



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2017 60 stp  
Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

## **Funksjonelle studier av ComM, et immunitetsprotein som beskytter *Streptococcus pneumoniae* mot fratricinet CbpD**

Functional studies of ComM, an immunity protein  
that protects *Streptococcus pneumoniae* against the  
fratricine CbpD

Miriam Moldskred Dørum  
Bioteknologi

## **Førord**

Arbeidet presentert i denne oppgaven ble utført som en del av det toårige mastergradsstudiet Bioteknologi ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU). Oppgaven ble utført i samarbeid med den molekylære mikrobiologigruppen ved Professor Leiv Sigve Håvarstein ved fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap på NMBU. Arbeidet ble gjennomført i perioden august 2016 til mai 2017.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min veileder Dr. Daniel Straume, for grundig veiledning i laboratoriearbeidet og utmerket hjelp i skriveprosessen. Det har vært veldig spennende og givende å være med på dette prosjektet, og jeg har lært utrolig mye. Takk for at du har tatt deg tid til de mange spørsmålene mine og for gode faglige innspill.

Jeg vil også rette en stor takk til Professor Leiv Sigve Håvarstein, for at jeg har fått lov til å skrive oppgaven min i samarbeid med den molekylære mikrobiologigruppa. Det har vært veldig lærerikt å få jobbe så tett på så mange flinke folk.

Takk til resten av den molekylære mikrobiologigruppa, for innspill underveis og et godt arbeidsmiljø. Jeg vil også takke min medmasterstudent Silja Fykse for gode samtaler og et labpartner-forhold som har strukket seg gjennom hele studieløpet.

En stor takk rettes også til mine venner og familie, som har støttet og inspirert meg under hele prosessen med denne oppgaven.

Miriam Moldskred Dørum

Ås, Mai 2017

## Sammendrag

*Streptococcus pneumoniae* er en opportunistisk patogen bakterie, og infeksjoner av denne kan føre til alvorlige sykdommer som lungebetennelse, blodforgiftning (sepsis) og hjernehinnebetennelse. *S. pneumoniae* er naturlig kompetent for genetisk transformasjon, noe som fører til at bakterien hurtig tilpasser seg endringer i dens naturlige habitat, og på denne måten kan tilegne seg nye egenskaper, som for eksempel økt resistens mot ulike antibiotikum. Kompetanse hos *S. pneumoniae* er en nøye regulert prosess som blir induert av det kompetanse stimulerende peptidet CSP. Kompetente pneumokokker benytter seg av en mekanisme kalt fratricide (broderdrap) for å erverve homologt DNA fra nært beslektede ikke-kompetente celler. Hovedkomponenten i fratricide-mekanismen er fratricinet CbpD, som angriper ikke-kompetente celler i septum, og lyserer disse. For at kompetente celler ikke skal begå «selvmord», uttrykker de immunitetsproteinet ComM. ComM er et membranprotein som har en ukjent funksjon utover at det beskytter kompetente celler mot CbpD. På bakgrunn av dette ble hovedmålet for denne oppgaven å undersøke funksjonen til immunitetsproteinet ComM nærmere. Dette ble gjort ved å innføre punktmutasjoner i konserverte regioner i aminosyresekvensen til ComM, for å undersøke om disse hadde noen effekt på immunitetsfunksjonen. Det ble også undersøkt om ComM fra andre streptokokkarter kunne gi immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae*, og om ComM kunne være en antagonist for CAAX-proteaser, da disse deler noe homologi. Fordi CbpD angriper celleveggen i septum, ble ComM også testet for protein-protein interaksjoner med proteiner som er viktige i celledelingen eller celleveggsyntesen. Det ble i tillegg gjort forsøk på å lokalisere GFP-ComM i cellen under celledeling. Resultatene fra denne oppgaven viste at aminosyrer i de konserverte regionene hos ComM var viktige for proteinets immunitetsfunksjon. ComM fra nært beslektede arter ga immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae*, mens ComM fra fjernere beslektede streptokokker ikke hadde denne egenskapen. Dette styrker teorien om at fratricide-mekanismen er utviklet for kontrollert opptak av DNA fra nært beslektede arter. ComM ble ikke identifisert som en antagonist for CAAX-proteaser. Protein-protein interaksjoner indikerte at ComM er assosiert med de tre PBP'ene PBP2b, PBP2x og PBP1b, som alle er viktige i celledelingsmaskineriet hos *S. pneumoniae*, men det er usikkert om disse resultatene er reelle da det ikke så ut til at ComM ble integrert i membranen hos *E. coli*, som ble brukt som ekspresjonsvert. En distinkt subcellulær lokalisering av GFP-ComM ble ikke observert. Det kan ikke trekkes noen klare konklusjoner fra arbeidet utført i denne oppgaven, men resultatene peker mot at ComM har en enzymatisk- eller substratbindende aktivitet.

## Abstract

*Streptococcus pneumoniae* is an opportunistic pathogen bacteria, and infections of this bacteria can lead to severe illnesses like pneumoniae, sepsis and meningitis. *S. pneumoniae* is naturally competent for genetic transformation, which makes it rapidly adaptive to changes in its natural habitat. In this way, the bacteria can evolve new properties, like resistance to various antibiotics. Competence in *S. pneumoniae* is a highly regulated process, induced by the competence stimulating peptide CSP. Competent pneumococci utilize a mechanism termed fratricide, to achieve homologous DNA from closely related non-competent cells. The main component of the fratricide-mechanism is the fratricine CbpD, which attacks non-competent cells in septa, resulting in cell lysis. To avoid competent cells in committing suicide, they express the immunity protein ComM. ComM is a membrane protein, with an unknown function except from the fact that it protects the competent cells from CbpD. With this background, the main goal of this thesis was to investigate the function of the immunity protein ComM closer. To do this, point mutations were introduced in conserved regions of the amino acid sequence to ComM, to investigate if these influenced the immunity function. ComM from other streptococci were analyzed for immunity against CbpD in *S. pneumoniae*, and the theory of which ComM could possibly be an antagonist for CAAX proteases (due to some shared homology) was tested. Because CbpD attacks the cell wall in septa, ComM was also tested for protein-protein interactions with proteins that are important for the cell division or the cell wall synthesis. Attempts to localize GFP-ComM in cells in cell division were also carried out. The results in this thesis identified amino acids in the conserved regions of ComM to be important for its immunity function. ComM from closely related species gave immunity to CbpD in *S. pneumoniae*, while ComM from the more distant related streptococci did not. This strengthens the theory of which the fratricide mechanism is developed for controlled uptake of DNA from closely related species. ComM was not identified as an antagonist for CAAX proteases. Protein-protein interactions indicated ComM in an association to the three PBP's PBP2b, PBP2x and PBP1b, all of which are of importance for the cell division machinery in *S. pneumoniae*, but it is not clear whether the results are real, as ComM did not seem to integrate in the membrane of *E. coli*, which was used as an expression host. A distinct sub cellular localization of GFP-ComM was not found. No clear conclusions can be drawn from the work of this thesis, but the results points in the direction of ComM having an enzymatic or substrate binding activity.

## Innholdsfortegnelse

<b>1. Introduksjon.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Horisontal genoverføring.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Naturlig genetisk transformasjon hos <i>S. pneumoniae</i> .....	4
<b>1.3 Kompetanseindusert cellelysis -fratricide (broderdrap).....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Kolinbindende protein D – CbpD.....	7
<b>1.4 Celleveggen hos <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Peptidoglykan – struktur og syntese.....	9
1.4.2 Celledelingsmaskineriet hos <i>S. pneumoniae</i> .....	12
<b>1.5 Immunitetsproteinet ComM.....</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Mål med oppgaven.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Materialer.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Bakteriestammer og plasmider.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Peptidferomoner.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Primere.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Antibiotika.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Enzymer, enzymbuffere, molekylvektstandarder og nukleotider.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Kjemikalier.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 Antistoff.....</b>	<b>28</b>
<b>2.8 Kit.....</b>	<b>28</b>
<b>2.9 Utstyr og instrumenter.....</b>	<b>29</b>
<b>2.10 Programvare.....</b>	<b>31</b>
<b>2.11 Vekstmedium.....</b>	<b>31</b>
<b>2.12 Buffere og løsninger.....</b>	<b>36</b>
2.12.1 Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese.....	36
2.12.2 Buffere og løsninger til SDS-PAGE.....	37
2.12.3 Løsninger til coomassie-farging.....	39
2.12.4 Løsninger og buffere til Western Blot.....	40

<b>3. Metoder</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 Kultivering og oppbevaring av bakteriestammer</b> .....	<b>41</b>
3.1.1 Kultivering av <i>S. pneumoniae</i> .....	41
3.1.2 Kultivering av <i>E. coli</i> .....	41
3.1.3 Oppbevaring av bakteriestammer.....	41
<b>3.2 Transformasjon</b> .....	<b>42</b>
3.2.1 Transformasjon av <i>S. pneumoniae</i> .....	42
3.2.1.1 Protokoll for transformasjon hos <i>S. pneumoniae</i> .....	42
3.2.1.2 Negativ seleksjon ved bruk av Janus-kassetten.....	43
3.2.2 Transformasjon av <i>E. coli</i> .....	43
3.2.2.1 Protokoll for varmesjokk-transformering.....	44
3.2.2.2 Protokoll for å lage kjemisk kompetente <i>E. coli</i> ved bruk av CaCl <sub>2</sub> .....	44
<b>3.3 Polymerase kjedereaksjon (polymerase chain reaction, PCR)</b> .....	<b>45</b>
3.3.1 Primerdesign og fortynning av primere.....	46
3.3.2 PCR ved bruk av Phusion DNA-polymerase.....	46
3.3.2.1 Protokoll for PCR med Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA-polymerase.....	47
3.3.3 Screening-PCR (OneTaq <sup>®</sup> polymerase).....	50
3.3.3.1 Protokoll for screening-PCR.....	50
3.3.4 Overlapp-ekstensjons PCR.....	51
<b>3.4 Agarose gelelektroforese</b> .....	<b>52</b>
3.4.1 Protokoll for agarose gelelektroforese.....	53
<b>3.5 Rense målfragment fra agarosegel</b> .....	<b>54</b>
3.5.1 Protokoll for rensing av DNA fra agarosegel.....	54
<b>3.6 Sekvensering</b> .....	<b>55</b>
<b>3.7 Isolering, restriksjonskutting og ligering av plasmid</b> .....	<b>55</b>
3.7.1 Isolering av plasmid.....	55
3.7.1.1 Protokoll for plasmidisolering.....	56
3.7.2 Restriksjonskutting av plasmid.....	57
3.7.2.1 Protokoll for restriksjonskutting av plasmid.....	57

3.7.3 Ligering av plasmid.....	58
3.7.3.1 Protokoll for ligering av plasmid.....	58
<b>3.8 Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System (BACTH).....</b>	<b>59</b>
3.8.1 Protokoll for BACTH-systemet.....	60
<b>3.9 Sytox lysis-assay.....</b>	<b>61</b>
3.9.1 Protokoll for Sytox lysis-assay.....	62
<b>3.10 Isolering av membranfraksjon.....</b>	<b>62</b>
3.10.1 Protokoll for isolering av membranfraksjon.....	63
<b>3.11 SDS-PAGE.....</b>	<b>63</b>
3.11.1 Protokoll for SDS-PAGE.....	64
<b>3.12 Coomassie-farging.....</b>	<b>65</b>
3.12.1 Protokoll for Coomassie-farging av SDS-geler.....	65
<b>3.13 Western Blot.....</b>	<b>65</b>
3.13.1 Protokoll for Western Blot.....	66
<b>3.14 Mikroskopering.....</b>	<b>67</b>
3.14.1 Fasekontrast-mikroskopi og fluorescensmikroskopi.....	67
3.14.1.1 Protokoll fluorescensmikroskopi.....	68
3.14.2 ComRS-systemet hos <i>S. pneumoniae</i> .....	68
<b>4. Resultater.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 Identifisering av konserverte aminosyrer i ComM.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2 Predikert 3D-struktur av ComM.....</b>	<b>73</b>
<b>4.3 Aminosyrer i konserverte regioner er essensielle for immunitetsfunksjonen til         ComM.....</b>	<b>75</b>
<b>4.4 ComM fra nært beslektede arter kan gi immunitet mot CbpD hos         <i>S. pneumoniae</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>4.5 Er ComM en antagonist for CAAX-lignende proteiner?.....</b>	<b>79</b>
<b>4.6 Interagerer ComM med celledelingsproteiner?.....</b>	<b>81</b>
<b>4.7 Lokaliseringsstudier av GFP-ComM.....</b>	<b>83</b>

<b>5. Diskusjon.....</b>	<b>86</b>
<b>5.1 Konserverte aminosyrer i ComM er viktige for proteinets immunitetsfunksjon..</b>	<b>86</b>
<b>5.2 ComM fra nært beslektede arter kan gi immunitet mot CbpD hos</b>	
<i>S. pneumoniae</i> .....	<b>87</b>
<b>5.3 Den CAAX-lignende proteasen Spr0265 gir ikke immunitet mot CbpD hos</b>	
<i>S. pneumoniae</i> .....	<b>88</b>
<b>5.4 Interaksjoner mellom ComM og proteiner involvert i celledelingsmaskineriet...</b>	<b>89</b>
<b>5.5 Lokalisering av GFP-ComM under celledeling.....</b>	<b>90</b>
<b>6. Konklusjon og videre studier.....</b>	<b>92</b>
<b>7. Referanser.....</b>	<b>93</b>
<b>Vedlegg.....</b>	<b>I</b>
<b>Vedlegg A.....</b>	<b>I</b>
<b>Vedlegg B.....</b>	<b>IV</b>
<b>Vedlegg C.....</b>	<b>V</b>



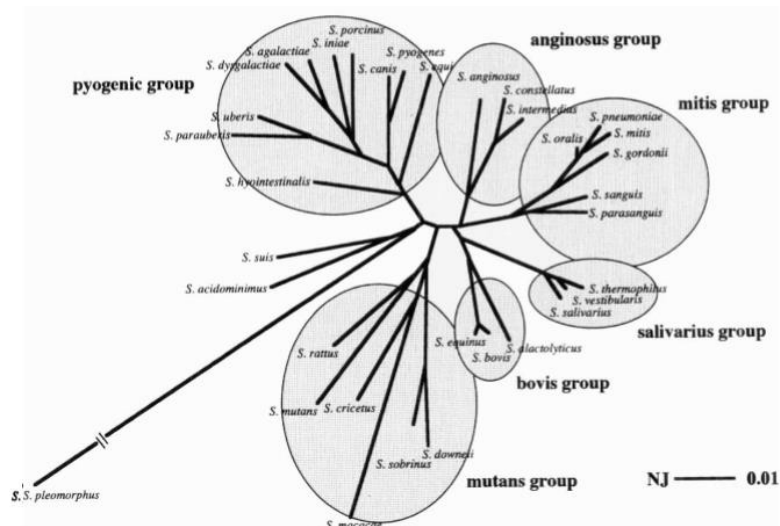
# 1 Introduksjon

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* er en opportunistisk patogen bakterie, som koloniserer de øvre luftveier (nesesvelg) hos mennesker og dyr. Hvert år infiserer bakterien rundt 100 millioner mennesker på verdensbasis, noe som fører til sykdommer som lungebetennelse, blodforgiftning (sepsis) og hjernehinnebetennelse (Bogaert et al. 2004). Barn, eldre og personer med redusert immunforsvar er spesielt utsatt for sykdommer som *S. pneumoniae* forårsaker. Infeksjoner av denne bakterien resulterer hvert år i 1-2 millioner dødsfall hos nyfødte verden over. Dødeligheten hos eldre og personer med redusert immunforsvar er vanskelig å tallfeste, men det antas at dødsraten er enda høyere enn hos nyfødte. Til enhver tid er rundt 10% av friske voksne og 20-40% av friske barn bærere av *S. pneumoniae* (Poll & Opal 2009).

Klassifisering av bakterier har vist seg å være en omfattende prosess, og ulike arters taksonomiske plassering har blitt revidert flere ganger gjennom tidene. Den gjeldende klassifiseringen plasserer *S. pneumoniae* i rekken *Firmicutes*, klassen *Bacilli*, ordenen *Lactobacillales*, familien *Streptococcaceae*, slekten *Streptococcus* og arten *pneumoniae* (Garrity et al. 2004).

Studier av 16S rRNA gensekvenser hos de ulike artene i slekten *Streptococcus* har gjort det mulig å beregne det fylogenetiske slektskapet mellom artene. Slekten er delt inn i seks hovedgrupper, som vist i figur 1.1 (Kawamura et al. 1995). *S. pneumoniae* tilhører gruppen *mitis*, som omfatter totalt 12 arter, deriblant de nært beslektede *Streptococcus mitis* og *Streptococcus oralis*. *S. pneumoniae* skiller seg klart ut i denne gruppen med sin patogene karakter, da de fleste artene innenfor denne er kommensale bakterier (Kilian et al. 2008).



**Figur 1.1. Fylogenetisk slektskap mellom arter av slekten *Streptococcus*.** Det fylogenetiske treet er basert på sammenligning av 16S rRNA sekvenser hos 34 ulike *Streptococcus* arter. Treet er delt inn i seks hovedgrupper, hvor *S. pneumoniae* er plassert i gruppen mitis. Figuren er hentet fra Kawamura *et al.* (1995).

*S. pneumoniae* er en Gram-positiv bakterie med lavt G+C innhold (Brantl & Brückner 2014). Cellene har en oval kokkeform og vokser i par eller korte kjeder. *S. pneumoniae* er  $\alpha$ -hemolytiske under aerobe forhold, noe som kan detekteres ved at det dannes en distinkt grønnfarge rundt koloniene når de dyrkes på blodagar. Denne grønnfargen skyldes at cellene skiller ut hydrogenperoksid som oksiderer rødt hemoglobin til grønt methemoglobin (Tortora *et al.* 2014). *S. pneumoniae* er katalase negative, ikke-motile og danner ikke sporer. Bakterien er anaerob, men kan vokse i miljø med lave oksygenkonsentrasjoner. Den krever komplekse næringsmedium, og er fermenterende. Ved fermentering av glukose dannes melkesyre som sluttprodukt (Hardie & Whiley 1997).

Cellene er omgitt av en tett polysakkarid-kapsel, og denne er hovedårsaken til bakteriens virulensegenskaper. Kapselen hjelper bakterien med å slippe unna vertens immunforsvar. Kapselen kan være bygget opp av ulike kombinasjoner av sukkerenheter. Slike variasjoner i kapselstrukturen kalles serotyper. Det er identifisert mer enn 90 ulike serotyper av slike kapsler hos *S. pneumoniae*. De fleste konvensjonelle vaksiner mot *S. pneumoniae* er i dag basert på kapselen fra bestemte serotyper typiske for virulente stammer. Et stort problem er likevel at *S. pneumoniae* tar opp gener involvert i kapselsyntese fra andre serotyper via horisontal genoverføring, og på denne måten begynner å lage en annen kapseltype (serobytte) (Jefferies

et al. 2004). Når bakterien begynner å lage en kapsel som ikke er inkludert i vaksinen, vil man ikke lenger være immun mot denne *S. pneumoniae* stammen. Slike kapselbytter gjør at man aldri kan være 100% immun mot *S. pneumoniae* med dagens vaksiner.

## 1.2 Horisontal genoverføring

Horisontal genoverføring har vist seg å være en viktig drivkraft i evolusjonen hos bakterier. Prinsippet bak dette er at gener blir overført mellom to organismer i samme generasjon. Bakterier bruker tre hovedmekanismer for å gjøre dette mulig: konjugasjon, transduksjon og naturlig genetisk transformasjon (Johnsborg & Håvarstein 2009). Ved konjugasjon blir plasmider overført mellom organismene via en rørformet pilus som vokser ut fra giverbakterien og fester seg til mottakerbakterien. Ved transduksjon blir gener overført mellom organismene ved at virus (bakteriofager) tar opp DNA fra den ene organismen og overfører dette ved å infisere den andre organismen. Naturlig genetisk transformasjon er en mekanisme hvor celler har et eget apparat som gjør at de kan ta opp nakent DNA fra omgivelsene. Det er uvisst hvilken av disse mekanismene som bidrar til størst grad av genetisk flyt i naturen, men naturlig genetisk transformasjon er den minst utbredte, da mekanismen kun er dokumentert i rundt 65 arter (Johnsborg et al. 2007b). De andre to mekanismene derimot benyttes av de fleste bakterier for utveksling av gener. Likevel er naturlig genetisk transformasjon en meget interessant mekanisme, da denne er den eneste mekanismen bakterien selv har full kontroll over (Håvarstein 2010).

Hos *S. pneumoniae* er naturlig kompetanse en veldig viktig drivkraft for spredning av antibiotikaresistensgener. Nært beslektede kommensale bakterier som *S. mitis* og *S. oralis* deler naturlig habitat i nesesvelget med *S. pneumoniae*. I disse kommensale bakteriene er det funnet mange determinanter for penicillinresistens, trolig utviklet som en respons på hyppig bruk av  $\beta$ -laktamerer i behandling av pasienter. Mutasjoner har skjedd i de penicillinbindende genene (PBP), noe som har ført til resistens mot disse antibiotikaene. Spredning av gener for antibiotikaresistens kan forekomme ved naturlig genetisk transformasjon, og disse kan dermed overføres til den opportunistisk patogene arten *S. pneumoniae* (Johnsborg & Håvarstein 2009). På verdensbasis har det blitt observert en økning i resistens mot  $\beta$ -laktamerer hos *S. pneumoniae*, noe som er bekymringsverdig med tanke på at sykdommene denne bakterien forårsaker kan ha fatale utfall (Zapun et al. 2008). Ved naturlig genetisk transformasjon kan

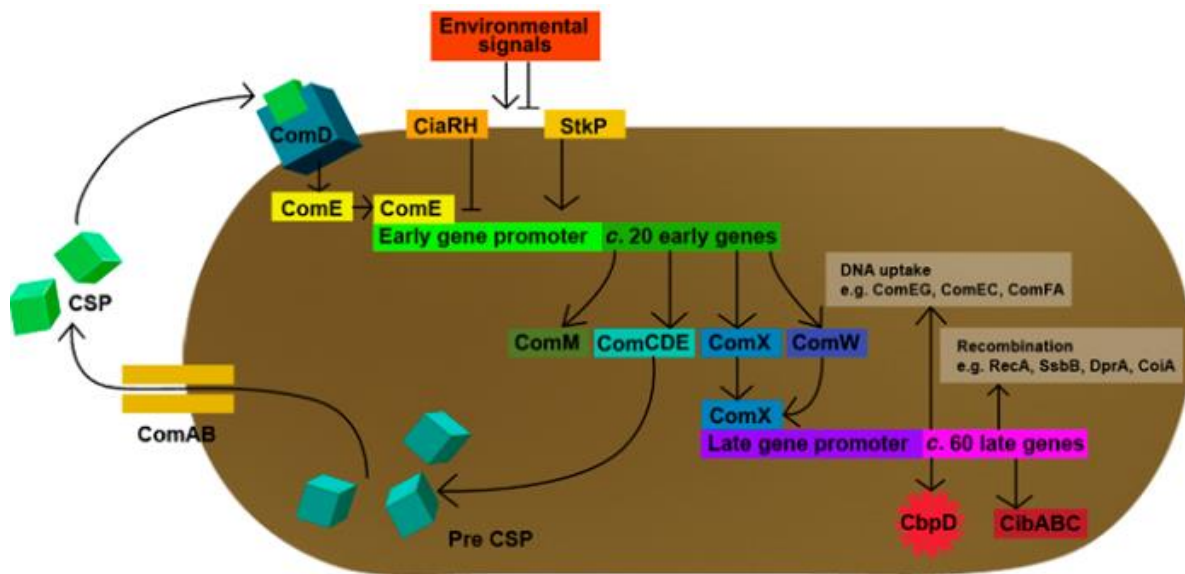
også virulensgener overføres mellom pneumokokker. Et eksempel på dette er virulensgenene *cps*, som er involvert i oppbyggingen av polysakkarid-kapselen hos pneumokokker (Johnsborg & Håvarstein 2009).

### 1.2.1 Naturlig genetisk transformasjon hos *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* benytter seg av naturlig genetisk transformasjon for å ta opp fremmed DNA. Denne egenskapen ble først observert av Frederick Griffith i 1928, da han arbeidet med å undersøke hvilke faktorer som var nødvendige for kapseldannelse i kapselfrie stammer av *S. pneumoniae* (Griffith 1928). Eksperimentet var firedelt og baserte seg på forsøk på mus, hvor friske mus ble injisert med (1) levende bakterier med kapsel, (2) levende bakterier uten kapsel, (3) døde bakterier med kapsel og (4) en kombinasjon av levende bakterier uten kapsel og døde bakterier med kapsel. Ved injisering med levende celler med kapsel døde musen, mens den overlevde både ved injisering med levende celler uten kapsel og ved injisering med døde celler med kapsel. Ved injisering av en kombinasjon av både levende celler uten kapsel og døde celler med kapsel døde musen. Dette viste at de levende bakteriene uten kapsel hadde blitt transformert av de døde bakteriene med kapsel, og dermed ervervet egenskapen til kapseldannelse, noe som igjen førte til at de kunne forårsake sykdom (Griffith 1928). Grunnlag for å forstå de molekylære mekanismene bak transformasjonen var ikke tilstede på dette tidspunktet, før Oswald Avery og hans kolleger identifiserte DNA som den transformerende agenten hos *S. pneumoniae* (Avery et al. 1944).

Nakent DNA fra omgivelsene blir tatt opp ved naturlig genetisk transformasjon og inkorporert i genomet hos *S. pneumoniae* ved hjelp av homolog rekombinasjon (Straume et al. 2015). Naturlig genetisk transformasjon blir induisert hos *S. pneumoniae* via et såkalt to-komponent signaloverføringssystem som kodes av operonet *comCDE*. Genet *comC* koder for et kompetanse-stimulerende peptid kalt CSP, *comD* for en histidin kinase reseptor som binder CSP og *comE* for en responsregulator (Håvarstein et al. 1995; Johnsborg et al. 2007a). Dette systemet regulerer induksjon til kompetanse ved at det overvåker konsentrasjonen av ekstracellulært CSP og responderer på denne (Johnsborg & Håvarstein 2009). Pre-CSP skilles ut av bakterien via et sekresjonskompleks bestående av ComAB. Ekstracellulært CSP stimulerer cellen til kompetanse ved at den binder til ComD, som sitter i cellemembranen. Ved binding av CSP til ComD vil denne autofosforylere og deretter overføre fosforyl-gruppen til

ComE. Dette resulterer i at ComE aktiverer rundt 20 såkalte tidlige *com*-gener ved å binde seg til spesifikke sekvenser i promotorene til disse genene. Denne aktiveringen fører til økt transkripsjon av blant annet *comCDE*-operonet, *comAB*-operonet, *comX*, *comW* og *comM*. Siden CSP induserer sin egen produksjon fører dette til en rask økning i ekstracellulær CSP konsentrasjon, noe som vil stimulere utviklingen av kompetanse (Straume et al. 2015). Produksjon av den alternative  $\sigma$  faktoren ComX fører til transkripsjon av rundt 60 såkalte sene *com*-gener. Blant disse sene genene finnes de som er direkte ansvarlige for naturlig genetisk transformasjon hos *S. pneumoniae*, ved at de koder for komponenter i maskineriet som sørger for opptak av DNA og homolog rekombinasjon. ComW hindrer proteolytisk kløyving av ComX, mens ComM gir den kompetente cellen immunitet mot murein hydrolasen CbpD som blir produsert når de sene *com*-genene blir transkribert (Johnsborg & Håvarstein 2009). En skjematisk oversikt av regulering av kompetanse hos *S. pneumoniae* er vist i figur 1.2.



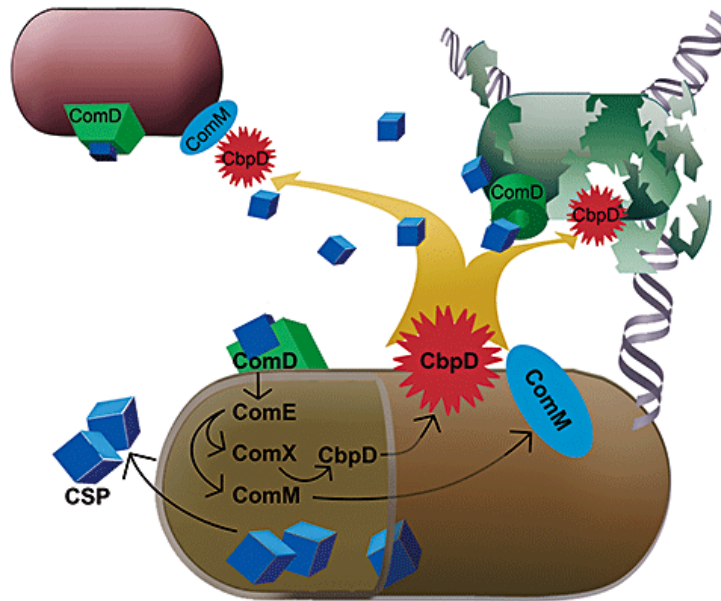
**Figur 1.2. Skjematisk oversikt over kompetanseregulering hos *S. pneumoniae*.** Ekstracellulært CSP binder til ComD, noe som aktiverer ComE. ComE binder til promotoren for de tidlige *com*-genene, slik at disse blir transkribert. Den alternative  $\sigma$  faktoren ComX binder til promotoren for de sene *com*-genene, noe som resulterer i transkribering av disse. Noen av de sene genene sørger for opptak av DNA og rekombinasjon. ComW hindrer degradering av ComX, og ComM beskytter den kompetente cellen mot sekretert CbpD. Figuren er hentet fra Johnsborg & Håvarstein (2009).

Kompetanseperioden hos *S. pneumoniae* er kort, og maksimal kompetanse er nådd 10 – 15 minutter etter at CSP tilsettes en kultur i tidlig eksponentiell fase. Etter omtrent 40 minutter blir kompetansen terminert (Håvarstein et al. 1995). Nylige studier har vist at det sene

kompetanseproteinet DprA, som er nødvendig for at kompetente celler skal inkorporere fremmed DNA ved homolog rekombinasjon, også er hovedkomponenten for terminering av kompetanseperioden. DrpA terminerer kompetanseperioden ved at den binder og inaktiverer fosforylert ComE, noe som igjen fører til nedregulering av de sene *com*-genene og kompetansetilstanden skrus av (Mirouze et al. 2013; Weng et al. 2013).

### 1.3 Kompetanse induisert cellelysis – fratricide (broderdrap)

Under kompetanse vil deler av *S. pneumoniae*-populasjonen som ikke er i den kompetente tilstanden frigi sitt DNA som et resultat av at cellene lyserer. Dette fører til at ikke-kompetente celler i populasjonen fungerer som donorer av DNA til transformasjon hos de kompetente cellene. Dette muliggjør en enklere DNA utveksling mellom pneumokokker i naturen (Steinmoen et al. 2002). Cellelysis induisert av kompetanse kalles fratricide (broderdrap), og baserer seg på at kompetente celler skiller ut noen proteiner, kalt fratriciner, som angriper ikke-kompetente naboceller slik at de lyserer. Mekanismen bak fratricide i *S. pneumoniae* baserer seg på de tre sekreterte kolin-bindende murein hydrolasene CbpD, LytA og LytC (Berg et al. 2012). Hovedaktøren blant disse under fratricide er CbpD hos angripercellene, mens LytA og LytC i målcellene bidrar til en mer effektiv lysering når CbpD angriper. CbpD kan også lysere målcellen alene, en egenskap som ikke LytA og LytC innehar. CbpD sekreteres fra den kompetente cellen, og binder til overflaten til målcellene. Her lager den skade i celleveggen slik at cellen lyserer og frigjør DNA. LytA og LytC aktiveres i målcellene når CbpD har begynt å gjøre skade, noe som akselererer lyseringsprosessen (Eldholm et al. 2009). En skjematisk oversikt over fratricide-mekanismen hos *S. pneumoniae* er vist i figur 1.3. Fratricide påvirker kun nært beslektede ikke-kompetente bakterier, noe som regnes som mest hensiktsmessig da opptak av DNA ofte har som funksjon å reparere skadet DNA i mottakercellen og å gi opphav til nye funksjoner hos denne. Dette DNAet må derfor være homologt til cellens eget DNA, slik at det kan inkorporeres ved homolog rekombinasjon. Opptak av DNA fra fjernt beslektede arter kan i verste fall være skadelig for mottakercellen, og det antas derfor at fratricide-mekanismen har utviklet seg for at naturlig kompetente celler skal kunne skille mellom DNA fra fjerne og nært beslektede arter (Johnsborg & Håvarstein 2009). For å hindre «selvmord» uttrykker de kompetente cellene et tidlig *com*-gen kalt *comM*. Dette genet koder for et immunitetsprotein som hindrer at kompetente celler lyseres av sitt eget CbpD protein (Håvarstein et al. 2006).



