



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Daniel Straume

Karakterisering og rensing av fusiformicin, et nytt bakteriosin med aktivitet mot *S. pneumoniae*

Characterization and purification of fusiformicin, a
novel bacteriocin with antimicrobial activity against
S. pneumoniae

Ingvild Hals Hauge

Bioteknologi

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført som en del av masterprogrammet i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) hos forskningsgruppen for Molekylær mikrobiologi ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap, mellom august 2019 og juni 2020.

Først ønsker jeg å takke hovedveilederen min Dr. Daniel Straume for alt du har lært meg, både på labben og under skriveprosessen. Biveilederen min Prof. Leiv Sigve Håvarstein, og resten av molekylær mikrobiologi gruppen. Takk for at jeg fikk skrive masteroppgaven min hos dere. En spesiell takk til Zhian Salehian for hjelp med sekvensering av ami. Og takk til Dr. Gro Stamsås og Dr. Danae Morales-Angeles for svar på alle spørsmålene som har dukket opp underveis.

Takk til Jeanette som har vært verdens beste labpartner i fem år, og mine med-masterstudenter Anette og Marita. Og alle venner og medstudenter som har vært med på å gjøre studiene på Ås uforglemmelige.

Jeg ønsker også å takke kollektivet mitt, Eplejentene. Ingen hadde forventet at vi skulle ende opp med å være innestengt sammen i flere måneder, og dere har vært en fantastisk støtte for meg gjennom skriveprosessen. Takk for alle seriekveldene og at dere har tvunget meg bort fra dataskjermen.

Til sist vil jeg takke familien min, for at dere alltid har hatt troen på meg og støttet meg.

Ingvild Hals Hauge

Ås, juni 2020

Sammendrag

Antibiotikaresistens regnes for å være et av de største, uløste problemene innen offentlig helsevesen over hele verden. *S. pneumoniae* er en viktig humanapatogen bakterie som raskt utvikler og sprer antibiotikaresistens. Det var derfor ønskelig å identifisere en bakterie som produserer et potensielt nytt, smalspektret antibiotikum mot *S. pneumoniae*. Mikroorganismer i naturen produserer et stort arsenal av antimikrobielle stoffer, og de fleste antibiotika som er i bruk i dag har blitt isolert fra jord, og kun 0,1% av den totale mikrobielle biodiversiteten i marine habitat er kjent (1). Potensialet for å finne et nytt antibiotikum ved å foreta en screening med sjøvann var derfor stort.

Screeningen resulterte i et lovende nytt bakteriosin, navngitt fusiformicin etter *L. fusiformis* som produserer bakteriosinet. Fusiformicin viste antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae* og flere andre streptokokkarer, og noe aktivitet mot *B. subtilis* og *M. smegmatis*. Det er et ~1000 Da stort protein eller peptidbasert molekyl. En relativ MIC verdi ble bestemt og en fusiformicin-konsentrasjon på 125 ganger MIC førte ikke til hemolyse av blodceller. Ulike rensemetoder ble testet med mål om å finne en protokoll for å oppnå fusiformicin med en renhet høy nok for massebestemmelse ved massespektrometri (>95% renhet). Den mest lovende renseprotokollen oppnådd i dette arbeidet bestod av gelfiltrering av fusiformicin i kultursupernatant (oppkonsentrert ved hjelp av Amberlite® XAD 16N hydrofobiske kuler) og gelfiltreringsfraksjonen med høyest antimikrobiell aktivitet ble antatt å inneholde fusiformicin. Den ble videre analysert og rensert med reversfase HPLC, men testing av HPLC-fraksjonene for antimikrobiell aktivitet viste at det ikke var målbar aktivitet i fraksjonene som ble samlet opp. Det ble også forsøkt å rense oppkonsentrert fusiformicin med ionebyttekromatografi med en anionbytter, men resultatene viste at fusiformicin ikke bandt til kolonnen ved pH 8,8. På grunn av faren for at pH verdier over 8,8 ville destabilisere fusiformicin ble gelfiltrering benyttet i stedet. Genomsekvensering av fusiformicinresistente *S. pneumoniae* mutanter viste at resistens oppstår ved å mutere oligopeptidpermeasen Ami, slik at transporten av fusiformicin stopper. Transport av peptider gjennom Ami avhenger av energi som generes av de to ATP-bindende proteinene AmiE og AmiF. Innføringen av en substitusjon av aspartat (D) med alanin (A) i Walker-motiv B i AmiE (D184A) resulterte i et komplett protein som ikke var i stand til å binde ATP. Testing av stammen med AmiE (D184A) for sensitivitet mot fusiformicin viste at

bakterien var blitt fullstendig resistent. Dette viser at fusiformicin må transporteres inn i cytoplasma for å ha antimikrobiell aktivitet. Hvilken prosess som inhiberes i cytoplasma er ukjent. Videre arbeid inkluderer å finne en optimal renseprotokoll for å oppnå fusiformicin med >95% renhet, og bestemme massen vha. massespektrometri. For at fusiformicin skal egne seg for terapeutisk bruk er det viktig at det kan administreres til pasienter, og at det har den nødvendige vevsgjennomtrengeligheten.

Abstract

Antibiotic resistance is regarded as one of the biggest challenges within public health worldwide. *S. pneumoniae* is an important human pathogen who quickly develops and spreads antibiotic resistance. The goal of this thesis was therefore to discover a bacteria who produces a novel, narrow spectrum antibiotic against *S. pneumoniae*. Microorganisms in the environment produce a huge arsenal of antimicrobial compounds, and most of the antibiotics that are currently used to treat infections have been isolated from soil. In addition only 0,1% of the total microbial biodiversity in marine environments are known (1). The potential of finding a novel antibiotic by screening water samples from the sea was therefore promising.

Screening of water samples resulted in the identification of a novel bacteriocin, named fusiformicin after the producing bacteria *L. fusiformis*. Fusiformicin showed antimicrobial activity against *S. pneumoniae* and other streptococcal species, and some activity against *B. subtilis* and *M. smegmatis*. It is a protein or peptide based molecule with a size of ~1000 Da. A relative MIC was determined, and a fusiformicin concentration 125 times higher than MIC (relative) did not lead to hemolysis of blood cells. Different purification methods were tested in order to establish a protocol for the purification of fusiformicin to a purity high enough for mass spectrometry (>95%) The most promising purification protocol consisted of gel filtration of fusiformicin in culture supernatant (concentrated by using Amberlite® XAD 16N hydrophobic beads), and the fraction with the highest amount of antimicrobial activity was further analyzed and purified by reverse phase HPLC. After the HPLC analysis antimicrobial activity was not observed for the fractions that had been collected. Ion exchange chromatography with an anion column was also tested to see if it could better separate concentrated fusiformicin. The results showed that fusiformicin did not bind to the column at pH 8,8. There was a risk that pH levels above 8,8 would destabilize fusiformicin, and gel filtration was therefore used for purification instead. Genome sequencing of fusiformicin resistant *S. pneumoniae* mutants revealed that the resistance was due to mutations in the oligopeptide permease Ami. Transport of oligopeptides through Ami is dependent on energy generated by the two ATP-binding proteins AmiE and AmiF. The substitution of an aspartate (D) with an alanine (A) in Walker motif B in AmiE resulted in a complete AmiE protein that was unable to bind to ATP. The strain where this substitution had been introduced turned out to be resistant against fusiformicin. This shows that fusiformicin must be transported to the

cytoplasm in order to have antimicrobial activity. Which process fusiformicin inhibits in the cytoplasm is unknown. Further work includes optimization of the purification protocol and determination of fusiformicin's mass by mass spectrometry. If fusiformicin is to be used therapeutically it is important that it can easily be distributed to patients, and that it has the necessary tissue permeability.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	<i>Antibiotika og resistensproblemet hos bakterier</i>	1
1.1.1	Ulike typer antibiotika	2
1.1.2	Resistensmekanismer	3
1.2	<i>Horisontal genoverføring og spredning av antibiotikaresistensgener</i>	4
1.3	<i>Streptococcus pneumoniae, en evig trussel</i>	5
1.3.1	Antibiotikaresistens hos <i>S. pneumoniae</i>	7
1.3.2	Distribusjon av penicillinresistens mellom pneumokokker	9
1.3.3	Naturlig kompetanse hos <i>S. pneumoniae</i>	10
1.4	<i>Et behov for nye antibiotika</i>	11
1.5	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	13
1.5.1	Antimikrobielle molekyler produsert av bakterier i familien Bacillaceae	13
1.6	<i>Bakteriosiner fra Gram-positive bakterier</i>	15
1.6.1	Virkningsmekanismer hos bakteriosiner	15
1.6.2	Resistens mot bakteriosiner	16
1.7	<i>Mål for oppgaven</i>	17
2	Materialer	18
2.1	<i>Stammer</i>	18
2.2	<i>Primere</i>	19
2.3	<i>Enzymer, DNA størrelsesstandarder og nukleotider</i>	21
2.4	<i>Peptider</i>	22
2.5	<i>Antibiotika</i>	22
2.6	<i>Kits</i>	22
2.7	<i>Utstyr</i>	23
2.8	<i>Kjemikalier</i>	24
2.9	<i>Oppskrifter på vekstmedium og buffere</i>	26
2.9.1	C medium	26
2.9.2	Todd Hewitt (TH) medium	28
2.9.3	Brain Heart Infusion (BHI) medium	28
2.9.4	2.6.4. Müller Hinton (MH) petriskåler	29
2.9.5	2.6.5 Luria Bertani (LB) soft agar	29
2.9.6	2.6.6 GM17 soft agar	29
2.9.7	Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese	29
2.9.8	Løsninger til HPLC	30
2.9.9	Buffere til ionebyttekromatografi	30
2.9.10	Buffere og standarder til gelfiltrering	31
2.9.11	Andre buffere	31
3	Metoder	32
3.1	<i>Kultivering og dyrkning av bakterier</i>	32
3.2	<i>Soft-agar overlay analyse</i>	33
3.3	<i>Innledende tester for karakterisering av fusiformicin</i>	35
3.3.1	Proteinase K	35
3.3.2	Sterilfiltrering	35
3.3.3	Ammoniumsulfat-felling	35
3.3.4	Butanolekstraksjon	36
3.3.5	Dithiothetrol (DTT)	37

3.4	<i>Vakuumtøking</i>	37
3.5	<i>Oppkonsentrering av fusiformicin med Amberlite® XAD 16N kuler</i>	37
3.6	<i>Relativ MIC og hemolyse</i>	38
3.7	<i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	39
3.8	<i>Ionebyttekromatografi (IEC)</i>	40
3.9	<i>Gelfiltrering</i>	41
3.10	<i>Mikroskopering</i>	42
3.11	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	42
3.11.1	PCR amplifisering.....	44
3.11.2	PCR «ligering».....	47
3.11.3	PCR screening av transformanter	49
3.11.4	Rensing av PCR produkt.....	50
3.12	<i>Agarose gelelektroforese</i>	51
3.13	<i>DNA sekvensering</i>	52
3.14	<i>Genomsekvensering (WGS)</i>	53
3.15	<i>Isolering av genomisk DNA</i>	54
3.16	<i>Transformasjon av S. pneumoniae</i>	55
3.16.1	Knockout av gener	56
3.16.2	Innføring av suppressormuterte gener i villtype S. pneumoniae	56
3.16.3	Inaktivering av Walker motiv i AmiE og AmiF	57
4	Resultater	58
4.1	<i>Screening av havbakterier for antibiotika mot S. pneumoniae</i>	58
4.1.1	Dyrking av havbakterier på ulike vekstmedium	59
4.1.2	Screening for antibiotika mot S. pneumoniae.....	60
4.2	<i>Identifisering av bakterieisolat 1</i>	62
4.2.1	Verifisering av at isolat 1 produserer pneumokokk-hemmende stoff.	62
4.2.2	Identifisering av isolat i ved 16s rRNA sekvensering	63
4.3	<i>Produksjon av fusiformicin</i>	65
4.3.1	Testing av fusiformicinproduksjon i flytende medium	65
4.3.2	Optimalisering av produksjon i flytende kultur.....	65
4.4	<i>Karakterisering av fusiformicin</i>	66
4.4.1	Fusiformicin har smalspektret aktivitet mot streptokokker og bakterier i bacillusslekten	67
4.4.2	Proteinase K.....	69
4.4.3	Dithiothreitol (DTT).....	69
4.4.4	Butanolekstraksjon	70
4.4.5	Ammoniumsulfatfelling.....	70
4.5	<i>Rensing av fusiformicin</i>	70
4.5.1	Fusiformicin binder til Amberlite® XAD 16N	71
4.5.2	Relativ-MIC og hemolyse av fusiformicin	72
4.5.3	Rensing av fusiformicin ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography	74
4.5.4	Rensing av fusiformicin med ionebyttekromatografi	82
4.5.5	Fusiformicin er et ~1000 Da stort peptid.....	83
4.6	<i>Genomsekvensering av fusiformicinresistente mutanter</i>	86
4.6.1	Identifikasjon av mutasjoner i ami- operonet	86
4.6.2	ami- systemet.....	87
4.6.3	Karakterisering av fusiformicinresistente mutanter.....	88
4.7	<i>Innføring av supressormuterte gener gir resistens mot fusiformicin</i>	90
4.7.1	Fusiformicinsensitivitet hos transformanter med re-innførte supressormutasjoner	90
4.8	<i>Delesjon av amiC og amiEF gir resistens mot fusiformicin</i>	91

4.8.1	Fusiformicinsensitivitet hos Δ amiC og Δ amiEF mutanter.	91
4.9	<i>Fusiformicin må tas opp til cytoplasma for å virke</i>	91
4.9.1	Fusiformicin virker i cytoplasma hos <i>S. pneumoniae</i>	93
4.9.2	Sekvensering av hele ami- operonet i AmiE mutanten	93
5	Diskusjon	95
5.1	<i>Screening av havbakterier for antibiotika mot S. pneumoniae</i>	95
5.2	<i>Identifisering av isolat 1</i>	96
5.3	<i>Produksjon av fusiformicin</i>	96
5.4	<i>Karakterisering av fusiformicin</i>	97
5.5	<i>Rensing av fusiformicin</i>	99
5.6	<i>Virkningsmekanismen til fusiformicin</i>	101
5.7	<i>Potensialet til fusiformicin som et fremtidig antibiotika</i>	103
6	Konklusjoner og videre arbeid	105
6.1	<i>Konklusjoner</i>	105
6.2	<i>Videre arbeid</i>	105
7	Referanser	107
8	Appendiks I: Sekvenseringsresultater	111

1 Innledning

1.1 *Antibiotika og resistensproblemet hos bakterier*

Antibiotika er organiske molekyler som både dreper og inhiberer vekst av andre mikroorganismer ved lave konsentrasjoner. For at et antibiotikum skal kunne brukes i behandling av infeksjoner hos mennesker og dyr, må stoffet også ha lav toksisitet og helst god vevsgjennomtrengelighet. Dessverre har antall kliniske isolater med resistens mot antibiotika økt i takt med antibiotikabruken (2). Man har også sett at etter hvert som nye antibiotika har kommet på markedet, har bakterier utviklet resistens mot disse samtidig, eller like etter (3). Omfanget av problemet er blitt så stort at det regnes som et av de ledende, uløste problemene innen offentlig helsevesen over hele verden (2). Verdens helseorganisasjon (WHO), American Centre for Disease Control (CDC) og European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) har alle rangert antibiotikaresistens som en av vår tids tre største utfordringer (3,4).

Multiresistente bakterier forårsaker årlig 25 000 dødsfall i EU, 2,5 millioner ekstra sykehusdager, og kostnadene infeksjoner med disse bakteriene fører med seg ligger på minst 1,5 milliarder euro årlig (4). CDC har anslått at mer enn 23 000 mennesker dør årlig av infeksjoner med antibiotikaresistente bakterier i USA, og mer enn 38 000 mennesker dør årlig i Thailand. De har også anslått at 58 000 babyer i India døde i løpet av et år som en følge av infeksjoner med resistente bakterier. Det er estimert at innen 2050 vil antibiotikaresistens være årsaken til 300 millioner dødsfall årlig, og et totalt tap for den globale økonomien på 100 milliarder dollar (5).

Det er en helt klar sammenheng mellom overforbruk av antibiotika i helsevesenet og landbruket og utvikling av nye resistente patogene bakterier. Når dette kombineres med en farmasøytisk industri som nesten ikke har utviklet nye antibiotika de siste 30-40 årene, har det ført til at verden nå er i en situasjon hvor stadig færre bakterieinfeksjoner kan behandles med medisinene som er tilgjengelige. Fortsetter denne utviklingen kan vi havne i en situasjon som er svært lik hvordan verden var før oppdagelsen av penicillin (2).

1.1.1 Ulike typer antibiotika

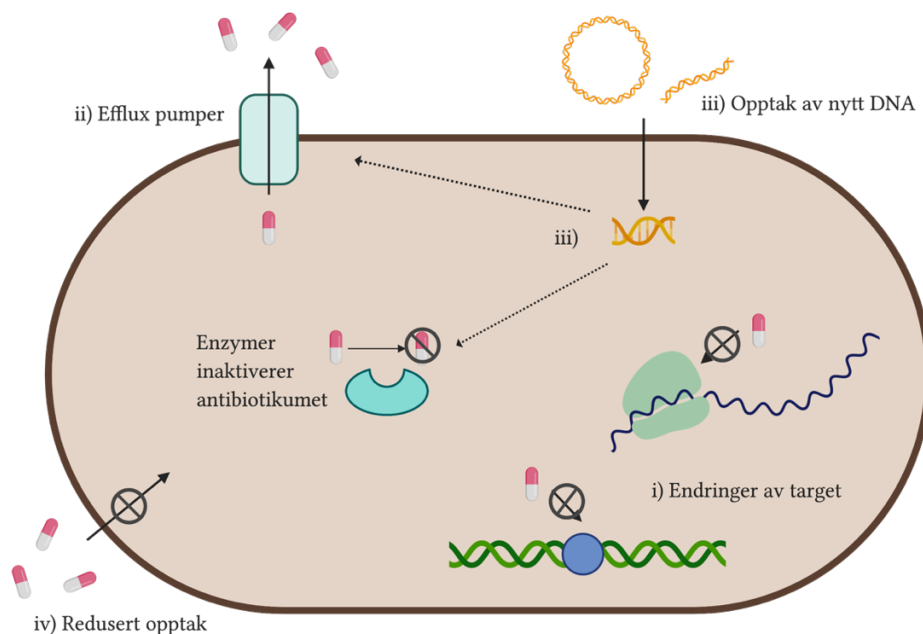
Penicillin var det første antibiotikumet som ble oppdaget, og er til i dag et av de mest brukte antibiotikaene. Det produseres av sopp i slekten *penicillium* og ble første gang oppdaget i 1928 av Alexander Flemming, men var ikke tilgjengelig på markedet før 15 år senere. På 1940 tallet ble flere nyttige antibiotika oppdaget av Selman Waksman gruppen ved Rutgers University, inkludert flere aminoglykosider. Suksessen fortsatte, og i 1948 ble flere klortetrasykliner oppdaget av et selskap som nå er en del av Pfizers (6). Oppdagelsen av nye antibiotika fortsatte gradvis fram til 1980- tallet, da antallet nye funn begynte å tørke ut (3). De siste 40 årene er bare to nye klasser av antibiotika blitt introdusert på markedet, oxazolidinone linezolid i år 2000, og det sykliske lipopeptidet daptomycin i 2003 (7). De viktigste typene antibiotika inkluderer β -lactamer som penicilliner og cephalosporiner, tetrasykliner, aminoglykosider, kloramfenikol makrolider, quinoloner og glykopeptider. Felles for de fleste (ikke quinoloner) er at molekylene er produsert av andre mikroorganismer eller er derivater av disse (6). Antibiotika grupperes først og fremst basert på molekylstruktur og virkningsmekanisme (Tabell 1). De mest brukte antibiotikaene hemmer hovedsakelig tre konserverte prosesser hos bakterier: celleveggsyntese, proteinsyntese eller DNA-replikasjon (6,8).

Tabell 1. Oversikt over de mest brukte klassene av antibiotika.

Antibiotika	Inhiberingsspekter	Virkningsmekanisme	Eksempler
Penicilliner	G+	Inhiberer celleveggsyntese	Penicillin G, Ampicillin
Cephalosporiner	G+	Inhiberer celleveggsyntese	Ceftobiprole Ceftalorine
Tetrasykliner	G+ og G-	Inhiberer proteinsyntese	Klortetrasyklin
Aminoglykosider	G+ og G-	Inhiberer proteinsyntese	Streptomycin, Kanamycin
Kloramfenikol	G+ og G-	Inhiberer proteinsyntese	Kloramfenikol
Makrolider	G+ og noen G-	Inhiberer proteinsyntese	Erythromycin
Glykopeptider	G+	Inhiberer celleveggsyntese	Vancomycin
Quinoloner	G+ og G-	Inhiberer DNA replikasjon	Ciprofloxacin

1.1.2 Resistensmekanismer

Bakterienes svar på et angrep fra antibiotika er å tilpasse seg den nye trusselen. Genomet til bakterier er ekstremt modulerbart, og når en bakterie stresses av for eksempel antibiotika kan genomet akkumulere mutasjoner som gjør bakterien immun eller delvis immun mot antibiotikumet. Genomet kan for eksempel gjennomgå spontane tilfeldige mutasjoner eller bakterien kan ta opp DNA fra omgivelsene eller fra andre bakterier. Ofte kan resistensgener være plassert på plasmider som lett overføres mellom ulike bakterier (se seksjon 1.2). Slike genetiske endringer kan gjøre bakterier resistente på forskjellige måter. (i) Bakterier kan mutere gener eller promotorer til gener som koder for proteiner som hemmes av et antibiotikum. Mutasjonene kan innføre endringer i proteinene eller endre uttrykket av proteinene slik at de ikke lenger hemmes av antibiotikumet, mens bakterien likevel delvis har bevart proteinfunksjonene. (ii) Mutasjoner kan føre til overproduksjon av efflux pumper som pumper antibiotikumet ut av cellen. (iii) Bakterien kan ta opp gener (ofte funnet på plasmider) som koder for efflux pumper eller enzymer som inaktiverer antibiotikumet via degradering eller andre modifikasjoner. (iv) Bakterier kan også ta opp gener eller endre uttrykk av egne gener som gjør cellen mindre gjennomtrengelig for visse typer antibiotika (5). Figur 1.1 viser en oversikt over disse resistensmekanismene.

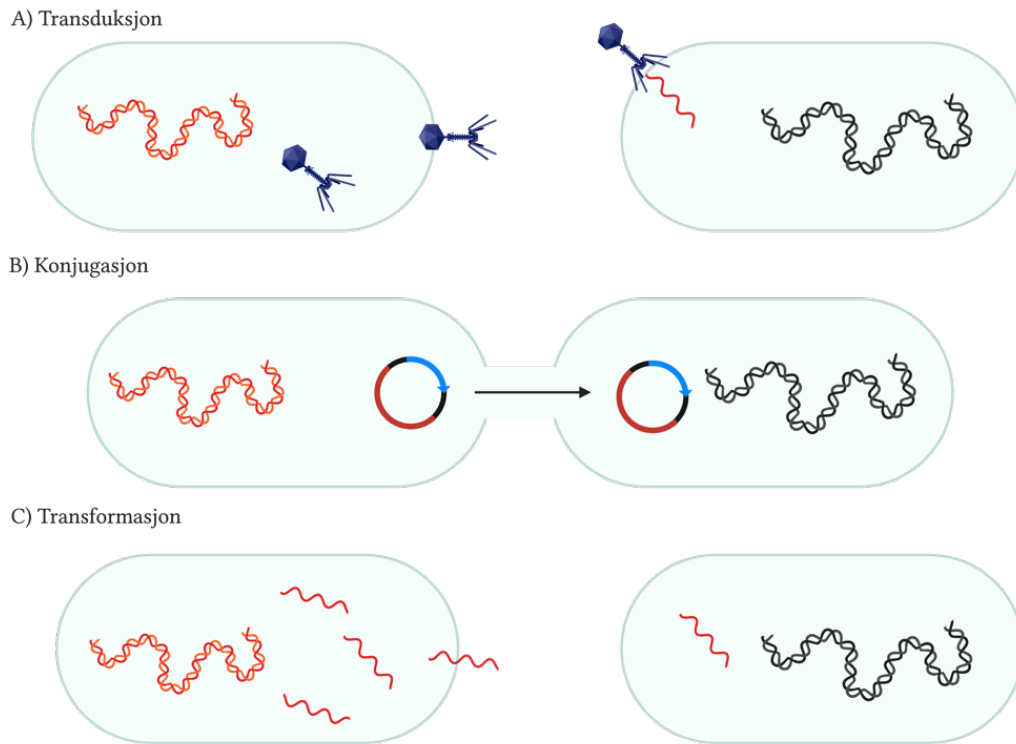


Figur 1.1 Oversikt over ulike resistensmekanismer. Figuren er laget i Biorender.

En bakterie som har oppnådd resistens mot et eller flere antibiotika kan videreføre disse resistensgenene til andre bakterier gjennom en prosess som kalles horisontal genoverføring (se seksjon 1.2) (9). Denne spredningen akselererer særlig når bakteriene blir utsatt for et seleksjonspress som for eksempel det å bli eksponert for antibiotika. Det er vist i *Escherichia coli* at stresset som antibiotika påfører bakterien kan indusere cellen til å dele såkalte konjugative plasmid som har resistensgener (se nedenfor) med andre bakterier (10), mens andre bakterier som for eksempel *Streptococcus pneumoniae* kan bli naturlig kompetent for genetisk transformasjon (se seksjon 1.3), og tar opp DNA fra omgivelsene eller andre bakterier i et forsøk på å skaffe seg resistensgener (11).

1.2 Horisontal genoverføring og spredning av antibiotikaresistensgener

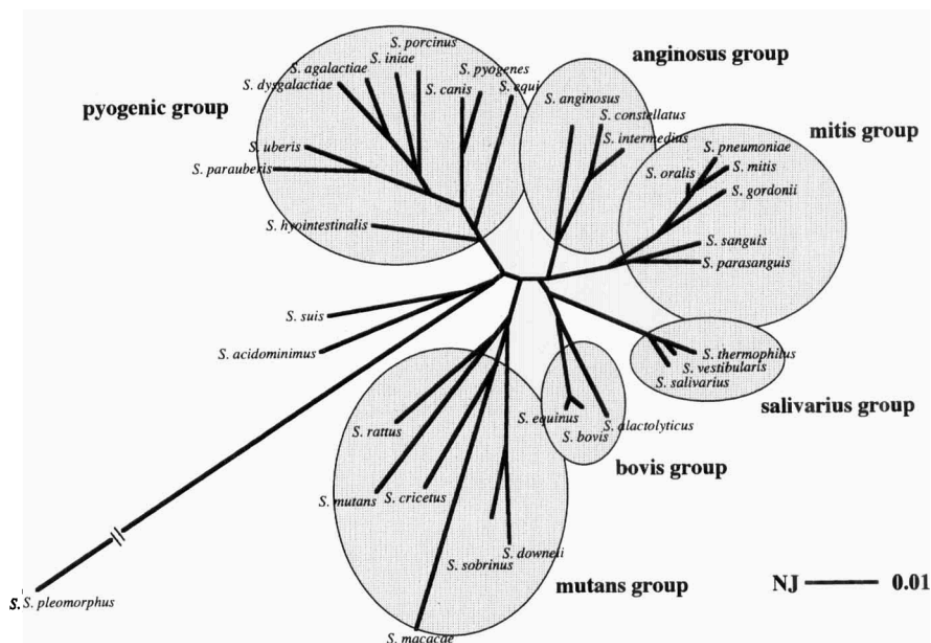
Mutasjoner og horisontal genoverføring fører til at det hele tiden oppstår nye bakterielle genotyper. Innimellom etableres de nye genotypene i bakteriepopulasjonen som et resultat av seleksjonspress, for eksempel når en ny genotype gir resistens mot antibiotika, eller som et resultat av genetisk drift. Det finnes tre hovedmekanismer for horisontal genoverføring (Figur 1.2) transduksjon som er overføring av bakteriegener via bakteriofager, konjugasjon og naturlig transformasjon. Ved transduksjon pakker bakteriofager ved et uhell bakterielt DNA i viruspartikkelen, og overfører det til en ny bakterie sammen med virusarvestoffet. Under konjugasjon overføres mobile genetiske elementer, som plasmider og transposon, via pili-strukturer som dannes mellom to nærliggende bakterieceller. Naturlig transformasjon er opptaket av fritt DNA hos kompetente bakterier, og bare rundt en prosent av bakterieartene som er beskrevet til nå er naturlig kompetente (12). Naturlig kompetente bakteriearter er ekstremt spesialiserte på å ta opp DNA fra omgivelsene og nært beslektede arter, og en disse er den viktige humanpatogene bakterien *Streptococcus pneumoniae*. Evnen til å ta opp DNA fra omgivelsene gjør at pneumokokker lett blir resistente og at resistensgener spres raskt mellom pneumokokkstammer (11).



Figur 1.2 Illustrasjon av hovedmekanismene for horisontal genoverføring. Figuren er laget i Biorender.

1.3 *Streptococcus pneumoniae*, en evig trussel.

Bakterier i *Streptococcus*-slekten finnes hovedsakelig på slimhinnene til mennesker og dyr, og basert på 16S rRNA sekvensering deles slekten inn i de seks undergruppene mitis, pyogenic, anginosus, salivarius, bovis og mutans, som vist i det fylogenetiske treet i Figur 1.3 (13). *Streptococcus pneumoniae*, også kalt pneumokokker, tilhører mitis gruppen, sammen med *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis* og *S. parasanguinis* (13). Den er en ellipseformet Gram-positiv bakterie som ofte vokser i kjeder. Bakterien danner ikke sporer, er fakultativt anaerob, har komplekse næringskrav, og vokser best ved 37 °C (14).



Figur 1.3 Fylogenetisk tre over de seks hovedgruppene i *Streptococcus*-slekten. Figuren er fra Kawamura et. al 1995 (13).

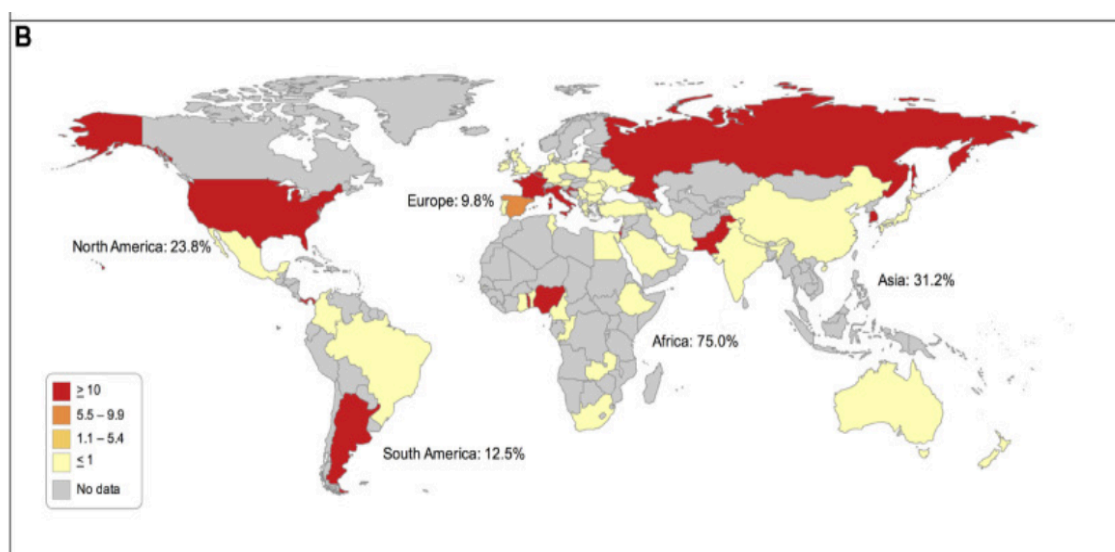
S. pneumoniae er vanligvis en ufarlig kolonisor av de øvre luftveiene hos mennesker, men er også hovedårsaken til bakteriell lungebetennelse. Pneumokokker kan i tillegg gi hjernehinnebetennelse, ørebetennelse, bihulebetennelse og blodforgiftning (sepsis). Andelen mennesker som er bærere av *S. pneumoniae* er på sitt høyeste ved 2-3 årsalderen, og synker så til under 10% i den voksne befolkningen. Kolonisering av nese og svelg er nødvendig for at *S. pneumoniae* skal gi sykdom. Etter at bakterien har kolonisert nesene og svelget, kan den enten bli værende, spre seg via luftveiene til bihulene og ørene, eller via bronkiene til lungene. I lungene kan *S. pneumoniae* spre seg til blodet, og krysse videre over til hjernen (15).

Infeksjoner hvor *S. pneumoniae* gir lungebetennelse, blodforgiftning, eller hjernehinnebetennelse er assosiert med alvorlig sykdom og høy dødelighet (16). Det er anslått at dødeligheten ved lungebetennelse er 5%, mens for blodforgiftning og hjernehinnebetennelse er dødeligheten henholdsvis 20% og 30%. Hvor alvorlig sykdommen blir varierer mellom ulike serotyper. Serotyper er de ulike strukturene polysakkaridkapselen utenpå celleveggen kan ha. Det finnes 100 ulike serotyper (17), og under pneumokokkinfeksjoner vil immunforsvaret gradvis bygge opp immunitet mot de ulike serotypene. Endring av serotype vil gjøre pneumokokkene i stand til å unngå vertens immunforsvar (15). Det er også blitt observert at β -laktamresistens er mer utbredt blant noen serotyper. I 1998 ble det funnet at 91% av alle β -

laktamresistente stammer i USA var fordelt over syv ulike serotyper. Da den første konjugative vaksinen mot pneumokokker (PCV-7) ble inkludert i vaksinasjonsprogrammet i USA i år 2000, var fem av disse serotypene dekt av vaksinen. Selv om andelen infeksjoner med vaksine-serotypene gikk ned, spredte β -laktamresistens seg raskt til serotyper som ikke var dekt av vaksinen (11). Den samme utviklingen har blitt observert for PCV-10 og PCV-13 (11,15). På grunn av naturlig kompetanse vil pneumokokker mest sannsynlig alltid mutere seg ut av både antibiotikasensitivitet og vaksinasjon.

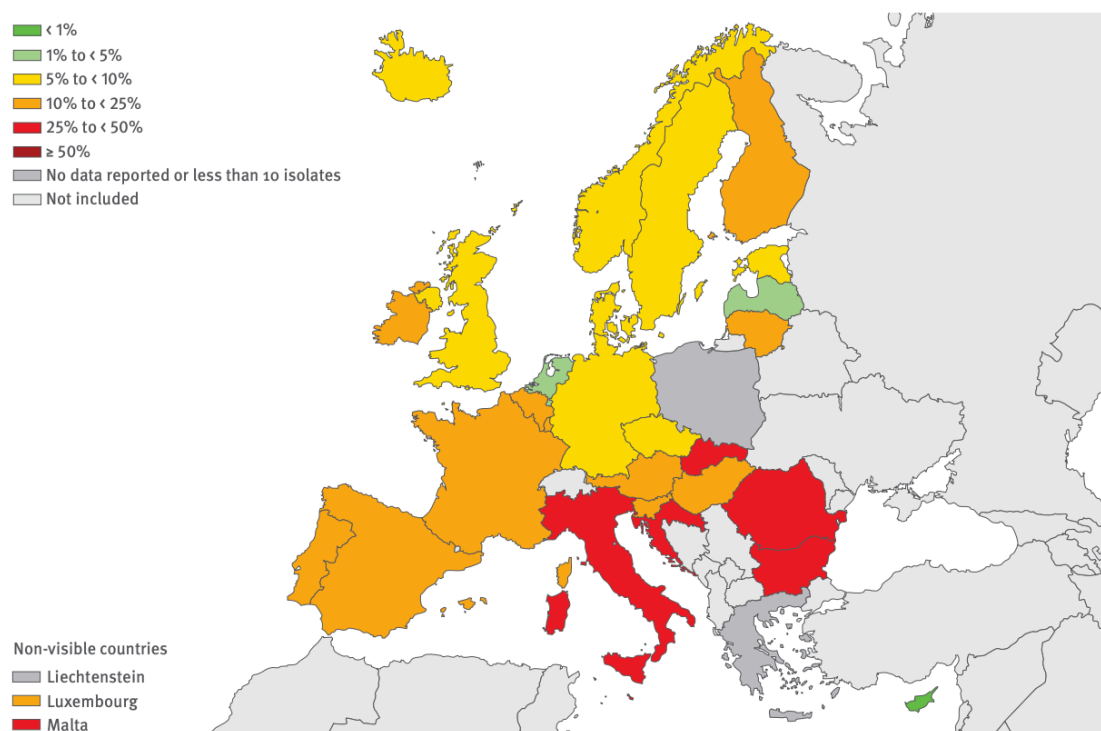
1.3.1 Antibiotikaresistens hos *S. pneumoniae*

Infeksjoner forårsaket av pneumokokker behandles hovedsakelig med penicillin. De første tilfellene av penicillinresistens ble observert på 1960-tallet, men antall penicillinresistente isolater har dessverre økt dramatisk over hele verden (16). Det er likevel stor variasjon i andel penicillinresistente isolater mellom ulike land og verdensdeler. For 15 år siden ble det beskrevet at andelen penicillinresistente isolater var 18,2% på verdens basis, 9,6 % i Afrika, 10,6% i Europa, 38,8% i Asia, 25,5% i Midtøsten, 13,3% i Latin-Amerika og 25% i USA (16). En annen rapport fra 2019 (se Figur 1.4) hvor de har undersøkt andelen pneumokokker hos pasienter med lungebetennelse som er resistente mot ulike antibiotika viser en ganske lik fordeling, med unntak av Afrika hvor andelen resistente isolater ser ut til å ha økt kraftig (18). En svakhet ved denne rapporten er at bare noen utvalgte land er inkludert, og det er få land i Afrika og Asia med tilgjengelige data, noe som kan tyde på at tallene ikke er representative for kontinentet.



Figur 1.4 Oversikt over andelen antibiotikaresistente *S. pneumoniae*-isolater som ble rapportert til Aliberti et.al. i 2019 (18).

I en rapport fra ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) fra 2007 står det også at andelen penicillinresistente isolater i Europa er på omtrent 10%, og det er rapportert at de fleste *S. pneumoniae*-isolatene som var resistente mot penicillin også var resistente mot makrolider (4). I en ny rapport fra 2014 står det at makrolidresistens er blitt høyere enn penicillinresistens i de fleste europeiske land, og at Italia og Sverige har hatt en signifikant økning i forekomsten av penicillinresistens. Andelen makrolidresistente isolater er vist i Figur 1.5 (19).



Figur 1.5 Prosent av sykdomsfremkallende *S. pneumoniae*- isolater som er resistente mot makrolider for hvert EU land, Island og Skandinavia.

Resistens er en naturlig konsekvens av bakteriers evolusjon, hvor de som overlever «angrepet» fra antibiotika får spre genene sine videre. I tillegg kan kommensale streptokokker i for eksempel munnen (*S. mitis* og *S. oralis*) være bærere av resistensgener, og spre dem til sykdomsfremkallende pneumokokker via horisontal genoverføring (16). Multiresistens er også et økende problem, og multiresistente pneumokokkstammer er blitt observert selv i land som normalt har lave nivåer av resistens, for eksempel Sverige (15).

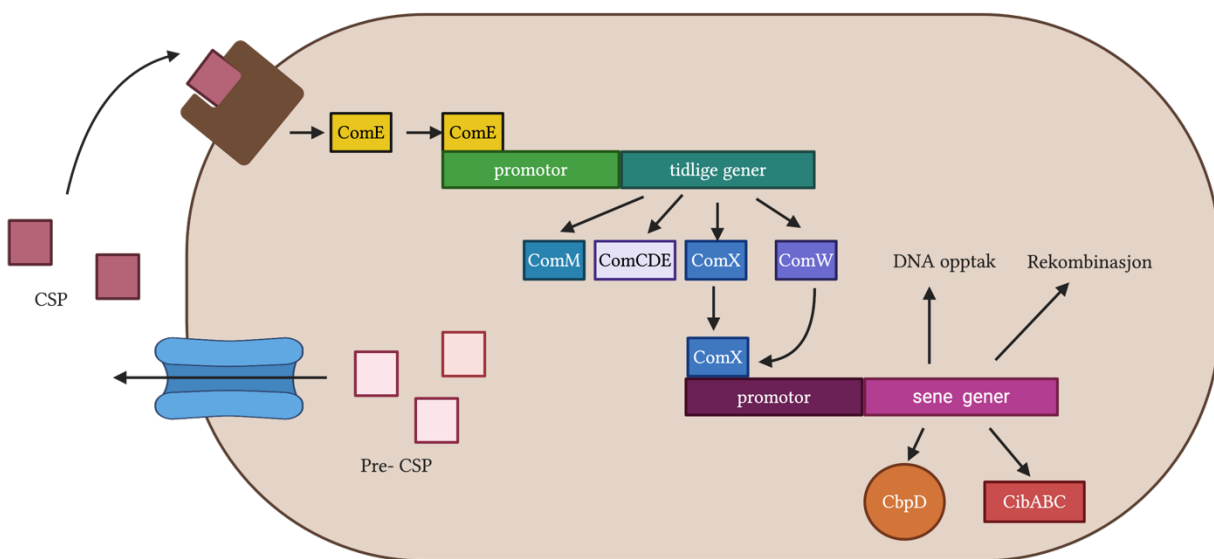
De økonomiske og helsemessige konsekvensene av resistente pneumokokkstammer er alvorlige og vil antagelig forverres betraktelig med dagens økende antall av resistente isolater. I USA forårsaker antibiotikaresistente pneumokokker 1,2 millioner infeksjoner og 7000 dødsfall årlig, hvorav de fleste dødsfallene rammer de som er over 50 år (3). På verdensbasis er det estimert at omtrent 1,6 millioner mennesker dør årlig av *S. pneumoniae* infeksjoner, hvorav de fleste som dør er barn under 5 år i utviklingsland (20)

1.3.2 *Distribusjon av penicillinresistens mellom pneumokokker*

Som nevnt er penicillin fortsatt standardbehandlingen for pneumokokkinfeksjoner, på tross av økende resistens. Penicillin inhiberer celleveggsyntesen hos streptokokker ved å blokkere kryssbindingen av peptidoglykanenheter. Danningen av peptidbindinger mellom peptidoglykanenheter katalyseres av transpeptidaser, også kalt penicillin-bindende proteiner (PBPer), og penicillin binder kovalent til det aktive setet til PBPer noe som gjør dem inaktive (8). Det fantes sannsynligvis noe naturlig variasjon i affiniteten til PBPer ovenfor penicillin og andre β -laktamer før bruken av antibiotika, men behandlingen av infeksjoner med antibiotika har gitt et seleksjonspress for PBPer med redusert affinitet ovenfor β -laktamer, såkalte lavaffinitets-PBPer. Hos svært resistente pneumokokkisolater finner man vanligvis allelevarianter av *pbp1a*, *pbp2b* og *pbp2x* som koder for lavaffinitets-PBPer. For å oppnå de høye resistensnivåene som observeres i dag må det ha skjedd flere substitusjoner i aminosyrerekkefølgen til transpeptidasedomenet i PBP1a, PBP2a og PBP2x. Disse endringene har skjedd gradvis gjennom akkumuleringen av spontane mutasjoner og rekombinering av ulike alleler tatt opp fra andre, resistente streptokokker (11). Pneumokokker er ekstremt effektive i å ta opp slike gener fordi de går inn i en tilstand av naturlig kompetanse. Det betyr at bakterien går inn i en tilstand der den aktivt tar opp DNA fra omgivelsene og inkorporerer det i sitt eget genom.

1.3.3 Naturlig kompetanse hos *S. pneumoniae*

Som beskrevet tidligere er naturlig kompetanse en mekanisme for horisontal genoverføring (se seksjon 1.2) hvor pneumokokkene tar opp DNA fra omgivelsene og inkorporerer det i sitt eget genom. Reguleringen av naturlig kompetanse hos pneumokokker er vist i Figur 1.6. Naturlig kompetanse aktiveres av et protein kalt competence stimulating peptide (CSP), og ulike streptokokkarter har ulike variasjoner av CSP. Under aktiveringen av kompetanse frigjør bakterien CSP via ComAB transporteren og ekstracellulært CSP akkumuleres. CSP binder så til reseptoren ComD som autofosforylerer og overfører en fosfatgruppe til transkripsjonsregulatoren ComE. Binding av P-ComE til promotorer for tidlige kompetansegener fører til økt transkripsjon av *comCDE*-opronet og *comX* genet, under normale forhold er det lavere nivå av transkripsjon. Dette gir økt produksjon av CSP, ComD og ComE, og akkumulering av den alternative sigmafaktoren ComX, ComW og ComM. ComW beskytter ComX og stimulerer ComX til å aktivere transkripsjon av sene kompetansegener som koder for celleveggshydrolyasen CbpD som trigger såkalt fratricid, i tillegg til proteiner som trengs for opptak av DNA og homolog rekombinasjon. Kompetente celler er beskyttet mot CbpD av immunitetsproteinene ComM, et produkt av tidlige kompetansegener. Fratricid er når kompetente pneumokokker lyserer naboceller for å få tilgang på homologt DNA. Fratricidmekanismen har blitt vist å dramatisk øke effektiviteten til horisontal genoverføring og overføring av gener fra de kommensale bakteriene *S. mitis* og *S. oralis* til *S. pneumoniae* (21).



Figur 1.6 Viser en forenklet versjon av kompetanseregulering hos *S. pneumoniae*. Figuren er laget i Biorender.

Den ekstremt høye graden av horisontal genoverføring og muligheten til å «stjele» DNA fra nære slektninger har gjort pneumokokker i stand til å unnsnippe vaksiner via «serotypeswitching» (se seksjon 1.3) og til å dele lavaffinitets-PBPer mellom ulike pneumokokker (seksjon 1.3.2). Dette betyr at man alltid vil ha et behov for å utvikle nye antibiotika og vaksiner for å bekjempe pneumokokkinfeksjoner.

1.4 *Et behov for nye antibiotika*

Moderne medisin er helt avhengig av effektive antibiotika for å behandle alt fra bakterielle infeksjoner i små sår til alvorlige infeksjoner, og for fortsatt å kunne utføre kirurgi og kreftbehandling uten at dette skal innebære høy risiko for å få bakterielle og potensielt dødelige infeksjoner. Med tanke på den akselererende økningen av antibiotikaresistente patogener, vil det bli ekstremt utfordrende å opprettholde lav risiko for infeksjoner ved slike behandlinger i fremtiden (3,5). Utviklingen av resistens kan begrenses ved smartere og mer restriktiv bruk av antibiotika. I tillegg er flere og bedre vaksiner en viktig bidragsyter for å begrense denne resistensutviklingen. Man vil likevel nå et punkt der man må ha tilgang på nye antibiotika som bakterier ikke har utviklet resistens mot ennå, enten for aktiv bruk eller for å ha i reserve ved behov (3). I og med at det ikke har vært utviklet mange nye antibiotika de siste 30-40 årene, mye pga den høye økonomiske kostnaden det innebærer, begynner vi nå å gå tom for medikamenter til å behandle infeksjoner av spesielt resistente bakterier (22). Mange forskningsmiljøer har derfor de siste årene begynt å lete etter nye antimikrobielle stoff med potensial for å bli utviklet til nye antibiotika. Dette gjøres f. eks ved å screene store syntetiske stoffkartotek (>100 000 ulike organiske molekyler) for antimikrobiell aktivitet, eller å lete etter molekyler med antimikrobielle egenskaper som produseres av andre mikroorganismer i naturen (6).

Letingen etter nye naturlig forekommende antibiotika starter med screening av mulige naturprodukter med antimikrobiologisk aktivitet mot en eller flere indikatorbakterier (6). Slike naturprodukter kan for eksempel produseres av mikroorganismer i jord, eller marine mikroorganismer (1). De fleste antibiotikum som er oppdaget til nå har kommet fra landbaserte mikroorganismer og over halvparten fra bakterier i slekten *Streptomyces* (aminoglykosider, kloramfenikol og makrolider), 10-15% produseres av andre bakterier, og rundt 20% av tråddannende sopper (6).

Den mest suksessfulle klassen av antibiotika, penicilliner, produseres f. eks. av sopp i *Penicillium* slekten, som *Penicillium notatum* (6) og *Penicillium chrysogenum* (23). Penicilliner tilhører gruppen av antibiotika kalt β -laktamer, sammen med cephalosporiner. Hovedprodusenten av cephalosporiner er soppen *Acremonium chrysogenum*. Cephalosporiner er mer bredspektret enn penicilliner, og kan inhibere både Gram-positive og Gram-negative bakterier. Både penicilliner og cephalosporiner har blitt videreutviklet, og derivatisert for å unngå resistensmekanismer, og gjøre de mer bredspektret (24).

Mikrober har et enormt arsenal av forsvarsmekanismer der de benytter små organiske molekyler i en slags «krigføring» mot andre mikroorganismer for å konkurrere om de samme næringsstoffene. Det terapeutiske potensialet til slike molekyler kan være stort. Som nevnt har det vært gjort mange store screeninger etter slike stoff blant jordbakterier, og historisk sett, med stor suksess, mens dette har vært mye mindre utforsket for marine mikroorganismer (6). Her ligger det et stort potensial for å oppdage nye antimikrobielle molekyler (1). Dette har vært utgangspunktet for initiativet til prosjektet som er presentert i denne oppgaven.

En rekke antibiotika som brukes i dag er såkalte bredspektrede. Det vil si at de hemmer vekst av mange ulike bakteriearter, og ikke spesifikt den bakterien som forårsaker infeksjonen. Dette er en fordel hvis man ikke vet hva slags bakterie som gir infeksjon. Likevel er ofte bakteriearten som gir infeksjon kjent, og da vil et smalspektret antibiotikum være å foretrekke for å målrettet behandle infeksjonen uten å ta livet av den naturlige bakteriefloraen til pasienten (25). Det vil være gunstig å unngå resistensutvikling hos ikke-patogene bakterier som kan «donere» resistensgener til patogener. I verste fall kan bredspektrede antibiotika forårsake dysbiose. Altså en ubalanse i normal bakterieflora hos mennesker (oftest i tarm eller vagina) som kan fremme vekst av andre ugunstige bakterier og sopp (26). Da jeg startet arbeidet med denne mastergraden var målet å finne nye smalspektrede naturstoff som spesifikt dreper *S. pneumoniae*, en av de viktigste humanpatogene bakteriene. Siden mikroorganismer fra havet har vært lite screenet for produksjon av antimikrobielle molekyler, var det her vi anså størst potensial for å oppdage nettopp slike stoff. En bakterie i slekten *Lysinibacillus* skulle vise seg å være attraktiv for videre studier.

1.5 *Lysinibacillus fusiformis*

L. fusiformis er en Gram-positiv, stavformet bakterie som danner endosporer (27). Endosporene kan være plassert både terminalt og sentralt i bakteriecellen (28). Den tilhører fylumet *Firmicutes*, klassen *Bacilli* og familien *Bacillaceae* (29). *L. fusiformis* er obligat anaerob og vokser best ved temperaturer på 17-37 °C, pH 6.0-9.5, og en saltkonsentrasjon (NaCl) på 2-5% (29). Under dyrking på petriskål danner *L. fusiformis* hvite, runde kolonier. Vekstforsøk viser at bakterien danner endosporer etter 13-14 timer (29). Bakterien lever hovedsakelig i jord, men er og blitt isolert fra en rekke andre miljøer som for eksempel vann, landbruksavfall og i matvarer. *Lysinibacillus* arter var lenge ansett som en del av *Bacillus* slekten, men regnes nå som en separat slekt fordi de har aminosyrene lysin, glutamat og alanin i celleveggen, mens *Bacillus* har diaminopimelinsyre (28).

Det antas at *L. fusiformis* kan være humanpatogen, men det er ikke gjort forskning som bekrefter dette (27). Annotering av genomet til *L. fusiformis* GM har vist at den har gener som koder for adhesjons proteiner, og seks gengrupper som det er antatt at koder for antimikrobielle metabolitter. En av disse genklyngene ble linket til syntesen av bakteriosiner, og videre undersøkelser viste at det kunne være snakk om lantibiotika. Stammen er protease og cellulase positiv, og resistent mot gentamycin, levomycetin, erytromycin, kanamycin og azithromycin (29).

1.5.1 Antimikrobielle molekyler produsert av bakterier i familien *Bacillaceae*

Det er lite kjent om bakterier i slekten *Lysinibacillus* produserer molekyler som hemmer vekst av andre bakterier. Undertegnede har bare funnet en studie som beskriver produksjon av antimikrobielle stoff fra tre isolater i slekten *Lysinibacillus* (basert på 16S rRNA sekvensering). Studien rapporterer at isolatene produserer stoff med peptid eller protein-egenskaper, men informasjon om aminosyresekvenser eller genene som koder for disse proteinene er ikke beskrevet (30,31). Molekylvekten på disse ble estimert å ha ligge mellom 25-70 kDa. Et av proteinene var smalspektret og hemmet den patogene bakterien *Bacillus pumilis* (assosiert med mat), mens et annet hemmet flere matbårne patogener, inkludert *B. pumilis* og *S. aureus*. Det siste hadde bredere inhiberingsspekter mot *B. pumilus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *B. cereus* og *L. monocytogenes* (Gram-positive), *Raoultella planticola* og *P.aeruginosade* (Gram-negative) og soppene *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *F.oxysporium* og *Trichoderma* spp. To av

proteinene ble klassifisert som såkalte bakteriosiner. Bakteriosiner er ribosomalt syntetiserte antimikrobielle peptider eller proteiner produsert av bakterier (32).

Bakteriosiner kan både inhibere bakteriell vekst og drepe bakterier, og virker ofte, men ikke alltid, mot organismer som er i nær slekt med produsenten. Bakteriosiner er derfor antatt å fungere som våpen mot beslektede bakterier i kamp om tilgang på felles næringsstoffer. Bakteriosinproduksjon er velkjent blant andre bakterier som tilhører familien *Bacillaceae*, for eksempel *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus* og *B. thuringiensis* (33). De fleste bakteriosiner produsert av *Bacillus*-arter er lantibiotika som er modifiserte peptider (se seksjon 1.6), men de produserer også mange umodifiserte bakteriosiner. Noen ligner på bakteriosiner som produseres av melkesyrebakterier, mens andre har helt unike peptidsekvenser. Noen *Bacillus* bakteriosiner har et bredere spekter enn bakteriosiner produsert av melkesyrebakterier, og kan inhibere både Gram-negative bakterier og sopp (34).

Analyser av genomene til 328 bakterier, fordelt over 57 arter av *Bacilliales* resulterte i totalt 1815 gener som koder for kjente bakteriosiner, proteiner som antas å være bakteriosiner, ikke-ribosomalt syntetiserte peptider, polyketider, og andre antimikrobielle stoffer (33). Mange bakteriosiner har blitt isolert fra *Bacillus*-arter, men screening av ulike habitater kan føre til isolering av enda flere bakteriosin-produserende stammer (35). De siste årene er det isolert flere nye bakteriosiner fra *Bacillus* arter, med aktivitet mot patogene bakterier, inkludert *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* og *V. vulnificus* (35,36). To eksempler er sonorensin isolert fra *B. sonorensis* MT93 (35) og thuricin BtCspB isolert fra *B. thuringiensis* (36). Sonorensin hadde aktivitet mot *L. monocytogenes*, *V. vulnificus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, og *E. coli* (35). *B. thuringiensis* er en jordbakterie, normalt brukt som et biopestisid. Thuricin BtCspB har stor likhet med Cold-shock protein B, og hadde kun aktivitet mot utvalgte *Bacillus cereus* stammer (36).

1.6 *Bakteriosiner fra Gram-positive bakterier*

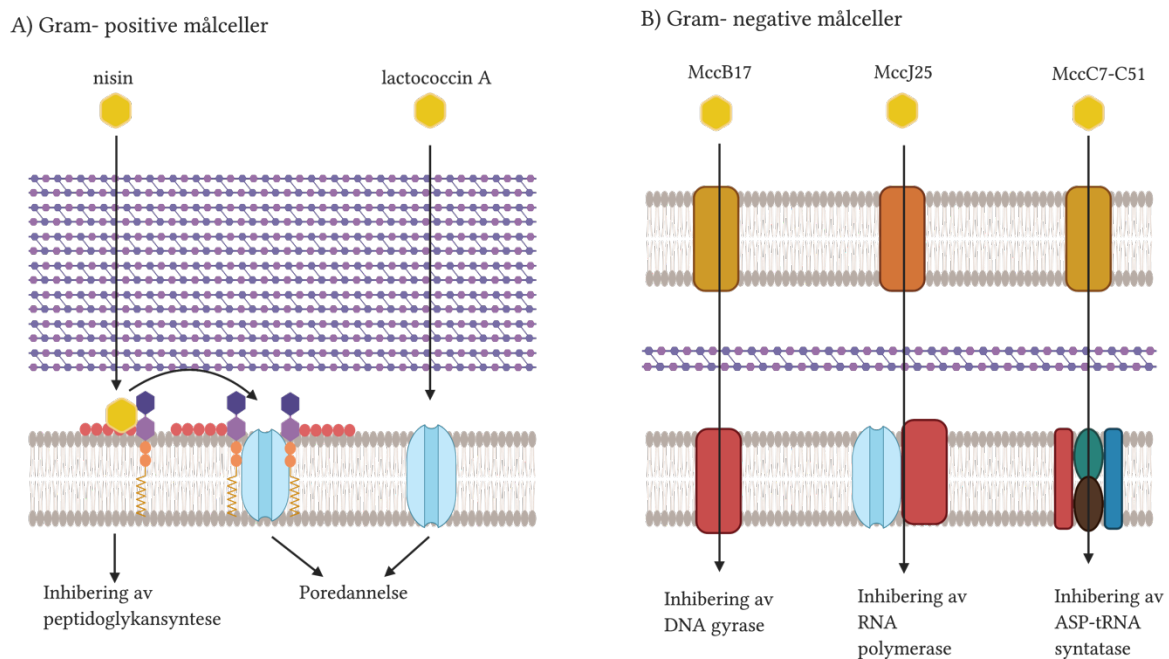
Bakteriosiner produsert av Gram-positive bakterier har fått verdensomspennende oppmerksomhet på grunn av deres store potensial som konserveringsmiddel i mat, bruk som overflatebehandlingsmidler og som fremtidige antibiotika (35). Egenskaper ved bakteriosiner som gjør dem godt egnet som antibiotika er at de har høy effektivitet, lav toksisitet, de er både bred- og smalspektrede og kan bli framstilt og modifisert bioteknologisk (25).

Bakteriosiner produsert av melkesyrebakterier har blitt studert mye siden disse bakteriene er klassifisert som GRAS (generally recognized as safe) organismer av FDA (United States Food and Drug Administration) (34). Gram-positive bakteriosiner deles derfor inn i fire hovedklasser, basert på bakteriosinene produsert av melkesyrebakterier. Klasse I bakteriosiner, også kalt lantibiotika, er små peptider som må gjennom post-translasjonelle modifikasjoner før de blir biologisk aktive. De aktive peptidene har polysyklisk struktur via thioeterbindinger. Lantibiotika har navnet sitt fordi de post-translasjonelle modifikasjonene gir de uvanlige aminosyrene lanthionin og B-metyllanthionin. Lantibiotika kan drepe målcellene ved å danne porer i den cytoplasmiske membranen slik at den blir depolarisert, inhibere essensielle enzymer som er involvert i for eksempel celleveggsyntese, eller binde lipid II (37). Klasse II bakteriosiner kjennetegnes av at de er umodifiserte, lineære peptider med lav molekylær vekt (0,7- 10 kDa). Klasse II bakteriosiner kan som noen lantibiotika også depolarisere cellemembranen til målcellene som angripes (37). Klasse III bakteriosiner er store (>30 kDa) og varmelabile, og inkluderer enzymer som degraderer celleveggen til bakterier og proteiner som ødelegger membranpotensialet til bakteriecellen. Klasse IV bakteriosiner omfatter sykliske peptider, og er avhengige av lipid- eller karbohydratdel for å ha antimikrobiell aktivitet (34,35).

1.6.1 *Virkningsmekanismer hos bakteriosiner*

Virkningsmekanismene til bakteriosiner kan grovt deles inn i de som virker på celleveggen eller cellemembranen, og de som må transporteres til cytoplasma for å deretter inhibere korrekt genuttrykk eller proteinsyntese (Figur 1.7). Mange bakteriosiner som inhiberer Gram-positive bakterier angriper celleveggsyntese eller depolariserer cellemembranen. Noen klasse I bakteriosiner binder til lipid II og blokker peptidoglykansyntesen, mens andre danner porer i cellemembranen, eller inhiberer andre essensielle enzymer. Nisin, et klasse I bakteriosin, binder

lipid II og blokkerer både peptidoglykansyntese og danner porer i cellemembranen. Thiopeptider, et annet klasse I bakteriosin inhiberer translasjon hos Gram-positive bakterier. Klasse II bakteriosiner som for eksempel lactococcin A binder til den poreformende reseptoren mannose fosfotransferase systemet (Man-PTS) og danner slik porer i cellemembranen hos Gram-positive bakterier. Bakteriosiner som produseres av og virker mot Gram-negative bakterier må derimot ofte transporteres gjennom både den ytre og den indre cellemembranen, før de angriper DNA-, RNA- eller proteinsyntese. Noen eksempler er microciner som produseres av *E. coli*. Microcin B17 (MccB17) inhiberer DNA gyrase, MccJ25 inhiberer RNA polymerase, og MccC7-C51 inhiberer aspartyl-tRNA syntatase. Et eksempel på et bakteriosin som virker mot Gram-negative bakterier ved å danne porer i indre cellemembranen er MccE492 som også binder til Man-PTS (25).



Figur 1.7 Eksempler på virkningsmekanismer hos bakteriosiner. Figuren er laget i Biorender.

1.6.2 Resistens mot bakteriosiner

Som alle stoffer som undersøkes for potensialet til å bli et nytt antibiotika, må også bakteriosiner undersøkes for muligheten til resistensutvikling. Siden bakteriosiner har blitt mindre klinisk brukt enn andre antibiotika, er utviklingen av resistens mot bakteriosiner blitt

best studert i laboratorier. Resistensmekanismer som har blitt identifisert inkluderer redusert affinitet hos reseptoren for lantibiotika som binder til lipid II, endringer i celleoverflaten, og reduksjon eller tap av cellemembranassosierte reseptorer. Undersøkelser har også vist at resistens mot bakteriosiner som virker i cytoplasma har oppstått som et resultat av mutasjoner i genene som koder for målproteinene til bakteriosinene. Et annet potensielt problem er «immunitetshemming», som brukes for å beskrive resistens som oppstår hos bakterier med immunitetsgener, eller som en konsekvens av at de produserer beslektede bakteriosiner (25).

1.7 Mål for oppgaven

Potensialet for å finne nye antibiotika produsert av mikroorganismer i miljøet er stort, spesielt i havet da det er antatt at kun 0,1% av den mikrobielle biodiversiteten i marine miljø er kjent (1). Screening av vannprøver fra Oslofjorden, utført av molekylær mikrobiologi gruppen ved NMBU har tidligere gitt lovende resultater. Det var derfor ønskelig å foreta en ny screening med sjøvann. Målet for denne masteroppgaven er å identifisere en bakterie som produserer et potensielt nytt, smalspektret antibiotikum mot *S. pneumoniae*, og å finne noen innledende svar på hva dette antibiotikumet kan være og hvordan det virker.

2 Materialer

2.1 Stammer

Tabell 2.1 Oversikt over bakteriestammer som er blitt testet for sensitivitet mot det antimikrobielle stoffet fusiformicin.

Art	Stamme	Referanse
<i>L. fusiformis</i>	Isolat 1	Denne oppgaven
<i>S. pneumoniae</i>	RH425	Johnsborg et al
<i>E. coli</i>	DH5 α	Invitrogen
<i>S. aureus</i>	MK1001	Dr. Morten Kjos
<i>B. subtilis</i>		Dr. Annette Fagerlund (Nofima, Ås)
<i>E. faecalis</i>	2708	Laboratorium for mikrobiell genteknologi (LMG)
<i>Pseudomonas</i>	Isolat 33	Dr. Daniel Straume
<i>M. smegmatis</i>	NCTC8159	Public Health England
<i>S. pneumoniae</i>	D39	Dr. Morten Kjos
<i>S. mitis</i>	SK142	Professor Mogen Kilian
<i>S. oralis</i>	ATCC 10557	National Collection of Type Cultures
<i>S. perori</i>	SK958	Professor Mogen Kilian
<i>S. infantis</i>	SK140	Professor Mogen Kilian
<i>S. parasanguinis</i>	ATCC 15912	National Collection of Type Cultures
<i>S. gordonii</i>	SK6	Professor Mogen Kilian
<i>S. cristatus</i>	NCTC 12479	National Collection of Type Cultures
<i>S. sanguinis</i>	SK90	Professor Mogen Kilian
<i>S. vestibularis</i>	NCTC 12166	National Collection of Type Cultures
<i>S. bovis</i>	NCTC 8177	National Collection of Type Cultures
<i>S. agalacticae</i>	NCTC 8181	National Collection of Type Cultures
<i>S. phocae</i>	ATCC 29128	National Collection of Type Cultures
<i>S. criceti</i>	ATCC 19642	National Collection of Type Cultures
<i>S. mutans</i>	NCTC 10449	National Collection of Type Cultures

Tabell 2.2 Oversikt over relevante *S. pneumoniae* mutanter konstruert til denne oppgaven, med en oppsummering av genotypen og kjennetegnene til hver mutant.

Stamme	Genotype og kjennetegn	Referanse
IHH12	RH425, men fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH14	RH425, men fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH16	RH425, men fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH18	RH425, men fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH21	RH425, men Δ <i>amiC</i> ::janus, kan ^R	Denne oppgaven
IHH22	RH425, men Δ <i>amiEF</i> ::janus, kan ^R	Denne oppgaven
IHH23	IHH22, men Δ janus:: <i>amiE</i> (D184A), Sm ^R	Denne oppgaven
IHH24	IHH22, men Δ janus:: <i>amiF</i> (D190A), Sm ^R	Denne oppgaven
IHH25	IHH21, men Δ janus:: <i>amiC</i> (fra IHH12), Sm ^R og fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH26	IHH22, men Δ janus:: <i>amiE</i> (fra IHH14), Sm ^R og fusiformiscin ^R	Denne oppgaven
IHH27	IHH22, men Δ janus:: <i>amiEF</i> (fra IHH16), Sm ^R og fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH28	IHH22, men Δ janus:: <i>amiF</i> (fra IHH18), Sm ^R og fusiformicin ^R	Denne oppgaven
IHH29	IHH22, men Δ janus:: <i>amiF</i> (D190A), Sm ^R	Denne oppgaven

2.2 Primere

Tabell 2.3 Oversikt over primere brukt i oppgaven, og en kort beskrivelse av området som amplifiseres i *S. pneumoniae* mutantene.

Navn	Sekvens 5'-3'	Beskrivelse
IHH-1F	TTCTATGCTAACTTGATTGAC	Mutasjon IHH-12
IHH-1R	TAGCAGAGCTGACAATCATAG	Mutasjon IHH-12
IHH-2F	CTATCTTCCAGGACCCAATG	Mutasjon IHH-14, start på delesjon i IHH-16
IHH-2R	AAATAACTGCGATACGATCTG	Mutasjon IHH-18, slutt på delesjon i IHH-16

Navn	Sekvens 5'-3'	Beskrivelse
Janus F	GTTTGATTTTTAATGGATAATGTG	forward janus
Janus R	CTTTCCTTATGCTTTTGGAC	reverse janus
11F	TAACACATGCAAGTCGAACG	forward 16S rRNA
5R	GGTACCTTGTTACGACTT	revers 16S rRNA
IHH-3	AATATCTATTACACACAATCAGG	forward 1000bp oppstrøms for amiC
IHH-4	CACATTATCCATTA AAAATCAAACCATGGAGA GAAAGTTCTATTAG	reverse 1000bp oppstrøms for amiC + forward janus
IHH-5	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGGGTAAAATGTTG ATTGACTCTG	forward 1000bp nedstrøms for amiC +reverse janus
IHH-6	GGACAAGGATACCAAGACAAGG	reverse 1000bp nedstrøms for amiC
IHH-7	TCTAATAACTCTATGGTCGTTG	forward 1000bp oppstrøms for amiE
IHH-8	CACATTATCCATTA AAAATCAA ACTTCTACTCC TATCTATGTGTAC	reverse 1000bp oppstrøms for amiE + forward janus
IHH-9	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGTGGTCGTGCTAT CATCGGTC	forward 1000bp nedstrøms for amiF + revers janus
IHH-10	TTAGTCCTTTTTGATAACGTGC	reverse 1000bp nedstrøms for amiF
IHH-11	AGCACAGATCAAGACATCAGG	revers walker motiv A
IHH-12	CCTGATGTCTTGATCTGTGCTGAGCCAACA ACT GCCTTGG	forward walker A + primer 11
IHH-13	AGCTGCAATAACAAAGTCTGGT	revers walker motiv A
IHH-14	ACCAGACTTTGTTATTGCAGCTGAGCCAATTC AGCCTTGGAC	forward walker A + primer 13
IHH-15	TCACTGTAGTCTTTGACACTTC	fwd ami locus
IHH-16	CTGAATGAAGAATTCGAAACATC	fwd ami locus 2
IHH-17	TGAAAATGTCGTTGTTGATATTC	fwd ami locus 3
IHH-18	AATTGATTTTCAAGCAGGATCC	fwd ami locus 4
IHH-19	TTGGTTCAGCCATGGCTCG	fwd ami locus 5
IHH-20	GATTTCAATGATGTCAGCAAGG	fwd ami locus 6

Navn	Sekvens 5'-3'	Beskrivelse
IHH-21	GTGGAATTTGACGTTTCGTGAC	fwd ami locus 7
IHH-22	GATGCTTTTGCCTTGC GTTC	fwd ami locus 8
IHH-23	GCCTTGGACGTTTCTGTACG	fwd ami locus 9
IHH-24	GCTCATACAACAGGATAGTCG	revers ami locus

2.3 Enzymer, DNA størrelsesstandarder og nukleotider

Tabell 2.4 Oversikt over enzymer, vektstandarder og nukleotider brukt i denne oppgaven.

Navn	Stock løsning	Produktnummer	Leverandør
1 kb DNA ladder	500 µg/ ml		New England BioLabs
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	100 mM	4026/4027/4028/4029	TaKaRa
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	2 U/µl	M0530	New England BioLabs
Phanta Max Super-Fidelity DNA polymerase	1 U/µl	P505	Vazyme
RedTaq® Readymix™		R2523	Sigma-Aldrich
Proteinase K	20 mg/ml	BIO37037	Bioline
Ribonuclease A			

2.4 Peptider

Tabell 2.5 Oversikt over peptider brukt i denne oppgaven, og deres aminosyresekvens.

Peptid	Aminosyresekvens	Stock løsning	Leverandør
Aprotinin			
CSP-1	N-EMRLSKFFRDFILQRKK-C	100 µg/ml	Research Genetics Inc.

2.5 Antibiotika

Tabell 2.6 Oversikt over antibiotika brukt i denne oppgaven.

Antibiotikum	Stock løsning	Produktnummer	Leverandør
Kanamycin	100 mg/ml	K4000	Sigma-Aldrich
Streptomycin	100 mg/ml	S6501	Sigma-Aldrich
Spectinomycin	100 mg/ml	S4014	Sigma-Aldrich

2.6 Kits

Tabell 2.7 Oversikt over kits brukt i denne oppgaven.

Navn	Formål	Produktnummer	Leverandør
Nucleospin® Gel and PCR Clean-up	Rensing av PCR product og ekstraksjon av DNA fra agarose gel	740609.250	Machnery-Nagel
Nucleobonds® AXG columns & buffers	Isolering av genomisk DNA fra celler		Machnery-Nagel

2.7 Utstyr

Tabell 2.8 Oversikt over utstyr brukt i denne oppgaven. Standard laboratorieutstyr ble også brukt, men er ikke vist i denne tabellen.

Utstyr	Modell	Leverandør
Gel kamera	GelDoc-1000	BioRad
HPLC maskin	Dionex UltiMate 3000	Thermo-Fisher Scientific
C18 HPLC kolonne	Halo 160 Å ES-C18, 2.7 µm, 4.6 x250 mm	Advanced-material Tech
C8 HPLC kolonne	MC-Triat C8/S-3µm/12nm, 4.6 x 250 mm	YMC Co., LTD
Kolonnekromatografi maskin	ÄKTA pure 25	GE Healthcare
Ionebyttekromatografi kolonne	Mono Q anionkolonne	GE Healthcare
Gelfiltreringskolonne	Superdex™ 30 Increase 10/300 GL	GE Healthcare
Plateleser	Hidex Sense	Hidex
Mikroskop	LSM700	Zeiss
Spektrofotometer	NanoDrop 2000	Thermo-Fisher Scientific
PCR maskin	ProFlex PCR Systems	Applied biodynamics
Vakuumpumpe og kondensasjonsfelle	Gel pump GP100	Savant

2.8 Kjemikalier

Tabell 2.9 Alfabetisk oversikt over kjemikalier brukt i denne oppgaven, inkludert kjemisk formel, produktnummer og leverandør.

Kjemikalie	Formel	Produktnummer	Leverandør
Acetonitrile	MeCN		
Acetat	CH ₃ COOH	1.00063.1011	Sigma-Aldrich
Adenosin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	A9251	Sigma-Aldrich
Aktivt kull	C	1.020184.1000	Merck
Agarose		15510-027	Invitrogen
Agar pulver			
Albumin BSA		A7906	Sigma-Aldrich
Amberlite® XAD-16N		XAD16	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	A4418	Sigma-Aldrich
Asparagine monohydrate			
Bacto™ Brain Heart Infusion		237200	BD Diagnostic
Bacto™ Todd Hewitt		249240	BD Diagnostic
Bactotrypton			
Biotine	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	19606	Sigma-Aldrich
Blod fra sau			Thermo Fisher
Bromfenol blå	C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Sna	B-5525	Sigma-Aldrich
Butanol	C ₄ H ₉ OH		
Casitone			
Choline klorid	C ₆ H ₁₄ NO.Cl	C1879	Sigma-Aldrich
di-kalsiumfosfat	CaHPO ₄	102304	Merck
di-natriumfosfat	Na ₂ HPO ₄	1.06580.1000	Merck
DTT	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂		
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₈ .H ₂ O	20 296.360	VWR
Etanol 70% og 100%	C ₂ H ₅ OH		

Kjemikalie	Formel	Produktnummer	Leverandør
Gjærekstrakt		1.04086.0250	Merck
Glassull		1.04086.0250	Merck
Glukose 20%	$C_6H_{12}O_6$	10117gK	VWR
Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$		
Glyserol (50%)	$C_3H_8O_3$	1.04094.1000	Merck
Glysin	$C_2H_5NO_2$	1.0421.1000	Merck
Isopropanol			
Jern(II)sulfat heptahydrat	$FeO_4S \cdot 7H_2O$	44970	Fluka
Kaliumfosfat	KH_2HPO_4	104873	Merck
Kaliumklorid	KCl		
Kalsium klorin anhydrine	CaCl	44970	Fluka
Kobbersulfat pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	61240	Fluka
L-cystein hydroklorid	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl$	30130	Fluka
L-tryptofan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$		
M-17 (oxid)			
Magnesium klorin hexahydrat	$ClMg \cdot 6H_2O$	63072	Fluka
Mangan(II)klorid	$MnCl_2$		
Mangan(II)klorid tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	31422	Riedel-de Haën
Metanol (100%)	CH_2OH	603-001-00-x	Merck
Metansyre	CH_2COOH		
Müller Hinton			
Natrium acetat	$C_2H_3O_2Na$	S3272	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid	NaOH	1.06469.1000	Merck
Natriumklorid	NaCl	1.06464.1000	Merck
Natrium pyruvat	$C_3H_3NaO_3$	P8574	Sigma-Aldrich
Nikotinsyre	$C_6H_5NO_2$	72309	Fluka

Kjemikalie	Formel	Produktnummer	Leverandør
peqGREEN		PEQL37-501	Saveen Werner
Pyrodoxin hydroklorid	$C_8H_{11}NO_3HCl$	95180	Fluka
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	R-7649	Sigma-Aldrich
Saltsyre	HCl	30721	Riedel-De Haën
Sinksulfat heptahydrat	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	96500	Fluka
Sukrose	$C_{12}O_{22}H_{11}$	102745C	BHD
Thiamine hydroklorid	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$	T4625	Sigma-Aldrich
Trifluoracetic acid (TFA)	$C_2HF_3O_2$	302031	Sigma-Aldrich
Tris base			
Uridin	$C_9H_{12}N_2O_6$	U6381	Sigma-Aldrich

2.9 Oppskrifter på vekstmedium og buffere

2.9.1 C medium

Gjærekstrakt:

40 g gjærekstrakt

360 ml dH₂O

37 % HCl

16 g aktivt kull

Løsningen ble blandet i 10 minutter, og inkubert på 4 °C i 2 timer, før den ble filtrert over natt gjennom en kolonne med glassull og celitt. Løsningen ble justert til pH 7,4 med høymolaritets NaOH, og volumet ble justert til 400ml med dH₂O. Den ferdige løsningen ble sterilfiltrert, og lagret i 4ml enheter på -80 °C.

ADAMS I:

150 µl 0,5 mg/ml Biotine

75 mg nikotinsyre

87,5 mg pyrodoxin hydroklorid (4 °C)

80 mg thiamine hydroklorid

35 mg riboflavin

Løsningen ble justert til pH 7,0, og et endelig volum på 0,5 L, før den ble sterilfiltrert og lagret på 4 °C.

ADAMS II:

500 mg jern(II)sulfat heptahydrat

500 mg kobbersulfat pentahydrat

500 mg sinksulfat heptahydrat

500 mg mangan(II)klorid tetrahydrat

10 ml konsentrert HCL

Løsningen ble justert med dH₂O til et endelig volum på 100 ml, sterilfiltrert og lagret på 4 °C.

ADAMS III:

128 ml ADAMS I

3,2 ml ADAMS II

1,6 g Asparagine monohydrate

160 mg Choline

0,4 g kalsium klorin anhydrine

16 g magnesium klorin hexahydrat

Løsningen ble justert med dH₂O til et endelig volum på 800 ml , og pH justert til 7,6, før løsningen ble sterilfiltrert og lagret på 4 °C.

Pre- C-medium:

22,5 mg L-cystein HCl

4 g natrium acetat

10 g casitone

12 mg L-tryptofan

17 g di-kalsiumfosfat

Løsningen ble justert med dH₂O til et endelig volum på 2 L, og lagret i sterilfiltrerte enheter på 150 ml i romtemperatur.

Tilsatt til 150ml pre- C medium:

150 µl 0,4mM Mangan(II)klorid

1,5 ml 20% Glukose

3,75 ml ADAMS III
110 µl 3% Glutamin
2,5 ml 2% Natrium pyruvat
95 µl 1,5M Sucrose
1,5 ml 2mg/ml Uridine adenosine
1,5 ml 8% Albumin/ BSA
3,75 ml gjærekstrakt

Før bruk ble løsningen blandet godt og sterilfiltrert. C-medium ble lagd ferskt den dagen det skulle brukes, og oppbevart på 4 °C.

2.9.2 *Todd Hewitt (TH) medium*

TH medium ble lagd ved å løse 30 g TH pulver i 1 L dH₂O, det ble så sterilisert ved autoklaving.

TH agar til støpning av petriskåler ble lagd ved å løse 15 g TH pulver og 7,5 g agar pulver (1,5% agar) i 500 ml dH₂O. Agaren ble autoklavert og fordelt i omtrent 20 petriskåler etter autoklaving.

TH soft agar til overlay ble lagd ved å løse 9 g TH pulver og 2,25 g agar pulver (0,75% agar) i 300 ml dH₂O, blandingen ble sterilisert ved autoklaving.

2.9.3 *Brain Heart Infusion (BHI) medium*

BHI medium ble lagd ved å løse 37 g BHI pulver i 1 L dH₂O, og sterilisert ved autoklaving.

BHI agar til støpning av petriskåler ble lagd ved å løse 18,5 g BHI pulver og 7,5 g agar pulver (1,5% agar) i 500 ml dH₂O. Agaren ble sterilisert ved autoklaving og fordelt i omtrent 20 petriskåler.

BHI soft agar til overlay ble lagd ved å løse 9,25 g BHI pulver og 2,25 g agar pulver (0,75% agar) i 300 ml dH₂O. (

2.9.4 2.6.4. Müller Hinton (MH) petriskåler

MH agar til støpning av petriskåler ble lagd ved å løse 9,5 g MH pulver i 250 ml sjøvann, og sterilisert ved autoklaving. Etter autoklaving ble agaren fordelt i omtrent 10 petriskåler.

2.9.5 2.6.5 Luria Bertani (LB) soft agar

For å lage LB soft agar til overlay ble de følgende ingrediensene løst i 300 ml dH₂O:

3g Bactotrypton

1,5 g gjærekstrakt pulver

3 g Natriumklorid

2,25 g (0,75%) agar pulver

Blandingen ble ristet godt, og sterilisert ved autoklaving

2.9.6 2.6.6 GM17 soft agar

GM17 soft agar ble lagd med M17 (oxid), 0,5% (v/v) glukose, og 0,75% (w/v) agar. Ferdig soft agar ble oppbevart i romtemperatur og smeltet i mikrobølgeovn før bruk.

2.9.7 Buffere og løsninger til agarose gelelektroforese

50x Tris-acetat-EDTA (TAE):

424 g Tris base

57,1 ml acetat

100 ml 0,5 M EDTA pH 8.0

Løsningen blandes godt, og justeres til et endelig volum på 1 L med dH₂O.

10x Loading Buffer:

10 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

20% Glukose

0,01% Bromfenol blå

1 kb DNA ladder (50 mg/ml):

50 µl 1 kb ladder (Invitrogen)

200 µl 10x loading buffer

750 µl dH₂O

1% Agarose gel:

0,50 g Agarose

50 ml TAE buffer

2 µl peqGREEN

Løsningen ble kokt i mikrobølgeovn til agarosen var fullstendig oppløst, før peqGREEN fargestoff ble tilsatt. Etter støping tar det omtrent 30 min før gelen er klar til bruk.

2.9.8 Løsninger til HPLC

Buffer A: 0,05% TFA:

250 µl TFA ble løst i dH₂O til et endelig volum på 0,5 L og en endelig konsentrasjon på 0,05% TFA.

Buffer B: 100% acetonitril i 0,05 % TFA:

250 µl TFA ble løst i 500 ml 100% acetonitril.

2.9.9 Buffere til ionebyttekromatografi

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

Løs 181,65 g Tris base i omtrent 800 ml dH₂O, og bruk konsentrert HCl til å justere pH til 8,8. Tilsett dH₂O til et endelig volum på 1 L.

20 mM Tris pH 7,4 + 1 M NaCl

5 ml 1 M Tris og 14,61 g NaCl ble tilsatt i 245 ml dH₂O og blandet godt.

2.9.10 Buffere og standarder til gelfiltrering

20x TBS:

Løs 48,4 g Tris base og 160 g NaCl i omtrent 800 ml dH₂O. Juster pH til 7,6 med konsentrert HCl. Juster til endelig volum på 1 L med dH₂O.

Standarder til kalibrering:

0,2 mg Aprotinin og Ribonuclease A, 7,0 mg Glysin, og noen korn Blue Dextran løses i 1 ml TBS.

2.9.11 Andre buffere

PBS:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

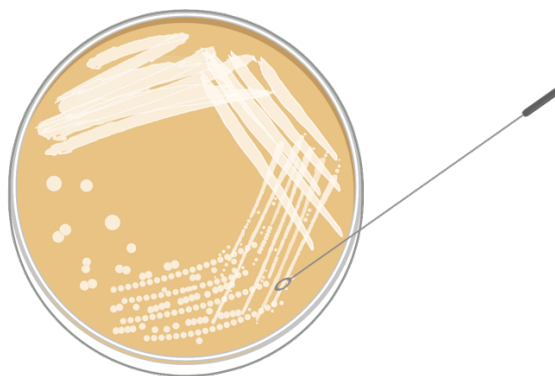
0,24 g KH₂PO₄

Løsningen blandes godt i 800 ml dH₂O, og pH justeres til 7,4 med enten HCl eller NaOH avhengig av utgangspunktet. Sluttvolum justeres til 1 L med dH₂O.

3 Metoder

3.1 Kultivering og dyrkning av bakterier

Bakterier fra sjøvann og sjøbunn ble dyrket på petriskåler med Todd Hewitt-, Brain Heart Infusion- og Müller Hinton agar, med og uten sjøvann. Volum på 100 μ l av de ulike vannprøvene ble platet ut på hver skål, og skålene ble inkubert i romtemperatur i 1-3 døgn. Kolonier til renstryking ble plukket med en podenål, og strøket ut på en plate (Figur 3.1) med samme vekstmedium som skålen kolonien ble plukket fra. Kolonier til frystestokker og startkulturer ble dyrket i flytende vekstmedium til de nådde den eksponentielle vekstfasen, ved $OD_{550} = 0,3$. Glycerol ble tilsatt til en endelig konsentrasjon på 15% (v/v), og både frystestokkene og startkulturene ble lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figur 3.1 Eksempel på strykemønster til renstryking. Enkeltkolonier kan plukkes med en podenål. Figuren er laget i Biorender.

S. pneumoniae ble dyrket i flytende C-medium i lufttette falkonrør, eller på TH-agar i lufttette beholdere. Oksygenet i beholderne ble fjernet ved å tilsette AnaeroGen™ poser (38). AnaeroGen™ posene inneholder askorbinsyre og aktivt karbon som reagerer med oksygenet i beholderen og produserer karbondioksid. Dette resulterer i at etter 30 min er oksygeninnholdet redusert til $< 1\%$ (38). *S. pneumoniae* i C-medium ble inkubert på vannbad ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, mens plater ble plassert i et varmeskap med $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. De andre *Streptococcus* stammene som er brukt i denne studien (Tabell 3.1) ble dyrket på samme måte.

Bakterieartene brukt til soft-agar overlay (Tabell 3.1) ble dyrket aerobt og under følgende forhold; *E. coli* ble dyrket i LB-medium, ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ og resting, *pseudomonas* ble dyrket i BHI-

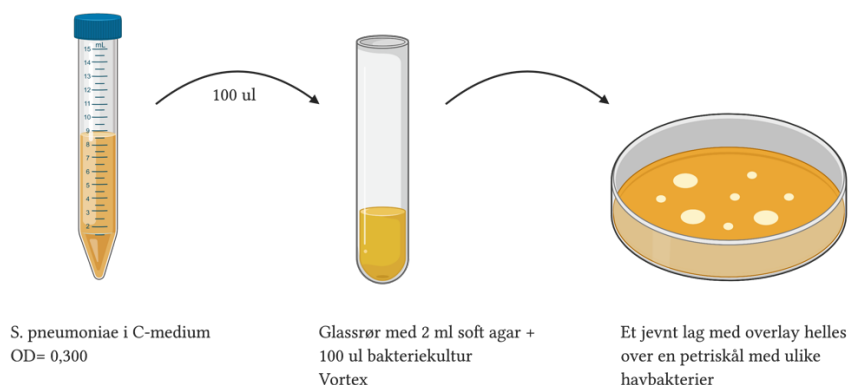
medium ved 22 °C, *B. subtilis* og *S. aureus* ble dyrket i BHI-medium ved 37 °C og risting, og *L. lactis* og *E. faecalis* ble dyrket i GM17-medium ved henholdsvis 37 °C og 30 °C.

For å teste ulike bakteriers sensitivitet mot fusiformicin ble *L. fusiformis* dyrket på TH-agarplater ved å applisere tre µl flytende kultur på en TH-agarplate, og inkubere den over natten ved romtemperatur og normale atmosfæriske betingelser. Flytende kultur ble først produsert ved å plukke en koloni fra en plate med renstryking, og inokulere den i to ml flytende TH. Når cellene nådde eksponentiell vekst ble volumet av TH økt til fem ml. Ved senere anledninger ble startkulturer på fem ml benyttet. For produksjon av store mengder fusiformicin ble en ml flytende *L. fusiformis* kultur tilsatt en 1 L glasskolbe med 500 ml flytende TH-medium, og inkubert på romtemperatur i fire dager uten risting. Etter fire dager ble supernatanten høstet ved å sentrifugere i fem minutter ved 7000g og 4 °C. Supernatanten ble lagret ved -20 °C. Denne kultursupernatanten med fusiformicin vil bli omtalt som «supernatant» videre i teksten om ikke annet er spesifisert.

3.2 Soft-agar overlay analyse

Soft-agar overlay er en teknikk hvor for eksempel bakteriekolonier på en petriskål dekkes av et tynt lag soft-agar som inneholder en annen bakterie, en såkalt indikatorbakterie. Dette kan gi informasjon om bakteriene på petriskålen produserer stoffer med antimikrobiell aktivitet mot bakterien i soft-agar overlayet. Soft-agar overlay kan også brukes til å teste om ulike kjemiske eller enzymatiske behandlinger av et antimikrobielt stoff påvirker aktiviteten til stoffet. Om innholdet på petriskålen inhiberer indikatorbakterien i overlayet vil det dannes en hemmesone hvor indikatorstammen ikke kan vokse (39).

Før overlay må indikatorstammen dyrkes i flytende medium til den er i eksponentiell vekst, det vil si $OD_{550} \sim 0,3$. Deretter overføres 100 µl av indikatorbakterien til et glassrør med fem ml softagar (45°C) som så vortexes, før softagar med indikatorbakterien helles over petriskålen og raskt fordeles i et jevnt lag. Soft-agaren stivner fort, og petriskålen med overlay inkuberes under de optimale vekstforholdene til indikatorbakterien (39). Figur 3.2 viser overlay-teknikken når *S. pneumoniae* brukes som indikatorbakterie.



Figur 3.2 Viser hvordan overlay med *S. pneumoniae* RH425 ble forberedt, og brukt til å dekke petriskåler med kolonier av havbakterier for å teste om noen av dem viste antimikrobiell aktivitet mot RH425. Den samme teknikken ble benyttet for alle overlay. Figuren er laget i Biorender.

I denne oppgaven ble *S. pneumoniae* RH425 brukt som indikatorbakterie for screening av antimikrobielle stoff produsert av havbakterier, og under biokjemisk karakterisering av fusiformicin. Fusiformicin ble også testet mot flere andre indikatorstammer i *Streptococcus* slekten og et utvalg andre bakterier. En oversikt over disse bakteriene finnes i Tabell 3.1.

Tabell 3.1 Oversikt over hvilke bakteriearter som ble brukt til softagar overlay, hvilke medium som ble brukt til softagar for hver art, og hvilke temperaturer og oksygenforhold de ble dyrket ved.

Bakterieart	Soft-agar	Temperatur	Aerob/ anaerob
<i>Streptococcus</i> spp,	TH	37 °C	anaerob
<i>Escherichia coli</i>	LB	37 °C	aerob
<i>Pseudomonas</i> isolat 133	BHI	22 °C	aerob
<i>Bacillus subtilis</i>	BHI	30 °C	aerob
<i>Lactococcus lactis</i>	GM 17	37 °C	aerob
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	37 °C	aerob
<i>Enterococcus faecalis</i>	GM 17	30 °C	aerob
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	BHI	37 °C	aerob

3.3 Innledende tester for karakterisering av fusiformicin

Enkle kjemiske tester kan brukes for å finne noen av de kjemiske og fysiske egenskapene til et ukjent stoff. De som er benyttet i denne oppgaven er beskrevet nedenfor. Alle testene ble utført på en ml ubehandlet supernatant fra en *L. fusiformis* kultur, med unntak av Proteinase K-testen som ble gjentatt med 50x oppkonsentrert supernatant, og DTT-testen som ble utført med Amberlite® XAD 16N oppkonsentrert supernatant. Restaktiviteten til fusiformicin etter de kjemiske testene ble undersøkt ved å applisere tre µl av hver prøve på en TH agarskål med et *S. pneumoniae* RH425 overlay.

3.3.1 Proteinase K

Proteinase K er en endopeptidase som katalyserer spaltningen av peptidbindinger i proteiner. Et ukjent stoff kan behandles med Proteinase K for å finne ut om det er peptidbasert eller ikke (40). Til en ml supernatant ble det tilsatt en µl Proteinase K (20 mg/ml) slik at sluttkonsentrasjonen ble 20 µg/ml. Røret ble invertert for å blande godt, og deretter inkubert på 37 °C i en time. Etter inkubering ble røret plassert på en varmeblokk på 95 °C i 10 minutter, sammen med et rør som kun inneholdt supernatant. Røret med supernatant ble brukt som negativ kontroll.

3.3.2 Sterilfiltrering

Sterilfiltrering kan brukes for å sterilisere løsninger som ikke kan autoklaveres, og for å fjerne partikler over en bestemt størrelse fra en løsning. Partikler som er større enn porestørrelsen til filteret vil ikke passere. Porestørrelsen som ble brukt til sterilfiltrering av en ml supernatant var på 0,2 µm.

3.3.3 Ammoniumsulfat-felling

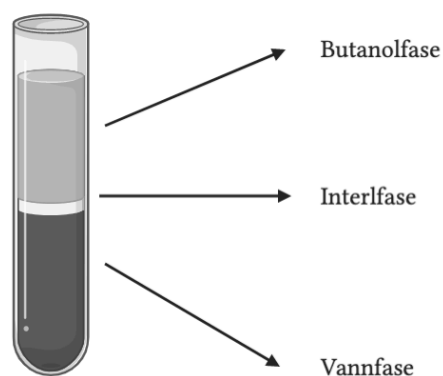
Ved høye saltkonsentrasjoner vil løseligheten til proteiner reduseres. Dette er fordi overflatespenningen i vannet øker, og det fører til at mengden hydrofobiske interaksjoner mellom protein og vann øker (entropisk ugunstige interaksjoner fordi vannmolekylene danner ordnede strukturer mot de hydrofobe flatene). Proteinene reagerer med å minske overflatearealet, for å minimere kontakten med vannet. Dette gjør proteinene ved å aggregere med andre proteiner

noe som fører til at de felles ut. Tilsetning av salter, for eksempel ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) kan derfor brukes for å isolere og oppkonsentrere proteiner (41).

Følgene protokoll ble brukt for ammoniumsulfat-felling: 10 g (NH₄)₂SO₄ ble løst i 25 ml kultursupernatant av *L. fusiformis* (sluttkonsentrasjon på 40%) Løsningen ble inkubert i en time ved romtemperatur før utfelt materialet ble isolert ved sentrifugering på 25 000g i 30 min, og supernatanten fjernet. Pelleten ble resuspendert i to ml dH₂O, og overført til eppendorfrør.

3.3.4 Butanolekstraksjon

Butanol er et hydrofobt organisk stoff og vil trekke til seg andre hydrofobe forbindelser. Når butanol blandes med en vandig løsning vil blandingen skille seg i en vannfase, en hydrofob butanolfase, og noen ganger en interfase mellom butanol- og vannfasen, som vist i Figur 3.3. Butanol har lavere tetthet enn vann og legger seg derfor på toppen av vannfasen. I denne oppgaven ble ti ml supernatant vortexet i ett minutt med to ml butanol i et 15 ml falkonrør. Røret ble så sentrifugert ved 4000g i fem minutter. En ml prøve ble tatt ut fra hver av fasene som ble dannet. Butanolfasen og interfasen er giftige og veksthemmende for bakterier. For å teste om fusiformicin var i butanolfasen måtte butanolen derfor fjernes vha. en vakuumpumpe med kjølefelle. Pelleten som ble igjen ble løst 100 µl dH₂O.



Figur 3.3 Skjematisk fremstilling av plasseringen til butanol-, vann-, og interfasen i et reagensrør. Butanolfasen vil legge seg på toppen, og vannfasen i bunnen av røret. Interfasen vil være mellom de to andre fasene når den er synlig. Figuren er laget i Biorender.

3.3.5 *Dithiothreitrol (DTT)*

DTT er et redokskjemikalie som forstyrrer korrekt folding av proteiner ved å bryte disulfidbroer som kan oppstå mellom cysteiner. Hvis et stoff inhiberes av DTT kan det tyde på at det er et peptid eller protein som inneholder disulfidbroer (42). Stockløsningen av DTT hadde en konsentrasjon på 0,5 M, og den ønskede sluttkonsentrasjonen var på 50 mM. Til ni µl Amberlite®- oppkonsentrert supernatant ble det tilsatt en µl DTT. Røret ble invertert, og deretter inkubert i 30 min ved romtemperatur. Det ble lagd en negativ kontroll med 50 mM DTT fortynnet med dH₂O.

3.4 *Vakuumtørking*

Giftige løsemidler som butanol og acetonitril måtte fjernes før prøvene kunne testes for antimikrobiell aktivitet. Giftige stoffer ble dampet vekk i et tredelt system for vakuumtørking. Den første delen består av en liten sentrifuge som kan varmes opp, og den er koblet til en vakuumpumpe og en kjølefelle. Vakuumpumpen lager et vakuum i sentrifugekammeret, slik at alle væsker som fordamper blir sugd gjennom et rør og inn i kjølefellen. I kjølefellen er temperaturen -50 °C, og gassene kondenserer og blir fanget. Kjølefellen må skrus på 30 min før bruk, slik at den rekker å bli kald. Hvis den ikke er kald vil ikke gassene kondensere, og de vil unnslippe til luften som pustes inn.

3.5 *Oppkonsentrering av fusiformicin med Amberlite® XAD 16N kuler*

Amberlite® XAD 16N hydrofobiske kuler kan brukes til å oppkonsentrere hydrofobiske forbindelser og til å separere store organiske molekyler. Kulene er spesielt godt egnet for proteiner. De har en porediameter på 100 Å, og overflaten på innsiden er 900 m²/g. Molekyler som er mindre enn 100 Å binder hydrofobisk til overflaten på innsiden av kulene. Avhengig av de kjemiske egenskapene til molekylene som er bundet til kulene, vil molekylene elueres ved ulike konsentrasjoner av et organisk løsemiddel. Eksempler på løsemidler som kan brukes er metanol og etanol (43).

Amberlite® XAD-kuler ble brukt som det første renssteget av fusiformicin fra supernatant. 200 ml supernatant ble tilsatt ca. tre gram Amberlite® XAD-kuler, og inkubert i minst en time

på risting. Etter inkubering ble kulene høstet ved 4000g i fem minutter, og supernatanten fjernet ved hjelp av en fem ml pipette. Kulene ble vasket to ganger med fem ml dH₂O, deretter en gang med fem ml 20% etanol, og til slutt ble fusiformicin og andre hydrofobiske forbindelser eluert med fem ml 100% etanol. Etter hvert rensessteg ble kulene høstet ved 4000g i to minutter. Fraksjoner fra alle vasketrinn samt supernatant etter inkubasjon med Amberlite-kuler ble tatt vare på. For å fjerne etanol og oppkonsentrere mengden fusiformicin ble fraksjonene vakuumentørket, og pelleten resuspendert i 50 µl dH₂O.

3.6 Relativ MIC og hemolyse

Minimum inhiberingskonsentrasjon (MIC) er den minste mengden av et antibiotikum som skal til for å inhibere vekst av en bakterie. Siden massen til fusiformicin er ukjent ble en relativ MIC verdi funnet ved å tilsette fortyninger av fusiformicin til *S. pneumoniae* kultur, og OD₅₅₀ brukt for å måle bakteriell vekst (44). Hemolyse er når røde blodceller lyserer og frigjør hemoglobin (45). Hemolyse kan føre til store skader, og til og med død, hos mennesker, og stoffer som gir stor grad av hemolyse egner seg derfor dårlig som medisiner. Graden av hemolyse kan måles ved å separere plasma fra blodcellene, og måle mengden hemoglobin i plasma med et spektrofotometer (46).

For MIC ble det antatt at 20 µl Amberlite®-oppkonsentrert supernatant med fusiformicin var mer enn nok til å hemme vekst av 280 µl RH425. Det ble deretter laget en to-folds fortyningsrekke, og konsentrasjonen av fusiformicin ble fortynt 11 ganger. De ulike fortyningene ble så tilsatt i hver sin brønn på en mikrotitrerplate, og 280 µl RH425, med OD₅₅₀ = 0,05, ble tilsatt i hver brønn. Den siste brønnen inneholdt kun vann, og fungerte som en negativ kontroll. Bakterievekst ble målt ved OD₅₅₀ hvert femte minutt i åtte timer på en Hidex Sense plateleser. For hemolyse ble 280 µl blodceller i PBS tilsatt 20 µl av de samme fortyningene, og OD₄₉₀ ble målt en gang. Positiv kontroll for hemolyse var en prøve med 1% Triton-X100 i PBS.

3.7 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) er en form for kolonnekromatografi hvor en prøve (den mobile fasen) pumpes gjennom en kolonne (den stasjonære fasen) ved høyt trykk. Reversfase HPLC beskriver et system hvor den mobile fasen er polar, og den stasjonære fasen er hydrofob. Hvor lang tid det tar for en spesifikk forbindelse å passere gjennom kolonnen avhenger av hvor sterk interaksjonen mellom forbindelsen og kolonnematerialet er. Styrken på interaksjonen avhenger hovedsakelig av polariteten til de ulike forbindelsene i prøven. Det vil si at ved reversfase HPLC vil hydrofobe forbindelser bruke lengre tid på å passere gjennom kolonnen enn hydrofile forbindelser. Ofte må hydrofobe stoff elueres med organiske løsemidler der de mest hydrofobe elueres ved høyest konsentrasjon av eluent. Hvor lang tid en forbindelse bruker på å passere gjennom kolonnen kan derfor si noe om hvor hydrofob den er (47).

Når HPLC brukes til rensing av ulike forbindelser i en prøve samles det opp fraksjoner i testrør etter hvert som de ulike forbindelsene elueres fra kolonnen. Siden ulike forbindelser binder til kolonnen med ulik styrke vil de eluere ved ulike tidspunkt og bli samlet opp i ulike fraksjoner. Ved analytisk HPLC sendes løsningen gjennom en detektor etter hvert som ulike forbindelser elueres. Et eksempel på en detektor som kan brukes er et spektrofotometer som måler UV ved en bestemt bølgelengde (47). Bølgelengden kan deretter plottes mot elueringstid (også kalt retensjonstid) i et kromatogram.

Under arbeidet med denne oppgaven ble reversfase HPLC brukt til rensing av Amberlite®-oppkonsentrert fusiformicin og fraksjoner fra gelfiltrering (se seksjon 4.5). Det ble hovedsakelig benyttet en C¹⁸-kolonne fra Advanced-material Tech, men en C⁸-kolonne ble også testet. Begge kolonnene ble koblet til en Dionex UltiMate 3000 HPLC maskin fra Thermo-Fisher Scientific. Siden molekyler har høyest hydrofobisitet ved sine respektive pK_a-verdier vil små variasjoner av pH-verdien i pK_a området kunne ha stor påvirkning på hydrofobisiteten til molekylet og forhindre god separasjon av molekyler. Man ønsker derfor en pH som ligger langt unna pK_a-verdiene til molekylene som skal separeres. Prøvene ble derfor blandet 1:1 med løsning A (0,05% TFA) for å sikre en pH (pH = 2,1) som protonerer de fleste stoff. Kolonnen ble ekvilibrert med den samme løsningen. Etter at prøvene var satt på kolonnen ble de eluert med en lineær gradient fra 0-100% løsning B (100% acetonitril i 0,05% TFA eller 0,1% maursyre). To ulike elueringsgradienter ble benyttet. En hvor konsentrasjonen av løsning B

økte fra 0-100% i løpet av 30 min, og en hvor konsentrasjonen økte fra 0-100% i løpet av 120 min. Absorbans ble målt ved 206 nm. Væskestrømmen ble satt til 0,5 ml/min, og fraksjoner ble samlet for hvert minutt, med mindre noe annet er spesifisert i resultatene.

Alle fraksjonene ble vakuamtørket, og pelletene resuspendert i 25 µl dH₂O, før det ble testet om de inneholdt fusiformicin. Testingen ble enten gjort ved hjelp av plateleser, eller ved å applisere tre µl av fraksjonene på et *S. pneumoniae* RH425 softagar-overlay, og undersøke hvilke fraksjoner som inhiberte vekst. I de tilfellene hvor plateleser ble brukt ble brønnene på en mikrotitrerplate fylt med 300 µl flytende RH425 kultur med OD₅₅₀ ~ 0,02, og ti µl av hver elueringsfraksjon. En brønn med 300 µl C-medium ble brukt som blank, og en med brønn med kun 300 µl RH425 ble brukt som positiv kontroll. OD₅₅₀ ble målt i hver brønn hvert 5. minutt i 8 timer i en Hidex Sense plateleser.

3.8 Ionebyttekromatografi (IEC)

Ionebyttekromatografi separer molekyler basert på overflateladningen deres. Kolonnen som brukes kan være positivt eller negativt ladet. Hvis kolonnen er positivt ladet vil den binde molekyler med negativ ladning, den kalles da en anionbytter og vice versa for en negativt ladd kolonne (kationbytter). Molekylene som er bundet til kolonnen kan deretter bli eluert ved å tilsette en buffer med høye saltkonsentrasjoner eller ved å endre pH. Saltionene med motsatt ladning av kolonnen vil etter hvert utkonkurrere proteinene ved å binde enda sterkere til kolonnematerialet (48). Det isoelektriske punktet (pI) til proteiner er den pH-verdien som gir en netto ladning lik null. Når proteinet er i en buffer med pH høyere enn pI, vil det være negativt ladet (anionisk) og binde til en anionbytter. Når pI ikke er kjent brukes en buffer med pH som er så høy eller lav (over pH = 8,5 eller lavere enn pH 5,5) at den mest sannsynlig er ulik pI (49).

I denne oppgaven ble en Tris-HCl buffer med pH 8,8 brukt. 240 µl eluat fra amberlitekonsentrert kultursupernatant ble sentrifugert ved 20 000g i fem min, og supernatanten ble tilsatt Tris-HCl buffer til en sluttkonsentrasjon på 20 mM. Prøven ble deretter applisert på en anionkolonne (Mono Q) koblet til en Äkta pure 25 kromatografmaskin fra GE Healthcare. Stoff bundet til kolonnen ble eluert med en lineær gradient av NaCl fra 0 – 1 M i

20 mM Tris pH 8,8 over en tidsperiode på 30 minutter. Fraksjoner fra elueringen, inkludert «flow through», ble samlet opp ved hjelp av et automatisk oppsamlingssystem koblet til kromatografmaskinen, og UV ble målt. Fraksjonene ble vakuumtørket og pelleten ble løst i 200 μ l dH₂O, før de ble testet for antimikrobiell aktivitet ved å applisere tre μ l av hver fraksjon på et *S. pneumoniae* RH425 softagar-overlay.

3.9 Gelfiltrering

Gelfiltreringskromatografi separer molekyler, for eksempel proteiner, peptider eller oligonukleotider, basert på størrelse. Molekylene sendes gjennom en kolonne med porøse kuler, og vil diffundere inn i kulene i ulik grad. Små molekyler vil diffundere lengere inn i porene på kulene, og derfor bevege seg saktere gjennom kolonnen. Større molekyler vil i mindre grad diffundere inn i porene, og noen vil ikke gå inn i porene i det hele tatt, de vil derfor bevege seg raskere gjennom kolonnen. Både størrelse og den tredimensjonale formen til molekylene vil påvirke hvor lang tid et molekyl bruker på å passere gjennom kolonnen (10). Gelfiltrering kan brukes til å estimere størrelsen på molekyler og til å separere ulike molekyler i en løsning. For å kunne estimere størrelsen på molekyler ved hjelp av gelfiltrering må kolonnen kalibreres med molekyler av kjent størrelse (50). Under kalibrering vil et molekyl som diffunderer helt inn i kulene passere gjennom kolonnen når et visst volum væske tilsettes. Dette volumet refereres til som totalvolumet til kolonnen (V_t). Et molekyl som er større enn porene vil renne gjennom kolonnen når et mindre volum tilsettes, dette volumet referes til som «void volum» (V_0) til kolonnen (51).

Til gelfiltrering ble 100 μ l amberlitekonsentrert fusiformicin blandet med 100 μ l TBS, og blandingen ble sentrifugert på maks hastighet i fem min, før supernatanten ble overført til et nytt rør. Äkta kromatografmaskinen og gelfiltreringskolonnen ble deretter ekvilibrert med TBS, før prøven ble applisert og gelfiltreringen startet. 1 ml fraksjoner ble samlet opp hvert minutt mellom V_0 og V_t . Vakuumtørking ble brukt for å oppkonsentrere mengden stoff i hver fraksjon. Deretter ble fraksjonene testet for biologisk aktivitet ved å applisere tre μ l av hver fraksjon på et RH425 overlay.

3.10 Mikroskopering

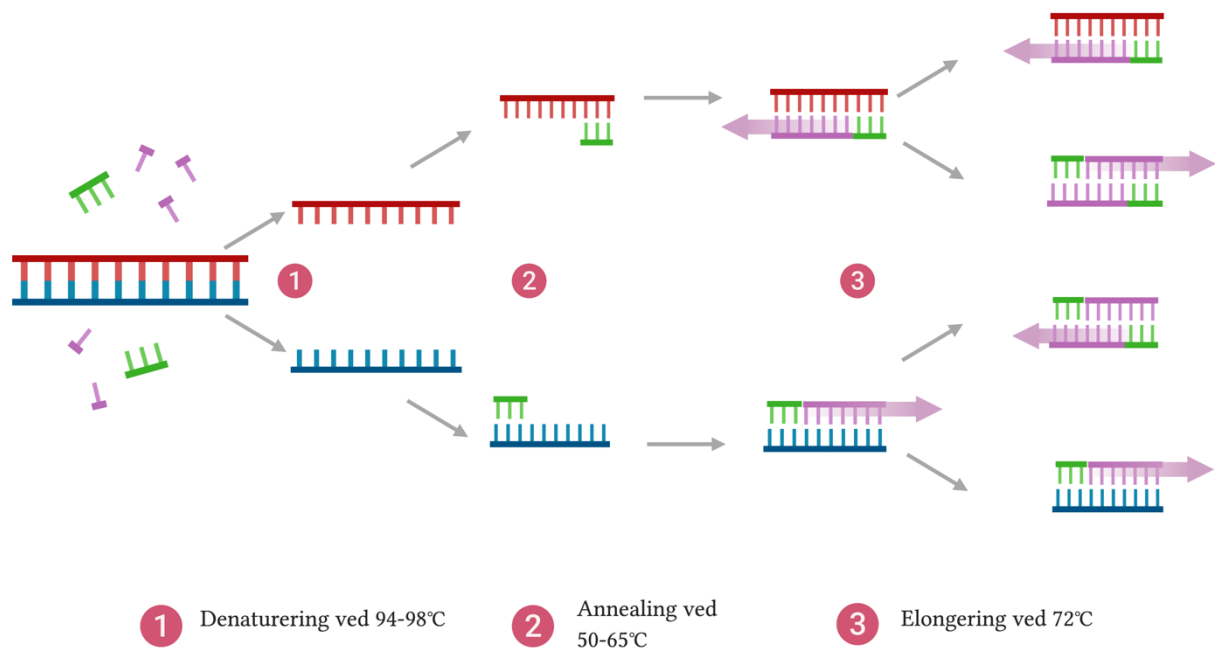
Fasekontrastmikroskopi ble brukt for å undersøke morfologien til ulike isolater fra Hvitsten og *S. pneumoniae* mutanter som var spontanresistente mot fusiformicin. Det var også planlagt å undersøke *S. pneumoniae* RH425 tilsatt veksthemmende mengder fusiformicin, men dette ble ikke gjennomført pga. Covid-19. Følgende protokoll ble brukt: En liten pipettespiss ble brukt til å plukke kolonier av *L. fusiformis* fra en TH agarplate, før de ble løst i 50 µl PBS. Det ble også tatt bilder av *L. fusiformis* fra flytende kultur. 0,5 µl bakterier oppkonsentrert i PBS ble direkte applisert på agarosen. Startkulturer med de spontantresistente mutantene, $OD_{550} = 0,300$ ved frysing, ble tint og sentrifugert ved 4000g i fem min. Etter at supernatanten var fjernet ble den gjenværende pelleten av bakterieceller resuspendert i 100 µl PBS. For å immobilisere bakteriecellene ble det støpt et tynt lag av 1,2% agarose i PBS gel på objektglasset, og etter at gelen hadde stivnet ble 0,5 µl bakteriesuspensjon applisert på agarosen i brønnene på objektglasset, før et dekkglass ble forsiktig satt på. Cellene ble undersøkt i et Zeiss LM700 mikroskop, med et 100x fasekontrast objektiv. Bilder ble tatt med et ORCA-Flash 4.0 V2 Digital CMOS kamera koblet til mikroskopet, og bildebehandling ble gjort i ImageJ.

3.11 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Prinsippet for PCR-teknikken ble oppfunnet av Prof. Kjell Kleppe på 1960-tallet, men ble videreutviklet av Dr. Kary Mullis på 1980-tallet ved at han benyttet en varmemestabil DNA polymerase (52). På den måten kunne metoden automatiseres ved at man slapp og tilsette nytt enzym for hver syklus. PCR-teknikken har gjort det mulig å lage millioner kopier av en spesifikk DNA sekvens. Dette har revolusjonert DNA kloning og sekvensering, funksjonell analyse av gener, forskning på både arvelige og infeksjose sykdommer, og identifisering av genetiske fingeravtrykk (53). Teknikken benytter som nevnt et enzym kalt DNA polymerase til å syntetisere nye DNA tråder som er komplementære til den originale DNA tråden (templatet). Det som er spesielt for DNA polymerase som brukes til PCR er at de er varmemestabile (vanligvis isolert fra termofile bakterier som for eksempel *Thermus aquaticus*), så de tåler å varmes opp til over 90 °C og kjøles ned igjen gjentatte ganger. DNA polymerase kan kun legge til nye nukleotider til en eksisterende 3'-OH gruppe, og derfor trengs det såkalte primere. En primer er en kort DNA-sekvens som er komplementær til et område på templatet, og vil raskt binde til templatet under en PCR (53). I en PCR trengs det to primere; en «forward» og en revers. DNA sekvensen mellom disse primerne vil amplifiseres eksponentielt i en PCR. Primere designes

spesifikt til hver PCR, noe som gjør det mulig å skreddersy hvilket område av DNA templatet som amplifiseres. Det er også mulig å legge til en ekstra sekvens i 5'-enden av primeren. Dette kan være ulike markører, en sekvens som er komplementær til en annen DNA tråd, eller en punktmutasjon man vil introdusere. I tillegg til templat, DNA polymerase og primere må en PCR-reaksjon inneholde deoksynukleotider (dATP, dTTP, dGTP og dCTP), som er byggeblokkene til den nye DNA tråden, og en buffer som sørger for optimale reaksjonsforhold. Bufferen inneholder $MgCl_2$ som er en essensiell co-faktor for DNA polymerasen (53).

En typisk PCR fremgangsmåte består av 20-40 gjentakende sykluser, hvor hver syklus består av regelmessige temperaturendringer som vist i Figur 3.4. Det første steget i en syklus er denaturering av DNA-templatet. Under denaturering økes temperaturen til 94 °C- 98 °C slik at DNA dobbelttråder (dsDNA) separeres. Det neste steget er primer annealing hvor temperaturen senkes til 50 °C- 65 °C og primerne binder en spesifikk sekvens på enkelttrådet DNA templat (ssDNA). Annealingtemperaturen er basert på smeltetemperaturen (T_m) til primerne som brukes. Primerne i denne oppgaven er designet til å ha en T_m på 55 - 60 °C. Det siste steget er polymerisering, der temperaturen økes til omtrent 72 °C og DNA polymerasen syntetiserer nye DNA tråder fra den frie 3'OH-gruppen på primeren. For hver syklus vil antallet DNA tråder dobles etter formelen 2^n der n er antall sykluser. Hvilke temperaturer som blir brukt tilpasses DNA polymerasen, primerne og templatet. Før syklusene starter er det vanlig å ha et innledende steg med temperatur på over 90 °C for å sikre at alt DNA-templat er fullstendig denaturert før primerannealing. Etter at syklusene er ferdig er det vanlig med et ekstra elongeringssteg, for å sikre at PCR-produktene blir fullstendig syntetisert (53).



Figur 3.4 Viser en PCR syklus som starter med dsDNA, primere og dNTPs. Under steg 1, denaturering, separeres dsDNA og det dannes to ssDNA. I steg 2, annealing, binder primerne (grønn) i 3' til den eksisterende tråden. I steg 3, elongering, syntetiserer DNA polymerase nye DNA tråder ved å legge til en og en av dNTPene i 3' enden på den nye tråden. Resultatet blir at for hver PCR syklus doubles teoretisk sett antallet dsDNA.

3.11.1 PCR amplifisering

I denne oppgaven er PCR blitt brukt for å amplifisere DNA til sekvensering og transformasjon av *S. pneumoniae*, og til screening av mulige transformanter. DNA-konstruktene som skulle brukes til sekvensering og transformasjon måtte ikke ha uønskede mutasjoner og DNA polymerasene Phusion® High-Fidelity (New England BioLabs) og Phanta Max Super Fidelity (Vazyme) ble derfor brukt. Phusion® High-Fidelity polymerase ble brukt til DNA-konstruktene til sekvensering, og Phanta Max Super-Fidelity polymerase ble brukt til amplifisering av hele *ami*- operonet. Det er på 7200 bp og Phanta Max Super-Fidelity ble brukt fordi den har høyere nøyaktighet med lange PCR-produkt. Begge enzymene har en polymeriseringshastighet på 30 sekunder per kilobase når genomisk DNA brukes som templat (54,55).

Følgene protokoll ble fulgt for PCR med både Phusion® og Phanta, men med tilpasninger av reaksjonsmiksen og PCR programmet for å sikre optimale forhold for hvert av enzymene. Først ble en reaksjonsmikse med alle komponentene som er listet opp i Tabell 3.2 (Phusion) eller Tabell 3.3 (Phanta) gjort klar. Både 5x Phusion® Buffer og 2x Phanta Buffer inneholder MgCl₂. I noen reaksjoner ble det tilsatt ekstra MgCl₂ ved å erstatte en µl dH₂O med en µl MgCl₂ (50 mM). Deretter ble prøvene plassert i en termosyklus (PCR-maskin) og det aktuelle PCR programmet startet. Standard PCR program for Phusion® og Phanta er vist i tabell 3.4 og 3.5.

Tabell 3.2 Phusion® High-Fidelity reaksjonsmikse for 1 PCR reaksjon. Ved flere PCR reaksjoner ble det gjort klar en mastermikse bestående av buffer, dNTP, Phusion® polymerase og dH₂O med de samme sluttkonsentrasjonene.

Reagens	Volum (µl)	Sluttkonsentrasjon
5x Phusion® Buffer	10	1x
10 mM dNTPer	1	0,2 mM
2 U/µl Phusion® HF polymerase	0,5	0,02 U/µl
10 µM Forward primer	2,5	0,5 µM
10 µM Revers primer	2,5	0,5 µM
DNA templat	1	~20-100 ng
dH ₂ O	32,5	Til et sluttvolum på 50 µl
Endelig volum: 50 µl		

Tabell 3.3 Phanta Max Super-Fidelity reaksjonsmiks for 1 PCR reaksjon. Ved flere PCR reaksjoner ble det gjort klar en mastermiks bestående av buffer, dNTP, Phanta polymerase og dH₂O med de samme sluttkonsentrasjonene.

Reagens	Volum (µl)	Sluttkonsentrasjon
2x Phanta Buffer	25	1x
10 mM dNTPer	2	0,4 mM
1 U/µl Phanta SF DNA polymerase	1	0,02 U/µl
10 µM Forward primer	2	0,4 µM
10 µM Revers primer	2	0,4 µM
DNA templat	1	~50-400 ng
dH ₂ O	17	Til et sluttvolum på 50 µl
Endelig volum: 50 µl		

Tabell 3.4 Standard PCR program for Phusion® High-Fidelity polymerase.

Steg	Temperatur	Tid	Repetisjoner
Innledende denaturering	94 °C	5-10 min ^{a)}	1x
Denaturering	94 °C	30 sek	} 25-30x
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	68 °C	X sek ^{b)}	
Siste elongering	68 °C	5 min	1x
Lagring	4 °C	∞	

^{a)} Når templatet var bakterieceller ble den innledende denatureringen satt til 10 minutter for å lysere cellene. Når rensed DNA ble brukt som templat ble den innledende denatureringen redusert til 5 minutter, og prøvene ble satt på Hot start, som vil si at de ikke ble satt i PCR maskinen før temperaturen hadde nådd 90 °C.

^{b)} Elongeringstid ble tilpasset størrelsen på templatet og 30 sekunder ble lagt til for hver 1000 basepar når Phusion® High-Fidelity polymerase ble brukt. 30 sekunder per 500 basepar ble lagt til når RedTaq® polymerase ble brukt.

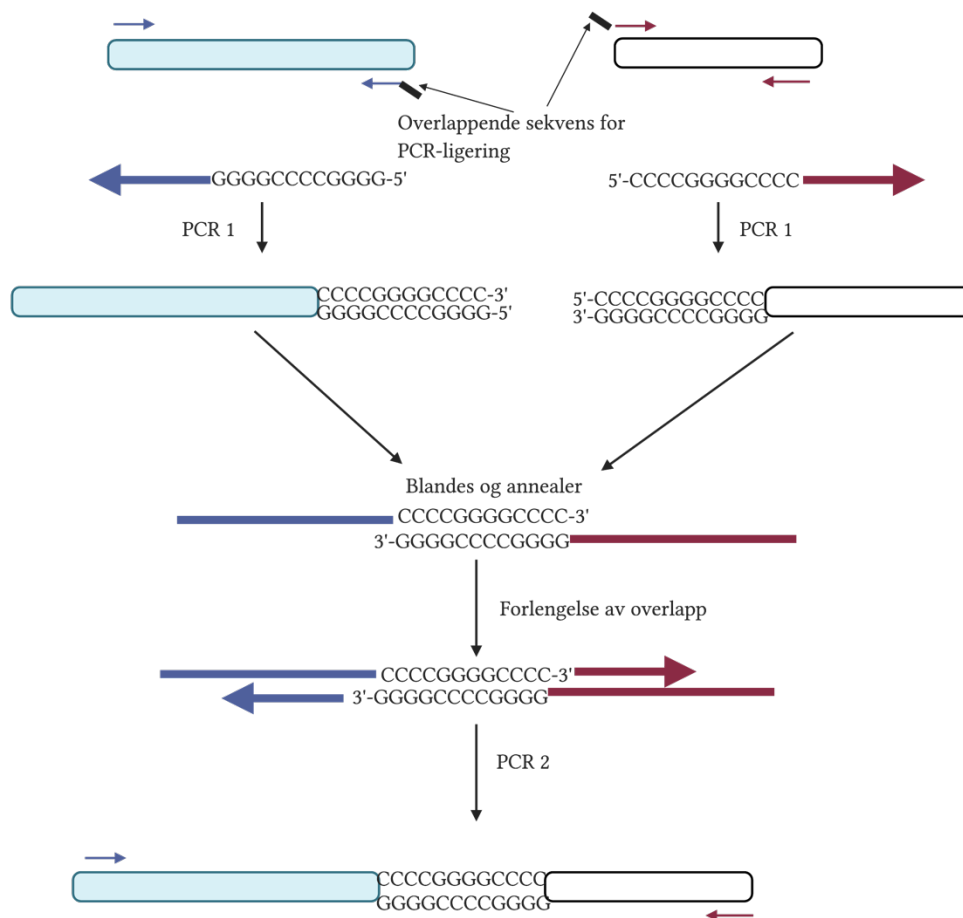
Tabell 3.5 Standard PCR program for Phanta Max Super-Fidelity polymerase.

Steg	Temperatur	Tid	Repetisjoner
Innledende denaturering	95°C	5-10 min ^{a)}	1x
Denaturering	95 °C	30 sek	} 25-30x
Annealing	58 °C	15 sek	
Elongering	72 °C	X sek ^{b)}	
Siste elongering	72 °C	5 min	1x
Lagring	4 °C	∞	

a) og b) gjelder som for Tabell 3.4.

3.11.2 PCR «ligerings»

Fusjonering av PCR produkter kan gjøres med en PCR-metode som kalles «overlap extension PCR» på engelsk, og vil bli referert til som PCR-ligerings videre i denne teksten. Dette er en enkel og allsidig metode for å lage nye DNA-konstrukt for knockout av gener og for å introdusere mutasjoner. To PCR-produkter amplifiseres med 5'- og 3'-ender som overlapper med hverandre, altså har de ca. 20-30 baser i endene som er komplementære med hverandre (Figur 3.5) I neste PCR-reaksjon blandes begge PCR-produktene og blir brukt som templat i en PCR-ligerings. For å lage overlappende, komplementære ender på de innledende DNA-sekvensene brukes det interne primere med et 5'-overheng som er komplementært til 3-enden av den andre DNA-sekvensen. I den påfølgende PCR-ligerings hybridiserer de overlappende, komplementære 3'endene sammen, og de to ulike gensekvensene forlenges til et helt nytt DNA-konstrukt. I PCR-ligerings brukes det primere som annealer til hver sin ende av det fusjonerte DNA-konstruktet (56).



Figur 3.5 Illustrasjon av PCR-ligering hvor boksene illustrerer to DNA-sekvenser som skal fusjoneres. I den første PCR-reaksjonen blir de to sekvensene amplifisert med primere med overlappende sekvenser. PCR-produktene som inkluderer de overlappende sekvensene blandes i en ny PCR-reaksjon, og de overlappende sekvensene annealer til hverandre. De fusjonerte sekvensen amplifiseres med primere som flankerer hver sin ende av sluttproduktet. Figuren er laget i Biorender.

I denne oppgaven ble PCR-ligering brukt til å lage genkassetter for å knocke ut *amiC* og *amiEF*, og til å introdusere spesifikke punktmutasjoner via en Janus kassett (se seksjon 3.16 for beskrivelse av Janus-systemet). For å lage en Janus-kassett til slå ut *amiC* ble følgende PCR-ligering utført:

Tre ulike DNA-fragmenter ble amplifisert ved hjelp av vanlig PCR: 1) 1000 bp oppstrøms for starten på *amiC* hvor revers primer IHH4 introduserer en sekvens 3' som er komplementær til Janus forward primeren (altså 5'-ende av Janus), 2) Janus-kassetten, og 3) 1000 bp nedstrøms for *amiC* hvor forward primer IHH5 introduserer sekvensen som er komplementær til Janus

revers primeren. Genomisk DNA fra RH425 ble brukt som templat for *ami*-sekvensene, og genomisk DNA fra *S. pneumoniae* RH426 ble brukt som templat for Janus-kassetten. I den første PCR-ligeringen ble primer IHH3 og Janus revers primeren brukt for å ligere sekvensen oppstrøms for *amiC* med Janus-sekvensen. De to sekvensene fusjoneres siden de siste ~20 basene 3' på oppstrømsfragmentet er komplementære med Janus forward sekvensene. I den andre PCR-ligeringen ble DNA-fragmentet fra PCR-ligering 1 fusjonert med sekvensen nedstrøms for *amiC* ved hjelp av primer IHH3 og primer IHH6. I den andre ligeringen annelaer 3'-ende av Janus med 5'-ende av nedstrømsfragmentet. Mellom hver PCR-amplifisering ble PCR-produktene separert på gel og rensset. Den samme protokollen ble fulgt for å lage en Janus-kassett til å knocke ut *amiEF*, men med 1000 bp oppstrøms for *amiE* og 1000 bp nedstrøms for *amiF* flankerende henholdsvis 5'- og 3'-ende på Janus. Primer IHH7 og IHH8 ble brukt til å amplifisere sekvensen oppstrøms for *amiE*, og primer IHH9 og IHH10 ble brukt for å amplifisere sekvensen nedstrøms for *amiF*. Det ferdige DNA-konstruktet med Janus-kassetten inkorporert ble amplifisert med primer IHH7 og IHH10.

3.11.3 PCR screening av transformanter

PCR screening er sannsynligvis den raskeste metoden for å undersøke om en transformasjon, se seksjon 3.15, er vellykket eller ikke. Transformanter som skal undersøkes blir tilsatt en ferdig PCR mastermiks og primere. Det er viktig at en eller begge primerne er spesifikke for DNA-sekvensen som skulle transformeres inn, slik at man unngår falske positive svar. I en optimal screeningsprosedyre skal kun koloniene som er blitt transformert ha DNA som kan fungere som templat i PCR-en, og dette visualiseres som bånd med forventet størrelse i en agarosegel (se seksjon 3.12). Hvis transformasjonen ikke var vellykket vil ikke PCR-reaksjonen produsere et DNA-produkt.

I denne oppgaven ble RedTaq® Readymix™ (Sigma-Aldrich) brukt til PCR screening av transformanter. RedTaq® er en klar til bruk PCR miks som inneholder *Taq* DNA polymerase, deoksynukleotider (dNTP), reaksjonsbuffer, MgCl₂, og rødt fargestoff og glyserol som gjør at prøven synker ned i brønnene under agarose gelelektroforese (57). RedTaq® polymerasen syntetiserer DNA med en hastighet på 500 baser per 30 sek. En steril tannpirker ble brukt til å plukke kolonier til screening. Bakterier på tannpirkeren ble overført til sterile PCR-rør ved å berøre bunnen av røret to ganger, og deretter ble tannpirkeren overført til i et rør med

vekstmedium med relevant antibiotika. PCR-røret vil da inneholde nok bakterieceller til screening. Tabell 3.6 viser den endelige PCR miksen inkludert primere. Selve PCR-reaksjonen tok utgangspunkt i PCR-programmet beskrevet for Phusion® High-Fidelity polymerase i Tabell 3.4, men med 10 minutter innledende denaturering, og tilpasning av elongeringstid til lengden på DNA-sekvensen som skulle amplifiseres.

Tabell 3.6 Viser PCR miksen til en PCR-screening. DNA templat er ikke inkludert, men bakterieceller fra kolonier på plate er direkte tilsatt i PCR røret ved hjelp av en tannpirker.

Reagens	Volum (µl)	Sluttkonsentrasjon
2x RedTaq® Readymix®™	5	1x
10 µM Forward Primer	1	1 µM
10 µM Revers Primer	1	1 µM
dH ₂ O	3	Til et sluttvolum på 10 µl
Endelig volum: 10 µl		

3.11.4 Rensing av PCR produkt

Etter PCR-amplifisering av DNA-fragmenter som skulle sekvenseres ble mengden og kvaliteten på PCR-produktene undersøkt ved å analysere fem µl av PCR-produktet på en agarosegel, og resten av PCR-produktet ble rensset. For PCR-ligering ble hele (50 µl) PCR-reaksjonen separert på gel, og det aktuelle DNA-båndet kuttet ut av gelen med en skalpell. Selve rensingen ble gjort med et Nucleospin® Gel og PCR Clean-up kit fra Machnery-Nagel. 45 µl PCR-produkt ble blandet med 500 µl NT1 buffer, og applisert på en tilhørende kolonne (maks 700µl). PCR-produkt fra gel måtte løses fullstendig i 500 µl NT1 buffer, og ble derfor inkubert med bufferen ved 55 °C i 10 minutter. Produktet ble deretter applisert på en tilhørende kolonne og PCR-produktet ble passert gjennom kolonnen ved sentrifugering på 11 000g i 30 sekunder, DNA-molekylene binder til silicastoffet i kolonnen. Membranen i kolonnen ble deretter vasket ved å tilsette 700 µl NT3 buffer med EtOH, og sentrifugert ved 11 000g i 30 sek. Flow-through ble kastet og vaskingen ble deretter gjentatt en gang. Kolonnen ble så sentrifugert ved 11 000g i ett min, for å tørke membranen. Deretter ble kolonnen overført til et nytt eppendorfrør. Det ble tilsatt 30 µl NE elueringsbuffer, og kolonnen ble inkubert i romtemperatur i ett min, før DNA ble eluert ved å sentrifugere ved 11 000g i ett minutt.

Kvaliteten til det rensede DNAet ble bedømt ved hjelp av agarose gelelektroforese. Renset DNA ble oppbevart på -20 °C.

3.12 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en effektiv måte å separere DNA-fragmenter på etter størrelse. Teknikken kan brukes til å separere ulike DNA-fragmenter i en løsning, og til å estimere størrelsen på DNA-fragmentene. Agarose er en polymerer av agarbiose (L- og D galaktose) subenheter, og under geldannelse dannes det et nettverk av fibre med porer av ulik størrelse. Generelt vil en høyere konsentrasjon av agarose gi mindre porer. For å separere DNA ved hjelp av agarose gelelektroforese blir DNA applisert i ferdigstøpte brønner, og en elektrisk strøm påført. Fosfat-gruppene i DNA-molekylet er negativt ladet ved nøytral pH, og DNA-fragmentene vil derfor migrere mot den positivt ladde anoden i et elektrisk felt. Hastigheten DNA-fragmentene beveger seg med i gelen vil avhenge av størrelsen og konformasjonen til DNA-molekylet. Generelt vil de minste DNA-molekylene møte mindre motstand gjennom agarosenettverket i gelen og derfor vandre raskest mot anoden. Etter separering kan DNA-fragmentene visualiseres under UV lys, hvis DNAet i gelen har blitt farget med et passende fargestoff, for eksempel peqGREEN som fluoriserer kun når det er bundet til DNA (58).

I denne oppgaven har agarose gelelektroforese blitt brukt til å separere og analysere DNA-sekvenser i form av PCR-produkt og genomisk DNA. 1 % agarosegel ble lagd ved å løse 0,5 g agarosepulver i 50 ml TAE (Tris-acetat-EDTA) buffer, løsningen ble deretter kokt opp til agarosepulveret var fullstendig løst. Den ble deretter kjølt ned til omtrent 60 °C, og det ble tilsatt to µl peqGREEN fargestoff. Løsningen ble så helt over i et gelstativ, og brønner med ønsket størrelse ble støpt ved å plassere plastkammer i gelstativet før gelen stivnet. Etter 20-30 min var gelen klar til bruk, og den ble overført til et elektroforesekar med TAE buffer. Til prøvene med DNA ble det tilsatt en 10x loading buffer til en sluttkonsentrasjon på 1x. Loading bufferen inneholdt glyserol for å øke tettheten til prøven, og fargestoffet bromfenolblått. PCR-produkter amplifisert med RedTaq® ble ikke tilsatt loading buffer, fordi reaksjonsblandingen allerede inneholder fargestoff. En 1 kb DNA ladder (New England BioLabs) ble benyttet som standard for DNA-molekyler med kjent størrelse, og ved å sammenligne båndene til disse DNA-fragmentene med DNA-fragmentene i de ulike prøvene, får man en omtrentlig størrelse

på fragmentene i prøven. Spenningen ble satt til 90 V, og elektroforesen pågikk i 30-45 minutter. DNA-båndene ble visualisert i UV lys med et GelDoc-1000 kamera fra BioRad.

3.13 DNA sekvensering

DNA sekvensering brukes for å bestemme rekkefølgen av nukleinsyrer i et DNA-molekyl.

Det finnes flere ulike DNA-sekvenseringsteknikker, men den mest suksessfulle frem til introduksjonen av «neste-generasjons-sekvensering» (f. eks. Illumina og Nanopore) er en teknikk kalt Sanger-sekvensering. Sanger-sekvensering har siden 1977 vært den mest brukte metoden for DNA-sekvensering, og brukes fortsatt for sekvensering av korte, spesifikke DNA-molekyler. Teknikken tar utgangspunkt i et DNA-templat og en spesifikk primer. En DNA-polymerase syntetiserer en ny DNA tråd med utgangspunkt i 3'OH til primeren ved å tilsette deoksyribonukleotider (dNTP-er), men i tillegg til vanlige dNTP-er tilsettes det også dideoksyribonukleotider (ddNTP) som mangler den 3' hydroksylgruppen som er nødvendig for forlengelse av DNA tråden. Når en ddNTP blir koblet på den nye DNA tråden, vil DNA-syntesen stoppe opp. Ved å mikse en liten mengde ddNTPer med dNTPer i en reaksjon, vil frekvensen av ddNTP-inkorporering være lavere enn for dNTPene, men nok til at ddNTPer inkorporeres tilfeldig i hver posisjon i det nysyntetiserte DNAet. Altså vil syntesen stoppe opp på tilfeldige tidspunkter og med mange nok utgangstemplat og sekvenseringssyklusler vil resultatet bli DNA tråder som er terminert for hver base av templatet. De lengste kjedeterminerte DNA-molekylene er på ca. 1000 baser. Hver type ddNTP er konjugert med hvert sitt fluorescerende molekyl, og ved å utføre en såkalt denaturerende kapilargelelektroforese som er koblet til en fluorescensdetektor kan hvert terminerte DNA-molekyl detekteres fra minst til størst. Originalt ble radioaktivt merkede ddNTPer brukt, og Sanger-sekvensering ble utført i fire parallelle reaksjoner med samme templat, en for hver av de fire ulike dNTPene (A, T, C, G). Resultatene ble så kjørt i hver sin bane på en polyakrylamid gel, og der en ddNTP var det et radioaktivt bånd. De minste DNA-fragmentene vandret lengst, og ved å lese av hvilken ddNTP som gir et bånd på bunnen av gelen kunne man bestemme DNA sekvensen (59).

I denne oppgaven er målrettet sekvensering brukt for å identifisere bakterieisolat 1 fra sjøvann (16s rRNA sekvensering), og til å undersøke mutasjoner i *ami*-sekvensenet. DNA-sekvensen ble først amplifisert ved hjelp av PCR, og PCR-produktet ble rensset etter protokollen beskrevet

i seksjon 3.10.3. Til selve sekvenseringen ble Eurofins LightRun Tube service benyttet. Sekvenseringsmiksen, med enten forward eller revers primer, ble gjort klar i et eppendorfrør, som ble merket med en LightRun strekkode, og sendt til Eurofins. Sekvensene ble undersøkt ved manuell inspeksjon av kromatogrammene og ved hjelp av BLASTn tjenesten til NCBI. 16s rRNA sekvensene ble sammenlignet med genomdatabasen, mens *ami*-sekvensene ble alignet mot *S. pneumoniae* R6 referansegenom.

Tabell 3.7 Standard oppsett for sekvenseringsreaksjon. Mengden DNA ble justert til en endelig konsentrasjon på 50 – 200 ng, avhengig av størrelsen på DNA konstruktet. Generelt ble det antatt at 5 µl DNA templat var tilstrekkelig for sekvensering av god kvalitet.

Reagens	Volum (µl)	Sluttkonsentrasjon
10 µM Primer (F/R)	1	1 µM
DNA templat	5	50 ng- 200 ng
dH ₂ O	4	Til et sluttvolum på 10 µl
^a 2x BigDye® Direct Sanger sequencing mixture	10	1 x
Endelig volum:	20 µl	

^aTilsatt av Eurofins DNA-sekvenseringsservice.

3.14 Genomsekvensering (WGS)

Genomsekvensering brukes for å bestemme den komplette genomiske DNA-sekvensen i en celle, og ble brukt for å identifisere mutasjonene i *S. pneumoniae* RH425 stammene som utviklet spontanresistens mot fusiformicin. Genomisk DNA fra mutantstammene IHH-12, IHH-14, IHH-16 og IHH-18 ble isolert, som beskrevet i seksjon 3.15. Etter isoleringen ble kvaliteten og konsentrasjonen på det genomiske DNAet analysert ved hjelp av agarose gelelektroforese (se seksjon 3.11) og NanoDrop. Prøver med 1-5 µg genomisk DNA ble sendt til Norwegian Sequencing Centre for genomsekvensering. Genomisk DNA ble fragmentert for sekvensering ved å benytte Nextera™ DNA Flex tagmentation bibliotek-kit. Sekvenseringen ble utført med Illumina Miseq og Miseq v2 Nano-kittet der 2x250 bp parede ender ble avlest. Antall sekvenser ga en dekningsgrad på ca 30x av genomet til *S. pneumoniae*. Programmet Geneious Prime v2019-2.1 ble brukt for å sette sammen sekvensdataene mot referansegenomet til *S. pneumoniae* R6 (NC_003098.1), og for å identifisere mutasjoner mellom genomene til suppressormutantene, RH425 og R6-stammen.

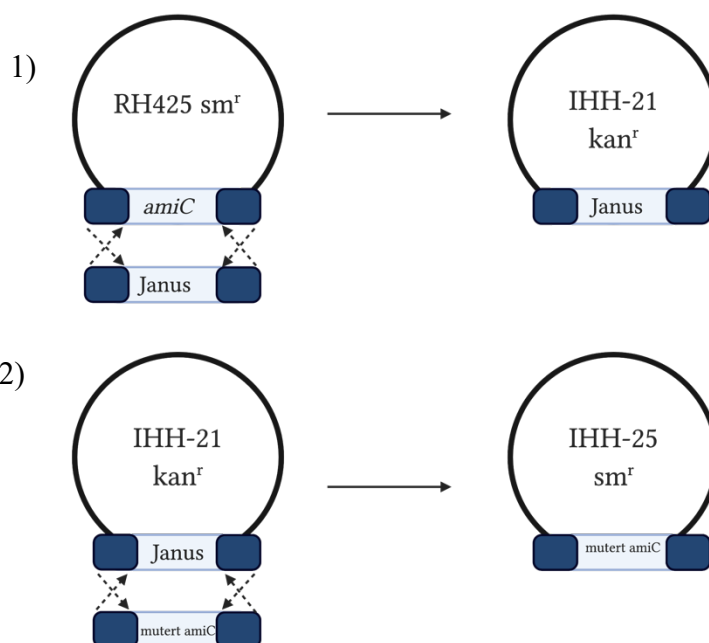
3.15 Isolering av genomisk DNA

Startkulturer av mutant IHH-12, 14, 16 og 18 ble tint, og glyserolen fjernet før cellepelleten ble resuspendert i fem ml ferskt C-medium. Kulturene ble inkubert på et 37 °C vannbad, til OD₅₅₀ = 0,5. Så ble rørene med mutantkulturer sentrifugert ved 4000g i fem minutter, supernatanten ble kastet, og cellepelletene ble fryst på -80 °C fram til genomisk DNA skulle isoleres. Genomisk DNA ble isolert i henhold til protokollen fra Machnery-Nagel, med Nucleobond® AXG kolonner og tilhørende løsninger:

1. Lysering: Cellepelleten ble løst i fem ml G3 buffer, og blandet godt med vortex. Deretter ble 25 µl proteinase K (20 mg/ml) tilsatt, og løsningen ble inkubert på 37 °C i 40 minutter. Etter 40 min ble 1,2 ml G4 buffer tilsatt, og løsningen inkubert på 50 °C i 30 min. Etter inkubering skal lysatet være gjennomsiktig. Lysatet ble sentrifugert på 5000g i 5 min for å fjerne eventuelt uløselig materiale, og supernatanten ble overført til nye rør for å fjerne uløst materiale
2. Ekvilibrering: Før løsninger med DNA ble tilsatt måtte kolonnen ekvibreres med to ml N2 buffer.
3. Binding av DNA til kolonnen: Fem ml N2 buffer ble tilsatt lysatet, og blandet med vortex. Blandingen fikk så renne gjennom kolonnen.
4. Vasking: Kolonnen ble deretter vasket tre ganger med fire ml N3 buffer, som fikk renne gjennom.
5. Eluering: Genomisk DNA ble eluert med fire ml N5 buffer, og samlet opp i et sentrifugerør av glass (Corex®).
6. Utfelling: Til DNA eluatet ble det tilsatt 3,5 ml isopropanol, og sentrifugerøret ble invertert et par ganger og utfelt DNA kom til syne. Løsningen ble deretter inkubert på romtemperatur i 30 min, og så sentrifugert ved 13 000g, og 4 °C i 25 min. Etter sentrifugering var det mulig å se små pelleter med DNA-tråder.
7. Resuspendering: Supernatanten ble forsiktig dekantert, og DNA pelleten ble vasket med en ml iskald 70% etanol og en ml 96% etanol. DNA-pelleten ble så tørket i et 60 °C varmeskap. Etter tørking ble pelleten resuspendert i 300 µl dH₂O, og overført til et eppendorfrør. Genomisk DNA ble oppbevart på -20 °C.

3.16 Transformasjon av *S. pneumoniae*

Naturlig genetisk transformasjon (se innledning) gir muligheten til å direkte deletere gener og innføre mutasjoner i genomet til *S. pneumoniae*. En utfordring kan være å finne en egnet negativ seleksjonsmarkør for gener som ikke direkte påvirker fenotypen til bakterien. Denne utfordringer kan overkommes ved å bruke en Janus-kassetten til å erstatte gener som skal deleteres. Janus-kassetten er på 1300 bp, og inneholder en markør som gir kanamycin-resistens (kan^r) og en markør som gir streptomycin-sensitivitet hos stammer som allerede er streptomycin-resistente (sm^r). Janus-kassetten kan også brukes til å innføre en vilkårlig DNA-sekvens til et målområde i genomet, gjennom en to stegs transformasjonsprosess. I den første transformasjonen brukes Janus-kassetten til å erstatte et valgt gen eller sekvens via homolog rekombinasjon. Transformanten vil da også få overført kanamycin-resistens og streptomycin-sensitivitet. I den andre transformasjonen blir Janus-kassetten erstattet av DNA-sekvensen som skal transformeres inn, og streptomycin-resistens blir reetablert hos bakterien (60). Figur 3.6 viser hvordan denne to-stegs transformasjonsprosessen ble brukt til å innføre et mutert *amiC* gen til RH425. Transformanter kan lett selekteres ved å dyrke bakteriene på medium som inneholder det antibiotikumet de skal være resistente mot.



Figur 3.6 Illustrasjon av hvordan homolog rekombinasjon fører til at et nytt gen blir tatt opp av *S. pneumoniae* celler. 1) Den første transformasjonen av RH425 villtype som tar opp Janus-kassetten og den resulterende transformanten IHH-21 har en Janus-kassetten i stedet for *amiC*, og er blitt kanamycin-resistent. 2) Transformasjonen hvor homolog rekombinasjon sørger for at Janus-kassetten byttes ut med et mutert *amiC* fra IHH-12. Streptomycin-resistens blir tilbakeført når Janus-kassetten ikke lenger er til stede.

3.16.1 Knockout av gener

Under arbeidet med denne oppgaven ble Janus-kassetten brukt til å slå ut *amiC* og *amiEF* i stamme RH425. Janus-sekvensen ble amplifisert med genomisk DNA fra *S. pneumoniae* RH426 celler som templat, mens sekvensene oppstrøms for *amiC* og *amiE*, og nedstrøms for *amiC* og *amiF* ble amplifisert med genomisk DNA fra RH425 som templat. Før transformasjonen ble RH425 celler dyrket i ferskt C-medium til $OD_{550} = 0,05-0,1$ for å sikre at bakteriene var i eksponentiell vekst. Mens cellene inkuberte ble det gjort klart 3 transformasjonsreaksjoner, en reaksjon per transformasjon og en negativ kontroll for hver stamme som skal transformeres. 1: CSP-1 + $\Delta amiC::janus$ DNA, 2: CSP-1 + $\Delta amiEF::janus$ DNA og 3: CSP-1. Det ble brukt 2,5 μ l CSP-1 (stockløsning: 100 ng/ μ l) og 10 μ l DNA (~100 ng). Til hver av de tre transformasjonsreaksjonene ble det tilsatt en ml RH425 flytende kultur. Reaksjonen ble mikset ved invertering, og inkubert på 37 °C vannbad i 2,5 time. Etter transformasjonen ble 30 μ l cellekultur sådd ut på TH-skåler med kanamycin (400 μ g/ml). Transformatene ble inkubert anaerobt overnatt ved 37 °C. På de skålene hvor det var transformanter ble det plukket fire kolonier per transformasjon for screening og oppdyrking. PCR screening av *amiC* transformanter ble gjort med primer IHH3 og Janus revers primer, og *amiEF* transformanter med primer IHH7 og Janus revers primer. PCR screening står beskrevet under seksjon 3.10.4.

3.16.2 Innføring av suppressormuterte gener i villtype *S. pneumoniae*

Stamme IHH-21 og IHH-22 ble videre brukt til å reintrodusere de originale suppressormutasjonene fra de spontanresistente mutantene IHH-12, 14,16 og 18. Genomisk DNA fra stamme IHH-12 ble brukt som templat for PCR amplifisering av mutert *amiC* med primer IHH3 (1000 bp oppstrøms for *amiC*) og primer IHH6 (1000 bp nedstrøms for *amiC*). Genomisk DNA fra stamme IHH-14, 16 og 18 ble brukt som templat for sine respektive mutasjoner i *amiE* og *amiF*, og de samme primerne ble brukt i alle 3 PCR-amplifiseringene: primer IHH7 (1000 bp oppstrøms for *amiE*) og primer IHH10 (1000bp nedstrøms for *amiF*). De rensede PCR-produktene ble deretter brukt til følgende seks transformasjonsreaksjoner:

1: CSP-1 + *amiC^a* + IHH-21 ($\Delta amiC::janus$)

2: CSP-1 + IHH-21 (neg. kontroll)

3: CSP-1 + *amiEF^b* + IHH-22 (Δ *amiEF::janus*)

4: CSP-1 + *amiEF^c* + IHH-22

5: CSP-1 + *amiEF^d* + IHH-22

6: CSP-1 + IHH-22 (neg. kontroll)

^aPunktmutert *amiC*, C-terminal trunkering ved kodon 223

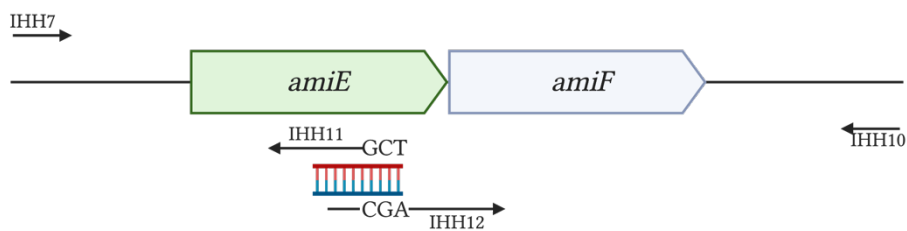
^bPunktmutert *amiE*, C-terminal trunkering ved kodon 318

^cDelesjon av 1079 bp i både *amiE* og *amiF*

^dPunktmutert *amiF*, innføring av stoppkodon ved kodon 51.

3.16.3 Inaktivering av Walker motiv i *AmiE* og *AmiF*.

Ved hjelp av PCR-ligering ble det lagd to DNA-konstrukt med genomisk DNA fra RH425 som templat, et med mutert Walker B motiv i *amiE* og et med mutert Walker B motiv i *amiF*. Begge konstruktene inneholdt *amiEF* sekvensen og sekvenser 1000 bp oppstrøms for *amiE* og 1000 bp nedstrøms for *amiF*. Oppstrøms og nedstrøms regionene er homologe med sekvensene i hver ende av Janus-kassetten i IHH-22, og gjør det mulig å introdusere det nye DNAet ved homolog rekombinasjon. Figur 3.7 viser hvordan mutasjonen ble introdusert i *amiE* via primerne. Den samme teknikken ble brukt til å introdusere mutasjonen i *amiF*. De ferdige DNA-konstruktene ble transformert inn i stamme IHH-22.



Figur 3.7 Viser *amiEF* og primerne, (sorte piler) som ble brukt for å innføre et punktmutert Walker B motiv i *amiE*. Med RH425 som templat ble *amiE* amplifisert med primer IHH7 og primer IHH11, som inneholdt den ønskede mutasjonen: GAT → GCT. Parallelt ble slutten på *amiE* og hele *amiF* amplifisert med primer IHH12, som inneholdt den komplementære mutasjonen og hele den komplementære sekvensen til primer IHH11, og primer IHH10. Den komplementære sekvensen i primer IHH11 og IHH12 er illustrert med dsDNA i figuren. Deretter ble det utført en PCR-ligering med primer IHH7 og IHH10. Det endelige DNA-konstruktet hadde et mutert Walker B motiv i *amiE*, og homologe sekvenser oppstrøms og nedstrøms for genet som var komplementære med sekvensene som flankerte Janus-kassetten i stamme IHH-22.

4 Resultater

4.1 Screening av havbakterier for antibiotika mot *S. pneumoniae*

Nye antibiotika er helt nødvendig i kampen mot resistente bakterier. Mange mikroorganismer kriger om samme habitat og næringsstoffer, og benytter kjemiske «våpen» for å bekjempe hverandre. De produserer små molekyler som hemmer veksten av andre mikroorganismer. Noen slike stoff har gjennom historien vist seg å ha stor terapeutisk nytte som antibiotika (se seksjon 1.4). Få screeningsstudier av slike stoff har vært gjort for mikroorganismer i det marine miljø, og vi ønsket derfor å utnytte dette utforskede domenet til å identifisere nye stoff som hemmer *S. pneumoniae*. Den 19.08.2019 ble 11 prøver hentet fra to ulike lokasjoner ved Hvitsten i Vestby kommune (se Figur 4.1). Av disse 11 ble fire valgt til utplating. Lokasjon en hadde høy grad av vannsirkulasjon (bølger) og prøver med tang, småstein, og slim skrapet av en stein ble hentet. Prøven fra lokasjon to var vann fra en grumsete bukt med lavere grad av vannbevegelser. Det ble også tatt med fire liter sjøvann for å ha i dyrkningsmedier.



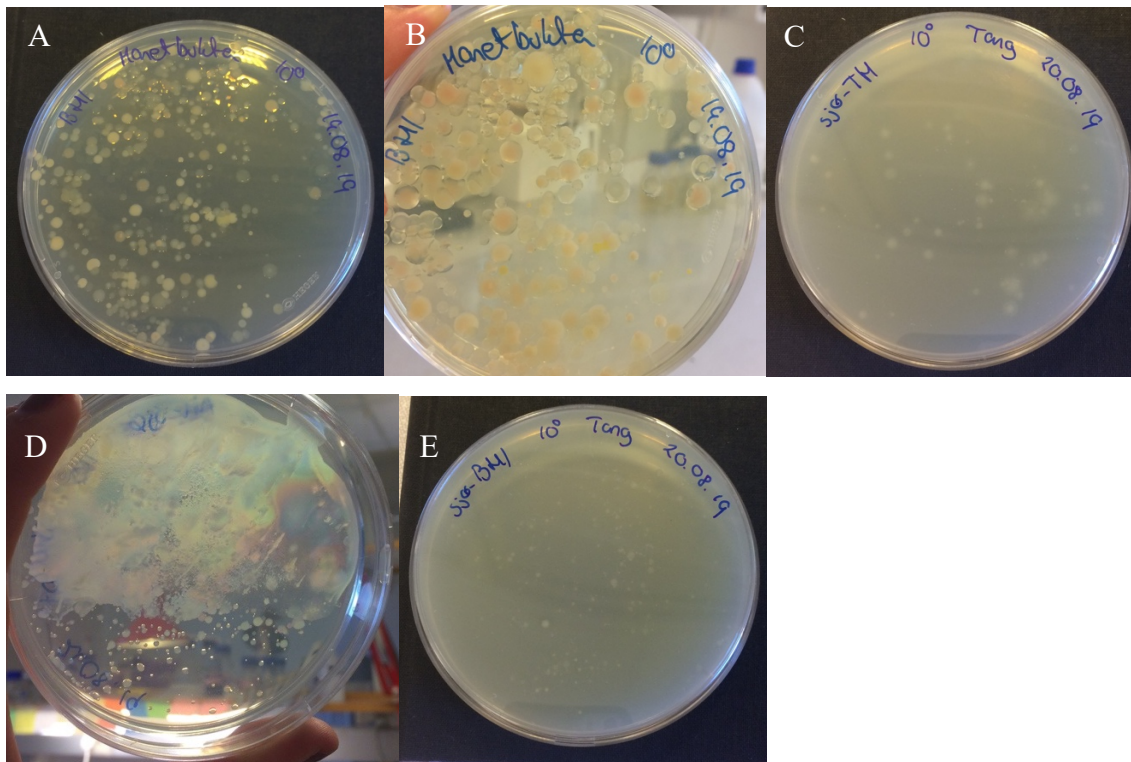
Figur 4.1 Kart over Norge, hvor den røde markøren viser hvor Hvitsten er. Det er så zoomet inn til et oversiktskart over Hvitsten. De to lokasjonene hvor det ble hentet vannprøver er markert med nummer. 1) Er en strand med små og store steiner, og 2) Er en bukt omgitt av en brygge og en steinmolo. Sjøbunnen i bukten hadde sand, og grumsete vann. Bildene er hentet fra Google maps.

4.1.1 *Dyrking av havbakterier på ulike vekstmedium*

Mikroorganismer som var festet på tang, småstein, sand og slim ble forsøkt løsnet mekanisk ved hjelp av en stor pinsett og kraftig risting. Deretter ble 100 µl av tre ulike fortyninger av hver prøve (ufortynnet, 10^{-1} og 10^{-2}) platet ut på både TH og BHI skåler. Skålene ble inkubert i romtemperatur overnatt.

Etter inkubering var det veldig lite vekst på skålene. De fortynnede prøvene ga ikke noe vekst. For å optimalisere vekstbetingelsene ble det derfor laget TH og BHI skåler med saltvann fra Hvitsten i stedet for dH_2O . 100 µl ufortynnet prøve ble så platet ut på saltvannsskålene og inkubert over natten. Samtidig ble de første skålene uten sjøvann inkubert videre. Etter ett døgn hadde skålene med sjøvann mer vekst enn de med ferskvann. Det ble også laget saltvannsskåler med MH-medium, som inneholder svært mange næringsstoffer. 100 µl ufortynnet prøve ble platet ut og inkubert over natten. Inkubering av TH- og BHI-skålene med og uten sjøvann fortsatte.

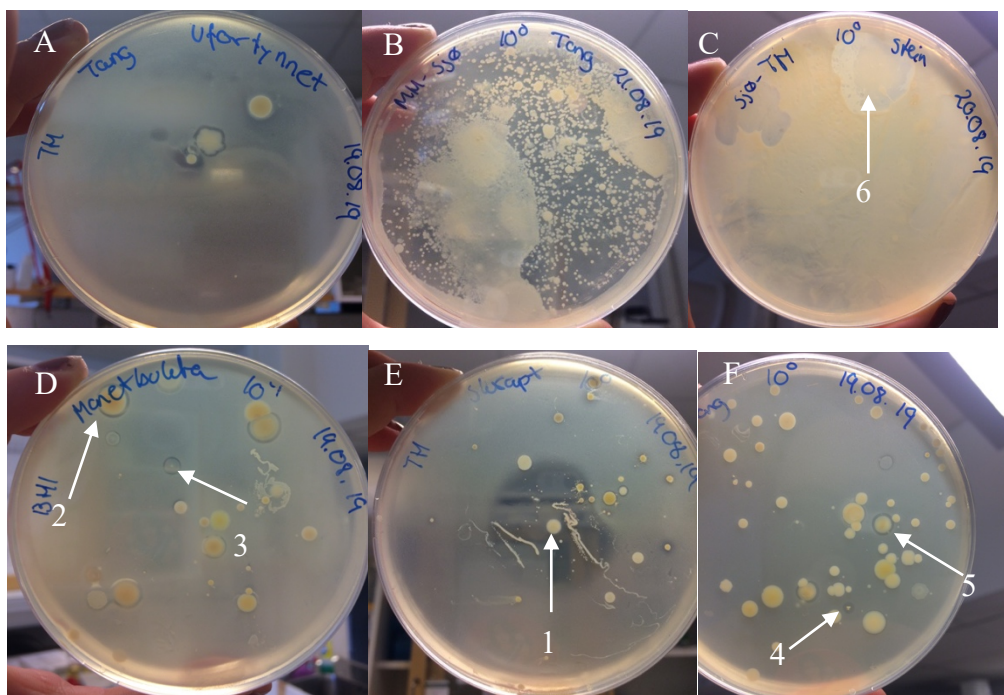
Etter inkubering med ulike vekstmedium hadde skålene med sjøvann flere kolonier enn de med dH_2O . Et utvalg av de ulike koloniene dyrket på ulike medium med og uten sjøvann er vist i Figur 4.2. Vannprøven fra lokasjon to ga flest kolonier på alle de ulike vekstmediene. Flere skåler hadde en koloni som spredde seg over hele skålen, spesielt skålene med MH-agar hvor den utflytende kolonien også hadde et karakteristisk regnbuemønster. BHI-skålene med dH_2O ga mange gule og oransje kolonier.



Figur 4.2 Vekst av bakterier fra A) Skål med BHI-agar lagd med dH₂O. Vannprøven er fra lokasjon to, og skålen har vært inkubert i to døgn. B) Den samme skålen som i A, men inkubert i tre døgn. C) Skål med BHI-agar og sjøvann som har vært inkubert i ett døgn. Vannprøven inneholdt tang (lokasjon en). D) Skål med MH-agar og sjøvann. Prøven er fra lokasjon en og har en regnbuefarget, utflytende koloni E) Skål med TH-agar og sjøvann som har vært inkubert i ett døgn. Vannprøven var hentet fra lokasjon en og inneholdt tang. Bildene er tatt med mobilkamera.

4.1.2 Screening for antibiotika mot *S. pneumoniae*

Alle skålene med ufortynnet vannprøve og BHI-skålen med 10⁻¹ prøven fra lokasjon to ble plukket ut for overlay med *S. pneumoniae* RH425. Skålene med RH425-overlay ble så inkubert anaerobt ved 37°C overnatt. Etter inkubering hadde totalt 14 skåler hemmesone rundt en eller flere bakteriekolonier, og et utvalg av dem er vist i Figur 4.3. Det var færre hemmesoner på skålene med saltvann. Den største hemmesonen var rundt en bakterie fra lokasjon en som ble dyrket tre døgn på TH skålen med dH₂O før overlay. Vannprøven var ufortynnet med slim skrappt fra stein ved lokasjon en.



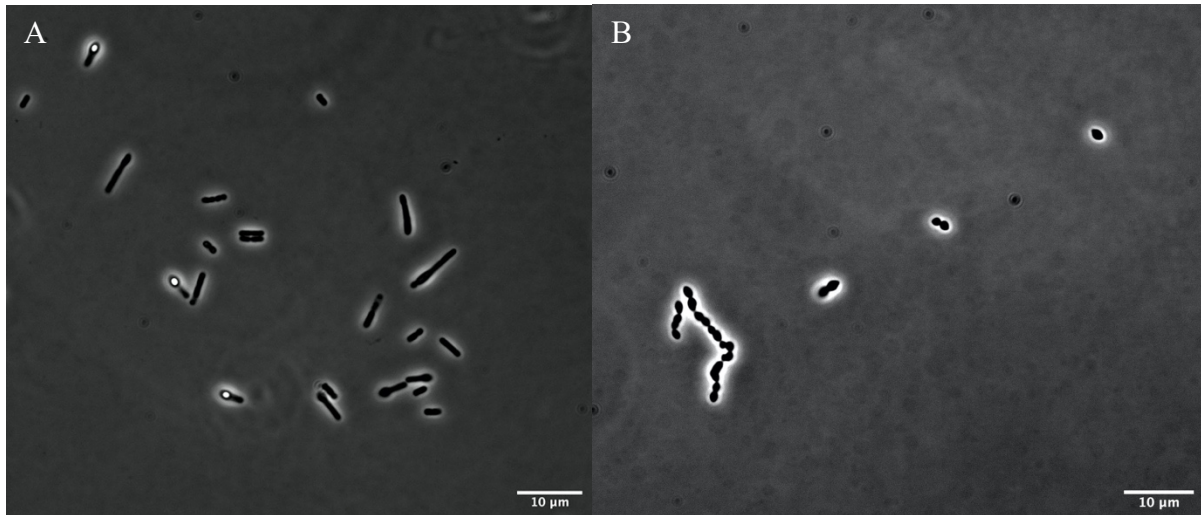
Figur 4.3 Bilder av seks ulike skåler (A-F) som alle hadde kolonier med ulik morfologi som ga hemmesoner. Bilde B og C viser skåler med veldig tett bakterievekst, noe som gjør det vanskelig å se hemmesonene på bildet. Bilde E viser skålen med den største hemmesonen. Det ble plukket kolonier fra skål C, D, E og F, og pilene indikerer hvilke kolonier som ble plukket. Bildene er tatt med mobilkamera, og i etterpåkløkskapens lys ville de sett bedre ut med ensfarget bakgrunn.

Seks kolonier med hemmesone og ulik morfologi ble plukket ut for renstryking. Koloniene kom fra følgende skåler:

- TH + sjøvann med uforyttnet vannprøve med stein (C)
- BHI med 10^{-1} fortytning av vannprøve fra Manetbukta (D)
- TH med uforyttnet vannprøve med slim skript fra stein (E)
- BHI med uforyttnet vannprøve med tang (F)

Bakteriene ble navngitt isolat 1-6, og inkubert i romtemperatur over helgen (tre døgn). Etter inkubering hadde isolat 2, 3 og 5 ingen vekst. Isolat 6 hadde vekst over hele skålen, og isolat 1 og 4 hadde moderat vekst. Fra skålene med isolat 1 og 4 ble det plukket enkeltkolonier til dyrking i flytende medium og mikroskopering.

Fasekontrastmikroskopering viste at isolat 4 så ut som *S. pneumoniae* med ellipseformede celler, som noen steder dannet kjeder. Isolat 1 var lange staver med terminale endosporer, som lignet *Bacillus*-slekten (Figur 4.4). Isolat 4 ble antatt å være en *S. pneumoniae* RH425 kontaminant fra softagar-overlayet og ble derfor ikke studert videre i denne oppgaven, mens isolat 1 ble analysert i nærmere detalj.

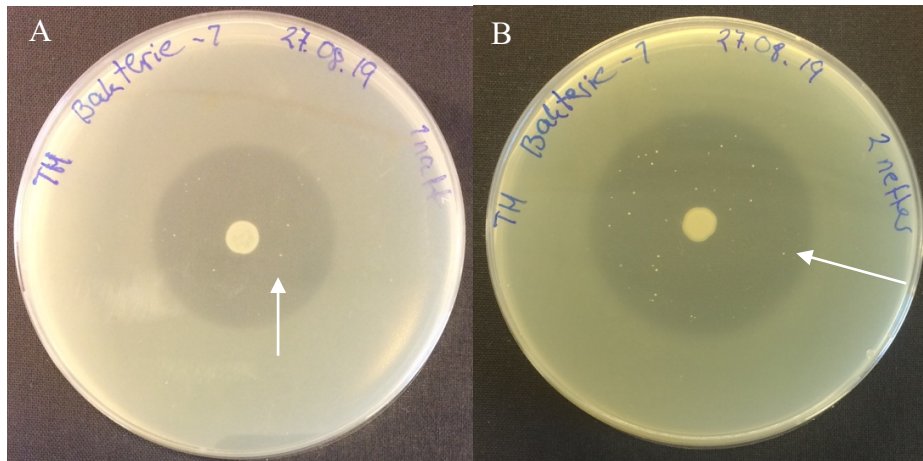


Figur 4.4 Mikroskopbilder av isolat 1 (A) og isolat 4 (B). Lyse flekker kan sees i polene på noen av bakteriene i A. Disse indikerer endosporer.

4.2 Identifisering av bakterieisolat 1

4.2.1 Verifisering av at isolat 1 produserer pneumokokk-hemmende stoff.

For å verifisere at en renkultur av isolat 1 hemmer veksten til *S. pneumoniae* RH425 ble tre µl av den flytende kulturen applisert på to TH-agarskåler. TH-skålene med isolat 1 ble inkubert i romtemperatur i ett og to døgn, det ble deretter lagt et RH425 softagar-overlay, og skålene ble inkubert anaerobt overnatt ved 37 °C. Skålen som ble inkubert i to døgn fikk større hemmesone enn skålen inkubert i en natt (Figur 4.5), men begge hemmesonen var tydelige og med en skarp kant. Inne i hemmesonen hadde det vokst kolonier av resistente bakterier. Mikroskopering av disse bakteriene tydet på at dette kunne være spontanresistente mutanter av *S. pneumoniae* RH425.

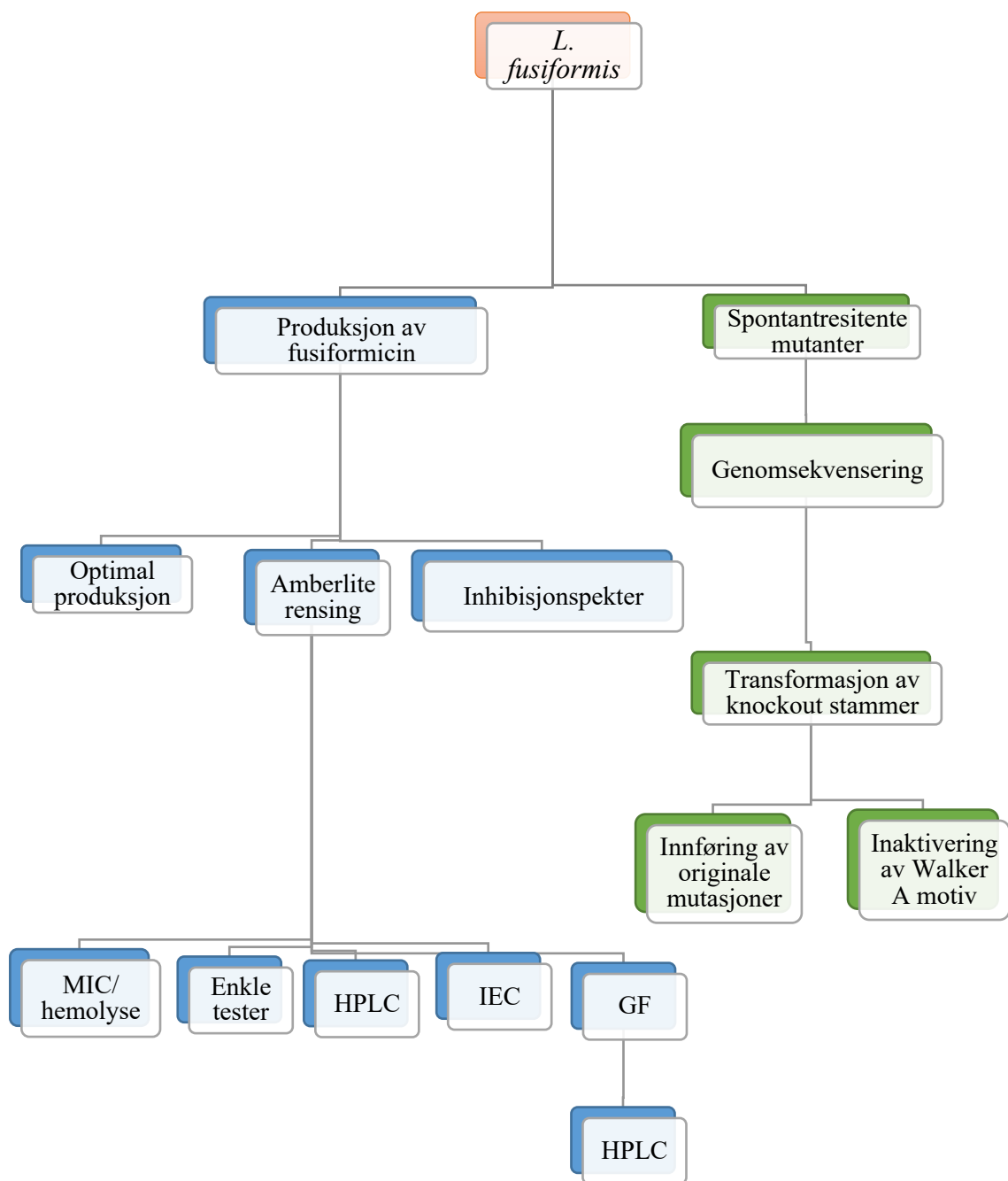


Figur 4.5 Isolat 1 skiller ut stoff som hemmer vekst av *S. pneumoniae* RH425. A) overlay, inkubert i 1 natt og B) inkubert i 2 netter. Hemmesonen i bilde A har en diameter= 35 mm og i bilde B er diameteren= 45 mm. Kolonier av resistente *S. pneumoniae* mutanter kan sees i hemmesonen på begge skålene. Bildene er tatt med mobilkamera.

4.2.2 Identifisering av isolat i ved 16s rRNA sekvensering

Siden resultatene så langt tydet på at isolat 1 var en lovende produsent av et antimikrobielt stoff rettet mot *S. pneumoniae*, ønsket vi å identifisere hvilken bakterie det var. Det ble gjort med 16S rRNA sekvensering. 16S rRNA genet i isolat 1 ble amplifisert ved PCR som så ble rensert og sekvensert. Det ble deretter utført et BLAST-søk for å sammenligne 16S rRNA genet i isolat 1 med 16S rRNA gener i NCBI databasen. 16S sekvensen hadde 99% identitet og 100% dekning med 16S rRNA genet i *Lysinibacillus fusiformis*. Heretter vil derfor isolat 1 bli referert til som *L. fusiformis*, og det antimikrobielle stoffet referert til som fusiformicin.

Arbeidet med fusiformicin tok videre to ulike retninger. Den ene retningen fortsetter med karakterisering og rensing av fusiformicin, mens den andre retningen fortsetter videre med genomsekvensering av de spontantresistente pneumokokkene (Figur 4.5), for å prøve å finne virkningsmekanismen til fusiformicin. Figur 4.6 viser en oversikt over de to retningene og de ulike delforsøkene som ble gjort. Deretter vil rensing og identifisering av fusiformicin presenteres først, før genetiske analyser av virkningsmekanisme.



Figur 4.6 Flyttdiagram som viser de ulike delforsøkene som ble utført i hver av de to retningene. Delforsøk relatert til rensing og identifisering av fusiformicin har blå bakgrunn, mens delforsøk relatert til genomiske analyser av virkningsmekanisme er markert med grønn bakgrunn.

4.3 *Produksjon av fusiformicin*

For å kunne studere de biokjemiske egenskapene til fusiformicin er det nødvendig å ha tilstrekkelige mengder stoff til ulike analyser. En viktig forutsetning for dette er at *L. fusiformis* produserer analyserbare mengder fusiformicin i kulturvolum som er håndterbart i en lab-skala. Selv om produksjon av fusiformicin ser ut til å være betydelig på fast vekstmedium (TH-agar), var det ingen garanti for at *L. fusiformis* ville produsere fusiformicin i flytende vekstmedium. Produksjon i flytende medium er å foretrekke siden det er lettere å oppskalere enn dyrkning på fast vekstmedium.

4.3.1 *Testing av fusiformicinproduksjon i flytende medium*

For å teste om *L. fusiformis* produserer fusiformicin i flytende TH-medium ble bakterien dyrket i 100 ml TH-medium i to dager ved romtemperatur. Tre µl av kultursupernatant isolert ved sentrifugering ble deretter applisert på et RH425 softagar-overlay, og inkubert anaerobt overnatt ved 37 °C. Resultatet var en svak hemmesone der kultursupernatanten var plassert (Figur 4.7). Vi ønsket videre å finne en protokoll for optimal fusiformicinproduksjon i flytende TH-medium.



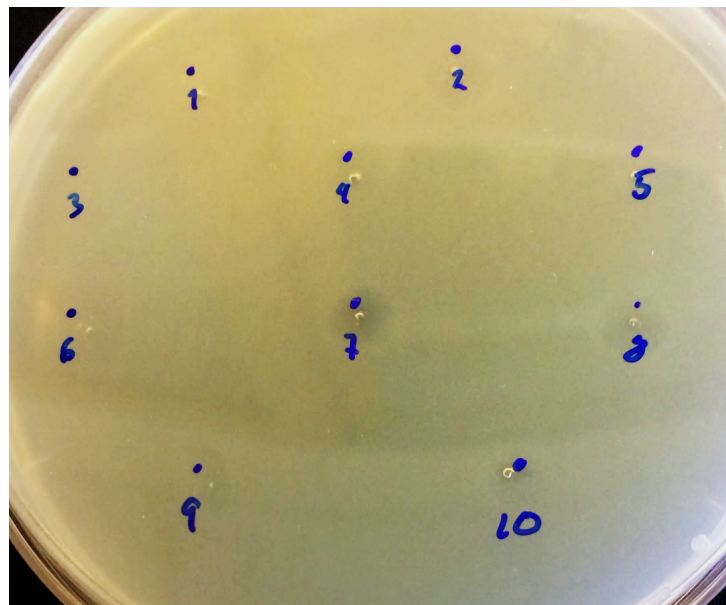
Figur 4.7 RH425 softagar-overlay med 20 ganger oppkonsentrert kultursupernatant isolert ved sentrifugering. Bildet er tatt med mobilkamera.

4.3.2 *Optimalisering av produksjon i flytende kultur*

For optimalisering av produksjon i flytende medium måtte to spørsmål besvares:

- 1) Hvor lang tid tar det før produksjonen er på det høyeste?
- 2) Er produksjon av fusiformicin en stressrespons på f.eks. lite oksygen?

L. fusiformis ble dyrket i 100 ml flytende TH-medium i en Erlenmeyerkolbe, og i et falkonrør med 45 ml TH-medium. I glasskolben var det mer oksygen enn i falkonrøret. De to beholderne med flytende kultur ble så inkubert i romtemperatur i syv dager, og det ble tatt ut en ml bakteriekultur fra begge beholderne på dag en, fire, fem, seks og syv. Supernatant ble isolert fra bakteriekulturen ved sentrifugering. Tre μ l supernatant fra hver prøve (totalt ti) ble så applisert på TH-agarskåler med et RH425 softagar-overlay. Det var størst hemmesone for supernatanten isolert fra bakteriekulturen som var inkubert i glasskolbe i fire dager (Figur 4.8). Det betyr at produksjonen av fusiformicin er størst etter 4 dager, når *L. fusiformis* har tilgang på oksygen. Det ble også observert at bakteriene med tilgang på oksygen vokste mye raskere. De neste spørsmålene ble: Hvor bredspektret er inhibisjonsspekteret til fusiformicin, og 2) Hvor mye fusiformicin skal til for å hemme veksten til *S. pneumoniae*?



Figur 4.8 RH425 softagar-overlay med supernatant isolert fra bakteriekultur inkubert i ett til syv døgn i falkonrør (1-5) og Erlenmeyerkolbe (6-10). Nummer syv er supernatant fra bakteriekultur inkubert i fire dager i Erlenmeyerkolbe. Bildet er tatt med mobilkamera.

4.4 Karakterisering av fusiformicin

Fusiformicin har tydelig antimikrobiell effekt mot *S. pneumoniae*, men har stoffet smal- eller bredspekteret inhiberingsspektrum? For å avgjøre dette ble stoffet testet mot andre streptokokkarter av varierende slektskap til *S. pneumoniae*, samt fjernere slektninger (både Gram-positive og -negative) som *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium smegmatis*, *pseudomonas ssp.* og *Escherichia coli*.

4.4.1 Fusiformicin har smalspektret aktivitet mot streptokokker og bakterier i bacillusslekten

Inhibisjonsspekteret er hvor mange ulike bakterier et antibiotika kan hemme. Smalspektrede antibiotika virker bare mot en type bakterier eller et fåtall arter, mens bredspektret antibiotika virker mot de fleste bakteriearter. Ofte både Gram-positive og Gram-negative (25). Inhibisjonsspekteret til fusiformicin ble undersøkt vha. softagar-overlay med ulike bakterier på TH-skåler med allerede tre dager gamle *L. fusiformis* kolonier. Syv ulike bakteriearter (se Tabell 4.1) som ikke er i slekt med *S. pneumoniae* ble først testet, og deretter ble et utvalg streptokokkarter testet (Tabell 4.1). Det viste seg at i tillegg til streptokokkene, var også *B. subtilis* og *M. smegmatis* sensitive for fusiformicin. Blant streptokokkene fikk *Streptococcus gordonii* den største hemmesonen (48 mm), og *Streptococcus phocae* fikk den minste hemmesonen (25 mm). En streptokokk, *S. agalacticae* var resistent mot fusiformicin. Resultatene peker mot at fusiformicin virker spesifikt mot streptokokker og bakterier i bacillusslekten.

Tabell 4.1 Oversikt over alle bakteriene som ble testet for sensitivitet ovenfor fusiformicin. Streptokokkene står øverst i tabellen, og under skillelinjen er de andre bakteriene. Sensitivitet er beskrevet som diameteren på inhibisjons sirkelen.

Bakterieart	Stammenummer	Hemmesone
<i>S. pneumoniae</i>	D39	40 mm
<i>S. mitis</i>	SK142	35 mm
<i>S. oralis</i>	ATCC 10557	30 mm
<i>S. perori</i>	SK958	40 mm
<i>S. infantis</i>	SK140	34 mm
<i>S. parasanguinis</i>	ATCC 15912	27 mm
<i>S. gordonii</i>	SK6	48 mm
<i>S. cristatus</i>	NCTC 12479	42 mm
<i>S. sanguinis</i>	SK90	40 mm
<i>S. vestibularis</i>	NCTC 12166	28 mm
<i>S. bovis</i>	NCTC 8177	35 mm
<i>S. agalacticae</i>	NCTC 8181	resistent
<i>S. phocae</i>	ATCC 29128	25 mm
<i>S. criceti</i>	ATCC 19642	35 mm
<i>S. mutans</i>	NCTC 10449	29 mm
<i>B. subtilis</i>	ATCC6051	svak hemming (utydelig hemmesone)
<i>M. smegmatis</i>	NCTC 8159	Svak hemming (utydelig hemmesone)
<i>E. coli</i>	DH5 α	resistent
<i>Pseudomonas</i>	ds701	resistent
<i>L. lactis</i>	MG1363	resistent
<i>S. aureus</i>	NCTC 8325	resistent
<i>oE. faecalis</i>	LMG2708	resistent

For å besvare spørsmålet om hvilken type stoff fusiformicin er ble det gjort en rekke enkle biokjemiske tester (proteinase K, DTT, varmeinhibering, butanolekstraksjon og saltfelling), som står beskrevet videre i dette kapitlet.

4.4.2 Proteinase K

En enkel test for å bestemme om et antimikrobielt molekyl består av et peptid eller protein er å behandle det med en protease som vil hydrolysere peptidbindinger og redusere aktiviteten til stoffet. For å teste om fusiformicin er et peptid- eller proteinbasert stoff ble prøve fra supernatant behandlet med proteinase K. Siden proteinase K også kan hemme vekst av *S. pneumoniae*, ble dette enzymet inaktivert ved 95 °C før aktiviteten til proteinase K-behandlet fusiformicin ble testet på RH425 softagar-overlay. Supernatant behandlet parallelt ved 95 °C og romtemperatur ble brukt som kontroller. Tydelig hemmesone ble observert for ubehandlet supernatant, en svak hemmesone for den varmebehandlede supernatanten, og nesten ingen hemmesone for supernatanten behandlet med proteinase K (Figur 4.9). Fusiformicin har blitt delvis inaktivert av varme og tilnærmet helt inaktivert av proteinase K. Dette viser tydelig at fusiformicin er et peptid eller et protein.

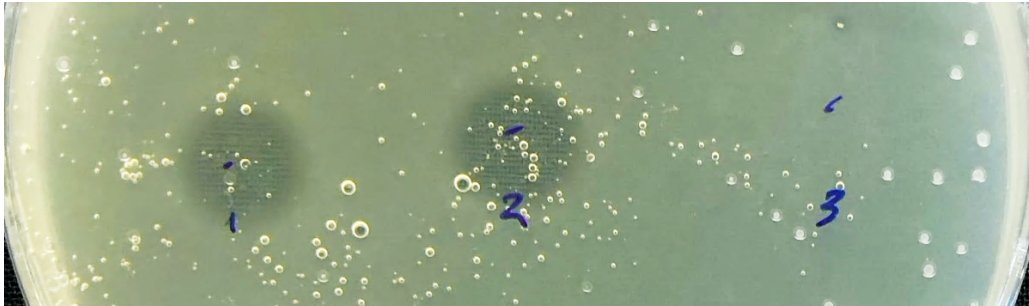


Figur 4.9 Supernatant behandlet med proteinase K (1), varmebehandlet supernatant (2), ubehandlet supernatant (3). Bildet er tatt med mobilkamera.

4.4.3 Dithiothreitol (DTT)

Proteinase K-resultatet viser at fusiformicin er et peptid eller et protein. Det produseres av en *Lysinibacillus*, og vi testet med DTT fordi vi vet fra før at flere bakterier i slekten *Bacillus* produserer en rekke bakteriosiner som heter lantibiotika. De inneholder flere disulfidbroer som er nødvendige for antimikrobiell aktivitet. Inaktivering av fusiformicin med DTT ville derfor vært en indikasjon på et det kunne være et lantibiotikum (34). Fusiformicin fra Amberlite®-oppkonsentrering (seksjon 4.5.1) ble behandlet med DTT, og aktiviteten til DTT-behandlet

fusiformicin ble undersøkt vha. RH425 softagar-overlay. Aktiviteten til fusiformicin ble ikke signifikant redusert etter DTT-behandling (Figur 4.10).



Figur 4.10 Ubehandlet fusiformicin (1) Fusiformicin behandlet med DTT (2) DTT (3). Bildet er tatt med mobilkamera.

4.4.4 Butanolekstraksjon

Butanolekstraksjon ble brukt for å forsøke å oppkonsentrere fusiformicin, og teste om det er hydrofobt. Hvis det beholdt aktivitet etter butanolekstraksjon, kunne det også tyde på at dette er et peptid eller lite protein da disse lettere foldes riktig etter denaturerende butanolbetingelser. Prøver fra butanolfasen, interfasen og vannfasen ble testet for innhold av fusiformicin vha. RH425 softagar-overlay. Ingen av fasene viste antimikrobiell aktivitet.

4.4.5 Ammoniumsulfatfelling

En annen metode som ble forsøkt for å oppkonsentrere fusiformicin fra kultursupernatant var ammoniumsulfatfelling. Utfelt materiale ble resuspendert i vann og testet for innhold av fusiformicin, mens supernatanten ikke ble testet for restaktivitet. Det utfelte materialet hadde ikke antimikrobiell aktivitet, og inneholder derfor inaktivert fusiformicin, eller fusiformicin ble ikke utfelt og det ville vært restaktivitet i supernatanten.

4.5 Rensing av fusiformicin

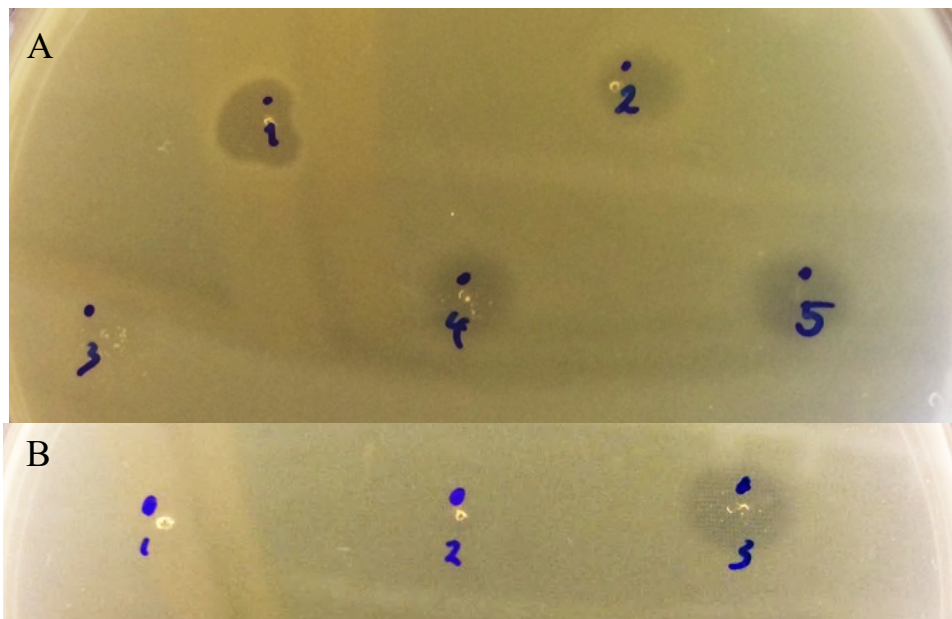
Å rense et stoff til >95% renhet gjør det mulig å identifisere massen til stoffet, beregne MIC (minimal inhibitory concentration), og å finne krystallstrukturen (61). Etablering av en renseprotokoll for fusiformicin ble derfor initiert i dette arbeidet med et hovedmål om å identifisere massen til fusiformicin ved hjelp av MALDI-TOF MS, og å beregne MIC. Noen rensesteg gir også informasjon om egenskapene til stoffet (se seksjon 3. Metode). Rensesteg

for bakteriosiner inkluderer en kombinasjon av Amberlite® XAD hydrofobiske kuler, ionebyttekromatografi (IEC) eller gelfiltrering (GF), og High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Siden behandling med proteinase K viste at fusiformicin er et peptid eller protein, ble alle de nevnte rensestegene testet.

4.5.1 *Fusiformicin binder til Amberlite® XAD 16N*

Peptider og proteiner har både hydrofobe og hydrofile egenskaper, og begge kan utnyttes med hensyn på rensing. De hydrofobe områdene kan binde til en hydrofob flate som for eksempel Amberlite® XAD-kuler. Volum på 100-200 ml kultursupernatant fra *L. fusiformis* ble inkubert med ca. tre gram Amberlite® XAD 16N-kuler under risting for å la fusiformicin binde til de hydrofobe kulene. Fusiformicin ble så eluert med økende konsentrasjon av etanol (se metoder for detaljert beskrivelse). I det første forsøket på å oppkonsentrere fusiformicin ble resultatet at prøven med 20% etanolvasken hadde størst hemmesone, etterfulgt av 100% metanolvasken, 100% etanolvasken, og 30% etanolvasken (Figur 4.11).

Basert på dette resultatet ble det antatt at fusiformicin hadde bundet hydrofobisk til Amberlite® XAD-kulene og blitt eluert med 20% etanol, og renheten på prøven ble derfor analysert med C¹⁸- reversfase HPLC (seksjon 4.5.3). HPLC-analysen viste at prøven inneholdt en rekke ulike stoff (Figur 4.13), og testing av HPLC-fraksjonene for antimikrobiell aktivitet viste at majoriteten av fusiformicin gikk i «flow-through» (seksjon 4.5.3). Dette tydet på at fusiformicin ikke bandt til kolonnen. Det ble derfor testet på nytt om fusiformicin binder hydrofobisk eller ikke til Amberlite® XAD-kuler. Denne gangen ble det tatt vare på restsupernatanten etter inkubering med Amberlite® XAD-kuler, og kulene ble vasket to ganger med vann før fusiformicin ble forsøkt eluert med 20% etanol og 100% etanol. Resultatet var at kun stoff eluert med 100% etanol ga hemmesone (Figur 4.11). Det betyr at fusiformicin binder hydrofobisk til Amberlite® XAD 16N kuler, og elueres med 100% etanol.



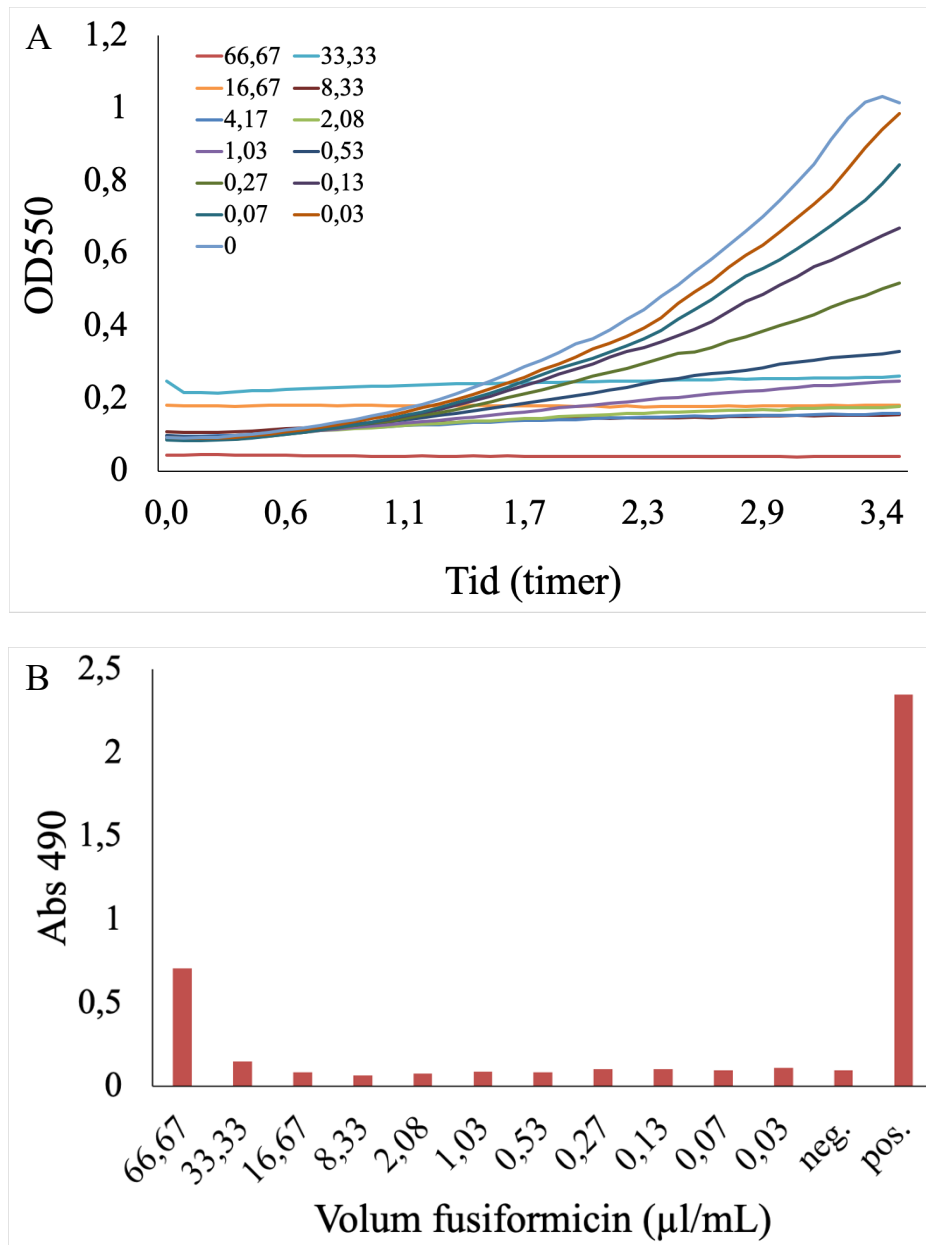
Figur 4.11 Oppkonsentrering av fusiformicin med Amberlite XAD-kuler. A) Resultat etter inkubering av RH425 softagar-overlay med 1) 20% etanoleluat 2) 30% etanoleluat 3) 40% etanoleluat 4) 100% etanoleluat 5) 100% metanoleluat. B) Resultat etter inkubering av RH425 softagar-overlay med 1) Restsupernatant 2) 20% etanoleluat 3) 100% etanoleluat

Amberlite® XAD 16N-oppkonsentrering ble gjentatt ved behov, og fusiformicin fra 100% etanoleluatene ble forsøkt rensert med HPLC, ionebyttekromatografi og gelfiltrering. De ble også brukt til beregning av relativ-MIC og hemolyse.

4.5.2 Relativ-MIC og hemolyse av fusiformicin

Fusiformicin har blitt vist å virke spesifikt mot streptokokker, og en *L. fusiformis* koloni på TH-agarskåler produserer nok fusiformicin til å hemme *S. pneumoniae* etter inkubering i kun ett døgn. I flytende kultur er produksjonen på sitt høyeste etter inkubering i fire dager, men den eksakte mengden fusiformicin som produseres er ukjent. Før man klarer å rense fusiformicin til > 95% renhet, er det ikke mulig å regne ut en nøyaktig minimum inhiberings konsentrasjon (MIC) i f. eks $\mu\text{g/mL}$. Det ble derfor satt opp et dyrkningsforsøk for å finne en relativ-MIC verdi i volum oppkonsentrert fusiformicin. Det ble også satt opp et forsøk for å sammenligne den relative MIC-verdien (μl) med volum oppkonsentrert fusiformicin som eventuelt fører til hemolyse av blodceller. Hvis et stoff gir hemolyse ved konsentrasjoner som er rett over eller lavere enn MIC egner det seg dårlig til terapeutiske formål.

Resultatene (Figur 4.12) viser at allerede når mengden fusiformicin er 0,53 $\mu\text{l/ml}$ vekstmedium begynner veksten av RH425 å avta, men fullstendig hemming av vekst skjer først når mengden er 2,08 $\mu\text{l/mL}$. Ingen av fusiformicinfortynningene ga hemolyse, og toppen med $\text{Abs}_{490} = 0,700$ i Figur 4.12 skyldes brunstoff i fusiformicinprøven som absorberer ved 490 nm. Verdien er signifikant lavere enn i den positive kontrollen (1% Triton X-100), som hadde $\text{Abs}_{490} = 2,348$.

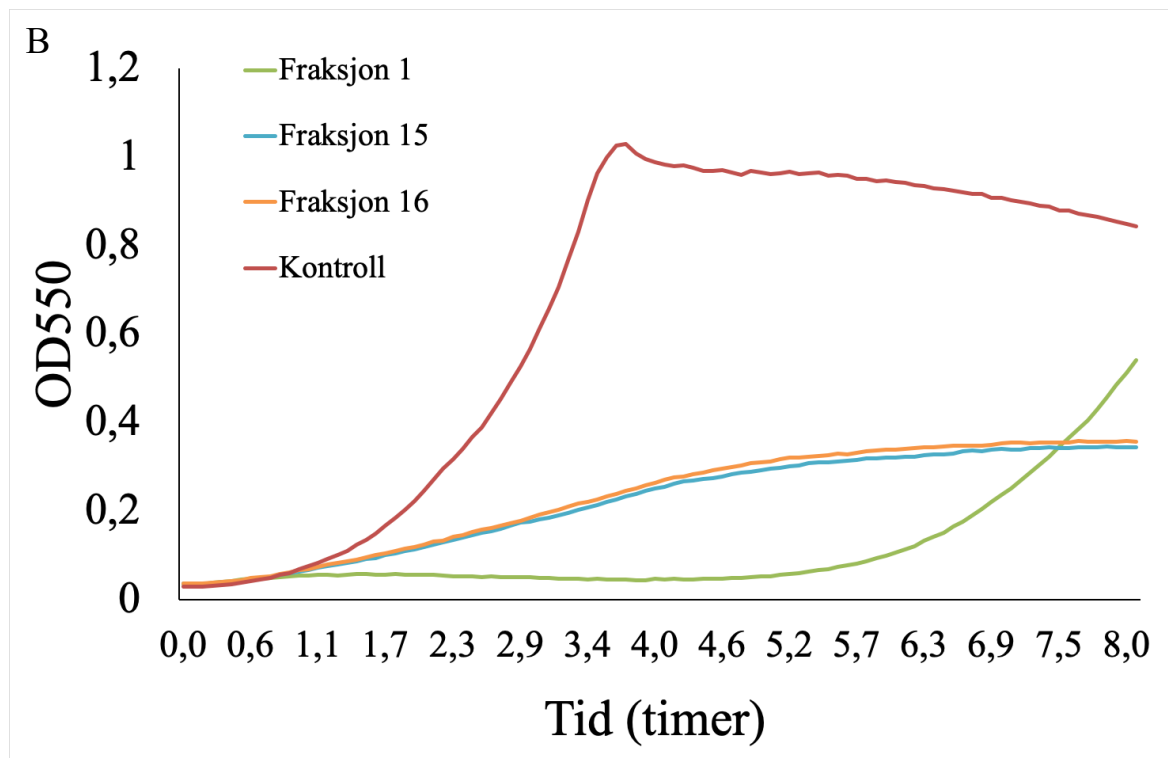
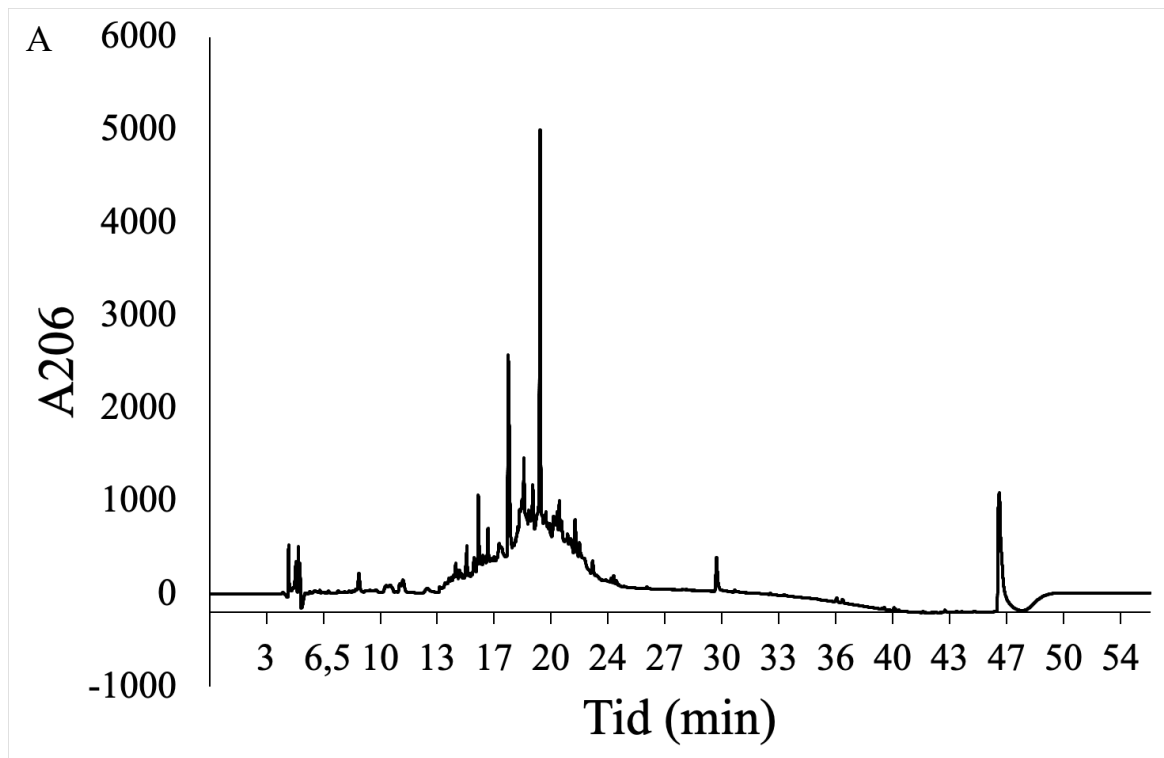


Figur 4.12 Resultatene for relativ MIC- og hemolyseforsøkene. A) Viser vekstkurver for 280 μl RH425 tilsatt ulike fortynninger av fusiformicin. B) Viser absorbans for blodceller tilsatt de samme fusiformicinfortynningene.

4.5.3 Rensing av fusiformicin ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography

HPLC ble benyttet for å analysere renheten til fusiformicin eluert med 20% etanol fra Amberlite®-oppkonsentrering. Fem µl prøve ble applisert på en C¹⁸ Halo HPLC-kolonne. Fusiformicin ble eluert med en 30 minuttersgradient av acetonitril (0-100%) (Figur 4.13). Det ble samlet opp en fraksjon hvert minutt, og hver fraksjon tilsvarer ett minutt i HPLC-kromatogrammet (Figur 4.13). Fraksjonene ble senere testet for antimikrobiell aktivitet. Absorbansen ved 206 nm ble benyttet under HPLC-analyser, fordi proteinase K-behandling viste at fusiformicin er et peptid eller protein. Absorbansen er høyest etter omtrent 20 minutter (Figur 4.13), noe som tydet på at fusiformicin kan være i fraksjonene samlet rundt dette tidspunktet.

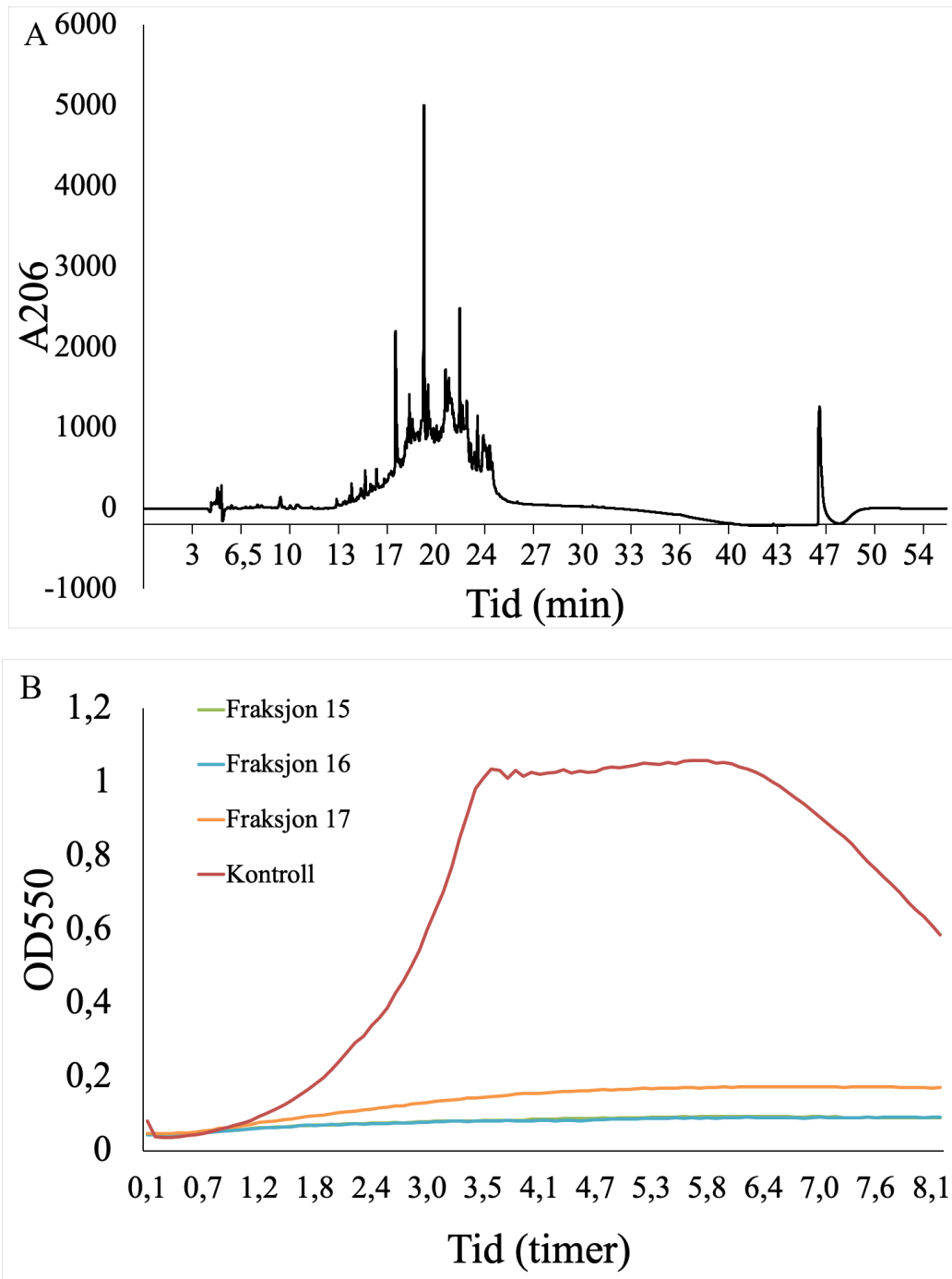
De ulike fraksjonene ble testet for antimikrobiell aktivitet for å analysere hvilken fraksjon som inneholdt fusiformicin (Figur 4.13). Resultatene for platelesningen viste at vekst av RH425 hemmes når stoff fra fraksjon 1 (som inneholdt «flow-through») er tilsatt, og at det er noe hemming av vekst for fraksjon 15 og 16. Etter åtte timer ble det observert vekst av RH425 i brønnen med fraksjon 1. Det tydet på at mye fusiformicin ikke bandt til C¹⁸-kolonnen. Som tidligere nevnt ble oppkonsentrering med amberlitekuler gjentatt for å teste om fusiformicin binder hydrofobisk eller ikke (Seksjon 4.5.1).



Figur 4.13 A) HPLC analyse av fusiformicin eluert med 20% etanol fra Amberlite® XAD 16N-oppkonsentrering. B) Platelesing av vekst av RH425 tilsatt HPLC-fraksjoner fra analyse av fusiformicin eluert med 20% etanol fra Amberlite® XAD 16N-oppkonsentrering.

Etter at det var bekreftet at fusiformicin binder hydrofobisk til Amberlite® XAD 16N-kuler (Seksjon 4.5.1), ble fusiformicin eluert med 100% etanol fra Amberlite®-oppkonsentrering

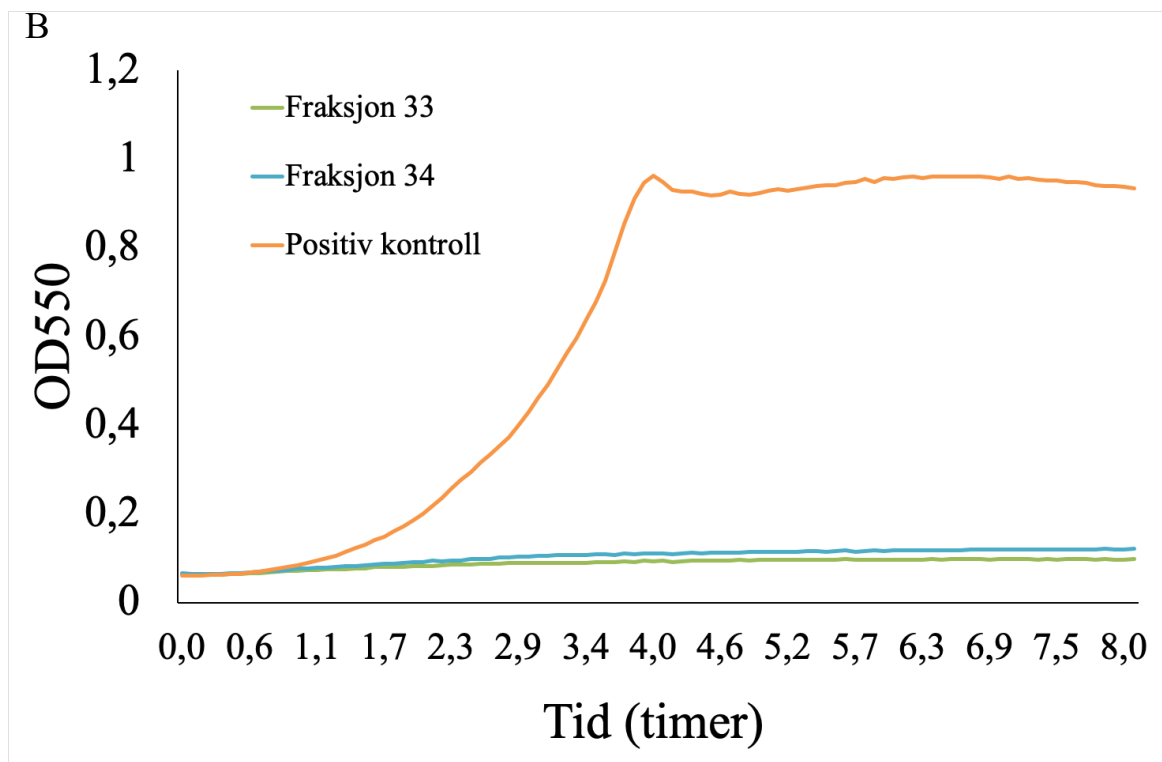
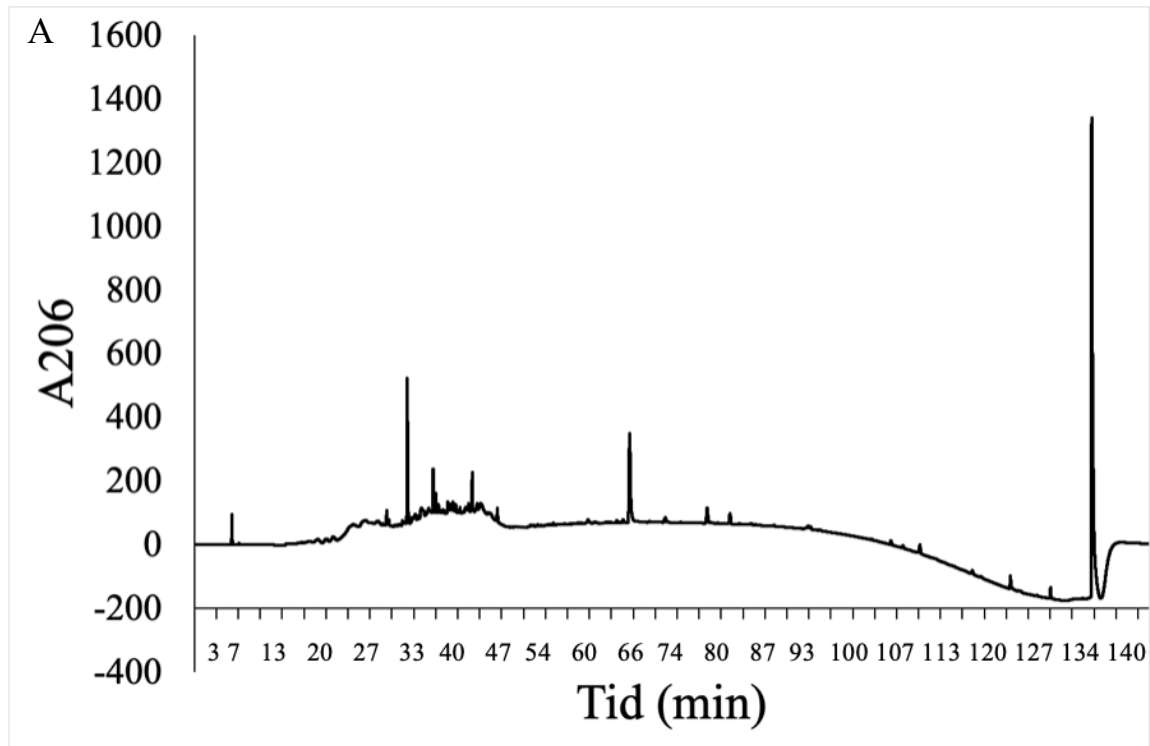
analysert på samme måte som beskrevet ovenfor ved hjelp av HPLC. Kromatogrammet (Figur 4.14A) viser at den høyeste absorbansen kommer etter 19 minutter, og håpet var at denne toppen inneholdt fusiformicin. Testing av fraksjonene (Figur 4.14B) viste at det var antimikrobiologisk aktivitet mot RH425 i fraksjon 15, 16 og 17, som korresponderte til toppene før den høyeste i kromatogrammet (Figur 4.14).



Figur 4.14 A) HPLC analyse av fusiformicin eluert med 100% etanol fra Amberlite® XAD 16N oppkonsentrering. B) Platelesing av vekst av RH425 tilsatt HPLC-fraksjoner fra analyse av fusiformicin eluert med 100% etanol.

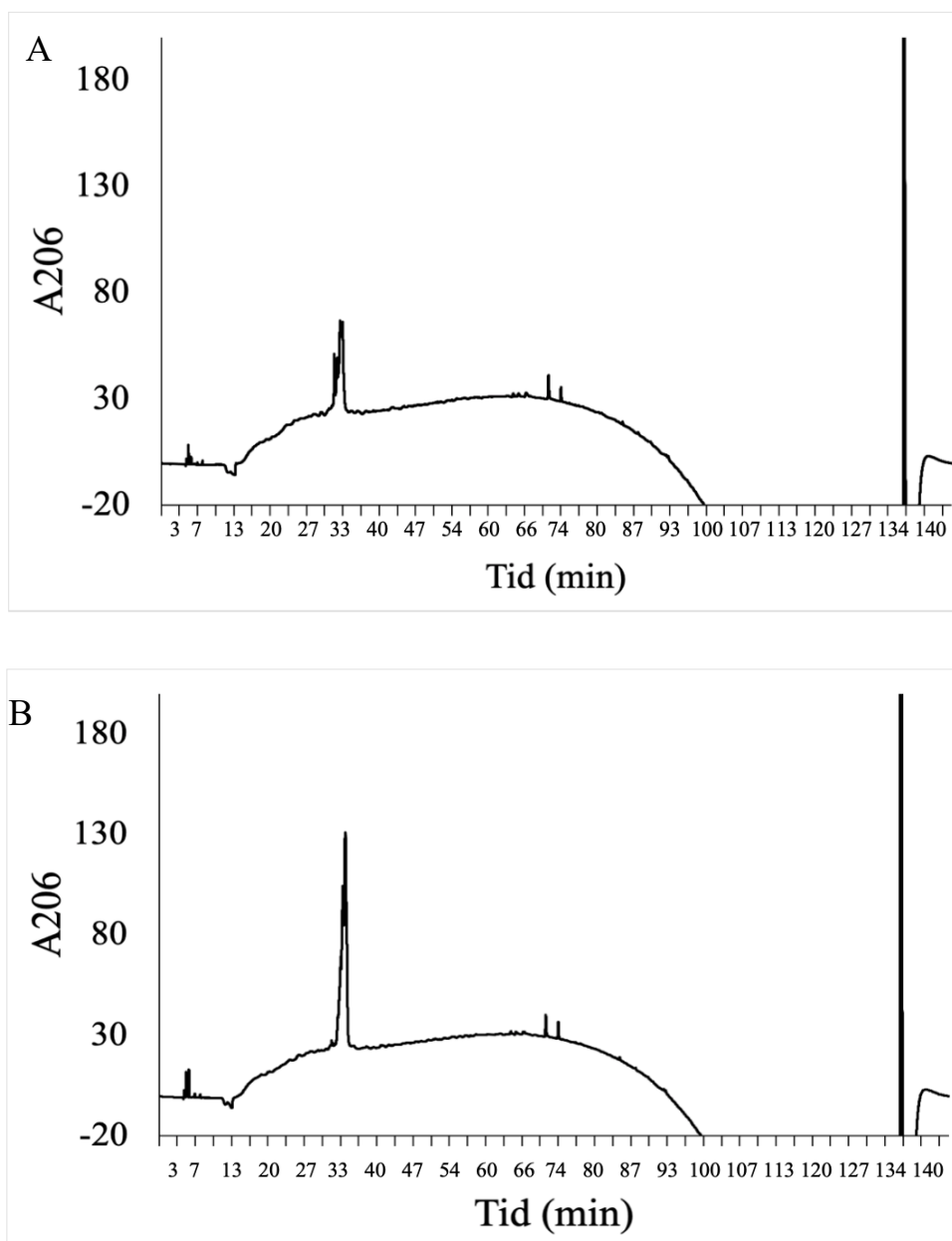
Siden det var antimikrobiologisk aktivitet i tre ulike fraksjoner tydet det på at rensingen av fusiformicin ikke var helt vellykket. Vi forsøkte derfor å kombinere det som var igjen av fraksjon 15,16 og 17 i ett rør, og deretter reanalysere innholdet vha. HPLC for å prøve og rense fusiformicin fra denne prøven. Det var også mulig at økningen i acetonitrilgradienten var for bratt. Gradienten ble derfor økt til 120 minutter. Kromatogrammet for en μl prøve (Figur 4.15) viser fint separerte topper. For oppsamling av fraksjoner til testing av antimikrobiell aktivitet ble 50 μl av den samme prøven separert med HPLC.

Testing av antimikrobiell aktivitet (Figur 4.15B) viste at det fortsatt var antimikrobiell aktivitet i flere fraksjoner. Både fraksjon 33 og 34 inhiberte vekst av RH425 fullstendig, men de stemte ikke overens med en tydelig topp i HPLC-kromatogrammet. I tillegg viste kromatogrammet under oppsamlingen flere topper i samme minutt, og det er derfor trolig at fraksjon 33 og 34 inneholdt flere stoffer enn fusiformicin, og fusiformicin var mest sannsynlig ikke rent nok til massebestemmelse ved hjelp av massespektrometri.



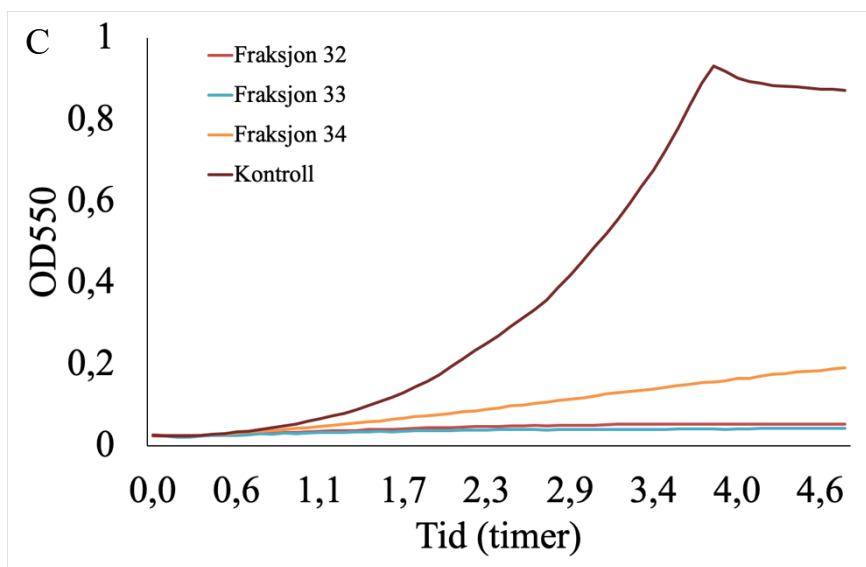
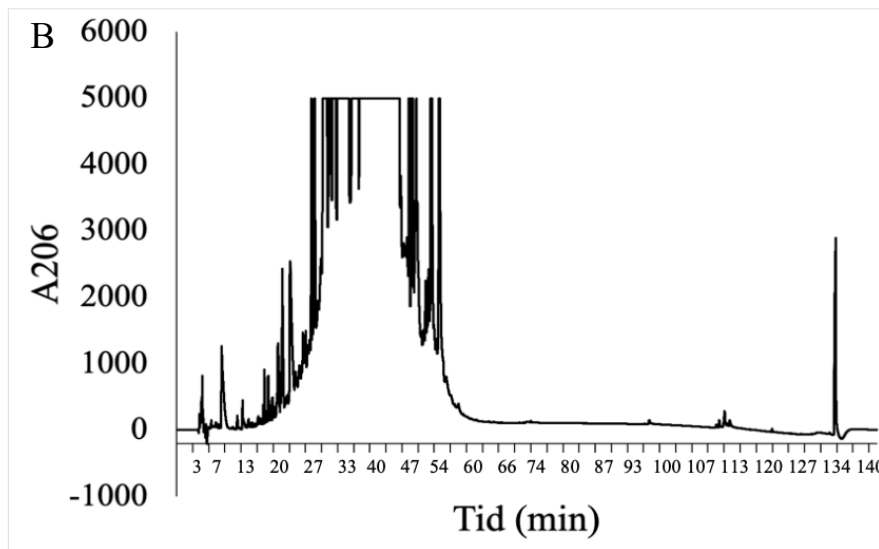
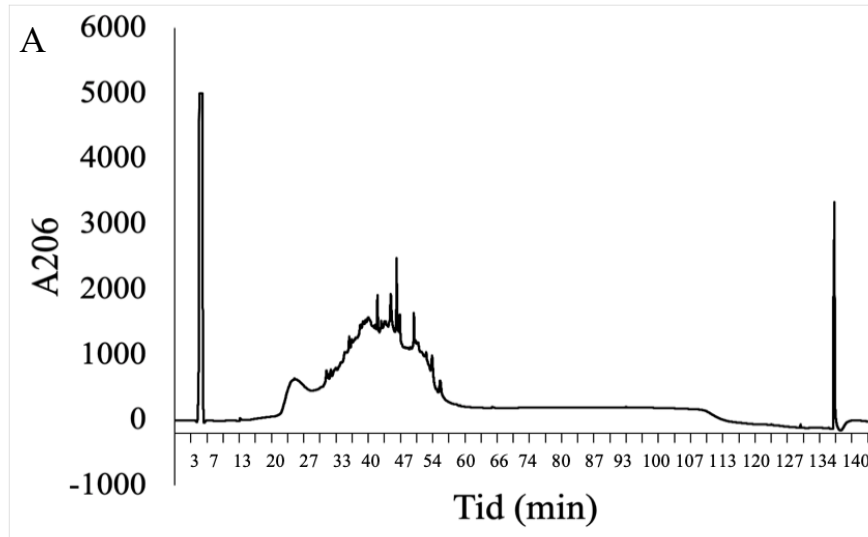
Figur 4.15 A) HPLC-analyse av fraksjon 15,16 og 17. B) Platelesing av vekst av RH425 tilsatt HPLC-fraksjoner fra analyse av fraksjon 15,16 og 17.

Fraksjon 33 og 34 ble analysert vha. HPLC for å bekrefte at det var en økning i absorpsjon ved 206 nm ved disse tidspunktene. Det ville bekrefte at fusiformicin elueres ved omtrent 33 minutter. Det ble gjort klart prøver med to μl av hver fraksjon og ti μl TFA. Prøvene ble eluert med en 120 minuttersgradient. Kromatogrammene (Figur 4.16) viser begge en klar topp ved 33 minutter. Det ble og undersøkt om fraksjonene hadde størst absorpsjon ved 206 nm eller en annen bølgelengde. Undersøkelsen ble gjort ved å analysere absorpsjonsspekteret til fusiformicin vha. NanoDrop. Resultatene viste at både fraksjon 33 og 34 hadde høyest absorpsjon like over 200 nm, så 206 nm fortsatte å bli brukt til å måle absorpsjon under HPLC-analyser.



Figur 4.16 A) HPLC-analyse av fraksjon 33. B) HPLC-analyse av fraksjon 34.

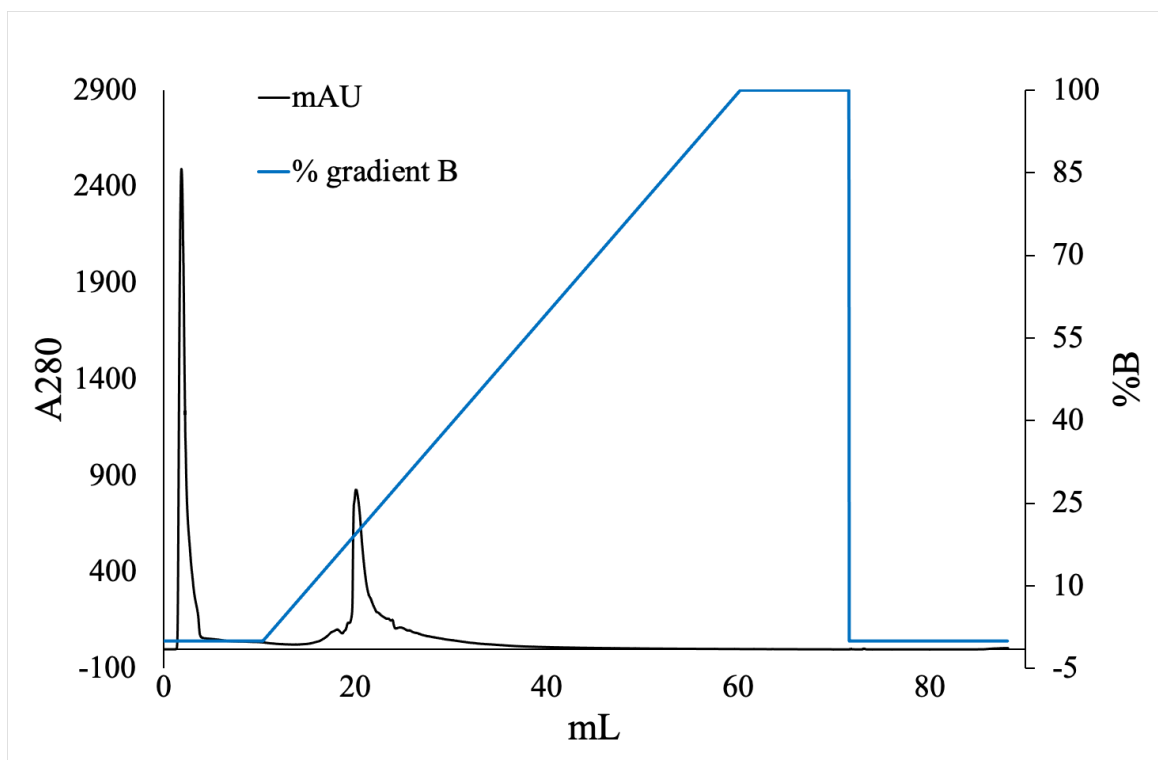
HPLC-analysene så langt tydet på at mye uønsket stoff ble eluert sammen med fusiformicin under Amberlite®-oppkonsentrering. Amberlite®-oppkonsentrering ble gjentatt med flere etanolkonsentrasjoner (20%, 30%, 40%, 50%, 60% og 100%) for å se om uønsket stoff kunne vaskes bort med etanolkonsentrasjoner lavere enn 100%. Før vasking med 20% etanol ble kulene vasket to ganger med dH₂O. Undersøkelse av antimikrobiell aktivitet viste at det var hemming av RH425-vekst ved alle etanolkonsentrasjonene, men hemmingen var størst for 60% etanoleluat og 100% etanoleluat. Disse prøvene ble derfor analysert vha. HPLC med en 120 minutters acetonitrilgradient. Fraksjoner ble samlet fra 30 til 36 minutter, som er tidspunktet hvor fusiformicin har eluert tidligere. Kromatogrammene (Figur 4.17) viser en bred topp fra 24 minutter til 60 minutter, noe som tyder på at fraksjonene samlet i dette tidsrommet inneholder flere ulike stoffer. Kromatogrammet for 100% etanoleluatet (Figur 4.17) viser også at toppene i dette tidsrommet går over måleområdet for absorbans, men de er litt mer separert enn toppene i kromatogrammet for 60% etanoleluat. Fraksjonene fra HPLC-analyse av 60% etanoleluat ble ikke testet for antimikrobiell aktivitet, men fraksjonene fra HPLC-analyse av 100% etanoleluat ble testet. Det var inhibering av RH425-vekst i fraksjon 32, 33 og 34 (Figur 4.17). Ut ifra HPLC-analysene som viser flere topper i området som har detekterbar fusiformicinaktivitet, kan vi konkludere med at vårt oppsett med en C¹⁸-kolonne og acetonitrilgradienteluering ikke er egnet til å rense fusiformicin til renheten som kreves for massebestemmelse (>95% renhet). MALDI-TOF MS av fraksjon 32-34 ville gitt et meget komplisert spektrum, og det ville mest sannsynlig ikke være mulig å skille ut hvilken masse som var fusiformicin. Altså må flere rensetrinn til.



Figur 4.17 A) Kromatogram for HPLC-analyse av 60% etanoleluat. B) Kromatogram for HPLC-analyse av 100% etanoleluat. C) Det var antimikrobiell aktivitet i fraksjon 32-34 fra kromatogrammet i B.

4.5.4 Rensing av fusiformicin med ionebyttekromatografi

Ionebyttekromatografi ble testet fordi det er en effektiv rensemethode for proteiner, og kan kombineres med HPLC. Molekyler med ulik ladning passerer gjennom kolonnen med ulik hastighet, og kan samles opp i fraksjoner. Fraksjonene kan så testes for antimikrobiologisk aktivitet. 100% etanoleluat fra Amberlite®-oppkonsentrering ble passert gjennom en anionbytter (en kolonne som binder negativt ladde molekyler) ved pH 8,8 (vi antok at fusiformicin ville ha en netto negativ ladning ved denne pH-verdien). Kromatogrammet (Figur 4.18) viser absorbansen og konsentrasjonen av elueringsbuffer. Den høyeste absorbansen kommer før eleringen starter, og det er en mindre topp når konsentrasjonen av elueringsbuffer er omtrent 25%. Fraksjonene ble fem ganger oppkonsentrert ved vakuumsørking, og testet for antimikrobiologisk aktivitet ved å applisere tre μl av hver fraksjon på et *S. pneumoniae* RH425 overlay. Antimikrobiell aktivitet ble kun observert for materialet som passerte rett gjennom kolonnen («flow-through»). Fusiformicin bandt ikke til anionkolonnen ved pH 8,8, og kunne derfor ikke renses under disse betingelsene. Med fare for at pH verdier høyere enn 8,8 ville senke stabiliteten til fusiformicin valgte vi å teste gelfiltrering som er en mer skånsom rensemethode. I tillegg kan gelfiltrering benyttes for å estimere molekylvekten til et stoff.

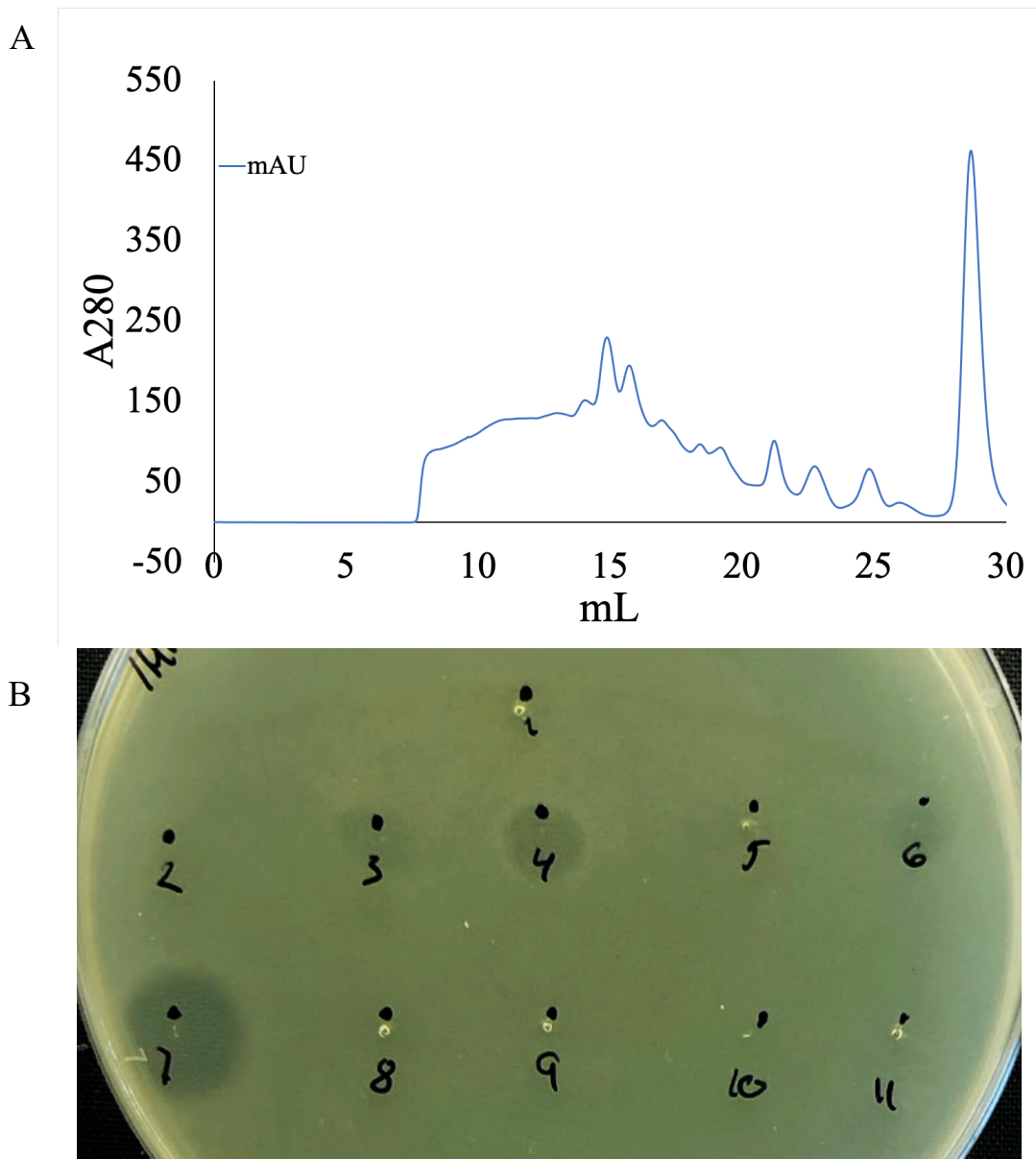


Figur 4.18 Kromatogram for ionebyttekromatografi. Både absorbansen (mAU) og konsentrasjonen av elueringsbuffer (% gradient B) er vist. "Flow-rate" var satt til 0,5 ml/min.

4.5.5 *Fusiformicin er et ~1000 Da stort peptid*

Siden proteinase K-testen viste at fusiformicin var et peptidbasert molekyl eller et lite protein (seksjon 4.4.2) ble fusiformicin fra Amberlite®-oppkonsentrering separert gjennom en gelfiltreringskolonne beregnet på molekyler fra 100-7000 Da (Figur 4.19). Fraksjoner ble samlet hvert minutt med en væskehastighet på 0,3 ml/min. Instrumentet som ble benyttet kunne bare måle absorbansen ved 280 nm. Derfor ble alle fraksjoner eluert fra kolonnen testet med hensyn på antimikrobiell aktivitet. Det var en liten økning i absorbans etter omtrent syv minutter, men den høyeste absorbansen kom ikke før på slutten av filtreringen (29 ml).

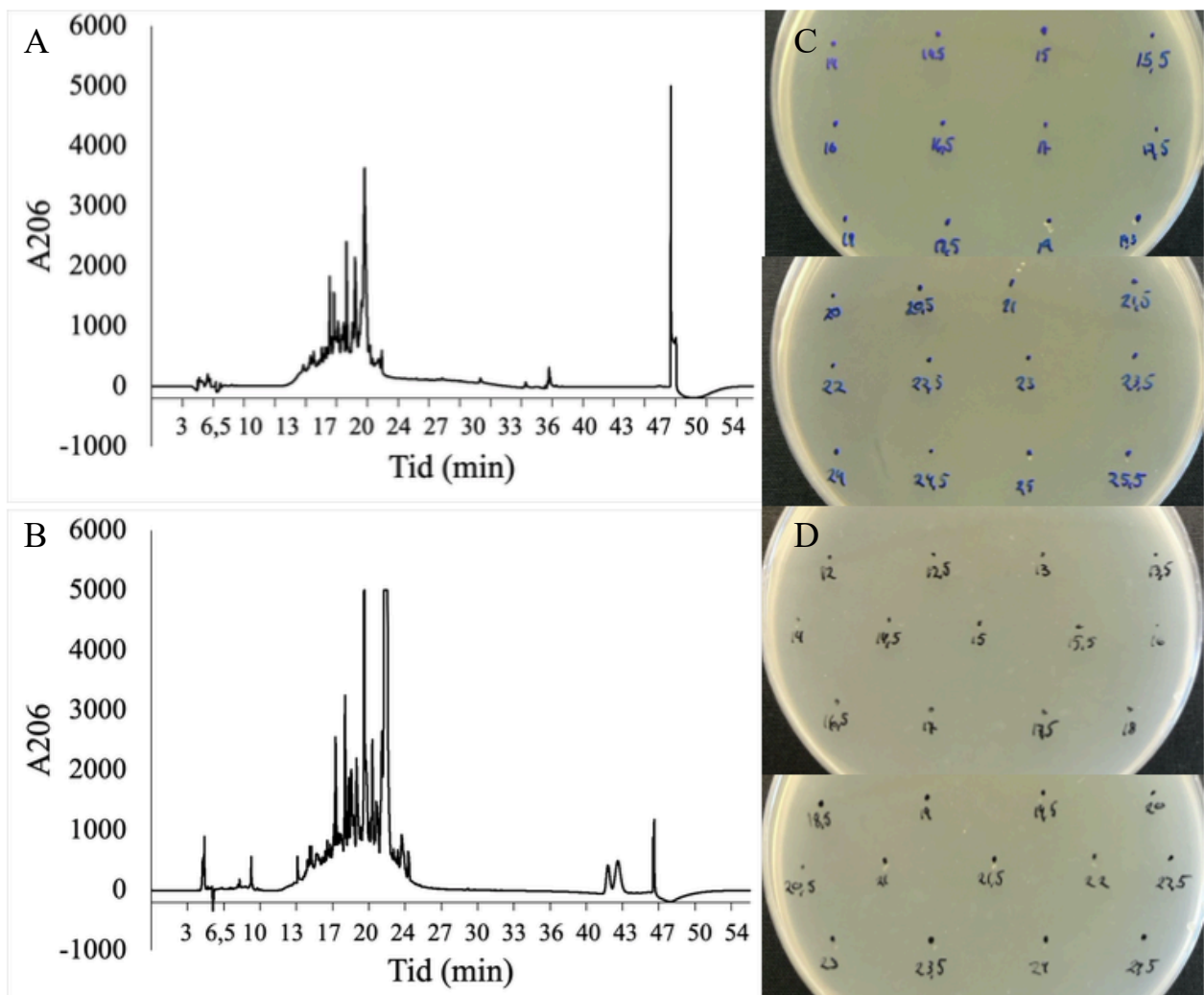
Fraksjonene ble 30x oppkonsentrert ved vakuomtørking, og testet for antimikrobiologisk aktivitet ved å applisere tre µl av hver prøve på et *S. pneumoniae* RH425 softagar-overlay. Flere fraksjoner (tre, fire og seks) viste tydelig hemmesoner, men det var størst hemmesone for fraksjon syv (Figur 4.19). Kalibrering av gelfiltreringskolonnen ble utført av laboratoriet og viste den samme separasjonshastigheten som oppgitt av produsenten (62). Det vil si at molekyler på omtrent 1000 Da elueres etter syv minutter. Fusiformicin har altså en omtrentlig størrelse på 1000 Da.



Figur 4.19 A) Kromatogram for gelfiltrering med Amberlite-oppkonsentrert fusiformicin. B) RH425 softagaroverlay med prøver fra gelfiltreringsfraksjon 1-11. Det er hemmeseoner ved fraksjon tre, fire, seks og syv.

Fraksjon syv fra gelfiltrering skulle i teorien være renere enn fusiformicin rensert fra Amberlite®-oppkonsentrering. Den ble derfor analysert og forsøkt videre rensert med HPLC, både med en C^{18} - og en C^8 -kolonne. Målet var å få fusiformicin rent nok til MALDI-TOF MS. HPLC-analysene (Figur 4.20) viste at gelfiltreringsfraksjon syv fortsatt inneholdt en rekke ulike stoffer (basert på at kromatogrammene viser mange topper som eluerte ved ulik acetonitrilkonsentrasjon). Det ble samlet opp fraksjoner hvert 30 sek i tidsrommet fusiformicin har eluert ved før. Under analysen med C^8 -kolonnen ble fraksjoneringen startet ved 14 minutter og avsluttet ved 25 minutter. Under analysen med C^{18} -kolonnen ble fraksjoneringen startet ved 12 minutter og avsluttet ved 25 minutter. Kromatogrammene (Figur 4.20) viser en topp per 30

sekunder, men flere topper per minutt. Fraksjonene ble 25x oppkonsentrert ved vakuomtørking og deretter testet for innhold av fusiformicin ved å applisere tre μl av hver prøve på et *S. pneumoniae* RH425 softagar-overlay. Målet var at det skulle være antimikrobiologisk aktivitet i bare en av dem. Fraksjonen med antimikrobiologisk aktivitet ville da inneholde fusiformicin rent nok til MS-analyser. Antimikrobiell aktivitet ble ikke observert for noen av fraksjonene som ble samlet opp. Det var derfor ikke mulig å vite hvilken fraksjon som inneholdt fusiformicin, og ingen fraksjoner ble analysert ved MALDI-TOF MS.



Figur 4.20 A) HPLC-analyse av gelfiltreringsfraksjon syv med en C^8 -kolonne. B) HPLC-analyse av gelfiltreringsfraksjon syv med en C^{18} -kolonne. C) Testing av fraksjonene fra kromatogrammet i A for antimikrobiell aktivitet mot RH425. D) Testing av fraksjonene fra kromatogrammet i B for antimikrobiell aktivitet mot RH425.

4.6 Genomsekvensering av fusiformicinresistente mutanter

Som nevnt i seksjon 4.2 ble det funnet fusiformicinresistente supressormutanter i hemmesonen som oppstod når *S. pneumoniae* RH425 vokste i et softagar-overlay over en koloni med *L. fusiformis* (Figur 4.5). Supressormutantene ble sendt til genomsekvensering for å undersøke hvilke gener som hadde mutert, noe som også ville gi informasjon om virkningsmekanismen til fusiformicin. Fire av de fusiformicinresistente mutantene ble plukket og inokulert i C-medium for isolering av genomisk DNA til genomsekvensering. De fikk navnene IHH12, IHH14, IHH16 og IHH18.

4.6.1 Identifikasjon av mutasjoner i *ami*- operonet

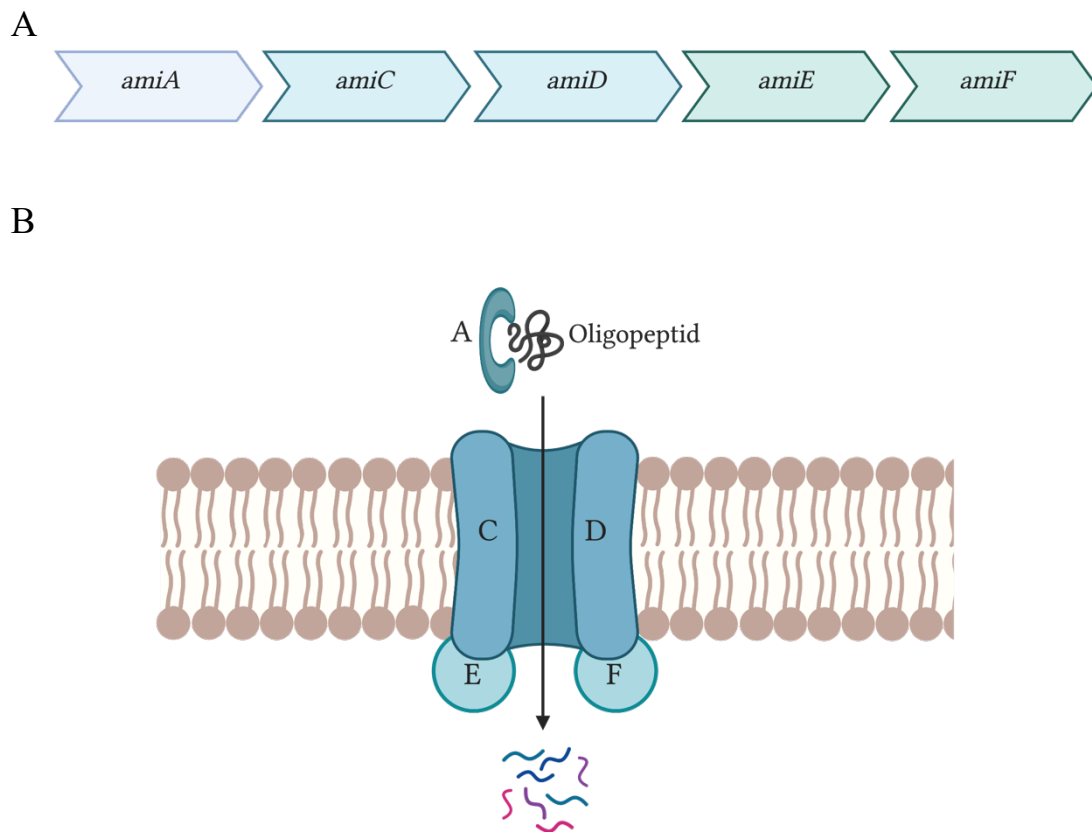
Genomisk DNA fra mutant IHH-12, IHH-14, IHH-16 og IHH-18 ble sekvensert ved Norwegian Sequencing Centre. Etter at sekvensdataene var satt sammen mot referanseggenomet til *S. pneumoniae* R6 (NC_003098.1) i programmet Geneious Prime v2019-2.1, og mutasjoner mellom genomene til supressormutantene og R6 var identifisert, ble mutasjonene sammenlignet med genomsekvensen til RH425 (for å skille RH425-mutasjoner fra mutasjoner i IHH-mutantene). Det førte til identifisering av fire mutasjoner i *ami*-operonet. Det var tre ulike punktmutasjoner (SNP) i *amiC*, *amiE* og *amiF*, og en delesjon som startet i *amiE* og sluttet i *amiF* (Tabell 4.2). Mutasjonene vil videre bli referert til som mutasjon 12, 14, 16 og 18 etter stammen de ble funnet i.

Tabell 4.1 Oversikt over mutasjoner i de fusiformicinresistente mutantene sammenlignet med RH425.

Stamme	Mutasjon	Gen	Type	Konsekvens
IHH-12	G->A (1676261)	<i>amiC</i>	SNP	Trunkering. SNP introduserer et stop-kodon i kodon 223. C-terminal 276 aa ikke translert
IHH-14	C->T (1673543)	<i>amiE</i> - <i>amiF</i>	SNP	Trunkering. SNP introduserer et stop-kodon i kodon 318. C-terminal 38 aa ikke translert
IHH-16	D1672934 1674011	- <i>amiE</i> - <i>amiF</i>	Stor delesjon	Delesjon av 1079 nukleotider I <i>amiE</i> - <i>amiF</i> regionen (sekvensen som koder for de siste 193 aa av <i>AmiE</i> og de første 161 aa av <i>amiF</i>)
IHH-18	C->A (1673313)	<i>amiF</i>	SNP	Trunkering. SNP introduserer et stop-kodon i kodon 51. C-terminal 273 aa ikke translert

4.6.2 *ami*-systemet

S. pneumoniae er avhengig av å ta opp aminosyrer fra omgivelsene for å kunne vokse. Opptaket av disse aminosyrene gjøres blant annet av oligopeptidpermeasen Ami (Figur 4.21). Permeasen tilhører ABC transporter superfamilien, og DNA koden ligger i *amiACDEF* operonet. Ami består av det membranbundne lipoproteinets AmiA som binder til oligopeptider, to transmembranproteiner AmiC og AmiD, som former selve transportkanalen, og to ATP-bindende proteiner AmiE og AmiF, som frigjør energi til transport ved å hydrolysere ATP (63). Transport gjennom Ami er selektiv, og AmiA har høy affinitet ovenfor hvilke oligopeptider som transporteres.



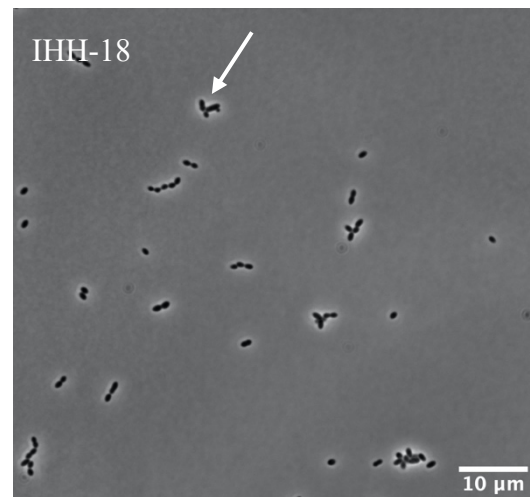
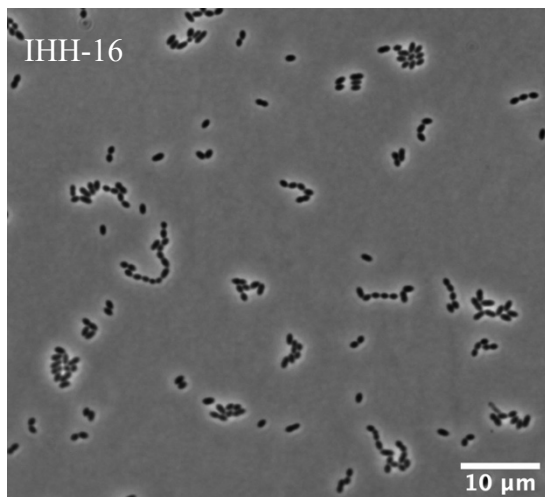
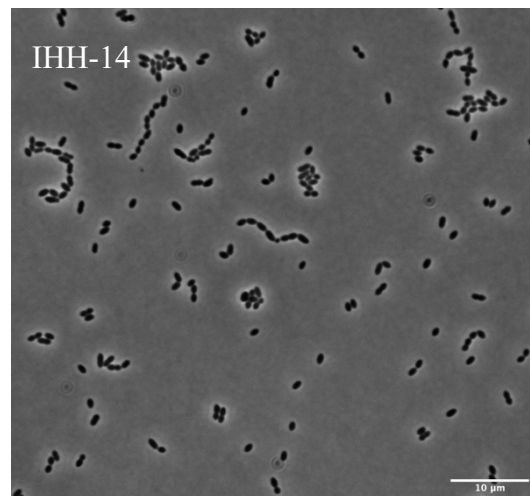
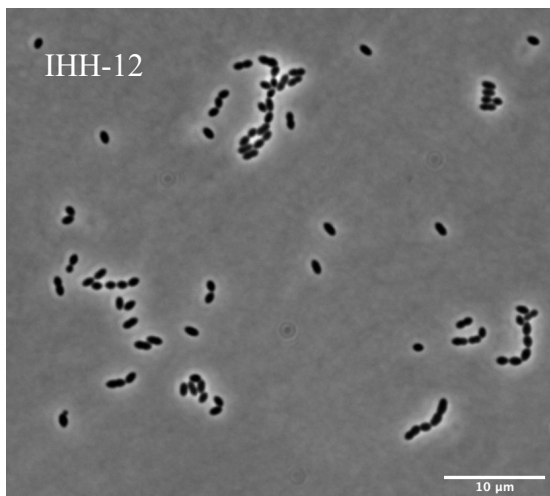
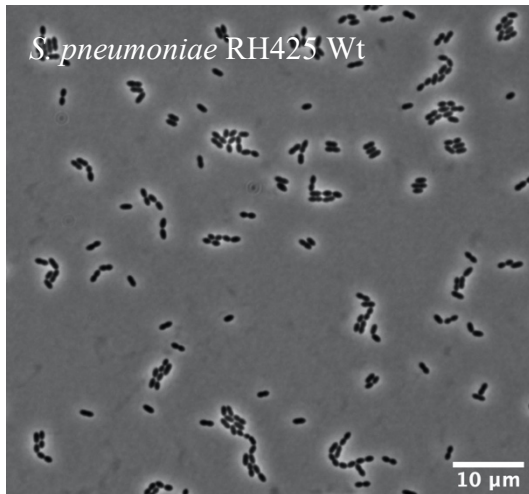
Figur 4.21 A) Viser organiseringen av *ami*-operonet på den negative DNA-tråden hos *S. pneumoniae*. B) Viser Ami-permeasen hos *S. pneumoniae* basert på modeller av andre oligopeptidpermeaser. Hvert protein er merket med bokstaver. AmiA binder til oligopeptider, som så transporteres gjennom porten som formes av AmiC og AmiD. Energi til transporten frigjøres av AmiE og AmiF. Figuren er laget i Biorender.

Lignende oligopeptidpermeaser finnes hos de fleste bakterier, både Gram-positive og -negative. Søk med aminosyresekvensen til AmiA ga treff for homologe peptider hos alle bakteriene som ble testet for sensitivitet mot fusiformicin, med unntak av *S. criceti*. Identiteten med AmiA i *S. pneumoniae* R6 varierte fra 25% hos *B. subtilis* til over 80% hos *S. mitis*. Det ble også funnet proteiner med lav homologi (<35%) hos de resistente bakteriene, med unntak av hos *E. coli*.

Forsøk med *Streptococcus thermophilus* har vist at Ami systemet er i stand til å ta opp oligopeptider bestående av opptil 23 aminosyrer (64), mens oligopeptidpermeaser generelt transporterer oligopeptider fra 4 til 35 aminosyrer (65). Det har også blitt vist at Ami ikke kan ta opp lange oligopeptider med negativ ladning, mens oligopeptider med netto positiv ladning og hydrofobe peptider transporteres mer effektivt. Størrelsen på oligopeptidene som transporteres er omtrent 1000 til 3000 Da (64).

4.6.3 Karakterisering av fusiformicinresistente mutanter

De fire fusiformicinresistente mutantene IHH-12, IHH-14, IHH-16 og IHH-18 ble dyrket i C-medium, og mutantene brukte to dager på å nå den eksponentielle vekstfasen i motsetning til villtypen som bruker en dag. Når mutantene ble dyrket på TH-agarskåler var koloniene mindre enn det som er typisk for *S. pneumoniae* RH425. Dette indikerer at de vokser saktere enn villtypen, men vekstforsøk for å sammenlikne veksthastighet må gjøres for å bekrefte dette. Fasekontrastmikroskopi av mutant IHH-12, IHH-14, IHH-16 og IHH-18 (Figur 4.22) viser at alle mutantene hadde normal morfologi, med unntak av mutant IHH-18, som hadde noen celler som var lengre og smalere. Det ble også observert at cellene klumpet seg sammen, men det er usikkert om dette skyldes endringer i morfologi eller klumper i preparatet.



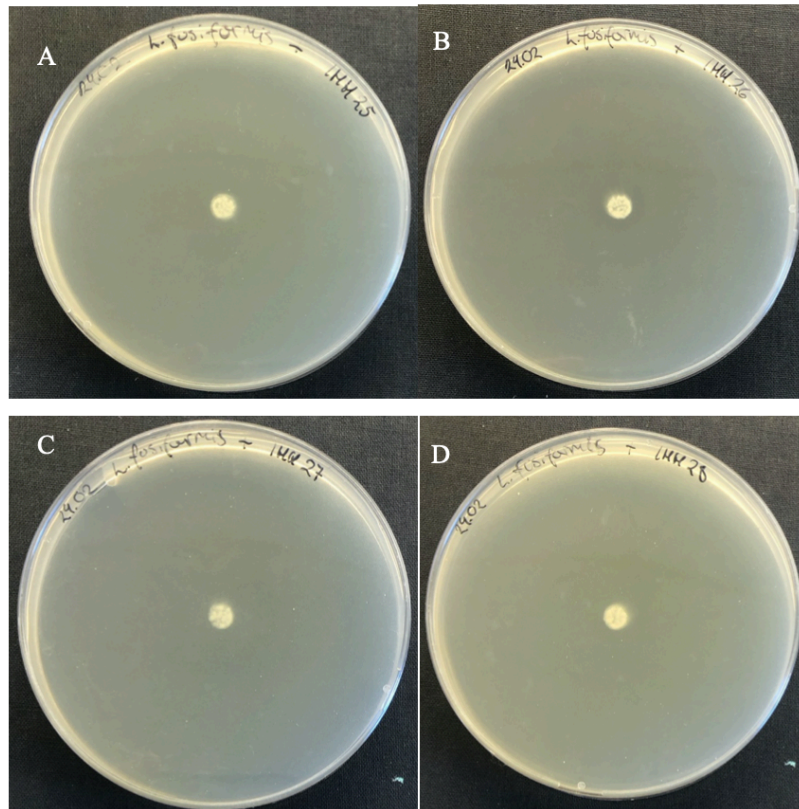
Figur 4.22 Mikroskopbilder av de fusiformicinresistente mutantene og villtypen. Pilen peker på celler med endret morfologi i mutant IHH-18

4.7 Innføring av supressormuterte gener gir resistens mot fusiformicin

For å dobbeltsjekke at mutasjonene fra supressormutantene var tilstrekkelige til å gi resistens mot fusiformicin, ble mutasjonene identifisert med genomsekvensering (mutasjon 12, 14, 16 og 18) innført i *S. pneumoniae* på en kontrollert måte ved å bruke Janussystemet. De nye transformantene fikk da akkurat de samme mutasjonene som supressormutantene. Før transformasjonen ble det observert at knockout-stammene trengte lengere tid til å nå $OD_{550} = 0,05-0,1$ enn villtypen RH425. De måtte pre-inkuberes i minst fire timer, og selve transformasjonsreaksjonen måtte inkuberes i 2,5 time.

4.7.1 Fusiformicinsensitivitet hos transformanter med re-innførte supressormutasjoner

Etter transformeringen ble de nye mutantene (IHH-25, 26, 27 og 28), med mutasjon 12, 14, 16 og 18 innført, testet for sensitivitet mot fusiformicin, og det viste seg at de var resistente (Figur 4.23). Det var da bevist at de supressormuterte *ami*-genene identifisert med genomsekvensering var de eneste mutasjonene som var nødvendige for å gjøre *S. pneumoniae* resistent mot fusiformicin.



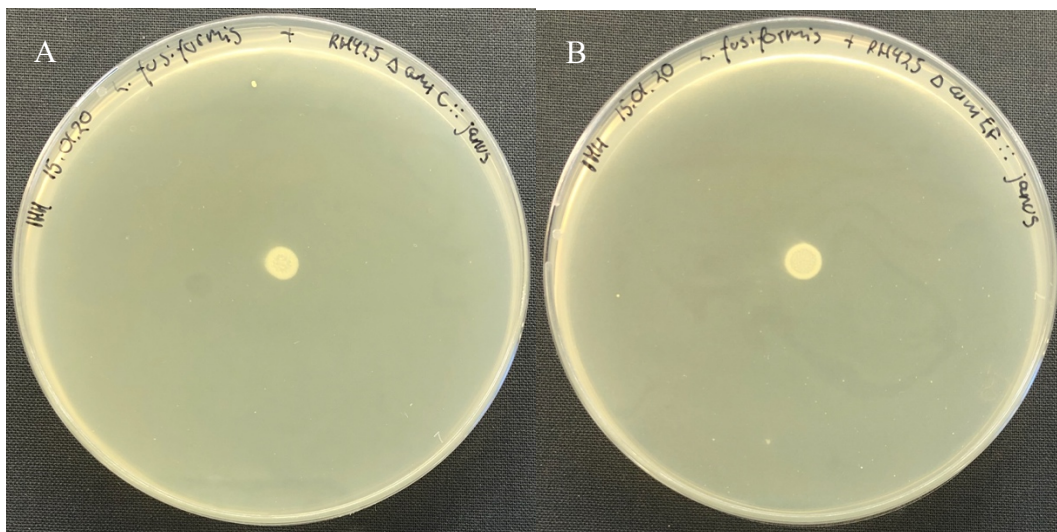
Figur 4.23 Softagar-overlay med transformanter med mutasjon 12 (A), 14 (B), 16 (C) og 18 (D), over en *L. fusiformis* koloni. Bildet er tatt med mobilkamera.

4.8 Delesjon av *amiC* og *amiEF* gir resistens mot fusiformicin

Identifiseringen av mutasjonene i de fusiformicinresistente stammene tydet på at ufunksjonelt *AmiC*, *AmiE*, og *AmiF* gir resistens mot fusiformicin. For å bekrefte dette ble det lagd to ulike knockout transformanter, en hvor *amiC* ble erstattet av en Janus-kassett og en hvor *amiEF* ble erstattet av en Janus-kassett. Det tok flere forsøk å få vellykket transformasjon, og løsningen viste seg å være å øke inkubasjonen av transformasjonsreaksjonene fra to timer til 2,5 time. Transformanter ble deretter testet for sensitivitet mot fusiformicin.

4.8.1 Fusiformicinsensitivitet hos Δ *amiC* og Δ *amiEF* mutanter.

Transformantene ble testet for sensitivitet mot fusiformicin ved å legge et softagar-overlay med hver transformant over en *L. fusiformis* koloni. RH425 ble brukt som kontroll på en sensitiv stamme. Resultatet (Figur 4.24) var at transformantene var resistente mot fusiformicin. Dette beviser at *Ami*-systemet er essensielt for at fusiformicin skal hemme vekst av *S. pneumoniae*.



Figur 4.24 Sofatagar-overlay med delesjonsmutanter som mangler *amiC* (A) og *amiEF* (B), over en *L. fusiformis* koloni. Bildet er tatt med mobilkamera.

4.9 Fusiformicin må tas opp til cytoplasma for å virke

ATP-bindende proteiner har såkalte Walker-motiver som utgjør en ATP-bindende «lomme» i proteinet. *AmiE* og *AmiF* er begge ATP-bindende proteiner som spalter ATP til ADP for at *Ami*-transporteren skal importere oligopeptider til cytoplasma. I en *AmiE/F* homolog, kalt *FtsE*

(involvert i bakteriell celledeling), er det vist at substitusjon av spesifikke aminosyrer i Walker-motiv B gjør at det produseres et FtsE-protein som er ute av stand til å binde til ATP (66).

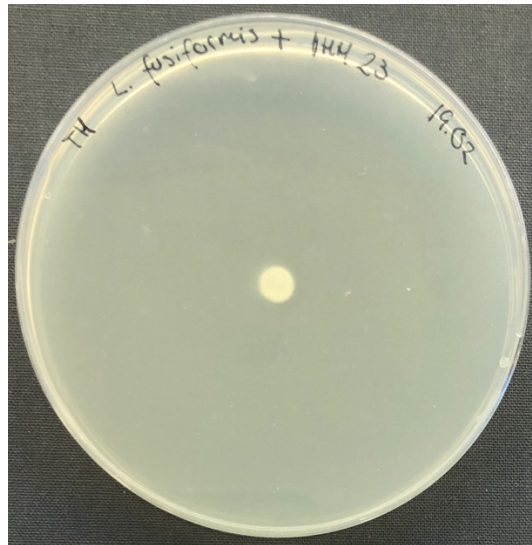


Figur 4.25 Sammenstilling av FtsE, AmiE og AmiF. Walker motiv A er markert med gult, Walker motiv B er markert med grønt, og aspartat (D) som ble mutert til alanin (A) er markert med rødt.

Endringen av baser i DNA sekvensen fra GAT til GCT gir en endring i aminosyresekvensen fra aspartat (D) til alanin (A), og det er denne endringen som gjør proteinet ute av stand til å binde til ATP (66). Ved å introdusere et mutert Walker B-motiv i AmiE (D184A) og AmiF (D190A) var det mulig å undersøke om fusiformicin må tas opp til cytoplasma for å virke eller ikke. Hvis *S. pneumoniae* med et punktmutert Walker B-motiv er resistent mot fusiformicin må det tas opp til cytoplasma for å virke.

4.9.1 Fusiformicin virker i cytoplasma hos *S. pneumoniae*

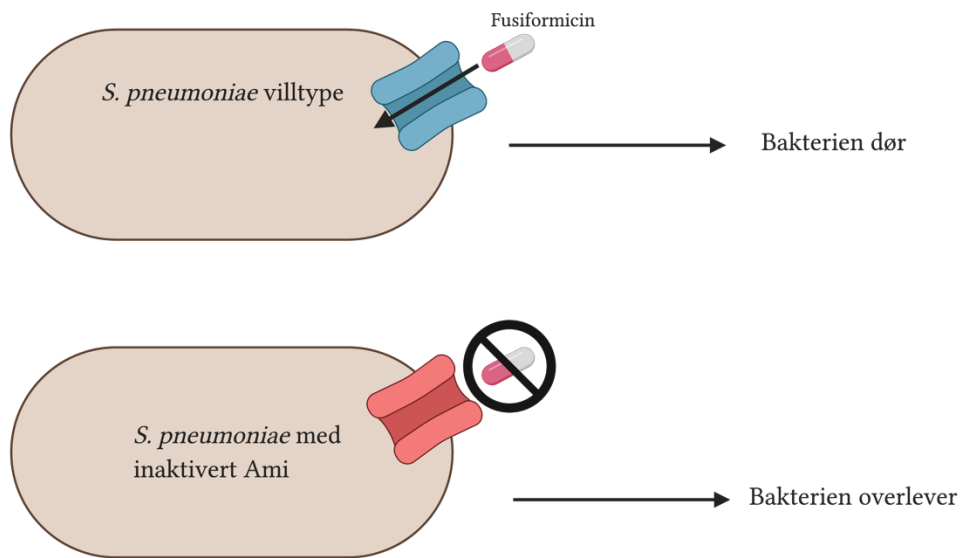
Transformantene ble testet for sensitivitet mot en *L. fusiformis* koloni, og som vist i Figur 4.26 var transformanten med mutert AmiE (IHH-23) resistent. Innføring av punktmutert Walker B-motiv i AmiF (IHH-29) ble utført ved et senere tidspunkt, men pga. Covid-19 rakk vi ikke å teste om denne også var immun mot fusiformicin.



Figur 4.26 Softagar-overlay med punktmutert Walker B i AmiE (A) og mutert Walker A i AmiF (B) over en *L. fusiformis* koloni. Bildet er tatt med mobilkamera.

4.9.2 Sekvensering av hele *ami*-operonet i *AmiE* mutanten

For å være helt sikre på at ingen andre mutasjoner enn den vi innførte i Walker B-motiv var tilstede i mutant IHH-23 og ga resistens mot fusiformicin, ble hele *ami*-operonet i IHH-23 sekvensert. (Det ble også forsøkt å sekvensere hele *ami*-operonet i IHH-29, men templatet ga bare dårlige sekvenser). Resultatet av sekvensering av *ami*-operonet i IHH-23 var at ingen andre mutasjoner var tilstede. Det betyr at inaktivering av transport gjennom Ami-permeasen gir resistens mot fusiformicin, som betyr at fusiformicin etter all sannsynlighet må tas opp til cytoplasma for å virke (Figur 4.28).



Figur 4.27 Fusiformicin må tas opp til cytoplasma for å virke. Villtype bakterien har et intakt Ami-system og fusiformicin transporteres til cytoplasma. Det er ukjent hva som skjer i cytoplasma, men denne cellen dør. Bakterien med inaktivert Ami-system tar ikke opp fusiformicin, og denne cellen overlever.

5 Diskusjon

5.1 *Screening av havbakterier for antibiotika mot S. pneumoniae*

Det er estimert ved hjelp av DNA sekvensering at man bare klarer å dyrke en liten andel av bakterieartene som finnes i ulike habitat i naturen. Paradigmet har vært at ca. en prosent av artene kan dyrkes i laboratoriet, mens andre mener dette tallet er høyere (67,68). De fleste bakterier er uansett vanskelig å dyrke, noe som mest sannsynlig er fordi vi ikke klarer å etterlikne de vekstbetingelsene som kreves. Vi antok derfor at et utvalg bakterier i de ulike prøvene fra Hvitsten ville dominere under oppdyrking i laboratoriet, men ville likevel prøve å fange opp så mange ulike bakterier som mulig ved å teste forskjellige vekstmedier. Vi ønsket også å etterlikne marine forhold ved å inkludere sjøvann i vekstmediene. Det var mindre vekst på skålene med vekstmedium og dH₂O enn på skålene med vekstmedium og sjøvann. Det kan skyldes at sjøbakteriene er avhengige av høye saltkonsentrasjoner for å trives, eventuelt at de var i sultemodus da de ble hentet og at overgangen fra sultemodus til tilgang på mye næring var forsinket. Skålene med sjøvann inkubert i ett døgn ga mer vekst enn skålene med vekstmedium og dH₂O som hadde vært inkubert i tre døgn, og det tydet på at bakteriene trivdes bedre med høye saltkonsentrasjoner, eller at det vokste helt andre arter på skålene med sjøvann. Det var også mer vekst på BHI-skålene enn TH-skålene, noe som var forventet siden BHI er et rikere næringsmedium. Skålene med BHI-, TH- og MH-agar ga kolonier med ulik morfologi (BHI-skålene hadde gule og oransje kolonier, TH-skålene for det meste hvite kolonier, og MH-skålene flerfargede, utflytende kolonier), og dette indikerer at et bredere utvalg av sjøbakterier ble screenet, enn om bare en type vekstmedium hadde blitt benyttet. Skålene med mest vekst ble plukket ut for screening av antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae*, da vi antok at det ville gi det største utvalget av bakterier sett borti ifra å teste alle skålene.

Etter inkubering med *S. pneumoniae* RH425 softagar-overlay var det få hemmesoner på skålene med sjøvann, noe som kan skyldes at pneumokokker vokser dårligere på saltmedium, eller at bakteriekoloniene som vokste på skålene med sjøvann i større grad var aerobe og derfor døde under anaerob inkubering. En annen mulighet er at bakteriekoloniene som vokste på skåler med ferskvann hadde suboptimale vekstbetingelser (altså at de fortrekker tilgang på salter) og derfor var stresset. Stress kan indusere produksjon av ulike sekundærmetabolitter som kan være antimikrobielle, eller stress kan indusere ekspresjon av antimikrobielle stoffer som brukes i kampen om næringsstoffer mellom bakterier. Veksten av sjøbakterier og den eventuelle

produksjonen av antibiotika avhenger av en rekke faktorer, og ikke alle er mulige å kontrollere. Det er derfor lite sannsynlig at en ny screening ville gitt de samme resultatene.

5.2 Identifisering av isolat 1

Allerede under mikroskopering av bakterieisolat 1 og 4 mistenkte vi at isolat 1 kunne være en *Bacillus*-art på grunn av morfologien. Morfologien til isolat 1 viste lange, stavformede celler som dannet terminale endosporer. Det ble så bekreftet med 16S rRNA sekvensering at bakterieisolat 1 var *L. fusiformis*, en relativt ukjent miljøbakterie i bacillusslekten. Den lever for det meste i vann, jord, landbruksavfall og matvarer, mens *S. pneumoniae* hovedsakelig lever i nesen og svelget til mennesker. Et interessant spørsmål blir da hvorfor *L. fusiformis* produserer et antimikrobielt stoff mot *S. pneumoniae* når pneumokokker tilsynelatende ikke er en naturlig konkurrent?

Det kan tenkes at *S. pneumoniae* ikke er det opprinnelige målet for fusiformicin, men tilfeldigvis også har en reseptor (AmiA) som binder til fusiformicin, noe som fører til opptak av fusiformicin til cytoplasma. Ulike oligopeptidpermeaser finnes hos alle bakterier (65), og undersøkelser i dette arbeidet har vist at AmiA er delvis konserverert hos alle bakteriene som testet positivt for sensitivitet mot fusiformicin. Alle bakteriene som var resistente mot fusiformicin hadde lav identitet med AmiA i *S. pneumoniae* R6. Dette indikerer at resistensen mot fusiformicin hos disse bakteriene er oppnådd ved at fusiformicin ikke tas opp av cellene, heller enn at det er den toksiske effekten i cytoplasma som er redusert. De fleste bakteriene som ble testet var andre streptokokker, så undersøkelser av Ami-homologer og fusiformicinsensitivitet hos flere bakteriearter må til for å kunne konkludere om det er en sammenheng mellom hvor konserverert det peptidbindende domenet er hos AmiA og hvor sensitiv bakterien er for fusiformicin. Det vi derimot vet er at fusiformicin må transporteres til cytoplasma for å virke.

5.3 Produksjon av fusiformicin

Produksjon av fusiformicin så ut til å være større på TH-agar enn i flytende TH-medium siden supernatanten av en fire dager gammel *L. fusiformis*-kultur i stasjonærfase ga signifikant mindre hemmingssone enn hemmingssonen rundt *L. fusiformis*-kolonier på TH-agarskåler (Figur 4.8

og 4.5). En del av forklaringen kan være at konsentrasjonen av bakterieceller er høyere på agar enn i flytende medium, men dette er umulig å vite uten å måle celletettheten eller telle antall bakterieceller. En annen forklaring kan være at *L. fusiformis* sender ut miljøsignaler til naboceller som aktiverer produksjon av fusiformicin. Konsentrasjonen av disse miljøsignalene vil da være lavere i store volum (500 ml) flytende medium enn på en agar, fordi bakteriecellene på agar vokser i biofilm hvor det akkumuleres en høy konsentrasjon av ekstracellulære miljøsignaler. Det er også mulig at tilgangen på oksygen har noe å si, cellene på TH-agarskål hadde tilgang på mer oksygen enn cellene i flytende medium. Stabiliteten til fusiformicin i flytende medium kan og skille seg fra stabiliteten i agar. For eksempel kan det hende at bakteriecellene slutter å produsere fusiformicin etter to til tre dager, og at det fra dag tre begynner å miste aktiviteten. Testing av produksjon i flytende medium over syv dager viste at aktiviteten til fusiformicin begynte å avta etter fire dager, men det ble ikke tatt prøver etter to og tre dager. Det er derfor ikke sikkert om produksjonen er på sitt høyeste etter fire dager, og deretter begynner å avta, eller om aktiviteten til fusiformicin var på sitt høyeste etter to-tre dager og allerede hadde begynt å avta ved dag fire. Dette er mulig å teste om av stabiliteten til fusiformicin i flytende medium skal testes på nytt, ved å ta prøver hver dag og måle celletettheten hver dag (OD).

Testing av produksjon i flytende medium ble gjort med og uten oksygen, og viste også at produksjonen av fusiformicin er mest effektiv når *L. fusiformis* har tilgang på oksygen. Dette kan indikere at fusiformicinproduksjon ikke er et resultatet av en stressrespons hos bakteriecellene, men det kan også være en konsekvens av at cellene som hadde god tilgang på oksygen nådde en høyere tetthet. Høyere tetthet kan ha induisert regulatoriske veier som fører til produksjon (quorum-sensing), mens cellene som vokste anaerobt aldri fikk muligheten til å nå den nødvendige tettheten fordi *L. fusiformis* er obligat anaerob og cellene i falkonrøret entret dødsfasen.

5.4 Karakterisering av fusiformicin

Vi hadde tidlig en hypotese om at fusiformicin kunne være et bakteriosin basert på at det var varmestabilt og ikke dannet miceller som f.eks. lipopeptider gjør (det passerte gjennom et filter med porestørrelse 0,2 μm). Hypotesen ble videre bekreftet av at proteinase K inhiberer fusiformicin. I tillegg tilhører produsenten *L. fusiformis* bacillusslekten som er kjent for å

produsere bakteriosiner. Resultatene fra butanolekstraksjon stemte derimot ikke overens med hypotesen og resultatet av proteinase K-behandlingen. Det var forventet at hvis fusiformicin er et bakteriosin ville det hatt aktivitet i butanolfasen, men ingen av fasene etter butanolekstraksjon hadde antimikrobiell aktivitet. Det kan tyde på at butanol førte til inaktivering av fusiformicin ved for eksempel misfolding, eller at fusiformicin er et amfifilt molekyl som går både i vannfasen og butanolfasen, og at konsentrasjonen i hver av fasene dermed ble for lav. Eventuelt kan forklaringen være at konsentrasjonen i den originale prøven var for lav til å gi antimikrobiell aktivitet. Det ble senere vist at fusiformicin binder hydrofobisk til Amberlite® hydrofobiske kuler og elueres med 100% etanol, noe som viser at det har hydrofobe partier på molekylet. Siden fusiformicin både løses i vann og binder hydrofobt til Amberlite® XAD-kuler er det sannsynligvis amfifilt. Ammoniumsulfatfelling, som også er en mye brukt metode for å oppkonsentrere proteiner og peptider, hadde tilsynelatende ikke fusiformicin i det utfelte materialet. Hvis forsøket skal gjentas bør også supernatanten testes for eventuell restaktivitet.

Samtidig som de tre ulike fasene fra butanolekstraksjon og det utfelte materialet fra ammoniumsulfatfelling ble testet for antimikrobiell aktivitet ble også ubehandlet supernatant (isolert fra *L. fusiformis* kultur ved sentrifugering), proteinase K-behandlet supernatant og varmebehandlet supernatant testet. Resultatet viste at ingen av prøvene ga antimikrobiell aktivitet. Supernatanten ble deretter oppkonsentrert, og etter oppkonsentrering ble det observert antimikrobiell aktivitet. Det ville derfor vært interessant å gjenta butanolekstraksjon og ammoniumsulfatfelling med supernatant som er blitt oppkonsentrert ved vakuumbørking, eventuelt Amberlite®-oppkonsentrert supernatant.

For å finne ut mer om hvilken bakteriosingruppe fusiformicin tilhører ble det behandlet med DTT for å se om det dannet disulfidbroer og kunne være et lantibiotika (klasse I bakteriosin), men det viste seg at fusiformicin ikke inhiberes av DTT og dermed mest sannsynlig ikke er lantibiotika. Den molekylære vekten ble funnet til å være ~1000 Da, noe som betyr at det mest sannsynlig ikke tilhører klasse III bakteriosiner, som er større enn 30 kDa. Da gjenstår klasse II og klasse IV. Hvis fusiformicin er et klasse II bakteriosin har det en virkningsmekanisme som er lite utbredt blant klasse II bakteriosiner som vanligvis virker ved å depolarisere cellemembranen, mens fusiformicin virker i cytoplasma. Strukturelt virker det mest sannsynlig at fusiformicin tilhører klasse II, fordi vi ikke har sett noen resultater som tyder på at det har en

lipid- eller karbohydratdel, noe som kjennetegner klasse IV bakteriosiner. Et forsøk som kunne ha blitt gjort for å bekrefte at fusiformicin ikke har en lipiddel er å behandle det med polymixcin acylase som kløyver av acylgrupper og slik spalter bindingen mellom lipid og peptid, og hvis fusiformicin beholder den antimikrobielle aktiviteten er det ikke avhengig av en lipiddel for å være aktivt.

5.5 Rensing av fusiformicin

Rensingen av fusiformicin førte dessverre ikke til >95% rent stoff, og det kan være flere grunner til hvorfor. De to hovedproblemene var at fusiformicin eluerte over flere HPLC-fraksjoner, og at hver fraksjon inneholdt flere uønskede stoffer i tillegg til fusiformicin. En forklaring på hvorfor fraksjonene inneholdt flere uønskede stoffer er at mye uønsket stoff elueres sammen med fusiformicin under Amberlite®-oppkonsentrering. Det tyder på at en annen form for oppkonsentrering ville vært å foretrekke, for eksempel butanolekstraksjon eller ammoniumsulfatfelling. I tillegg til å gjenta butanolekstraksjon og ammoniumsulfatfelling, ville det vært interessant å prøve andre ekstraheringsmetoder, for eksempel med kloroform, diklormetan eller heksan.

Det kan være flere ulike grunner til at fusiformicin eluerer over flere HPLC-fraksjoner. En av dem er at fusiformicin er et heterogent molekyl, med for eksempel en lipid- eller karbohydratdel. De ulike delene av fusiformicin vil da ha ulik hydrofobisitet og elueres fra kolonnen ved ulike tidspunkt. Om denne hypotesen stemmer ville det vært forventet at fusiformicin mistet aktivitet etter separering av lipid- eller karbohydratdelen og peptiddelen, slik det er observert for klasse IV bakteriosiner. Dette ble ikke observert for fusiformicin. En annen forklaring kan være at fusiformicin interagerer uspesifikt med andre kontaminerende stoff i prøven som også binder reversfasekolonnen. Disse interaksjonene vil variere avhengig av hvilke kontaminanter fusiformicin binder, og direkte påvirke hvor mye eluent som må til for å eluere stoffet. I et slikt scenario vil fusiformicin eluere enten ved at interaksjonen med kontaminanten brytes, eller at kontaminanten fusiformicin binder til elueres ut av kolonnen. Fusiformicin vil da elueres ved ulike konsentrasjoner avhengig om det binder direkte til kolonnen eller via kontaminanter.

En annen mulig forklaring er at fusiformicin har et signalsekvens (pre-peptid) som er tilstede i noen av molekylene, men ikke alle. Pre-peptidet kan da tenkes å blokkere antimikrobiell aktivitet, og for eksempel virke som en merkelapp som forteller *L. fusiformis* at fusiformicin skal transporteres ut av cellen. Fusiformicin som inneholder pre-peptidet kan ha høyere eller lavere hydrofobisitet enn fusiformicin hvor pre-peptidet er fjernet, avhengig av hvilke aminosyrer pre-peptidet inneholder. For at fusiformicin skal få antimikrobiell aktivitet må pre-peptidet kløyves av etter at det er blitt transportert inn i målcellen hvis det ikke kløyves av under transport ut av *L. fusiformis*. Dette vil forklare hvorfor det observeres antimikrobiell aktivitet i flere HPLC-fraksjoner. Transport av oligopeptider er ofte koblet med kløyving av oligopeptider for å danne et aminosyrelager hos bakterien (64).

Et tredje alternativ til hvorfor fusiformicin eluerer over flere HPLC-fraksjoner er om det består av to peptider som må dimerisere for at fusiformicin skal ha optimal antimikrobiell aktivitet. Dimeriseringen kan skje spontant når de to peptidene kommer i kontakt med hverandre, men de separeres under HPLC-fraksjonering. Denne hypotesen kan testes ved å kombinere fraksjonene fra HPLC-analysene og undersøke om den antimikrobielle aktiviteten da blir dramatisk høyere. Om det blir bevist at fusiformicin består av to ulike peptider som må dimerisere for å ha antimikrobiell aktivitet blir det en utfordring å rense peptidene til >95% renhet fordi kombinerings av flere ulike HPLC-fraksjoner kan gi høye konsentrasjoner av uønsket stoff.

Det er blitt vist at HPLC-analyser av Amberlite®-oppkonsentrert fusiformicin ikke er tilstrekkelig for å oppnå >95% renhet. Ionebyttekromatografi med en anionbytter viste seg å være dårlig egnet fordi fusiformicin ikke bandt til anion-kolonnen ved pH 8,8, og det er fare for at pH verdier høyere enn 8,8 ville senke stabiliteten til fusiformicin. Det ble valgt å benytte en mildere rensemetode (gelfiltrering), framfor å øke pH eller teste en kation-kolonne på grunn av faren for at veldig høye eller veldig lave pH verdier vil påvirke stabiliteten til fusiformicin. Det kunne likevel vært interessant å teste en kation-kolonne, siden strukturen til fusiformicin er ukjent og det derfor ikke er mulig å predikere effekten av veldig lave pH verdier med 100% sikkerhet.

Resultatene fra gelfiltrering var lovende, men det var fortsatt antimikrobiell aktivitet i flere fraksjoner. Fraksjonen med mest antimikrobiell aktivitet var fraksjon syv, og det var også svak aktivitet i fraksjon seks. Sannsynligvis blir de fusiformicin-molekylene som først passer gjennom kolonnen samlet opp i fraksjon seks, men mesteparten av fusiformicin blir samlet opp i fraksjon syv. Antimikrobiell aktivitet ble og observert for fraksjon fire, og fusiformicin i denne fraksjonen passerte gjennom kolonnen med litt høyere hastighet enn fusiformicin i fraksjon syv. Dette tyder på at fusiformicin i fraksjon fire har noe høyere masse (like over 1000 Da) enn fusiformicin i fraksjon syv. Den lille økningen i masse kan stemme med tilstedeværelsen av et pre-peptid. Om dette stemmer viser det at fusiformicin har antimikrobiell aktivitet med og uten pre-peptidet, og at begge formene er tilstede i Amberlite®-oppkonsentrert supernatant. Hvis fusiformicin består av to peptider som dimeriserer tyder gelfiltreringsresultatet på at begge peptiden eluerer fra gelfiltreringskolonnen samtidig, eller at det er to molekyler av det samme peptidet som dimeriserer. Gelfiltreringsresultatet kan også tyde på at det er aggregater av fusiformicin eller at det binder uspesifikt til andre stoff i prøven og danner større komplekser.

Etter HPLC-analyse av gelfiltreringsfraksjon syv ble det ikke observert antimikrobiell aktivitet i fraksjonene som ble samlet opp. Hvis fusiformicin ikke består av en dimer som ble separert og mistet aktiviteten, er en annen mulighet at fusiformicin eluerte ved en annen acetonitrilkonsentrasjon enn det som hadde blitt observert tidligere. Dette er spesielt sannsynlig for HPLC-analysen med C⁸-kolonnen. Den er mindre hydrofob enn C¹⁸-kolonnen og hadde ikke blitt testet tidligere, så det er mulig at fusiformicin eluerte tidligere enn antatt. Volumet av gelfiltreringsfraksjon syv som ble analysert var og veldig lite (fem til ti µl), og mengden fusiformicin som ble samlet opp kan ha vært for liten (mindre enn tre µl) til å gi antimikrobiell aktivitet. Det ville derfor vært interessant å gjenta gelfiltrering og analysere og fraksjonere det totale volumet av fraksjon syv (eller den fraksjonen som gir mest antimikrobiell aktivitet) vha. HPLC, for å se om det da er mulig å identifisere hvilken fraksjon som inneholder fusiformicin.

5.6 *Virkningsmekanismen til fusiformicin*

Etter å ha isolert spontanresistente supressormutanter kom vi fram til følgende hypotese for virkningsmekanismen til fusiformicin: Fusiformicin binder til en reseptor på overflaten til *S. pneumoniae*, og dette aktiverer en reaksjon som potensielt ødelegger cellemembranen, eller en annen essensiell del eller prosess i bakterien. Hos supressormutantene kan en punktmutasjon

ha ført til endringer i aminosyresammensetningen til reseptoren, slik at den ikke lenger binder til fusiformicin, eller til et stop-kodon som gir en ufullstendig reseptor.

Genomsekvensering av supressormutantene avslørte tre mutasjoner i *ami*-gener som førte til trunkerte proteiner, og en deleksjon på omtrent 1000 bp. *ami*-genene *amiACDEF* koder for et oligopeptid opptakssystem der lipoproteinet AmiA sitter forankret i membranen og gjenkjenner peptider på utsiden av cellen. Peptidene tas opp gjennom ABC-transporteren som består av AmiCDEF-komplekset. Genomsekvenserings viste ingen mutasjoner i den potensielle fusiformicinreseptoren AmiA, men mutasjoner i *amiC*, *amiE* og *amiF*. Proteinene som ble trunkert var AmiC, en del av transportkanalen, og AmiE og AmiF som sørger for energi til transport. Deleksjonen startet i AmiE og sluttet i AmiF. Dette var de første hintene om at fusiformicin må transporteres inn i cytoplasma for å virke. Videre forsøk bekreftet at inaktivering av AmiC, og AmiEF fører til resistens. Opptak av oligopeptider gjennom Ami-systemet krever hydrolyse av ATP fra både AmiE og AmiF. Siden den Walker B (ATP-bindende motiv) muterte stammen IHH-23 (AmiE, D184A) var resistent mot fusiformicin, og ikke inneholdt noen andre mutasjoner enn GAT → GCT (D184A) er det bevist at transport til cytoplasma etter all sannsynlighet er den avgjørende faktoren for aktiviteten til fusiformicin.

Det ble observert at bakterier med mer ulik AmiA var immune mot fusiformicin, og dette bygger opp under denne modellen. Størrelsen og de kjemiske egenskapene til fusiformicin stemmer godt med det litteraturen sier om transport gjennom Ami. Virkningsmekanismen til fusiformicin etter at det er blitt transportert inn i cytoplasma er ukjent, men det er fristende å tenke at det inhiberer en av de konserverte prosessene DNA-, RNA- eller proteinsyntese. Undersøkelsene som er gjort så langt tyder på at det er en forutsetning at en bakteriestamme har et AmiA-protein eller et homologt protein som gjenkjenner fusiformicin og starter transport inn til cytoplasma. Det er derimot ikke en klar sammenheng mellom hvor stor graden av homologi er og hvor sensitive bakteriene er for fusiformicin. *S. agalacticae*, *E.coli*, *pseudomonas*, *L. lactis*, *S. aureus* og *E. faecalis* var alle immune mot fusiformicin, og alle har et peptid som gjenkjenner andre peptider for opptak med en homologi på 35% eller mindre med AmiA.

5.7 *Potensialet til fusiformicin som et fremtidig antibiotika*

Supressormutantene i arbeidet som er blitt presentert i denne oppgaven utviklet resistens mot fusiformicin i løpet av det første døgnet de var i kontakt med bakteriosinet. Resistensmekanismen har blitt vist til å være mekanisme iv (seksjon 1. 1.2) redusert opptak av antibiotikumet. Denne mekanismen har og blitt observert for resistensutvikling mot andre bakteriosiner. Mutasjoner i Ami-transporteren har relativt milde konsekvenser for pneumokokker, som også tar opp aminosyrer via andre transportkanaler. De konsekvensene som er blitt observert i dette arbeidet er reduksjon i veksthastighet, og reduksjon i transformasjonshastighet. Andre studier har vist at pneumokokker med inaktivert Ami er dårligere kolonisorer av mennesker enn villtypen, og at de derfor vil ha lavere forutsetninger for å opprettholde en infeksjon (69,70). Spredning av fusiformicinresistens vil antagelig skje raskt mellom pneumokokker som kommer i kontakt med hverandre og andre bakteriearter på grunn av horisontal genoverføring. Det kan tenkes at i en situasjon hvor tilgangen på aminosyrer er lav vil kostnaden av å inaktivere transport via Ami være høyere, slik at pneumokokkene som har inaktivert Ami vil vokse så sakte at de blir utkonkurrert av andre bakterier, og dermed ikke får spredd fusiformicinresistensen. Det er og viktig å finne korrekt dosering av fusiformicin for å minske resistensutviklingen. Feildosering og ufullstendige antibiotikakurer har vært med på å muliggjøre den enorme resistensutviklingen man har sett til nå, og blir viktig å unngå når man skal introdusere nye antibiotika til terapeutisk bruk. Subletale doser vil ikke gi fullstendig inhibering, og det vil promotere spredning av resistens.

En viktig forutsetning for om fusiformicin har potensialet til å bli et nytt antibiotika er om det er skadelig for mennesker og dyr eller ikke. Sammenligning av relativ MIC og hemolyse av blodceller viste at en fusiformicin-konsentrasjon på 125 ganger MIC ikke førte til hemolyse av blodceller. Den lille absorpsjonen som kan observeres for hemolysetesten skyldes sannsynligvis at fusiformicin ble fortynt i dH₂O, og ikke PBS. Et negativt hemolyseresultat utelukker derimot ikke at fusiformicin ikke kan gi andre reaksjoner som potensielt kan være skadelige. En annen viktig forutsetning er om fusiformicin har vevsgjennomtrengeligheten som skal til for å behandle pneumokokkinfeksjoner i for eksempel hjernen. For å spres til de infiserte vevene (lungevev, hjernevev, slimhinnene) må fusiformicin, hvis det skal distribueres oralt, bli tatt opp fram tarmen til blodet og videre overføres fra blod til det infiserte vevet. Det er usikkert om fusiformicin har den nødvendige vevsgjennomtrengeligheten, men dette kan testes enten ved infeksjonsmodeller i mus eller syntetiske vev om teknologien tillater det, hvis det ikke dukker

opp andre hindringer på et tidligere tidspunkt i utviklingen. Om vevsgjennomtrengeligheten til fusiformicin viser seg å være god nok, blir det nødvendig å finne en egnet metode for å administrere det til pasienter. Det vanligste er å administrere medisiner enten oralt (i tablett eller væskeform) eller intravenøst. Fusiformicin som gis oralt og blir tatt opp i blodet kan føre til problemer, da det er et peptid og fremmede peptider i blodet har potensialet til å initiere en immunrespons. Intravenøs behandling kan være upraktisk fordi pasienten muligens må behandles på sykehus.

6 Konklusjoner og videre arbeid

6.1 Konklusjoner

Basert på funnene som er blitt gjort i dette arbeidet kan vi konkludere med at *L. fusiformis* produserer et bakteriosin, fusiformicin, som virker smalspektret mot streptokokker og noen få andre Gram-positive bakterier. Produksjonen av fusiformicin er størst på TH-agarskåler, men det produseres også i flytende TH-medium. Fusiformicin har en masse på omtrent 1000 Da. Det inhiberes av proteinase K-behandling, men ikke DTT-behandling noe som indikerer at fusiformicin er et peptid eller protein som ikke er avhengig av disulfidbroer for å ha antimikrobiell aktivitet. Fusiformicin fører ikke til hemolyse av blodceller når det tilsettes 125 fold mer fusiformicin enn MIC (relativ MIC-verdi). En renseprotokoll bestående av oppkonsentrering med Amberlite® XAD 16N hydrofobiske kuler, ionebyttekromatografi eller gelfiltrering og HPLC-analyse har ikke resultert i fusiformicin med <95% renhet. Resistens mot fusiformicin oppstår spontant hos *S. pneumoniae* RH425 ved at bakterien muterer oligopeptidpermeasen Ami, som er ansvarlig for opptaket av fusiformicin til cytoplasma. Opptak av fusiformicin til cytoplasma er nødvendig for at det skal inhibere målbakterien.

6.2 Videre arbeid

Arbeidet med fusiformicin så langt har vist et lovende potensiale for at det kan bli et nytt antibiotikum mot pneumokokkinfeksjoner, men utviklingen fra screening til antibiotikamarkedet krever mye tid og ressurser. Før fusiformicin potensielt kan produseres i stor skala og gjennomgå klinisk testing på dyr og kanskje mennesker, må grunnforskningen være på plass. Det ville vært logisk om det videre arbeidet med fusiformicin fortsetter i de to hovedretningene som er blitt presentert i denne oppgaven hvor den ene retningen har fokusert på rensing og karakterisering, og den andre har fokusert på å finne virkningsmekanismen.

Når det gjelder rensing og karakterisering av fusiformicin må en renseprotokoll for fusiformicin opprettes og optimaliseres slik at resultatet blir stoff med >95% renhet. Til å starte med kunne man forsøkt å ekstrahere fusiformicin i kultursupernatant med andre organiske løsemidler (kloroform, dikloroetan, heksan), for å se om en av disse teknikkene kan egne seg bedre for oppkonsentrering av fusiformicin. Et alternativ kan være å kombinere Amberlite®-oppkonsentrering med enten butanolekstraksjon (det organiske løsemiddelet som virker best)

eller ammoniumsulfatfelling hvis det viser seg at disse teknikkene gir oppkonsentrert fusiformicin. Hvis fusiformicin ikke felles ut med ammoniumsulfat, så kan det brukes som et rensetrinn fordi mange uønskede stoffer vil felle ut. De kan fjernes ved sentrifugering, og så kan man gå videre med et renere utgangspunkt til Amberlite®-oppkonsentrering. Gelfiltrering viste seg å være lovende som det neste rensessteget, men det ville også vært interessant å teste en kationbytter for å se om fusiformicin binder ved lav pH. HPLC-analyser har vært lovende som det siste rensetrinnet, og man kunne testet andre eluenter enn acetonitril (f.eks. maursyre). Rent fusiformicin kan deretter analyseres vha. MALDI-TOF MS for massebestemmelse, og massen sammenlignes med massen til allerede kjente molekyler. Deretter kan en korrekt MIC-verdi beregnes. Det ville også vært interessant å finne aminosyresekvensen til fusiformicin, og deretter bruke den til å predikere strukturen vha NMR. Videre undersøkelser av inhibisjonsspekteret til fusiformicin må også til for å finne ut hvilke patogener det virker mot. Sammenligning av konserveringsgrad av Ami-proteinene hos de sensitive stammene kan gi mer informasjon om hva som er forutsetningene for at en bakteriestamme skal være sensitiv ovenfor fusiformicin.

Når det gjelder virkningsmekanismen til fusiformicin vil det være spennende å finne ut om det er DNA-, RNA-, eller proteinsyntesen som inhiberes. Dette kan videre gi informasjon om andre resistensmekanismer som kan føre til fusiformicinresistens, og om det er mulig å kombinere fusiformicin med andre molekyler for å unngå disse resistensmekanismene.

7 Referanser

1. Silber J, Kramer A, Labes A, Tasdemir D. From Discovery to Production: Biotechnology of Marine Fungi for the Production of New Antibiotics. *Mar Drugs* [Internet]. 2016 Jul 21;14(7):137. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27455283>
2. Rossolini GM, Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Dec;14 Suppl 6:2–8.
3. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015 Apr;40(4):277–83.
4. ECDC. The bacterial challenge: time to react. 2009.
5. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2016;4(2). Available from: <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
6. Demain AL. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014 Feb;41(2):185–201.
7. Hamad B. The antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2010;9(9):675–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd3267>
8. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(6):423–35. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
9. Getino M, de la Cruz F. Natural and Artificial Strategies To Control the Conjugative Transmission of Plasmids. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2018;6(1). Available from: <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.MTBP-0015-2016>
10. Jousset AB, Rosinski-Chupin I, Takissian J, Glaser P, Bonnin RA, Naas T. Transcriptional Landscape of a bla (KPC-2) Plasmid and Response to Imipenem Exposure in *Escherichia coli* TOP10. *Front Microbiol*. 2018;9:2929.
11. Straume D, Stamsås GA, Håvarstein LS. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2015;33:371–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134814003918>
12. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2005;3(9):711–21. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
13. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995 Apr;45(2):406–8.
14. Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol* [Internet]. 1997 Oct 1;83(S1):1S-11S. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x>
15. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Jul 1;3(7):a010215. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23818515>
16. Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med Suppl* [Internet]. 2004;117(3, Supplement 1):3–15. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1548276604000032>
17. Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A New Pneumococcal Capsule Type, 10D, is the 100th Serotype and Has a Large Fragment from an Oral Streptococcus. McDaniel LS, editor. MBio [Internet]. 2020 Jun 30;11(3):e00937-20. Available from: <http://mbio.asm.org/content/11/3/e00937-20.abstract>
18. Aliberti S, Cook GS, Babu BL, Reyes LF, H. Rodriguez A, Sanz F, et al. International prevalence and risk factors evaluation for drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* pneumonia. *J Infect* [Internet]. 2019;79(4):300–11. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445319301999>
19. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. 2015.
20. World Health Organization. Pneumococcal disease.
21. Johnsborg O, Håvarstein LS. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2009 May 1;33(3):627–42. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00167.x>
22. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan;6(1):29–40.
23. Terfehr D, Dahlmann TA, Kück U. Transcriptome analysis of the two unrelated fungal β -lactam producers *Acremonium chrysogenum* and *Penicillium chrysogenum*: Velvet-regulated genes are major targets during conventional strain improvement programs. *BMC Genomics* [Internet]. 2017 Mar

- 31;18(1):272. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28359302>
24. Chaudhry SB, Veve MP, Wagner JL. Cephalosporins: A Focus on Side Chains and β -Lactam Cross-Reactivity. *Pharm (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2019 Jul 29;7(3):103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31362351>
 25. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(2):95–105. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
 26. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev* [Internet]. 2017 Sep;279(1):90–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28856737>
 27. Gallegos-Monterrosa R, Maróti G, Bálint B, Kovács ÁT. Draft Genome Sequence of the Soil Isolate *Lysinibacillus fusiformis* M5, a Potential Hypoxanthine Producer. *Genome Announc* [Internet]. 2016 Nov 10;4(6):e01272-16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27834716>
 28. Logan NA, Vos P De. *Bacillus* [Internet]. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015. p. 1–163. (Major Reference Works). Available from: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
 29. Pudova DS, Lutfullin MT, Shagimardanova EI, Hadieva GF, Shigapova L, Toymentseva AA, et al. Draft genome sequence data of *Lysinibacillus fusiformis* strain GM, isolated from potato phyllosphere as a potential probiotic. *Data Br* [Internet]. 2018 Nov 24;21:2504–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30761330>
 30. Ahmad V, Muhammad Zafar Iqbal AN, Haseeb M, Khan MS. Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus jx416856* against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste. *Anaerobe* [Internet]. 2014;27:87–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996414000316>
 31. Ahmad V, Ahmad K, Baig MH, AL-Shwaiman HA, Al Khulaifi MM, Elgorban AM, et al. Efficacy of a novel bacteriocin isolated from *Lysinibacillus* sp. against *Bacillus pumilus*. *LWT* [Internet]. 2019;102:260–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381831079X>
 32. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* [Internet]. 1995 Jun;59(2):171–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7603408>
 33. Zhao X, Kuipers OP. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 Nov 7;17(1):882. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27821051>
 34. Abriouel H, Franz CMAP, Omar N Ben, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2011 Jan 1;35(1):201–32. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
 35. Chopra L, Singh G, Choudhary V, Sahoo DK. Sonorensin: an antimicrobial peptide, belonging to the heterocycloanthracin subfamily of bacteriocins, from a new marine isolate, *Bacillus sonorensis* MT93. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2014/03/07. 2014 May;80(10):2981–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24610839>
 36. Huang T, Zhang X, Pan J, Su X, Jin X, Guan X. Purification and Characterization of a Novel Cold Shock Protein-Like Bacteriocin Synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Oct 20;6:35560. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27762322>
 37. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2002 Oct 1;56(1):117–37. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
 38. Thermo Scientific. Atmosphere Generation System [Internet]. Online. [cited 2020 May 16]. Available from: http://www.oxid.com/UK/BLUE/prod_detail/prod_detail.asp?pr=AN0010
 39. Hockett KL, Baltrus DA. Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J Vis Exp* [Internet]. 2017 Jan 14;(119):55064. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28117830>
 40. Saenger W. Chapter 714 - Proteinase K. In: Rawlings ND, Salvesen GBT-H of PE (Third E, editors. Academic Press; 2013. p. 3240–2. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822192007146>
 41. Wingfield P. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Curr Protoc protein Sci* [Internet]. 2001 May;Appendix 3:Appendix-3F. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18429073>
 42. Rinschen MM. Chapter 1 - Single glomerular proteomics: A novel tool for translational glomerular cell biology. In: Weimbs TBT-M in CB, editor. *Methods in Kidney Cell Biology - Part B* [Internet]. Academic Press; 2019. p. 1–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X19300329>
 43. Sigma Aldrich. Amberlite hydrophobic resins. 2020.
 44. Lambert RJW, Pearson J. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2000

- May 1;88(5):784–90. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>
45. Sharma M. Chapter 18 - Transdermal and Intravenous Nano Drug Delivery Systems: Present and Future. In: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra RK, Thomas SBT-A of TND and DS, editors. *Micro and Nano Technologies* [Internet]. Elsevier; 2019. p. 499–550. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128140291000181>
 46. Van Buren T, Arwatz G, Smits AJ. A simple method to monitor hemolysis in real time. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):5101. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62041-8>
 47. Crowley TE. Chapter 5 - High-performance liquid chromatography. In: Crowley TEBT-P and C of SM, editor. Academic Press; 2020. p. 49–58. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012813942400005X>
 48. Shen C-H. Chapter 8 - Quantification and Analysis of Proteins. In: Shen C-HBT-DMB, editor. Academic Press; 2019. p. 187–214. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028230000080>
 49. Bauer MMT, Schnapp G. 3.19 - Protein Production for Three-Dimensional Structural Analysis. In: Taylor JB, Trigg DJBT-CMCII, editors. Oxford: Elsevier; 2007. p. 411–32. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B008045044X000924>
 50. Hussain CM, Keçili R. Chapter 7 - Separation techniques for environmental analysis. In: Hussain CM, Keçili RBT-MEAT for P, editors. Elsevier; 2020. p. 163–98. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128169346000072>
 51. Stephenson FH. Chapter 11 - Protein. In: Stephenson FHBT-C for MB and B (Third E, editor. Boston: Academic Press; 2016. p. 375–429. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128022115000114>
 52. Kaunitz JD. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2015 Aug;60(8):2230–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26077976>
 53. Delong RK, Zhou Q. Experiment 6 - Polymerase Chain Reaction (PCR). In: Delong RK, Zhou QBT-IE on B and their I, editors. Boston: Academic Press; 2015. p. 59–66. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009697000062>
 54. New England BioLabs. Phusion Technology. 2020.
 55. Vazyme. Phanta Max Super-Fidelity DNA polymerase. 2020.
 56. Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* [Internet]. 2007;2(4):924–32. Available from: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
 57. Sigma Aldrich. RedTaq Ready-mix. 2020.
 58. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 Apr 20;(62):3923. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546956>
 59. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* [Internet]. 2015/11/10. 2016 Jan;107(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26554401>
 60. Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Nov;67(11):5190–6.
 61. Geerlof A, Brown J, Coutard B, Egloff MP, Enguita FJ, Fogg MJ, et al. The impact of protein characterization in structural proteomics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006 Oct;62(Pt 10):1125–36.
 62. GE Healthcare. 29219757 Superdex™ 30 Increase 10/300 GL. 2020.
 63. Claverys JP, Grossiord B, Alloing G. Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? *Res Microbiol*. 2000;151(6):457–63.
 64. Rodríguez-Serrano GM, García-Garibay M, Cruz-Guerrero AE, Gómez-Ruiz L, Ayala-Niño A, Castañeda-Ovando A, et al. Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2018 Oct;28(10):1581–8.
 65. Slamti L, Lereclus D. The oligopeptide ABC-importers are essential communication channels in Gram-positive bacteria. *Res Microbiol*. 2019;170(8):338–44.
 66. Sham L-T, Jensen KR, Bruce KE, Winkler ME. Involvement of FtsE ATPase and FtsX extracellular loops 1 and 2 in FtsEX-PcsB complex function in cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *MBio*. 2013 Jul;4(4).
 67. Torsvik V, Øvreås L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Jun;5(3):240–5.
 68. Martiny AC. High proportions of bacteria are culturable across major biomes. *ISME J*. 2019 Aug;13(8):2125–8.
 69. Cundell DR, Pearce BJ, Sandros J, Naughton AM, Masure HR. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun*. 1995 Jul;63(7):2493–8.
 70. Kerr AR, Adrian P V, Estevão S, de Groot R, Alloing G, Claverys J-P, et al. The Ami-AliA/AlkB

permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):3902–6.

8 Appendiks I: Sekvenseringsresultater

16S rRNA sekvensen hos bakterieisolat 1

>10CG03_37649128_37649128_37649128_37649128

GAAAGCTGCTCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTATAGTTT
GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAAATACTGAA
AGACGGTTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT
CACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAAC
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTCCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTA
GTAACCTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCA
GAAGAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGG
CGAAGGCGACTATCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
AGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCT
TGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACCCACGTGCTACAATGGACGAAA
CAAACGGTTGCCAACTCGCGATAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGAAGAAGGATTTCCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTA
ACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA
GAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGACTATCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTG
CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGA
TCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATA

Sammenstilling av 16S rRNA sekvensen hos bakterieisolat 1 og *Lysinibacillus fusiformis*:

Lysinibacillus fusiformis strain L21aMb 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MN826515.1](#) Length: 1419 Number of Matches: 2

Range 1: 21 to 1226 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2198 bits(1190)	0.0	1201/1206(99%)	2/1206(0%)	Plus/Plus
Query 4	AGC-TGCT-CTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTAT	61		
Sbjct 21	AGCTTGCTCCTTCGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTTAT	80		
Query 62	AGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGT	121		
Sbjct 81	AGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGT	140		
Query 122	GAAATACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAG	181		
Sbjct 141	GAAATACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAG	200		
Query 182	TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC	241		
Sbjct 201	TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC	260		
Query 242	CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA	301		
Sbjct 261	CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCA	320		
Query 302	CAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTCGTAA	361		
Sbjct 321	CAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTCGTAA	380		
Query 362	AACTCTGTGTAAAGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACGGCTGTACCTTGACGGTACCTT	421		
Sbjct 381	AACTCTGTGTAAAGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACGGCTGTACCTTGACGGTACCTT	440		
Query 422	ATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT	481		
Sbjct 441	ATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT	500		
Query 482	TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC	541		
Sbjct 501	TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC	560		
Query 542	CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAG	601		
Sbjct 561	CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAG	620		
Query 602	TGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG	661		
Sbjct 621	TGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG	680		
Query 662	CGACTATCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	721		
Sbjct 681	CGACTATCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	740		
Query 722	ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCT	781		
Sbjct 741	ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCT	800		
Query 782	TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGTGCAGACTGAAAC	841		
Sbjct 801	TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGGTGCAGACTGAAAC	860		
Query 842	TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC	901		
Sbjct 861	TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAAC	920		
Query 902	GCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCT	961		
Sbjct 921	GCGAAGAACCCTTACCAGGCTTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCT	980		
Query 962	TCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG	1021		
Sbjct 981	TCGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG	1040		
Query 1022	GTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTC	1081		
Sbjct 1041	GTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTC	1100		
Query 1082	TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC	1141		
Sbjct 1101	TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC	1160		
Query 1142	CTTATGACCTGGGCTACCCACGTGTACAATGGACGAAACAACGGTTGCCAACTCGCGA	1201		
Sbjct 1161	CTTATGACCTGGGCTACCCACGTGTACAATGGACGATACAACGGTTGCCAACTCGCGA	1220		
Query 1202	TAGGGA 1207			
Sbjct 1221	GAGGGA 1226			

amiC i IHH25 (mutasjon 12)

>10DD71_37701819_37701819

TAAGAAAATAATCCAAGAACCCTGAAAATCCAGACTTGAAACGCTACCTTCGTTTTGAAAATGATC
 CAGCTATCGGATGGTCATTGGTCGGTTCAGGAACATAACATAAATATCTCTTGTACTTTAACAGTC
 AGTCCCATTTGTTTCATCAAACTTTGTGAACTTGAATTTAGGTGACTCTTACCCAACCTATGCTAA
 TACACCAGTTCTTCAGGTTATTACTCAAGGTCAAGGATAAACCAAACTGCCAAGTTCAGTTCCC
 AACAGGTAAGAAAACGTCTTCTGTAATAATTTACTCAAGAACCTACAAGTCACCTAGTCAGGCTGA
 CTCTCGTGAAGTAGCTAGCTATGGGAAAGATGATCCTTATACAGCGACTGAAAGTAATTACCAATA
 TCCATCTATGATTGTCAGCTCTGCTATTACTGGTTTGGTTTGGTTTGGTTCTTGCCTATGCTCTTGCCG
 TGCCACTTGGTTCAGCCATGGCTCGTTTCAAGAACACTTGGATTGATAGCCTCTCAACAGGGGCTTT
 GACCTTCTTGCTTGTCTTCCAACGATTGCCTTGGTTTACATCGTTTCGATTGATTGGATCATCTATTG
 CCCTTCCAGATTCATCCCTATCTTGGGAGCTGGAGATTGGCGTCTTACGTTTTACCAGCAGTCAT
 CCTTGGTTTGGTGGTGCTCCTGGTACAGCCATTTGGATTTCGTCGTTACATGATTGACTTGCAATCT
 CAAGACTTTGTTTCGTTTCGCTCGTGCAAAAGGTTTGTCTGAAAAAGAAATTTCAAACAAACACATC
 TTTAAAAATGCCATGGTTCGCTGGTTTCAGGAATTCCTGCTGCCATTATTGGGGTTATCGGTGGTG
 CAGCCCTTACTGAAACAGTCTTCGCCTCCCAGGTATGGGTAAAATGTTGATTGACTCTGTACAAG
 CATCTAATAACTCTATGGTCGTTGGTCTTGTCTTCATCTTACATGAATCCATCGTCTCACGTCTAT
 TGGGAGAAGTTTAGATGACTATTGATCACCCACCATGCAAATAAACGTACATGGCAGGCAAGGAA
 TGGATCCTATCTAAAAAACAAAAATT

Sammenstilling av *amiC* i IHH25 og villtype:

Mutasjon IHH12 er markert i rødt T → C

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1810 bits(980)	0.0	1011/1026(99%)	2/1026(0%)	Plus/Minus
Query 10	AATCCAAGAACCCTGAAAATCCAGACTTGAAACGCTACCTTCGTTTTGAAAATGATCCAG	69		
Sbjct 1057	AATCCAAG-ACCCTGAAAATCCAGACTTGAAACGCTACCTTCGTTTTGAAAATGATCCAG	999		
Query 70	CTATCGGATGGTCATTGGTCGGTTCAGGAACATAACATAAATATCTCTTGTACTTTAACA	129		
Sbjct 998	CTATCGGATGGTCATTGGTCGGTTCAGGAACATAACATAAATATCTCTTGTACTTTAACA	939		
Query 130	GTCAGTTCACATTTGTTTCATCAAACTTTGTGAACTTGAATTTAGGTGACTCTTACCCAA	189		
Sbjct 938	GTCAGTTCACATTTGTTTCATCAAACTTTGTGAACTTGAATTTAGGTGACTCTTACCCAA	879		
Query 190	CCTATGCTAATACACCAGTCTTTCAGGTTATTACTCAAGGTCAAGGATAACCAAACTG	249		
Sbjct 878	CCTATGCTAATACACCAGTCTTTCAGGTTATTACTCAAGGTCAAGGACAAACCAAACTG	819		
Query 250	CCCAAGTTCAGTTCCCAACAGGTAAGAAAACGCTCTTCTGTAAATATTTACTCAAGAACCT	309		
Sbjct 818	CCCAAGTTCAGTTCCCAACAGGTAAGAAAACGCTCTTCTGTAAATATTTACTCAAGAACCT	759		
Query 310	ACAAGTCACCTAGTCAGGCTGACTCTCGTGAAGTAGCTAGCTATGGGAAAGATGATCCTT	369		
Sbjct 758	ACAAGTCACCTAGTCAGGCTGACTCTCGTGAAGTAGCTAGCTATGGGAAAGATGATCCTT	699		

amiE i IHH26 (mutasjon 14)

>10DD72_37701826_37701826

CAAATGCCATTAAACATTGGGTAGTCAGATTACAGAAGTTATTGTAAAACACCAAGGGAAAAACA
 GCTAAAGAAGCGAAAGAATTGGCCATTGACTACATGAATAAGGTTGGCATTCCAGACGCAGATAG
 ACGTTTTAATGAATACCCATTCCAATATTCTGGAGGAATGCGTCAACGTATCGTTATTGCGATTGCC
 CTTGCCGACCTGATGTCTTGATCTGTGATGAGCCAACAACCTGCCTTGGATGTAACCTATTCAAG
 CTCAGATTATTGATTGGCTAAAATCTTTACAAAACGAGTATCATTTCACAACAATCTTTATTACCA

CGACCTTGGTGTGGTGGCAAGTATTGCGGATAAGGTAGCGGTTATGTATGCAGGAGAAATCGTTGA
 GTATGGAACGGTTGAGGAAGTCTTCTATGACCCTCGCCATCCATATACATGGAGTCTCTTGTCTAGC
 TTGCCTCAGCTTGCTGATGATAAAGGGGATCTTTACTCAATCCCAGGAACACCTCCGTCACCTTTATA
 CTGACCTGAAAGGGGATGCTTTTGCCTTGCCTTCTGACTACGCAATGCAGATTGACTTCGAACAAA
 AAGTCCTCAATTCTCAGTATCAGAGACACATTGAGCTAAAACCTGGCTTCTTCATGAGGATGCTC
 CAAAAGTAGAAAAACCAGCTGTGATTGCAAATCTCCATGATAAGATCCGTGAAAAAATGGGATTT
 GCCCATCTGGCTGACTAGGAGGAAGGAAATGTCTGAAAAATTAGTAGAAATCAAAGATTTAGAAA
 TTTCCTTCGGTGAAGGAAGTAAGAAGTTTGTGCGCGTTAAAAATGCTAACTTCTTTATCAACAAGG
 GAGAACTTTCTCGCTTGTAGGTGAGTCCGGTAGTGGGAAAACAACACTATTGGTCGTGCTATCATCG
 GTCTAAATGATACAAGTAATGGAGATATCATTTTTTGTATGGTCAAAAAATTAATGGGTAAGAAAAT
 CCCGGGGAACAAGCTGGGGAAATTGATTCCTCAAATCCCAGATGAATTTTCCAGAAACCCTGGCC
 CCAAAGTTTTGAAAGAAACGGGCGCAACGGTGTGATTTAAATTTTTTCCGGAAAGGTTTTTAAAA
 TCCCCCTTTTTTTTTAGGGGGGAAAAAAAACGCAAAGAGAAAAAGTTTTCAAAAATTTATCC
 GGGAAAAAAGGTTCTTTTGGGGGAAAAAAAACGCAACACTCCCCCCCCAAAAATTTCCGGGGGCAAA
 CAAAAAATAAAGTTTGGCCCGCCTTGGGGGACACCCACATATTTTTTTTTTAAGAAAAAAT
 TTTTTCTCGGGGGGGGTTTTTTGTGGGGGGGCGCGCCGTGTGGTGTTTTGTGAAAAAATAAAA
 AAAAAAGGGGGGGGGGGGTTTTCTTTCCCCCCCCGAGGGGGTGGGGGTGGGGTTTTTTTTTAAT
 AAAATAACAAAAATATTTATATGGGTGGGGGGGTGGGGGTGGGGCGGCCAAAAAAAATAGG
 GCCCC

Sammenstilling av amiE i IHH26 og villtype:

Mutasjon IHH14 er like etter det markerte området: A → G

```

Query 366 GTAGCGGTTATGTATGCAGGAGAAATCGTTGAGTATGGAACGGTTGAGGAAGTCTTCTAT 425
          |||
Sbjct 381 GTAGCGGTTATGTATGCAGGAGAAATCGTTGAGTATGGAACGGTTGAGGAAGTCTTCTAT 322

Query 426 GACCTCGCCATCCATATACATGGAGTCTCTTGTCTAGCTTGCCCTCAGCTTGCTGATGAT 485
          |||
Sbjct 321 GACCTCGCCATCCATATACATGGAGTCTCTTGTCTAGCTTGCCCTCAGCTTGCTGATGAT 262

Query 486 AAAGGGATCTTTACTCAATCCCAGGAACACCTCCGTCACTTTATACTGACCTGAAAGGG 545
          |||
Sbjct 261 AAAGGGATCTTTACTCAATCCCAGGAACACCTCCGTCACTTTATACTGACCTGAAAGGG 202

Query 546 GATGCTTTTGCCTTGCGTTCTGACTACGCAATGCAGATTGACTTCGAACAAAAAGCTCCT 605
          |||
Sbjct 201 GATGCTTTTGCCTTGCGTTCTGACTACGCAATGCAGATTGACTTCGAACAAAAAGCTCCT 142

Query 606 CAATTCAGTATCAGAGACACATTGAGCTAAAACCTGGCTTCTTCATGAGGATGCTCCA 665
          |||
Sbjct 141 CAATTCAGTATCAGAGACACATTGGCTAAAACCTGGCTTCTTCATGAGGATGCTCCA 82

Query 666 AAAGTAGAAAAACCAGCTGTGATTGCAAATCTCCATGATAAGATCCGTGAAAAAATGGGA 725
          |||
Sbjct 81 AAAGTAGAAAAACCAGCTGTGATTGCAAATCTCCATGATAAGATCCGTGAAAAAATGGGA 22

Query 726 TTTGCCCATCTGGCTGACTAG 746
          |||
Sbjct 21 TTTGCCCATCTGGCTGACTAG 1
  
```

amiEF i IHH27 (delesjon 16)

>10DD73_37701918_37701918

CCAAATGCCATTAACAATTGGGTAGTCAGATTACAGAAGTTATTGTA AACACCAAGGGAAAAA
 CAGCTAAAGAAGCGAAAGAATTGGCCATTGACTACATGAATAAGGTTGGCATTCCAGACGCAGAT
 AGACGTTTTAATGAATACCCATTCCAATATTCTGGAGGAATGCGTCAACGTATCGGTATTGCCCGT
 GCCTTGGTTCATGCAACCAGACTTTGTTATTGTCAGATGAGCCAATTTACGCTTGGACGTTTCTGTAC
 GTGCCAAGTCTTGAACCTTGCTCAAAAAATTTCAAAAAAGAGCTCGGCTTGACCAATCTCTCATCG
 CCCATGACTTGTCTGTTTGTCTGTTTATTTTCAGATCGTATCGCAGTTATTTACAAGGGTATTGTA
 GAGGTTGCAGAAACAGAAGAATTGTTAACAATCCAATTCACCCATATACTCAAGCCTTGCTTTCA
 GCGGTACCAATCCCAGATCCAATCTTGAACGTAAGAAGGTTTGAAGGTTTACGACCCAAGTCAA
 CACGACTATGAGACTGATAAGCCATCTATGGTAGAAATCCGTCCAGGTCATGTTTGGGCGAAC
 CAAGCCGAATTAGCACGTTATCAAAAAAGGGGAAAAAAA

Sammenstilling av *amiEF* i IHH27 og i villtype:

Det er en delesjon fra basepar 461 til 1493 som tilsvarer delesjon IHH16.

Range 1: 12 to 461 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
832 bits(450)	0.0	450/450(100%)	0/450(0%)	Plus/Minus
Query 173	CGTCAACGTATCGGTATTGCCCGTGCCTTGGTCATGCAACCAGACTTTGTTATTGCAGAT			232
Sbjct 461	CGTCAACGTATCGGTATTGCCCGTGCCTTGGTCATGCAACCAGACTTTGTTATTGCAGAT			402
Query 233	GAGCCAATTTTCAGCCTTGGACGTTTCTGTACGTGCCAAGTCTTGAACCTTGCTCAAAAA			292
Sbjct 401	GAGCCAATTTTCAGCCTTGGACGTTTCTGTACGTGCCAAGTCTTGAACCTTGCTCAAAAA			342
Query 293	TTCCAAAAAGAGCTCGGCCTTGACCTATCTCTTCATCGCCCATGACTTGTTCGGTTGTTTCGC			352
Sbjct 341	TTCCAAAAAGAGCTCGGCCTTGACCTATCTCTTCATCGCCCATGACTTGTTCGGTTGTTTCGC			282
Query 353	TTTATTTCAGATCGTATCGCAGTTATTTACAAGGGTGTATTGTAGAGGTTGCAGAAACA			412
Sbjct 281	TTTATTTCAGATCGTATCGCAGTTATTTACAAGGGTGTATTGTAGAGGTTGCAGAAACA			222
Query 413	GAAGAATTTGTTAACAATCCAATTCACCCATATACTCAAGCCTTGCTTTCAGCGGTACCA			472
Sbjct 221	GAAGAATTTGTTAACAATCCAATTCACCCATATACTCAAGCCTTGCTTTCAGCGGTACCA			162
Query 473	ATCCAGATCCAATCTTGGAACGTAAGAAGTCTTGAAGTTTACGACCCAAGTCAACAC			532
Sbjct 161	ATCCAGATCCAATCTTGGAACGTAAGAAGTCTTGAAGTTTACGACCCAAGTCAACAC			102
Query 533	GACTATGAGACTGATAAGCCATCTATGGTAGAAATCCGTCCAGTCACTATGTTGGGCG			592
Sbjct 101	GACTATGAGACTGATAAGCCATCTATGGTAGAAATCCGTCCAGTCACTATGTTGGGCG			42
Query 593	AACCAAGCCGAATTAGCACGTTATCaaaaa 622			
Sbjct 41	AACCAAGCCGAATTAGCACGTTATCAAAAA 12			

Range 2: 1493 to 1676 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

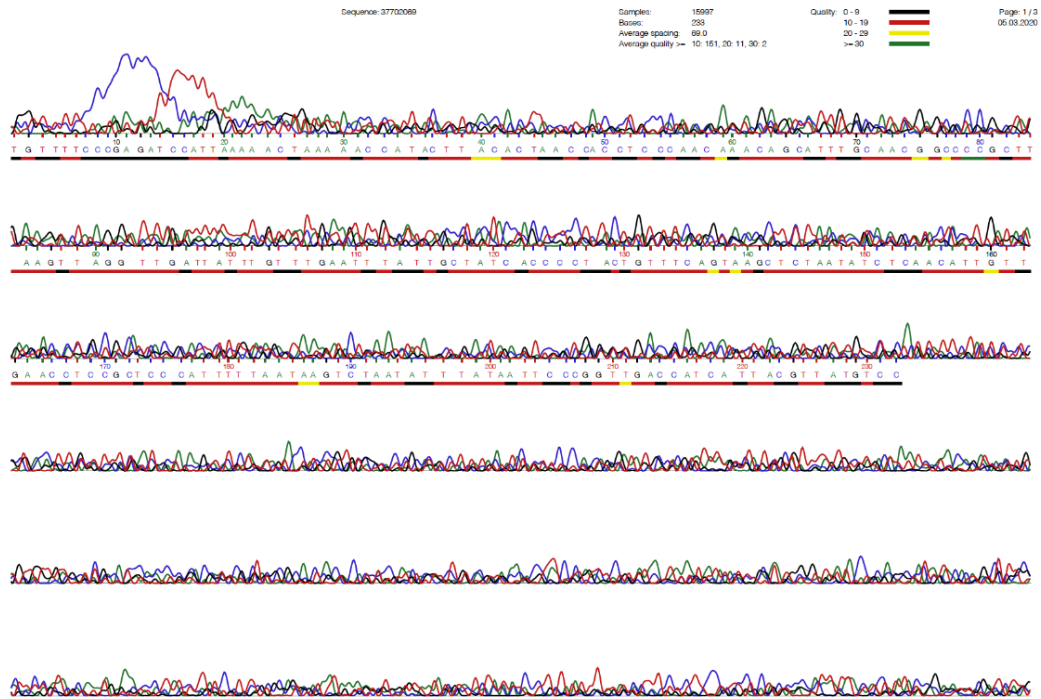
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
318 bits(172)	1e-90	182/186(98%)	3/186(1%)	Plus/Minus
Query 8	CCATT-AAACAATTTGGGTAGTCAGATTACAGAAGTTATTGTTAAACACCAAGGAAAAAC			66
Sbjct 1676	CCATTAAACAATTTGGGTAGTCAGATTACAGAAGTTATTGTTAAACACCAAGG-AAAAAC			1619
Query 67	AGCTAAAGAAGCGAAAGAATTGGCCATTGACTACATGAATAAGGTTGGCATTCCAGACGC			126
Sbjct 1618	AGCTAAAGAAGCGAAAGAATTGGCCATTGACTACATGAATAAGGTTGGCATTCCAGACGC			1559
Query 127	AGATAGACGTTTTAATGAATACCCATTCCAATATCTGGAGGAATGCGTCAACGTATCGG			186
Sbjct 1558	AGATAGACGTTTTAATGAATACCCATTCCAATATCTGGAGGAATGCGTCAACGTATCGT			1499
Query 187	TATTGC 192			
Sbjct 1498	TATTGC 1493			

amiF i IHH28 (mutasjon 18)

>10DD74_37702069_37702069

TGTTTTCCCGAGATCCATTA AAAA ACTAAAA ACCATACTTACACTAACCCACCTCCCAACAAACAGCA
 TTTGCAACGGCCCCGCTTAAGTTAGGTTGATTATTTGTTTGAATTTATTGCTATCACCCCTACTGTTT
 CAGTAAGCTCTAATATCTCAACATTGTTGAACCTCCGCTCCCATTTTTAATAAGTCTAATATTTATA
 ATTCCCGGTTGACCATCATTACGTTATGTCCA

Kromatogrammet viser en uren prøve, eller dårlig anealing av primer.



Ami-lokuset i IHH23 (D184A):

TGAACTATATTCAAAAAAATGAAAAATTTGTGCCAACAAGCCTAAATATTCTGAAAATTTGTTTGA
 TTTTAAATGGATAATGTGATATAATGGTTGTCAATCTATAATTCACATAAACAGAGGAGTAGAAAA
 TGAAAAAAAATCGTGTATTTGCTACAGCAGGCTTGTTTTATTAGCAGCAGGTGTACTTGCAGCAT
 GCAGTTCCTTCAAAATCATCTGATTTCCATCGCCCTAAAGCTTATGGCTATGTTTATACAGCAGCCC
 AGAAACCTTGACTACCTGATTTTCACGTAAAAATAGTACAACAGTAGTGACTTCAAATGGGATTGA
 TGGTTTATTACTAACGATAATTACGGTAATCTTGCTCCTGCAGTTGCAGAGGATTGGGAAGTCTCT
 AAGGATGGTTTGACCTACACTTATAAGATTCGTAAAGGGGTTAAATGGTTTACCTCTGATGGAGAA
 GAATATGCAGAGGTGACGGCTAAAGATTCGTGAACGGTTTAAAACACGCAGCAGATAAAAAATC
 AGAAGCTATGTATTTAGCTGAAAATTCGGTTAAAGGCTTGGCAGATTATCTATCAGGAACCTCAAC
 AGATTTTTCAACAGTTGGTGTCAAGGCGTTGATGATTATACGTTACAATACACTTTGAACCAGCCT
 GAACCGTTCTGGAACCTAAGTTGACCTATTCTATTTTCTGGCCTCTGAATGAAGAATTCGAAACAT
 CAAAAGGAAGCGATTTTGCTAAACCAACAGATCCGACATCCTTGCTTTATAATGGTCCATTCTTGTT
 GAAAGGGTTGACTGCAAATCTTCTGTAGAGTTTGTAAAAAATGAGCAATATTGGGATAAAGAAA
 ATGTCCACCTAGATACTATCAATCTAGCTTACTATGATGGATCAGATCAGGAGTCGCTAGAGCGTA
 ACTTCACTAGTGGAGCTTATAGTTATGCCCGTCTTTACCCTACCAGCTCCAATATTCTAAGGTTGC
 AGAAGAATACAAGGACAATATCTATTACACACAATCAGGCTCTGGGATTGCTGGTCTGGGTGTGAA
 TATTGATCGCCAAAGTTACAACATACTTCTAAAACACTACAGATTCAGAGAAAGTAGCTACTAAGAA
 GGCATTGCTTAACAAAGATTTCCGTCAAGCCTTGAATTTTGGCTCTTGATCGCTCAGCTTACTCAGCT
 CAAATCAATGGTAAAGATGGAGCAGCTTTAGCAGTTCGTAATTTATTTGTAAAACAGACTTTGTTT
 CAGCTGGTGAGAAGACCTTTGGTGATTTAGTCGCTGCTCAACTTCTGCTTATGGTGATGAGTGGA
 AAGGTGTGAATTTAGCTGATGGGCAGGATGGTTTATTCAATGCTGACAAGGCCAAGGCAGAGTTTG
 CGAAAGCTAAGAAAGCTTTAGAAGCAGACGGCGTTCAGTTTCTATTCTGACGTTCCAGTAG
 ACCAAGCATCAAAAAACTACATATCTCGTATTCAGTCCTTAAACAATCTGTAGAAACAGTTCTTG
 GTGTTGAAAATGTCGTTGTTGATTTCAACAAATGACAAGTGATGAATTCCTTAATATTACTTACTA
 TGCTGCCAATGCTTCATCTGAGGATTGGGATGTATCAGGAGGAGTTTCATGGGGGCCAGACTATCA
 AGACCCATCTACTTACCTGGATATTTTAAAAACAACACTAGCAGTGAACACTACAAAAACATATTTAGG
 ATTTGATAATCCAAATAGCCCTTCAGTAGTTCAAGTTGGTTTGAAGAATACGATAAAATAGTTGA
 TGAAGTGCCAAAGAGACAAGCGACTTGAATGTCCGTTATGAAAAATATGCAGCGGCTCAAGCAT
 GTTGACAGATAGTTCACTCTTTATTCTGTCTATGGCTTCTTCTGGTGCAGCACCAGTGCTTTCACG
 AATTGTTCCATTTACTGGAGCTTCTGCGCAAACAGGCTCTAAGGGGTCAGATGTTTACTTCAAATAT
 TTGAAATTACAAGATAAAGCGGTGACTAAGGAAGAGTATGAAAAAGCTCGTGAAAAATGGTTGAA
 AGAAAAAGCTGAATCAAATGAGAAAGCTCAAAAAGAATTGGCAAGTCATGTGAAGTAAATAATTT

CTAATAGAACTTTCTCTCCATGAGGAGAAGGTTCTTTTGGGATTTTTAAAGGAAATAATATGAAAA
AATATATTTTTATGCGTGTTCGCGGTCAATTGGTTTCGATTTTCTTAGTAACGACTTTGACCTACACG
ATTATCTATACCTTGGTTCCTCGAAAATTGATTTTCAAGCAGGATCCTAACTATAATAAAAATTGCGA
CAACGGCTGATAAACGTGATAACTATGAAAATACTGTGTTTGGAGCGTATGGGCTACATTGAGTATT
ACGATACTAAAGAGTTGCAAGAAAAGGCAAGTAGCATGGATTCTTCTGTAACAGTAGAAGCAAAT
GCGACCAATAAAGCTATTTATGAAAAGTACATCAATCAATTAGGTCATGGTTGGACTTTGGGAGAA
TTTACTGAAAGTGGTCAATTCTATGCTACTCGTGAAATTCCAATTTTTGAACGTGTTTTCACTTCTA
TGCTAACTTGATTGACATTGACCATACAAATAAAAATCCAAGACCCTGAAAATCCAGACTTGAAACG
CTACCTTCGTTTTGAAAATGATCCAGCTATCGGATGGTTCATTGGTTCGGTTCAGGAACATAACATAA
ATATCTCTTGTACTTTAACAGTCAGTTCCCATTTGTTTCATCAAAAATTTGTGAACTGAATTTAGGTG
ACTCTTACCCAACCTATGCTAATACACCAGTTCTTCAGGTTATTACTCAAGGTCAAGGACAAACCA
AAACTGCCCAAGTTCAGTTCCCAACAGGTAAGAAAACGTCTTCTGTAATAATTTACTCAAGAACCT
ACAAGTACCTAGTCAGGCTGACTCTCGTGAAGTAGCTAGCTATGGGAAAGATGATCCTTATACAG
CGACTGAAAAGTAATTACCAATATCCATCTATGATTGTCAAGTCTGCTATTACTGGTTGATTGGTT
GGTCTTGCCTATGCTCTTGCCGTGCCACTGGTTTCAGCCATGGCTCGTTTTCAAGAACACTGGATT
GATAGCCTCTCAACAGGGGCTTTGACCTTCTTGCTGCTCTTCCAACGATTGCCTTGGTTTACATCG
TTCGATTGATTGGATCATCTATTGCCCTTCCAGATTCAATCCCTATCTTGGGAGCTGGAGATTGGCG
TTCTTACGTTTTACCAGCAGTCATCCTTGGTTTGTGGGTGCTCCTGGTACAGCCATTTGGATTGCTC
GTTACATGATTGACTTGCAATCTCAAGACTTTGTTTCGTTTCGCTCGTGCAAAAAGGTTTGTCTGAAAA
AGAAATTTCAAACAAACACATCTTTAAAAATGCCATGGTTCGCTGGTTTCAGGAATTCCTGCTGC
CATTATTGGGGTTATCGGTGGTGCAACCCTTACTGAAACAGTCTTCGCCTTCCCAGGTATGGGTAA
AATGTTGATTGACTCTGTA AAAAGCATCTAATAACTCTATGGTCGTTGGTCTTGTCTTTCATCTTTACAT
GTATTTCTATCTTCTCACGTCTTTTGGGAGATATTTGGATGACTATTATTGACCCACGTATTA AATTG
ACTGAGAAAGGAGGCAAATAATGTCTACAATCGATAAAGAAAAATTTAGTTCGTTGTA AAAACGTGAC
GATTTTGCCTCTGAAACTATTGATGCGCCAGCATATTCTTACTGGAAATCAGTGTTTAAACAATTTA
TGAAGAAAAAATCAACTGTAGTCATGTTGGGAATCTTGGTAGCCATCATTTTGATAAGTTTCATCTA
CCCAATGTTTTCTAAGTTTGATTTCAATGATGTCAGCAAGGTA AACGACTTTAGTGTTCGTTATATC
AAGCCAAATGCGGAGCATTGGTTCGGTACTGACAGTAACGGTAAATCGCTCTTTGACGGTGTCTGG
TTCGGAGCTCGTAACTCCATCCTCATTTCTGTGATTGCGACAGTGATTA ACTTGGTTATCGGTGTTTT
TGTCGGTGGTATTTGGGGTATTTCAA AATCAGTTGACCGTGTGATGGAAGTTTACAACGTCATC
TCAAACATCCCACCTCTTTTGATTGTTATTGCTTGACTTACTCAATCGGAGCTGGATTCTGGAATC
TGATTTTTGCCATGAGCGTAACAACATGGATTGGTATTGCCTTCATGATCCGTGTGCAAATCTTGC
CTATCGTGACTTGGAAATACAACTTGGCGTACGTA CTTTGGGAACACCAACCTTGAAGATTGTTGC
CAAAAATATCATGCCTCAATTGGTATCTGTTATTGTGACAACCATGACTCAAATGCTTCCAAGCTTT
ATCTCATACGAAGCCTTCTGTCTTTCTTCGGTCTTGGATTACCGATTACAGTGCCAAGTTTGGGTC
GTTTGATTTGCGGATTATTCACAAAACGTAACAACCAATGCTTACTTGTCTGATTCCATTGACAAC
CCTGTCTTGGTATCCTTGTCCCTTTCTGAGTTGGTCAA AACTTAGCGGATGCTGATGCCAGT
ACACATAGATAGGAGTAGAAAATGACAAAAGAAAAAATGTAATTTTACTGCTCGCGATATTGTC
GTGGAATTTGACGTTTCGTGACAAAGTATTGACAGCCATTTCGCGGCGTTTTCCCTTGA ACTAGTCGAA
GGAGAAGTATTAGCCTTGGTAGGTGAGTCAGGATCAGGTA AATCTGTTTTGACAAAAGACCTTCA
GGTATGCTCGAAGAAAATGGTCTGATTGCCCAAGGTAGTATTGACTACCGTGGTTCAGGACTTGACA
GCTTTATCTTCTCACAAGGATTGGGAACAAATTCGTGGTGTGCTAAGATTGCGACTATCTTCCAGGAC
CCAATGACTAGTTTGGACCCCATTTAAAACAATTGGTAGTCAGATTACAGAAGTTATTGTAAAACAC
CAAGGAAAAACAGCTAAAGAAGCGAAAGAATTGGCCATTGACTACATGAATAAGGTTGGCATTCC
AGACGCAGATAGACGTTTTAATGAATACCCATTCCAATATTCTGGAGGAATGCGTCAACGTATCGT
TATTGCGATTGCCCTTGCCTGCCGACCTGATGTCTTGTGATCTGTGCTGAGCCAACA ACTGCCTTGGAT
GTA ACTATTCAAGCTCAGATTATTGATTTGCTAAAATCTTTACAAAACGAGTATCATTTACACAACA
TCTTTATTACCCACGACCTTGGTGTGGTGGCAAGTATTGCGGATAAGGTAGCGGTTATGTATGCAG
GAGAAATCGTTGAGTATGGAACGGTTGAGGAAGTCTTCTATGACCCTCGCCATCCATATACATGGA
GTCTCTTGTCTAGCTTGCCTCAGCTTGTGATGATAAAGGGGATCTTTACTCAATCCCAGGAACACC
TCCGTCACCTTTATACTGACCTGAAAGGGGATGCTTTTGCCTTGCCTTCTGACTACGCAATGCAGATT
GACTTCGAACAAAAGCTCCTCAATTCTCAGTATCAGAGACACATTGGGCTAAA ACTTGGCTTCTTC
ATGAGGATGCTCCAAAAGTAGAAAAACCAGCTGTGATTGCAAATCTCCATGATAAGATCCGTGAA
AAAATGGGATTTGCCCATCTGGCTGACTAGGAGGAAGGAAATGTCTGAAAAATTAGTAGAAATCA
AAGATTTAGAAATTTCTTCGGTGAAGGAAGTAAGAAGTTTGTGCGGTTAAAAATGCTAACTTCT
TTATCAACAAGGGAGAAACTTTCTCGCTTGTAGGTGAGTCCGGTAGTGGGAAAACA ACTATTGGTC
GTGCTATCATCGGTCTAAATGATACAAGTAATGGAGATATCATTTTTGATGGTCAA AAGATTAATG
GTAAGAAATCGCGTGAACAAGCTGCGGAATTGATTCGTGCAATCCAGATGATTTTCCAAGACCCTG
CCGCAAGTTTGAATGAACGTGCGACTGTTGATTATATTATTCTGAAGGTCTTTACAATCACCGTTT
ATTTAAGGATGAAGAAGAACGTA AAGAGAAAGTTCAAAGTATTATCCGTGAAGTAGGTCTTCTTGC

TGAGCACTTGACTCGTTACCCTCATGAATTCTCAGGCGGTCAACGTCAACGTATCGGTATTGCCCGT
GCCTTGGTCATGCAACCAGACTTTGTTATTGCAGATGAGCCAATTTAGCCTTGGACGTTTCTGTAC
GTGCCAAGTCTTGAACCTGCTCAAAAAATTCCAAAAAGAGCTCGGCTTGACCTATCTCTTCATCG
CCATGACTTGTCGGTTGTTGCTTTATTTAGATCGTATCGCAGTATTTACAAGGGTGTATTGTA
GAGTTGCAGAAACAGAAGAATTGTTAACAATCCAATTCACCCATATACTCAAGCCTTGCTTTCA
GCGGTACCAATCCCAGATCCAATCTTGAACGTAAGAAGGTCTTGAAGGTTTACGACCCAAGTCAA
CACGACTATGAGACTGATAAGCCATCTATGGTAGAAAATCCGTCCAGGTCCTATGTTTGGGCGAAC
CAAGCCGAATTAGCACGTTATCAAAAAGGACTAAACTAATAATGGTTTTATAATTTCCATGTCAAT
TTTTATGGGAATTAGGCTCTTTGTCAACTGTAGTGGGTTGAAGTCAGCTAAGCTCGAGAAAGGACA
AATTCGTCCTTTCTTTTTGATGTTCAAAGCGATAAAAAATCCGTTTTTTGAAGTTTTCAAAGTTCCG
AAAACCAAAGGCATTGCGCTTGATAAGTTTGTAGATTATTGGTCGCTTCCAATTTGGCGTTTGA
ATAGGGTAGTTGAAGGGCGTTGACGATTTCTCTTTGTTTCTTAGAAAGGTTTTAAGGAGAGTCTGA
TAAAGAGGATGAACCTGCTTGAGATTGTCTCAGGATCCGAAGAATTTCTCCGGTTCCTTATTCT
GATCTCGTCACAGTGGGCAGCTGTTATAGCTTATTGTGATGTTTACGCTTTCAGAATCATTGGGAG
CTAGCTCTCCAAAACTTTTGGGTTTCAAGTGTGTTTTAACTTTTATACTAAAACTCTGAAGTTGCTTTT

Deler av sammenstillingen mellom ami-locuset i IHH23 (D184A) og villtype:

Sammentillingen hadde 99% identitet. Punktmutasjonen i Walker motiv B er like etter det markerte området. GAT → GCT.

Query	2101	ACCTGATGTCTT	GATCTGTG	GATGAGCCAACA	ACTGCCTTGGATGTA	ACTATTCAAGCTCA	2160
Sbjct	5139	ACCTGATGTCTT	GATCTGTG	CTGAGCCAACA	ACTGCCTTGGATGTA	ACTATTCAAGCTCA	5198



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway