttrykket ComM forårsaker en økt cellelysis og endring i cellemorfologien.

Det ble også påvist at ComM degraderes i cellen og har en raskt turn-over i cellen. Derfor ble det forsøkt å identifisere hvilken protease(r) som var involvert i nedbrytningen av ComM. Det påvist at protease RseP bidrar til degradering av 3xFlag-ComM. Immunitet ble også forbedret etter delesjon av *rseP*-genet. Om RseP har en direkte effekt på ComM kan vi ikke konkludere i dette arbeidet. Siden ComM var fortsatt nedbrutt selv etter fjerning, men i mindre grad.

Det ble vist også at ComM uttrykkes i lave mengder under kompetanse. Dette gir mening da det også ble vist at for store mengder ComM er toksisk for *S. pneumoniae*. Det ble ikke påvis noe interaksjon med andre membranproteiner, men dette kan ikke bekreftes i dette arbeidet. Kryssbinding forsøkes må også gjentas og kanskje med mer nøyaktig metode.

Forskning for å utrede mekanismen bak immunitet under fratricide vil fortsette, og resultatet fra dette arbeidet kan brukes for videre forskning. Det kan undersøkes om endring plassering av 3xflag kan gjøre at ComM kan lokaliseres i cellemembranen. Videre ville forskning med ComM og RseP sammen spill kan også undersøkes nøye. Nå som det ble mulig å overuttrykke ComM kan det isoleres og krystalliseres. Det jobbes med å anskaffe antistoff mot nativt ComM slik at man unngår å bruke Flag-taggen for å detektere ComM. Først da kan man med sikkerhet si at degraderingen av ComM ikke skyldes tilstedeværelsen av 3xFlag-tag i ComM.

7. Referanser

- Ades, S. E. (2004). "Control of the alternative sigma factor sigmaE in Escherichia coli." Curr Opin Microbiol **7**(2): 157-162.
- Bartlett, J. M. and D. Stirling (2003). "A short history of the polymerase chain reaction." Methods Mol Biol **226**: 3-6.
- Berg, K. H., T. J. Biornstad, et al. (2012). "Properties and biological role of streptococcal fratricins." Appl Environ Microbiol **78**(10): 3515-3522.
- Berg, K. H., T. J. Biornstad, et al. (2011). "Peptide-regulated gene depletion system developed for use in Streptococcus pneumoniae." J Bacteriol **193**(19): 5207-5215.
- Berg, K. H., H. S. Ohnstad, et al. (2012). "LytF, a novel competence-regulated murein hydrolase in the genus Streptococcus." J Bacteriol **194**(3): 627-635.
- Berge, K. H. (2010). "masteroppgave, Immunitetsproteinene ComM og fratricide hos streptococcus pneumoniae."
- Bertrand, J. J., J. T. West, et al. (2010). "Genetic analysis of the regulation of type IV pilus function by the Chp chemosensory system of Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **192**(4): 994-1010.
- Brito, D. A., M. Ramirez, et al. (2003). "Serotyping Streptococcus pneumoniae by multiplex PCR." J Clin Microbiol **41**(6): 2378-2384.
- Brizzard, B. L., R. G. Chubet, et al. (1994). "Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution." Biotechniques **16**(4): 730-735.
- Brown, M. S., J. Ye, et al. (2000). "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans." Cell **100**(4): 391-398.
- Brueggemann, A. B., R. Pai, et al. (2007). "Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States." PLoS Pathog **3**(11): 1628-1636.
- Cassone, M., A. L. Gagne, et al. (2012). "The HtrA protease from Streptococcus pneumoniae digests both denatured proteins and the competence-stimulating peptide." Journal of Biological Chemistry **287**(46): 38449-38459.
- Claverys, J. P. and L. S. Havarstein (2002). "Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae." Frontiers in Bioscience **7**: D1798-D1814.
- Claverys, J. P., B. Martin, et al. (2009). "The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism." FEMS Microbiol Rev **33**(3): 643-656.
- Dalbey, R. E., P. Wang, et al. (2012). "Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway." Microbiology and Molecular Biology Reviews **76**(2): 311-330.
- De Maio, A. (1999). "Heat shock proteins: Facts, thoughts, and dreams." Shock **11**(1): 1-12.
- Diezel, W., G. Kopperschlager, et al. (1972). "An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue." Anal Biochem **48**(2): 617-620.
- Einhauer, A. and A. Jungbauer (2001). "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins." J Biochem Biophys Methods **49**(1-3): 455-465.
- Eldholm, V., B. Gutt, et al. (2010b). "The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics." J Bacteriol **192**(7): 1761-1773.
- Eldholm, V., O. Johnsborg, et al. (2009). "Fratricide in Streptococcus pneumoniae: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC." Microbiology **155**(Pt 7): 2223-2234.

- Eldholm, V., O. Johnsborg, et al. (2010). "Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide." Mol Microbiol **76**(4): 905-917.
- Facklam, R. (2002). "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes." Clin Microbiol Rev **15**(4): 613-630.
- Finnzymes (2007). "Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase".
- Fowler, A. V. and I. Zabin (1970). "The amino acid sequence of beta galactosidase. I. Isolation and composition of tryptic peptides." J Biol Chem **245**(19): 5032-5041.
- Garcia-Bustos, J. F., B. T. Chait, et al. (1987). "Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan." J Biol Chem **262**(32): 15400-15405.
- Garcia-Suarez, M. D. M., F. Vazquez, et al. (2006). "Streptococcus pneumoniae virulence factors and their clinical impact: an update." Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica **24**(8): 512-517.
- Hardie, J. M. and R. A. Whiley (1997). "Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus." Soc Appl Bacteriol Symp Ser **26**: 1S-11S.
- Hase, C. C. and R. A. Finkelstein (1993). "Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases." Microbiol Rev **57**(4): 823-837.
- Havarstein, L. S., B. Martin, et al. (2006). "New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor." Mol Microbiol **59**(4): 1297-1307.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, et al. (1998). "SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins." Bioinformatics **14**(4): 378-379.
- Hoskins, J., W. E. Alborn, Jr., et al. (2001). "Genome of the bacterium Streptococcus pneumoniae strain R6." J Bacteriol **183**(19): 5709-5717.
- Jamal, F., M. Tirathram, et al. (1983). "Penicillin resistant pneumococcus." Med J Malaysia **38**(2): 102-103.
- Jedrzejewski, M. J. (2001). "Pneumococcal virulence factors: structure and function." Microbiol Mol Biol Rev **65**(2): 187-207 ; first page, table of contents.
- Jenkins, S. G., S. D. Brown, et al. (2008). "Trends in antibacterial resistance among Streptococcus pneumoniae isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4." Ann Clin Microbiol Antimicrob **7**: 1.
- Johnsborg, O., V. Eldholm, et al. (2008). "A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in Streptococcus pneumoniae and related commensal species." Mol Microbiol **69**(1): 245-253.
- Johnsborg, O., V. Eldholm, et al. (2007). "Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function." Research in Microbiology **158**(10): 767-778.
- Johnsborg, O. and L. S. Havarstein (2009). "Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in Streptococcus pneumoniae." J Bacteriol **191**(18): 5859-5864.
- Johnsborg, O. and L. S. Havarstein (2009a). "Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in Streptococcus pneumoniae." J Bacteriol **191**(18): 5859-5864.
- Johnsborg, O. and L. S. Havarstein (2009b). "Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in Streptococcus pneumoniae." FEMS Microbiol Rev **33**(3): 627-642.
- Juers, D. H., R. E. Huber, et al. (1999). "Structural comparisons of TIM barrel proteins suggest functional and evolutionary relationships between beta-galactosidase and other glycohydrolases." Protein Sci **8**(1): 122-136.

- Kadioglu, A., J. N. Weiser, et al. (2008). "The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nat Rev Microbiol **6**(4): 288-301.
- Kanehara, K., Y. Akiyama, et al. (2001). "Characterization of the *yaeL* gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*." Gene **281**(1-2): 71-79.
- Kanehara, K., K. Ito, et al. (2002). "YaeL (EcfE) activates the sigma(E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA." Genes Dev **16**(16): 2147-2155.
- Kanehisa, M. and S. Goto (2000). "KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." Nucleic Acids Res **28**(1): 27-30.
- Kausmally, L., O. Johnsborg, et al. (2005). "Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis." J Bacteriol **187**(13): 4338-4345.
- Kenneth Todar, P. (2008-2012). *Streptococcus pneumoniae* (page 2) Kap.4. text book of bacteriology.
- Kilian, M., K. Poulsen, et al. (2008). "Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives." PLoS One **3**(7): e2683.
- Kjos, M., L. Snipen, et al. (2010). "The Abi Proteins and Their Involvement in Bacteriocin Self-Immunity." J Bacteriol **192**(8): 2068-2076.
- Klockenbusch, C. and J. Kast (2010). "Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1." J Biomed Biotechnol **2010**: 927585.
- Knutsen, E., O. Ween, et al. (2004). "Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*." J Bacteriol **186**(10): 3078-3085.
- Koide, K., K. Ito, et al. (2008). "Substrate recognition and binding by RseP, an *Escherichia coli* intramembrane protease." Journal of Biological Chemistry **283**(15): 9562-9570.
- Krogh, A., B. Larsson, et al. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol **305**(3): 567-580.
- Lacks, S. and R. D. Hotchkiss (1960). "A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*." Biochim Biophys Acta **39**: 508-518.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lanie, J. A., W. L. Ng, et al. (2007). "Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6." J Bacteriol **189**(1): 38-51.
- Lawyer, F. C., S. Stoffel, et al. (1993). "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity." PCR Methods Appl **2**(4): 275-287.
- Li, X., Y. Qiu, et al. (2008). "Splicing together different regions of a gene by modified polymerase chain reaction-based site-directed mutagenesis." Anal Biochem **373**(2): 398-400.
- Lichtman, J. W. and J. A. Conchello (2005). "Fluorescence microscopy." Nat Methods **2**(12): 910-919.
- Llull, D., R. Lopez, et al. (2006). "Skl, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain." FEBS Lett **580**(8): 1959-1964.
- Magrane, M. and U. Consortium (2011). "UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data." Database (Oxford) **2011**: bar009.

- Maiden, M. C. J. (1998). "Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria." *Clinical Infectious Diseases* **27**: S12-S20.
- Nadeau, O. W. and G. M. Carlson (2007). "Protein Interactions Captured by Chemical Cross-linking: One-Step Cross-linking with Formaldehyde." *CSH Protoc* **2007**: pdb prot4634.
- NucleoSpin® (2012). "PCR clean-up, Gel extraction. User manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up."
- Obaro, S. and R. Adegbola (2002). "The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines." *J Med Microbiol* **51**(2): 98-104.
- Oxoid. (2002). "AnaeroGen." *OXOID Ltd, Wade Road, Basinstoke, Hants RG24 8PW, UK*, from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=AN0035&c=UK&lang=EN&org=53&img=AN00250035&sec=.
- Pei, J. and N. V. Grishin (2001). "Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases." *Trends Biochem Sci* **26**(5): 275-277.
- Pryor, E. E., Jr., P. S. Horanyi, et al. (2013). "Structure of the integral membrane protein CAAX protease Ste24p." *Science* **339**(6127): 1600-1604.
- Radivojac, P., W. T. Clark, et al. (2013). "A large-scale evaluation of computational protein function prediction." *Nat Methods* **10**(3): 221-227.
- Rodriguez, A. M., J. E. Callahan, et al. (2011). "Physiological and molecular characterization of genetic competence in *Streptococcus sanguinis*." *Mol Oral Microbiol* **26**(2): 99-116.
- Rosenthal, C. K. (2009). "Contrast by interference." *Nature Cell Biology*.
- Ryan KJ, R. C., . (2004). *Sherris Medical Microbiology (4th ed.)*.
- Rychlik, W., W. J. Spencer, et al. (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro." *Nucleic Acids Res* **18**(21): 6409-6412.
- Sakoh, M., K. Ito, et al. (2005). "Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **280**(39): 33305-33310.
- Salles, C., L. Creancier, et al. (1992). "The High-Level Streptomycin Resistance Gene from *Streptococcus-Pneumoniae* Is a Homolog of the Ribosomal-Protein S12 Gene from *Escherichia-Coli*." *Nucleic Acids Res* **20**(22): 6103-6103.
- Sambrook J, R. D. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY."
- Sanchez-Puelles, J. M., J. M. Sanz, et al. (1990). "Cloning and expression of gene fragments encoding the choline-binding domain of pneumococcal murein hydrolases." *Gene* **89**(1): 69-75.
- Schumann, W. (1999). "FtsH - a single-chain charonin?" *FEMS Microbiol Rev* **23**(1): 1-11.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, et al. (1967). "Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by Electrophoresis in Sds-Polyacrylamide Gels." *Biochem Biophys Res Commun* **28**(5): 815-&.
- Spratt, B. G. (1994). "Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations." *Science* **264**(5157): 388-393.
- Steinmoen, H., E. Knutsen, et al. (2002). "Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(11): 7681-7686.
- Sung, C. K., H. Li, et al. (2001). "An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*." *Appl Environ Microbiol* **67**(11): 5190-5196.

- Tenover, F. C. (2006). "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria." American Journal of Medicine **119**(6): S3-S10.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **60**(5): 523-533.
- Thomas P. Hopp¹, K. S. P., Virginia L. Price¹, Randell T. Libby², Carl J. March¹, Douglas Pat Cerretti¹, David L. Urdal¹ & Paul J. Conlon¹ (1988). "A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification." Nature Biotechnology **6**:1204–1210.
- Tomasz, A. (1967). "Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in Pneumococcus." Science **157**(3789): 694-697.
- Tomasz, A. (1997). "Antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae." Clinical Infectious Diseases **24**: S85-S88.
- Towbin, H. (1988). "Citation Classic - Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications." Current Contents/Life Sciences(11): 19-19.
- Vestrheim, D. F., O. Lovoll, et al. (2008). "Effectiveness of a 2+1 dose schedule pneumococcal conjugate vaccination programme on invasive pneumococcal disease among children in Norway." Vaccine **26**(26): 3277-3281.
- Warrens, A. N., M. D. Jones, et al. (1997). "Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: An improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest." Gene **186**(1): 29-35.

8. Vedlegg

Vedlegg A: Aminosyre- og nukleotidsekvens av ComM/*comM* i *S. pneumoniae* R6

>gi|15902044:c1730321-1729701 Streptococcus pneumoniae R6, complete genome

```
ATGAAATCAATGAGAATCTTATTTTTGTTAGCTTTAATTCAAATCAGTTTGAGTAGCTGTTTCCTAT
GGAAGGAATGCATCTTGTCTTTAAACAAAGTACAGCTTTTTTCATCGGAAGCATGGTTTTTCGTTTC
AGGAATCTGTGCTGGAGTAAATTATCTTTATAACCGTAAGCAAGAAGTCCATAGTGTCTAGCCAG
TAAGAAGTCGGTGAAGCTTTTTTACAGTATGTTACTCTTAATTAATTTGTTAGGAGCTGTTCTTGTT
TTGTCAGATAACTTGTTTCATCAAAAATACGCTGCAGCAAGAATTAGTTGACTTTTTATTGCCATCCT
TCTTTTTCTTATTTGGGCTAGATTTGCTGATTTTTTTACCCCTTGAAAAAATACGTGCGCGATTTTCTT
GCTATGCTGGACAGAAAAAAGACAGTGTGGTGACTATTTTAGCAACACTTCTTTTCTTAAGAAAT
CCAATGACCATTGTCTCACTTCTGATTTATATTGGACTGGGCTTGTTTTTTGCAGCCTATCTTGTCCC
AAATTCGGTTAAGAAGGAAGTTTCCTTTTATGGTCATATTTCCGAGATCTTGTATTGGTCATTGTT
ACGCTCATTTTCTTTTAG
```

>gi|15903804|ref|NP_359354.1| hypothetical protein spr1762 [Streptococcus pneumoniae R6]

```
MKSMRILFLLALIQISLSSCFLWKECILSFKQSTAFFIGSMVSVSGICAGVNYLYTRKQ
EVHSVLASKKSVKLFYSMLLLINLLGAVLVLSDNLFIKNTLQQELVDFLLPSFFFLFGL
DLLIFLPLKKYVRDFLAMLDRKKTVLVTLATLLFLRNPMTIVSLLIYIGLGLFFAAYL
VPNSVKKEVSFYGHIFRDLVLVIVTLIFF
```


Vedlegg B 1,2,3xFlag-*comM* sekvens

3xFlag -*comM*

>comM (spr1762)

```
ATGAAATCAATGAGAATCTTATTTTTGTTAGCTTTAATTCAAATCAGTTTGAGTAGCTGTTTCCTAT
GGAAGGAATGCATCTTGTCTTTAAACAAAGTACAGCTTTTTTCATCGGAAGCATGGTTTTTCGTTTC
AGGAATCTGTGCTGGAGTAAATTATCTTTATACCCGTAAGGATTATAAAGATCATGATGGTGATTA
TAAAGATCATGATATTGATTATAAAGATGATGATGATAAACAAGAAGTCCATAGTGCCTAGCCA
GTAAGAAGTCGGTGAAGCTTTTTTACAGTATGTTACTCTTAATTAATTTGTTAGGAGCTGTTCTTGT
TTTGTGAGATAACTTGTTTCATCAAAAATACGCTGCAGCAAGAATTAGTTGACTTTTTATTGCCATCC
TTCTTTTTCTATTTGGGCTAGATTTGCTGATTTTTTACCCTTGAAAAAATACGTGCGCGATTTTCT
TGCTATGCTGGACAGAAAAAGACAGTGTGGTGACTATTTTAGCAACACTTCTTTTCTTAAGAAA
TCCAATGACCATTGTCTCACTTCTGATTTATATTGGACTGGGCTTGTTTTTGCAGCCTATCTTGTCC
CAAATTCGGTTAAGAAGGAAGTTTCCTTTTATGGTCATATTTTCCGAGATCTTGTATTGGTCATTGT
TAGCTCATTTCCTTTAG
```

2xFlag-*comM*

>comM (spr1762)

```
ATGAAATCAATGAGAATCTTATTTTTGTTAGCTTTAATTCAAATCAGTTTGAGTAGCTGTTTCCTAT
GGAAGGAATGCATCTTGTCTTTAAACAAAGTACAGCTTTTTTCATCGGAAGCATGGTTTTTCGTTTC
AGGAATCTGTGCTGGAGTAAATTATCTTTATACCCGTAAGGATTATAAAGATCATGATATTGATTA
TAAAGATGATGATGATAAACAAGAAGTCCATAGTGCCTAGCCAGTAAGAGTCGGTGAAGCTTTT
TTACAGTATGTTACTCTTAATTAATTTGTTAGGAGCTGTTCTTGTTTTGTCAGATAACTTGTTTCATCA
AAAATACGCTGCAGCAAGAATTAGTTGACTTTTTATTGCCATCCTTCTTTTTCTATTTGGGCTAGA
TTTGCTGATTTTTTTACCCTTGAAAAAATACGTGCGCGATTTTCTTGCTATGCTGGACAGAAAAAA
GACAGTGTGGTGACTATTTTAGCAACACTTCTTTTCTTAAGAAATCCAATGACCATTGTCTCACTT
CTGATTTATATTGGACTGGGCTTGTTTTTGCAGCCTATCTTGTCCCAAATTCGGTTAAGAAGGAAG
TTTCCTTTTATGGTCATATTTTCCGAGATCTTGTATTGGTCATTGTTACGCTCATTTCCTTTTAG
```

1xFlag-*comM*

>comM (spr1762)

```
ATGAAATCAATGAGAATCTTATTTTTGTTAGCTTTAATTCAAATCAGTTTGAGTAGCTGTTTCCTAT
GGAAGGAATGCATCTTGTCTTTAAACAAAGTACAGCTTTTTTCATCGGAAGCATGGTTTTTCGTTTC
AGGAATCTGTGCTGGAGTAAATTATCTTTATACCCGTAAGGATTATAAAGATGATGATGATAAACA
AGAAGTCCATAGTGCCTAGCCAGTAAGAAGTCGGTGAAGCTTTTTTACAGTATGTTACTCTTAAT
TAATTTGTTAGGAGCTGTTCTTGTTTTGTCAGATAACTTGTTTCATCAAAAATACGCTGCAGCAAGA
ATTAGTTGACTTTTTATTGCCATCCTTCTTTTTCTATTTGGGCTAGATTTGCTGATTTTTTTACCCTT
GAAAAAATACGTGCGCGATTTTCTTGCTATGCTGGACAGAAAAAAGACAGTGTGGTGACTATTTT
AGCAACACTTCTTTTCTTAAGAAATCCAATGACCATTGTCTCACTTCTGATTTATATTGGACTGGGC
TTGTTTTTGCAGCCTATCTTGTCCCAAATTCGGTTAAGAAGGAAGTTTCCTTTTATGGTCATATTTT
CCGAGATCTTGTATTGGTCATTGTTACGCTCATTTCCTTTTAG
```

Vedlegg C: Aminosyrer

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsyre	Asp	D
Cystein	Cys	C
Fenylalanin	Phe	F
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsyre/glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V