**Figur 1.3. Skjematisk oversikt over fratricide-mekanismen hos *S. pneumoniae*.** Når cellen blir indusert til kompetanse blir det tidlige *com*-genet *comM* transkribert, slik at immunitetsproteinet ComM blir produsert. Dette proteinet hindrer CbpD, som blir produsert når de sene *com*-genene blir transkribert, i å hydrolysere celleveggen hos kompetente celler slik at de ikke lyses (begår selvmord) når CbpD blir utskilt. Ikke-kompetente celler produserer ikke ComM, og har derfor ingen immunitet mot CbpD, noe som resulterer i at disse blir lysert. DNA blir frigitt fra de lyserte cellene, og kan deretter tas opp av de kompetente cellene. Figuren er hentet fra Johnsborg *et al.* (2008).

### 1.3.1 Kolinbindende protein D – CbpD

Hovedeffektoren i fratricide hos pneumokokker er kolin-bindende protein D (CbpD). Når cellene blir indusert til kompetanse blir proteinet produsert ved transkribering av de sene *com*-genene, og deretter sekretet. Produksjon av CbpD finner kun sted i kompetente celler. CbpD er en murein hydrolase som er bygd opp av fire domener: et CHAP-domene i den N-terminale enden, et kolin-bindende domene (CBD) i den C-terminale enden og to SH3b-domener mellom disse (Eldholm *et al.* 2010). CHAP-domenet sørger for hydrolysering av celleveggen. Det er uvisst akkurat hvor i celleveggen hos *S. pneumoniae* dette enzymatiske domenet kutter, men studier av andre muralytiske CHAP-domener indikerer at det fungerer enten som en amidase som gjør kutt mellom stem-peptider i celleveggen eller en endopeptidase som kutter bindingen mellom stem-peptidet og glykankjedene (N-acetylmuramyl-L-Ala) (Bateman & Rawlings 2003). Det kolin-bindende domenet består av fire kolin-bindende motiver som binder med sterk affinitet til kolin. Tekoinsyrer i celleveggen til *S. pneumoniae* er dekorert med kolinheter, noe som er essensielt for at CbpD skal binde celleoverflaten til ikke-kompetente målceller (Berg

et al. 2012; Eldholm et al. 2010). Denne bindingen er ikke-kovalent, og sørger for at CbpD styres mot den septale delen av celleveggen. De to SH3b-domenene antas å bidra til å posisjonere det katalytiske CHAP-domenet mot stedet der det skal kutte i celleveggen (Eldholm et al. 2010).

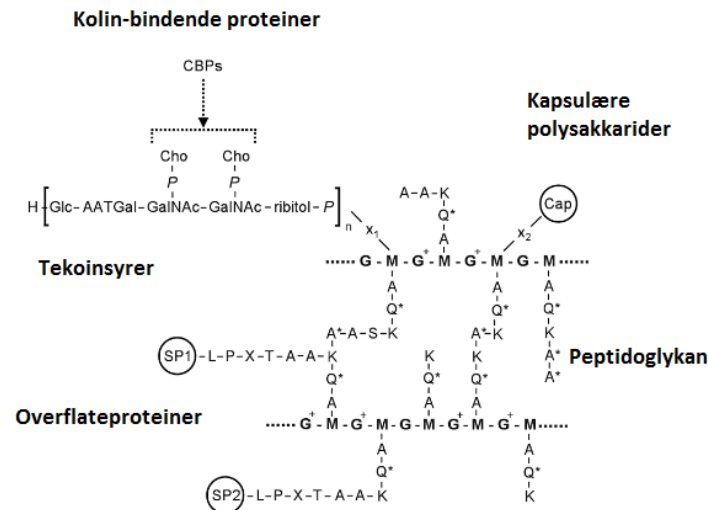
Strukturene til celleveggstekoinsyren (WTA) og lipotekoinsyren (LTA) i celleveggen hos *S. pneumoniae* er nærmest identiske. Den eneste forskjellen er membranankeret som forankrer LTA til cellemembranen (Fischer et al. 1993). Dette forekommer ikke hos de fleste andre Gram-positive bakterier, hvor WTA og LTA er strukturelt ulike (Berg et al. 2012). Studier har vist at tekoinsyrene hos de nært beslektede artene *S. mitis* og *S. oralis* har lignende oppbygning som tekoinsyrene man finner hos *S. pneumoniae* (Denapaitte et al. 2012). Dette tyder på at fratricide har blitt utviklet som en mekanisme for opptak av DNA fra nært beslektede arter, da fratricinet CbpD lyses celler som har lignende tekoinsyrer i sin cellevegg som *S. pneumoniae* (Eldholm et al. 2010). Det faktum at andre mer fjernt beslektede streptokokkarter som for eksempel *S. gordonii* og *S. thermophilus* uttrykker fratriciner med lignende CHAP-domener som CbpD, men helt ulike celleveggbindende domener styrker denne teorien (Berg et al. 2012).

#### **1.4 Celleveggen hos *S. pneumoniae***

Den bakterielle celleveggs funksjon er å forme cellen og å sørge for at cellen kan motstå osmotisk trykk ved å bidra med mekanisk styrke. Proteiner assosiert til celleveggen hos pneumokokker er i tillegg viktige for mange fysiologiske prosesser i cellen, deriblant cellevekst og deling, opptak av substrater og DNA-opptak under transformasjon. Hovedkomponenten i den bakterielle celleveggen er peptidoglykan, som er et mureint nettverk. Dette nettverket inneholder også som nevnt tekoinsyrene og lipotekoinsyrene, hvor sistnevnte er forankret i den cytoplasmiske membranen med et lipidanker. De kapsulære polysakkaridene er kovalent bundet til sukkerne som danner glykantrådene i peptidoglykan (Vollmer 2007). *In silico* analyser av genomet til laboratoriestammen R6 predikerer et betydelig antall proteiner som enten blir sekretert eller festet til celleveggen hos *S. pneumoniae*. Det ble identifisert 471 proteiner med sekvenser predikert til å være signalpeptider, 109 som inneholdt motiver for lipidforankring og 10 proteiner med kolin-bindende domener (Hoskins et al. 2001). Gjennom proteomikk analyser av *S. pneumoniae* TIGR4 ble det funnet 69 proteiner som tilsynelatende virker å være eksponert på overflaten av cellene (Tettelin et al. 2001). Celleveggen hos *S. pneumoniae* er med andre ord



veldig kompleks. Figur 1.4 viser en skjematisk oversikt av celleveggskomponentene i celleveggen hos *S. pneumoniae*.



**Figur 1.4. Skjematisk oversikt over celleveggskomponentene i celleveggen hos *S. pneumoniae*.** I celleveggen hos *S. pneumoniae* er hovedkomponenten peptidoglykan. Den består av alternerende enheter av N-acetylmuraminsyre (M) og N-acetylglukosamin (G) som er kryssbundet med pentapeptider (L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala). Tekoinsyrer, kapsulære polysakkarider (Cap) og overflateproteiner (SP) er bundet til celleveggen. Kolin-bindende proteiner kan binde til kolin på overflaten av tekoinsyrene. Figuren er modifisert fra Vollmer (2007).

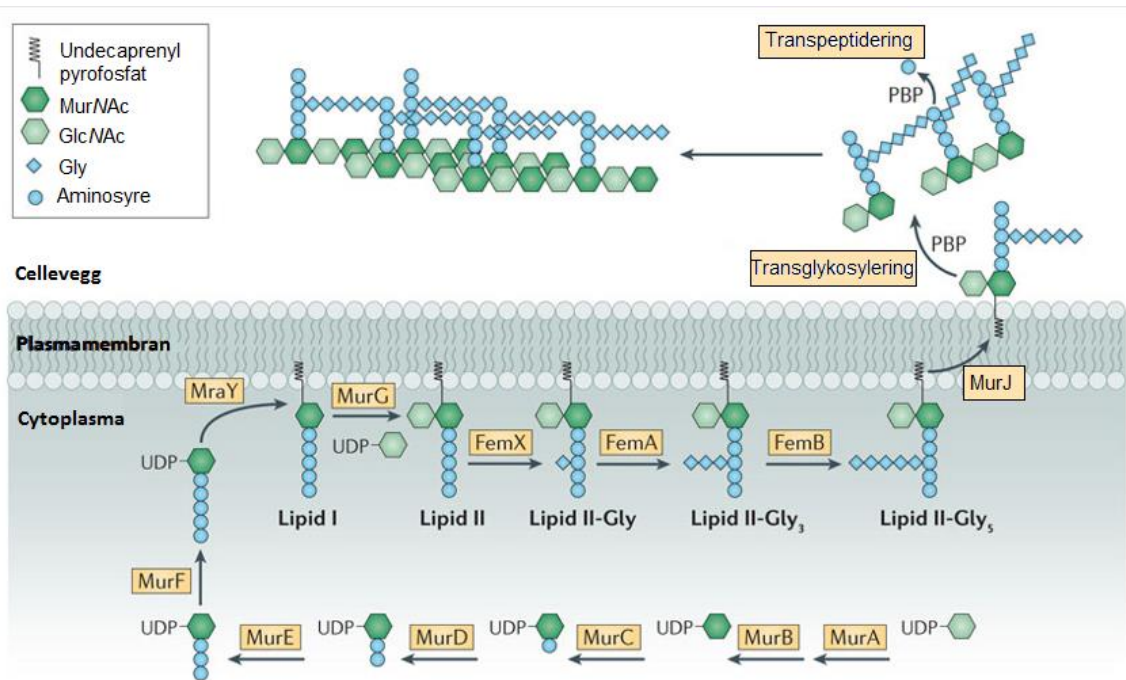
### 1.4.1 Peptidoglykan - struktur og syntese

Hovedkomponenten i den bakterielle celleveggen er peptidoglykan. Peptidoglykan er bygd opp av stive glykankjeder i en kovalent makromolekyl-struktur, hvor fleksible peptidbroer krysslinker disse kjedene til hverandre (Labischinski et al. 1979). Dette nettverket ligger i et lag rundt cellen og omslutter dermed den cytoplasmiske membranen. Glykankjedene blir syntetisert som oligomerer av alternerende residuer av de to amniosukkerene N-acetylmuraminsyre (MurNAc) og N-acetylglukosamin (GlcNAc), satt sammen med  $\beta$ -1,4 glykosidbindinger, noe som resulterer i lange og sterke kjeder. Lengden på glykankjedene hos *S. pneumoniae* er 25 disakkarid-enheter eller lengre (Bui et al. 2012). Transpeptidaser sørger for at glykankjedene blir krysslinket til hverandre via peptidbroer (Cabeen & Jacobs-Wagner 2005; Vollmer 2007).

Mer enn 20 proteiner er involvert i syntese av peptidoglykan hos *S. pneumoniae*, og prosessen deles inn i tre hovedtrinn:

1. Syntese av UDP-MurNAc-pentapeptid (i cytoplasma)
2. Dannelse av lipid II i cytoplasma og transport av denne til periplasma
3. Inkorporering av lipid II i peptidoglykan

I det første trinnet i syntese av peptidoglykan blir UDP-GlcNAc dannet fra GlcNAc-1-fosfat. MurA og MurB syntetiserer deretter UDP-MurNAc fra UDP-GlcNAc. UDP-MurNAc-pentapeptid blir dannet ved at N-terminus av et spesifikt pentapeptid blir addert til UDP-MurNAc, en reaksjon som blir katalysert av ligasene MurC, MurD, MurE og MurF. Pentapeptidene har sekvensen L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala. En fraksjon av pentapeptidene får koblet på forgreininger ved at dipeptidet L-Ala-L-Ala eller L-Ser-L-Ala settes på sidegruppen til L-Lys i stem-peptidet (Garcia-Bustos et al. 1987). Dette syntetiseres av enzymene MurM og MurN (Filipe & Tomasz 2000). Funksjonen til forgrenede pentapeptider er lite kjent. I det andre trinnet i syntesen av peptidoglykan katalyserer transferasene MraY og MurG dannelsen av lipid I (undecaprenyl-pyrofosforyl-MurNAc-pentapeptid) og lipid II (undecaprenyl-pyrofosforyl-MurNAc-pentapeptid-GlcNAc) i cytoplasma (Vollmer 2007). Lipid II blir transportert over cytoplasmamembranen ved hjelp av flippasen MurJ (Sham et al. 2014). I det siste trinnet i peptidoglykansyntesen blir lipid II inkorporert i peptidoglykan ved hjelp av transglykosylaser og transpeptidaser. Transglykosylering av lipid II fører til polymerisering av de mureine glykankjedene. Transpeptidering fører til krysslinking mellom glykankjedene. Begge disse prosessene blir utført av penicillin-bindende proteiner (PBP'er), noe som gjør disse proteinene til essensielle komponenter i syntesen av peptidoglykan (Vollmer 2007). En skjematisk oversikt over peptidoglykansyntesen er vist i figur 1.5.



**Figur 1.5. Syntese av peptidoglykan.** UDP-MurNAc blir syntetisert fra UDP-GlcNAc ved hjelp av MurA og MurB. Ligasene MurCDEF adderer pentapeptidet til UDP-MurNAc. Transferasene MraY og MurG katalyserer dannelsen av lipid I og lipid II. Hos *S. pneumoniae* er det MurN og MurM som lager forgreininger i pentapeptidet, så funksjonen til FemXAB kan ses bort ifra i denne figuren. Flippasen MurJ transporterer lipid II over plasmamembranen. PBP'er inkorporerer lipid II i peptidoglykan ved transglykosylering og transpeptidering. Figuren er modifisert fra Pinho *et al.* (2013).

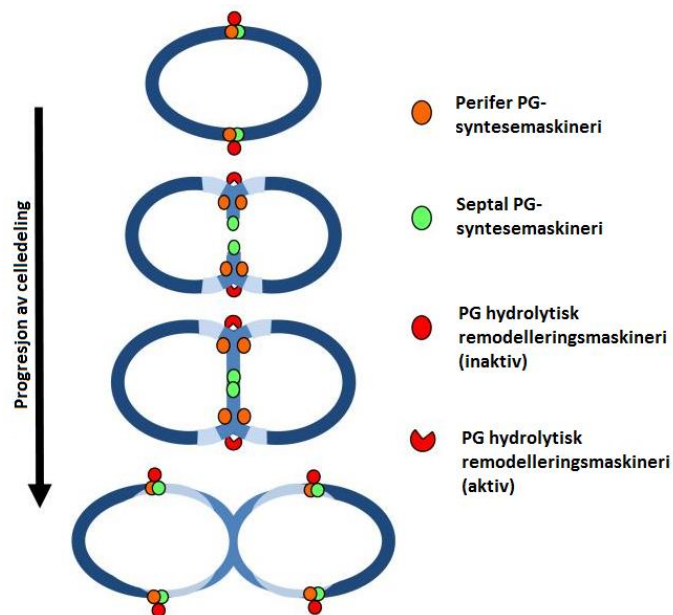
*S. pneumoniae* har seks PBP'er, arrangert i tre klasser. Klasse A omfatter PBP1a, PBP2a og PBP1b. Disse har både et domene som utfører transglykosylering (GT) og et domene som utfører transpeptidering (TP). Klasse B omfatter PBP2b og PBP2x, og disse har et TP-domene. Klasse C omfatter kun PBP3, som sekvensmessig har et TP-domene, men i realiteten kun fungerer som en carboxypeptidase som hydrolyserer stem-peptidet ved å frigi det femte residuet (D-Aal) i dette (Zapun *et al.* 2008; Zapun *et al.* 2013). Dette reduserer mengde pentapeptidbroer i peptidoglykanet. PBP'ene i klasse B er essensielle for *S. pneumoniae* (Kell *et al.* 1993). PBP'ene i klasse A kan derimot deleteres hver for seg, noe som tyder på at disse har overlappende funksjon (Hoskins *et al.* 1999). Karakteristisk for *S. pneumoniae* er at den oppnår sin ovokokke form ved å ha både perifer og septal peptidoglykansyntese. Mye tyder på at klasse B PBP'ene PBP2b og PBP2x har hver sin rolle i disse to prosessene. Studier har vist at PBP2b er viktig for syntese av den perifere celleveggen, mens PBP2x er viktig for syntese av den septale celleveggen. Ved fjerning av PBP2b har cellene septal men ikke perifer

celleveggsyntese, mens fjerning av PBP2x fører til at cellene kun har perifer celleveggsyntese (Berg et al. 2013).

#### **1.4.2 Celledelingsmaskineriet hos *S. pneumoniae***

Den økende antibiotikaresistensen som er observert hos streptokokker har ført til ny interesse for forståelse av celledelingen hos disse bakteriene, med tanke på å utvikle nye bredspektrede antimikrobielle midler som angriper celledelingsproteiner (Massidda et al. 2013; Sham et al. 2012). Mye er fortsatt ukjent, men funksjonelle studier av proteiner som deltar i celledelingsmaskineriet hos *S. pneumoniae* kan bidra til klarhet i mekanismene bak denne prosessen.

Celledelingen hos *S. pneumoniae* utføres som allerede nevnt av to hovedmaskinerier: det perifere maskineriet og det septale maskineriet. Det perifere maskineriet blir også kalt elongasomet, da det fører til elongering av cellene, mens det septale blir kalt divisomet, da det syntetiserer den septale celleveggen som separerer datterceller. Til sammen sørger disse to maskineriene for den karakteristiske ovale kokkeformen hos *S. pneumoniae* (Massidda et al. 2013). En skjematisk oversikt over det perifere og det septale celledelingsmaskineriet er vist i figur 1.6.



**Figur 1.6. Skjematisk oversikt over det perifere og det septale peptidoglykan syntesemaskineriet under celledeling.** Maskineriet for perifer celledeling (vist som oransje sirkel) fører til elongering av celleveggen, mens maskineriet for septal celleveggsyntese (vist som grønn sirkel) danner skilleveggen som skiller de to dattercellene. Et peptidoglykan hydrolyserende maskineri som inneholder blant annet celleveggshydrolasen PcsB (vist som rød sirkel i inaktiv form og rød halvmåne i aktiv form) kløyver peptidoglykan midt inni den septale celleveggen slik at datterceller kan separere seg fra hverandre (Bartual et al. 2014). Figuren er modifisert fra Sham *et al.* (2012).

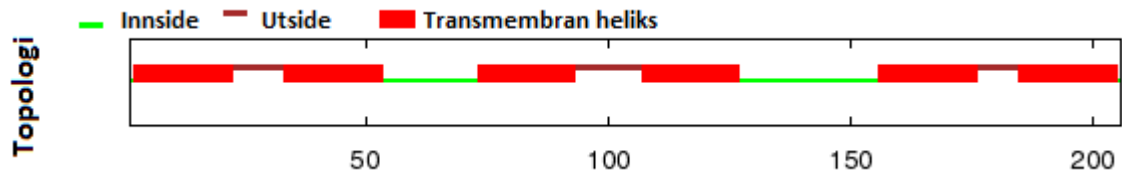
Celledelingen hos *S. pneumoniae* initieres ved at MapZ lokaliserer til cellens ekvator, sannsynligvis ved å gjenkjenne spesifikke substrukturer i peptidoglykan i dette området (Fleurie et al. 2014). Deretter rekrutteres FtsZ og FtsA til celleekvator for så å danne en ekvatoriell FtsZ-ring. I neste trinn rekrutteres en mengde komponenter som er involvert i peptidoglykansyntese som for eksempel PBP'er, SEDS (shape, elongation, division, sporulating) polymeraser, og andre regulatoriske proteiner til FtsZ-ringen (Massidda et al. 2013; Meeske et al. 2016). Etter dannelsen av FtsZ-ringen blir to nye ringer dannet på hver sin side av den opprinnelige. Den opprinnelige ringen holdes konstant mens de nylig genererte får innsatt nytt peptidoglykan mellom seg i sirkulære bevegelser. Resultatet av dette er perifer vekst, som fortsetter til de interne hemisfærene som dannes har blitt like store som de opprinnelige. Den riktige størrelsen er nådd når de to nye ringene når ekvatorene til kommende datterceller, noe som synliggjør de neste delingssetene for videre celledeling. I dette trinnet er septal syntese av peptidoglykan i full gang, og det ferdige septumet blir kløvet av murine hydrolaser, slik at datterceller kan separere seg fra hverandre (Massidda et al. 2013).

I det perifere celledelingsmaskineriet er PBP2b nøkkelkomponenten, sammen med SEDS polymerasen RodA (enzym som har transglykosylase funksjon). SEDS proteinene er en stor familie av polymeraser som deltar i både det perifere og det septale celledelingsmaskineriet, men ulike SEDS proteiner bidrar til hvert sitt maskineri (Meeske et al. 2016). Andre proteiner som er assosiert med det perifere celledelingsmaskineriet er CozE (RoaA), MreC og MreD. Funksjonen til disse er derimot ikke kjent, men CozE er viktig for elongasomet, og MreC og MreD antas å ha regulatoriske funksjoner for elongasomet (Fenton et al. 2016). Nøkkelkomponenten i den septale celledelingen er PBP2x sammen med dens tilhørende SEDS polymerase FtsW. PBP1a bidrar i både den perifere og den septale celledelingen, mens funksjonen til klasse A PBP'ene PBP1b og PBP2a under celledeling er per dags dato ukjent. StkP og DivIVA er viktige proteiner som bidrar i regulering av celledelingen, mens RodZ er et protein med et DNA-bindende domene, noe som peker mot en funksjon i kromosomregresjon (Massidda et al. 2013). Celledelingen hos *S. pneumoniae* er med andre ord en omfattende og nøye regulert prosess.

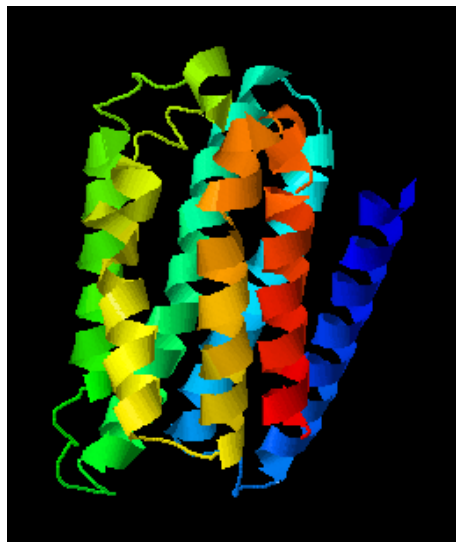
### **1.5 Immunitetsproteinet ComM**

Fratricinet CbpD angriper celleveggen til ikke-kompetente *S. pneumoniae* og andre nært beslektede streptokokker, som beskrevet i seksjon 1.3. For at kompetente celler ikke skal begå selvmord produserer de immunitetsproteinet ComM (tidlig *com*-gen) før produksjonen av CbpD (sent *com*-gen) starter. I tiden det tar før CbpD produseres, rekker ComM å beskytte cellene mot den muralytiske aktiviteten til CbpD, som beskrevet i seksjon 1.3. ComM er et 23,5 kDa stort membranintegret protein, og topologi-prediksjoner har vist at proteinet har seks eller syv transmembrane segmanter. Figur 1.7 og figur 1.8 viser en oversikt over henholdsvis predikert topologi og proteinstruktur til proteinet ComM. Etter induksjon med CSP vil ComM etter 8 – 10 minutter gi cellen full immunitet, noe som er rett før initiering av transkripsjon av det sene *com*-genet *cbpD* (Håvarstein et al. 2006; Straume et al. 2015). Hvordan ComM gir den kompetente cellen immunitet mot fratricinet CbpD er per dags dato ikke kjent, men fordi ComM er predikert til å være integrert i cytoplasmamembranen uten særskilte overflate-loops er det lite trolig at disse to proteinene har noen direkte fysisk kontakt med hverandre. Det antas derfor at denne immunitetsmekanismen skjer indirekte, hvor ComM enten fører til en modifikasjon av substratet (celleveggen) som CbpD binder til eller hindrer CbpD i å utføre katalytisk aktivitet (Straume et al. 2015). Siden CbpD må binde overflaten til målcellene og har peptidoglykan som

substrat, er det nærliggende å anta at ComM gir immunitet ved å påvirke en eller flere prosesser som har med celleveggsyntese eller celledeling å gjøre.



**Figur 1.7. Predikert topologi ComM.** Denne prediksjonen av topologien til ComM viser at den har seks transmembrane segmenter (illustrert i rødt). Topologien er predikert med programmet OCTOPUS.



**Figur 1.8. Predikert proteinstruktur ComM.** I denne figuren er ComM predikert til å ha syv transmembrane helikser. Prediksjonen er utført ved hjelp av programmet I-TASSER.

ComM ble identifisert som et immunitetsprotein som beskytter cellen under fratricide for over 10 år siden (Håvarstein et al. 2006), men likevel er proteinets aktivitet og deltakelse i cellulære prosesser fortsatt ukjent. Det eneste som egentlig er avdekket med sikkerhet er at ComM gir cellen immunitet mot CbpD under kompetanse. En nylig studie utført av Straume og hans kollegaer (2017) har vist at overuttrykk av ComM kan virke toksisk på cellene. ComM har kort levetid i kompetente celler, noe som kan være med på å hindre at det blir akkumulert til toksiske nivåer naturlig i cellene. Studien viste også at overuttrykk av ComM fører til nedsatt vekstrate hos cellene og morfologiske endringer som inhibering og feilplassering av den septale syntesen av peptidoglykan og økt cellestørrelse. Resultatet av dette var terminering av celledelingen (Straume et al. 2017).

## 1.6 Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å studere immunitetsproteinet ComM, med hensyn på funksjon og kryssimmunitet mellom ulike streptokokker.

Det er interessant å studere ComM fordi den virker å ha en funksjon i den septale celledelingen hos *S. pneumoniae*. Dette er interessant for å bedre kunne forstå celledelingsmaskineriet, og hvordan celledeling kan hindres. Dette gir igjen opphav til nye angrepspunkter i cellen, som kan utnyttes av antibakterielle midler, som for eksempel i utvikling av nye antibiotikum. I tillegg kan nye funn om funksjonen til ComM gi nyttig informasjon om Abi proteins funksjon hos bakterier. Abi proteiner er utbredt blant bakterier, men veldig lite er kjent om deres funksjon.



## 2 Materialer

### 2.1 Bakteriestammer og plasmider

**Tabell 2.1 Bakteriestammer og plasmider.** Tabellen viser en oversikt over bakteriestammene og plasmidene som ble brukt i arbeidet med denne oppgaven, deres relevante egenskaper og referanse.

Stamme/plasmid	Genotype/Relevant egenskap	Referanse
<i>S. pneumoniae</i>		
RH420	$\Delta comM::Janus$ , Str <sup>S</sup> , Kan <sup>R</sup>	Johnsborg & Håvarstein (2009)
RH425	Villtype, Str <sup>R</sup> , Kan <sup>S</sup>	Eldholm <i>et al.</i> (2009)
RH607	RH425, men ComM fra <i>S. oralis</i> uo5 i nativt <i>comM</i> -lokus	Sandanger S. (upublisert)
RH608	RH425, men ComM <sup>H191A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH617	RH425, men ComM <sup>N82A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH618	RH425, men ComM <sup>S111A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH620	RH425, men ComM <sup>D119A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH621	RH425, men ComM <sup>C20A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH622	RH425, men ComM <sup>N52A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH623	RH425, men ComM <sup>N156A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH624	RH425, men ComM <sup>E185A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH625	RH425, men ComM <sup>R194A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH626	RH425, men ComM <sup>D195A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
RH627	RH425, men ComM <sup>S187A</sup>	Sandanger S. (upublisert)
DS405	RH425, men ComM <sup>Y166A</sup>	Straume D. (upublisert)
DS269	RH425, men GFP-ComM	Straume D. (upublisert)
MD14	RH425, men ComM <sup>P125A</sup>	Denne oppgaven
MD15	RH425, men ComM <sup>G117L</sup>	Denne oppgaven
MD16	RH425, men ComM <sup>S162A</sup>	Denne oppgaven
MD17	RH425, men ComM <sup>G170L</sup>	Denne oppgaven
MD49	RH425, men $\Delta comM::Spr0265$	Denne oppgaven
MD50	MD50, men Spr0265 <sup>EE → AA</sup>	Denne oppgaven
MD51	MD50, men Spr0265 <sup>EE → QQ</sup>	Denne oppgaven

---

MD52	RH425, men ComM fra <i>S. anginosus</i> NCTC10713 i nativt <i>comM</i> -lokus	Denne oppgaven
MD53	RH425, men ComM fra <i>S. cristatus</i> NCTC12479 i nativt <i>comM</i> -lokus	Denne oppgaven
MD54	RH425, men ComM fra <i>S. infantis</i> SK605 i nativt <i>comM</i> -lokus	Denne oppgaven
MD56	RH425, men ComM fra <i>S. mitis</i> B6 i nativt <i>comM</i> -lokus	Denne oppgaven
VL15	Uttrykker GFP-ComM via ComRS- systemet	Lie V.O. (2015)
<i>S. anginosus</i> NCTC10713	Villtype	NCTC
<i>S. cristatus</i> NCTC12479	Villtype	NCTC
<i>S. infantis</i> SK605	Villtype	Prof. Mogens Kilian
<i>S. mitis</i> B6	Villtype	Prof. Regine Hakenbeck
<i>E. coli</i> BTH101	Ekspresjonsvert	Euromedex
DH5 $\alpha$	Kloningsvert	Invitrogen
XL1-Blue	Kloningsvert	Agilent Technologies
Plasmider		
pKT25	For fusjonering av T25-domenet på N- terminus, Kan <sup>R</sup>	Euromedex
pKNT25	For fusjonering av T25-domenet på C- terminus, Kan <sup>R</sup>	Euromedex

---

pUT18C	For fusjonering av T18-domenet på N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Euromedex
pUT18	For fusjonering av T18-domenet på C-terminus, Amp <sup>R</sup>	Euromedex
pKT25-zip	Uttrykker T25 fusjonert til et leusin zipper domene, Kan <sup>R</sup>	Euromedex
pUT18C-zip	Uttrykker T18 fusjonert til et leusin zipper domene, Amp <sup>R</sup>	Euromedex
pUT18C-rodA	Uttrykker RodA med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Straume <i>et al.</i> (2017)
pKT25-mreD	Uttrykker MreD med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Straume D. (upublisert)
pKT25-stkP	Uttrykker StkP med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Stamsås <i>et al.</i> (2017)
pUT18C-stkP	Uttrykker StkP med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Stamsås <i>et al.</i> (2017)
pKT25-pbp1b	Uttrykker PBP1b med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Stamsås G.A. (Upublisert)
pUT18C-roaA	Uttrykker RoaA med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Stamsås G.A. (Upublisert)
pKT25-pbp2a	Uttrykker PBP2a med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Stamsås G.A. (Upublisert)
pKT25-PBP2x	Uttrykker PBP2x med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Straume <i>et al.</i> (2017)
pUT18C-ftsW	Uttrykker FtsW med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Stamsås G.A. (Upublisert)
pKT25-pbp2b	Uttrykker PBP2b med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Straume <i>et al.</i> (2017)
pUT18C-pbp2b	Uttrykker PBP2b med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Straume <i>et al.</i> (2017)
pUT18C-rodZ	Uttrykker RodZ med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Berg K.H. (Upublisert)

pKT25-divIVA	Uttrykker DivIVA med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Berg K.H. (Upublisert)
pKT25-pbp1a	Uttrykker PBP1a med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Berg K.H. (Upublisert)
pUT18C-ComM	Uttrykker ComM med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Berg K.H. (Upublisert)
pUT18C-flagComM	Uttrykker flagComM med T18-domenet fusjonert til sin N-terminus, Amp <sup>R</sup>	Denne oppgaven
pKT25-flagComM	Uttrykker flagComM med T25-domenet fusjonert til sin N-terminus, Kan <sup>R</sup>	Denne oppgaven

## 2.2 Peptidferomoner

**Tabell 2.2. Peptidferomoner.** Tabellen viser peptidferomonene brukt i arbeidet med denne oppgaven, deres aminosyresekvens og konsentrasjonen på stock-løsning.

Feromon	Aminosyresekvens (N→C)	Stock-konsentrasjon
CSP	EMRLSKFFRDFILQRKK	100 µg/ml
ComS	LPYFAGCL	500 µM

## 2.3 Primere

**Tabell 2.3. Primere.** Tabellen viser de ulike primerne brukt i arbeidet med denne oppgaven, sekvensene til disse, beskrivelse og referanse.

Primer	Sekvens	Beskrivelse	Referanse
479	TACGGAATTCCTAAAATGA GCGTAACAA	<i>comM</i> BACTH N term EcoRI.R	Stamsås, G.A. (upublisert)
DS101	GCCTTGAAAAAATACGTGC GC	Fwd <i>comM</i> P125A	Straume <i>et al.</i> (2017)
DS102	GCGCACGTATTTTTCAAG GCTAAAAAATCAGCAAA TCTAGCC	Rev <i>comM</i> P125A	Straume <i>et al.</i> (2007)

DS477	CTGTTTTGAGCAACCTGTGG	Sekvensering Fwd <i>comM</i> 150 bp Up	Denne oppgaven
DS478	CCAGTTAAGATTAAAACAT CATTC	Sekvensering Rev <i>comM</i> 150 bp Down	Denne oppgaven
DS479	GGTAGGAAGGGAGAGAGA AGATGGAAAAAATGAAAAA GCAAATTC	Fwd <i>comM</i> S. mitis B6	Denne oppgaven
DS480	CATCCATAAAAAACAGGCT TTCTTTAAAATAGAAACAG CAAGAAGAC	Rev <i>comM</i> S. mitis B6	Denne oppgaven
KHB430	TGGCACGACAGGTTTCCCG	Fwd pUT18C og pKT25	Berg, K.H. (upublisert)
KHB431	GCAAAAGCACCGCCGGAC	pKT25 rev	Berg, K.H. (upublisert)
KHB434	GAAAACCTCTGACACATGC AG	pUT18C rev	Berg, K.H. (upublisert)
KHB435	GAAAGCGGGCAGTGAGCG	Fwd + sekvensering pUT18C og pKT25	Berg, K.H. (upublisert)
KHB436	CAATGCCGCCGGTATTCC	Sekvensering pKT25	Berg, K.H. (upublisert)
KHB439	ACCGTGCATACGGCGTGG	Sekvensering pUT18C	Berg, K.H. (upublisert)
KHB457	CATTCAGGCTGCGCAACTG	Sekvensering pKT25	Berg, K.H. (upublisert)
KHB458	GAGACGGTCACAGCTTGTC	Sekvensering pUT18C	Berg, K.H. (upublisert)
MD1	GCACTTCTGATTTATATTG GACTGG	Fwd <i>comM</i> S162A	Denne oppgaven

---

MD2	CCAGTCCAATATAAATCAG AAGTGCGACAATGGTCATT GGATTTC	Rev <i>comM</i> S162A	Denne oppgaven
MD3	TTGTTGTTTTTTGCAGCCT ATCTTG	Fwd <i>comM</i> G170L	Denne oppgaven
MD4	CAAGATAGGCTGCAAAAAA CAACAACAGTCCAATATAA ATCAGAAGTG	Rev <i>comM</i> G170L	Denne oppgaven
MD5	TACGGGATCCCGATTATAA AGATGATGATGATAAAAT GAAATCAATGAGAATCTT ATTTTTG	Fwd <i>flag-comM</i> i BACTH	Denne oppgaven
MD6	CTTCTCTCTCCCTTCCTACC	Rev <i>comM</i> 1000 bp up	Denne oppgaven
MD7	AGAAAGCCTGTTTTTTATG GATG	Fwd <i>comM</i> 1000 bp down	Denne oppgaven
MD8	GGTAGGAAGGGAGAGAGA AGATGAAAGAGAAAATA TGTGGAAAG	Fwd <i>spr0265</i> MD6 comp	Denne oppgaven
MD9	CATCCATAAAAAACAGGC TTTCTTTACACAGAAATTC CTAATGTCC	Rev <i>spr0265</i> MD7 comp	Denne oppgaven
MD10	GCTGCTATCTTGTGTCGTG GGATTATTC	Fwd <i>spr0265</i> EE → AA	Denne oppgaven

---

---

MD11	GAATAATCCCACGACACA AGATAGCAGCACAAATCG GAGCAAGCAAGG	Rev <i>spr0265</i> EE → AA	Denne oppgaven
MD12	CAGCAGATCTTGTGTCGT GGGATTATTC	Fwd <i>spr0265</i> EE → QQ	Denne oppgaven
MD13	GAATAATCCCACGACACAA GATCTGCTGACAAATCGGA GCAAGCAAGG	Rev <i>spr0265</i> EE → QQ	Denne oppgaven
MD14	GGTAGGAAGGGAGAGAGA AGATGGAAAAAGTCATAA AATCAATTC	Fwd <i>comM S</i> , <i>infantis</i> MD6 comp	Denne oppgaven
MD15	CATCCATAAAAAACAGGC TTTCTTTACCATAGGAGGA ACGTACAG	Rev <i>comM S</i> . <i>infantis</i> MD7 comp	Denne oppgaven
MD16	GGTAGGAAGGGAGAGAGA AGATGAGAAAGATAAAAA ATATTCTTC	Fwd <i>comM S</i> . <i>anginosus</i> MD6 comp	Denne oppgaven
MD17	CATCCATAAAAAACAGGCT TTCTTTACCAAAAAATAATC AAGAAAAGAAG	Rev <i>comM S</i> . <i>anginosus</i> MD7 comp	Denne oppgaven
MD18	GGTAGGAAGGGAGAGAGA AGATGAGGCTCACATTTCA AAAATC	Fwd <i>comM S</i> . <i>cristatus</i> MD6 comp	Denne oppgaven

---

MD19	CATCCATAAAAAACAGGCT TTCTTTACAAACAGAAAGG CAAAAGG	Rev <i>comM</i> <i>S. cristatus</i> MD7 comp	Denne oppgaven
TH021	ATGAAATCAATGAGAATCT TATTTTTG	Fwd <i>comM</i>	Omran, A.T. (2013)
TH022	CTAAAAGAAAATGAGCGTA ACAATG	Rev <i>comM</i>	Omran, A.T. (2013)
TH023	CAAAAATAAGATTCTCATT GATTTTCATCTTCTCTCTCC CTTCCTAC	Rev <i>comM</i> 1000 bp Up	Omran, A.T. (2013)
TH024	CATTGTTACGCTCATTTTC TTTTAGAGAAAGCCTGTT TTTTATGGATG	Fwd <i>comM</i> 1000 bp Down	Omran, A.T. (2013)
VE109	GACCGACTTACCTTGAAT GGA	Fwd <i>comM</i> 1000 bp Up	Eldholm <i>et al.</i> (2009)
VE112	TGCCCCACGCTCTTGG	Rev <i>comM</i> 1000 bp Down	Eldholm <i>et al.</i> (2009)

## 2.4 Antibiotika

**Tabell 2.4. Antibiotika.** Tabellen viser antibiotika brukt i arbeidet med denne oppgaven, konsentrasjonen av stock-løsninger, produsent og produktnummer.

Antibiotika	Stock-konsentrasjon	Produsent	Produktnummer
Ampicillin	100 mg/ml	Sigma-Aldrich	A-9518
Kanamycin	100 mg/ml	Sigma-Aldrich	K4000
Streptomycin	100 mg/ml	Sigma-Aldrich	S6501



## 2.5 Enzymer, enzymbufferer, molekylvektstandarder og nukleotider

**Tabell 2.5. Enzymer, enzymbufferer, molekylvektstandarder og nukleotider.** Tabellen viser enzymer, enzymbufferer, molekylstandarder og nukleotider brukt i arbeidet med denne oppgaven, med stock-konsentrasjon, produsent og produktnummer.

<b>Produkt</b>	<b>Stock-konsentrasjon</b>	<b>Produsent</b>	<b>Produktnummer</b>
1 kb DNA ladder	500 µg/ml	New England Biolabs	N3232
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	10 U/µl	New England BioLabs	M0290
BamHI-HF <sup>®</sup>	20 U/µl	New England BioLabs	R3136
Color Prestained Standard, Broad Range (11-245 kDa)	0,2 mg/ml	New England BioLabs	P7712
EcoRI-HF <sup>®</sup>	20 U/µl	New England BioLabs	R3101
dNTPs	10 µM	Promega	U1511
NEBuffer 4	10X	New England BioLabs	B7004
One Taq <sup>®</sup> DNA Polymerase	5 U/µl	New England BioLabs	M0480
One Taq <sup>®</sup> Standard Reaction Buffer	5X	New England BioLabs	B9022
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/µl	New England BioLabs	M0530
Phusion <sup>®</sup> HF Buffer	5X	New England BioLabs	B0518
T4 DNA ligase	400 U/µl	New England BioLabs	M0202
T4 DNA ligase buffer	10X	New England BioLabs	B0202
Quick Ligation <sup>™</sup> Ligase		New England BioLabs	M2200
Quick Ligation <sup>™</sup> Standard Buffer	2X	New England BioLabs	M2200

## 2.6 Kjemikalier

**Tabell 2.6. Kjemikalieliste.** Oversikt over kjemikalier brukt i denne oppgaven, kjemiske formler, produsent og produktnummer.

<b>Kjemikalie</b>	<b>Kjemisk formel</b>	<b>Produsent</b>	<b>Produktnummer</b>
β-mercaptoetanol	$C_{22}H_6OS$	Sigma	M6250
Adenosin 99%	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	Sigma	A9251
Agar		VWR	20767.298
Agarose		Invitrogen	16-550-100
Akryl/Bis™	$C_3H_5NO$	VWR	0311-500ML
Aktivt kull	C	Merck	1.02182.1000
Albumin/BSA		Sigma-Aldrich	A7906
Ammoniumpersulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma	A3678-25G
Bacto™ Casitone		BD and Company	225930
Bacto™ Todd Hewitt Broth		BD and Company	249240
Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma	19606
Bromfenolblå	$C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	Sigma	B-5525
Celitt	$SiO_2$	Acros Organics	206352500
Coomassie Brilliant Blue	$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$	Sigma	B-7920
di-kaliumhydrogenfosfat	$K_2HPO_4$	Merck	1.05104.1000
Dimetylsulfoksid (DMSO)	$(CH_3)_2SO$	Sigma-Aldrich	D5879
Eddiksyre	$CH_3COOH$	Merck	1.00063.2500
Etylendiamintetraacetat (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	VWR	20.296.360
Gjærekstrakt granulert		Merck	1.03753.0500
Glassull		Merck	1.04086.0250
Glukose	$C_6H_{12}O_6$	VWR	97061-164
Glyserol	$C_3H_5(OH)_3$	Sigma	49781
Glysin	$C_2H_5NO_2$	Merck	1.04201.1000

Isopropyl $\beta$ -D-tiogalaktopyranosid (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	AppliChem	A1008.0005
Jern(II)sulfat heptahydrat	$FeO_4S \cdot 7H_2O$	Fluka	44970
Kaliumklorid	KCl	Merck	1.04936.0500
Kalsiumklorid anhydrid	$CaCl_2$	Fluka	21075
Kalsiumpantotenat	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	Sigma	C8731
Kobbersulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Fluka	61240
Kolinklorid	$C_5H_{14}ClNO$	Sigma	C1879
L-Aspargin monohydrat	$C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	A8381
L-Cystein hydrogenklorid monohydrat	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Fluka	30130
L-Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	Fluka	49419
L-Tryptofan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Fluka	93660
Magnesiumklorid heksahydrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Merck	1.05833.0250
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Sigma	M2643
Mangan(II)klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Riedel-de Haën	31422
Metanol	$CH_3OH$	Merck	1.06009.2500
N,N,N',N'-Tetrametyl etylendiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Sigma	P8574
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	VWR	27650.292
Natriumklorid	NaCl	Merck	1.06404.1000
Natriumhydroksid	NaOH	Merck	1.06469.1000
Natriumpyruvat	$C_3H_3NaO_3$	Sigma-	P8574
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	Fluka	72309
PeqGREEN		VWR	732-3196
Pyridoksin hydrogenklorid	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	Fluka	95180
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Sigma-Aldrich	R-7649
Saltsyre 37%	HCl	Merck	1.00317.2500
SDS ultrapure	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	AppliChem	A1112.1000

Sinksulfat heptahydat	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	Fluka	96500
Sukrose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	BHD	102754C
Sytox®		Invitrogen	S7020
Tiamin hydroklorid	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> OS*HCl	Sigma	67038
Trizma® base	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Sigma	T1503-1KG
Tryptone		Oxoid	LP0042
Tween20		BioRad	1706531
Tørrmelk (fettfri)		Merck	1.15363.0500
Uridin 99%	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	Sigma	U3750
X-gal (5-brom-4-klor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid)	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich	B4252

## 2.7 Antistoff

**Tabell 2.7. Antistoff.** Tabellen viser antistoffene som ble brukt i arbeidet med denne oppgaven, med biologisk kilde, produsent og produktnummer.

Antistoff	Biologisk kilde	Produsent	Produktnummer
ANTI-FLAG®	Kanin	Sigma-Aldrich	F7425-.2MG
Anti-kanin HRP	Geit	Sigma-Aldrich	GERPN4301

## 2.8 Kit

**Tabell 2.8. Kit.** Tabellen viser kittene brukt i arbeidet med denne oppgaven, deres bruksområde og produsent.

Kit	Bruksområde	Produsent
Nucleospin® Gel and PCR clean-up	Rensing av DNA fra agarosegel	Macherey-Nagel
Nucleospin® Plasmid (No lid)	Isolering av plasmid	Macherey-Nagel
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Substratløsning Western Blot	Thermo Scientific

## 2.9 Utstyr og instrumenter

**Tabell 2.9. Utstyr og instrumenter.** Tabellen viser en oversikt over utstyr og instrumenter brukt i arbeidet med denne oppgaven, modell og produsent.

<b>Utstyr/Instrument</b>	<b>Modell</b>	<b>Produsent</b>
Anaerob dyrkningspose	AnaeroGen™	Oxoid
Autoklav	cv-el 12L/18L	Certoclav
Avanti sentrifuge	J-26 XP	Beckman Coulter®
Beholder for anaerob dyrking		Oxoid
Bordsentrifuge I	5424	Eppendorf
Bordsentrifuge II	5415 R	Eppendorf
Bordsentrifuge III	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Bordsentrifuge IV	5430 R	Eppendorf
Bordsentrifuge PCR-rør	Ministar silverline	VWR
Elektroforesekar agarose gelelektroforese	Mini-Sub Cell® GT	BioRad
Elektroforesekar SDS-PAGE	Mini PROTEAN® Tetra Cell	Biorad
Engangskyvetter (1,5 ml)	759015	Brand
Fast Prep	Fast prep 24	MPT™
Filter (0,2 µM)		Sarstedt
Filter Western Blot	Whatman Gel Blotting Paper	Sigma-Aldrich
Fotoprinter	P91	Mitsubishi
Geldokumentasjonssystem agarosegel	Gel Doc-1000	BioRad
Geldokumentasjonssystem SDS-PAGE gel	c400	Azure biosystems
Glasskuler, syrevasket	G1145	Sigma
Inkubator		Termaks
Inkubator med risting	Multitron Standard	Infors HT
Inokuleringslupe	86.1562.010	Sarstedt
Magnetrører	MR 3001 K	Heidolph
Mikrobølgeovn	MWO0602	Whirlpool
Mikroskop	LSM 700	Zeiss
Mikrotiterplate	Corning® 96 Well NBS™ - 3651	Corning

---

Mikrotiterplateleser	Synergi H1 Hybrid Reader	BioTek
Nanodrop	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
pH-meter	PHM210	MeterLab®
PCR-maskin I	PTC-100	MJ Research Inc.
PCR-maskin II	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Pipetter	Finnpipetter (0,5-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml)	Thermo Scientific
Pipettespisser		VWR
PVDF-membran	Immun-Blot® PVDF Membrane	BioRad
Skalpell		
Spektrofotometer	Novaspec® II	Pharmacia Biotech
Sprøyte til sterilfiltrering		BD Plastipac
Sterilbenk		KEBO productions
Strømforsyning til gelelektroforese I	PowerPac 200	BioRad
Strømforsyning til gelelektroforese II	PowerPac 300	BioRad
Vannbad I	7A	Julabo
Vannbad II	19	Julabo
Vannbad III		GFL
Vekt (0,0001 g – 200 g)	CP124S	Sartorius
Vippebord		Edmund Bühler
Vortex	Press-to-mix 34524	Snijders
Western Blotter	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad

---

## 2.10 Programvare

**Tabell 2.10 Programvare.** Tabellen viser en oversikt over programvaren som ble benyttet i arbeidet med denne oppgaven, med bruksområde og webadressen disse er tilgjengelig fra.

<b>Programvare</b>	<b>Bruksområde</b>	<b>Tilgjengelig fra</b>
BLAST	Sekvenssammenstillinger	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Chromas	Analysere kromatogrammer etter sekvensering	<a href="http://technelysium.com.au/wp/chromas/">http://technelysium.com.au/wp/chromas/</a>
Clustal Omega	Multiple sekvens-sammenstillinger	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
ExPASy Translate tool	Oversette nukleotidesequenser til proteinsequenser	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>
I-TASSER	Prediksjon av proteinstruktur og proteinfunksjon	<a href="http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/">http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/</a>
Jmol	Visualisering av proteinstruktur i 3D	<a href="http://jmol.sourceforge.net/">http://jmol.sourceforge.net/</a>
OCTOPUS	Prediksjon av membranprotein topologi	<a href="http://octopus.cbr.su.se/">http://octopus.cbr.su.se/</a>
Reverse Complement	Reverskomplementere DNA-sequenser	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>

## 2.11 Vekstmedium

**Tabell 2.11. 1.5% Todd-Hewitt (TH)-agar**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
Bacto™ Todd-Hewitt Broth	15 g
Agar	7,5 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	500 ml

**Tabell 2.12. 1.5% Luria-Bertani (LB)-agar**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
Tryptone	5 g
Natriumklorid	5 g
Gjærekstrakt	5 g
Agar	7,5 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	500 ml

Løsningene i tabell 2.11 og 2.12 ble autoklavert ved 121°C i 15 minutter. Løsningen ble deretter avkjølt til 55°C, før ønskede antibiotikum ble tilsatt, og agaren fordelt i petriskåler. For å lage LB/X-gal skåler til bruk til BACTH-eksperimenter, ble løsningen med LB-agar nedkjølt til 55°C etter autoklaving og tilsatt X-gal (40 µg/ml), IPTG (0,5 mM), kanamycin (50 µg/ml) og ampicillin (100 µg/ml) før den ble fordelt i petriskåler. X-gal ble løst i 1 ml DMSO og IPTG ble løst i 1 ml dH<sub>2</sub>O før disse ble tilsatt løsningen.

**Tabell 2.13. Luria-Bertani (LB)-medium.**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
Tryptone	10 g
Natriumklorid	10 g
Gjærekstrakt	10 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	1 l

Løsningen ble autoklavert ved 121°C i 15 minutter. Løsningen ble deretter oppbevart ved romtemperatur.



**Tabell 2.14. SOC-medium.**

<b>Reagenser</b>
0,5% Gjærekstrakt
2% Tryptone
10 mM Natriumklorid
2,5 mM Kaliumklorid
20 mM Magnesiumsulfat
20 mM Glukose

Reagensene i tabell 2.14, med unntak av glukose, ble blandet og autoklavert ved 121°C i 15 minutter. Glukose ble tilsatt når løsningen hadde blitt avkjølt til 55°C.

**Tabell 2.15. Pre C-medium**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
L-Cystein HCl	22,5 mg
Natriumacetat	4 g
Bacto™ Casitone	10 g
L-tryptofan	12 mg
Di-kaliumfosfat	17 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	2 l

Løsningen ble autoklavert ved 121°C i 15 minutter.

**Tabell 2.16. Gjærekstrakt**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
Gjærekstrakt	40 g
dH <sub>2</sub> O	360 ml
37% Saltsyre	6 ml
Aktivt kull	16 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	400 ml

Gjærekstrakt ble løst i dH<sub>2</sub>O og pH ble justert til 3,0 ved bruk av 5 M HCl. Aktivt kull ble tilsatt løsningen, før den ble satt til røring i 10 minutter. Deretter ble løsningen inkubert ved 4°C i to timer. Løsningen ble filtrert gjennom celitt, pH-justert til 7,8 med 5 M NaOH før totalvolumet ble justert til 400 ml med dH<sub>2</sub>O. Den ferdige løsningen ble filtrert gjennom 0,2 µm filtere, alikvotert og lagret ved -80°C.

**Tabell 2.17. ADAMS I.**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
0,5 mg/ml Biotin	0,15 ml
Nikotinsyre	75 mg
Pyridoksin hydroklorid (4°C)	87,5 mg
Kalsiumpantotenat (4°C)	300 mg
Thiamin hydroklorid	80 mg
Riboflavin	35 mg
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	500 ml

Løsningen ble deretter justert til pH 7 og sterilfiltrert.

**Tabell 2.18. 10X ADAMS II.**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
Jern(II)sulfat heptahydrat	500 mg
Kobbersulfat pentahydrat	500 mg
Sinksulfat heptahydrat	500 mg
Mangan(II)klorid tetrahydrat	200 mg
Konsentrert saltsyre	10 ml
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	100 ml

Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart ved 4°C.

**Tabell 2.19. ADAMS III.**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
ADAMS I	128 ml
10X ADAMS II	3,2 ml
Aspargin monohydrat	1,6 g
Kolinklorid	160 mg
Kalsiumklorid anhydrid	0,4 g
Magnesiumklorid heksahydrat	16 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	800 ml

Løsningen ble deretter justert til pH 7,6 og sterilfiltrert.

**Tabell 2.20. C-medium.**

<b>Reagenser</b>	<b>Volum</b>
0,4 mM Mangan(II)klorid	150 µl
20% Glukose	1,5 ml
ADAMS III	3,75 ml
3% Glutamin	110 µl
2% Natriumpyruvat	2,5 ml
1,5 M Sukrose	95 µl
2 mg/ml Uridin adenosin	1,5 ml
8% Albumin/BSA	1,5 ml
Gjærekstrakt	3,75 ml

Reagensene over tilsettes i 150 ml autoklavert pre C-medium

C-medium måtte være ferskt ved bruk, og det ble derfor laget nytt medium hver dag ved behov for dette mediet.

## 2.12 Buffere og løsninger

### Tris-HCl

1 M Tris-HCl (pH 7,4) ble laget ved at 30,29 g Trizma® base ble løst i 200 ml dH<sub>2</sub>O. Løsningen ble justert med HCl til pH 7,4 ved bruk av et pH-meter og etterfylt med dH<sub>2</sub>O til sluttvolum 250 ml.

### EDTA

0,5 M EDTA (pH 8,0) ble laget ved at 18,61 g EDTA ble løst i 60 ml dH<sub>2</sub>O. Løsningen ble justert med 5 M NaOH til pH 8,0 ved bruk av et pH-meter og etterfylt med dH<sub>2</sub>O til sluttvolum 100 ml.

### CaCl<sub>2</sub>

0,1 M CaCl<sub>2</sub> ble laget ved at 5,55 g CaCl<sub>2</sub> ble løst i dH<sub>2</sub>O til sluttvolum 500 ml. Løsningen ble oppbevart ved 4°C til den skulle brukes.

### 2.12.1 Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese

Tabell 2.21. 6X Appliseringsbuffer.

Reagenser
40% Sukrose
10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA (pH 8,0)
~ 0.002 g Bromfenolblå

**Tabell 2.22. 50X TAE-buffer.**

<b>Reagenser</b>	<b>Mengde</b>
Trizma base	242 g
dH <sub>2</sub> O	750 ml
Eddiksyre	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	1 l

Trizma base ble løst i 750 ml dH<sub>2</sub>O, før resten av reagensene ble tilsatt og totalvolumet ble justert med dH<sub>2</sub>O til 1 l. Bruksløsning av TAE-buffer var 1X, og denne ble laget ved å fortynne 20 ml av stock-løsningen (50X) i 980ml dH<sub>2</sub>O. Sluttkonsentrasjonene i bruksløsningen ble da 40 mM Tris-acetat og 1 mM EDTA.

**Tabell 2.23. 1 kb DNA-ladder (New England BioLabs).**

<b>Reagenser</b>	<b>Volum</b>
500 µg/ml 1 kb DNA-ladder	100 µl
6X Appliseringsbuffer	100 µl
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	600 µl

### 2.12.2 Buffere og løsninger til SDS-PAGE

**Tabell 2.24. 2X SDS-prøvebuffer.**

<b>Reagenser</b>
125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
4% SDS
150 mM β-mercaptoetanol
20% Glyserol
Et korn Bromfenolblå

**Tabell 2.25. 10X Tris-glysin løpebuffer.**

Reagenser	Mengde
Trizma® base	30,3 g
Glysin	14,4 g
SDS	10 g
Totalvolum justert med dH <sub>2</sub> O	1 l

**SDS**

10% SDS ble laget ved å løse 10 g SDS i dH<sub>2</sub>O til totalvolum 100 ml. Løsningen ble oppbevart ved romtemperatur.

**APS**

10% APS ble laget ved å løse 0,03 g APS i 300µl dH<sub>2</sub>O.

**Geler SDS-PAGE****Tabell 2.26. Seperasjonsgel (til 2 geler).**

Reagenser	8%	10%	12%	15%	18%
ddH <sub>2</sub> O	5,3 ml	4,78 ml	4,3 ml	3,55 ml	2,8 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
40% akrylamid + 0.8% bis-akrylamid	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,75 ml	4,5 ml
10% APS*	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED*	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Totalvolum	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

\* Tilsettes til slutt fordi polymeriseringen starter når disse tilsettes.

**Tabell 2.27. Stacking gel (til 2 geler).**

<b>Reagenser</b>	<b>4%</b>
ddH <sub>2</sub> O	3,15 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
40% akrylamid + 0.8% bis-akrylamid	0,5 ml
10% APS*	0,05 ml
TEMED*	5 µl
Bromfenolblå	~ 0,05 ml
Totalvolum	5 ml

\* Tilsettes til slutt fordi polymeriseringen starter når disse tilsettes.

### 2.12.3 Løsninger til Coomassie-farging

**Tabell 2.28. Coomassie blue fargeløsning.**

<b>Reagenser</b>	<b>Volum</b>
0,2% Coomassie Brilliant Blue	1 ml
7,5% eddiksyre	37,5 ml
50% metanol	250 ml
dH <sub>2</sub> O	211,5 ml
Totalvolum	500 ml

**Tabell 2.29. Avfargingsløsning.**

<b>Reagenser</b>	<b>Volum</b>
7,5% eddiksyre	37,5 ml
50% metanol	250 ml
dH <sub>2</sub> O	212,5 ml
Totalvolum	500 ml

## 2.12.4 Løsninger og buffere til Western Blot

Tabell 2.30. 1X Overføringsbuffer.

Reagenser
25 mM Trizma® base
10% Metanol
192 mM Glysin

Tabell 2.31. TBS-Tween

Reagenser
25 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
0,05% Tween20

### Blokkeringsløsning

5% tørrmelksløsning ble laget ved å løse 5 g tørrmelkspulver i 100 ml TBS-Tween.



## 3 Metoder

### 3.1 Kultivering og oppbevaring av bakteriestammer

#### 3.1.1 Kultivering av *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* ble dyrket i dagsferskt C-medium (Lacks & Hotchkiss 1960) ved 37°C på vannbad. Seleksjon av *S. pneumoniae* transformanter ble gjort på Todd Hewitt (TH) agar som inneholdt passende antibiotikum (400 µg/ml kanamycin eller 200 µg/ml streptomycin). Platene ble dyrket anaerobt ved 37°C. I flytende medium ble sterile reagensrør med lufttett kork benyttet for å holde miljøet anaerobt, mens anaerobe AnaeroGen™ poser (Oxoid) ble plassert i en lufttett beholder ved vekst på TH agar-plater. Transformanter av *S. pneumoniae* ble verifisert ved hjelp av PCR-teknikker og DNA sekvensering. Ved dyrking av *S. pneumoniae* i flytende medium var det viktig å unngå at cellene gikk lenge i stasjonær vekstfase, da dette kunne resultere i at cellene autolyserte grunnet aktivering av autolysinet LytA.

#### 3.1.2 Kultivering av *E. coli*

I dette arbeidet ble stammer av *E. coli* dyrket i flytende Luria-Bertani (LB) medium eller på plater med LB-agar, tilsatt antibiotika i vekstmediet etter behov (50 µg/ml kanamycin og/eller 100 µg/ml ampicillin). Flytende medium ble benyttet ved poding fra frysestock-kulturer og plukking av transformanter, mens LB-agar ble benyttet ved transformasjon. For optimal vekst ble stammer av *E. coli* dyrket aerobt ved 37°C. Et aerobt miljø ble opprettholdt i flytende medium ved bruk av reagensglass uten lufttett kork og i en inkubator med risting ved 200 rpm, mens agar-plater ble oppbevart i en inkubator med kun en plastpose rundt seg for å hindre uttørking av agaren. Transformanter av *E. coli* ble verifisert ved hjelp av PCR og DNA sekvensering. Ved bruk av BACTH-systemet (se seksjon 3.8) vokste stammene på plater med LB-agar tilsatt 40 µg/ml X-gal, 0,5 mM IPTG, 50 µg/ml kanamycin og 100 µg/ml ampicillin, og ble inkubert overnatt ved 30°C.

#### 3.1.3 Oppbevaring av bakteriestammer

Det ble laget en frysestock av alle stammer som ble benyttet eller konstruert i denne oppgaven, og startkulturer etter behov. Frysestock ble laget i cryorør (1,5 ml) og startkulturer ble laget i

sterile reagensrør med lufttett kork (15 ml), begge med 15% (v/v) glyserol, og stammene ble systematisk merket for senere bruk. Både frysestock og startkulturer ble lagret ved -80°C.

## 3.2 Transformasjon

### 3.2.1 Transformasjon av *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* mutanter ble laget ved å transformere bakterien med ulike DNA-kassetter generert ved hjelp av PCR. Siden *S. pneumoniae* er naturlig kompetent, ble DNA transformert inn i bakterien ved å indusere cellene til naturlig kompetanse med det kompetansestimulerende peptidet CSP (Johnsborg & Håvarstein 2009). DNA som tas opp i cellen vil integreres inn i genomet via homolog rekombinasjon. Ulike versjoner av *comM* ble transformert inn i stammen RH420. Denne stammen har en Janus-kassetten (se seksjon 3.2.1.2) satt inn i *comM*-lokuset. Janus-kassetten kan erstattes med ulike *comM*-versjoner, via negativ seleksjon.

#### 3.2.1.1 Protokoll for transformasjon hos *S. pneumoniae*

1. RH420 celler ble resuspendert i ferskt C-medium til  $OD_{550} = 0,05 - 0,1$ .
2. Sterile eppendorfrør ble tilsatt 1,25 ml 0,1 mg/ml CSP ( $250 \text{ ng ml}^{-1}$ ), 5  $\mu\text{l}$  (ble justert om nødvendig etter DNA-konsentrasjonen) av DNA-fragmentet som skulle transformeres inn i cellene og 500  $\mu\text{l}$  av bakteriestammen som skulle transformeres. Et parallelt rør uten DNA ble brukt som negativ kontroll.
3. Prøvene og den negative kontrollen ble dyrket på vannbad ved 37°C i to timer.
4. Transformanter fra 30  $\mu\text{l}$  cellekultur ble selektert for på TH-agar plater tilsatt 200  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin.
5. Agar-platene ble deretter inkubert anaerobt ved 37°C over natt i en lufttett beholder som inneholdt en anaerogen pose fra Oxoid.
6. Transformanter ble verifisert ved hjelp av PCR og dyrket opp i C-medium med passende antibiotikum som beskrevet i seksjon 3.1.1.
7. Transformantene ble deretter verifisert ved å sekvensere *comM*-genet.

### 3.2.1.2 Negativ seleksjon ved bruk av Janus-kassetten

Janus-kassetten er en *rpsL* kassett som kan brukes til utbytting av gener hos *S. pneumoniae* via negativ seleksjon. *S. pneumoniae* er naturlig resistent mot antibiotikumet streptomycin, mens Janus-kassetten inneholder et dominant allel for sensitivitet mot streptomycin. Ved å bytte ut et gen ved å sette inn Janus-kassetten i stedet for dette vil cellene bli sensitive ovenfor streptomycin. Ved deretter å bytte ut Janus-kassetten med en versjon av det opprinnelige genet, vil cellene igjen bli resistente mot streptomycin (Sung et al. 2001). Dette kan utnyttes ved at transformanter av en stamme med innsatt Janus-kassett blir dyrket på agarskåler med tilsatt streptomycin. Dersom transformantene vokser opp er transformasjonen vellykket.

### 3.2.2 Transformasjon av *E. coli*

I denne oppgaven ble *E. coli* benyttet som kloningsvert, og for å teste protein-protein interaksjoner med et system kalt BACTH (se seksjon 3.8).

*E. coli* ble transformert ved å utsette kjemisk kompetente celler (se seksjon 3.2.2.2) for varmesjokk (heat shock method). Metoden er enkel og regnes som et molekylærbiologisk basisverktøy. Prinsippet bak metoden er at DNA, vanligvis et plasmid, blir tatt opp av bakterien når den utsettes for stress i form av høy temperatur (Froger & Hall 2007). For å studere protein-protein interaksjoner ved å bruke BACTH-systemet (se seksjon 3.8), ble utvalgte gener fra *S. pneumoniae* klonet i en leseramme med T25- eller T18-kodende sekvens i BACTH-plasmidene pKT25 og pUT18C (se tabell 3.1). De resulterende plasmidene ble så transformert inn i kloningsverten *E. coli* DH5 $\alpha$  eller XL1-Blue. Grunnen til at det ikke ble brukt samme stamme for transformering av begge plasmidene var at noen T18-fusjoner ikke lot seg transformere inn i DH5 $\alpha$  uten problemer (muteringer, sjekket ved sekvensering). Videre ble plasmidene isolert fra kloningsvertene, og et T25- og et T18-plasmid ble co-transformert inn i BACTH-ekspressjonsverten *E. coli* BTH101.

### 3.2.2.1 Protokoll for varmesjokk-transformering

1. Kjemisk kompetente celler ble tint på is.
2. Et volum på 50  $\mu$ l kompetente celler ble tilsatt plasmid (10  $\mu$ l for plasmidligeringer og 1  $\mu$ l for rensset plasmid). Prøvene ble blandet forsiktig ved å «tappe» på røret, og deretter inkubert på is i 1 time.
3. Varmesjokk ble utført ved å inkubere prøvene i vannbad ved 42°C i 30 sekunder.
4. Etter varmesjokk ble prøvene satt direkte på is og inkubert i 1 minutt før de ble tilsatt 450  $\mu$ l SOC-medium.
5. Prøvene ble deretter inkubert ved 37°C i 1 time med risting (200 rpm).
6. For transformasjoner med plasmidligeringer, ble hele transformasjonsvolumet sådd ut på LB-agar med passende antibiotika. For transformasjon med rensset plasmid ble 30  $\mu$ l platet ut.
7. Platene ble deretter inkubert aerobt overnatt ved 37°C i en plastpose som skulle hindre platene i å tørke ut.
8. Transformantene ble verifisert ved hjelp av PCR på samme måte som beskrevet for transformanter av *S. pneumoniae* (se seksjon 3.2.1.1).
9. Transformanter ble dyrket i LB-medium ved 37°C og 200 rpm risting.
10. Alle plasmider ble til slutt verifisert ved sekvensering.

### 3.2.2.2 Protokoll for å lage kjemisk kompetente *E. coli* ved bruk av CaCl<sub>2</sub>

1. Fem ml av stammen som skulle gjøres kompetent ble dyrket overnatt i LB-medium.
2. Overnatt-kulturen ble deretter fortynt i LB-medium til en slutt-OD<sub>600</sub> = 0,05 – 0,1.
3. Cellene ble deretter dyrket til OD<sub>600</sub> ~ 0,4 (tidlig log-fase), og høstet ved 5000 x g i 5 minutter ved 4°C. Det var viktig at cellene etter sentrifugering ble holdt på is i alle de resterende trinnene.
4. Cellene ble resuspendert i et halvt kulturvolum av sterilfiltrert 0.1 M iskald CaCl<sub>2</sub>, og deretter inkubert i 1 – 2 timer på is.
5. Cellene ble deretter høstet som beskrevet i trinn 4, og resuspendert i 0,1X kulturvolum med 0,1 M iskald CaCl<sub>2</sub>.
6. De kompetente cellene ble tilsatt iskald steril glyserol til sluttkonsentrasjon 15 % (v/v), og lagret ved -80°C.

### 3.3 Polymerase kjedereaksjon (polymerase chain reaction, PCR)

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en av de mest brukte metodene innenfor medisinsk og biologisk forskning, og siden metodens utvikling på 1970-80-tallet har den fått stadig nye bruksområder. PCR ble raskt en døråpner for ny forskning innenfor blant andre felt som molekylær genetik, molekylær systematikk, molekylær epidemiologi og rettsmedisin, og hadde en vesentlig rolle i ferdigstillingen av det humane genom-prosjektet (Singh et al. 2014). Hovedprinsippet bak PCR er at små mengder av et bestemt DNA-fragment blir enzymatisk amplifisert, slik at det genereres mange kopier. Drivkraften bak denne metoden er repeterende (sykliske) temperaturendringer, som utføres ved hjelp av en PCR-maskin (thermocycler). En PCR-maskin endrer temperaturen automatisk etter et program som innstilles før bruk. For å utføre en PCR-reaksjon trengs det et DNA-templat, som er den sekvensen det er ønskelig å amplifisere, primere som er spesifikke for det fragmentet som skal kopieres, en termostabil DNA-polymerase, en buffer spesifikk for DNA-polymerasen som benyttes, og de fire deoxynukleosid trifosfatene (dNTPer) dATP, dTTP, dGTP og dCTP, som polymerasen bruker som byggesteiner for å syntetisere DNA.

PCR deles inn i tre hovedtrinn:

1. Denaturering: PCR-blandingen varmes opp til rundt 94-98°C, slik at det dobbelttrådede DNA-molekylet separeres til to enkelttråder.
2. Hybridisering (annealing): Temperaturen senkes til rundt 55-65°C, slik at primere med komplementære sekvenser til DNA-templatet man ønsker å amplifisere hybridiserer med templatet.
3. Elongering: Temperaturen økes til 72°C, slik at DNA-polymerasen syntetiserer nytt DNA ved hjelp av dNTPer.

De tre trinnene gjentas 25-35 ganger, avhengig av hvor mye produkt man ønsker, og fordi antall DNA-fragmenter dobles ( $2^n$ ) i hver syklus vil man til slutt sitte igjen med veldig mange kopier av utgangstemplatet.

### 3.3.1 Primerdesign og fortykning av primere

For hver PCR-reaksjon trengs det to primere som er spesifikke for nettopp den DNA-sekvensen som skal amplifiseres; en som er komplementær med starten av sekvensen som skal kopieres opp (forover) og en som er reverskomplementær med slutten av sekvensen (revers). Ved design av primere er det viktig å lage lange nok primere til at de er spesifikke, slik at de binder på riktig sted, men ikke for lange slik at de ikke vil hybridisere godt nok til templatet. Primere har derfor som oftest en lengde på 18-24 baser, avhengig av blant annet GC-innhold. Et GC-innhold på mellom 40-60% er mest ønskelig for å lage gode primere (Singh et al. 2014), som har et smeltepunkt mellom 55-65°C. Smeltepunktet til en primer bestemmer ved hvilken temperatur den vil hybridisere til templatet, og dette kan beregnes ved formelen:  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ . For å unngå dannelse av primer-dimerer og hårnålstrukturer bør sekvenser som er komplementære til seg selv eller andre primere i blandingen unngås ved design av primere (Singh et al. 2014).

Primerne som ble designet i denne oppgaven ble laget med hensyn på at de skulle ha en hybridiseringstemperatur på 58-60°C, og ble bestilt fra Thermo Scientific. Når primerne ankom fra leverandør ble de løst i dH<sub>2</sub>O til en stock-konsentrasjon på 100 µM. Brukskonsentrasjonen for primerne var 10 µM.

### 3.3.2 PCR ved bruk av Phusion DNA-polymerase

Når det er ønskelig å bruke et produkt fra PCR-reaksjonen videre i senere eksperimenter bør DNA-polymerasen gjøre så få feil som overhodet mulig. Til dette formålet ble det i denne oppgaven benyttet Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-polymerase (NEB). Denne DNA-polymerasen har en feilrate som er 50 x lavere enn *taq* DNA-polymerase, noe som gjør den godt egnet til dette formålet. Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-polymerase har polymeraseaktivitet i 5' → 3', eksonukleaseaktivitet i 3' → 5', og vil gi produkter med butte ender. En annen stor fordel med denne DNA-polymerasen er at den har hurtig polymeriseringskapasitet, kun 15 sekunder per 1 kb dersom templatene er PCR-produkter, noe som fører til at PCR-reaksjonen trenger kortere elongeringstrinn enn ved bruk av andre DNA-polymeraser (NewEnglandBioLabs 2017b). I arbeidet med denne oppgaven ble Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity

DNA-polymerase brukt ved utførelse av konvensjonell PCR og for å sette sammen fragmenter ved overlapp-ekstensjons PCR.

### 3.3.2.1 Protokoll for PCR med Phusion® High-Fidelity DNA-polymerase

1. Reagensene til PCR-miks (fra tabell 3.1) ble blandet godt sammen i et sterilt PCR-rør. Ved mange prøver ble det laget en mastermiks for reagensene felles for alle prøvene, før denne ble fordelt i PCR-rør og reagenser spesifikke for den enkelte reaksjon ble tilsatt.

Tabell 3.1. Reagenser for PCR-reaksjon ved bruk av Phusion® High-Fidelity DNA-polymerase.

Reagenser	Volum (µl)
10 µM Primer forover (fwd)	2,5
10 µM Primer revers (rev)	2,5
5X Phusion® HF Buffer	10
10 µM dNTPer	1
10-15 ng templat	1*
dH <sub>2</sub> O	31,5
Phusion® HF DNA polymerase	0,5
Totalvolum	50

\* Ved sammensetting av konstrukt med flere deler trengtes det 1 µl av hvert templat (maksimalt to templat per PCR-reaksjon). Mengden dH<sub>2</sub>O ble justert deretter, slik at sluttvolumet ble 50 µl.

2. PCR-reaksjonen ble utført i en PCR-maskin med et forhåndsinnstilt program som vist i Tabell 3.2. De ulike parametrene kan variere avhengig av type templat, hybridiseringstemperatur for primerne, og lengde på fragmentet som skulle kopieres opp.

**Tabell 3.2. Standardprogram for PCR-maskin ved bruk av Phusion® High-Fidelity DNA-polymerase i denne oppgaven.**

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Tid</b>
1. Initiell denaturering	94°C	5 – 10 minutter
2. Denaturering	94°C	30 sekunder
3. Hybridisering	58°C	30 sekunder
4. Elongering	72°C	0,5 – 2 minutter
5. Gjentakelse av trinn 2 – 4		25 – 35 sykluser
6. Avsluttende elongering	72°C	7 minutter
7. Oppbevaring	4 °C	∞

3. Etter endt PCR-reaksjon ble prøvene oppbevart ved 4°C til de skulle brukes videre. Renhet og størrelse på alle PCR-produkter ble analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese.

I noen tilfeller der en konvensjonell PCR ikke resulterte i riktig PCR-produkt, ble det utført en såkalt step-down PCR (Tabell 3.3.) hvor 1 µl dH<sub>2</sub>O ble byttet ut med 1 µl DMSO i PCR-reaksjonen (tabell 3.1).



**Tabell 3.3. PCR-program for stepdown-PCR.**

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Tid</b>
1. Initiell denaturering	94°C	5 – 10 minutter
2. Denaturering	94°C	30 sekunder
3. Hybridisering	65°C	30 sekunder
4. Elongering	72°C	0,5 – 2 minutter
5. Gjentakelse av trinn 2 – 4		5 sykluser
6. Denaturering	94°C	30 sekunder
7. Hybridisering	62°C	30 sekunder
8. Elongering	72°C	0,5 – 2 minutter
9. Gjentakelse av trinn 6 – 8		5 sykluser
10. Denaturering	94°C	30 sekunder
11. Hybridisering	58°C	30 sekunder
12. Elongering	72°C	0,5 – 2 minutter
13. Gjentakelse av trinn 10 – 12		25 sykluser
14. Avsluttende elongering	72°C	7 minutter
15. Oppbevaring	4°C	∞

### 3.3.3 Screening-PCR (OneTaq<sup>®</sup> polymerase)

Når det ikke er vesentlig at sekvensen etter endt PCR-reaksjon er fullstendig korrekt, brukes ofte en billigere DNA-polymerase som for eksempel OneTaq<sup>®</sup> DNA polymerase. Denne har større feilrate enn Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-polymerase, som nevnt i seksjon 3.3.2, men vil likevel generere produkter av riktig størrelse. DNA-polymerasene *Taq* og Deep Vent<sub>R</sub><sup>™</sup> er blandet i OneTaq<sup>®</sup> DNA polymerase, og utgjør til sammen en polymerase optimalisert for kjøring av analytisk PCR. OneTaq<sup>®</sup> DNA polymerase har lavere hastighet (1 kb i minuttet) Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-polymerase (NewEnglandBioLabs 2017a). I denne oppgaven ble OneTaq<sup>®</sup> DNA polymerase brukt til screening PCR, for å verifisere at transformanter hadde inkorporert det ønskelige DNA-fragmentet i sitt genom.

#### 3.3.3.1 Protokoll for screening-PCR

1. Fem enkeltkolonier fra hver transformasjonsreaksjon ble plukket med sterile tannpirkere og et avtrykk med celler ble satt i bunnen av hvert sitt sterile PCR-rør ved å berøre rørbunnen med tannpirkeren. Deretter ble tannpirkeren overført til et kulturrør med vekstmedium og passende antibiotika.
2. Reagensene til PCR-miks (fra tabell 3.4) ble deretter tilsatt PCR-røret og PCR-reaksjonen ble utført med programmet beskrevet i tabell 3.5.

Tabell 3.4. Reagenser for screening-PCR.

Reagenser	Volum (µl)
10 µM Primer forover (fwd)	1
10 µM Primer revers (rev)	1
5X OneTaq <sup>®</sup> Standard Reaction Buffer	4
10 µM dNTPer	0,5
10-15 ng templat	1*
dH <sub>2</sub> O	12,375
OneTaq <sup>®</sup> DNA polymerase	0,125
Totalvolum	20

\*Ved plukking av kolonier med tannpirker ble volumet av templatet noe lavere enn 1  $\mu\text{l}$ . Dette ble justert ved å tilsette 13  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O i stedet for 12.375  $\mu\text{l}$ , slik at sluttvolumet ble tilnærmet 20  $\mu\text{l}$ .

**Tabell 3.5. PCR-program for screening-PCR**

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Tid</b>
1. Initiell denaturering	94°C	10 minutter
2. Denaturering	94°C	30 sekunder
3. Hybridisering	58°C*	30 sekunder
4. Elongering	68°C	1,5 – 3 minutter
5. Gjentakelse av trinn 2 – 4		25 – 35 sykluser
6. Avsluttende elongering	68°C	5 minutter
7. Oppbevaring	4°C	$\infty$

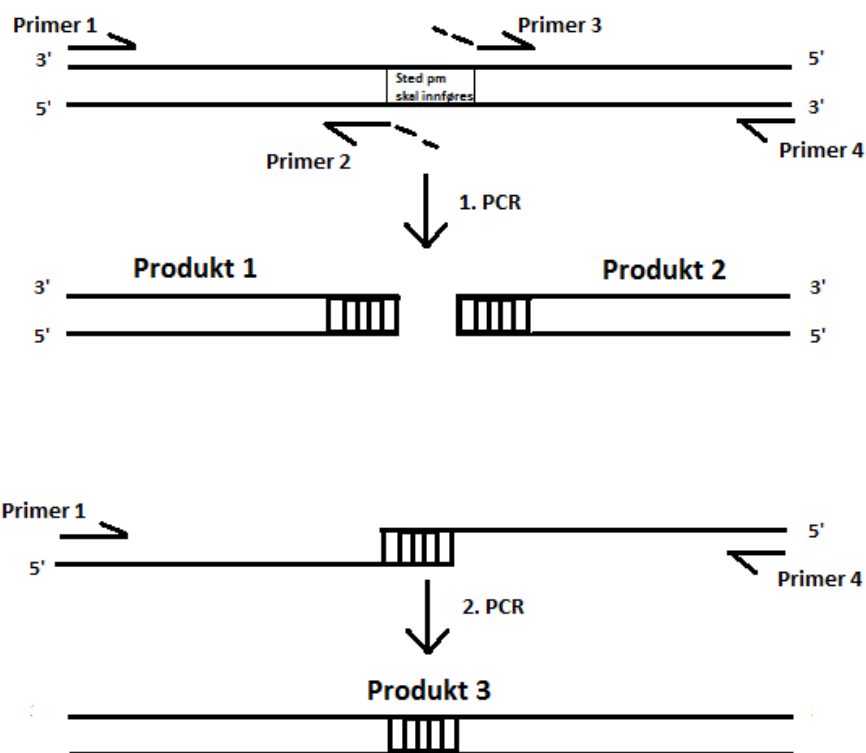
\* Hybridiseringstemperaturen er avhengig av hvilke primere som brukes, men i denne oppgaven ble 58°C brukt som standard for alle reaksjoner.

- Etter endt PCR-reaksjon ble prøvene analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese for å verifisere at transformantene hadde inkorporert riktig DNA-fragment.

### 3.3.4 Overlapp-ekstensjons PCR

I denne oppgaven ble punktmutasjoner introdusert i *comM*-genet ved å bruke såkalt overlapp-ekstensjons PCR. Denne teknikken er basert på at to eller flere DNA-fragmenter blir satt sammen til et sammenhengende fragment via flere PCR-reaksjoner. To PCR-produkt kan fusjoneres ved at 3' enden av det ene fragmentet er komplementært til 5' enden av det andre fragmentet. Når begge disse PCR-produktene brukes som templat i en PCR-reaksjon, vil endene

fra hvert produkt hybridisere og fungere som startpunkt for DNA-polymerasen, og produktene fusjoneres. Ved å inkludere flankerende primere i reaksjonen vil det fusjonerte DNA-fragmentet amplifiseres på vanlig måte (figur 3.1). Punktmutasjoner i *comM* ble innført ved først å amplifisere *comM* genet i to ulike deler (figur 3.1). I revers primer, som ble brukt til å lage fragment en, ble det inkludert spesifikke punktmutasjoner. Framover primer, brukt til å lage fragment to ble designet til å være 100% komplementær til revers primer for produkt en. Ved å utføre overlapp-ekstensjons PCR på disse DNA-fragmentene, ble punktmutasjonen en del av det fusjonerte *comM* genet (Heckman & Pease 2007; Higuchi et al. 1988).



**Figur 3.1. Overlapp-ekstensjons PCR for konstruksjon av punktmutanter.** Ved de første to PCR-reaksjonene blir produkt 1 laget ved bruk av primer 1 og primer 2, mens produkt 2 blir laget ved bruk av primer 3 og primer 4. Primer 2 og primer 3 har flankerende ender, og det er disse som introduserer punktmutasjonen. I den andre PCR-reaksjonen blir de to produktene satt sammen til produkt 3 ved bruk av primer 1 og primer 4. Produkt 3 har fått innført punktmutasjonen.

### 3.4 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en metode som benyttes for å separere DNA-fragmenter etter størrelse. Denne regnes som den beste metoden for å skille fragmenter som er fra 100 bp til 25

kb (Lee et al. 2012). Metoden bygger på et masse/ladnings-prinsipp og benytter seg av at DNA er negativt ladet, grunnet den negative ladningen fosfatmolekylene i DNA-ryggraden bidrar med. Dette kan utnyttes når DNA-fragmenter vandrer i et elektrisk felt, hvor de vil dras mot den positive anoden. Agarose er et polysakkarid som er bygd opp av subenheter bestående av L- og D-galaktose (Lee et al. 2012). Ved å løse agarose i buffer (TAE eller TBE) ved oppvarming, for så å kjøle ned blandingen, vil det dannes en gele hvor subenhetene i agarosen danner et porøst nettverk. Dette nettverket vil gi motstand i gelen, slik at korte DNA-fragmenter vil vandre raskere enn lengre fragmenter når gelen plasseres i et elektrisk felt. For å størrelsesbestemme separerte fragmenter benyttes en molekylær størrelsesmarkør (ladder) med kjente størrelser. I denne oppgaven ble en 1 kb DNA-ladder (NewEngland BioLabs) benyttet til dette formålet.

For å visualisere DNA i en agarosegel, må et markørstoff tilsettes gelblandingen før den stivner til en fast gel. I denne oppgaven ble peqGreen benyttet, da dette stoffet regnes som ikke-toksisk og sikrere enn tidligere brukte Ethidiumbromid (GeneON 2009). Markørstoffet binder seg til DNA på gelen og fluoriserer under UV-lys kun når det er bundet til DNA, noe som i denne oppgaven ble detektert med en geldoc-maskin (BioRad).

### **3.4.1 Protokoll for agarose gelelektroforese**

I denne oppgaven ble det brukt 1% (v/v) agarosegel.

1. Agarose (0,5 g) ble løst i 50 ml 1X TAE-buffer ved oppvarming i mikrobølgeovn.
2. Løsningen ble deretter avkjølt under springvann til den holdt en temperatur rundt 60-55°C, og tilsatt 2 µl peqGreen under lett røring.
3. Gelblandingen ble så helt over i en form og kammer utfra ønsket størrelse og antall av brønner på gelen ble plassert i formen.
4. Når løsningen var blitt kjølt ned til en fast gel ble kammene fjernet og gelen plassert i et elektroforesekar fylt med 1X TAE-buffer slik at brønnene var dekket.
5. DNA-prøvene som skulle undersøkes ble tilsatt 6X appliseringsbuffer, volum avhengig av hvor mye prøve som skulle kjøres på gelen.
6. En 1 kb DNA-ladder ble applisert i den første brønnen på gelen, etterfulgt av de respektive DNA-prøvene som skulle undersøkes i de neste brønnene.

7. Elektroforesen ble utført ved 90 V til separasjonen av DNA-fragmentene var tilfredsstillende, rundt 20 - 30 minutter avhengig av størrelsen på DNA-fragmentene.
8. Etter endt gelelektroforese ble agarosegelen plassert i en Gel Doc-1000 (BioRad), slik at DNA kunne visualiseres under UV-lys. DNA-fragmentene fra egne prøver ble her sammenlignet med størrelsesmarkøren tilsatt i den første brønnen.

### **3.5 Rense målfragment fra agarosegel**

Når man skal bruke DNA-fragmenter i videre arbeid som for eksempel kloning, overlapp-ekstensjons PCR eller transformasjon, så er det viktig at dette er fritt for kontaminanter og uspesifikke DNA-fragmenter. Å separere DNA-fragmentene ved hjelp av agarose gelelektroforese, for så å ekstrahere DNA fra gelen er en god metode for å oppnå rent DNA. I denne oppgaven ble slik rensing utført ved bruk av et NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). Kittets egen protokoll, seksjon 5.2 «DNA extraction from agarose gels» ble benyttet (Macherey-Nagel 2017), med enkelte modifikasjoner.

#### **3.5.1 Protokoll for rensing av DNA fra agarosegel**

1. DNA-fragmentet med den ønskede størrelsen ble skjært ut av gelen med en steril skalpell.
2. Gelbiten ble overført til et sterilt eppendorfrør, tilsatt NT1 bindingsbuffer, 200 µl per 100 mg gel, og satt på vannbad som holdt 55°C til gelbiten var helt oppløst.
3. Prøven ble deretter overført til en kolonne med silikamembran som var plassert i et oppsamlingsrør (2 ml), begge medfølgende kittet, maksimalt 700 µl om gangen, og kjørt i en bordsentrifuge på 11 000 x g i 1 minutt. Hensikten med dette trinnet var å få DNA til å binde til kolonnematerialet.
4. Oppsamlingsrøret ble deretter tømt og kolonnen satt tilbake i denne. For å vaske kolonnen ble den tilsatt 700 µl NT3 vaskebuffer, satt tilbake i bordsentrifugen og kjørt på 11 000 x g i 1 minutt.
5. Oppsamlingsrøret ble igjen tømt, og kolonnen ble satt tilbake i denne. For å tørke silikamembranen ble røret igjen satt i bordsentrifugen og kjørt på 11 000 x g i 2 minutter.

6. Oppsamlingsrøret ble kastet og kolonnen ble overført til et sterilt eppendorfrør. For å frigjøre DNA fra silikamembranen ble 25 - 50  $\mu$ l NE elueringsbuffer tilsatt kolonnen, volum avhengig av prøvens DNA-konsentrasjon (kunne estimeres fra gelbildet). Røret ble deretter inkubert ved romtemperatur i 1 minutt, før det ble plassert i bordsentrifugen og kjørt ved 11 000 x g i 1 minutt.
7. Kolonnen ble så kastet og eppendorfrøret med det eluerte DNAet ble oppbevart ved -20°C til det skulle brukes videre til for eksempel transformasjon eller settes sammen med et annet fragment ved PCR.
8. Om ønskelig kunne 5  $\mu$ l av eluatet testes ved agarose gelelektroforese (se seksjon 3.4.1) for å sjekke om rensingen var vellykket.

### **3.6 Sekvensering**

Alle transformantene som ble generert i denne oppgaven ble verifisert ved hjelp av sekvensering. For sekvensering av DNA-fragment ble to prøver med rensed DNA blandet med 1  $\mu$ l primer (fremover primer i den ene og revers primer i den andre) og tilsatt dH<sub>2</sub>O til sluttkonsentrasjon på 100 ng/ $\mu$ l rensed DNA. For sekvensering av plasmid ble tre prøver med rensed plasmid blandet med 1  $\mu$ l primer (fremover primer i den ene, en primer midt i genet i den andre og en revers primer i den tredje) og tilsatt dH<sub>2</sub>O til sluttkonsentrasjon 200 ng/ $\mu$ l rensed plasmid. Det ble brukt henholdsvis to og tre primere for å være sikker på at hele gensekvensen ble dekket. Prøvene ble deretter sendt til GATC-Biotech, som utførte selve sekvenseringsreaksjonen og separasjon av fragmentene ved bruk av kapilær akrylamid gelelektroforese. Resultatene ble levert som kromatogrammer og tekstfiler. Kromatogrammene ble undersøkt i databehandlingsverktøyet Chromas, og sekvensene i tekstfilene ble sammenlignet med teoretisk sekvens ved bruk av verktøyet BLAST.

### **3.7 Isolering, restriksjonskutting og ligering av plasmid**

#### **3.7.1 Isolering av plasmid**

For å isolere plasmid ble kittet «Plasmid DNA purification» (Macherey-Nagel 2015) benyttet. Protokoll for prosedyren brukt i denne oppgaven er beskrevet i detalj i seksjon 5 «Nucleospin® Plasmid / Plasmid (NoLid) protocols» i brukermanualen til kittet.

### 3.7.1.1 Protokoll for plasmidisolering

1. Cellene plasmid skulle isoleres fra ble dyrket til god vekst i flytende LB-medium. For høykopi-plasmider ble det tatt ut 1 ml celler til plasmidisolering, for lavkopi-plasmider ble det tatt ut 5 ml celler.
2. Prøvene ble sentrifugert ved 11 000 x g i 30 sekunder i en bordsentrifuge, og supernatanten ble kastet.
3. Cellepelleten ble deretter resuspendert i 250 µl buffer A1 (oppbevares i kjøleskap før bruk). Før cellelysing var det viktig at pelleten var helt oppløst, noe som ble utført ved å pipettere opp og ned.
4. For å lysere prøvene, slik at plasmidene ble frigitt, ble 250 µl av buffer A2 tilsatt. Prøvene ble blandet lett ved invertering av rørene, om lag 8-10 ganger. Det var viktig å unngå vortexing og ekstensiv blanding i dette trinnet, for å unngå fragmentering av genomisk DNA. Prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 5 minutter, eller til lysatet ikke lenger var blakket.
5. Deretter ble 300 µl av buffer A3 tilsatt prøvene. Lett blanding som beskrevet i trinn 4 ble gjentatt, og prøvene ble sentrifugert ved 11 000 x g i 5 minutter i en bordsentrifuge. Dersom supernatanten ikke var klar ble prøvene sentrifugert på samme måte i nye 5 minutter.
6. For å binde DNA ble et maksimalt volum på 750 µl av supernatanten fra sentrifugeringen overført til en silikamembran-kolonne medfølgende kittet plassert i et oppsamlingsrør (2 ml) også medfølgende kittet. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt, oppsamlingsrøret ble tømt før kolonnen ble satt tilbake i denne. Dersom det var mer lysat igjen ble dette steget gjentatt.
7. For å vaske kolonnematerialet ble 600 µl av vaskebufferen A4 tilsatt kolonnen. Prøvene sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt, oppsamlingsrøret ble tømt og kolonnen satt tilbake i denne.
8. For å tørke silikamembran-kolonnen ble prøvene sentrifugert i 2 minutter ved 11 000 x g. Oppsamlingsrøret ble kastet, og kolonnen ble plassert i et sterilt eppendorfrør (1.5 ml).
9. For å frigjøre DNA fra silikamembranen ble kolonnen tilsatt elueringsbufferen AE. Høykopi-plasmider ble eluert i 50 µl romtemperert AE, mens lavkopi-plasmider ble eluert i 30 µl AE forhåndsoppvarmet til 70°C. Prøvene ble deretter inkubert i 1 minutt



ved romtemperatur for høykopi-plasmider, og i 2 minutter ved 70°C for lavkopi-plasmider. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 11 000 x g i 1 minutt.

10. Det eluerte plasmidet ble oppbevart ved -20°C.

11. Om ønskelig kunne 5 µl av eluatet testes ved agarose gelelektroforese (se seksjon 3.4) for å sjekke om rensingen var vellykket.

### 3.7.2 Restriksjonskutting av plasmid

For å kunne sette inn et DNA-fragment i et plasmid må plasmidet først lineariseres. Dette blir gjort ved å kutte plasmidet i bestemte restriksjonskuttsteder der man ønsker at DNA-fragmentet skal settes inn. I denne oppgaven ble plasmidene pUT18C og pKT25 fra *E. coli* kuttet med enzymene EcoRI-HF og BamHI-HF, med den hensikt å sette inn flag-tagget *comM* fra *S. pneumoniae* i disse plasmidene. Hensikten med introduksjon av en flag-tag var at proteinet ComM skulle gjenkjennes ved hjelp av Western Blot analyse, hvor primært antistoff binder til denne taggen (se seksjon 3.13). For å kunne sette dette genet inn i plasmidene måtte genet først kopieres opp ved PCR (se seksjon 3.3) og deretter kuttet med de samme enzymene som plasmidene.

#### 3.7.2.1 Protokoll for restriksjonskutting av plasmid

1. Reagensene til kutting av plasmid (se tabell 3.6) ble blandet i et sterilt eppendorfrør.

Tabell 3.6. Reagenser til kutting av plasmid

Reagenser	Volum (µl)
DNA (plasmid eller gen)	25 (~ 500 ng)
10X buffer (NEBuffer 4)*	3
Enzym 1 (EcoRI-HF®)	1
Enzym 2 (BamHI-HF®)	1
Totalvolum	30

\* Hvilken buffer som ble benyttet var avhengig av hvilke enzymer som ble brukt. I denne oppgaven ble NEBuffer 4 benyttet, da denne var mest optimal for begge enzymene EcoRI-HF® og BamHI-HF®.

2. Prøvene ble inkubert på vannbad ved 37°C i 2 timer. Etter 1 time ble plasmidene tilsatt 1 µl CIP (alkalisk fosfatase fra kalv), som fjerner 5' fosfatgruppene slik at plasmidene ikke religerer med seg selv. Det var viktig at prøven med flag-tagget *comM* ikke ble tilsatt CIP, da dette ville føre til at genet mistet 5' PO<sub>4</sub>, slik at det dermed ikke ville kunne settes inn i plasmidene ved ligering.
3. Etter kutting ble prøvene separert ved hjelp av agarose gelelektroforese (se seksjon 3.4), for å sjekke om kuttingen var vellykket og for å rense de kuttete DNA-fragmentene fra gelen.

### 3.7.3 Ligering av plasmid

Etter at plasmidene hadde blitt linearisert ved kutting skulle det kuttete genet settes inn i disse. Dette ble gjort ved ligering. For pKT25 ble en hurtigmetode med Quick ligase benyttet, men siden denne viste seg å ikke fungere for ligering av pUT18C (plasmidet religerte med seg selv istedenfor å inkorporere insertet) ble en ligeringsreaksjon med en ordinær T4 ligase benyttet for ligering av dette plasmidet.

#### 3.7.3.1 Protokoll for ligering av plasmid

1. Reagensene til ligering av plasmid (se tabell 3.7 og 3.8) ble blandet i et sterilt eppendorfrør.

**Tabell 3.7. Reagenser for ligering av pKT25.**

Reagenser	Volum (µl)
2X Quick Ligase buffer	10
Kuttet plasmid	1
Insert (flag-tagget <i>comM</i> )	4
Quick Ligase	1
dH <sub>2</sub> O	4
Totalvolum	20

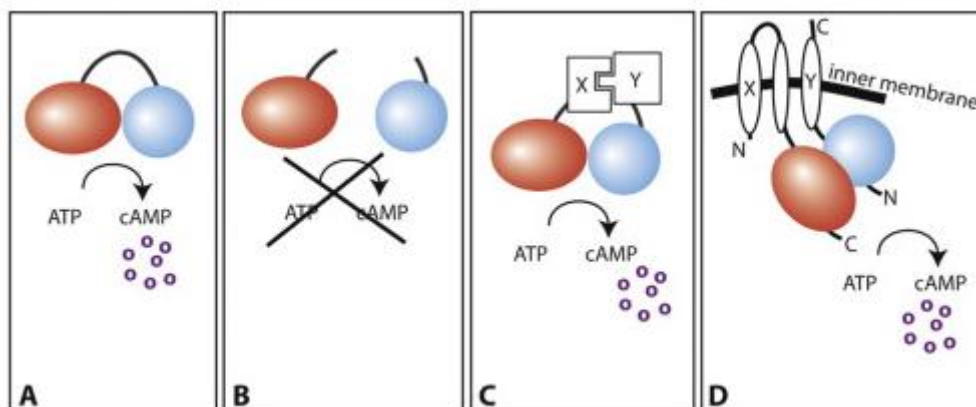
**Tabell 3.8. Reagenser for ligering av pUT18C**

Reagenser	Volum ( $\mu$ l)
10X T4 DNA ligase buffer	2
Kuttet plasmid	2
Insert (flag-tagget <i>comM</i> )	5
T4 ligase	1
dH <sub>2</sub> O	10
Totalvolum	20

2. For ligering av pKT25 med Quick ligase ble prøven inkubert ved romtemperatur i 5 minutter. For ligering av pUT18C med ordinær ligase ble prøven inkubert ved romtemperatur i 2 timer.
3. Etter ligering ble prøvene oppbevart ved -20°C til de skulle transformeres inn i *E. coli*.

### 3.8 Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System (BACTH)

BACTH systemet er et to-hybrid system som detekterer protein-protein interaksjoner, og gjør det mulig med *in vivo* screening og seleksjon av funksjonelle interaksjoner som finner sted mellom to proteiner (Karimova et al. 1998). Metoden baserer seg på rekonstruksjon av en syklisk adenosin 3',5'-monofosfat (cAMP)-avhengig regulatorisk kaskade (Battesti & Bouveret 2012). I BACTH systemet brukes domenene T25 og T218, hvor proteinene som skal testes mot hverandre blir fusjonert til hvert sitt domene. Dersom disse proteinene fusjonert til hvert sitt domene interagerer, vil domenene T25 og T18 danne et enzym som produserer cAMP. Aktiviteten til dette enzymet kan deretter detekteres siden cAMP fører til oppregulering av  $\beta$ -galaktosidasen LacZ. Ved å dyrke cellene på plater med X-gal, vil LacZ produksjon vises ved at bakteriekoloniene bli blå (Euromedex). En oversikt over mekanismen bac BACTH-systemet er vist i figur 3.2.



**Figur 3.2. Mekanisme bak BACTH systemet.** **A:** Domenene T25 (rød) og T18 (blå) utgjør til sammen adenylatsyklase domenet i *E. coli cya* celler, syklisk AMP produsert fra ATP. **B:** Domenene T25 og T18 produsert hver for seg gir ikke produksjon av syklisk AMP. **C:** Interaksjon mellom protein X (fusjonert til T25) og protein Y (fusjonert til T18) gir produksjon av syklisk AMP. **D:** Interaksjoner mellom membranproteiner kan også testes i BACTH-systemet, da interaksjon mellom disse gir produksjon av syklisk AMP. Figuren er hentet fra Battesti & Bouveret (2012).

I denne oppgaven ble BACTH-systemet benyttet for å undersøke om ComM interagerer med proteiner i divisomet hos *S. pneumoniae*. Dette ble gjort for å prøve å kartlegge hvor ComM hadde sin funksjon i celledelingsmaskineriet. ComM (flag-tagget) fusjonert til T25/T18 ble testet for interaksjon med PBP1a, PBP2a, PBP1b, PBP2b, PBP2x, RodA, RodZ, RoaA (CozE), StkP, FtsW, MreD og DivIVA fusjonert til T18/T25. For å undersøke om ComM interagerer direkte med domenene T25 og T18 ble ComM fusjonert til T25 testet for interaksjon med pUT18 og pUT18C, og ComM fusjonert til T18 testet for interaksjon med pKT25 og pKNT25. Plasmidene pUT18C/pKT25 ble brukt som negativ kontroll og plasmidene pUT18C-zip/pKT25-zip ble brukt som positiv kontroll i alle testene. Positiv test ville vise til interaksjon mellom de to proteinene som ble testet, noe som ble visualisert som blå kolonier på LB/X-gal agarskåler.

### 3.8.1 Protokoll for BACTH-systemet

1. Plasmider med T25 og T18 fusjonerte proteiner ble co-transformert i ulike kombinasjoner inn i *E. coli* BTH101. Transformanter inneholdt nå genene som kodet for begge proteinene som skulle testes mot hverandre, fusjonert til hvert sitt T25- eller T18-domene.

2. Tre  $\mu\text{l}$  eksponentielt voksende cellekultur ble deretter spottet på LB/X-gal agarplater som inneholdt 40  $\mu\text{g/ml}$  X-gal, 0.5 mM IPTG, 50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin og 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin, 5 paralleller av hver prøve. Positiv og negativ kontroll fra kittet ble spottet nederst på platen, for å sammenligne prøvene med disse.
3. Agarplatene ble inkubert aerobt i en plastpose ved 30°C i 24 timer.
4. Etter 24 timer ble platene sjekket for enzymaktivitet (blå farge) og det ble tatt bilder av disse til dokumentering.

### 3.9 Sytox lysis-assay

Sytox lysis-assay er en metode som er basert på å måle cellelysis som følge av at DNA slipper ut av cellene. Sytox<sup>®</sup> Green Nucleic Acid stain (Invitrogen<sup>™</sup>) er en fluoroflor som fluoriserer når den binder DNA. Sytox<sup>®</sup> Green Nucleic Acid stain (Invitrogen<sup>™</sup>) gir >500 gangers økning i fluorescens ved binding til nukleinsyrer, noe som gjør det enkelt å detektere lyserte celler i en populasjon ved bruk av dette fargestoffet (Invitrogen<sup>™</sup> 2006). Siden Sytox ikke kan krysse cellemembraner, kan den brukes til å bestemme relativ cellelysis i en bakteriekultur ved å måle økning i fluorescens som følge av frigjort DNA. Sytox lysis-assay utføres ved at Sytox tilsettes en bakteriekultur i en mikrotiterplate. Platen inkuberes i en plateleser ved 37°C, og bakterievekst samt fluorescens måles automatisk. DNA-bundet Sytox eksiteres ved 485 nm og emitterer lys ved 528 nm (Straume et al. 2016).

I denne oppgaven ble Sytox-assay bruk for å teste immunitetsfunksjonen til punktmuterte versjoner av ComM i *S. pneumoniae*, immunitetsfunksjonen til ComM fra andre bakteriestammer (arter), og immunitetsfunksjonen til en CAAX-lignende protease. Siden ikke-immune *S. pneumoniae* lyses av CbpD, vil graden av lysis være direkte relatert til immunitetsfunksjonen til ComM. Dersom mutantene ga stor grad av lysis ved induksjon med CSP betydde det at de ikke ga immunitet mot CbpD, mens dersom cellene ikke lyserte ga ComM-mutantene immunitet mot CbpD. Ved indusering til kompetanse med CSP ville cellene nå maksimal kompetanse etter 15 - 20 minutter, mens kompetansen etter 40 minutter ville gå ned til nærmere null (Håvarstein et al. 1995).

### 3.9.1 Protokoll for Sytox lysis-assay

1. Stammene av *S. pneumoniae* som skulle testes ved Sytox-assay ble dyrket til  $OD_{550} \sim 0,05$ , og holdt på is for å hindre videre vekst til de skulle tilsettes på en mikrotiter-plate.
2. Mikrotiter-plater (96-brønners Corning NBS) med blank bunn ble brukt til Sytox-assay. Først ble 20  $\mu\text{l}$  Sytox-løsning (2  $\mu\text{M}$  i C-medium) tilsatt hver brønn i platen hvor det skulle tilsettes prøve. Deretter ble 280  $\mu\text{l}$  C-medium tilsatt i brønnen som skulle være blank-prøve, mens 280  $\mu\text{l}$  av hver cellekultur ble tilsatt i resterende brønner. Det ble inkludert 6 paralleller av hver mutant (kun en blank-prøve); 3 som skulle induseres til kompetanse ved tilsetning av CSP og 3 ikke-induserte kontroller. RH420 ( $\Delta\text{comM}$ -mutant) ble brukt som kontroll på maksimal lysis, mens RH425 (villtype *comM*) ble brukt som kontroll på 100% immune celler.
3. Sytox-assay ble utført ved  $37^\circ\text{C}$  i en Synergy H1 hybrid reader (BioTek), som tok separate målinger hvert femte minutt av  $OD_{492}$  og lys emittert ved 528 nm.
4. Når cellene hadde vokst til  $OD_{492} = 0,2$  ble tre paralleller av hver prøve indusert til kompetanse med en sluttkonsentrasjon på 250 ng/ml CSP.
5. Cellelysering etter indusering med CSP ble monitorert ved nye målinger hvert femte minutt av  $OD_{492}$  og lys emittert ved 528 nm i omtrent 1 time.
6. Relativ fluorescens ble beregnet ved fluorescens/OD (lyserte celler/totalt antall celler). Prøvene ble sammenlignet med de to kontrollene, og cellelysis ble beregnet i prosent, hvor ikke-immune celler (RH420) utgjorde 100% lysis.

### 3.10 Isolering av membranfraksjon

I denne oppgaven ble membranfraksjoner isolert fra stammer som inneholdt plasmidene pUT18C, pUT18C med ComM fusjonert til seg og pUT18C med flag-tagget ComM fusjonert til seg isolert fra cellene, for å undersøke om det flag-taggede proteinet ComM hadde blitt integrert i membranen hos *E. coli*. De to stammene som ikke inneholdt flag-tagget ComM ble brukt som kontroller.

### 3.10.1 Protokoll for isolering av membranfraksjon

1. Cellene ble dyrket ved 37°C i en inkubator med risting ved 200 rpm til  $OD_{600} = 0,3 - 0,4$ . Deretter ble 30 ml celler tatt ut for membranisolering og 1 ml celler ble tatt ut til total cellelysat.
2. De resterende 70 ml ble induert med IPTG til en sluttkonsentrasjon på 0,5 mM i 3 timer.
3. Nye 30 ml celler ble tatt ut for membranisolering og 1 ml celler ble tatt ut til total cellelysat.
4. Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 5 000 x g i 10 minutter. Cellene til membranisolering ble resuspendert i 1 ml iskald 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl, mens cellene til total cellelysat før induksjon ble resuspendert i 50 µl 2X SDS-prøvebuffer og 50 µl dH<sub>2</sub>O og cellene etter induksjon ble resuspendert i 100 µl 2X SDS-prøvebuffer og 100 µl dH<sub>2</sub>O. Alle prøvene ble deretter oppbevart på is i de resterende trinnene i protokollen.
5. Prøvene til membranisolering ble tilsatt 0,5 g glasskuler og cellene ble lysert ved bruk av fastprep (6,5 m/s) i 3 x 20 sekunder.
6. Lysatet med kuler ble overført til 25 ml iskald 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 mM NaCl. Rørene ble deretter invertert 5 ganger for blanding.
7. For å skille ut celledbris og ulyserte celler ble prøvene sentrifugert ved 5 000 x g i 10 minutter.
8. For å høste membranene ble supernatanten sentrifugert ved 25 000 x g i 30 minutter.
9. De høstede membranene for prøvene før induksjon ble løst i 50 µl 2X SDS-prøvebuffer og 50 µl dH<sub>2</sub>O, og cellene etter induksjon ble resuspendert i 100 µl 2X SDS-prøvebuffer og 100 µl dH<sub>2</sub>O.
10. Prøvene ble oppbevart ved -20°C til de skulle brukes videre.

### 3.11 SDS-PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfat polyakrylamid gelelektroforese) er en gelelektroforesemetode som benyttes for å separere proteiner etter størrelse (kDa). I SDS-PAGE brukes en gel av akrylamid, hvor akrylamid monomerer polymeriserer ved å danne kryssbindinger til hverandre, noe som genererer et fast nettverk. Drivkraften bak denne polymeriseringen er tilsatt APS og TEMED, hvor sistnevnte trigger APS til å danne frie radikaler, noe som fører til

krysslinking av metylen-bis-akrylamid. Separasjonens rekkevidde er avhengig av konsentrasjonen av akrylamid og hvor mange kryssbindinger som dannes. Før prøvene settes på gel blir de tilsatt SDS-prøvebuffer, som bidrar med å linearisere proteinene og gi disse en negativ ladning, slik at de vandrer mot positiv pol i et elektrisk felt. Prøvene blir også kokt, slik at proteinene skal denaturere (Sambrook & Russel 2001).

I denne oppgaven ble SDS-PAGE brukt for å separere proteiner fra membranfraksjon og total cellelysat av plasmidene pUT18C, pUT18C med ComM fusjonert til seg og pUT18C med flag-tagget ComM fusjonert til seg. Hensikten med dette var å generere geler til utførelse av coomassie farging (se seksjon 3.12) og Western Blot (se seksjon 3.13).

### **3.11.1 Protokoll for SDS-PAGE**

I denne oppgaven ble 12% separasjonsgeler benyttet:

1. Glassplater og annet utstyr til støping av geler ble vasket godt før bruk. Glassplatene (en liten og en stor) ble plassert i en klemme som holdt platene sammen og plassert i en støpeform. Det var viktig at denne var tett, slik at gelen ikke fløt ut av formen, noe som ble sjekket ved å fylle formen med dH<sub>2</sub>O.
2. Formen ble fylt med 3,25 ml separasjonsgel-løsning og deretter etterfylt med dH<sub>2</sub>O til toppen av formen for å få en rett kant på separasjonsgelen. Etter 20 minutter hadde gelen polymerisert og dH<sub>2</sub>O ble helt av.
3. Formen ble deretter fylt til toppen med stackinggel-løsningen (omtrent 1,25 ml), og kammer for lagging av brønner ble plassert i toppen av stackinggelen. Etter 20 minutter hadde gelen polymerisert og kammene ble fjernet.
4. Gelene ble plassert i et gelelektroforesekar fylt med buffer.
5. En ladder ble tilsatt i den første brønnen på hver gel, etterfulgt av prøvene som skulle testes.
6. Gelen ble kjørt ved 200 V i 45 minutter.
7. Etter endt separasjon ble gelene løsnet fra glassplatene ved skjæring med en plast-kutter.



### **3.12 Coomassie-farging**

Etter at proteinene hadde blitt separert etter størrelse ved hjelp av SDS-PAGE ble gelen farget med Coomassie Brilliant Blue. Dette er et fargestoff som binder til proteiner i gelen med hydrofobe og elektrostatiske interaksjoner. Denne bindingen kan brukes til mål på proteinkonsentrasjon, da mengde protein er tilnærmet proporsjonal med bundet fargestoff (Sambrook & Russel 2001).

I denne oppgaven ble Coomassie-farging benyttet for å se om det var mulig å finne igjen ComM i plasmidet pUT18C som hadde dette fusjonert til seg, og å beregne proteinkonsentrasjonen.

#### **3.12.1 Protokoll for Coomassie-farging av SDS-geler**

1. Gelen ble etter endt gelelektroforese senket i en beholder med Coomassie blue fargeløsning og varmet opp i mikrobølgeovn ved maksimal effekt i 10 sekunder.
2. Gelen ble deretter inkubert i 1 time ved romtemperatur på et vippebord.
3. Fargeløsningen ble helt av og gelen vasket i springvann.
4. Gelen ble deretter inkubert i avfargingsløsning i 1 time ved romtemperatur på vippebord. Papir ble plassert i den ene enden av beholderen for å trekke til seg farge, og dette papiret ble byttet ut hvert 10. minutt.
5. Avfargingsløsningen ble helt av og gelen vasket i springvann.
6. Det ble deretter tatt bilde av gelen i en geldoc-maskin til dokumentasjon av resultatene.

### **3.13 Western Blot**

Western Blot er en teknikk for å identifisere et eller flere proteiner. Metoden baserer seg på at proteiner blir separert etter molekylær vekt ved gelelektroforese, før de overføres til en membran og blir detektert med antistoff (Mahmood & Yang 2012). Proteinene overføres fra en gel til en membran gjennom ved at proteinene vandrer fra negativ til positiv pol i et elektrisk felt. Dette er mulig fordi alle proteinene er dekket av SDS, noe som gir dem en negativ ladning. Proteinene fester seg på membranen via hydrofobe interaksjoner. Etter at proteinene er overført til membranen blir denne behandlet med blokkeringsløsning, som hindrer uspesifikk binding av antistoff til membranen. Membranen blir deretter behandlet med et primært antistoff, som

vil gjenkjenne et eller flere spesifikke proteiner og binde til disse. Deteksjon av målprotein avhenger av hvilket protein det primære antistoffet gjenkjenner. Ofte blir proteinene som det ønskes å detektere designet med en spesifikk tag, og det brukes et spesifikt antistoff som kun kjenner igjen denne taggen. Etter behandling med et primært antistoff blir membranen behandlet med et sekundært antistoff, som gjenkjenner det primære antistoffet og binder til dette. Grunnen til at det brukes to antistoff er å generere et sterkere signal for indirekte deteksjon av taggen.

I denne oppgaven ble Western Blot benyttet for å undersøke om flag-tagget ComM hadde blitt integrert i membranen hos *E. coli*. De to stammene som ikke inneholdt flag-tagget ComM ble brukt som kontroller.

### 3.13.1 Protokoll for Western Blot

1. Gelen ble etter endt gelelektroforese senket i en beholder med overføringsbuffer.
2. For å overføre proteinene i gelen til en membran ble det benyttet en Trans-blot membrablott – maskin (BioRad). Seks 3 MM filtre ble bløtlagt i overføringsbuffer og PVDF membranen som skulle benyttes ble aktivert i 100% metanol. Tre filtre ble plassert i maskinen, etterfulgt av membranen, gelen og 3 filtre på toppen. Det var viktig at disse ble lagt kant i kant med hverandre og at luftbobler ble unngått for best mulig resultat.
3. Et lokk som fungerte som den negative polen i blottingen ble skrudd på plass på toppen, og blottingen ble kjørt i 60 minutter ved 15 V.
4. Etter blottingen ble membranen tatt ut av maskinen og overført i en beholder som inneholdt tørrmelksløsning for blokkering av membranen, 5% fettfri tørrmelk i TBS-Tween. Membranen ble inkubert i tørrmelksløsning i 1 time ved romtemperatur på et vippebord.
5. Tørrmelksløsningen ble helt av og membranen vasket med TBS-Tween for å fjerne rester av løsningen.
6. Deretter ble membranen inkubert med primært antistoff (anti-flag fra Sigma) fortynnet 1:4000 i TBS-Tween i 1 time ved romtemperatur på et vippebord.
7. Membranen ble vasket i TBS-Tween 3 x 10 minutter ved romtemperatur på vippebord.

8. Membranen ble så inkubert med sekundært antistoff (anti-kanin-HRP, 1:1000 i TBS-Tween) i 1 time ved romtemperatur på vippebord.
9. Membranen ble deretter vasket 3 x 10 minutter på samme måte som i trinn 7.
10. For å fremkalle immunoblottet ble membranen inkubert med substratløsning (5 ml av luminol og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:1, SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate fra Thermo Scientific™) i 1 minutt, før luminescens ble detektert i en Azur 400 geldoc.

### **3.14 Mikroskopering**

#### **3.14.1 Fasekontrast-mikroskopi og fluorescensmikroskopi**

Fasekontrast-mikroskopi er en kontrastøkende optisk teknikk, som brukes når man ønsker å studere transparente prøver, som for eksempel cellekulturer, i detaljer og med høy kontrast. Teknikken baserer seg på at fasevariasjoner blir oversatt til korresponderende amplitudeendringer, noe som deretter blir visualisert som kontrastforskjeller (Zernike 1942). Metoden er god for studier av levende celler, da den ikke krever farging eller fiksering av preparater.

Fluorescensmikroskopiering baserer seg på at den delen man ønsker å undersøke i en celle, som for eksempel et protein, kan tagges med en fluorofor som emitterer lys ved en gitt bølgelengde. En fluorofor som ofte blir brukt ved studier av proteiner er GFP (green fluorescent protein), som blir transkribert kun når genet kodende for proteinet den er tagget til blir transkribert (Lichtman & Conchello 2005). Dette fører til at fluorescens kun kan detekteres når dette proteinet blir uttrykt, og man kan dermed studere hvor dette proteinet har sin funksjon i cellen.

I denne oppgaven ble fasekontrast- og fluorescensmikroskopi benyttet samtidig for å undersøke om det var mulig å lokalisere ComM i celledelingen. Stammer hvor ComM var tagget med GFP ble brukt til dette formålet. Fordi nativt ComM var vanskelig å lokalisere i cellen når cellen ble indusert til naturlig kompetanse ved tilsetning av CSP, ble en stamme hvor ComM var satt inn i ComRS-systemet (se seksjon 3.14.2) analysert. På denne måten ble ComM uttrykt ektopisk fra PcomX-promotoren ved å tilsette induseren ComS.

### 3.14.1.1 Protokoll fluorescensmikroskopi

1. Vekstmedium til fluorescensmikroskopi ble laget ved å tilsette 0,12 g agarose til 10 ml ferskt C-medium, noe som ga en 1,2% agarosegel.
2. Vekstmedie-løsningen ble inkubert ved 55°C på vannbad til ComS skulle tilsettes, for å unngå stivning til gel før den skulle brukes.
3. Stammen som skulle undersøkes ble inokulert i ferskt C-medium og dyrket til tidlig log-fase ved 37°C på vannbad. Prøven ble holdt på is til den skulle brukes videre.
4. En plastramme ble plassert på et rent objektglass, og C-medium med 0,2 µM ComS + 1,2% agarose ble applisert inni plastrammen. Et rent objektglass ble lagt oppå rammen og presset forsiktig ned for å jevnt fordele mediumet inni rammen.
5. Da mediumsløsningen hadde stivnet, ble det øvre objektglasset forsiktig skjøvet til side.
6. Stammen som skulle undersøkes ble tilsatt ComS til sluttkonsentrasjon 0,2 µM, og 2 µl celler ble pipettert på mediumet i rammen. Et dekkglass ble deretter plassert på glass-sliden, og prøvene var klare til å undersøkes nærmere i et mikroskop.
7. Fluorescensmikroskopi ble gjort ved 37°C og bruk av et «time lapse»-program, med bildedokumentering hvert minutt i 60 minutter, for å monitorere plasseringen til GFP-ComM i cellen under celledeling.

### 3.14.2 ComRS-systemet hos *S. pneumoniae*

ComRS-systemet utviklet i *S. pneumoniae* er et omstendig regulert, titrerbart depleksjons-system som gjør det mulig å studere genuttrykk av essensielle gener ektopisk. Systemet baserer seg på at det native genet blir fjernet, slik at det ektopisk uttrykte genet kan undersøkes med ulike grader av transkripsjon av dette, for å undersøke hvilken funksjon geneuttrykket har. Systemet inkluderer comX-promotoren, regulatoren ComR og peptidet ComS som er et induserpeptid fra *S. thermophilus*. Bruk av ComRS-systemet påvirker ikke de naturlige prosessene i *S. pneumoniae*, da det ikke deler noen homologi med andre proteiner hos denne arten. Genuttrykk bak promotoren PcomX kan kontrolleres ved å bruke ulike konsentrasjoner av induserpeptidet ComS i vekstmediumet (Berg et al. 2011).

## 4 Resultater

### 4.1 Identifisering av konserverte aminosyrer i ComM

Man vet at ComM er et integralt membranprotein som gir immunitet mot CbpD, men om det virker som et enzym, er involvert i protein-protein interaksjoner eller binder opp en bestemt komponent i cellene er ukjent. Enzymer har som regel konserverte motiver og bestemte aminosyrer som inngår i katalytiske seter. For å undersøke om ComM har slike konserverte motiver eller aminosyrer, som potensielt kan være en del av et katalytisk sete, ble aminosyresekvensen til ComM hos *S. pneumoniae* sammenlignet med sekvensen til ComM fra andre streptokokker. Sekvenssammenstillingen ble konstruert i Clustal Omega, og er vist i figur 4.1.

```

S.pneumoniae-R6-ComM  ----MKSMRILFLLALIQLISLSSCFLWKECILSFKQSTAFFIGSM-VFVSGICAGVNYL
S.mitis                ----MKSMRILFLLALIQLISLSSCFLWKECILSFKQSTAFFIGSM-VFVSGICAGVNYL
S.pseudopneumoniae   ----MKSMRILFLLALIQLISLSSCFLWKECILSFKQSTAFFIGSM-VFVSGICAGVNYL
S.oralis              ----MVKSIRLLLLIAVVQISFSSCCLLWKEFSLKQTNAYFFCILVIGISVLCAGINYF
S.infantis            -MEKVIKIRLLLLFFALIQLALCSCIFWSGTSLALKQSCFYFLAL-LGLSGSCAFMHYL
S.parasanguinis       -MEKMNKSIQLLLLISLVYLGCCSCLWVPGIALTLKQSCFYFLLLL-MLLAGICTFIHYL
S.anginosus          -MRKIKNILQMSLLIVLTQITLVLLTTPLPKSLTFQOSSFVFLFIL-FFA-GLLYF-RYF
S.intermedius        -MKNIKNILQMSLLIVLTQITLVLLTTPLSKSLTFQOSSFVFLFIL-FFC-GLLYF-RYF
S.sanguinis          -MLKLEKIIQLLLLAMLTQTGLLLMLHMPHRLVFSQANLLFMVGL-LGL-LFCCA-FYF
S.cristatus          MRLTFQKSIQILLVAMLMQSVLLLLLVHMTNRFALSRLNLLFISLF-LLI-LLGYA-SYF
                        :  ::  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
S.pneumoniae-R6-ComM  YTRKQEVHVSVLASK---KSVKLFYSMLLLINLLGAVLVLSDNLFIKNTLQOELVDVDFLLPS
S.mitis                YTRKQEVHVSVLASK---KSVKLFYSMLLLINLLGAVLVLSDNLFIKNTLQOELVDVDFLLPS
S.pseudopneumoniae   YTRKQEVHVSVLASK---KSVKLFYSMLLLINLLGAVLVLSDNLFIKNTLQOELVDVDFLLPS
S.oralis              HTADQSRHSILHVQ---KKVSLVYCLLLVNNLATCLVLSESIQTTSKQLQOELVDVDFLLPS
S.infantis            SSHNLKRDRLIDRS---RFIFLFYSMMIVVNLGCVGLVLSSETIVTVNLLQKEAVDVLILPS
S.parasanguinis       SGHDHVNSQLHNRS---RSFFLLYSSMVIINVAGVCFILFESISTDTLLQKEIVDLLLLIS
S.anginosus          SRELTDFKSEILVARYWPLLHFSYLMVFINAIGAYLMIVEGLAEVSESQKLFMSLFIHS
S.intermedius        ARELQEIKGSLRQSSNYRHLLFLYFLMILVNAAGVLLLCGKEAQSGQAVEQMLTESFLSS
S.sanguinis          SHEWRDFKIELRASKRFQHLRCFYFLMIASNAASLVLLCGQSSSELTPLQQLISNSFSAS
S.cristatus          .  *  ::  *  .  ::  .  ::  .  :  :  .  :  *
S.pneumoniae-R6-ComM  FFFLFGDLLIFLPLKKYVRDF-LAMLDKKTVLVLTILATLLFLRNPMTIVSLLIYIGLG
S.mitis                FFFLFGDLLIFLPLKKYMRDF-LAMLDKKTVLVLTILATLLFLRNPMTIVSLLIYIGLG
S.pseudopneumoniae   FFFLFGDLLIFLPLKKYMRDF-LAMLDKKTVLVLTILATLLFLRNPMTIVSLLIYIGLG
S.oralis              FFFLLGVDLLIFLPPDKIFRDI-ENHLNKKKTVVISVLATMVFLRNPVISSILIYISVG
S.infantis            FFFLFGVDLVTFPLKKWRRLQ-KNSSSKEVRFVSIISILIFLRNPITILSIAFYIGLG
S.parasanguinis       FFFLFGLDIATFLPLNKWRKLP-THKKT--GRLLTLIFLSLFLHNPLTIFSVSFIYLLG
S.anginosus          SLFLLGVDIVALVPELRSFIIHFFVSKDQARTSFVIGSLLFILLRNPADLTCFIVYTGLG
S.intermedius        SLFLLGVDVVALVPEVRSYVVRFLFLKQARASFIIGSLIFIVLNRNPADLVCFIYTGGLG
S.sanguinis          SLLLLGIDIAVLSPPAPKFIIDRAFSLRYRKSNGIALGLLCFSLAKNPQETLFCFLSYLVLG
S.cristatus          SLLLLGMDLFGMSSQAK---QNRQMKYRKSNCIVLGLALFAFLKPNPGESSCFIYLSLG
                        ::*:*:*:  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
S.pneumoniae-R6-ComM  LFFAAYLVPNSVKKEVSFYGHIFRDLVIVITLIEF
S.mitis                LFFAAYLVPNSVKKEVSFYGHIFRDLVIVIATLIEF
S.pseudopneumoniae   LFFAAYLVPNSVKKEVSFYGHIFRDLVIVIATLIEF
S.oralis              FLCARFLFPKCIQREISFYGHLIRDILFVFSIVVFF
S.infantis            ALFSLFPLPKNLRQEVSFYGHILIRDILFVVCFTLLW
S.parasanguinis       VSFLNFLFPKTLRQDLSFYSHLIRNILLVLS-----
S.anginosus          SLLSFLISKPTIRLEFSIFSHLVRNSFSLFLIIFW
S.intermedius        LLFSEVIPKSSLRLEFSIFSHLVRNSVSLFLFLIFW
S.sanguinis          LVFAHLLRPFYQRLSMLAHLIRNMIILSLLPFCF
S.cristatus          MAFVQLLKAWVSSLELSLLAHLIRNLLILLPFCF
                        :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```

**Figur 4.1. Sekvenssammenstilling av ComM.** Sammenstilling av aminosyreskvenser av ComM hos ulike *Streptococcus* arter. De predikerte transmembrane segmentene for R6 ComM er vist i gult.

Aminosyresammenstillingen identifiserte flere konserverte aminosyrer i ComM. De fleste er lokalisert i predikerte transmembrane regioner. Blant de konserverte residuene finner man histidin, aspartat, asparagin, arginin og serin, som er kjent å kunne være involvert i enzymatiske reaksjoner (Black 1993; Engelman & Craigie 1992; Pickard et al. 1996; Plummer et al. 2006; Waldow et al. 1999). Homologisøk finner også ofte svak homologi mellom ComM og såkalte Abi proteiner, også kalt CAAX-proteaser (C = cystein, A = alifatisk aminosyre, X = tilfeldig aminosyre). Karakteristisk for Abi proteiner er at de er membranproteiner som har tre konserverte motiver; EEXXXR, FXXXH og HXXXN/D, som antas å til sammen utgjøre det

aktive setet hos Abi proteaser (Pei & Grishin 2001). I eukaryote celler er det kjent at CAAX-proteaser katalyserer kløyvingen mellom C og AAX etter at cystein-residuen har blitt prenylert (Manolaridis et al. 2013; Pryor et al. 2013; Tam et al. 1998). I prokaryoter derimot er funksjonen til disse mindre kjent, men noen Abi proteiner er vist å ha funksjon innenfor immunitet mot bakteriosiner (Kjos et al. 2010). Abi proteinene er utbredt hos bakterier, men hovedandelen av disse proteinene er likevel ikke karakterisert (Straume et al. 2017).

For å få et tydeligere innblikk i likhetene mellom Abi proteiner og ComM ble det også laget en aminosyresekvenssammenstilling av ComM i *S. pneumoniae* stammen R6 mot Abi proteiner hos ulike arter av *Streptococcus*. Sekvenssammenstillingen er vist i figur 4.2.

```

ComM-R6                    -----MKS-----MRILFLALIQISLSSCFWLKECIL
S.pneumoniae1              -----MKEKNMKELNLRAGWILVFLAVLLYQVPLVVTSLT-----
S.pneumoniae2              -----
S.mitis1                    -----
S.mitis2                    -----MTCWKRLMWGGCAFLALALYVLPVPMVQQAET-----
S.sanguinis                 MLAVKNCLYKRRKLSYTRKEEEDMKAILKLEIYITLTLFVLFSLQIPFFIFRQM-----
S.gordonii                  -----MTCWKRLMWGGCVFLALALYVLPVPMVQQAET-----
S.oligofermentans          -----MTCWKRLIHWGCAFLALGLYVLPMLFQQVAII-----
S.cristatus                 -----MTWLKRLVWVGCAFLAMALYVLPMLFQQVAII-----
Streptococcus-sp.DD04      -----MTWWRRLIHWGCVFLALALYMLPMLSQQLAIT-----
S.sinensis                  -----MTWWRRLIHWGCVFLALALYMLPMLFQQLAIT-----
Streptococcus-sp.DD11     -----
S.dentasini                 -----MKGILKKLIAAI----AIIIGLEVVSQTPDLLMIWKKKE--
S.australis                 -----MMENWMEKKWWSNGLWLLIGIPLLLATQLPMLVALILGI-----

ComM-R6                    SFKQSTAFFIGSMVFV---SGICAGVNYLYTRKQEVHSV-----LASKKSVKLFYSML
S.pneumoniae1              -LKEVALLQSGLIVAG--LSIVLALFIMGARKTKLASF-NFSFFRAKDLARLGLSYLVI
S.pneumoniae2              -----MARGLSYLVI
S.mitis1                    -----MGLSYLVI
S.mitis2                    -YQILKQWTIGIGILL--IF-LALLVFIIVAKKIGILSQ-SGKVFQKGDGKRISLSILGM
S.sanguinis                 -TSSEKFSFSAQTIFVLVVYLLIVFVLRMAKQELLSL-DLSFFKWSFQWLAVSVVM
S.gordonii                  -YQISKQWTIGIGILL--IF-LALLIFIVAKKIGILSQ-SGKFFQKGDGKRISLSILGM
S.oligofermentans          -YQFPKQWITDGLGILL--II-LILLVFIIVAKKIGILSP-SGKIFQKGDGKRIALGLLGM
S.cristatus                 -YQFPKQWITDGLGILL--II-LILLVFIIVAKKIGILSP-SGKIFQKGDGKRIALGLLGM
Streptococcus-sp.DD04      -YQFPKQWISIGLGLL--IF-LTLLVFVAVAKKAGILSQ-SGKIFQKGDGKRIALGLLGM
S.sinensis                  -YQFHKQWITIGLGLL--IF-LTLLVFVAVAKKAGILSQ-SGKIFQKGDGKRIALGLLGM
Streptococcus-sp.DD11     -----MAKQEGLLSL-DFSFFGWSVGVGLALSVMVM
S.dentasini                 -NPKLDTWQWLLIMI---LQIIVVIGFYLLARRKELISSGVKHWLSWKTFTVVS LGFIAL
S.australis                 -ENAWSNWTINSLILG--VTMLLVYLLWVFMKWSPLDPL-DFSRTIGRDIRNFLYFLLL

ComM-R6                    LLINLLGAVLVLSDNLFIKNTLQQELVDLPLPSSFFFLFGLDLLIFLPLKYY--VDFLAM
S.pneumoniae1              VGSNILGSILLQLS-NETTANQSQINDMVQNSSLISSFFLLALLAPICEETLCRGIVPK
S.pneumoniae2              VGSNILGSILLQLS-NETTANQSQINDMVQNSSLISSFFLLALLAPIFEEILCRGIVPK
S.mitis1                    ICSNILGSILLQLS-NETTANQSQINDMVQNSSLISSFFLLAVLAPICEEILCRGIVPK
S.mitis2                    FLISILGTALLRWNLGEVTTANQASLIEEFKRGNGILLPIMLGVLAPVVEEIIIFRGIPL
S.sanguinis                 IGVMNLGAIIMLLEGQAI STANQDALNALFQHVPKILLVVGAVIQAPIIEEVVFRGLIPQ
S.gordonii                  FLISILGTALLRWNLGEVTTANQASLIEEFQRNGILLPILGLVLAPEEIIIFRGIPL
S.oligofermentans          LLISVLGTVLLRNLHGEVTTANQASIMEEFRRGDIILLSIMLGVLAPIAEEIIIFRGIPL
S.cristatus                 ILISVLGTVLLRNLHGEVTTANQASIMEEFRRGDIILLSIMLGVLAPIAEEIIIFRGIIPQ
Streptococcus-sp.DD04      LLISVLGTVLLRNLHGEVTTANQASIMEEFRRGDMISFPIMLGVLAPIAEEIIIFRGIPL
S.sinensis                  LLISVLGTVLLRNLHGEVTTANQASIMEEFRRGDMISFPIMLGVLAPIAEEIIIFRGIIPL
Streptococcus-sp.DD11     FGVSILGIVIMMEEGGQIDTANQEAALKQMFKIVPSSILLVVGAVIQAPIIEVAFRGLIAE
S.dentasini                 FIIKLVGGIILTLE-GKTSTNNQEMINQLFENSLLVMEMTIVIIAPLTELIFRGLIPK
S.australis                 LANNIVGATVLRNI-GETTTANQETIQGLSSLAPQLAMGLLIVVWVAPLCEEIIICRAVIPR

ComM-R6                    L-DRKKTIVLVTILATL--LFLRNPMTIVSLLIYIGLGLFFAAYLVPNVSKVEVSFYGHIF
S.pneumoniae1              KIFRGENLGFVVGTVVIFALLHQPSNLPSELLIYGGMSTVLSW-TVYKQRLEMSILLHMI
S.pneumoniae2              KIFRGENLGFVVGTVVIFALLHQPSNLPSELLIYGGMSTVLSW-TAYKQRLEMSILLHMI
S.mitis1                    KIFRGENLGFVVGTVVIFALLHQPSNLPSELLIYGGMSTVLSW-TAYKQRLEMSILLHMI
S.mitis2                    KIFKGYEGWGYIVGGLLFAIFHGPTNIVSFVIYGGSSVILTL-LAYRTRRLEVSIAVHMI
S.sanguinis                 KIFKHYVWGLVVGTVVIFGLFHGPTNIGSFVIYAGMGAVLAA-VAYIFKRLEMSILLHMI
S.gordonii                  KIFKGYEGWGYIVGGLLFAIFHGPTNIMSFVIYGGSSVILTL-LAYRTRRLEVSIAVHMI
S.oligofermentans          KIFKGYESWGYIIGGLLFAIFHGPTNIMSFVIYGGASVILTL-LACRTRRLEVSIAVHMI
S.cristatus                 KIFKGYESWGYIIGGLLFAIFHGPTNIMSFVIYGGASVILTL-LAYRTRRLEVSIAVHMI
Streptococcus-sp.DD04      KIFKGYESWGYIIGGLLFAIFHGPTNIMSFVIYGGSSVILTL-LAYRTRRLEVSIAVHMI
S.sinensis                  KIFKGYESWGYIIGGLLFAIFHGPTNIMSFVIYGGASVILTL-LAYRTRRLEVSIAVHMI
Streptococcus-sp.DD11     KIFAKHSIWGLLVSSILFGLFHGPTNIGSFVLYAGIGGVLAFL-VVYISKREMAVLAFLHMI
S.dentasini                 LFSKRFEGLGFVAGALLFGLLHGPSDIGSFVLYVGMGAVLAV-ICYRFKHEYSILTHAL
S.australis                 LIFKGEKIGYLVGALVFAYLHTPSNLGSWIIYGGMSLILTL-VAYRYKRVESILHFT

ComM-R6                    EDLVLVIVTLIFF-----
S.pneumoniae1              VNGIAFCLLALVIMSRTLGISV
S.pneumoniae2              VNGIAFCLLALVIMSRTLGISV
S.mitis1                    VNGVAFCLLALVIMSRTLGISV
S.mitis2                    NNGLPAIIMLLIGIFGMEV----
S.sanguinis                 RNVAVLIMILTGLVNK-----
S.gordonii                  NNGLPAIIMLLIGIFGMEV----
S.oligofermentans          NNGLPAIIMLLIPILGVEV----
S.cristatus                 NNGLPAIIMLLIPILGVEV----
Streptococcus-sp.DD04      NNGLPAIIMLLITIFGVEV----
S.sinensis                  NNGLPAIIMLLIPIFGVEV----
Streptococcus-sp.DD11     RNVVALLMMLMS-----
S.dentasini                 NNALGFAALLISHLMGS-----
S.australis                 NNAFALFITILVSFLPA-----

```

Figur 4.2. Aminosyresekvenssammenstilling av ComM hos *S. pneumoniae* mot *Abi* proteiner ulike arter av *Streptococcus*. Motivene EEXXXR, FXXXH og HXXXN/D er vist i blått.

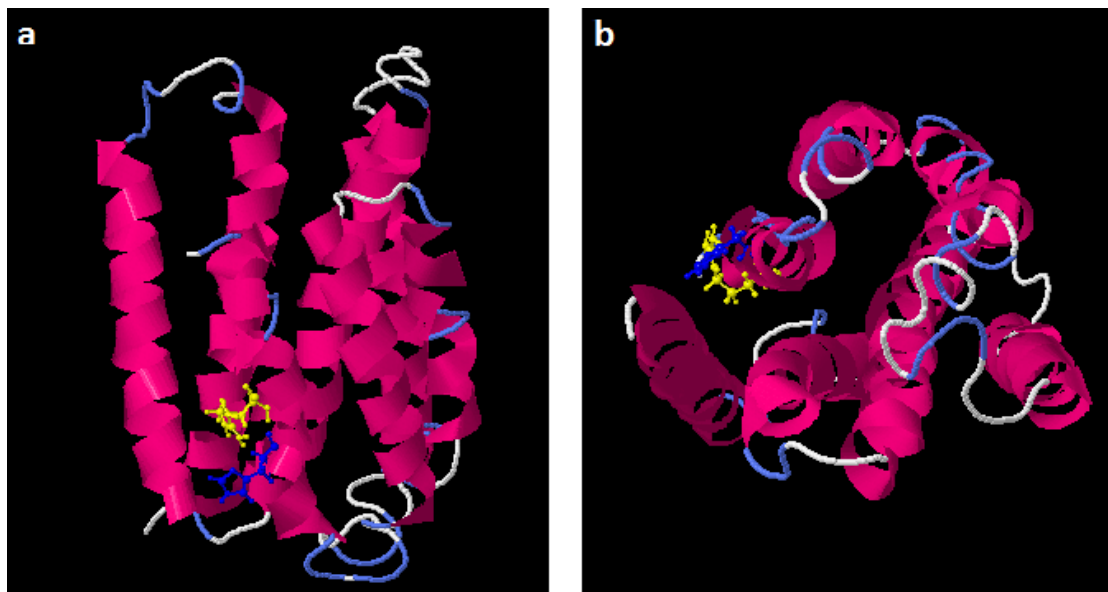


Fra sekvenssammenstillingen i figur 4.2, kan det observeres at ComM har motivet HXXXN/D, men mangler EEXXR- og FXXXH-motivene.

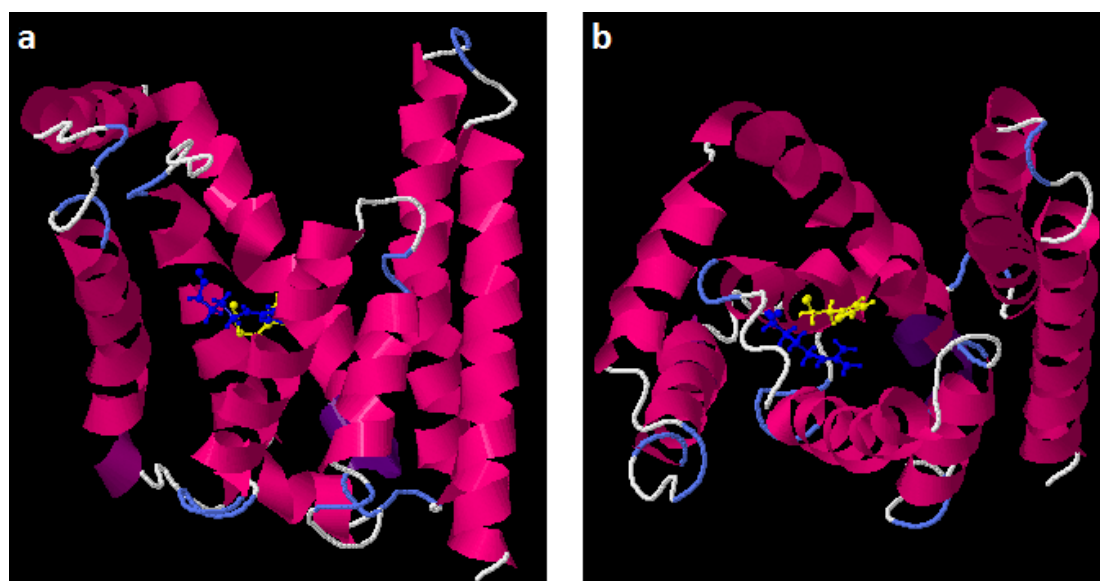
#### **4.2 Predikert 3D-struktur av ComM**

Aminosyresammenstillingene ovenfor avdekket at ComM har flere konserverte aminosyrer, men at disse er spredt utover med ulik avstand i sekvensen. Likevel kan flere av disse være i nær kontakt med hverandre i den foldede 3-dimensjonale strukturen til ComM. For å undersøke dette ble en 3D-struktur for ComM i *S. pneumoniae* predikert ved hjelp av det bioinformatiske programmet I-TASSER. Dette programmet predikerer 3D-strukturer ved å modellere en gitt aminosyresekvens mot allerede kjente strukturer av liknende sekvenser. På denne måten var det lettere å identifisere et mulig katalytisk sete, noe som kunne gi et innblikk i hvordan proteinet fungerte.

ComM fra *S. pneumoniae* R6 ga en relativt dårlig score, og prediksjonen av 3D-strukturen inneholder derfor sannsynligvis en del avvik sammenliknet med den faktiske strukturen til ComM (figur 4.3). Flere ComM-homologer fra andre streptokokkarter ble derfor analysert med I-TASSER, og ComM fra *S. sanguinis* resulterte i en predikert struktur med god score. Det vil si at det er større sannsynlighet for at denne strukturen er mer lik den faktiske strukturen (figur 4.4).



**Figur 4.3.** Predikert proteinstruktur av ComM etter ComM fra *S. pneumoniae* R6. Denne proteinstrukturen ga en relativt dårlig score. De to aminosyrene som det antas kan være del av et katalytisk sete, H191 og R194, er vist i «pinner og kuler». **a:** Sett forfra. **b:** Sett ovenfra.



**Figur 4.4.** Predikert proteinstruktur av ComM etter ComM fra *S. sanguinis*. Denne proteinstrukturen ga en god score. De to aminosyrene som det antas kan være en del av et katalytisk sete, H191 og R194, er vist i «pinner og kuller». **a:** Sett forfra. **b:** Sett ovenfra.

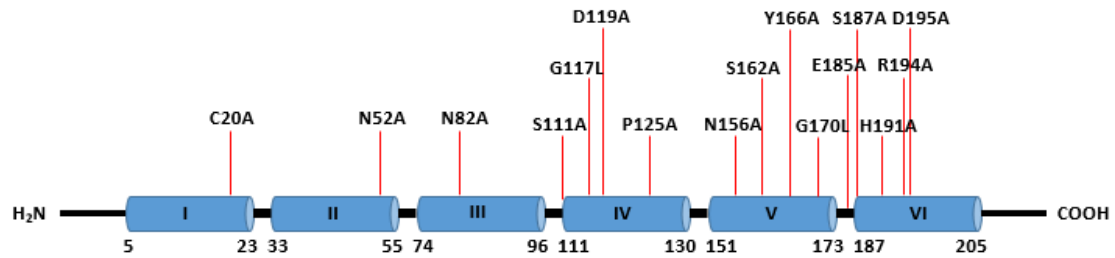
3D-strukturen viser at H191 og R194 i HXXXRN/D-motivet posisjonerer seg sammen på samme side av  $\alpha$ -heliksen i en kløft i ComM fra *S. sanguinis*. For ComM fra *S. pneumoniae* stammen R6 plasseres disse aminosyrene i en utovervendt posisjon fra proteinet. Fra figur 4.2

kan det observeres at de typiske EE aminosyrene man vet er involvert i det katalytiske setet til CAAX-proteaser mangler hos ComM. I stedet finnes aminosyrene lysin og tyrosin i denne posisjonen for ComM. Det kan derfor spekuleres i om andre aminosyrer har erstattet funksjonen til EE eller om ComM har mistet katalytisk aktivitet grunnet manglende EE.

#### **4.3 Aminosyrer i konserverte regioner er essensielle for immunitetsfunksjonen til ComM**

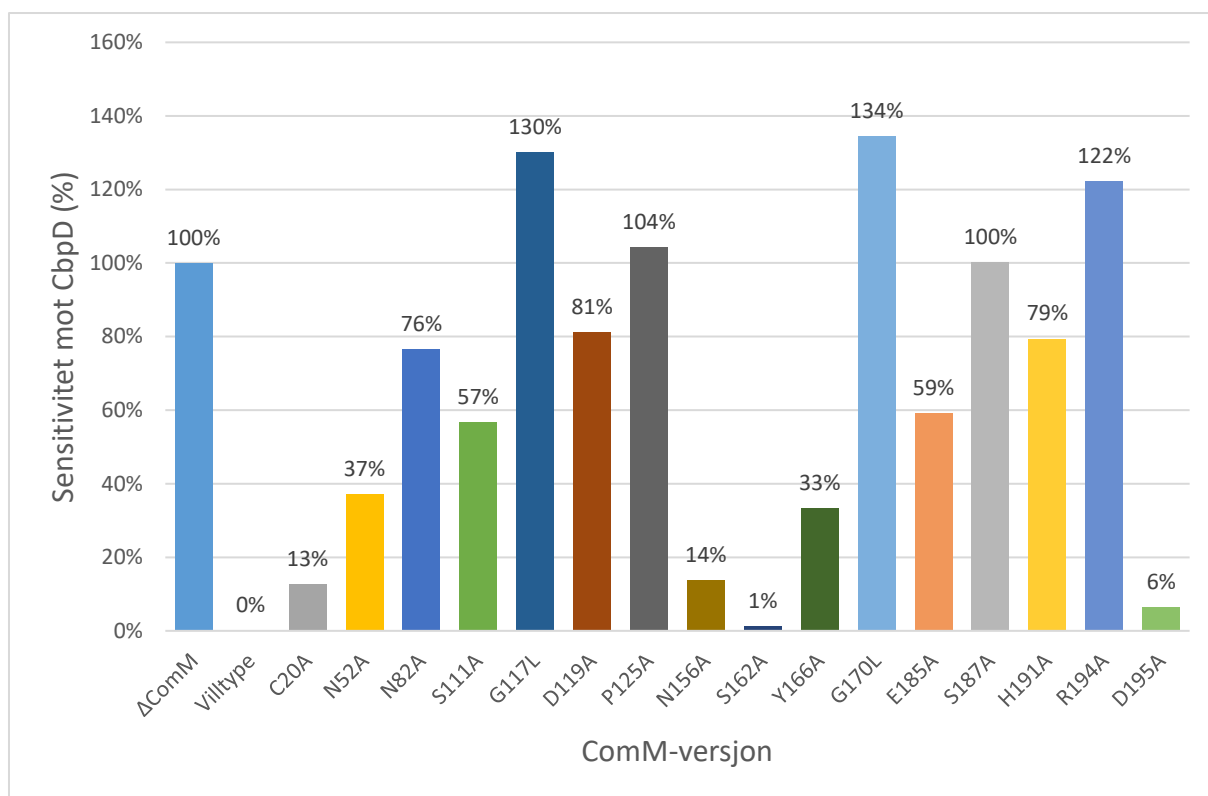
For å undersøke hvilke av de konserverte aminosyrene i ComM som var essensielle for proteinets funksjon, ble disse substituert med alanin eller leusin. Disse aminosyrene er blant de enkleste og har ikke noen ladning eller sidegrupper som kan tilføre proteinet nye egenskaper eller forstyrre proteinet på noen annen måte enn at den opprinnelige aminosyren er blitt byttet ut. De punktmuterte versjonene av ComM ble deretter uttrykt i kompetente *S. pneumoniae*-celler. Dette ble gjort ved overlapp-ekstensjons PCR, som beskrevet i seksjon 3.3.4. Konstruktet etter overlapp-ekstensjons PCR ble satt sammen med fragmentet som lå 1000 bp oppstrøms for *comM* og fragmentet som lå 1000 bp nedstrøms for *comM*, før det ble transformert inn i stammen RH420, som beskrevet i seksjon 3.2.1.1. I denne stammen var nativt ComM erstattet med Janus-kassetten i *comM*-lokuset, og konstruktet fusjonert med oppstrøms og nedstrøms sekvensene ble satt inn i dennes sted.

Hvilke punktmutasjoner som skulle innføres ble bestemt utfra sekvenssammenstillingen (se figur 4.1), hvor aminosyrer i konserverte regioner ble valgt. Det ble også valgt noen aminosyrer som ikke var godt konserverte mellom de ulike artene i sammenstillingen, for å undersøke om mutering av disse hadde noen effekt på ComM sin immunitetsfunksjon. En oversikt over posisjonene til punktmutasjonene som ble testet i denne oppgaven er vist i figur 4.5.



**Figur 4.5. Oversikt over punktmutasjoner innført i ComM.** Figuren viser den predikerte topologien til ComM, med seks transmembrane segmenter, og en oversikt over hvor punktmutasjonene ble innført i ComM i denne oppgaven. Se figur 4.1 for detaljer rundt aminosyresekvensen til ComM og hvilke områder som er konserverte mellom flere streptokokker.

Immunitetsfunksjonen til de punktmuterte versjonene av ComM ble analysert ved å bestemme grad av beskyttelse mot CbpD hos kompetente *S. pneumoniae*-celler. Sytox lysis-assay ble brukt til dette formålet (beskrevet i seksjon 3.9). Cellene ble her dyrket til tidlig eksponentiell fase, før de ble induert med det kompetanse stimulerende peptidet CSP. Grad av lysis hos en  $\Delta$ ComM-mutant ble definert som 100% sensitivitet mot CbpD.

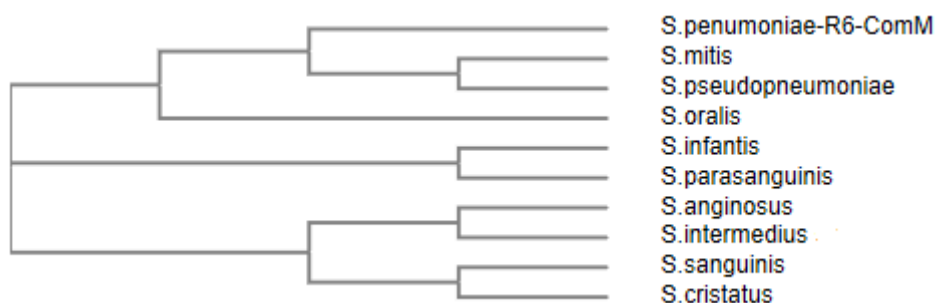


**Figur 4.6. Punktmutasjoners sensitivitet mot CbpD.** Figuren viser grad av sensitivitet mot CbpD i stammene med punktmuterte ComM-versjoner. En  $\Delta$ ComM-mutant ble brukt som mål på 100% sensitivitet, som vil si at ComM ikke gir cellene noen immunitet mot CbpD. Villtype-ComM ble brukt som mål på 0% sensitivitet, som vil si at ComM hadde sin immunitetsfunksjon intakt. Sensitiviteten mot CbpD til de ulike punktmutantene ble deretter beregnet utfra disse, og er vist i stigende rekkefølge etter hvor de befinner seg i aminosyresekvensen.

Punktmuterte versjoner av ComM ga ulik grad av immunitet, men felles for resultatene var at punktmutasjoner i konserverte regioner var essensielle for immunitetsfunksjonen til ComM, mens punktmutasjoner i ikke-konserverte regioner ikke hadde noen dramatisk effekt på immunitetsfunksjonen. Sytox lysis-assay ble gjentatt tre ganger for alle prøvene, for å undersøke om resultatene var reproduserbare.

#### 4.4 ComM fra nært beslektede arter kan gi immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae*

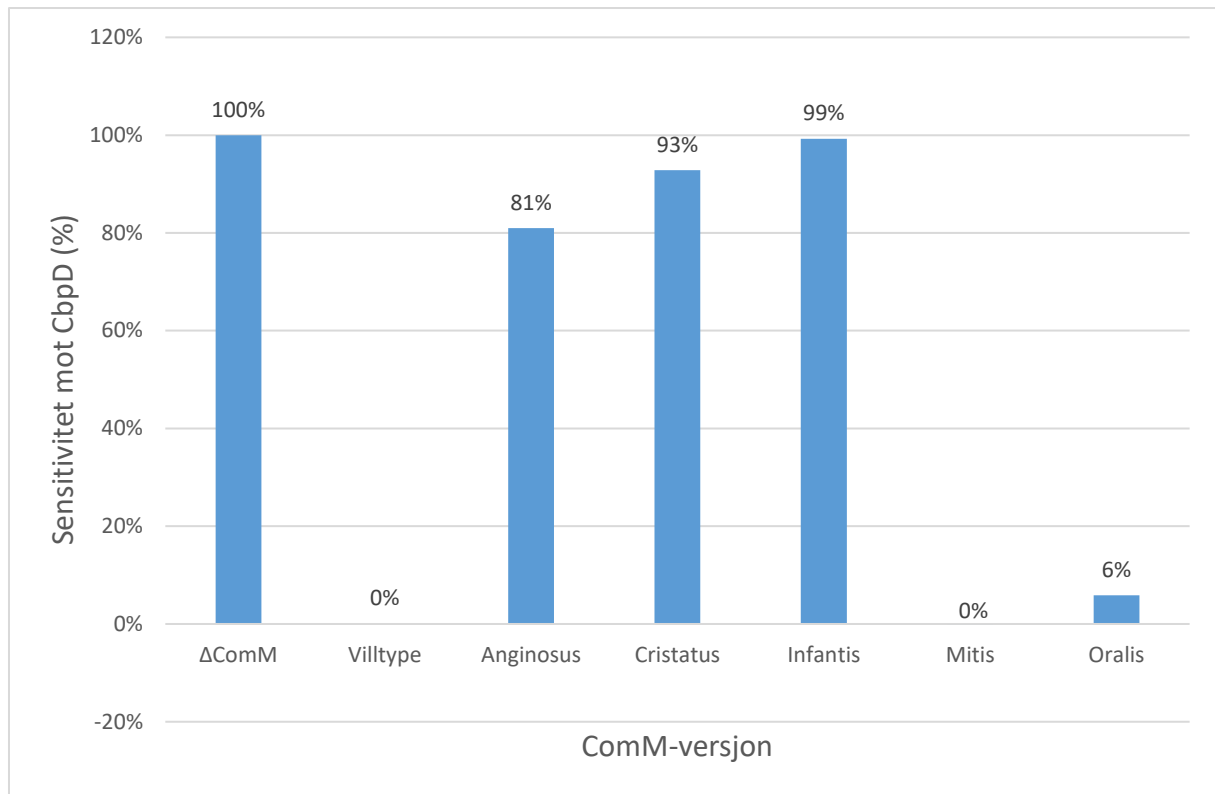
Sammenligning mellom ComM hos *S. pneumoniae* og ComM fra andre arter i slekten *Streptococcus* har vist at flere regioner er konserverte mellom disse (se figur 4.1). Fra sekvenssammenstillingen kunne det beregnes et fylogenetisk slektskap mellom de ulike ComM-homologene hos de ulike artene, som vist i figur 4.7.



**Figur 4.7. Fylogenetisk slektskap mellom ComM-homologene i de ulike artene.** Dendogrammet er basert på Neighbour-joining (NJ), og viser relativt slektskap mellom ComM-homologene i de ulike *Streptococcus* artene. Det fylogenetiske slektskapet mellom ComM-homologene i de ulike artene er videre basert på sekvenssammenstillingen av disse (figur 4.1), og ble konstruert i Clustal Omega.

I denne oppgaven ble nativt ComM hos *S. pneumoniae* byttet ut med ComM fra andre streptokokkarter, for å undersøke om disse også kunne beskytte mot CbpD fra *S. pneumoniae*. På denne måten kunne det undersøkes hvor fjernt beslektet artene kunne være før ComM ikke lenger ga immunitet mot CbpD sekretert fra kompetente pneumokokker. *comM*-genet fra streptokokkartene *S. anginosus*, *S. cristatus*, *S. infantis*, *S. mitis* og *S. oralis* ble satt inn i nativt *comM*-posisjon i genomet til *S. pneumoniae*.

Stammene med ComM fra ulike arter ble analysert ved bruk av Sytox lysis-assay, som beskrevet i seksjon 3.9.1.



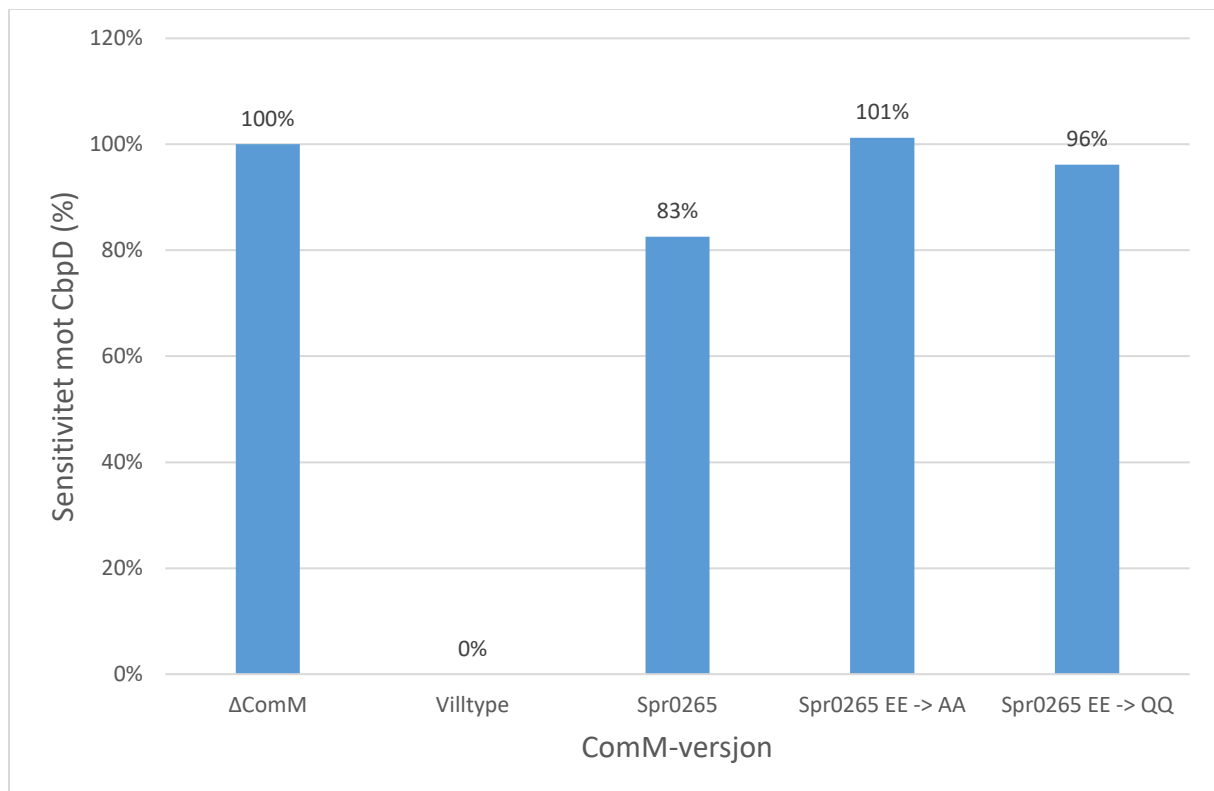
**Figur 4.8. ComM fra andre streptokokkarters effekt på sensitivitet mot CbpD.** Figuren viser grad av sensitivitet mot CbpD i stammene hvor ComM fra andre streptokokkarters var satt inn i stedet for nativt ComM i *S. pneumoniae*. En ΔComM-mutant ble brukt som mål på 100% sensitivitet, mens villtype-ComM ble brukt som mål på 0% sensitivitet. Sensitiviteten mot CbpD ble deretter beregnet ut fra disse.

Felles for resultatene var at ComM fra nært beslektede arter ga de kompetente cellene immunitet mot sekretert CbpD, mens ComM fra fjernere slektninger av *S. pneumoniae* ikke hadde noen immunitetsfunksjon.

#### 4.5 Er ComM en antagonist for CAAX-lignende proteiner?

Fordi ComM ligner noe på CAAX-proteaser (se seksjon 4.1), ville vi teste om et ekte CAAX-protease-lignende protein kunne utføre samme jobb som ComM under kompetanse. På samme måte som beskrevet ovenfor, ble *comM*-genet i *S. pneumoniae* byttet ut med genet *spr0265*, som koder for et CAAX-protease-lignende protein. Dersom Spr0265 hadde immunitetsfunksjon mot CbpD, ville dette styrke teorien om at ComM fungerte som en CAAX-lignende protease.

En annen hypotese vi ville teste, var om ComM fungerer som en antagonist for CAAX-protease-lignende proteiner. Siden ComM mangler EEXXR-motivet, kan man tenke seg at immunitetsfunksjonen virker ved at ComM tar plassen til en CAAX-protease, men uten å ha enzymatisk aktivitet. Dette ble testet ved å innføre punktmutasjoner i det konserverte domenet EEXXH i Spr0265. EE ble mutert til AA eller til QQ.



**Figur 4.9. Det CAAX-protease-lignende proteinet Spr0265 gir ikke cellene immunitet mot CbpD.** Figuren viser grad av sensitivitet mot CbpD når ulike versjoner av det CAAX-protease-lignende proteinet Spr0265 var satt inn hos *S. pneumoniae* i stedet for nativt ComM. En ΔComM-mutant er definert som 100% sensitivitet mot CbpD, og villtype-ComM er definert som 0% sensitivitet mot CbpD. De ulike versjonene av Spr0265 er beregnet ut fra disse.

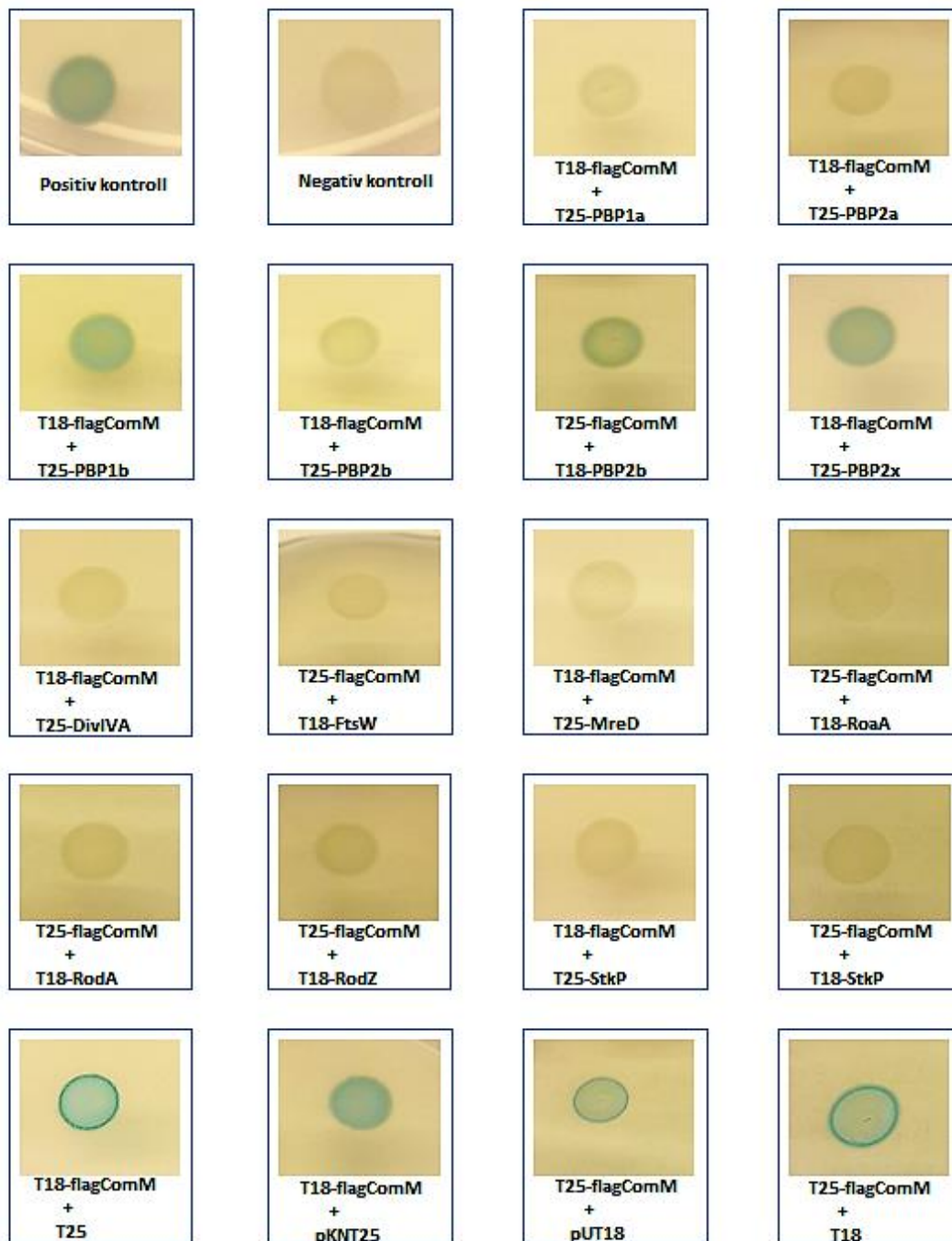
Hverken Spr0265 eller de muterte versjonene av dette proteinet ga cellene immunitet mot CbpD.



#### 4.6 Interagerer ComM med celledelingsproteiner?

CbpD har aktivitet mot den septale delen av celleveggen til ikke-kompetente pneumokokker (Eldholm et al. 2010), og man vet at celler som overuttrykker ComM får multiple delingssoner og delingssoner som er abortert (Straume et al. 2017). Dette indikerer at ComM beskytter den kompetente cellen mot CbpD, ved å interferere med en eller flere komponenter involvert celledeling eller celleveggsyntese. Det ble derfor testet om ComM interagerer direkte med andre proteiner i celledelingsmaskineriet. BACTH-systemet ble benyttet for å studere dette (se seksjon 3.8 for detaljer om BACTH).

Som beskrevet i seksjon 3.8, ble flag-ComM fusjonert til T25/T18 og testet for interaksjon med T18/T25-fusjoner av PBP1a, PBP2a, PBP1b, PBP2b, PBP2x, RodA, RodZ, RoaA (CozE), StkP, FtsW, MreD og DivIVA. Dette ble gjort ved at to plasmid som hver uttrykker et T18-fusjonert og et T25-fusjonert protein, ble co-transformert inn i *E.coli*-stammen BTH101, og «spottet» på agarskåler med LB/X-gal. Det ble også gjort interaksjonsanalyser av flag-ComM fusjonert til T25/T18 mot T18- og T25-domenene alene for å undersøke om flag-ComM interagerer direkte med disse domenene. Plasmidene pKT25/pUT18C ble benyttet som negativ kontroll, mens pKT25-zip/pUT18C-zip ble brukt som positiv kontroll på protein-protein interaksjon. Positiv interaksjon mellom proteinene ble visualisert som blå farge på LB/X-gal skåler, mens negativ test ble visualisert som fargeløs «spot» på skålen. Resultatene fra protein-protein interaksjonene i BACTH-systemet er vist i figur 4.10.

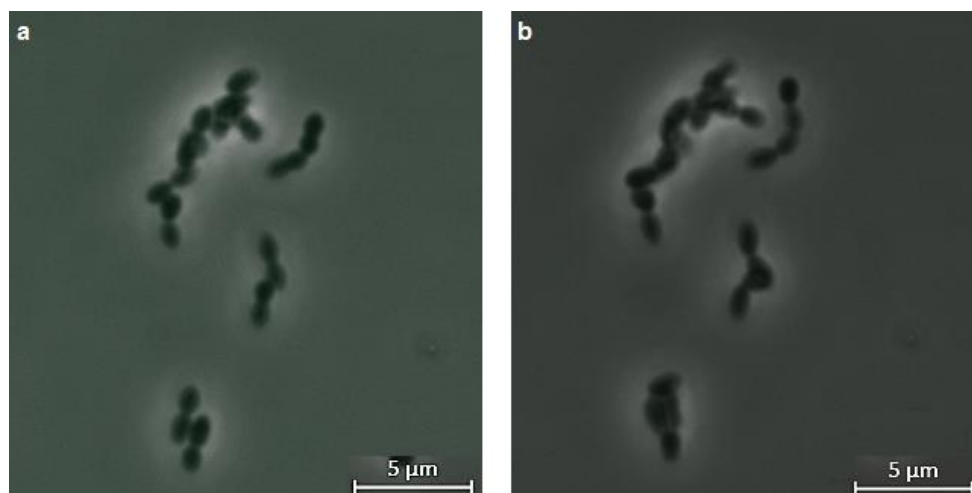


**Figur 4.10. Resultater av BACTH analyse.** Positiv og negativ kontroll øverst i venstre hjørne, etterfulgt av respektive protein-protein interaksjonstester. Positive tester har den karakteristiske blåfargen som positiv kontroll ved vekst på LB/X-gal agarskåler, og i denne oppgaven omfatter disse T18-flagComM + T25-PBP1b, T25-flagComM + T18-PBP2b, T18-flagComM + T25-PBP2x, T18-flagComM + T25, T18-flagComM + pKNT25, T25-flagComM + pUT18 og T25-flagComM + T18. De resterende interaksjonene var negative.

Figur 4.10 viser at flag-ComM hadde interaksjon med PBP1b, PBP2x og PBP2b (kun når fusjonert til T18). Dette resultatet må tolkes med varsomhet, siden det også ble påvist at flag-ComM interagerer direkte med de to T18/T25 domenene. Det ble derimot ikke påvist noen protein-protein interaksjon mellom flag-ComM og celledelingsproteinene PBP1a, PBP2a, PBP2b (fusjonert til T25), DivIVA, FtsW, MreD, RoaA (CozE), RodA, RodZ eller StkP.

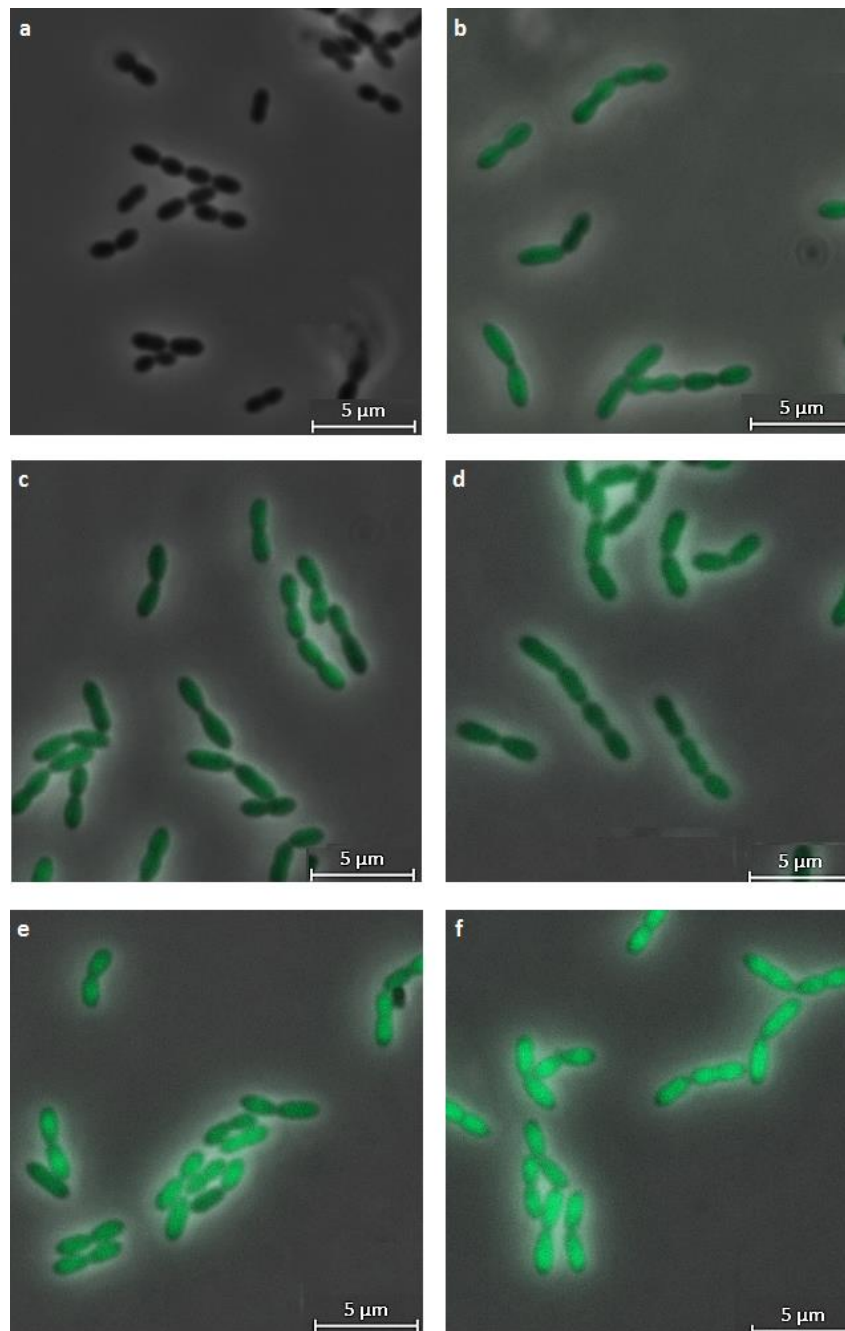
#### 4.7 Lokaliseringsstudier av GFP-ComM

Tidligere ComM-overekspresjonsstudier (Straume et al. 2017) og protein-protein interaksjonsresultatene i denne studien peker mot at ComM utfører sin funksjon i cellen der det skjer aktiv celleveggsyntese. Dersom dette er tilfellet, vil det være sannsynlig at ComM lokaliserer til den septale delen hos *S. pneumoniae*. For å undersøke hvor ComM befinner seg i cellen under celledeling, ble preparater av *S. pneumoniae* som uttrykker GFP-ComM analysert ved hjelp av kombinert fasekontrast-mikroskopi og fluorescensmikroskopi, som beskrevet i seksjon 3.14.1.1. Forsøk på å lokalisere GFP-ComM i celler som uttrykte fusjonsproteinet fra den kompetanseinduserte  $P_{comM}$ -promotoren (stamme DS269) ga negative resultater. Det ble benyttet et time-lapse program, hvor det ble tatt bilder av cellene hvert minutt i 25 minutter, men det var ikke mulig å detektere GFP-signal i disse cellene (figur 4.11). Dette kan tyde på at GFP-ComM ikke blir høyt nok uttrykt fra denne promotoren til at det kunne observeres.



**Figur 4.11. Mikroskopibilder av DS269 induisert med CSP. a:** t = 0 minutter. **b:** t = 25 minutter etter induksjon med CSP.

Fordi GFP-ComM uttrykt fra nativ  $P_{comM}$ -promoter ikke ga noe fluorescenssignal, ble også stammen VL15 testet. I denne stammen var ComM-GFP satt inn bak  $P_{comX}$  i ComRS-systemet, som beskrevet i seksjon 3.14.2. Dette er en sterkere promoter enn  $P_{comM}$ . Overekspressjon av GFP-ComM ble induert ved å tilsette 0,2  $\mu$ M ComS til cellene, som beskrevet i seksjon 3.14.1.1. Cellene ble mikroskopert 30, 45, 60, 75 og 90 minutter etter induksjon. Før cellene ble analysert i mikroskopet fikk de vokse med ComS i 30 minutter. Som kontroll ble også uinduserte celler analysert. Resultatene fra mikroskopi av overuttrykk av GFP-ComM og uinduserte celler er vist i figur 4.12.



**Figur 4.12. Mikroskopibilder av VL15. a:** Uinduserte celler. **b:** 30 minutter etter induksjon. **c:** 45 minutter etter induksjon. **d:** 60 minutter etter induksjon. **e:** 75 minutter etter induksjon. **f:** 90 minutter etter induksjon.

Signalet fra GFP-ComM økte gradvis desto lenger cellene var indusert med ComS, men det ble ikke påvist noen distinkt subcellulær lokalisering av GFP-ComM. Fluorescenssignal kunne detekteres i hele cellen. Uinduserte celler ga ikke fluorescens.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Konserverte aminosyrer i ComM er viktige for proteinets immunitetsfunksjon

ComM er et immunitetsprotein som gir kompetente celler av *S. pneumoniae* immunitet mot fratricinet CbpD under fratricide (Håvarstein et al. 2006). Mekanismen bak denne immuniteten er ukjent, men det antas at ComM enten modifierer substratet til CbpD i celleveggen, eller hindrer CbpD i å utføre katalytisk aktivitet. Disse hypotesene styrkes av at ComM er et membranprotein, mens CbpD blir sekretert fra kompetente celler, noe som gjør det lite trolig at disse proteinene er i direkte kontakt med hverandre (Straume et al. 2015). I denne oppgaven ble punktmutasjoner innført i *comM*-genet, for å undersøke hvilke aminosyrer som var viktige for proteinets immunitetsfunksjon. Dette kunne gi et klarere bilde på mekanismen bak selve immunitetsfunksjonen. Det ble kartlagt hvilke regioner i proteinet som var konserverte mellom ulike streptokokker (se figur 4.1), og dermed antagelig var viktige for proteinets funksjon, da regioner som er viktige for et proteins funksjon ofte er konserverte gjennom evolusjonen. Sytox lysis-assay (se seksjon 3.9.1) ble i denne oppgaven benyttet for å undersøke om punktmutanter av ComM hadde immunitetsfunksjonen intakt. Dersom uttrykk av de punktmuterte versjonene av ComM ikke ga cellene immunitet mot CbpD under kompetanse, var dette et tegn på at den aktuelle aminosyren som var byttet ut var viktig for ComM sin funksjon. Som forventet førte substitusjoner av konserverte aminosyrer i ComM til at proteinet mistet delvis eller helt sin immunitetsfunksjon mot fratricinet CbpD, mens substitusjon av ikke-konserverte aminosyrer hadde liten effekt (figur 4.6). Resultatene viser tydelig at noen av aminosyrene er viktigere for ComM-funksjonen enn andre. Dersom man antar at ComM virker som et enzym, kan dataene tolkes dithen at residuene som er 100% essensielle for ComM-aktivitet har med substratgjenkjenning og/eller enzymatisk aktivitet å gjøre. Dette er fordi mutasjoner av katalytiske aktive eller substratgjenkjennende aminosyrer som regel inaktiverer enzymer 100% (Huang et al. 1997; Li et al. 1994). Dersom ComM ikke er et enzym, betyr det at disse aminosyrene har en ekstremt viktig rolle for ComM-struktur eller protein-protein interaksjoner. Basert på resultatene i denne studien kan det ikke trekkes konklusjoner på at den ene forklaringen er riktig fremfor den andre. Likevel tyder 3D-modelleringen av ComM fra *S. sanguinis*, der H191 og R194 danner et potensielt katalytisk sete, på at ComM fungerer som et enzym. Noen av de muterte versjonene av ComM gjorde at *S. pneumoniae* ble mer sensitiv mot CbpD enn  $\Delta$ ComM-celler (>100% lysis). Disse funnene var uforventede og vanskelige å tolke. En mulig forklaring, forutsatt at ComM fungerer som et enzym, kan være at disse muterte versjonene av ComM har mistet sin katalytiske aktivitet, men likevel har mulighet til å binde

sitt substrat. En slik situasjon kan gi en additiv effekt som følge av at immunitet ikke oppnås, samt at substratet bli utilgjengelig for andre viktige prosesser i cellen, noe som også er foreslått av Straume og hans kolleger (Straume et al. 2017).

## **5.2 ComM fra nært beslektede arter kan gi immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae***

Det er vist at kompetente *S. pneumoniae*-celler kan lysere nært beslektede arter ved hjelp av fratricide-mekanismen (Eldholm et al. 2010; Johnsborg et al. 2008; Steinmoen et al. 2002). CbpD er en murein hydrolase, som vil si at den bryter ned peptidoglykan i celleveggen hos bakterier. For at CbpD skal kunne lysere andre ikke-immune celler, er disse cellene nødt til å ha kolin i tekoinsyrene på overflaten, som det kolin-bindende (CBD)-domenet i CbpD kan binde til (Eldholm et al. 2010). Studier av tekoinsyrestrukturer på overflaten av cellene hos ulike streptokokker har vist mye diversitet, mens tekoinsyrestrukturen hos *S. pneumoniae* og de nært beslektede kommensale artene *S. mitis* og *S. oralis* har mye til felles (Denapaite et al. 2012). I denne studien ble det derfor testet om ComM fra andre streptokokkarter kunne gi immunitet hos *S. pneumoniae*, og hvor langt bort man måtte gå fylogenetisk sett før ComM fra disse artene mistet immunitetsfunksjonen i pneumokokker. Dette ble gjort ved å sette inn ComM fra andre streptokokker i stedet for nativt ComM i *comM*-loket hos *S. pneumoniae*. Det ble valgt ComM fra noen nært beslektede arter og noen fjernere beslektede arter for å teste dette. Fra figur 4.8 kan det observeres at ComM fra artene *S. mitis* og *S. oralis* ga immunitet mot CbpD i kompetente celler av *S. pneumoniae*. Som nevnt over er disse kommensale artene nært beslektet til *S. pneumoniae*, og har lignende tekoinsyresekvenser, noe som er avgjørende for at CbpD skal kunne binde til disse. ComM fra *S. anginosus*, *S. cristatus* og *S. infantis* derimot, ga ikke immunitet mot CbpD i kompetente pneumokokker. Disse er fjernere beslektet til *S. pneumoniae*, og resultatene er derfor som forventet. Det var likevel litt uforventet at ComM fra *S. infantis* ikke ga noen immunitet hos *S. pneumoniae*, da begge disse artene er plassert i *mitis*-gruppen (se figur 1.1), og dermed er nokså nært beslektet (Kawamura et al. 1998). Likevel er ikke disse to like nært beslektet som *S. pneumoniae* er til *S. mitis* og *S. oralis*. Funnene i denne oppgaven viser at ComM fra nært beslektede arter også gir immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae*, mens fylogenetisk sett er det ikke mulig å bevege seg lenger enn til *S. infantis* før immunitetsfunksjonen forsvinner.

Resultatene betyr at aktiviteten til ComM virker mot en svært spesifikk mekanisme eller prosess hos den kompetente cellen, og at ComM-homologer fra fjernt beslektede arter ikke gjenkjenner disse i *S. pneumoniae*. Det er fristende å spekulere i om ComM har utviklet seg i takt med endringer i tekoinsyrestruktur hos ulike streptokokker, men en slik konklusjon kan foreløpig ikke trekkes siden man kun kjenner tekoinsyrestrukturen til noen få streptokokkarter. Det at et fratricin kun kan lysere nært beslektede arter med liknende tekoinsyrestruktur (Johnsborg & Håvarstein 2009), og at ComM også kan fungere mellom disse artene, stemmer godt med teorien om at fratricide-mekanismen sannsynligvis har utviklet seg til å være en svært artsspesifikk mekanisme for ervervelse av homologt DNA til den kompetente cellen (Johnsborg & Håvarstein 2009).

### **5.3 Den CAAX-lignende proteasen Spr0265 gir ikke immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae***

CAAX-proteaser er en proteinfamilie som inneholder tre karakteristiske katalytiske motiver; EEEXXR, FXXXH og HXXXN/D. Disse tre motivene utgjør til sammen det aktive setet hos CAAX-proteaser (Pei & Grishin 2001). ComM deler noe homologi med CAAX-proteaser, ved at det innehar motivet HXXXN/D, som vist i figur 4.2. På bakgrunn av dette ble den CAAX-lignende proteasen Spr0265 (fra *S. pneumoniae*) i denne oppgaven satt inn i stedet for ComM i *comM*-lokuset i *S. pneumoniae*. Dette ble gjort for å undersøke om CAAX-proteaser kan gi kompetente celler immunitet mot CbpD, og dermed inneha samme funksjon som immunitetsproteinet ComM. I tillegg, for å undersøke om ComM har en CAAX-antagonerende funksjon, ble de to glutamat-residuene i det katalytiske motivet EEEXXR hos Spr0265 mutert til AA eller QQ. Disse versjonene av Spr0265 manglet dermed EEEXXR-motivet slik som ComM, og kunne derfor kanskje ha ervervet en liknende funksjon som ComM. Verken det native Spr0265-proteinet eller de punktmuterte versjonene ga immunitet mot CbpD, noe som mest sannsynlig tyder på at proteinet ikke har samme funksjon som ComM, til tross for den delte homologien. Likevel, dersom Spr0265 bare har delvis overlappende aktivitet som ComM, kan det hende at proteinet trenger å bli uttrykt i høyere grad for å kunne gi beskyttelse mot CbpD. Transkribering av det tidlige *com*-genet *comM* er initieres med en gang cellene blir induisert til kompetanse, og har sitt toppunkt etter omtrent 5 minutter, før den hurtig nedreguleres. Etter 15 – 20 minutter er ekspresjonen på et basalt nivå (Alloing et al. 1998; Dagkessamanskaia et al. 2004; Peterson et al. 2000; Peterson et al. 2004). Siden *spr0265* ble



uttrykt med *comM*-genets native promotor i dette forsøket, kan det tenkes at *spr0265* må transkriberes i større grad for at proteinet Spr0265 skal ha en funksjonell katalytisk aktivitet.

#### 5.4 Interaksjoner mellom ComM og proteiner involvert i celledelingsmaskineriet

CbpD angriper celleveggen i septum (Eldholm et al. 2010). Fordi CbpD og ComM mest sannsynlig ikke er i direkte fysisk kontakt med hverandre, kan det antas at ComM har en funksjon som er relatert til proteinene i den laterale eller septale celleveggsyntesen. I denne oppgaven ble dette undersøkt ved å studere protein-protein interaksjoner ved hjelp av BACTH-systemet (se seksjon 3.8). I dette systemet ble det testet om flag-ComM interagerer direkte med andre proteiner som man vet er involvert i celledeling og celleveggsyntesen hos *S. pneumoniae*. Fra figur 4.10 kan det observeres at flag-ComM hadde interaksjon med PBP2x, som er nøkkelkomponenten i den septale celledelingen (Massidda et al. 2013). Denne interaksjonen er en sterk indikator på at ComM har funksjon i den septale celledelingen. Fra figur 4.10 kan det også observeres at flag-ComM hadde interaksjon med PBP2b, men kun når dette proteinet var fusjonert til T18. PBP2b er nøkkelkomponenten i den perifere celledelingen (Massidda et al. 2013). Studier har vist at depleksjon av *pbp2b* hos *S. pneumoniae* fører til at ComM ikke lenger kan gi immunitet, og at cellene blir hypersensitive mot CbpD (Straume et al. 2016). Ikke-publiserte studier utført av Dr. Stamsås og hennes kollegaer i samme laboratorium som denne studien ble utført, har vist at depleksjon av *pbp2x* fører til at  $\Delta$ ComM-celler blir immune. Disse studiene tyder derfor på at begge disse interaksjonene kan være reelle, og at ComM dermed interagerer både med PBP2x og PBP2b. Det kan tenkes at ComM interagerer med begge disse proteinene i kompetente celler for å sette hele celledelingsmaskineriet i «arrest». En slik mekanisme ville betyde at CbpD kun angriper celler i aktiv deling, men dette blir kun spekulasjoner som krever videre testing for validering. Figur 4.10 viser også at flag-ComM hadde interaksjon med PBP1b. Denne PBP'en har både transglykosylase- og transpeptidaseaktivitet, og er med på å syntetisere peptidoglykan (Zapun et al. 2013). Likevel er den spesifikke rollen til dette proteinet i celleveggsyntesen noe uklar, siden klasse A PBP'er har overlappende funksjoner (Hoskins et al. 1999). Nylig ble det funnet at PBP1b interagerer med et enzym kalt MltG, som sannsynligvis er en terminase av peptidoglykansyntese (Yunck et al. 2016). MltG er også vist å være en viktig komponent for lateral celleveggsyntese (Tsui et al. 2016), noe som også plasserer PBP1b i denne prosessen. Oppsummert viste BACTH-dataene at flag-ComM interagerer med tre ulike PBP'er: PBP2x som er essensiell for septal peptidoglykansyntese, og PBP2b og PBP1b som er viktige for lateral peptidoglykansyntese.

Hvorvidt disse interaksjonene er reelle og påvirker celledeling hos *S. pneumoniae* krever videre studier. Testene hvor flag-ComM ble testet for interaksjon med T18- og T25-domenene direkte var positive, og understreker at disse resultatene må tolkes med varsomhet. Det kan tenkes at å benytte BACTH-systemet for å studere interaksjoner mellom flag-ComM og andre proteiner ikke er optimalt. Siden ComM er et membranprotein, kan det skape utfordringer med tanke på å få uttrykt et riktig foldet fusjonsprotein i *E. coli*-verten. Flag-taggen ble derfor inkludert for å kunne immunodetekttere uttrykket av T18/T25-ComM i membranfraksjonen fra *E. coli*-cellene brukt i BACTH-forsøkene. I tillegg har Flag-taggen mange negative ladninger (5 aspartat-residuer), og det kan tenkes at disse forårsaker uspesifikke interaksjoner mellom flag-ComM og T18/T25-domenene.

Det viste seg at flag-ComM var vanskelig å detekttere i membranene (Vedlegg C). Dette kan skyldes misfolding av ComM, eller at det blir raskt degradert i *E. coli*. I proteinekstrakter fra hele celler, derimot, kunne et svakt bånd av flag-ComM skimtes på immunoblottet (Vedlegg C), både i induserte og uinduserte celler. Disse båndene har rett størrelse, da T18-ComM har en størrelse på 47 kDa, og de nevnte båndene ligger mellom 40 og 50 kDa. Dette kan tyde på at ComM faktisk ikke går inn i membranen hos *E. coli*, noe som igjen gjør at resultatene fra BACTH ikke viser det reelle bildet på hvilke proteiner ComM interagerer med i celledelingsmaskineriet. Videre interaksjonsstudier av ComM kreves for å kunne trekke noen klare slutninger.

### **5.5 Lokalisering av GFP-ComM under celledeling**

Som nevnt tidligere angriper CbpD celleveggen i det septale området hos ikke-kompetente celler, og BACTH-resultatene hinter også om at ComM kan interagere med flere proteiner i celledelingsmaskineriet. I denne oppgaven ble det derfor undersøkt om ComM også lokaliserer til delingssonen. Det var ikke mulig å detekttere noe fluorescenssignal fra GFP-ComM når det ble uttrykt fra nativ  $P_{comM}$  -promotor under kompetanse. Grunnen til dette er sannsynligvis at nativt ComM blir lavt uttrykt, og at tilstedeværelsen av ComM i kompetente celler er veldig transient. ComM degraderes raskt i kompetente celler. Det er vist at ComM-nivået i kompetente celler synker dramatisk 10 – 15 minutter etter kompetanseinduksjon (Straume et al. 2017). Det samme kan man anta at skjer med GFP-ComM, og mengdene av «fritt» GFP i cellene som følge av ComM-degradering var ikke høyt nok til å detekteres. En stamme hvor GFP-ComM var satt

inn bak  $P_{comX}$ -promotoren i ComRS-systemet ble derfor undersøkt, for å sjekke om overuttrykk av GFP-ComM ville gi sterkere signal og en pekepinn på hvor ComM lokaliserer i cellene. Celler som uttrykte GFP-ComM ektopisk fra  $P_{comX}$ -promotoren hadde fluorescenssignal i hele cellene (Figur 4.12). Dette kan tolkes på to måter: (i) ComM lokaliserer normalt i hele membranen hos cellene, eller (ii) fluorescenssignalet var et resultat av at ComM raskt blir degradert, som nevnt ovenfor, og at det derfor bare er GFP som har blitt frigjort fra ComM som observeres i cellene. For å bekrefte eller avkrefte sistnevnte, kunne man utført konfokalmikroskopi av cellene. Det ville avdekket om fluorescenssignalet var i cytoplasma, eller bare i cellemembranen. Det er lite sannsynlig at resultatet er grunnet misfolding av GFP-ComM, siden det er vist tidligere at denne gir immunitet mot CbpD (Straume, D. upublisert data). Stammen som ble undersøkt var ikke kompetent, men dette burde ikke påvirke lokaliseringen av ComM, siden konstitutivt uttrykk av ComM alene gjør ikke-kompetente pneumokokker 100% immune (Straume et al. 2017). Så hvis man antar at ComM faktisk lokaliseres i hele cellemembranen til immune celler, hvordan kan dette beskytte mot CbpD? Det har vært spekulert i om ComM kan fungere som en vannpore i den korte perioden den er tilstede, slik at turgortrykket synker, og cellene kan motstå lysis når CbpD påfører celleveggen skader. En annen teori baserer seg på at CbpD hemmes av divalente kationer (Straume, D. upubliserte data), og at ComM sin funksjon er å slippe ut slike ioner fra cellene. Likevel, med tanke på at ComM har slektskap til CAAX-proteaser, at ComM-funksjonen er avhengig av artsspesifisitet, og at overuttrykk av ComM har sterk påvirkning på celledelingsmaskineriet, er disse hypotesene lite sannsynlige. Identifiseringen av det typiske CAAX-protease motivet HXXXRD/N med H191 og R194 som predikeres å orientere seg i et katalytisk sete, og at alaninsubstitusjoner av disse inaktiverer ComM, peker mot en enzymatisk- eller spesifikk interaksjons-/substratbindingsfunksjon for ComM.

## 6 Konklusjon og videre studier

Fra denne studien kan det ikke trekkes noen klare konklusjoner, da alle resultatene krever videre studier for validering. Resultatene peker i retning mot at ComM har enzymatisk eller substratbindende aktivitet, og mye tyder på at ComM fra nært beslektede stammer kan gi immunitet mot CbpD hos *S. pneumoniae*. Det ble ikke vist at ComM er en antagonist for det CAAX-protease-lignende proteinet Spr0265 i denne studien, men likevel er det interessant å følge dette videre. En mulighet for videre arbeid kan være å sette *spr0265*-genet inn i en annen del av genomet til *S. pneumoniae*, slik at transkripsjonen øker. Dette kan for eksempel være bak  $P_{comX}$ -promotoren i ComRS-systemet, for å undersøke om overuttrykk av dette genet har noen effekt på proteinets katalytiske aktivitet. Fordi BACTH-resultatene var interessante, men det ser ut til at flag-ComM ikke går inn i membranen hos *E. coli*, kunne det ha vært hensiktsmessig å teste ComM uten flag-tag for protein-protein interaksjoner i BACTH-systemet, for å prøve å undersøke om interaksjonene funnet i denne oppgaven er reelle. Samt teste om de punktmuterte inaktive versjonene av ComM mister interaksjon med PBP2x, PBP2b eller PBP1b. For å undersøke hvilke proteiner som ComM har interaksjon med kunne det også ha vært en idé å kjøre en Pull-down for affinitetsrensing av ComM, og undersøke om andre proteiner som binder ComM følger med i denne rensesprosessen. Mye ComM er toksisk for cellene. Det kunne derfor ha vært interessant å overuttrykke ComM i *S. pneumoniae* for å tvinge fram suppressormutanter. Mutanter som viser seg å tåle høye nivåer av ComM kunne så genomsekvenseres, for å identifisere de muterte genene. Undersøkelser på om ComM kan påvirke mengden tekoinsyre i celleveggen er også en spennende hypotese det går an å ta med i videre studier, hvor det kan bli utført immunoblot på celleekstrakter fra immune og ikke-immune celler. Lipotekoinsyre kunne deretter ha blitt detektert med anti-lipotekoinsyre antistoff, noe som kan kjøpes kommersielt, og mengden tekoinsyre i celleekstraktene fra immune og ikke-immune celler kan sammenlignes.

## 7 Referanser

- Alloing, G., Martin, B., Granadel, C. & Claverys, J. P. (1998). Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol Microbiol*, 29 (1): 75-83.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M. & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of Experimental Medicine*, 79 (2): 137.
- Bartual, S. G., Straume, D., Stamsås, G. A., Muñoz, I. G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L. S. & Hermoso, J. A. (2014). Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications*, 5: 3842.
- Bateman, A. & Rawlings, N. D. (2003). The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*, 28 (5): 234-237.
- Battesti, A. & Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, 58 (4): 325-334.
- Berg, K. H., Bjørnstad, T. J., Straume, D. & Håvarstein, L. S. (2011). Peptide-Regulated Gene Depletion System Developed for Use in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 193 (19): 5207-5215.
- Berg, K. H., Bjørnstad, T. J., Johnsborg, O. & Håvarstein, L. S. (2012). Properties and Biological Role of Streptococcal Fratricins. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (10): 3515-3522.
- Berg, K. H., Stamsås, G. A., Straume, D. & Havarstein, L. S. (2013). Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Journal of Bacteriology*, 195 (19): 4342-4354.
- Black, M. T. (1993). Evidence that the catalytic activity of prokaryote leader peptidase depends upon the operation of a serine-lysine catalytic dyad. *Journal of Bacteriology*, 175 (16): 4957-4961.
- Bogaert, D., de Groot, R. & Hermans, P. W. M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4 (3): 144-154.
- Brantl, S. & Brückner, R. (2014). Small regulatory RNAs from low-GC Gram-positive bacteria. *RNA Biology*, 11 (5): 443-456.
- Bui, N. K., Eberhardt, A., Vollmer, D., Kern, T., Bougault, C., Tomasz, A., Simorre, J.-P. & Vollmer, W. (2012). Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. *Analytical Biochemistry*, 421 (2): 657-666.
- Cabeen, M. T. & Jacobs-Wagner, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nature Reviews. Microbiology*, 3 (8): 601-610.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J. & Claverys, J. P. (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Mol Microbiol*, 51 (4): 1071-86.
- Denapaite, D., Brückner, R., Hakenbeck, R. & Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of Teichoic Acids in *Streptococcus pneumoniae* and Closely Related Species: Lessons from Genomes. *Microbial Drug Resistance*, 18 (344-358).
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H. S. & Håvarstein, L. S. (2009). Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology*, 155 (7): 2223-2234.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Ohnstad, H. S., Berg, K. H., Hermoso, J. A. & Håvarstein, L. S. (2010). Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Molecular Microbiology*, 76 (4): 905-917.
- Engelman, A. & Craigie, R. (1992). Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J Virol*, 66 (11): 6361-9.

- Euromedex. (2016). *BACTH System Kit - Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit*.  
Tilgjengelig fra:  
[http://static.bioport.cn/data/upload/product/specification/396/1342594983673\\_396560.pdf](http://static.bioport.cn/data/upload/product/specification/396/1342594983673_396560.pdf)
- Fenton, A. K., Mortaji, L. E., Lau, D. T., Rudner, D. Z. & Bernhardt, T. G. (2016). CozE is a member of the MreCD complex that directs cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Microbiol*, 2: 16237.
- Filipe, S. R. & Tomasz, A. (2000). Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (9): 4891-4896.
- Fischer, W., Behr, T., Hartmann, R., Peter-Katalinic, J. & Egge, H. (1993). Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *European Journal of Biochemistry*, 215 (3): 851-857.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., et al. (2014). MapZ beacons the division sites and positions FtsZ-rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*, 516 (7530): 259-262.
- Froger, A. & Hall, J. E. (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments* (6): e253.
- Garcia-Bustos, J. F., Chait, B. T. & Tomasz, A. (1987). Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 262 (32): 15400-15405.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G. (2004). *Taxonomic outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, Second Edition*. New York: Springer, for Bergey's Manual® Trust. 399 s.
- GeneON. (2009). *GREEN DNA-RNA-dye (20000x in water) - High level sensitivity, substitute to ethidium bromide*. Tilgjengelig fra: [http://www.taq-dna.com/rich\\_files/attachments/P5000\\_GREEN-DNA-RNA-dye.pdf](http://www.taq-dna.com/rich_files/attachments/P5000_GREEN-DNA-RNA-dye.pdf).
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene*, 27 (2): 113-159.
- Hardie, J. M. & Whiley, R. A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 83 (S1): 1S-11S.
- Heckman, K. L. & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2 (4): 924-932.
- Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 16 (15): 7351-7367.
- Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D. L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T. I., Nicas, T. I. & Jaskunas, S. R. (1999). Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 181 (20): 6552-5.
- Hoskins, J., Jr., W. E. A., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., et al. (2001). Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *Journal of Bacteriology*, 183 (19): 5709-5717.
- Huang, H.-B., Horiuchi, A., Goldberg, J., Greengard, P. & Nairn, A. C. (1997). Site-directed mutagenesis of amino acid residues of protein phosphatase 1 involved in catalysis and inhibitor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (8): 3530-3535.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D. A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (24): 11140-11144.
- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. & Claverys, J.-P. (2006). New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Molecular Microbiology*, 59 (4): 1297-1307.
- Håvarstein, L. S. (2010). Increasing competence in the genus *Streptococcus*. *Molecular Microbiology*, 78 (3): 541-544.

- Invitrogen™. (2006). SYTOX® Green Nucleic Acid Stain. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07020.pdf>.
- Jefferies, J. M. C., Smith, A., Clarke, S. C., Dowson, C. & Mitchell, T. J. (2004). Genetic Analysis of Diverse Disease-Causing Pneumococci Indicates High Levels of Diversity within Serotypes and Capsule Switching. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12): 5681-5688.
- Johnsborg, O., Blomqvist, T., Killian, M. & Håvarstein, L. S. (2007a). Biologically active peptides in streptococci. I: Hakenbeck, R. & Chhatwal, S. (red.) *Molecular Biology of Streptococci*, s. 25-59. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press.
- Johnsborg, O., Eldholm, V. & Håvarstein, L. S. (2007b). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology*, 158 (10): 767-778.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjørnstad, M. L. & Håvarstein, L. S. (2008). A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology*, 69 (1): 245-253.
- Johnsborg, O. & Håvarstein, L. S. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev*, 33: 627-642.
- Johnsborg, O. & Havarstein, L. S. (2009b). Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 191 (18): 5859-64.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (10): 5752-5756.
- Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Miura, H. & Ezaki, T. (1995). Determination of 16s rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (2): 406-408.
- Kawamura, Y., Hou, X. G., Todome, Y., Sultana, F., Hirose, K., Shu, S. E., Ezaki, T. & Ohkuni, H. (1998). *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 3: 921-7.
- Kell, C. M., Sharma, U. K., Dowson, C. G., Town, C., Balganes, T. S. & Spratt, B. G. (1993). Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 106 (2): 171-175.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L. S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. & Sørensen, U. B. S. (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and Its Close Commensal Relatives. *PLOS ONE*, 3 (7): e2683.
- Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I. F. & Diep, D. B. (2010). The abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J Bacteriol*, 192 (8): 2068-76.
- Labischinski, H., Barnickel, G., Bradaczek, H. & Giesbrecht, P. (1979). On the secondary and tertiary structure of murein. Low and medium-angle X-ray evidence against chitin-based conformations of bacterial peptidoglycan. *Eur J Biochem*, 95 (1): 147-155.
- Lacks, S. & Hotchkiss, R. D. (1960). A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta.*, 39: 508-518.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* (62): e3923.
- Li, Y., Foran, P., Fairweather, N. F., de Paiva, A., Weller, U., Dougan, G. & Dolly, J. O. (1994). A single mutation in the recombinant light chain of tetanus toxin abolishes its proteolytic activity and removes the toxicity seen after reconstitution with native heavy chain. *Biochemistry*, 33 (22): 7014-20.
- Lichtman, J. W. & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2 (12): 910-919.
- Lie, V. O. (2014). *The immunity protein ComM; effects of overexpression in Streptococcus pneumoniae*. Masteroppgave. Ås: Norwegian University of Life Sciences, Department of Chemistry, Biotechnology and Food science. 81 s.

- Macherey-Nagel. (2015). *Plasmid DNA purification - User manual NucleoSpin® Plasmid NucleoSpin® Plasmid (NoLid) NucleoSpin® Plasmid QuickPure*. Tilgjengelig fra: [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM\\_pDNA\\_NS.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid%20DNA%20Purification/UM_pDNA_NS.pdf).
- Macherey-Nagel. (2017). *PCR clean-up Gel extraction - User manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up*. Tilgjengelig fra: [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM\\_PCRcleanup\\_Gelex\\_NSGelPCR.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/DNA%20clean-up/UM_PCRcleanup_Gelex_NSGelPCR.pdf).
- Mahmood, T. & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4 (9): 429-434.
- Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R. B., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., O'Reilly, N., Hanrahan, S. J., Thompson, A. J., Cronin, N., et al. (2013). Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1. *Nature*, 504 (7479): 301-305.
- Massidda, O., Novakova, L. & Vollmer, W. (2013). From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environmental Microbiology*, 15 (12): 3133-3157.
- Meeske, A. J., Riley, E. P., Robins, W. P., Uehara, T., Mekalanos, J. J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A. C., Bernhardt, T. G. & Rudner, D. Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature*, 537 (7622): 634-638.
- Mirouze, N., Bergé, M. A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., Granadel, C., Noirot-Gros, M.-F., Noirot, P., Polard, P., et al. (2013). Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (11): E1035-E1044.
- NewEnglandBioLabs. (2017a). *OneTaq® DNA Polymerase* Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/m0480-onetaq-dna-polymerase>.
- NewEnglandBioLabs. (2017b). *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*. Tilgjengelig fra: <https://www.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase>.
- Omran, T. A. (2013). *Studier av immunitetsproteinene ComM hos Streptococcus pneumoniae*. Masteroppgave. Ås: Universitetet for Miljø- og Biovitenskap, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM). 106 s.
- Pei, J. & Grishin, N. V. (2001). Type II CAAX prenyl endopeptidases belong to a novel superfamily of putative membrane-bound metalloproteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (5): 275-277.
- Peterson, S., Cline, R. T., Tettelin, H., Sharov, V. & Morrison, D. A. (2000). Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J Bacteriol*, 182 (21): 6192-202.
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., et al. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol*, 51 (4): 1051-70.
- Pickard, R. T., Chiou, X. G., Striffler, B. A., DeFelippis, M. R., Hyslop, P. A., Tebbe, A. L., Yee, Y. K., Reynolds, L. J., Dennis, E. A., Kramer, R. M., et al. (1996). Identification of Essential Residues for the Catalytic Function of 85-kDa Cytosolic Phospholipase A2: PROBING THE ROLE OF HISTIDINE, ASPARTIC ACID, CYSTEINE, AND ARGININE. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (32): 19225-19231.
- Plummer, L. J., Hildebrandt, E. R., Porter, S. B., Rogers, V. A., McCracken, J. & Schmidt, W. K. (2006). Mutational Analysis of the Ras Converting Enzyme Reveals a Requirement for Glutamate and Histidine Residues. *The Journal of biological chemistry*, 281 (8): 4596-4605.
- Poll, T. v. d. & Opal, S. M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374: 1543-1556.



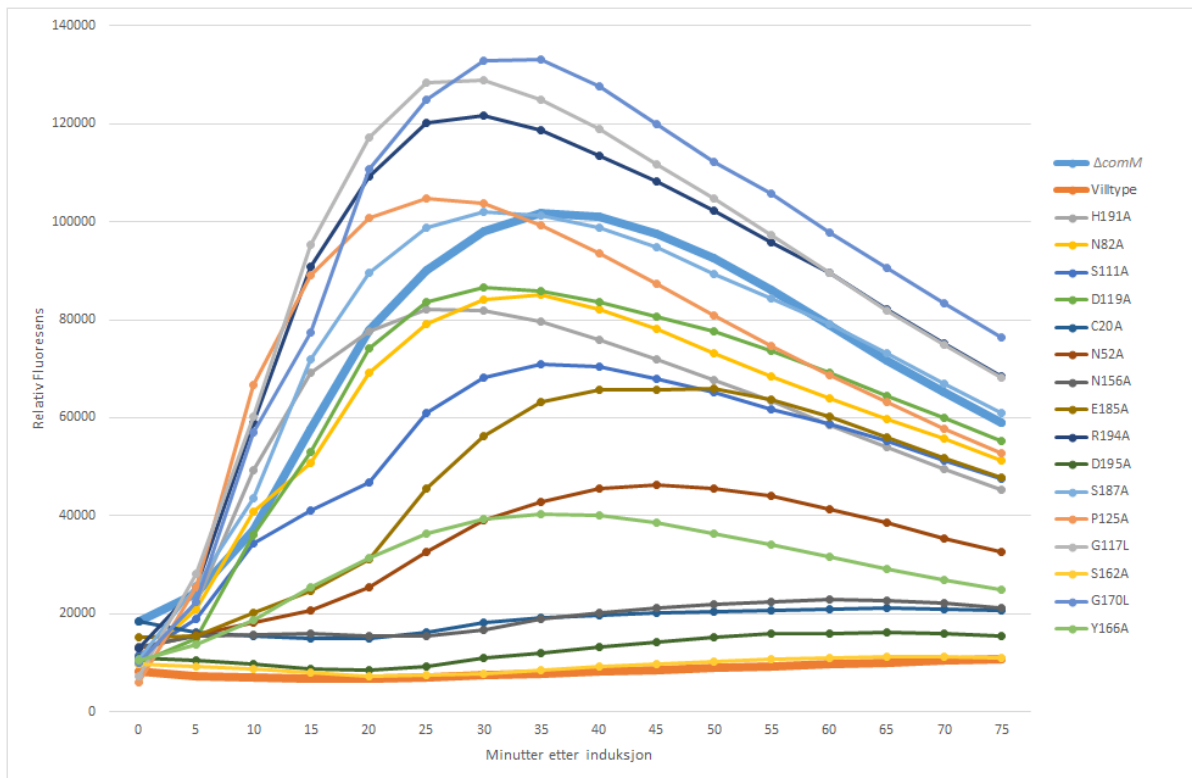
- Pryor, E. E., Horanyi, P. S., Clark, K. M., Fedoriw, N., Connelly, S. M., Koszelak-Rosenblum, M., Zhu, G., Malkowski, M. G., Wiener, M. C. & Dumont, M. E. (2013). Structure of the Integral Membrane Protein CaaX Protease Ste24p. *Science (New York, N.Y.)*, 339 (6127): 1600-1604.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3. utg. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2100 s.
- Sham, L.-T., Butler, E. K., Lebar, M. D., Kahne, D., Bernhardt, T. G. & Ruiz, N. (2014). MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 345 (6193): 220-222.
- Sham, L. T., Tsui, H. C., Land, A. D., Barendt, S. M. & Winkler, M. E. (2012). Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Curr Opin Microbiol*, 15 (2): 194-203.
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S. & Goswami, A. (2014). A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1 (7): 65-80.
- Stamsås, G. A., Straume, D., Salehian, Z. & Håvarstein, L. S. (2017). Evidence that pneumococcal Walk is regulated by StkP through protein–protein interaction. *Microbiology*, 163 (3): 383-399.
- Steinmoen, H., Knutsen, E. & Håvarstein, L. S. (2002). Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (11): 7681-7686.
- Straume, D., Stamsås, G. A. & Håvarstein, L. S. (2015). Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 33: 371-380.
- Straume, D., Stamsås, G. A., Berg, K. H., Salehian, Z. & Håvarstein, L. S. (2016). Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b). *Molecular Microbiology*, 103 (1): 99-116.
- Straume, D., Stamsås, G. A., Salehian, Z. & Håvarstein, L. S. (2017). Overexpression of the fratricide immunity protein ComM leads to growth inhibition and morphological abnormalities in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 163 (1): 9-21.
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. & Morrison, D. A. (2001). An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied Environmental Microbiology*, 67 (11): 5190-5196.
- Tam, A., Nouvet, F. J., Fujimura-Kamada, K., Slunt, H., Sisodia, S. S. & Michaelis, S. (1998). Dual Roles for Ste24p in Yeast a-Factor Maturation: NH(2)-terminal Proteolysis and COOH-terminal CAAX Processing. *The Journal of Cell Biology*, 142 (3): 635-649.
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J., et al. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, 293 (5529): 498-506.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2014). *Microbiology: An Introduction*. 11. utg. Essex: Pearson Education Limited. 970 s.
- Tsui, H.-C. T., Zheng, J. J., Magallon, A. N., Ryan, J. D., Yunck, R., Rued, B. E., Bernhardt, T. G. & Winkler, M. E. (2016). Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Molecular Microbiology*, 100 (6): 1039-1065.
- Vollmer, W. (2007). Structure and biosynthesis of the pneumococcal cell wall. I: Hakenbeck, R. & Chhatwal, S. (red.) *Molecular Biology of Streptococci*, s. 83-117. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press.
- Waldow, A., Schmidt, B., Dierks, T., von Bülow, R. & von Figura, K. (1999). Amino Acid Residues Forming the Active Site of Arylsulfatase A: ROLE IN CATALYTIC ACTIVITY AND SUBSTRATE BINDING. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (18): 12284-12288.
- Weng, L., Piotrowski, A. & Morrison, D. A. (2013). Exit from Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae* Is Regulated at Multiple Levels. *PLoS ONE*, 8 (5): e64197.
- Yunck, R., Cho, H. & Bernhardt, T. G. (2016). Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Molecular microbiology*, 99 (4): 700-718.

- Zapun, A., Contreras-Martel, C. & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 (2): 361-385.
- Zapun, A., Philippe, J., Abrahams, K. A., Signor, L., Roper, D. I., Breukink, E. & Vernet, T. (2013). In vitro Reconstitution of Peptidoglycan Assembly from the Gram-Positive Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chemical Biology*, 8 (12): 2688-2696.
- Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9 (7): 686-698.

# Vedlegg A

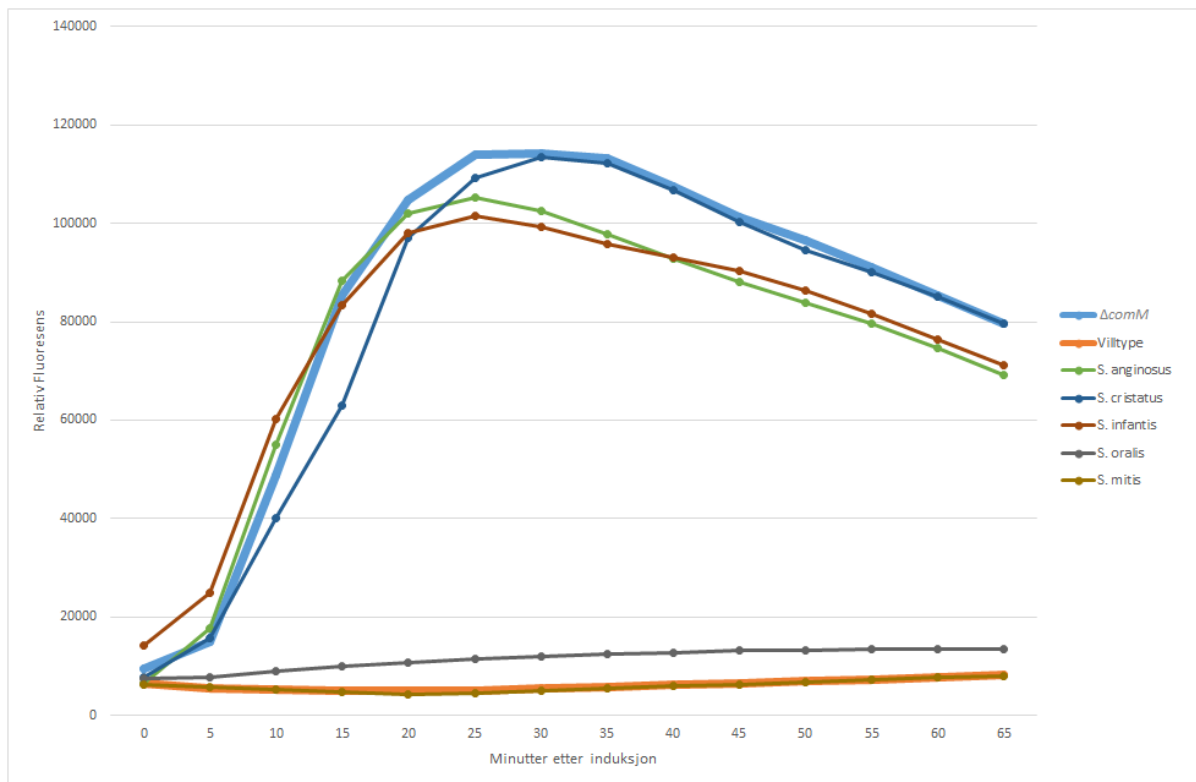
## Sytox lysis-assay grafer

### A.1 Punktmutanter



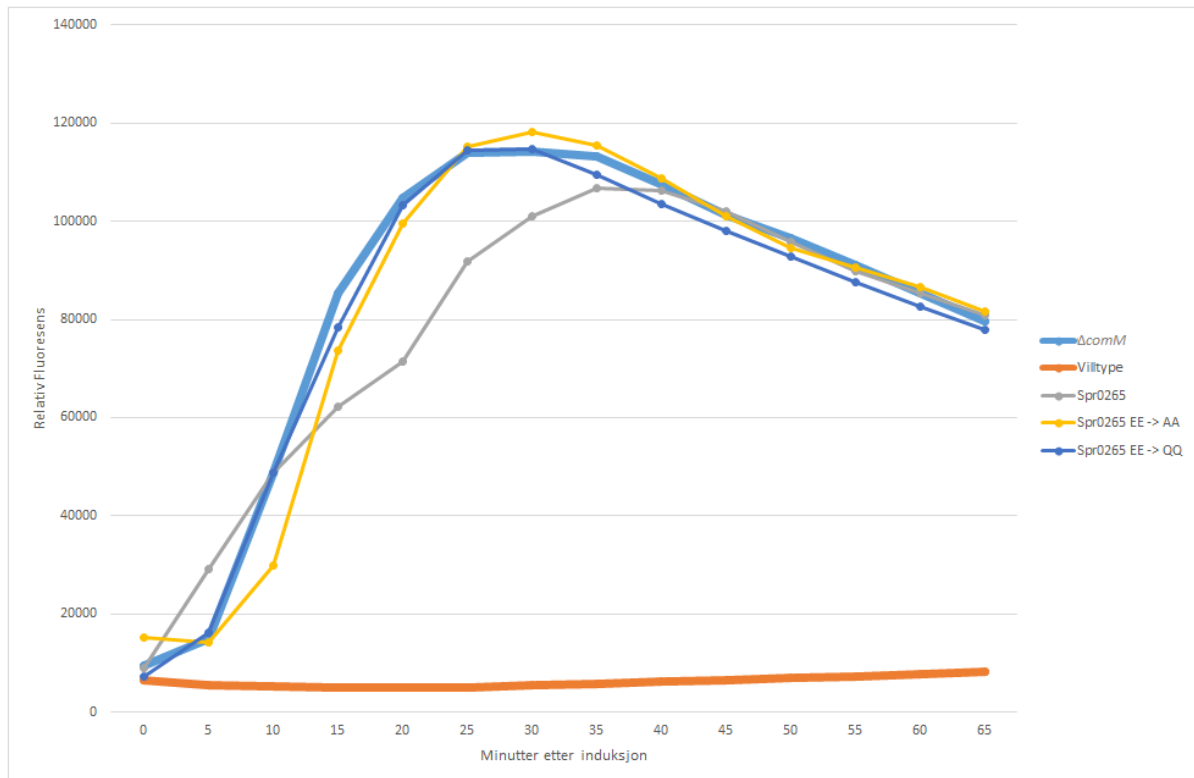
**Figur A.1. Sytox-kurver punktmutter.** Figuren viser kurver av relativ fluorescens som funksjon av minutter etter induksjon med CSP, for de punktmutterte versjonene av ComM, som ble testet i denne oppgaven.

## A.2 ComM fra andre arter



**Figur A.2. Sytox-kurver ComM fra andre streptokokker.** Figuren viser kurver av relativ fluorescens som funksjon av minutter etter induksjon med CSP, for *S. pneumoniae*-stammene hvor nativt ComM var byttet ut med ComM fra andre stammer, som ble testet i denne oppgaven.

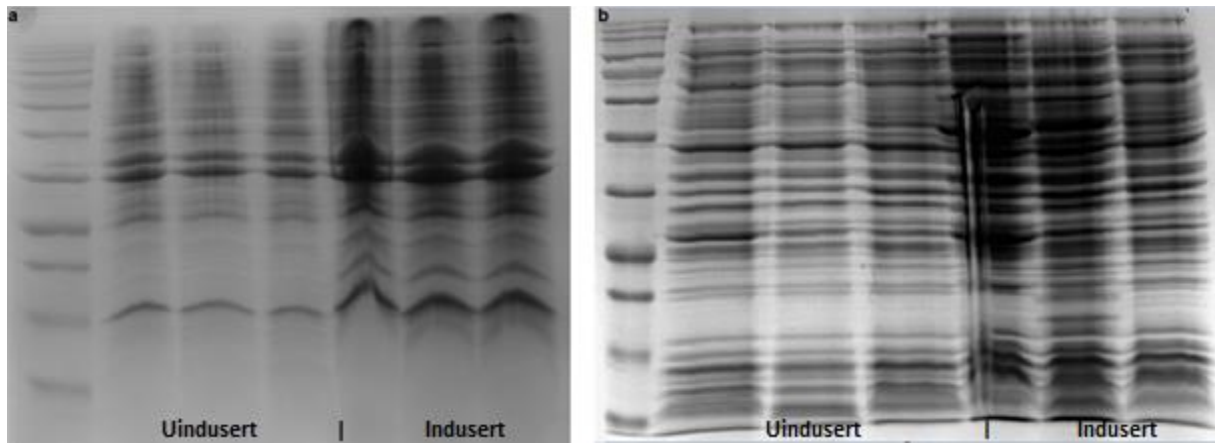
### A.3 CAAX-protease-lignende Spr0265



**Figur A.3. Sytox-kurver CAAX-protease-lignende Spr0265.** Figuren viser kurver av relativ fluorescens som funksjon av minutter etter induksjon med CSP, for *S. pneumoniae*-stammene hvor nativt ComM var erstattet med Spr0265 eller punktmuterte versjoner av denne, som ble testet i denne oppgaven.

## Vedlegg B

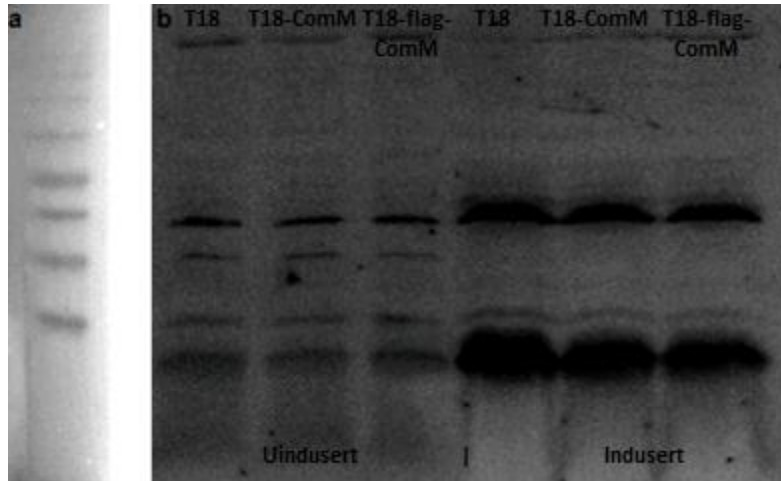
### Resultater Coomassie-farging



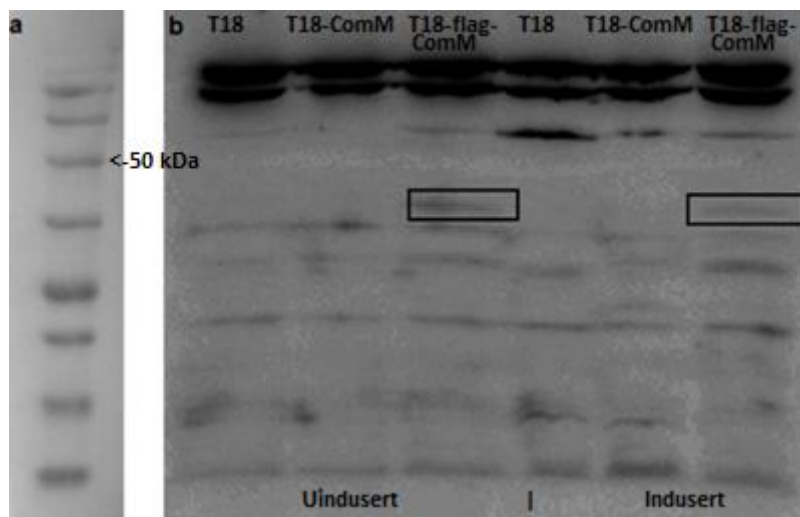
**Figur B.1. Geler Coomassie-farging.** Rekkefølge brønner (felles for begge gelene): 1. pUT18C 2. pUT18C-ComM 3. pUT18C-flagComM 4. pUT18C 5. pUT18C-ComM 6. pUT18C-flagComM. Prøvene i brønnene 1-3 er uinduserte, mens prøvene i brønnene 4-6 har blitt indusert med IPTG i 3 timer. **a:** Membranfraksjon. **b:** Hele celler.

## Vedlegg C

### Resultater Western Blot



**Figur C.1. Western Blot membranfraksjon. a:** Størrelsesmarkør. **b:** Western Blot. Figuren viser prøvene før og etter induksjon med IPTG i 3 timer. T18-flagComM har en størrelse på 47 kDa, og er ikke detektert i membranfraksjonen.



**Figur C.2. Western Blot hele celler. a:** Størrelsesmarkør. Fragmentet med størrelse 50 kDa er indikert med pil. **b:** Westernblot. Figuren viser prøvene før induksjon og etter induksjon med IPTG i 3 timer. T18-flagComM har en størrelse på 47 kDa. De sorte boksene indikerer plasseringen til T18-flagComM.



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway