



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2022 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Morten Kjos

Funksjonelle studier av SmdA: et nytt protein involvert i celledeling og varmetoleranse i *Staphylococcus aureus*

Functional studies of SmdA: a novel protein
involved in cell division and heat tolerance in
Staphylococcus aureus

Tiril Mathiesen Knutsen

Bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven er gjennomført som en del av masterstudiet i bioteknologi ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet. Arbeidet er utført i molekylær mikrobiologisk forskningsgruppe ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap i perioden august 2021 til mai 2022. Dette videre studiet av SmdA har basert seg på avhandlingen «Functional insights into novel factors affecting cell division in Gram-positive bacteria» Myrbråten (2021).

Jeg ønsker først og fremst å rette en stor takk til min hovedveileder, Dr. Morten Kjos, for alt du har lært meg i alle trinn av laboratoriearbeidet og skriveprosessen. Dine faglige innspill og ideer har gjort oppgaven svært lærerik. Ikke minst ønsker jeg å takke for at du alltid har vært tilgjengelig under arbeidet for spørsmål og veiledning. Jeg ønsker også å rette en takk til min biveileder, Dr. Daniel Straume, for all oppfølging og praktisk hjelp i laboratoriet.

Jeg ønsker også å takke alle i laboratorieguppen for både det faglige og sosiale gjennom året. Det har vært inspirerende å være en del av et så kunnskapsrikt miljø! Spesielt ønsker jeg å takke Dr. Ine Storaker Myrbråten for den gode innføringen i oppstarten, og alt du har bidratt med underveis. Det har vært utrolig spennende å fortsette på arbeidet ditt med SmdA. En ekstra takk til Zhian Salehian for all veiledning og støtte under forsøk, og at du alltid har svart på spørsmål gjennom året. Du har virkelig lært meg hvordan man jobber nøye, men effektivt på lab! En stor takk til alle masterstudentene (Rebekka, Jennie, Vilde, Anne og Ingrid) for å gjøre hver dag gøy. Dette året hadde ikke blitt det samme uten dere!

Helt til sist ønsker jeg å rette den største takk til familie og venner for støtte gjennom mine seks år her i Ås! Takk til mamma, pappa og Vetle for at dere alltid er der, og stiller opp når det trengs.

Tiril Mathiesen Knutsen

Ås, mai 2022

Sammendrag

Staphylococcus aureus er et av de viktigste patogenene å studere i sammenheng med infeksjonssykdommer i samfunnet, da det de seneste årene er observert en betydelig økning av resistente stammer mot antibiotika. For å kunne utvikle nye samt forbedre eksisterende behandlingsmetoder mot *S. aureus*, er det helt nødvendig å få en større forståelse for essensielle cellulære mekanismer i arten. Celledeling kreves for overlevelse i *S. aureus*, og både proteinene og mekanismene involvert er derfor potensielle nye angrepspunkt for antibiotika. SmdA («staphylococcal morphology determinant A») er et membranprotein i *S. aureus* som ble identifisert blant konserverte stafylokokkproteiner med ukjent funksjon. Et tidligere studie av SmdA har vist at det er essensielt for rett utført celledeling og morfologi i *S. aureus*, og at SmdA depleksjon fører til økt sensitivitet mot celleveggangripende antibiotika.

I dette arbeidet ble proteinstrukturen og funksjonen til SmdA nærmere studert for å få en større forståelse for hvordan proteinet er involvert i, eller påvirker, de ulike stegene under cellesyklus og deling. Selv om det i dette arbeidet ikke var mulig å bekrefte den predikerte membrantopologien til SmdA, ble det likevel vist at membranlokaliseringen samt det predikerte NERD-domenet og C-terminus er viktig for proteinfunksjon. Det ble innledningsvis observert at et nedregulert uttrykk av SmdA resulterer i celler med defekt cellemorfologi, forårsaket av flere aktive punkter med peptidoglykantsyntese og dermed flere dannede septa. Sammenlignet viste et overuttrykk av SmdA tilsvarende defekter, men cellene ble observert med en lavere frekvens. Samtidig ble det også vist at det nedregulerte uttrykket av SmdA påvirker lokaliseringen av celledelingsproteinene EzrA, og dermed også den videre koordineringen av divisomet. Resultatene i dette arbeidet indikerer i tillegg at SmdA har en bredere rolle tilknyttet termosensitivitet og stresstoleranse. Vekstanalyser viste at *S. aureus* verken kan vokse ved høyere temperaturer eller inducere termotoleranse uten SmdA. Målt mengde proteinaggregater i celler uten SmdA indikerer også at fraværet av proteinet fører til mindre aggregatdannelse, mulig som følge av det oppregulerte uttrykket av Clp-proteiner med chaperon-aktivitet vist i en RNA-sekvensering. SmdA ble også bekreftet å ha en sammenheng med *ica*-operonet, da SmdA depleksjon fører til et nedregulert uttrykk av *ica* og signifikant mindre biofilmdannelse i *S. aureus*. Et av de store spørsmålene etter arbeidet er likevel hvorfor termostabiliteten reduseres ved økt temperatur uten SmdA, selv om mengden proteinaggregater samtidig reduseres og ekspresjonen av Clp-proteinene øker.

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogens to study in conjunction with infectious diseases in the community due to the increased observations of resistant strains against antibiotics. To develop new as well as improving existing treatment methods against *S. aureus*, it's necessary to obtain a deeper knowledge of essential cellular mechanisms in the species. Cell division is required for *S. aureus* viability, and both proteins and mechanisms involved could be new potential targets for antibiotics. SmdA («staphylococcal morphology determinant A») is a membrane protein identified among conserved staphylococcal proteins with unknown function. A previous study of this protein has demonstrated that SmdA is essential for proper cell division and morphology in *S. aureus*, and that a depletion results in increased sensitivity against cell wall targeting antibiotics.

In this work both protein structure and function of SmdA was studied to get a deeper insight into how the protein is involved, or affects, the different steps in the cell cycle and division. Even though we were not able to confirm the predicted membrane topology of SmdA, we were still able to show that the membrane localization as well as the predicted NERD domain and C-terminal part is important for protein function. It was initially observed that a downregulated expression of SmdA resulted in cells with morphological defects caused by several active sites with peptidoglycan synthesis thus multiple septa. Overexpression of SmdA led to similar defects, although the cells were observed with a lower frequency. At the same time a downregulated expression of SmdA was shown to affect the localization of the cell division protein EzrA, and as a result the further coordination of the divisome. The results obtained in this work also indicate that SmdA has a larger role related to thermosensitivity and stress tolerance. Growth analysis shows that *S. aureus* are not able to grow at higher temperatures nor induce thermotolerance without SmdA. The measured quantity of protein aggregates in cells without SmdA indicates that the absence of this proteins leads to less aggregates, possibly because of the upregulated expression of Clp-proteins with chaperon activity shown in an RNA sequencing. This work also confirmed a functional link between SmdA and the *ica*-operon where SmdA depletion leads to downregulation of *ica* and significant decreased biofilm formation in *S. aureus*. One of the big questions after this work is why the thermostability is reduced with increased temperature without SmdA even though the quantity of protein aggregates is reduced and the expression of Clp proteins increases.

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> – en opportunistisk patogen bakterie	1
1.1.1 Overflatemolekyler og biofilm er viktige virulensfaktorer hos <i>S. aureus</i>	2
1.1.2 Antibiotikaresistens hos <i>S. aureus</i>	4
1.2 Oppbygningen av <i>S. aureus</i> celler	5
1.2.1 Biosyntese av peptidoglykan	6
1.3 Cellesyklus i <i>S. aureus</i>	8
1.3.1 Kromosomreplikasjon og segregering	9
1.3.2 Cytokinese.....	10
1.3.3 Faktorer som påvirker celledeling og morfologi	12
1.4. Stresstoleranse i <i>S. aureus</i>	12
1.4.1 Regulering av stresstolerant fenotype og varmesjokk-respons.....	12
1.4.2 Clp-proteiner	14
1.5 Genetisk manipulering av genekspressjon ved introduksjon av CRISPR interferens (CRISPRi) i <i>S. aureus</i>	15
1.6 Bakgrunn og formål med studiet	17
1.6.1 SmdA er et nytt protein viktig for celledeling i <i>S. aureus</i>	17
1.6.2 Formålet med oppgaven.....	18
2. Materialer.....	19
2.1 Stammer og plasmid	19
2.2 Antibiotika	20
2.3 Primere.....	20
2.4 Enzymer.....	21
2.5 Kjemikalier	21
2.6 Oppskrift på vekstmedier.....	21
2.7 Buffere og løsninger	22
2.7.1 Oppskrift på buffere til PCR	22
2.7.2 Oppskrift på buffere og løsninger til agarose gelelektroforese.....	22
2.7.3 Løsninger og buffere for SDS-PAGE, farging av gel og Western blotting	23
2.7.4 Løsninger for proteinase K beskyttelsesanalyse	23
2.7.5 Løsninger og buffere til preparering av kompetente celler.....	24
2.7.6 Oppskrift på løsninger og buffere benyttet under mikroskopering.....	24
2.7.7 Oppskrift på løsninger for krystallfiolett biofilmanalyse.....	24
2.7.8 Oppskrift på buffere til kvantifikasjon av proteinaggregater ved SmdA depleksjon	24

2.8 Instrumenter, ferdige kit og annet bruksutstyr.....	25
3. Metode	26
3.1 Dyrking og oppbevaring av <i>S. aureus</i> og <i>E. coli</i>	26
3.1.1 Optisk tetthet (OD)	26
3.1.2 Predyrking og dyrking av <i>S. aureus</i> stammer til eksponentiell vekst.....	26
3.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR)	27
3.2.1 Generelt om metoden	27
3.2.2 Koloni-PCR.....	29
3.3 Agarose gelelektroforese	30
3.3.1 Ekstrahering av DNA fra agarosegel	30
3.4 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	31
3.4.1 Western blotting.....	32
3.4.2 Visualisering av separerte proteiner i SDS-PAGE med Coomassie blue farging....	33
3.5 Isolering og rensing av plasmid DNA	34
3.6 Konstruksjon av plasmid ved restriksjonskutting og ligering	35
3.6.1 Restriksjonskutting og ligering	35
3.6.2 Konstruksjon av pIMAY- <i>smdA</i> :: <i>spc</i>	36
3.7 Transformasjon av <i>E. coli</i>	37
3.7.1 Kalsiumklorid-behandling for tillaging av kjemisk kompetente <i>E. coli</i> celler	37
3.7.2 Varmesjokktransformasjon	37
3.8 Transformasjon i <i>S. aureus</i>	37
3.8.1 Tillaging elektrokompetente celler av <i>S. aureus</i>	38
3.8.2 Elektroporering	38
3.8.3 Genetisk modifisering av <i>S. aureus</i> ved bruk av pIMAY vektor	38
3.9 Bakterielle vekstanalyser	39
3.9.1 Bakteriell vekstanalyse (optisk tetthet)	39
3.9.2 Bakteriell vekstanalyse (spotting).....	40
3.9.2.1 Temperaturpåvirkning på vekst ved overuttrykk og deplesjon av <i>SmdA</i>	40
3.9.2.2 Indusering av termotoleranse ved <i>SmdA</i> deplesjon.....	40
3.10 Proteinase K beskyttelsesanalyse for verifikasjon av <i>SmdA</i> membranorientering	41
3.11 Kvantifikasjon av proteinaggregater ved <i>SmdA</i> deplesjon	42
3.12 Krystallfiolettanalyse for kvantifisering av biofilmdannelse	43
3.13 Mikroskopi.....	44
3.13.1 Fasekontrast- og fluorescensmikroskopering.....	44

3.13.1.1 Markering av peptidoglykan-biosyntese og nyinnsatt cellevegg under celledeling	44
3.13.1.2 Green fluorescent protein (GFP)-markering av proteiner	45
3.13.2 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM).....	46
3.14 DNA sekvensering.....	46
4. Resultater	47
4.1 SmdA ^{ned} påvirker celledeling og fører til store endringer i cellemorfologi i <i>S. aureus</i> .	47
4.2 SmdA ^{ned} påvirker lokaliseringen av delingsproteinene EzrA og videre koordinering av divisomet	49
4.3 SmdA ^{opp} påvirker celleveggsyntese, men ikke vekst i <i>S. aureus</i> NCTC8325-4	50
4.4 Studier av membrantopologi til SmdA	52
4.5 Membranlokaliseringen av SmdA er viktig for proteinets funksjon i <i>S. aureus</i> NCTC8325-4	54
4.6 Det predikerte NERD-domenet og C-terminus er essensielt for funksjonen til SmdA..	56
4.7 SmdA er et essensielt protein under vekst ved høye temperaturer og ved induksjon av termotoleranse i <i>S. aureus</i>	61
4.8 SmdA påvirker dannelsen av proteinaggregater i <i>S. aureus</i>	63
4.9 SmdA ^{ned} har en signifikant påvirkning på biofilmdannelse i <i>S. aureus</i> NCTC8325-4 ..	64
5. Diskusjon	66
5.1 Et nedregulert uttrykk av SmdA påvirker celledeling og lokalisering av EzrA.....	67
5.2 Membranlokalisering i tillegg til det predikerte NERD-domene og C-terminus er viktig for SmdA sin funksjon.....	69
5.3 SmdA er essensiell for termosensitivitet og induksjon av termotoleranse i <i>S. aureus</i> ..	71
5.4 <i>S. aureus</i> NCTC8325-4 danner mindre biofilm uten SmdA til stede.....	73
6. Konklusjon og videre arbeid	75
Referanser	77
Appendiks.....	83

1. Introduksjon

1.1 *Staphylococcus aureus* – en opportunistisk patogen bakterie

Staphylococcus aureus er en Gram-positiv opportunistisk bakterie som er en av de viktigste årsakene til infeksjonssykdommer i samfunnet (Kumar et al., 2020). Disse infeksjonene kan variere mellom alt fra milde hudinfeksjoner til mer alvorlige tilstander som sepsis og endokarditt (Oliveira et al., 2018). *S. aureus* refereres ofte til som gul stafylokokk på grunn av de pigmenterte gulfargede koloniene (Kumar et al., 2020). Kirurgen Alexander Ogston beskrev *S. aureus* allerede i 1880 i sammenheng med blodforgiftning og bylldannelse (Lowy, 1998). Han studerte verk som følge av infeksjon i en byll og observerte celler som dannet drueklaser. Med utgangspunkt i disse observasjonene, fikk arten navnet *Staphylococcus* fra ordene *Staphyle* og *kokkos* som er gresk, og stammer fra beskrivelsen om «drueklaser» og «bær» (Ogston, 1881; Ogston, 1882).

S. aureus er en del av normal mikrobiota på hud og slimhinner hos mennesker, men kan også kolonisere dypere vev. Arten koloniserer rundt 20% av den voksne populasjonen permanent, mens hos yngre barn er prosentandelen som har nasalkolonisering vesentlig høyere (Balasubramanian et al., 2017; Kumar et al., 2020). Om lag 60% av befolkningen er periodevis bærere, og de fleste vil være kolonisert av *S. aureus* på et tidspunkt i løpet av livet. Selv om kolonisering gir økt sjans for infeksjonsdannelse, vil de fleste tilfeller av *S. aureus* kolonisering ikke resultere i infeksjon (Johannessen et al., 2012; Lowy, 1998). *S. aureus* kan også skape infeksjoner forårsaket av kolonisering på abiotiske gjenstander til medisinsk bruk, som for eksempel implantater og utstyr for kirurgiske inngrep (Kumar et al., 2020). *S. aureus* koloniserer også dyr, og er blant annet den største årsaken til jurbetennelsen mastitt hos melkekyr (Côté-Gravel & Malouin, 2019).

Infeksjonsdannelsen forårsaket av *S. aureus* kan beskrives gjennom tre hovedtrinn. Først vil bakterien feste seg til vertsceller, deretter trengte inn i verten, før den videre forsøker å unngå vertens immunforsvar (Middleton, 2008). Som et utgangspunkt for infeksjonsdannelse, må *S. aureus* først feste seg til vertsceller. Dette skjer via uttrykte overflatemolekyler. *S. aureus* kan videre invadere igjennom huden eller slimhinner, typisk via et eksponert åpent sår, eller via medisinsk utstyr (Middleton, 2008). Slik får bakterien tilgang til ytterligere vev eller blodbanen (Lowy, 1998). Under en etablert infeksjon vil *S. aureus* sirkulere med blodbanen, og dermed kunne nå vitale organer og dypere vev som bein, hjerte og mage-tarm kanalen (Balasubramanian et al., 2017; Kumar et al., 2020; Kwiecinski & Horswill, 2020). Dette kan

1. Introduksjon

føre til medisinske tilstander som lungebetennelse, kronisk osteomyelitt og endokarditt (Kumar et al., 2020). Ved en begynnende infeksjonsdannelse forårsaket av *S. aureus*, vil vertens immunforsvar aktivere en inflammasjonsrespons (Kumar et al., 2020). Her rekrutteres immunceller, primært nøytrofiler, for å eliminere invaderende *S. aureus* (Middleton, 2008). Immunresponsen i verten er stressende for bakteriecellen og potensielt dødelig. Derfor må bakterien ha strategier for å unngå inflammasjonen og sikre egen overlevelse. En av egenskapene som gjør det mulig for *S. aureus* å unngå immunforsvaret er en ekstracellulær polysakkarid-kapsel som gjør bakteriecellene ugjenkjennelige for fagocytose av vertens immunceller (Middleton, 2008). Gjennom de ulike trinnene av infeksjonsdannelsen vil et varierende uttrykk av virulensfaktorer være viktig for å tolerere stress og det harde miljøet, som oppstår som en følge av inflammasjonsresponsen (Kumar et al., 2020). I tillegg er *S. aureus* helt avhengig av å tilpasse seg vertens forhold med hensyn på faktorer som temperatur, pH og tilgang på oksygen for å dekke egne metabolske og fysiologiske behov (Willey et al., 2017).

1.1.1 Overflatemolekyler og biofilm er viktige virulensfaktorer hos *S. aureus*

En av de viktigste egenskapene til *S. aureus* som patogen, er evnen til å endre og tilpasse livsstilen ut ifra om den lever kommensalt eller invaderende i en vert (Balasubramanian et al., 2017; Kumar et al., 2020). Ved å detektere signaler fra verten og miljøet den befinner seg i, kan *S. aureus* regulere genuttrykket av virulensfaktorer (Balasubramanian et al., 2017). Virulensfaktorer gir økt grad av tilpasningsdyktighet ved at de bidrar til kolonisering, spredning av infeksjonen og skade under invasjon i verten. *S. aureus* sin evne til å skape vellykkede infeksjoner er derfor i stor grad knyttet til disse (Kumar et al., 2020; Oliveira et al., 2018). Typiske eksempler på virulensfaktorer hos *S. aureus* er overflateproteiner, sekrete toksiner samt dannelsen av biofilm.

Overflateproteiner er gjennom kovalente bindinger bundet til peptidoglykanlaget i celleveggen (**Seksjon 1.2**), og refereres derfor til som cellevegg-bundne proteiner (Kumar et al., 2020). Denne typen proteiner uttrykt i *S. aureus* klassifiseres inn i fire grupper, hvor den best karakteriserte gruppen går under forkortelsen MSCRAMM («microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule») (Kumar et al., 2020). Proteinene er viktige for å feste bakterieceller til vertens slimhinner og hudvev, ved å binde ekstracellulær matriks hos vertsceller gjennom komponenter som kollagen og fibrinogen (Kumar et al., 2020). MSCRAMM er også viktige overflateproteiner for festing av celler under etablering av biofilm (Johannessen et al., 2012). Toksiner produsert av *S. aureus* er giftige substanser som kan skape sykdom i verten, som eksempelvis toksisk sjokksyndrom (Middleton, 2008). De har egenskaper

1. Introduksjon

som gjør det mulig å svekke samt manipulere vertens immunforsvar ved nedbrytning av celler (Kumar et al., 2020; Oliveira et al., 2018). Dette gjør det lettere for *S. aureus* å trenge gjennom vev i verten, og det er vist at toksiner har en viktig rolle under biofilmdannelse (Oliveira et al., 2018).

Biofilm er multicellulære aggregater av bakterieceller som lever i en beskyttende barriere (Moormeier & Bayles, 2017). Under naturlig vekst danner bakterier celleaggregater på overflater fremfor å vokse planktonisk som enkeltceller med fri bevegelse. Dette skyldes blant annet at det naturlige miljøet ofte er næringsfattig sammenlignet med vekstforholdene i laboratoriet (Berlanga & Guerrero, 2016; Moormeier & Bayles, 2017). Den omsluttende barrieren rundt mikroorganismene kalles ekstracellulær matriks, og består av ekstracellulære polymersubstanser bakteriene produserer selv, som proteiner, karbohydrater og eventuelt ekstracellulært DNA (eDNA) (Flemming & Wingender, 2010; Moormeier & Bayles, 2017). Sammensetningen og strukturen i matriksen kan variere ut ifra hvilke mikroorganismer som lever der (Flemming & Wingender, 2010). I *S. aureus* er det minst to forskjellige mekanismer som styrer sammensetningen i matriksen, der den ene synteseveien danner ekstracellulære polysakkarider, mens den andre mekanismen er protein-mediert (Lauderdale et al., 2009; O'Gara, 2007). Av ekstracellulære polysakkarider er det molekylet PIA («polysaccharide intercellular adhesin»), også kjent som PNAG, som finnes i stafylokokker og kodes for av *ica*-operonet (Nguyen et al., 2020). Selv om de fleste stammer av *S. aureus* har *ica*-genene, er det likevel ikke alle som benytter synteseveien for dannelse av polysakkarider under biofilmdannelse (Nguyen et al., 2020). Matriksen som barriere gir en rekke fordeler for cellene som å forhindre uttørking, beskyttelse mot enkelte typer antibiotika ved å hindre diffusjon og beskyttelse mot vertens immunsystem (Berlanga & Guerrero, 2016; Moormeier & Bayles, 2017). En annen viktig egenskap med matriksen er å holde cellene nær hverandre. Den korte avstanden mellom cellene fasiliterer interaksjoner og kommunikasjon mellom celler, som igjen er viktig for fysiologiske prosesser (Flemming & Wingender, 2010). I tillegg vil matriksen være viktig for feste til overflater. Biofilm kan dannes både på syntetiske abiotiske overflater som glass og metall, men også organiske som hud og slimhinner (Berlanga & Guerrero, 2016).

Selv om biofilmdannelse skjer kontinuerlig, beskrives utviklingen ofte gjennom en standardmodell med tre hovedtrinn (Berlanga & Guerrero, 2016). I *S. aureus* er det i tillegg til de tre hovedtrinnene blitt beskrevet ytterligere to trinn. Biofilmdannelsen i *S. aureus* kan derfor beskrives gjennom en femtrinnsmodell: feste til en overflate, multiplisering, utvandring, modning og spredning (Moormeier et al., 2014). I første trinn vil frie enkeltceller feste seg på

1. Introduksjon

overflater (Moormeier et al., 2014). MSCRAMM, blant de cellevegg-bundne proteinene, vil være viktig for feste på biotiske overflater, mens elektrostatiske og hydrofobiske interaksjoner vil være viktig på abiotiske overflater (Moormeier & Bayles, 2017). Under multiplisering i andre trinn vil det produseres ekstracellulære substanser, som bidrar til celleinteraksjoner for å skape en stabil biofilm. Utvandring under tredje trinn fører til en omstrukturering av biofilmen, hvor det dannes mikrokolonier med en tredimensjonalstruktur. I det fjerde trinnet modnes biofilmen gjennom rask celledeling, og store deler av den ekstracellulære matriksen dannes. I siste trinn fasiliteres spredning av enkeltceller eller større aggregater fra biofilmen, og danner utgangspunkt for etablering av biofilm eller infeksjoner i nye områder (Moormeier & Bayles, 2017).

Bakterier i en biofilm sammenlignet med planktoniske celler er 100 til 1000 ganger mer motstandsdyktig mot antimikrobielle midler som antibiotika og desinfeksjonsmidler (Olsen, 2015). Dette gjør det vanskelig å fjerne biofilm, og resulterer i infeksjoner som er vedvarende og tilbakevendende (Kumar et al., 2020). *S. aureus* er den største årsaken til infeksjoner forårsaket av biofilm dannet på medisinsk utstyr (Kumar et al., 2020). Klinisk er biofilm truende ved etablering på eksempelvis implantater og i urinveien, og kan skape ytterligere komplikasjoner ved allerede etablert sykdom som cystisk fibrose (Berlanga & Guerrero, 2016; Olsen, 2015). Som følge av dette er det et stort behov for å forstå mekanismene bak etablering og utvikling av biofilm, slik at det kan utvikles nye behandlingsmetoder for kliniske infeksjoner relatert til biofilmdannelse av *S. aureus* både i mennesker og dyr.

1.1.2 Antibiotikaresistens hos *S. aureus*

Antibiotika som legemiddel har på verdensbasis hatt stor betydning for folkehelsen, og har revolusjonert måten vi kan behandle og forhindre bakterielle infeksjoner. De seneste årene er det observert en rask utvikling av resistens mot legemiddelet, som i stor grad skyldes feil bruk og overforbruk både klinisk på sykehus og ellers i samfunnet (Blair et al., 2015; Kumar et al., 2020). Det er blant annet vist at dersom bakterier gjentatt eksponeres for antibiotika som ikke resulterer i et letalt utfall, kan dette bidra til utviklingen av resistens (Andersson & Hughes, 2014). I tillegg har bakterier egenskaper som gjør de motstandsdyktige mot antibiotika, og de kan spre resistensgener mellom seg. Dette skaper en stor utfordring i samfunnet, da dette begrenser tilgjengelige behandlingsmetoder. Infeksjoner forårsaket av resistente bakterier blir dermed vanskelig eller umulig å stanse, som igjen kan føre til ytterligere komplikasjoner som økte sykehusinnleggelseser samt dødelig og påfølgende samfunnskostnader (Kumar et al., 2020). World Health Organization anslår at antibiotikaresistens vil være en av de største globale

1. Introduksjon

truslene i årene som kommer (WHO, 2021). Som en følge av resistensutviklingen, samtidig som at det utvikles for få nye typer antibiotika (Blair et al., 2015), er det nå helt nødvendig å få en større forståelse for hvordan bakterier utvikler resistens.

S. aureus er viktig å studere i sammenheng med antibiotikaresistens, da patogenet har en enestående evne til å raskt utvikle egenskaper som gjør den motstandsdyktig. I tillegg har bakterien sammen med en rekke andre arter, gener som gjør den naturlig resistent (Blair et al., 2015). Penicillin ble tidligere benyttet som standard behandlingsmetode på 1940-tallet for å kontrollere infeksjoner forårsaket av *S. aureus*, men allerede i 1942 ble det identifisert resistente stammer, og i 1960 ble det vist at inntil 80% av isolerte stammer hadde utviklet resistens (Kumar et al., 2020). Meticillin ble utviklet mot penicillin-resistente stammer, men på 1960-tallet ble det identifisert meticillin-resistente *S. aureus* (MRSA) (Davies & Davies, 2010; Jevons et al., 1963). MRSA er resistent mot alle typer celleveggangripende antibiotika, kjent som β -laktamer. Årsaken er at stammene har genet *mecA* som koder for PBP2a, som har lav affinitet for β -laktamer (Sauvage et al., 2008; Vestergaard et al., 2019). Spesielt er horisontal genoverføring trukket frem som en av mekanismene viktig for utviklingen av resistens mot β -laktamer i *S. aureus* (Davies & Davies, 2010). For behandling av MRSA ble antibiotikumet vancomycin tatt i bruk på 1980-tallet, men vancomycin-resistent *S. aureus* (VRSA) ble rapportert i 1997 (David & Daum, 2017; Kumar et al., 2020).

S. aureus er en av få bakteriearter som har utviklet resistens mot alle nyutviklede typer antibiotika (David & Daum, 2017). Kombinert med å danne motstandsdyktig biofilm, utgjør patogenet en stor bekymring knyttet til folkehelse i årene som kommer. For å utvikle nye samt forbedre eksisterende antibiotika mot *S. aureus*, er det nødvendig å få en større forståelse for de cellulære mekanismene involvert i resistensutvikling i arten. Denne kunnskapen kan bidra til å finne nye angrepspunkt for antimikrobielle midler, som potensielt kan benyttes sammen med antibiotika som allerede eksisterer og dermed gjøre multiresistente bakteriearter sensitive igjen.

1.2 Oppbygningen av *S. aureus* celler

I Gram-positive bakterier, som *S. aureus*, er cytoplasma omsluttet av en dynamisk cellekonvolutt (Rajagopal & Walker, 2017; Willey et al., 2017). Cellekonvolutten består av en cellevegg og en enkelt plasmamembran som adskilles av et lite periplasmatiske rom. De fleste *S. aureus* stammer har også en ytre kapsel bestående kapselpolysakkarider på utsiden av

1. Introduksjon

celleveggen. Celleveggen i Gram-positive bakterier består i hovedsak av et 30-100 nm tykt lag peptidoglykan, i tillegg til teikoinsyrer som er festet enten til celleveggen (veggteikoinsyrer) eller membranen (lipoteikoinsyrer) (Rajagopal & Walker, 2017).

Peptidoglykanlaget i celleveggen utgjør en stabil, men elastisk struktur og er viktig for cellens stabiliserende evne for å respondere mot ytre trykk (Pinho et al., 2013). Elastisiteten gjør at celleveggen kan endre form under deling og vekst. I tillegg gir fleksibiliteten peptidoglykan en porøsitet, hvor proteiner kan passere gjennom ut i fra hvor strukket eller kontrahert laget er (Pinho et al., 2013; Willey et al., 2017). Peptidoglykanlaget er sammensatt av alternerende identiske subenheter i et tett nettverk. Hver subenhet utgjøres av disakkaridenheter bestående av *N*-acetylmuraminsyre (MurNAc) og *N*-acetylglukosamin (GlcNAc) koblet sammen av β -1,4-bindinger (Rajagopal & Walker, 2017). I tillegg har hver polysakkaridkjede et stammepeptid med fire alternerende D- og L-aminosyrer festet til MurNAc. Peptidoglykankjedene kryssbindes sammen gjennom kovalente bindinger mellom de utstikkende stammepeptidene. I *S. aureus* er kjedene indirekte kryssbundet via en peptidbro bestående av fem glysin-residuer (Rajagopal & Walker, 2017; Willey et al., 2017). Biosyntesen av peptidoglykan er beskrevet i mer detalj i **Seksjon 1.2.1**.

Plasmamembranen består av et dobbelt lipidlag som omslutter cytoplasma, og er et viktig element sammen med celleveggen for å opprettholde cellestruktur og gi beskyttelse mot omgivelsene (Willey et al., 2017). En av dens viktigste egenskaper er å være semipermeabel, og dermed selektivt begrense hvilke molekyler som får passere inn og ut av cellen. I tillegg vil en rekke metabolske prosesser, slik som respirasjon, finne sted her (Willey et al., 2017). Cellekonvolutten er også estimert å inneholde inntil 60% teikoinsyrer (Rajagopal & Walker, 2017). Disse holder celleveggen festet til plasmamembranen, og er derfor viktige for strukturell oppbygning av cellen og samtidig sørge for at skadelige substanser ikke kan passere gjennom peptidoglykanlaget (Willey et al., 2017; Xia et al., 2010). Teikoinsyrer er også viktige under celledeling samt for beskyttelse under stress, og bidrar til å feste celler til overflater (Xia et al., 2010). Veggteikoinsyrer, som er teikoinsyrer festet til peptidoglykan, er også vist å være viktige for *S. aureus* sin resistens mot β -laktamer (Rajagopal & Walker, 2017).

1.2.1 Biosyntese av peptidoglykan

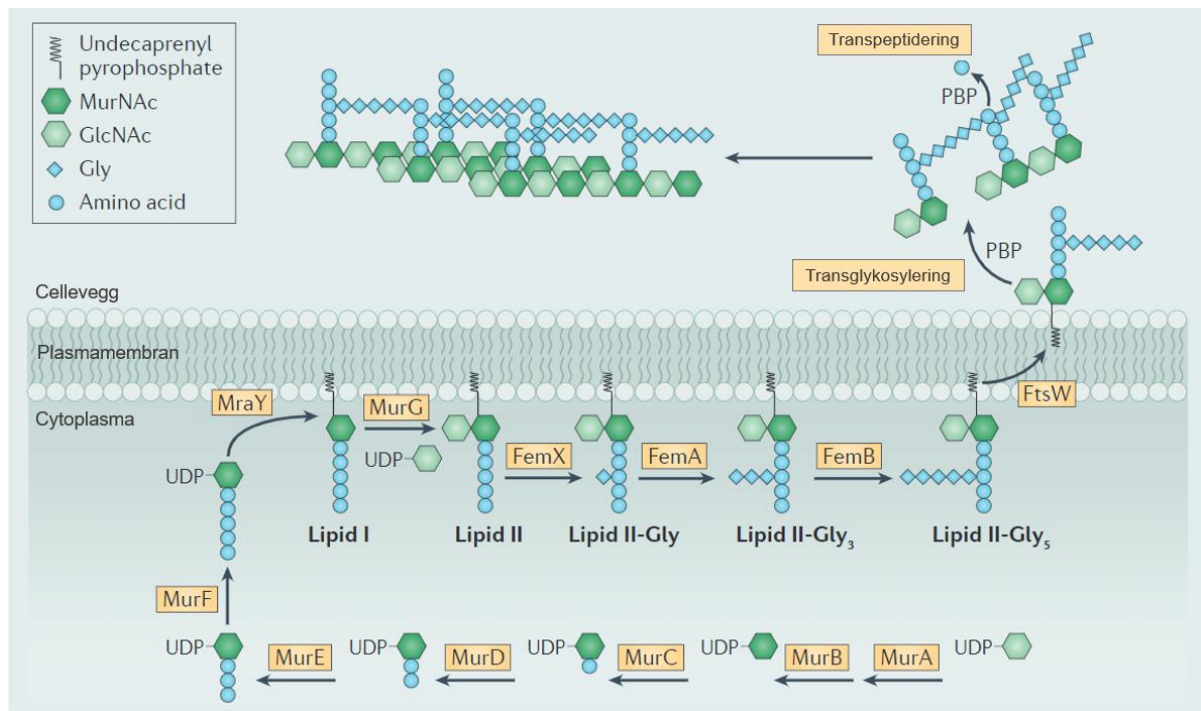
I *S. aureus* syntetiseres nytt peptidoglykan hovedsakelig i septum av cellene, hvor peptidoglykankjedene i gjennomsnitt er 6-18 disakkaridenheter lange (Rajagopal & Walker, 2017; Willey et al., 2017). Syntesen av peptidoglykan er vist i **Figur 1.1**, og kan deles inn i tre hovedtrinn. De første trinnene av peptidoglykansyntese skjer i cytoplasma. Her vil enhetene

1. Introduksjon

urindine diphosphate (UDP)-GlcNAc og UDP-MurNAc-pentapeptid settes sammen med utgangspunkt i fruktose-6-fosfat (Rajagopal & Walker, 2017). Enzymet MurA katalyserer overføringen av enolpyruvat til UDP-GlcNAc (Barreteau et al., 2008). MurB vil videre redusere enolat til laktat, som fører til dannelse av UDP-MurNAc fra UDP-GlcNAc. Stammepeptidet blir trinnvis festet på UDP-MurNAc av de fire enzymene MurCDEF for å danne pentapeptid-UDP-MurNAc (Barreteau et al., 2008). Videre fortsetter synteseveien i membranen, der det dannes to lipid-bundende intermediater. Membranproteinet MraY katalyserer fusjoneringen av transportlipidet undecaprenyl phosphate (Und)-P til MurNAc. Denne strukturen kalles Lipid I. Dannelsen av Lipid II katalyseres så av MurG, ved å feste GlcNAc til Lipid I. Aminosyre som kreves for å danne glysinbroen mellom stampeptidene i *S. aureus* blir satt på av enzymene FemXAB (FemX, FemA, FemB) (Pinho et al., 2013; Rajagopal & Walker, 2017). Lipid II translokaliseres deretter til periplasma av MurJ ved flipping til andre siden av membranen (Rajagopal & Walker, 2017). Her vil de siste syntesetrinnene foregå. Disse omfatter polymerisering og kryssbinding av peptidoglykan, hvor penicillin bindende proteiner (PBP) og såkalte SEDS (shape, elongation, division and sporulation)-proteiner er involvert (Rajagopal & Walker, 2017; Reichmann et al., 2019).

PBP er en gruppe enzymer essensielle for ferdigstilling av peptidoglykanlaget i celleveggen. Proteinene vil forlenge glykankjedene ved polymerisering av Lipid II-enheter under transglykosyleringsreaksjoner (Sauvage et al., 2008). Videre er de ansvarlig for å kryssbinde kjedene sammen under transpeptideringsreaksjoner via peptidsidekjedene. *S. aureus* har fire ulike typer PBP (1-4). MRSA har i tillegg PBP2a som er involvert i transpeptidering, og har lav sensitivitet mot β -laktamer (Kumar et al., 2020; Sauvage et al., 2008). Alle de fire PBP vil ha transpeptidase-aktivitet, hvor PBP2 i tillegg vil ha transglykosylase-aktivitet. I tillegg til PBP vil *S. aureus* ha de to SEDS-proteinene FtsW og RodA med transglykosylase-aktivitet (Reichmann et al., 2019). FtsW vil sammen med PBP1 og RodA med PBP3, utgjøre par som både polymeriserer glykankjeder og kryssbinder de sammen (Reichmann et al., 2019). Selv om celleveggsyntese er lokalisert i hovedsak til septum, er celler av *S. aureus* vist å elongere i noe grad. Dette er det RodA og PBP3 som er ansvarlig for (Reichmann et al., 2019). Etter endt septumdannelse vil en klasse av PBP, kalt autolysiner, splitte foreldrecellen inn i to identiske datterceller (**Seksjon 1.3.2**).

1. Introduksjon



Figur 1.1 Reaksjoner i peptidoglykan biosyntese i Gram-positive bakterier. Figuren viser alle reaksjoner og mellomprodukter samt enzymer nødvendige for peptidoglykansyntese. Figuren er gjengitt med tillatelse fra Pinho et al. (2013).

1.3 Cellesyklus i *S. aureus*

De fleste bakterier deler seg aseksuelt gjennom todeling, også kalt binær fisjon, der en foreldrecelle vil gi opphavet til to nye, identiske datterceller (Willey et al., 2017). Det er viktig å forstå mekanismene bak celledeling, da prosessen er helt essensiell for reproduksjon og bakteriers overlevelse. For at en enkelt celle skal kunne dele seg til to nye celler, må foreldrecellen syntetisere ny cellevegg og plasmamembran. I tillegg må kromosomene replikeres og det dannes en ny kryssvegg, septum, før den deler seg. De eksakte mekanismene knyttet til celledeling varierer ut ifra cellens morfologi. Mekanismene for hvordan stavbakterier opprettholder formen samt segregerer DNA og avgjør delingspunkt, er i større grad kjent sammenlignet med for kokker (Pinho et al., 2013). *S. aureus* benyttes ofte som en modellbakterie for å studere deling i celler med sfærisk morfologi (Stamsås et al., 2018).

Cellessyklus kan defineres som alle stegene som kreves for at en enkelt celle skal kunne gi opphav til to nye datterceller. Hos bakterier kan cellessyklusen deles inn i tre hovedperioder (Willey et al., 2017). Første periode er tiden fra siste avsluttende celledeling, frem til DNA replikasjon starter. Neste periode innebærer kromosomreplikasjon og segregering, før cellen i

1. Introduksjon

siste periode gjennomgår cytokinese med dannelse av septum og datterceller (Willey et al., 2017). Til forskjell fra eukaryoter vil de ulike periodene i cellyklusen være overlappende hos bakterier. Dette betyr at kromosomreplikasjon, kromosomsegregering og deling av datterceller foregår parallelt, og at en ny runde celledeling kan begynne før avsluttende periode med cytokinese er ferdig gjennomført (Willey et al., 2017).

1.3.1 Kromosomreplikasjon og segregering

Kromosomreplikasjon i bakterier starter i punktet *oriC* (Mott & Berger, 2007; Willey et al., 2017). Syntesen begynner ved binding av DnaA til A-T rike sekvenser i *oriC*, og fortsetter til endepunktet *ter*, som ligger rett ovenfor startpunktet i det sirkulære kromosomet. Syntesen er bidireksjonell, og vil dermed foregå i begge retninger med utgangspunkt i *oriC* (Mott & Berger, 2007).

Før septumdannelsen fullføres, må de replikerte datterkromosomene adskilles til hver ende av cellen. De to viktigste aktive, systemene for segregering av DNA er det strukturelle vedlikeholdskomplekset SMC («structural maintenance of chromosomes») og kromosomoppdelingssystemet ParABS. SMC er viktig for organisering og pakking samt segregering av kromosomer (Pinho et al., 2013; Yu et al., 2010). Systemet ParABS består av proteinene ParA og ParB. ParB er et DNA-bindende protein som binder til bindingsstedet *parS*, lokalisert nær *oriC*, på hver kopi av genet på datterkromosomene (Willey et al., 2017). I *S. aureus* er Spo0J en homolog til ParB (Chan et al., 2020). ParA er et cytoskjelett protein som ved polymerisering danner filamenter. Ved binding til *parS*-ParB komplekset, vil ParA depolymerisere, og slik dra med seg et av datterkromosomene mot motsatt pol i cellen. *S. aureus* koder ikke for ParA, men Spo0J er likevel vist å lokalisere til områder nær *oriC* og er viktig for rett kromosomsegregering (Pinho et al., 2013). Verken SMC eller Spo0J er vist å være essensielle i *S. aureus*, men det observeres defekt kromosomsegregering og celler uten DNA ved fravær av proteinene (Chan et al., 2020; Yu et al., 2010).

Under avsluttende trinn i segregeringen, før begynnende septumdannelse, er det viktig at planet for celledeling er helt frigjort for datterkromosomer. Bakterier har i tillegg DNA pumper som bidrar til å unngå at septum krysser kromosomene (Pinho et al., 2013). Pumpene er DNA translokaser, som sørger for at datterkromosomer blir skjøvet inn i dattercellene. Pumpene er anslått å være viktige for bakterieceller med sfærisk form, da disse har et mindre område for segregering av datterkromosomene sammenlignet med stavbakterier (Pinho et al., 2013).

1. Introduksjon

I tillegg til aktive, direkte prosesser vil indirekte prosesser som DNA replikasjon, transkripsjon og komprimering legge til rette for DNA segregering (Pinho et al., 2013). Andre modeller foreslår at krefter knyttet til entropi kan være eneste pådriver for kromosomsegregering, som resulterer i en spontan oppsplitting av datterkromosomene (Jun & Wright, 2010; Pinho et al., 2013).

1.3.2 Cytokinese

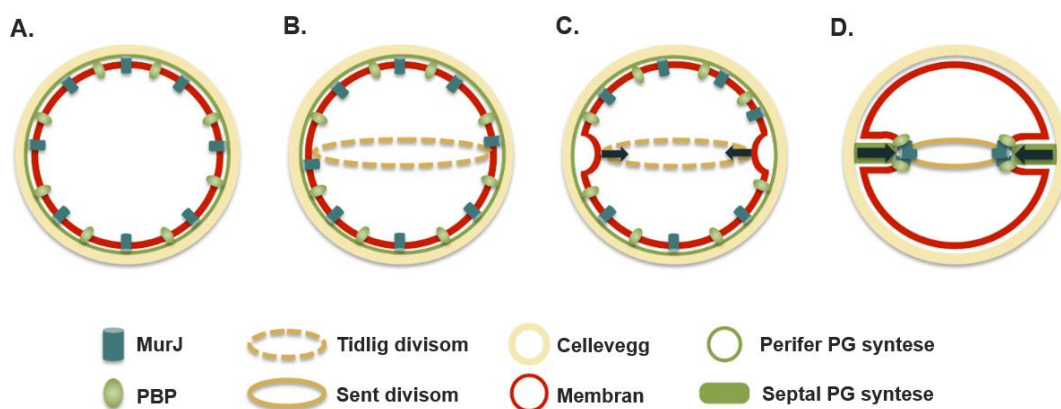
Cytokinese omfatter prosessen der cytoplasma i foreldrecellen deles inn i to identiske datterceller med hver sin kopi av kromosomet. De fire trinnene i prosessen, vist i **Figur 1.2**, er viktige for at cellen klarer å koordinere kromosomsegregeringen med videre celledeling. I første trinn velges det et punkt for septumdannelse, før Z-ringen dannes under trinn to. Videre i trinn tre etableres komponentene for cellevegg syntese, og avslutningsvis vil det skje en innsnevring av septum (Willey et al., 2017).

Valg av delingspunkt er et kritisk trinn for at cellen videre skal være i stand til å koordinere divisomet rett. Om det velges feil delingspunkt kan septumdannelsen skje på tvers av replikert DNA. For å hindre dette har bakterier etablert to ulike systemer: «nucleoid occlusion» og Min-systemet (Pinho et al., 2013; Willey et al., 2017). *S. aureus* koder ikke for et Min-system, men har en homolog av «nucleoid occlusion» proteinet Noc i *Bacillus subtilis* (Pinho et al., 2013). Noc har negativ innvirkning på dannelse av Z-ringen, ved å hindre polymerisering av celledelingsproteinet FtsZ (Bottomley et al., 2017). Under «nucleoid occlusion» vil Noc binde til steder nære *oriC*. Ettersom datterkromosomer replikeres og beveger seg mot sin ende av cellen, vil Noc følge med i segregeringen. Som en følge av dette vil ikke Z-ringen kunne dannes før kromosomene er tilstrekkelig segregert, og det er dannet et plan i cellen fritt for Noc. Siden planet frigjort for DNA er eneste mulige sted for septumdannelse og videre deling, er det antatt at kromosomsegregeringen i *S. aureus* er med på å bestemme delingsplanet (Pinho et al., 2013).

Tidligere var det antatt at celledelingen i *S. aureus* ville foregå i tre plan, hvor neste runde celledeling ville skje ortogonalt mot planet ved forrige deling (Stamsås et al., 2018). Nyere studier indikerer at *S. aureus* ikke alltid vil danne tre alternerende plan for celledeling (Saraiva et al., 2020). Nytt dannet plan vil alltid være vinkelrett på det forrige, men ikke nødvendigvis på det tidligere planet dannet før dette. Siden nye delingsplan alltid være forflyttet 90 grader fra forrige, må kromosomreplikasjon og segregering orientere seg deretter (Yu et al., 2010). Mekanismene bak denne forflytningen er ikke helt kjent.

1. Introduksjon

Det er viktig at septum dannes i midten av foreldrecellen slik at dattercellene får samme størrelse. Etableringen av divisomet og aktiv celleveggssyntese avgjøres ut ifra lokaliseringen av FtsZ (Jorge et al., 2011; Monteiro et al., 2018). FtsZ vil polymerisere til filamenter ved tilstedeværelse av GTP, og utgjøre strukturen kalt Z-ring. Selv om Z-ringene ofte blir beskrevet som en etablert ringstruktur, viser studier at FtsZ vil polymerisere og depolymerisere rundt i delingsplanet. Dette fører til at Z-ringene får en bevegelse kjent som «treadmilling» (Bisson-Filho et al., 2017; Monteiro et al., 2018). Bevegelsen vil være viktig under tidlige trinn i cytokinesen, blant annet for å starte innsnevring av cellemembranen.



Figur 1.2 Tidlige trinn av cytokinese i *S. aureus*. (A) Celler før cytokinese starter. (B) Proteiner som FtsZ, EzrA og FtsA samt andre komponenter i det tidlige divisomet etableres i midten av cellen. (C) Membranen innsnevres, hvor «treadmilling» av Z-ringene er en av drivkreftene. (D) Sene celledelingsproteiner som MurJ og PBP forflyttes fra den perifere delen av cellen til midten for peptidoglykansyntese av septum. Figuren er gjengitt med tillatelse fra Monteiro et al. (2018).

For at Z-ringene skal bli stabile, vil proteinet FtsA binde FtsZ filamentene og dermed feste den dynamiske Z-ringene til cellemembranen (Lutkenhaus et al., 2012). I tillegg til FtsA, vil proteiner som EzrA og GpsB være involvert i stabilisering av Z-ringene (Eswara et al., 2018; Jorge et al., 2011). EzrA er et protein vist å interagere med FtsZ i *S. aureus*, og vil sammen med FtsZ og FtsA utgjøre det tidlige divisomet. Proteinene er ikke nødvendigvis for overlevelse i *S. aureus*, men er involvert i bestemmelse av cellestørrelse (Jorge et al., 2011). Det essensielle proteinet GpsB i *S. aureus* interagerer direkte med FtsZ før cellen deler seg, og bidrar til både plassering og stabilisering av Z-ringene ved å organisere FtsZ filamentene (Eswara et al., 2018). Andre faktorer vist å gjøre Z-ringene stabile og stabilisere divisomet er det tidligere nevnte FtsW-PBP1 (**Seksjon 1.2.1**) (Reichmann et al., 2019). Etter etablering av Z-ringene i midten av cellene, vil FtsZ være involvert i rekruttering av PBP og andre enzymer som RodA og FtsW nødvendig

1. Introduksjon

for celledeling og celleveggsyntese (**Seksjon 1.2.1**) for å danne sent divisom (Bisson-Filho et al., 2017; Lutkenhaus et al., 2012).

Etter fullført septumdannelse, vil autolysiner være ansvarlig for å splitte septum slik at det dannes to identiske datterceller. I *S. aureus* vil septum ha to parallelle soner med høy tetthet adskilt av en sone med lavere tetthet (Pinho et al., 2013). Septum vil derfor være bygget opp av to uavhengige strukturer som vil utgjøre celleveggen i hver dattercelle, allerede før septum splittes. Det er derfor antatt at autolysiner kun vil degradere celleveggen i de to ytre, perifere, delene av septum, og ikke langs hele kryssveggen i foreldrecellen (Pinho et al., 2013). Atl, som er en peptidoglykan hydrolase, er et av de viktigste autolysinene i *S. aureus*, og er vist å lokalisere til den perifere delen av septum før splittelsen (Houston et al., 2011; Zhou et al., 2015). Etter splittelsen, som skjer på millisekunder, vil det høye osmotiske trykket i hver dattercelle presse celleveggen utover, slik at cellene får en sfærisk morfologi. Etter splittelsen, krever celleveggen i dattercellene videre remodellering av enzymer for å danne et stivere, fullstendig lag av peptidoglykan (Pinho et al., 2013; Zhou et al., 2015).

1.3.3 Faktorer som påvirker celledeling og morfologi

En rekke faktorer og mekanismer samvirker for at prosesser i cellesyklusen skal utføres på rett sted til rett tidspunkt. Proteinkvalitet samt regulering av både transkripsjonsnivåer og lokalisering av proteinene involvert er viktig. Chaperoner er viktige enzymer i cellen som assisterer rett folding av ny-syntetiserte proteiner eller re-folding av proteiner med misfolding samt forhindrer proteinaggregering. Blant chaperoner er Clp-proteiner viktige for å sikre proteiners funksjoner både under normale vilkår og ved induert stress (Frees et al., 2007). Blant annet er det vist at celler av *B. subtilis* vil ha en 20-30% større andel proteinaggregater av ny-syntetiserte proteiner ved ikke-stressende vekstvilkår uten ClpP (Frees et al., 2007).

1.4. Stresstoleranse i *S. aureus*

1.4.1 Regulering av stresstolerant fenotype og varmesjokk-respons

Mikroorganismer under naturlige vilkår lever i et skiftende miljø. Disse er helt avhengig å overvåke nærmiljøet for både giftige substanser og andre trusler, for å opprettholde vekst og cellulær homeostase (Bonilla, 2020). Generell stressrespons (GSR) er en modell som benyttes for å beskrive hvordan cellene sensorisk detekterer endringer i miljøet, og videre koordinerer en molekylær respons (Bonilla, 2020). Sensoriske proteiner vil oppdage et skifte i temperatur eller pH, antimikrobielle substanser, oksygennivå og osmotisk stress, og videre aktivere GSR

1. Introduksjon

ut ifra styrken på stresssignalet. Aktivert GSR gir økt tilpasningsdyktighet slik at cellene kan håndtere stressfaktorer som ellers kunne hatt letal effekt (Bonilla, 2020). GSR er også en viktig del av patogenese, involvert i både biofilmdannelse og virulens (Côté-Gravel & Malouin, 2019; Roncarati & Scarlato, 2017).

En andel av proteinene oppregulert ved aktivering av GSR vil induseres av ulike stressfaktorer og føre til uspesifikk beskyttelse i cellene (Hecker et al., 1996). Disse omtales oftest som generelle stressproteiner. Oppregulert uttrykk av spesifikke stressproteiner induseres av en type stress-signal, og resulterer i økt toleranse mot denne gitte typen stress (Hecker et al., 1996). Varmesjokk-respons er en universal beskyttelsesmekanisme hos bakterier som induseres spesifikt av temperaturøkning, i tillegg til av andre generelle stressfaktorer i nærmiljøet som oksygennivå og osmotiske endringer (Bonilla, 2020; Roncarati & Scarlato, 2017). I dette arbeidet vil Hsp («heat shock proteins») videre benyttes som en betegnelse på proteiner som er oppregulert under varmesjokk-respons, som følge av økt temperatur. For å etablere en respons vil sensoriske molekyler, kalt termosensorer, detektere et temperaturskifte som fører til akkumulering av Hsp i cellene (Roncarati & Scarlato, 2017). Den viktigste oppgaven til Hsp er å fungere som chaperoner og proteaser involvert i proteinfolding (Roncarati & Scarlato, 2017). Under cellulært stress vil proteiner i større grad aggregere og folde feil, som fører til et større behov for chaperoners egenskaper for å opprettholde proteinfunksjon og kvalitet. Stressende forhold er vist å føre til at allerede foldede proteiner kan helt eller delvis denaturere, og foldingen av nysyntetiserte proteiner er mindre effektiv (Roncarati & Scarlato, 2017). Som en følge av dette er også proteolytisk degradering ved proteaser viktig for å fjerne feilfoldede polypeptider som kan være skadelig for cellen. Det bør også nevnes at de fleste Hsp kreves i cellene under normale vekstvilkår, men uttrykket øker og blir desto viktigere under stress (Neckers & Tatu, 2008; Roncarati & Scarlato, 2017). Hsp kan også være virulensfaktorer indirekte eller direkte involvert i patogenese (Neckers & Tatu, 2008; Roncarati & Scarlato, 2017).

Oppreguleringen av Hsp under varmesjokk bidrar også til at cellene får økt varmetoleranse (Cebrián et al., 2009; Pespeni et al., 2005). Termotoleranse er en induert tilstand i cellen etter preeksponering for en temperaturøkning, som vil gi cellen økt beskyttelse ved et senere varmesjokk. Cellen vil dermed tåle temperaturer som tidligere ville vært letale (Pespeni et al., 2005). Dette skyldes etter all sannsynlighet at preeksponeringen fører til økt uttrykk av Hsp, og bidrar til at cellen får bedre håndteringsevne ved neste varmesjokk (Frees et al., 2004). Det

1. Introduksjon

finnes også tilfeller av induisert termotoleranse i bakterier uten økt uttrykk av Hsp, men dette er ikke kjent for *S. aureus* (Cebrián et al., 2009).

1.4.2 Clp-proteiner

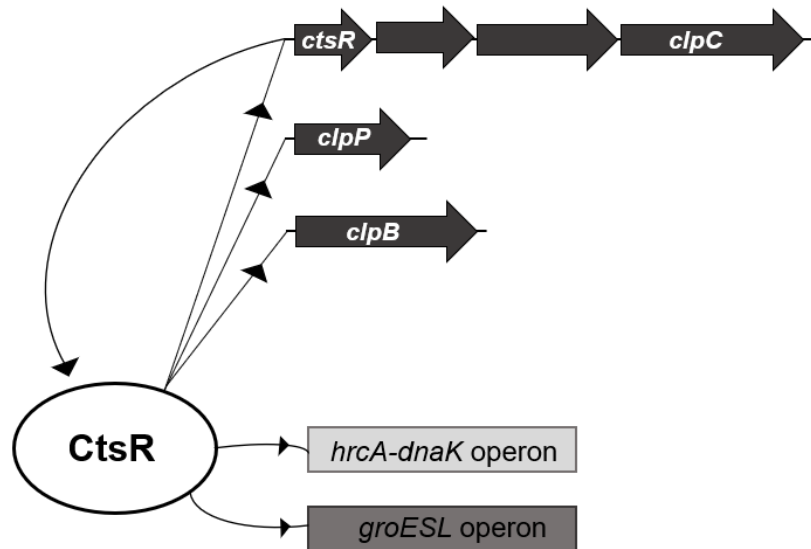
Clp ATPaser er en høyt konservert og universal proteinfamilie av Hsp (Frees et al., 2004). Clp-proteiner er chaperoner, der enkelte også kan danne proteolytiske komplekser for nedbrytning av proteiner foldet feil og mislokalisert (Frees et al., 2007). Clp-proteiner er viktige i celler under normale vekstvilkår, men desto viktigere under stresstilstander og i en varmesjokk-respons, for at cellen skal opprettholde proteinkvalitet og funksjoner i fysiologiske prosesser.

For regulering av genuttrykk under varmesjokkrespons, vil bakterier som oftest ha et system for enten positiv eller negativ regulering av transkripsjonell respons, mens noen har et komplekst system av begge (Roncarati & Scarlato, 2017). CtsR er en av flere negative regulatorer av varmesjokk-respons som finnes hos bakterier. I *S. aureus* er CtsR en transkripsjonell repressor av *ctsR-clpC*-operonet, *clpB* og *clpP* i tillegg til andre stressoperoner som *dnaK* og *groESL* (**Figur 1.3**) (Chastanet et al., 2003; Derré et al., 1999). CtsR vil blokkere uttrykket av regulonet ved å binde spesifikt i promoterregionene, som resulterer i sterisk hindring av RNA polymerase (Frees et al., 2004). Under varmesjokk-respons vil CtsR gjennomgå en strukturell endring og dermed miste bindingsaffiniteten til DNA, og bli degradert av ClpCP (Roncarati & Scarlato, 2017). Slik kan cellen oppregulere uttrykket av CtsR-regulonet under stresstilstander induisert av økt temperatur. Annerledes fra CtsR, vil Sigma faktor B være en positiv regulator i *S. aureus*, og er vist å kontrollere uttrykket av enkelte Clp-proteiner som *clpL* (Frees et al., 2007; Pané-Farré et al., 2006).

Clp-proteiner er vist å ha ulike funksjoner ved varmesjokk. Av Clp-proteiner kan ClpP peptidasen danne et kompleks med enten ClpC eller ClpX i *S. aureus* for å få proteolytisk aktivitet (Stahlhut et al., 2017). Et proteolytisk kompleks består ofte av to komponenter, med en katalytisk subenhet og en substratgjenkjennende enhet (Frees et al., 2004; Roncarati & Scarlato, 2017). I komplekset vil ATPase enheten (ClpC eller ClpX) gjenkjenne og folde ut substratet, som videre blir degradert i det proteolytiske kammeret i ClpP (Frees et al., 2004). For degradering av skadede proteiner, viser Stahlhut et al. (2017), at ClpCP er et viktigere proteolytisk kompleks enn ClpXP i *S. aureus*. ClpB er antatt å kun ha chaperon-aktivitet, og er viktig i *S. aureus* for vekst ved høyere temperaturer og essensiell for å induere termotoleranse (Frees et al., 2007). I tillegg er det observert i *Escherichia coli* at ClpB kan løse opp proteinaggregater ved varmesjokk, og denne egenskapen er antatt å være tilsvarende i Gram-

1. Introduksjon

positive bakterier (Frees et al., 2007). Verken ClpB eller ClpC er vist å være nødvendig for vekst i *S. aureus* under ikke-stressende tilstander (Frees et al., 2004).



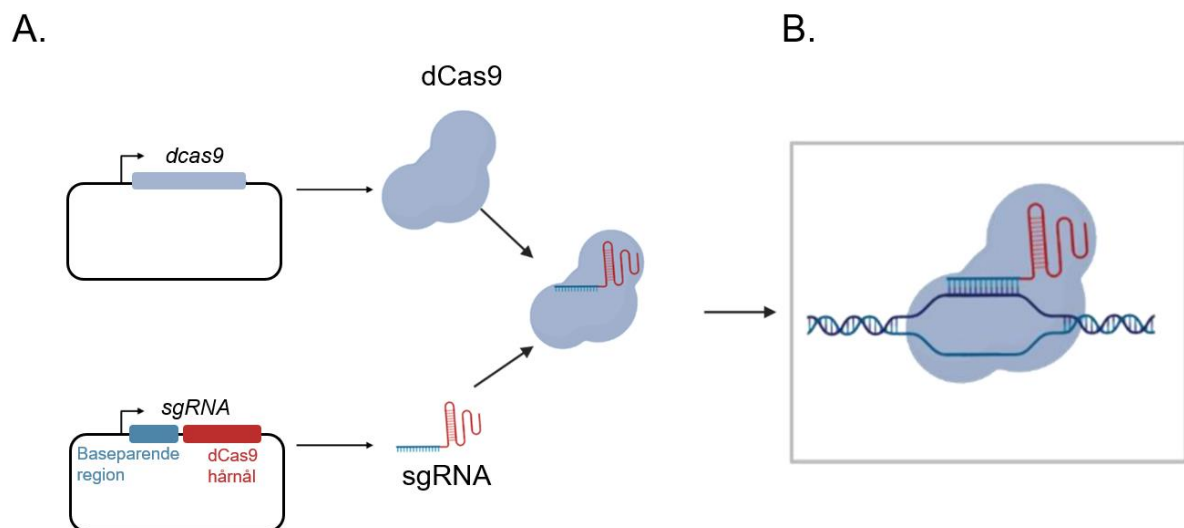
Figur 1.3 CtsR regulonet i *S. aureus*. CtsR er en negativ regulator av varmesjokk-respons i *S. aureus* og vil virke som en repressor av *clpC*-operonet, *clpP* og *clpB*. CtsR vil også være en repressor for andre stressoperon som *hrcA-dnaK* og *groESL*. Figuren er modifisert fra Chastanet et al. (2003).

1.5 Genetisk manipulering av genekspresjon ved introduksjon av CRISPR interferens (CRISPRi) i *S. aureus*

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) er et sekvensspesifikt forsvarssystem som finnes naturlig hos 40% av bakterier, for å kløye fremmed DNA fra virus og bakteriofager (Zhang et al., 2014). Bakterien vil kunne integrere DNA fra angriperen i CRISPR-lokuset, og kan slik gjenkjenne inntrengeren ved en senere tidspunkt (Zhang et al., 2014). Det enkleste CRISPR-systemet finnes hos bakterien *Streptococcus pyogenes*. Dette består av en enkelt nuklease (Cas9) og to RNA molekyler, som til sammen utgjør protein-DNA komplekset involvert i gjenkjennelse og nedbrytning av virus DNA (Qi et al., 2013). Fra dette CRISPR/Cas9 systemet har det blitt utviklet en metode for genredigering i flere organismer, bestående av Cas9 nukleasen og et «single guide RNA» (sgRNA). sgRNA er her en fusjon av de to originale RNA molekylene, og inneholder en 20 bp region som gjenkjenner målgenet for sekvensspesifikk kutting (Qi et al., 2013). sgRNA har også en 42 bp hårnål-struktur som tillater binding til Cas9. Under ko-uttrykk dannes et kompleks av dCas9 og sgRNA, hvor Cas9 ledes av sgRNA til målsekvensen. Videre vil det skje en dobbeltrådig kutting av målsekvensen.

1. Introduksjon

Delesjon av essensielle gener er ikke alltid gjennomførbart, dersom genet er så viktig for cellulære prosesser at det blir letalt for cellen. CRISPR interferens (CRISPRi) er en metode som er videreutviklet basert på CRISPR/Cas9 systemet (Qi et al., 2013), og gjør det mulig å transkripsjonelt blokkere for genuttrykket uten å påvirke DNAet. Til forskjell fra det kjente CRISPR-Cas9 systemet, benyttes det her et inaktivt (dødt) Cas9 protein uten endonukleaseaktivitet (Qi et al., 2013; Stamsås et al., 2018). dCas9 er imidlertid fortsatt i stand til å interagere med sgRNA og binde DNA målsekvensen. I *S. aureus* har det blitt innført et induserbart to-plasmid CRISPRi system (**Figur 1.4**) (Stamsås et al., 2018). dCas9 og sgRNA uttrykkes fra hvert sitt plasmid, hvor uttrykket av dCas9 er induserbart. Ved tilsetning av IPTG vil dCas9 sammen med sgRNA, som uttrykkes konstitutivt, danne dCas9-sgRNA komplekset. Komplekset vil kunne blokkere for RNA polymerase, og dermed nedregulere uttrykket av målgenet ved å forhindre elongering (Dong et al., 2017). Noen av fordelene med dette systemet er at den baseparende regionen av sgRNA kan byttes ut med andre målsekvenser, slik at nye gener kan bli nedregulert, i tillegg til at uttrykket av flere målsekvenser kan bli nedregulert samtidig (Stamsås et al., 2018).



Figur 1.4 Fremstilling av det induserbare to-plasmid CRISPRi-systemet i *S. aureus*. Figuren presenterer de to plasmidene nødvendig i CRISPRi, hvor det ene uttrykker dCas9 fra en IPTG-induserbar promoter og det andre plasmidet konstitutivt uttrykker sgRNA. SgRNA vil ha en baseparende region som gjenkjenner målsekvensen, og en hårnålstruktur som kan interagere med dCas9. Ved ko-uttrykk av plasmidene vil komplekset av dCas9-sgRNA blokkere for transkripsjon av målsekvensen. Modifisert med tillatelse fra Mårli (2020).

1. Introduksjon

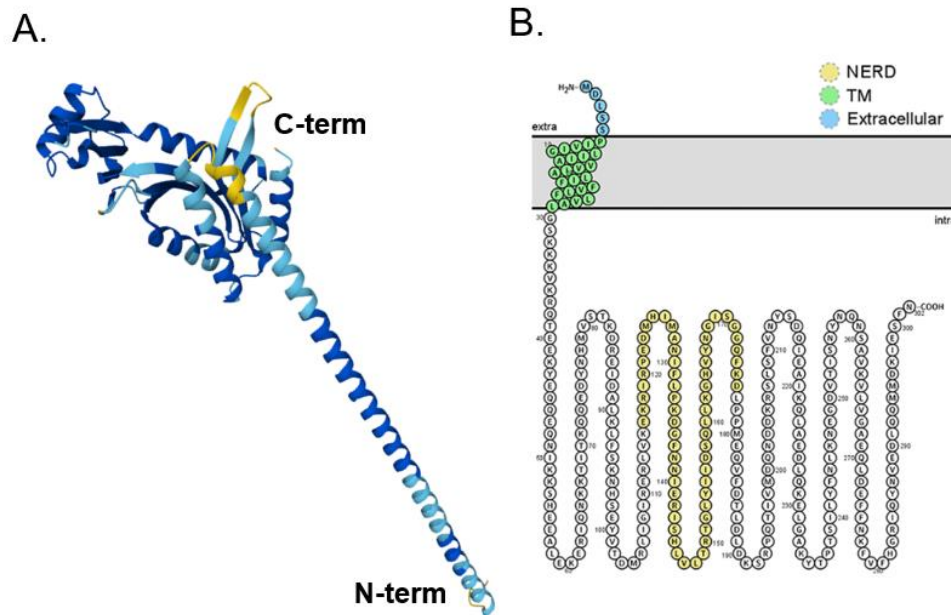
1.6 Bakgrunn og formål med studiet

1.6.1 SmdA er et nytt protein viktig for celledeling i *S. aureus*

Dette studiet baserer seg på resultater publisert i doktorgradsavhandlingen «Functional insights into novel factors affecting cell division in Gram-positive bacteria» (Myrbråten, 2021). For å identifisere essensielle proteiner potensielt involvert i celledeling i *S. aureus*, ble det i avhandlingen gjennomført en kombinert gen-deplesjon og subcellulær lokaliseringsanalyse som inkluderte 27 essensielle stafylokokkproteiner uten annotert funksjon. Disse proteinene ble blant annet valgt ut fordi de var høyt konserverte i *S. aureus*. For analyse av subcellulær lokasjon ble proteinene fusjonert til GFP og studert med fluorescensmikroskopi. CRISPRi (**Seksjon 1.5**) ble benyttet for å konstruere depleksjonsstammer. Av de 27 proteinene analysert, ble det vist at det ukjente membranproteinet SAOUHSC_01908 lokaliserte til septum av cellene. Nedregulering av uttrykket til dette proteinet i *S. aureus* stammen SH1000, resulterte i celler med unormal morfologi, deriblant varierende størrelse og klyngedannelser. Dette er typiske karakteristikk som tidligere er observert for proteiner involvert i celledeling (Myrbråten, 2021). SAOUHSC_01908 ble derfor omdøpt til SmdA (staphylococcal morphology determinant A).

SmdA er et fullstendig konserverte membranprotein i familien *Staphylococcaceae* (Myrbråten et al., 2022). Predikert proteinstruktur og membrantopologi er presentert i **Figur 1.5**. SmdA er predikert å ha en ekstracellulær N-terminal med et transmembrant domene og et NERD («nuclease related domain»)-domene i den intracellulære delen av proteinet. NERD-domener er i liten grad studert tidligere, men er foreslått å ha en nuklease-funksjon relatert til DNA prosessering (Grynberg & Godzik, 2004; Myrbråten et al., 2022). Videre studier av SmdA har vist at proteinet har en viktig rolle for normal celledeling og morfologi i *S. aureus*, og et redusert uttrykk av proteinet gir i tillegg økt sensitivitet mot celleveggangripende antibiotika (Myrbråten et al., 2022).

1. Introduksjon



Figur 1.5 Predikert proteinstruktur og membrantopologi for SmdA. (A) Proteinstrukturen er farget etter per-residue confidence score (pLDDT) hvor mørkeblått > 90, lyseblå 70-90 og gul 50-70. (B) SmdA er predikert å ha en ekstracellulær N-terminal del (blå) med et transmembrant domene (aminosyre 6-29) (grønn) og en intracellulær del med et predikert NERD-domene (aminosyre 115-176) (gult). Figuren er gjengitt med tillatelse fra Myrbråten et al. (2022).

1.6.2 Formålet med oppgaven

Ved starten av dette arbeidet var SmdA etablert som et nytt protein involvert i celledeling hos *S. aureus*. Likevel er fremdeles mye ukjent. Målet med dette arbeidet var å videre undersøke funksjonen til det konserverte membranproteinet SmdA, og forstå hvorfor SmdA påvirker cellesyklus og morfologi i *S. aureus*. For å få større kunnskap om rollen til SmdA, var det i studiet ønskelig å få dypere innsikt og forståelse for:

- Hvordan påvirker nedregulering og overuttrykk av SmdA cellemorfologi, celledeling og celleveggsyntese?
- Er den predikerte membrantopologien til SmdA korrekt?
- Hvilken betydning har det predikerte «NERD» domenet i SmdA?
- Hvordan påvirker SmdA ekspresjonen av andre gener?
- Kan genekspressionsanalyse brukes til å forstå mer om funksjonen til SmdA?

2. Materialer

2.1 Stammer og plasmid

Foreldrestammer av *E. coli* og *S. aureus* benyttet i arbeidet er listet i **Tabell 2.1**, og mutantstammer er listet i **Appendiks A1**.

Tabell 2.1 Foreldrestammer av *E. coli* og *S. aureus* benyttet i arbeidet.

Stamme	Beskrivelse	Kilde
<i>E. coli</i>		
IM08B	DH10B, Δdcm , $P_{\text{help}}\text{-}hsdMS$, $P_{N25}\text{-}hsdS$. Uttrykker <i>S. aureus</i> CC8 spesifikke metyleringsgener.	(Monk et al., 2015)
<i>S. aureus</i>		
NCTC8325-4	NCTC8325 behandlet for fag $\phi 11$, $\phi 12$ og $\phi 13$	(Novick, 1967)
SH1000	<i>rbsU</i> + derivatstamme av NCTC8325-4	(Horsburgh et al., 2002)
JE2	USA300 LAC derivat hvor plasmid pUSA01 og pUSA03 er fjernet	(Fey et al., 2013)

Tabell 2.2 Plasmider benyttet i arbeidet.

Plasmid	Beskrivelse av plasmid	Varianter av plasmidet benyttet i arbeidet	Referanse
pCG248	Skyttelvektor for <i>E. coli</i> og <i>S. aureus</i> , amp^R , cam^R	pCG248-sgRNA(<i>smdA</i>), pCG248-sgRNA (no target)	(Helle et al., 2011)
pIMAY	Induserbart plasmid for inaktivering av kromosomalt gen. cam^R	pIMAY- $\Delta\text{smdA}::\text{spc}$	(Monk et al., 2012)
pLOW	Lavkopi induserbart plasmid for uttrykk av proteiner i <i>S. aureus</i> . amp^R , ery^R	pLOW-dCas9_extra_lacO, pLOW- <i>smdA</i> , pLOW- <i>smdA</i> Δ TMH, pLOW- <i>smdA</i> Δ TMH_Mut1, pLOW- <i>smdA</i> Δ TMH_Mut2, pLOW- <i>smdA</i> Δ TMH_Mut3, pLOW-dCas9, pLOW- <i>smdA</i> -m(sf) <i>gfp</i> , pLOW-m(sf) <i>gfp</i> - <i>smdA</i> , pLOW- <i>lacA</i> -m(sf) <i>gfp</i> , pLOW-SA1721-m(sf) <i>gfp</i> , pLOW-dCas9_aad9	(Liew et al., 2011)
pVL2336	Skyttelvektor for <i>E. coli</i> og <i>S. aureus</i> , amp^R , ery^R , cam^R	pVL2336-sgRNA(no target), pVL2336-sgRNA(<i>smdA</i>), pVL2336-sgRNA(<i>clpP</i>), pVL2336-sgRNA(<i>icaA</i>)	Ikke publisert

2. Materialer

2.2 Antibiotika

Tabell 2.3 Antibiotika benyttet i arbeidet.

Antibiotikum ^{a, b}	Startløsning	Arbeidsløsning	Produktnummer	Leverandør
Ampicillin	100 mg/mL	100 µg/mL	A-9251	Sigma-Aldrich
Erytromycin	5 mg/mL	5 µg/mL	E6376	Sigma-Aldrich
Kloramfenikol	10 mg/mL	10 µg/mL	C0378	Sigma-Aldrich
Spektinomycin	100 mg/mL	100 µg/mL	S9007	Sigma-Aldrich

^a Ampicillin = Amp, Erytromycin = Ery, Kloramfenikol = Cam, Spektinomycin = Spc

^b Ampicillin og spektinomycin løses i dH₂O. Erytromycin og kloramfenikol løses i etanol

2.3 Primere

Tabell 2.4 Primere benyttet i arbeidet.

Navn ^a	Sekvens (5' - 3')	Referanse
Konstruksjon og sekvensering av pIMAY- Δ smd::spc		
af29_pIMAY_MCS_F	TACATGTCAAGAATAAACTGCC AAAGC	Dr. Annette Fagerlund
af30_pIMAY_MCS_R	AATACCTGTGACGGAAGATCAC TTCG	Dr. Annette Fagerlund
mk533_smdA_down_check_R	CCAAGCCCTGACAATTCATC	Dr. Morten Kjos
mk532_smdA_up_check_F	CAAATGCACGTGTAGCTTGTG	Dr. Morten Kjos
mk188_aad9_up_F	ATTGGGCCCACCTAGGATC	Dr. Morten Kjos
mk189_aad9_down_R	ACTATGCGGCCGCTCGAG	Dr. Morten Kjos
Sjekk av tilstedeværelse av pCG248-sgRNA		
mk25_pCG248_check_R	AAATCTCGAAAATAATAGAGGG A	Dr. Morten Kjos
mk26_pCG248_check_F	GGATAACCGTATTACCGCCT	Dr. Morten Kjos
Sjekk av tilstedeværelse av pLOW-dCas9_aad9		
im207_seq_dCas9_3_F	AGCATCCTGTTGAAAATACTCA	Dr. Ine Myrbråten
im134_pLOW_down_check_R	TGTGCTGCAAGGCGATTAAG	Dr. Ine Myrbråten

^a F = Fremover, R = Revers

2. Materialer

2.4 Enzymer

Tabell 2.5 Enzymer benyttet i arbeidet.

Navn	Produktnummer	Leverandør
Alkaline fosfatase, Calf Intestinal (CIP)	M0290	New England BioLabs®
EcoRI-HF®	R3101S	New England BioLabs®
GFP antibody rabbit polyclonal	PABG1	ChromoTek GmbH
Lysostaphin	L9043	Sigma-Aldrich
Lysozyme	L1667	Sigma-Aldrich
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	M0530	New England BioLabs®
Proteinase K	BIO-37037	Bioline
RedTaq® 2x Master mix 1,5 mM MgCl ₂	52000300-1250	VWR Life Science
SaI-HF®	R3138L	New England BioLabs®
T4 DNA ligase	M0202L	New England BioLabs®

2.5 Kjemikalier

Alle kjemikalier benyttet i arbeidet er listet i **Appendiks A2**.

2.6 Oppskrift på vekstmedier

Brain Heart Infusion (BHI)

Ved tillaging av BHI medium ble 35g BHI pulver oppløst per liter dH₂O og sterilisert ved autoklaving. Ved støping av BHI-agarskåler ble det tilsatt 15 g/L (1,5%) Bacto™ Agar før sterilisering.

Lysogeny Broth (LB)

Ved tillaging av LB medium ble 10 g tryptone, 5 g gjærekstrakt og 10 g NaCl oppløst per liter dH₂O og sterilisert ved autoklaving. Ved støping av LB-agarskåler ble det tilsatt 15 g/L (1,5%) Bacto™ Agar før sterilisering.

Tryptic Soy Broth (TSB)

Ved tillaging av TSB medium ble 30g TSB pulver oppløst per liter dH₂O og sterilisert ved autoklaving. Der det er benyttet TSB med 0,5 M sukrose ble 342,3g sukrose løst per liter dH₂O, og en lik mengde av 2x TSB og sukrose blandet.

Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)

Ved tillaging av SOC medium ble 20 g tryptone, 5 g gjærekstrakt, 10 mM NaCl og 2,5 KCl oppløst per liter dH₂O og sterilisert ved autoklaving. Deretter ble 2 mL 1M MgCl₂ og 1 mL 2M glukose (begge løsninger sterilfiltrert) tilsatt.

2. Materialer

2.7 Buffere og løsninger

Tabell 2.6 Buffere, nukleotider og størrelsesstandarder benyttet i arbeidet.

Produktnavn	Produktnummer	Produsent
1 kb DNA størrelsesstandard	N3232	New England BioLabs®
5x Phusion® High Fidelity Reaction Buffer	B0518S	New England BioLabs®
10x CutSmart® Buffer	B7204S	New England BioLabs®
10x T4 Ligase Reaction Buffer	B0202A	New England BioLabs®
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	N0447	New England BioLabs®
Color Protein Broad Range Ladder	P7719S	Spectra™
Nuclei Lysis Solution	A7941	Promega
Protein Precipitation Solution	A7951A	Promega

2.7.1 Oppskrift på buffere til PCR

Staphylococcus lyseringsbuffer

40 mM NaOH og 0,2 % SDS.

2.7.2 Oppskrift på buffere og løsninger til agarose gelelektroforese

50x Tris Acetat EDTA (TAE) buffer

424 g Tris base, 57,1 mL eddiksyre, 100 mL 0,5 M EDTA måles ut og løsningen justeres til 1L med dH₂O.

1 M Tris hydrochloride

15,15 g tris base ble oppløst pr liter dH₂O etterfulgt av en justering til ønsket pH. pH 6,8 eller pH 8,8 ble benyttet.

1% Agarose gel

Til 50 mL TAE buffer ble det veid ut 0,5 g agarosepulver. Løsningen ble kokt i mikrobølgeovn til agarosepulveret var fullstendig oppløst etterfulgt av nedkjøling til ~ 60 °C og tilsetning av 1 µl peqGREEN.

1 kb DNA størrelsesstandard (50mg/ml)

50 µl 1 kb ladder, 200 µL 10x loading buffer og 750 µL dH₂O.

6x Loading buffer

10 mM Tris-HCl med pH 8,0, 1 mM EDTA, 40% Sukrose og 0,01 % Bromfenolblått.

2. Materialer

2.7.3 Løsninger og buffere for SDS-PAGE, farging av gel og Western blotting

Tabell 2.7 Oversikt over løsninger tilsatt for tillaging av 2 stk. 12% separeringsgeler og 4% stacking-geler benyttet under SDS-PAGE i arbeidet.

Løsning	12% separeringsgel ^a	4% stackinggel
ddH ₂ O	4,3 mL	3,15 mL
Tris-hydroklorid (HCl)	2,5 mL (pH 8,8)	1,25 mL (pH 6,8)
10% SDS	0,1 mL	0,05 mL
40% akrylamid + 8% bis-akrylamid	3,0 mL	0,5 mL
Bromfenolblå	-	0,05 mL
10% APS ^b	0,1 mL	0,05 mL
TEMED ^b	0,005 mL	0,005 mL

^a Til 10% separeringsgel er det benyttet 4,78 mL ddH₂O og 2,5 mL 40% akrylamid + 8% bis-akrylamid

^b Ble tilsatt helt til sist

1% SDS running buffer

5g Tris base, 15 g glycin og 1 g natrium dodekyl sulfat (SDS) ble løst per 1 L dH₂O.

TBS-T

10 mM Tris-HCl med pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20 og d H₂O til sluttvolum 1L.

Transferbuffer

3 g Tris-base, 14,4 g glycin og 200 mL metanol ble løst per 1 L dH₂O.

5% skummet melk

1,5 g skummet melkepulver ble oppløst i 30 mL TBS-T.

2x SDS appliseringsbuffer

0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 0,3 M 2% β-2-mercaptoethanol (0,2 M DTT), 20% glyserol og 0,01% bromfenylblått.

Coomassie blue-fargeløsning

For tillaging av et totalt volum på 500 mL av fargeløsningen ble 0,1 g av 0,1% Coomassie blue, 37,5 mL av 7,5% eddiksyre og 250 mL av 50% EtOH blandet.

2.7.4 Løsninger for proteinase K beskyttelsesanalyse

Standard Minimal Medium (SMM)

1 M sukrose, 0,04 M maleinsyre, 0,04 M MgCl₂ x 6H₂O, pH 6,5.

TSM buffer

50 mM Tris-Hcl (pH 7,5), 0,5 M sukrose og 10 mM MgCl₂.

PMSF (protease inhibitor)

PMSF løses i 100 mM isopropanol (17,4 mg/mL). 2x Sample buffer mikses med 4 mM PMSF.

2. Materialer

2.7.5 Løsninger og buffere til preparering av kompetente celler

15% glyserol med 0,1 M kalsiumklorid

Like volum av 30% glyserol og 0,2 M kalsiumklorid ble blandet.

10% glyserol med 0,5 M sukrose

Like volum av 1M sukrose og 20% glyserol ble blandet.

2.7.6 Oppskrift på løsninger og buffere benyttet under mikroskopering

1x Fosfat-buffer saline (PBS) pH 7.4

Ved tillaging av 1x PBS ble 6 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,81 g Na₂HPO₄ x 2H₂O og 0,24 g KH₂PO₄ løst i 800 ml dH₂O. pH ble justert til 7,4 før etterfylling av dH₂O til et sluttvolum 1 L, og løsningen ble sterilisert ved autoklaving.

1,2 % agarose gel

0,12 g Certified Molecular Biology Agarose (Bio-Rad) ble løst i 10 mL 1x PBS ved koking i mikrobølgeovn.

Fikseringsløsning for transmisjonselektronmikroskopi (TEM)

2% paraformaldehyd, 0,1M cacodylate buffer og 1,25% glutaraldehyd.

2.7.7 Oppskrift på løsninger for krystallfiolett biofilmanalyse

Krystallfiolett løsning 10%

En 10% startløsning tillages i 96% etanol.

Krystallfiolett løsning 0,02%

Utgangsløsningen fortynnes videre i dH₂O til 0,02% og sterilfiltreres deretter.

2.7.8 Oppskrift på buffere til kvantifikasjon av proteinaggregater ved SmdA depleksjon

Buffer A with 1% Trion X-100

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8 med 1% Triton X.

Buffer A with 0,5% Triton X-100

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8 med 0,5% Triton X.

Buffer A

50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 8.

Rehydreringsbuffer

7M urea,

2 M thiourea,

4% (wt/v) 3-[(3-cholamidppropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS),

100 mM dithiothreitol (DTT).

2. Materialer

2.8 Instrumenter, ferdige kit og annet bruksutstyr

Tabell 2.8 Liste over instrumenter, ferdige kut og annet bruksutstyr benyttet i arbeidet.

Produktnavn	Modell/produktnummer	Leverandør
96-brønn polystyrene mikrotiter plater	82.1581.001	Sarstedt
Elektroporeringsmaskin	Gene pulser™ eller Micropulser™	Bio-Rad Laboratories
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I	D6943-02	Omega Bio-Tek
FastPrep	FastPrep® 24	MP™ Biomedicals
Gelelektroforese maskin	Mini-Sub Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories
Gel-kamera I	GelDoc™ XR + Imager-1000	BioRad Laboratories
Gel-kamera II	Azure Imager c400	Azure Biosystems
Glasskuler, syrevasket ≤ 106 µm	G4649-100G	Sigma-Aldrich
Immunoblotting transfer system	Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories
Mikroplateleser	Synergy™ H1 Hybrid Reader	BioTek Instruments
Mikroskop I (kamera)	LSM 700 (ORCA-Flash 4.0 V3 Digital CMOS)	Zeiss (Hamamatsu Photonics K.K)
Mikroskop II (kamera)	Morgagni TM 268 (Veleta CCD camera)	FEI Company (Olympus Corporation)
Multispot Microscope Slides PTFE & Specialised coatings		Hendley-Essex
Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up	740609.250	Machnery-Nagel®
PCR-maskin	ProFlex PCR systems	Applied Biodynamics
SDS-PAGE maskin	Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories
Spektrofotometer I	Genesys™ 30	Thermo-Fisher Scientific
Spektrofotometer II	Novaspec® II	Pharmacia Biotech
Spektrofotometer III	NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	34580	Thermo Fischer Scientific

3. Metode

3.1 Dyrking og oppbevaring av *S. aureus* og *E. coli*

Mutantstammer av *S. aureus* og *E. coli* benyttet i forsøkene er listet opp i **Appendiks A1**. *S. aureus* stammer ble som standard dyrket i flytende BHI medie ved 37 °C med risting (200 rpm) eller på BHI agar 1,5% (vekt/volum). Stammer av *E. coli* ble dyrket tilsvarende som for *S. aureus*, men i flytende LB medie eller LB agar (1,5% v/v). For tillaging av seleksjonsmedie ble antibiotika tilsatt etter konsentrasjonene listet opp i **Tabell 2.3**. Ved unntak fra disse dyrkningsmetodene, er dette oppgitt i forsøkets tilhørende metodebeskrivelse. Ved indusering av CRISPRi-systemet eller overuttrykk i *S. aureus* ble 300 µM IPTG benyttet.

Stammer av *S. aureus* og *E. coli* ble oppbevart i glyserolstokker på -80 °C. Glyserolstokkene ble preparert ved at overnattkultur av stammen ble tilsatt glyserol til en konsentrasjon på tilnærmet 15% før de ble fryst ned.

3.1.1 Optisk tetthet (OD)

Optisk tetthet (OD) er et verktøy for å estimere celledetthet i en bakteriekultur. Fra OD-verdien er det mulig å anslå generasjonstid og hvilken vekstfase av livssyklusen cellene befinner seg i. Måling av OD blir gjennomført i et spektrofotometer, der lysstråler sendes gjennom prøven. Differansen mellom lyset sendt inn og ut, angir total mengde lys absorbert. Desto mer lys som absorberes av prøven, jo høyere vil bakteriekonsentrasjon være (Stevenson et al., 2016).

I dette arbeidet ble OD målt ved bølgelengde 600nm (OD₆₀₀). Målingene ble enten gjennomført i kulturrør i GenesysTM 30 (Thermo-Fisher Scientific) eller i kyvette i Novaspec[®] II (Pharmacia Biotech). I begge instrumenter ble medie uten bakterier benyttet som nullprøve. En slik nullstilling av spektrofotometeret er nødvendig for å trekke fra eventuell absorbanse fra mediet som benyttes under målingene.

3.1.2 Predyrking og dyrking av *S. aureus* stammer til eksponentiell vekst

Overnattkulturer av *S. aureus* ble inokulert ved poding fra glyserolstokker i 5 mL flytende medie (tilsatt antibiotika når nødvendig for seleksjon). Som standardmetode for predyrking av stammer ble overnattkultur fortynnet 1:50 i 5 mL flytende BHI tilsatt respektiv antibiotika. Kulturene ble inkubert ristende (200 rpm) ved 37 °C til OD₆₀₀ ~ 0,4. For videre dyrking til eksponentiell vekst ble kulturen fortynnet 1:250 i flytende medie tilsatt antibiotika og eventuelt 300 µM IPTG for å indusere genuttrykk. Kulturene ble inkubert ved 37 °C til OD₆₀₀ ~ 0,3-0,4. OD₆₀₀-verdier ble normalisert for alle prøver før videre trinn i forsøkene.

3. Metode

3.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

3.2.1 Generelt om metoden

Polymerasekjedereaksjon (PCR) er en *in vitro* amplifiseringsmetode som har gjort det mulig å kopiere og isolere ubegrenset mengde av ønsket DNA. Fra oppdagelsen av PCR har metoden vært helt essensiell innen genteknologisk og biologisk forskning (Mullis, 1990; Sjøberg, 2017). I en PCR-reaksjon vil mengden DNA øke eksponentielt. Basert på denne grunnleggende teknikken har flere PCR-metoder blitt videreutviklet og er nå standardteknikker innen områder som kloning og sekvensering samt påvisning og kvantifisering av viktige mikrobielle patogener (Garibyan & Avashia, 2013).

En PCR-reaksjon består av tre temperaturbaserte hovedtrinn; denaturering, hybridisering og elongering. Til amplifisering av det ønskede fragmentet behøves DNA som templat for reaksjonen i tillegg til to primere, deoksynukleotid trifosfat (dNTP) og enzymet DNA polymerase. DNA polymerase behøver primere som binder til templat DNA som et startpunkt for syntesen. Primere er korte DNA-oligoer designet for å binde komplementært opp- og nedstrøms for målsekvensen på leder- og lagtråd. Områdene på hver side av målsekvensen kalles for flankerende DNA, og 5'enden av primeren vil dermed binde til 3'flankerende DNA (Sjøberg, 2017). Polymerase vil syntetisere en komplementær tråd av templatet som en forlengelse av den frie 3'OH-enden til primerne, med de fire ulike dNTP (N=A, T, G, C) som byggesteiner (Sjøberg, 2017).

I det første trinnet skjer denaturering av DNA ved 94-98 °C. Ved smeltepunktet vil hydrogenbindingene mellom dobbeltrådene bli brutt, trådene splittes fra hverandre, og DNA gjøres tilgjengelig som templat (Sjøberg, 2017). Videre i andre trinn vil temperaturen senkes til 40-65 °C, slik at primerne hybridiserer til 5' flankerende område på templattråden. Temperaturen i dette trinnet justeres ut ifra smeltepunktet (T_m) til primerne som benyttes. Smeltepunktet til en primer kan estimeres fra følgende formel (Sjøberg, 2017)

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

I det siste av de tre trinnene, kalt elongering, vil temperaturen igjen økes til rundt 72 °C som er optimumstemperatur for enzymet. DNA polymerase vil binde til primeren og starte syntesen av nytt DNA som en forlengelse av primerne. Etter endt polymerisering vil neste syklus begynne forfra med denaturering av dobbeltrådet DNA. Dobbelttrådet DNA består nå av en templattråd og en ny-syntetisert tråd. Etter et tilstrekkelig antall sykluser vil amplifiserte DNA-fragmenter

3. Metode

som kun består av en sekvens inneholdende målgenet og primersekvensen dominere reaksjonen (Sjøberg, 2017).

Temperaturen og tiden under elongering avhenger av typen polymerase benyttet. **Tabell 3.1** gir en oversikt over de ulike trinnene i en PCR-reaksjon med tilhørende temperatur og tid ut ifra polymerasen benyttet. I dette arbeidet har RedTaq DNA Polymerase 2x Master Mix (VWR Life Science) og Phusion[®] High Fidelity (HF) polymerase (New England BioLabs[®]) blitt benyttet i PCR-reaksjoner. Komponentene mikset sammen i en PCR-reaksjon ved bruk av RedTaq er listet i **Tabell 3.2** og ved bruk av Phusion[®] i **Tabell 3.3**. RedTaq ble benyttet til koloni-PCR og verifikasjon av størrelse på fragmenter, mens Phusion[®] ble brukt til kloning og sekvensering. Phusion[®] er en av de mest presise termostabile DNA polymerasene og gir større sikkerhet i korrekt sekvens i PCR-produktet etter amplifikasjon sammenlignet med RedTaq (New England BioLabs, 2022).

Tabell 3.1 Tabellen viser temperatur, tid og antall sykluser tilhørende trinnene i en PCR-reaksjon.

Trinn	Temperatur (RedTaq/Phusion HF)	Tid	Sykluser
Innledende denaturering	95 °C / 98 °C	5-10 minutter	1x
Denaturering	95 °C / 98 °C	30 sekunder	} 25-30x
Hybridisering	45-72 °C ^a	30 sekunder	
Elongering	72 °C	1 minutt pr kilobase/ 30 sekunder pr kilobase	
Sluttelongering	72 °C	5-10 minutter	1x
Oppbevaring	4 °C	∞	

^a Primerne i dette arbeidet hadde $T_m \sim 60$ °C

Tabell 3.2. Tabellen gir en oversikt over komponentene mikset sammen i en PCR-reaksjon ved bruk av RedTaq[®] 2x Master Mix 1,5 mM MgCl₂.

Komponent	Sluttkonsentrasjon/volum
RedTaq [®] 2x Master Mix 1,5 mM MgCl ₂	2x
10 µM fremover primer	0,2 µM
10 µM revers primer	0,2 µM
DNA	2 - 4 µL
dH ₂ O	Til et sluttvolum på 10 µL

3. Metode

Tabell 3.3 Tabellen gir en oversikt over komponentene mikset sammen i en PCR-reaksjon ved bruk av Phusion® High Fidelity Polymerase.

Komponent	Sluttkonsentrasjon/volum
5x Phusion® High Fidelity Reaction Buffer	1x
10 mM dNTPer	200 µM
10 µM fremover primer	0,5 µM
10 µM revers primer	0,5 µM
Templat DNA	< 200 ng
Phusion® High Fidelity (HF) Polymerase	0,5 µL
dH ₂ O	Til et sluttvolum 50 µL

3.2.2 Koloni-PCR

Koloni-PCR gjennomføres for å verifisere tilstedeværelsen av plasmid i transformanter. Cellene vil lyses slik at DNA blir frigjort, og deretter settes det opp en PCR-reaksjon med en kombinasjon av plasmidspesifikke primere. Denne metoden har blitt benyttet både på *E. coli* og *S. aureus* i dette arbeidet. I første steg ble cellene lysert, der kolonier ble plukket med en tannpirker eller det ble benyttet 2 µL fra overnattkultur. Kolonier av *E. coli* ble plukket til 10 µL dH₂O og kokt i mikrobølgeovn ved maksimal effekt i 3 minutter. Kolonier av *S. aureus* ble løst i 10 µL *Staphylococcus* lyseringsbuffer (oppskrift **Seksjon 2.7.1**) før de ble kokt tilsvarende, og lysatet ble fortynnet med 200 µL dH₂O. Fra begge stammer ble 2 µL lysat benyttet i en PCR-reaksjon med RedTaq (oppsett i **Tabell 3.2**).

Dersom det oppstod problemer med lyseringen av *S. aureus*, ble cellene forsøkt mekanisk lysert i FastPrep® 24 (MP™ Biomedicals) med syrevaskede ≤ 106 µm glasskuler (Sigma-Aldrich). I disse tilfellene ble 2 mL overnattkultur pelletert ved maks hastighet i 5 minutter, før pelleten ble resuspendert i 400 µL Solution I fra E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek). Løsningen ble overført til 0,5 g av glasskulene, og det ble kjørt FastPrep ved hastighet 6,0 m/s i 2x 20 sekunder. I tilfeller der koloni-PCR ikke ga produkt, ble det i tillegg gjennomført plasmidisolering før koloni-PCR som beskrevet i **Seksjon 3.5**.

3. Metode

3.3 Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er et raskt og effektivt verktøy for å separere nukleinsyrer. Under metoden appliseres prøvene i en agarosegel, der prøvene vil vandre gjennom et elektrisk felt mot den positive polen. Konsentrasjonen på gelen avgjør størrelsen på porene i gelen, og dermed hvor mye motstandsdyktighet molekylene får. Høyere konsentrasjon av agarose resulterer i mindre porestørrelse (Lee et al., 2012; Sjøberg, 2017). Som en følge av dette vil større molekyler vandre kortere enn de små. I dette arbeidet har agarose gelelektroforese blitt benyttet til å separere DNA-fragmenter, og kontrollere at disse har korrekt størrelse. Sammen med prøvene appliseres en størrelsesmarkør, hvor fragmenter med lik størrelse vandrer likt og dermed gjør det mulig å anslå størrelse på DNA-molekylene. For detektering av DNA har det fluorescerende stoffet peqGREEN blitt tilsatt i agarosegelen. peqGREEN binder til DNA-molekyler og vil fluorescere ved eksponering under UV-lys.

I arbeidet ble det benyttet 1% agarose-gel tilsatt peqGREEN laget etter oppskrift i **Seksjon 2.7.2**. Løsningen ble helt i støpekar med tilhørende kammer som danner brønner for prøveapplikasjon. Etter gelen var stivnet ved romtemperatur, ble kammer fjernet og gelen plassert i et gelelektroforesekammer (Mini-Sub Cell GT Cell) med TAE buffer (oppskrift **Seksjon 2.7.2**) i et volum som dekket overflaten av gelen. Før PCR-produktet ble applisert i brønnene ble det tilsatt en loading-dye til prøvene. Loading-dye inneholder bromfenolblått (for visualisering av hvordan prøvene vandrer) og glyserol (for å skape høyere tetthet slik at prøven synker til bunn av brønnen). I prøver der amplifikasjon ble gjennomført med 5x Phusion[®] High Fidelity Reaction Buffer ble det tilsatt 6x Loading buffer (oppskrift **Seksjon 2.7.2**) før applisering. Ved bruk av Red Taq Master Mix til amplifikasjon ble prøvene direkte applisert i brønnene, da mixen allerede inneholder 2x rød loading-dye. I tillegg til PCR-produkt ble en 1 kb DNA størrelsesstandard (New England BioLabs[®]) applisert som en standard for molekylstørrelser. En slik markør inneholder fragmenter med forhåndsbestemt størrelse og vil vandre gjennom det elektriske feltet parallelt med prøvene. Størrelsesstandarder er utgangspunktet for et størrelsesanslag på fragmentene i prøven applisert. Gelelektroforesen ble gjennomført ved 90V i 15-30 min etterfulgt av visualisering i en GelDoc-1000 (Bio-Rad Laboratories).

3.3.1 Ekstrahering av DNA fra agarosegel

Ekstrahering av DNA fra agarosegel ble gjennomført for å isolere og rense et PCR-produkt fra primere, enzymer og andre kontaminanter. Etter rensing kan fragmentet fra gel benyttes videre som templat for sekvensering eller til restriksjonskutting og ligering. Til rensingen ble

3. Metode

Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up (Machnery-Nagel®) benyttet, og protokoll er fulgt i henhold til medfølgende brukermanual. Kitet inneholder tre ulike buffere. NTI-buffer inneholder høy saltkonsentrasjon som skaper et hydrofobt miljø og optimale bindingsforhold til silica-membranen for DNA. For fjerning av kontaminanter ble NT3-buffer benyttet. NE elueringsbuffer vil eluere DNA festet til silica-membranen. Underveis i rensesegene benyttes en Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up kolonne med en silica-membran, et oppsamlingsrør samt eppendorfrør.

Etter gelelektroforese, ble DNA-fragmenter visualisert under UV-lys og båndet med korrekt størrelse kuttet ut med en skalpell. Eksponeringstiden for UV-lys var minst mulig, da strålingen kan skade DNA. Agarosen-biten ble oppløst i 200 µL NTI buffer pr 100 mg agarosegel ved 55 °C. Løsningen ble deretter overført til en kolonne plassert i et 2 mL oppsamlingsrør, og sentrifugert på 11 000 x g i 30 sekunder. Etter fullført sentrifugering ble alltid oppsamlingsrøret tømt. Kolonnen ble vasket ved tilsetning av 700 µL NT3 buffer etterfulgt av sentrifugering på 11 000 x g i 30 sekunder. En ekstra sentrifugering av tom kolonne ved samme hastighet i 1 minutt ble gjennomført for å tørke silica-membranen. Tørkingen er viktig for å fjerne gjenværende etanol som kan forhindre senere reaksjoner. I siste trinn ble kolonnen overført til et nytt eppendorf rør, og tilsatt 15-30 µL NE elueringsbuffer før en sentrifugering på 11 000 x g i 1 minutt. DNA-konsentrasjonen ble målt i NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

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

I en SDS-PAGE separeres proteiner i et elektrisk felt basert på størrelse. I metoden tilsettes detergenten Natrium dodekyl sulfat (SDS) til prøvene, som fører til at proteinene mister både sin opprinnelige form og ladning. Denatureringen skjer ved at SDS binder hydrofobt til proteinet og samtidig dekker proteinets overflate. Da den hydrofile delen av SDS har negativ ladning, vil proteinet få en jevn negativ ladning (Sjøberg, 2017). En polyakrylamid-gel benyttes til separering av proteinene, hvor konsentrasjonen av akrylamid vil avgjøre porestørrelsen. De lineariserte molekyler vil vandre mot den positive polen i det elektriske feltet, der molekylerne med lavest molekylærmasse vil vandre lengst. Årsaken er at porene i polyakrylamid-gelen gir mindre motstand og dermed påvirker mobiliteten til molekyler med lav masse i mindre grad enn de med stor (Sjøberg, 2017). Det appliseres en størrelsesmarkør med prøvene, hvor proteinet med lik størrelse vandrer likt og dermed gjør det mulig å anslå størrelse på proteinene.

3. Metode

Til en SDS-PAGE tillages det to separate gelløsninger, som sammen utgjør gelen som benyttes. Øvre del av gelen der prøvene appliseres, kalt stacking-gel (4%), vil ha en større porestørrelse enn separeringsgelen som utgjør nedre del (12%). Stacking-gelen benyttes for å konsentrere den appliserte prøven før den vandrer gjennom separeringsgelen i det elektriske feltet. Som forberedelse ble glassplater til støping av gel rengjort og sjekket for lekkasje, deretter montert i støperammer. Oppskrifter på gelene er beskrevet i **Tabell 2.7**. Løsningene til separasjonsgelen ble blandet, og 3,2 mL ble deretter applisert til de monterte glassplatene. Toppen av gelløsningen ble fylt opp med dH₂O til kanten av glassplatene. Gelen polymeriserte i 15-20 min, før vannet ble helt av. Løsningene til stacking-gel ble blandet sammen og applisert på toppen av separasjonsgelen mellom glassplatene. Det ble plassert kammer i stackinggelen for prøveapplikasjon og gelen stivnet/polymeriserte i 15-20 min. Deretter ble kammer fjernet og glassplater med polymerisert gel flyttet fra støperammen til et Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) gelkammer. I kammeret ble det fylt opp 1% SDS running buffer, og alle brønner i stacking-gel ble vasket med bufferen for å fjerne eventuell kontaminering.

Før applisering av prøvene på gel, ble prøvene tilsatt 2x SDS appliseringsbuffer i 1:1 forhold (oppskrift **Seksjon 2.7.3**) av prøvevolumet og kokt ved 95 °C i 5 minutter. I tillegg til 20 µL av prøvene, ble 5 µL av en størrelsesstandard Color Protein Broad Range Ladder (Spectra™) applisert i en egen brønn for størrelsesanslag for separerte proteiner. SDS-PAGE ble gjennomført ved 90 V frem til prøvene vandret ned til separasjonsgelen, og justert opp til 200 V frem til blåfronten vandret ut av gelen.

Separerte proteiner i SDS-PAGE ble visualisert enten ved Western blotting (**Seksjon 3.4.1**) eller ved Coomassie blue farging (**Seksjon 3.4.2**).

3.4.1 Western blotting

Western blotting, også kjent som immunoblotting, er en metode for å detektere spesifikke proteinmolekyler gjennom visualisering med antistoff. Proteinene blir separert ved en SDS-PAGE, og deretter overført til en mikroporemembran av enten nitrocellulose eller PVDF gjennom en prosess kalt (elektro)blotting (Kurien & Scofield, 2015). Membranen blir videre blokket for å hindre uspesifikk binding av antistoff før inkubasjon med primært og sekundært antistoff (Kurien & Scofield, 2015). Etter inkubering med primært antistoff som binder spesifikt til målproteinet, vil membranen vaskes før videre inkubasjon i sekundært antistoff. Det sekundære antistoffet gjenkjenner og binder til det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er konjugert til et enzym som gjør det mulig å indirekte visualisere målproteinet med fluorescens. Da ubundet antistoff blir vasket vekk er det kun antistoffbundet proteinet av

3. Metode

interesse som vil detekteres ved fremkalling (Kurien & Scofield, 2015; Ni et al., 2017). I dette arbeidet ble Western blotting gjennomført for å visualisere proteiner med N-terminalbunden GFP som en del av Proteinase K beskyttelsesanalyse (metodebeskrivelse i **Seksjon 3.10**).

Til Western blotting ble en PVDF-membran benyttet samt to filterpapir som ble tilpasset størrelsen på gelen. PVDF-membranen ble aktivert i metanol i 1 minutt etterfulgt av tre vasketrinn i dH₂O. Membranen, filterpapirene og gelen ble så plassert i en kald transferbuffer. Western blottingen ble gjennomført i Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad Laboratories). I systemet ble et filterpapir plassert på anodeplaten, etterfulgt av gelen og det andre filterpapiret. For å unngå luftbobler mellom lagene som kan forstyrre proteinoverføring, ble det lagt et lett press over siste filterpapir før katodeplaten ble plassert på toppen. Blottingen ble gjennomført ved 25V i 7 minutter. Membranen ble videre blokket i 30 mL 5% skummet melk (**Seksjon 2.7.3**) ved romtemperatur på et vippebord, før membranen ble blokket ved 4 °C over natt.

Påfølgende dag ble melken helt av, og membranen vasket tre omganger i dH₂O. Deretter ble den vasket tre ganger med TBS-T (**Seksjon 2.7.3**). Membranen ble inkubert i en time ved romtemperatur på vippebord med anti-GFP primært antistoff (fortynnet 1:1000 i TBS-T). For å fjerne overflødig ubundet antistoff ble membranens vasket i tre omganger av 10 minutter ved inkubering i TBS-T på vippebord. Videre ble membranens inkubert i en time med anti-Rabbit sekundært antistoff (fortynnet 1:1000 i TBS-T). Etter inkubering med sekundært antistoff ble ubundet antistoff fjernet fra membranens gjennom fire vasketrinn av 10 minutter i TBS-T på vippebord. SuperSignalTM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific) ble benyttet til fremkalling av proteiner i membranens. Løsningene detekterer det sekundære antistoffet som er konjugert til horseradish peroxidase (HRP). Fra hver av Stable Peroxide Solution og Luminol/Enhancer Solution ble 2,5 mL overført til membranens og inkubert i 3-5 minutter. Azure Imager c400 (Azure Biosystems) ble benyttet for bildetaking og visualisering av proteiner i membranens.

3.4.2 Visualisering av separerte proteiner i SDS-PAGE med Coomassie blue farging

For visualisering av separerte proteiner ble gelen overført til et kar med Coomassie brilliant blue løsning (**Seksjon 2.7.3**). Løsningen ble varmet opp til kokepunktet i mikrobølgeovn, før karet med gelen ble plassert på et vippebord og gelen ble farget i 10 minutter. Etter endt fargeprosess, ble overflødig fargeløsning fjernet ved å skylle gelen i vann og gelen ble videre inkubert i avfargingsløsning i ytterligere 60 minutter. Gelen med separerte proteiner ble avbildet i Azure Imager c400 (Azure Biosystems).

3. Metode

3.5 Isolering og rensing av plasmid DNA

For plasmidisolering fra *E. coli* og *S. aureus* ble E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek) benyttet. Isolering av plasmid ble gjennomført etter settets tilhørende fremgangsmetode fra produsent. Settet inneholder en HiBind® kolonne hvor silica-membranen i kolonnen vil binde DNA, og gjør det mulig å rense DNA før det til slutt elueres. Plasmid fra *E. coli* ble benyttet til transformasjon eller sekvensering, mens plasmid fra *S. aureus* ble benyttet i koloni-PCR dersom denne var problematisk.

Til isolering av plasmid fra *E. coli* ble 1-5 mL av overnattekultur sentrifugert ved 10 000 x g i 1 minutt. Cellepellet ble videre resuspendert i 250 µL Solution I blandet med RNase A for degradering av tilstedeværende RNA. Suspensjonen ble overført til et nytt 1,5 mL Eppendorf-rør. For lysing av cellene ble 250 µL Solution II tilsatt, etterfulgt av invertering av Eppendorf-røret frem til et klart lysat. For nøytralisering av surt lysat ble 350 µL Solution III tilsatt. Nøytralisering av lysatet resulterer i en utfelling av genomisk DNA og annet avfall etter lysing, mens plasmid DNA forblir i løsningen. Pelletering av utfellingen ble gjennomført ved sentrifugering på maks hastighet ($\geq 13\ 000 \times g$) i 10 minutter. Før videre rensing av plasmid, ble en HiBind® kolonne ekvilibrert ved tilsetning av 50 µL ekvibreringsbuffer til kolonnen og sentrifugert ved maks hastighet i 1 minutt. Det klare lysatet ble overført til kolonnen og sentrifugert på maks hastighet i 1 minutt. Filtratet ble dekantert, før 500 µL HBC buffer ble tilsatt til kolonnen for å binde plasmid DNA til silica-membranen. DNA bundet til kolonnen ble vasket i to omganger med DNA Wash Buffer. Kolonnen ble tørket under sentrifugering ved maks hastighet i 2 minutter, og overført til et nytt Eppendorf-rør. Tørkingen ble gjennomført for å fjerne etanol fra membranen, da denne kan ødelegge elueringsprosessen. 30-100 µL elueringsbuffer ble tilsatt direkte til membranen i kolonnen, og plasmid DNA ble eluert under sentrifugering ved maks hastighet i 1 minutt. DNA-konsentrasjon i eluatet ble målt ved bruk av NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific). Det isolerte plasmidet ble oppbevart ved -20 °C.

Celler av *S. aureus* kan være vanskeligere å lysere sammenlignet med *E. coli*, da bakteriearten er Gram-positiv og har et tykkere peptidoglykanlag. Lysing med Solution II vil ikke være tilstrekkelig i *S. aureus*, og det ble derfor gjennomført mekanisk lysing av cellene. 3-5 mL overnattekultur ble sentrifugert ved maks hastighet i 3-5 minutter, før pellet ble resuspendert i 400 µL Solution I. Løsningen ble overført til 0,5 g av syrevaskede glasskuler $\leq 106 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich), og kjørt ved 6,0 m/s i 20 sekunder. Rørene ble sentrifugert ved maks hastighet i 3-5

3. Metode

minutter. Lysatet ble overført til nye 1,5 mL Eppendorf-rør, før fortsettelse med isoleringsprotokoll som beskrevet tidligere.

3.6 Konstruksjon av plasmid ved restriksjonskutting og ligering

Restriksjonskutting og ligering er to viktige teknikker innenfor genteknologi for å konstruere plasmid-DNA (Sjøberg, 2017). Restriksjonsenzymene er sekvensspesifikke endonukleaser som gjenkjenner og kutter i bestemte nukleotidsekvenser, kalt restriksjonssteder. Setene er palindromsekvenser på normalt på 4 eller 6 baser som dermed er like når de leses i 5'-3' retning (Sjøberg, 2017). Restriksjonsenzymene kutter ofte DNA slik at det oppstår et overheng med enkeltrådig DNA. Et restriksjonsenzym vil alltid skape det samme overhengen, hvor overhengene er komplementære til hverandre og refereres derfor ofte til som klebrige ender (Sjøberg, 2017). I en ligeringsreaksjon med enzymet DNA ligase vil DNA-fragmenter med samme overheng kunne festes sammen. Under kloning av DNA gjør restriksjonsenzymet det mulig å kutte ut ønsket DNA-sekvens. Både DNA-sekvensen og plasmidet kuttes med samme restriksjonsenzymet for å skape kompatible klebrige ender. DNA ligase vil under ligeringsreaksjonen feste de klebrige endene sammen som resulterer i et ferdig konstrukt. I dette arbeidet ble restriksjonskutting og ligering benyttet for å konstruere nye plasmider.

3.6.1 Restriksjonskutting og ligering

Restriksjonskutting av det ønskede fragmentet og plasmid ble gjennomført ved å mikse komponentene listet i **Tabell 3.4**. Prøvene ble så plassert i 1,5 time på 37 °C vannbad. Etter 1 time inkubering ble alkalisk fosfatase Calf Intestinal (CIP) (New England BioLabs®) tilsatt til kuttreaksjonen av plasmid. Enzymet defosforylerer 5' fosfatgrupper, og forhindrer at kuttet plasmid vil re-ligere (Tabor, 2001). Etter inkubering ble agarose gelelektroforese (**Seksjon 3.3**) benyttet for separering og verifikasjon av størrelse på fragmentene, etterfulgt av rensing med NucleoSpin® Gel og PCR Clean-up som beskrevet i **Seksjon 3.3.1**.

Tabell 3.4 Oversikt over komponenter tilsatt i en kuttreaksjon med restriksjonsenzymet.

Komponent	Sluttkonsentrasjon/volum
DNA	1 µg
10x CutSmart® Buffer (New England BioLabs)	1x/3 µL
Restriksjonsenzym ^a	1 µL
dH ₂ O	Til et sluttvolum 30 µL

^a Ved bruk av to restriksjonsenzymet er det tilsatt 1 µL av hvert enzym

3. Metode

Etter rensing ble innsettelsesfragment og plasmid mikset sammen med T4 DNA ligase, T4 ligase buffer og dH₂O for ligering som vist i **Tabell 3.5**. Innsettelsesfragment og plasmid ble tilsatt i forholdet 5:1, da overflødighet av fragment gir en større sjanse for at plasmidet liggeres med fragmentet og hindrer ligering av tomt plasmid. Ligeringsmiksen ble inkubert ved 16 °C over natt. Ligerte plasmid ble holdt på is før transformasjon inn i *E. coli* IM08B (se **Seksjon 3.7.2**) eller oppbevart ved -20 °C frem til bruk.

Tabell 3.5 Oversikt over komponentene tilsatt i en ligeringsreaksjon med T4 DNA ligase.

Komponent	Sluttkonsentrasjon/volum
Vektor DNA	-
Innsettelsesfragment/PCR-produkt	-
T4 DNA ligase (New England BioLabs®)	1 µL
10x T4 Ligase Reaction Buffer (New England BioLabs®)	2 µL
dH ₂ O	Til et sluttvolum 20 µL

3.6.2 Konstruksjon av pIMAY-*smdA*::*spc*

Det temperatursensitive plasmidet pIMAY-*smdA*::*spc* ble konstruert for delesjon av *smdA* gjennom homolog rekombinasjon (se **Seksjon 3.8.3**). pIMAY-*smdA*::*spc* ble konstruert ved restriksjonskutting og ligering med utgangspunkt i et tidligere konstruert plasmid pMAD- Δ *smdA*::*spc* (konstruert av Dr. Ine Myrbråten). Både pMAD og pIMAY ble isolert og rensset fra *E. coli* IM08B celler som beskrevet i **Seksjon 3.5**. Begge plasmidene ble kuttet med restriksjonsenzymene Sall HF og EcoRI HF for å skape kompatible klebrige ender med komplementært overheng. Klebrige ender gjør det mulig å ligere *spc*-resistensgenet fra pMAD-vektor inn i pIMAY-vektoren. Restriksjonskutting og ligering ble gjennomført som tidligere beskrevet i **Seksjon 3.6.1**. Innsettelsesfragmentet ble etter restriksjonskutting rensset fra agarose gelelektroforese (**Seksjon 3.3.1**) med en forventet størrelse på 2,3 kb. For verifikasjon ble pIMAY-*smdA*::*spc* sendt til DNA-sekvensering som beskrevet i **Seksjon 3.14**. Videre ble plasmidet transformert inn i *E. coli* IM08B celler (**Seksjon 3.7.2**) og deretter inn i *S. aureus* NCTC8325-4 (**Seksjon 3.8.2**).

3. Metode

3.7 Transformasjon av *E. coli*

E. coli IM08B ble benyttet som vert for plasmider konstruert i arbeidet. Da *E. coli* ikke er naturlig kompetent og kan ta opp fremmed DNA fra omgivelsene, må cellene gjøres kjemisk kompetente. For tillaging av kjemisk kompetente IM08B celler ble CaCl₂ varmesjokktransformasjon benyttet. I metoden behandles cellene med CaCl₂ ved lav temperatur. Ca²⁺ ioner er vist å øke permeabiliteten, og vil sammen med det raske temperaturskiftet forstyrre cellemembranen slik at opptak av ukjent plasmid-DNA fasiliteres (Chang et al., 2017; Sjøberg, 2017). Den eksakte mekanismen til Ca²⁺ ioner er ikke kjent. I dette arbeidet ble pIMAY-*smdA*::*spc* og pLOW-dCas9(*P_{clpB}*-luc-gfp) transformert inn i IM08B celler, før isolering av plasmidene og videre transformasjon inn i *S. aureus*.

3.7.1 Kalsiumklorid-behandling for tillaging av kjemisk kompetente *E. coli* celler

IM08B-celler ble dyrket overnatt i 5 mL flytende LB medium ved 37 °C. Kulturen ble fortynnet til OD₆₀₀ 0,05 i nytt flytende LB medium (tilsatt antibiotika når nødvendig) og dyrket til OD₆₀₀ ~ 0,4. Cellene ble avkjølt på is i 20 min, før pelletering ved sentrifugering på 6000 rpm i 5 minutter på 4 °C. Alle videre trinn ble gjennomført på 4 °C og cellene ble holdt på is mellom trinnene. Supernatant ble dekantert, og cellene resuspendert i 1/2 av kulturvolumet i 0,1 M CaCl₂. Cellene ble så holdt på is i 2 timer. Cellene ble isolert ved sentrifugering 4000 rpm i 5 minutter og resuspendert i 1/10 av kulturvolumet i 0,1 M CaCl₂ med 15% glyserol. Kompetente celler ble alikvotert i Eppendorf-rør og oppbevart på -80 °C.

3.7.2 Varmesjokktransformasjon

For varmesjokktransformasjon ble 10-14 µL plasmid tilsatt til 40 µL IM08B celler holdt på is. Rørene ble holdt 30 minutter på is, før de ble plassert i et 42 °C vannbad i 30 sekunder og deretter ble holdt ytterligere 1 minutt på is. Det ble tilsatt 250 µL SOC medium til rørene som ble inkubert i 1 time på 37 °C ristende. Prøven ble platet ut på LB agarskåler tilsatt 100 µg/ml ampicillin som seleksjonsmarkør for transformanter. Påfølgende dag ble transformanter analysert ved koloni-PCR (Seksjon 3.2.2) og eventuell sekvensering av plasmidet (se Seksjon 3.14).

3.8 Transformasjon i *S. aureus*

Slik som tidligere beskrevet for *E. coli*, er ikke *S. aureus* naturlig kompetent og har dermed ikke evnen til å ta opp fremmed DNA fra omgivelsene. Elektroporering brukes til å introdusere plasmid-DNA inn i *S. aureus*. Under elektroporering utsettes cellene for en elektrisk puls som

3. Metode

skaper porer i cellemembranen, og denne midlertidige permeabiliteten fører til at plasmidet kan krysse den fysiske barrieren (Kumar et al., 2019).

3.8.1 Tillaging elektrokompetente celler av *S. aureus*

Fra overnattekultur (**Seksjon 3.1.2**) ble kulturen fortynnet 1:100 i 100 mL flytende BHI (20 mL kobler) tilsatt respektiv antibiotika. Kulturen ble inkubert ristende (200 rpm) ved 37 °C frem til en OD₆₀₀ 0,4-0,6. Ved riktig OD ble kulturen avkjølt på is i 10 minutter, før celler ble isolert fra 2 x 40 mL kultur (Nunc-rør) ved sentrifugering 5000 rpm i 10 minutter ved 4 °C. Alle videre trinn ble gjennomført med cellene på is eller ved 4 °C. Pelleter ble resuspendert i 25 mL kald steril dH₂O og sentrifugert ved 5000 rpm i 5 minutter. Det ble totalt gjennomført totalt tre vasketrinn i steril dH₂O (25 mL) og ytterligere tre trinn i steril 10% glycerol (25 mL). Etter siste sentrifugering ble begge pelleter resuspendert i 10% glyserol tilsatt 0,5 M sukrose og deretter slått sammen. Elektrokompetente celler ble alikvotert i Eppendorf-rør og oppbevart ved -80 °C.

3.8.2 Elektroporering

Elektrokompetente celler, isolert plasmid og 1 mm elektroporeringskyvette ble holdt på is. 500/750-1000 ng plasmid ble overført til 50 µL elektrokompetente celler, før løsningen ble overført til kyvetten og elektroporeringen ble gjennomført på 2,1 V, 100 Ω og 25 µF. Etter gjennomført elektroporering ble 950 µL flytende Tryptic Soy Broth (TSB) med 0,5 M sukrose tilsatt for å skape optimale forhold. Dersom den elektroporete stammen allerede hadde et annet plasmid, ble respektiv antibiotika tilsatt sammen med TSB. Cellene ble inkubert ristende ved 37 °C i minst 2 timer, før de ble platet ut på agarskåler med BHI tilsatt antibiotika. Agarskålene ble inkubert ved 37 °C over natt, og transformanter ble verifisert av koloni PCR (**Seksjon 3.2.2**).

3.8.3 Genetisk modifisering av *S. aureus* ved bruk av pIMAY vektor

I arbeidet ble det forsøkt laget en *smdA*-delesjonsmutant ved bruk av den temperatursensitive vektoren pIMAY (Monk et al., 2012). Den konstruerte vektoren pIMAY-*smdA*::*spc* har innsatt resistensmarkører for kloramfenikol og spektinomycin, hvor det er klonet inn oppstrøms og nedstrøms deler av *smdA* på hver side av markøren for spektinomycin. Vektoren er temperatursensitiv ved 37 °C, og vil slutte å replikere ved denne temperaturen og dermed bli integrert inn i vertskromosomet. Under integreringen vil det forekomme en dobbeloverkrysning mellom de homologe regionene på hver side av *smdA* og *spc*. Metoden resulterer i at *smdA* erstattes kromosomalt av resistensgenet for spektinomycin.

3. Metode

Fremgangsmetoden er modifisert fra Monk et al. (2012). Vektor pIMAY-*smdA::spc* (**Seksjon 3.6.2**) ble transformert inn i *E. coli* IM08B (**Seksjon 3.7.2**) og videre inn i *S. aureus* NCTC8325-4 villtype (**Seksjon 3.8.2**). Annerledes fra beskrevet fremgangsmetode, ble elektroporererte celler inkubert ristende ved 28 °C i 3-4 timer. Etter ferdig inkubasjon ble transformasjonen platet ut på BHI agarskåler tilsatt kloramfenikol (10 µg/mL). Skålene ble inkubert ved 28 °C i 48 timer. Transformanter på skålene ble plukket og homogenisert i 100 µL TSB. Løsningen ble fortynnet 1:1000. 1 µL og 100 µL av fortynningen ble platet ut på BHI agarskåler tilsatt kloramfenikol (10 µg/mL). Agarskålene ble inkubert ved 37 °C over natt, hvor det var forventet at integrasjon av vektoren skulle forekomme. Påfølgende dag ble det gjennomført koloni-PCR (**Seksjon 3.2.2**) med primere i flankerende områder som en kontroll på at ekstrakromosomalt plasmid var borte. Som et ekstra trinn ble en stor koloni re-strøket på en agarskål BHI tilsatt kloramfenikol (10 µg/µL) og inkubert ved 37 °C over natt. Det ble gjennomført PCR med genspesifikke primere for å undersøke om integrasjonen var oppstrøms eller nedstrøms for *smdA*. Kolonier av begge integrasjonstyper ble plukket og dyrket i flytende BHI uten antibiotika ved 28 °C. Kulturene ble platet ut på BHI agarskåler tilsatt aTc (1 µg/mL) og inkubert ved 28 °C i 48 timer.

3.9 Bakterielle vekstanalyser

Bakterielle vekstanalyser kan gi nyttig informasjon om hvordan genetisk variasjon og ytre faktorer påvirker celledeling. I dette arbeidet ble det gjennomført to ulike vekstanalyser. Den ene metoden baserer seg på måling av OD₆₀₀ over et gitt tidsintervall, som gjør det mulig å følge utviklingen av vekst over en periode. I den andre metoden ble fortynningsrekker av kulturer avsatt på agarskåler for å studere vekst ved ulike temperaturer.

3.9.1 Bakteriell vekstanalyse (optisk tetthet)

Prøver til vekstanalyse med måling av optisk tetthet (OD) ble forberedt med predyrking og 1:250 fortynning som beskrevet i **Seksjon 3.1.2**. Fra hver fortynning ble 280 µL overført til seks brønner i en 96-brønns mikrotiterplate, hvorav 3 brønner ble tilsatt 300 µM IPTG. Alle tomme brønner i mikrotiterplaten ble fylt med dH₂O og flytende BHI ble benyttet som blankprøve. OD ble målt ved bruk av SynergyTM H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments), hvor OD₆₀₀ ble avlest hvert 10 minutt, inkludert risting før hver måling, i totalt 20 timer på 37 °C.

3. Metode

3.9.2 Bakteriell vekstanalyse (spotting)

Kulturer til vekstanalyse med spotting ble forberedt som beskrevet i **Seksjon 3.1.2** med predyrking og 1:250 fortykning av alle prøver. Etter prøvene hadde vokst til eksponentiell fase, ble OD₆₀₀ justert likt for alle prøver. Videre ble det laget fortykningsserier 10⁻¹ - 10⁻⁶ i flytende BHI av alle prøver. Seriene, inkludert ufortynnet prøve, ble deretter spottet på BHI agarskåler tilsatt antibiotika og eventuelt IPTG 300 µM. Spotting ble gjennomført ved avsetting av 2 µL fra hver fortykning punktvis på skålen med jevn avstand mellom punktene.

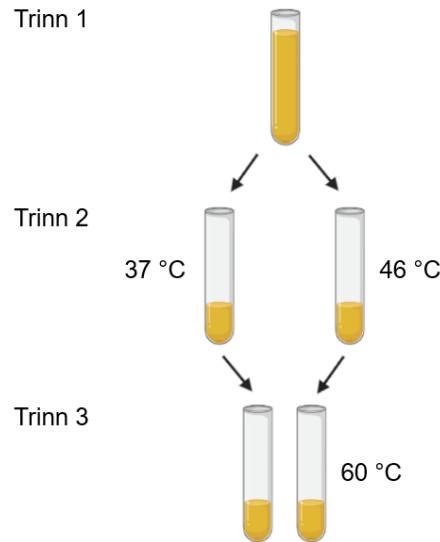
3.9.2.1 Temperaturpåvirkning på vekst ved overuttrykk og depleksjon av SmdA

Til vekstanalyse med SmdA overuttrykk ble erytromycin (5 µg/mL) benyttet som seleksjonsmarkør, og i CRISPRi stammer med SmdA depleksjon ble erytromycin (5 µg/mL) og kloramfenikol (10 µg/mL) benyttet. Genuttrykk i alle stammer ble induisert med 300 µM IPTG etter 1:250 fortykningen, og i BHI agarskåler. Etter spotting ble agarskåler inkubert ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C grader i ~ 17 timer. Etter endt inkuberingstid ble skåler avbildet i GelDocTM XR + Imager-1000 (BioRad Laboratories).

3.9.2.2 Indusering av termotoleranse ved SmdA depleksjon

Protokoll for forsøket er utarbeidet fra Frees et al. (2004). Oppsett og forberedelse av prøver er beskrevet tidligere i **Seksjon 3.1.2**. Videre trinn er presentert i **Figur 3.1**. Etter OD-verdier var normalisert, ble hver kultur splittet i to like deler. Den ene halvdel ble fortsatt dyrket ved 37 °C ristende i 30 minutter og andre halvpart på 46 °C i 30 minutter. Videre ble begge kulturer eksponert for 60 °C vannbad i 7 minutter. Kulturene ble så plassert på is, før det ble tillaget fortykningsserier som beskrevet i **Seksjon 3.9.2**. Seriene ble spottet på BHI agarskåler tilsatt 5 µg/mL erytromycin, 10 µg/mL kloramfenikol og 300 µM IPTG. Skålene ble inkubert på 37 °C i ~17 timer.

3. Metode



Figur 3.1 Skjematisk fremstilling av inkubasjonstrinn ved indusering av termotoleranse. Reagensrørene i figuren representerer kultur fra samme stamme. De tre trinnene presentert ble gjennomført for alle stammer inkludert i forsøket. (**Trinn 1**) kulturen dyrkes ved 37 °C frem til OD_{600} 0,4 (\pm 0,1) og OD-verdier normaliseres for alle stammer i forsøket. (**Trinn 2**) kulturen splittes i to like halvdel, der ene halvpart blir videre inkubert ved 37 °C i 30 minutter og andre halvpart blir inkubert ved 46 °C i tilsvarende 30 minutter. (**Trinn 3**) Begge kulturer ble så inkubert ved 60 °C i 7 minutter og deretter plassert på is. Figuren er laget med biorender.com.

3.10 Proteinase K beskyttelsesanalyse for verifikasjon av SmdA

membranorientering

I cellemembranen finnes det en rekke membranproteiner med ulike funksjoner, hvor lokalisering og orientering i forhold til hverandre er viktig for biologiske prosesser (Weihs et al., 2018). Fusjonering av fluorescerende molekyler til membranproteiner gjør det mulig å studere subcellulær lokalisering under celledeling, men kan også gi informasjon om orientering i membranen. I dette arbeidet ble green fluorescent protein (GFP) benyttet med enzymet proteinase K, for å mulig verifisere membranorienteringen til SmdA. I metoden ble både C- og N-terminalen av SmdA fusjonert til GFP, hvor det fusjonerte proteinet ble uttrykt fra plasmidet pLOW. Det ble dannet protoplaster ved behandling med lysostaphin som spalter kryssbindinger i peptidoglykan, og dermed fjerner celleveggen fra celler av *S. aureus* (Gründling & Schneewind, 2006). Proteinase K er et proteolytisk enzym som hydrolyserer peptidbindinger. Dersom GFP er eksponert på utsiden av protoplasten, vil enzymet bryte ned GFP proteinet og det fluorescerende signalet vil forsvinne.

3. Metode

Protokoll er modifisert fra Weihs et al. (2018). Overnattkulturer ble satt opp som beskrevet i **Seksjon 3.1.2** og stammene ble re-inokulert ved overføring av 5 μL fra overnattkultur til nytt flytende BHI tilsatt respektiv antibiotika og 300 μM IPTG. Kulturene vokste til en $\text{OD}_{600} = 0,4-0,6$, og OD-verdier ble normalisert før videre trinn. Celler ble isolert under sentrifugering 5000 x g i 10 minutter, før pellet ble resuspendert i 500 μL SMM-BHI (**Seksjon 2.7.4**) og overført til Eppendorf-rør. Bufferen tilsatt sukrose ble benyttet for å forhindre lysering av protoplaster i videre trinn. Alle Eppendorf-rør ble behandlet med 0,5 μL lysostaphin (10 mg/mL) roterende ved romtemperatur i 10 minutter. Det ble tillaget 3 stykk 100 μL alikvoter av hver kultur.

Til de tre alikvotene ble det tilsatt:

1. 25 μL TSM buffer
2. 5000 $\mu\text{g/mL}$ proteinase K (20 mg/mL)
3. 5000 $\mu\text{g/mL}$ proteinase K (20 mg/mL) og 0,1 % Triton-X

Se **Seksjon 2.7.4** for oppskrift på TSM buffer. Ved andre repetisjon av forsøket ble det benyttet 10 000 $\mu\text{g/mL}$ proteinase K (40 mg/mL). Etter inkubering i 20 minutter i romtemperatur, ble prøve nr 1 og 2 fra hver kultur mikroskopert i LSM700 (Zeiss) som beskrevet i **Seksjon 3.13.1**. 5 mM PMSF (100 mM) ble videre tilsatt til alle prøver, da dette er en protease inhibitor og vil stoppe reaksjonen (oppskrift **Seksjon 2.7.4**). Det ble videre gjennomført SDS-PAGE som beskrevet i **Seksjon 3.4** og Western blotting beskrevet i **Seksjon 3.4.1**.

3.11 Kvantifikasjon av proteinaggater ved SmdA depleksjon

Protokoll er modifisert fra Stahlhut et al. (2017). Overnattkulturer av stammene ble fortynnet 1:5000 i nytt flytende BHI tilsatt respektiv antibiotika og IPTG 300 μM . 25 mL av kulturene (250 mL kolber) ble dyrket på 37 °C ristende i 4 timer. Kulturene ble deretter splittet i to like deler, der ene halvdel ble inkubert på 45 °C i ytterligere 2 timer og resterende halvdel ble oppbevart ved 4 °C. Etter inkubering ble 10 mL kultur sentrifugert ved 4000 x g i 10 minutter på 4 °C. Cellene ble vasket to runder med 1, 5 mL 1X PBS. Prøvene ble holdt på is under vaskingen og i alle videre trinn. Etter siste sentrifugering ble pellet fryst ved - 80 °C til neste dag. Påfølgende dag ble cellene resuspendert i 1,5 mL kald PBS med pH 7. Cellene ble mekanisk knust med 0,5 g syrevaskede glasskuler $\leq 106 \mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich) i Fastprep® 24 (MP™ Biomedicals) med hastighet 6,0 m/s i 3x 30 sekunder. Prøvene sto i 5 minutter for å la glasskulene synke til bunnen, før 1 mL av råekstraktet ble overført til 2 mL Eppendorf-rør. Proteinkonsentrasjon (mg/mL) A280 ble målt med NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher

3. Metode

Scientific) i alle prøver. Videre ble prøvene sentrifugert ved 17 000 x g i 30 minutter på 4 °C, og pellet ble resuspendert i 500 µL buffer A med 1% Triton X-100 (**Seksjon 2.7.8**). Prøvene ble inkubert roterende i 3 timer ved 4 °C, før sentrifugering ved 17 000 x g i 30 minutter på 4 °C. Prosessen ble gjentatt i Buffer A med 0,5% Triton X-100. Etter sentrifugering ble pellet resuspendert i buffer A og sentrifugert ved 17 000 x g i 30 minutter ved 4 °C, før pellet ble fryst ved -80 °C til neste dag. Pellet ble løst i 200 µL rehydreringsbuffer (**Seksjon 2.7.8**). Prøver med proteinaggregater ble normalisert mot proteinkonsentrasjon i råekstraktet, før de ble applisert på 10% SDS-PAGE. Oppskrift på 12% separeringsgel er listet i **Seksjon 2.7.3**, men til 10% gel benyttes det 4,78 mL ddH₂O og 2,5 mL 40% akrylamid + 8% bis-akrylamid. Gelen ble visualisert ved farging med Coomassie brilliant blue (**Seksjon 3.4.2**) og deretter avbildet i Azure Imager c400 (Azure Biosystems). Programmet Azurespot 1D gel analysis ble benyttet for analyse av båndstyrke i brønnene.

3.12 Krystallfiolettanalyse for kvantifisering av biofilmdannelse

For kvantifisering av biofilmdannelse ble biofilm inkubert i brønner i en 96-brønns mikrotiterplater, etterfulgt av farging med krystallfiolett for kvantifisering av biofilmmasse (Djordjevic et al., 2002). Krystallfiolett vil binde både til bakterieceller og til matriksen i biofilmen. Det gjennomføres også en rekke vasketrinn av dannet biofilm i metoden, for å fjerne planktoniske celler før fargingen med krystallfiolett (Azeredo et al., 2017).

Overnattkulturer av stammene ble fortennet 1:250 i ny BHI tilsatt respektiv antibiotika og IPTG 300 µM. Kulturene vokste til OD₆₀₀ 0,4 og ble normalisert. Alle kulturer ble fortennet til OD₆₀₀ 0,05 i flytende TSB tilsatt antibiotika og 300 µM IPTG. Det ble byttet medie fra BHI til TSB for å fremme vekst av biofilm. 100 µL av hver kultur ble tilsatt til 8 brønner i en 96-brønns mikrotiterplate. 100 µL TSB ble benyttet som kontroll. Mikrotiterplaten ble inkubert på 37 °C i 20 timer. Halvveis i inkuberingsperioden ble det tilsatt ytterligere 300 µM IPTG til alle brønner. Etter inkubering ble alt medium fjernet fra brønnene i mikrotiterplaten. Biofilmen ble vasket ved tilsetning av 100 µL 0,9 % NaCl til alle brønner. NaCl ble fjernet etter 2-3 minutters inkubering, og biofilmen tørket i 5 minutter. Biofilm i alle brønner ble inkubert i 15 minutter med 100 µL 0,02% Krystallfiolett (se **Seksjon 2.7.7**). Etter krystallfiolett var fjernet fra alle brønner, ble biofilmen vasket i to omganger med 100 µL NaCl. For oppløsning av dannet biofilm ble 200 µL 96% etanol tilsatt til alle brønner og inkubert i 10 minutter. Innholdet i brønnene ble deretter overført til en ny 96-brønns mikrotiterplate. OD₆₀₀ ble avlest i alle brønner i SynergyTM H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments).

3. Metode

3.13 Mikroskopi

Mikroskopi er en viktig teknikk for undersøkelse av cellers morfologi, da en kan studere størrelse og form samt hvordan cellene er organisert. I dette arbeidet har det blitt benyttet fasekontrast- og fluorescensmikroskopi for å studere aktiv celleveggsyntese og septumdannelse i tillegg til subcellulærlokalisering av proteiner. Dannelse av septum og cellevegg ble også studert i et utvalg stammer under transmisjonselektronmikroskopi (TEM) ved Imaging Center NMBU.

3.13.1 Fasekontrast- og fluorescensmikroskopering

Til mikroskopering av fasekontrast og fluorescens ble stammene forberedt og dyrket som beskrevet i **Seksjon 3.1.2**. Til fluorescensmikroskopering ble fluorokromer tilsatt før mikroskopering for visualisering av cellekomponenter, eller det ble brukt celler som uttrykker green fluorescent protein (GFP) konjugert direkte til proteiner for deteksjon og lokalisering. Lysstrålene som sendes ut fra mikroskopet vil ha en definert bølgelengde nære absorpsjonsspekteret til fluorokromet som skal visualiseres. Fluorokromet vil absorbere strålene med rett bølgelengde, og emittere lys som detekteres i et filter. Da det kun er emittert lys som passerer filteret vil dette danne et bilde og dermed identifiserer ulike deler av cellen der fluorokromet befinner seg (Ajduk & Szkulmowski, 2019).

Det ble benyttet 1,2% agarose til mikroskopering (oppskrift **Seksjon 2.7.6**). 600 µL av agarosen ble avsatt på Multispot Microscope Slides PTFE & Specialised coatings (Hendley-Essex) og støpt under press med en glass-slide. 0,5 µL fra hver prøve ble applisert i brønnene på glass-sliden med agarose-gel og det ble plassert et dekkglass over gelen før mikroskopering. Ved tilsetning av fluorokrom i prøvene ble glass-sliden dekket til frem til mikroskopering. Til fasekontrast- og fluorescensmikroskopering ble LSM700 (Zeiss) benyttet og bildetakning av cellene ble gjennomført med ORCA-Flash 4.0 V3 Digital CMOS kamera (Hamamatsu Photonics K.K).

3.13.1.1 Markering av peptidoglykan-biosyntese og nyinnsatt cellevegg under celledeling

7-hydroxyxoumarincarbonylamino-D-alanine (HADA) er en type fluorescerende D-aminosyre (FDAA) som kan benyttes under mikroskopering for *in situ* markering av peptidoglykan-biosyntese (Hsu et al., 2017). Som tidligere beskrevet i **Seksjon 1.2.1** er PBPer involvert i transpeptidering under peptidoglykansyntese, hvor det settes inn D-aminosyrer mellom glykankjedene. Da HADA er en slik fluorescerende D-aminosyre vil denne inkorporeres under peptidoglykansyntesen (Hsu et al., 2017). Inkorporeringen gjør det dermed mulig å visualisere

3. Metode

punktet for cellevegg syntese under delingsfasen. I dette arbeidet ble fluorescensmikroskopering med HADA gjennomført for å studere septumdannelse og dens morfologiske påvirkning i stammer av *S. aureus* NCTC8325-4 ved SmdA^{opp} og av NCTC8325-4 og SH1000 ved SmdA^{ned}. HADA har maksimal eksitasjon ved bølgelengde 450 nm (blå del av spekteret).

For visualisering av septumdannelse med HADA ble fluorokromet tilsatt til cellene under eksponentiell vekstfase. Etter OD var justert for alle prøver som beskrevet i **Seksjon 3.1.2** ble det overført 50 µL kultur til et Eppendorf-rør med 4 µL HADA (1 mg/mL). HADA må holdes mørkt, da lys kan være degraderende for fluorokromer (Ajduk & Szkulmowski, 2019). Prøvene ble holdt mørkt på is mellom videre trinn. Prøvene ble inkubert i 1 minutt på 37 °C vannbad, før de ble sentrifugert ved 10 000 x g i 1 min på 4 °C. Pellet ble resuspendert i 50 µL kald PBS. Prøvene ble igjen sentrifugert, og pellet resuspendert i 25 µL kald PBS. Mikroskopering ble gjennomført som beskrevet i **Seksjon 3.13.1**. Bildetakingen ble gjennomført med filtersettet «DAPI».

3.13.1.2 Green fluorescent protein (GFP)-markering av proteiner

For å markere et protein kan det ønskede genet fusjoneres til genet for green fluorescent protein (GFP). Proteinene kommer opprinnelig fra maneten *Aequorea victoria* og kan blant annet benyttes som et fluorokrom under fluorescensmikroskopering for å studere subcellulær lokalisering av proteiner (Tsien, 1998). GFP kan også brukes for å studere genuttrykk eller som en indikator for å studere protein-protein interaksjoner (Tsien, 1998). I dette arbeidet er GFP-markering av proteiner benyttet til å studere lokaliseringen av SmdA og delingsproteinene EzrA i *S. aureus* SH1000 under celledeling, i tillegg til verifikasjon av den strukturelle membranorienteringen til SmdA (metodebeskrivelse **Seksjon 3.10**). Fusjoneringen av GFP til målgenet kan enten gjøres ved integrering kromosomt eller på et plasmid. Fusjoneringen av EzrA-gfp er integrert i kromosomet, mens pLOW-plasmid er benyttet til fusjoneringen av GFP til SmdA både N- og C-terminalt.

For mikroskopering av GFP fusjonert til SmdA ble prøver fortennet direkte 1:100 fra overnattkultur i friskt flytende BHI tilsatt respektive antibiotika og IPTG 300 µM. Kulturene ble dyrket ved 37 °C risting (200 rpm) til OD₆₀₀ 0,3-0,4 og OD-verdier ble normalisert før 0,5 µL fra hver kultur ble avsatt på en mikroskop-slide. Mikroskoperingen ble gjennomført som beskrevet i **Seksjon 3.13.1**. Bildetakingen ble gjennomført ved bruk av superfolder GFP kanalen.

3. Metode

3.13.2 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)

Transmisjonselektronmikroskopi (TEM) er en type mikroskopi som gir bilder av svært høy oppløselighet av små områder. I arbeidet ble et utvalgt prøver levert til TEM for å studere septumdannelse og cellevegg ytterligere. TEM ble som tidligere nevnt utført av Imaging Center ved NMBU, og fremgangsmetode for fiksering av prøver ble levert herfra.

Kulturer ble forberedt og predyrket som beskrevet i **Seksjon 3.1.2**, men ble fortynnet 1:250 i 20 mL BHI tilsatt respektiv antibiotika og IPTG 300 μ M. Kulturene ble dyrket til OD₆₀₀ 0,3, før 10 mL av hver kultur ble overført til 10 mL fikseringsløsning (**Seksjon 2.7.6**). Prøvene ble inkubert i 1 time i romtemperatur og videre ved 4 °C over natt. Påfølgende dag ble prøvene sentrifugert ved 5000 x g i 5 minutter på 4 °C. Pellet ble resuspendert i 1-1,5 mL cacodylate-buffer og overført til 2 mL Eppendorf-rør. Vasketrinnet i cacodylate-buffer ble gjennomført totalt tre ganger. I siste trinn ble pellet resuspendert i 1 mL cacodylate-buffer, og ferdige fikserte prøver ble levert til Imaging Center. Lene Cecilie Hermansen utførte videre prøvebearbeidelser og mikroskopering.

3.14 DNA sekvensering

I arbeidet ble konstruerte plasmid sendt til DNA-sekvensering ved Sanger sekvensering utført av Eurofins Genomics. Sekvensanalysen ble gjennomført for å verifisere at konstruktet var rett utført og at eventuelle oppståtte mutasjoner ikke påvirket uttrykket av plasmidet. Til sekvensering ble 80-100 ng/ μ L DNA mikset med 2 μ L sekvenseringsprimer. Det er mulig å sekvensere omtrent 1000 basepar av gangen. For å dekke et gen eller konstrukt lengre enn dette, ble det benyttet flere sekvenseringsprimere. Sekvensene ble analysert i Benchling.

4. Resultater

4.1 SmdA^{ned} påvirker celledeling og fører til store endringer i cellemorfologi i *S. aureus*

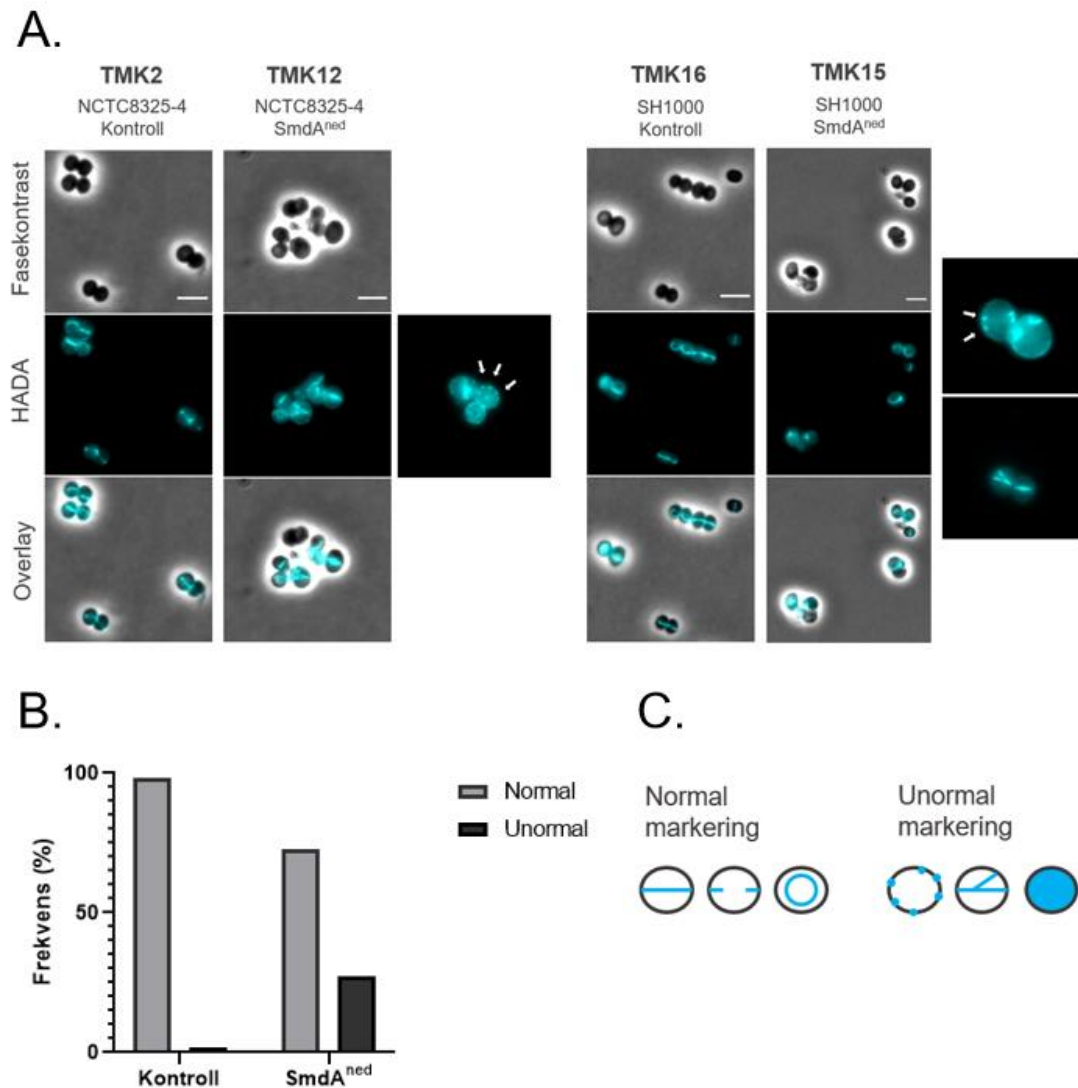
SmdA ble identifisert som et potensielt nytt protein involvert i celledeling i *S. aureus* SH1000 gjennom en kombinert subcellulær lokalisering og gen-deplesjons analyse, hvor nedregulering av membranproteinet resulterte i abnormal cellemorfologi (Myrbråten, 2021). Tidligere forsøk viste at et nedregulert uttrykk av SmdA ga redusert vekst ved 37 °C, men vekstreduksjon var ikke fullstendig (Myrbråten, 2021). Det ble derfor forsøkt i dette arbeidet å lage en *smdA*-delesjonsmutant. For delesjonen, ble den temperatursensitive vektoren pIMAY benyttet, hvor *smdA* vil erstattes med resistensgenet *spc* gjennom dobbel overkrysning (Monk et al., 2012). Til tross for gjentatte forsøk var det imidlertid ikke mulig å generere kolonier for å bekrefte korrekt integrasjon av pIMAY ved koloni-PCR (resultater ikke vist). Siden også tidligere forsøk for å lage en delesjonsmutant av *smdA* i ulike *S. aureus* stammer ikke har vært vellykkede (Morten Kjos, personlig kommunikasjon), ble i stedet CRISPRi benyttet for å nedregulere genuttrykket av SmdA (heretter kalt SmdA^{ned}) videre i dette prosjektet.

Ved fasekontrastmikroskopi ble det, på samme måte som tidligere (Myrbråten, 2021), vist at SmdA^{ned} har en tydelig endret cellemorfologi både i SH1000 og NCTC8325-4 sammenlignet med kontrollstammene CRISPRi (no target) (**Figur 4.1A**). I begge stammer varierer cellestørrelsen, i tillegg til at et utvalg celler har en avvikende form fra karakteristisk sfærisk morfologi hos *S. aureus*. Typisk for begge stammer er også klyngedannelser av celler.

For å forstå hvorfor disse morfologiene oppstår, ble lokaliseringen av celleveggsyntesen i disse cellene undersøkt med den fluorescerende D-aminosyren HADA. Under peptidoglykansyntese inkorporeres det D-aminosyrer i peptidkjedene mellom glykankjedene og HADA vil settes inn som en slik D-aminosyre (Hsu et al., 2017). HADA vil derfor visualisere innsettelse av nysyntetisert cellevegg og septumdannelse i *S. aureus*. Mikroskopibilder med HADA markering av nyinnsatt cellevegg i NCTC8325-4 og SH1000 er vist i **Figur 4.1A**. I kontrollstammene CRISPRi (no target) foregår peptidoglykansyntesen hovedsakelig i midten av cellen der septum dannes. SmdA^{ned} derimot fører til celledelingsdefekter med flere aktive punkter for celleveggsyntese og flere dannede septa i både NCTC8325-4 og SH1000. I **Figur 4.1B** har cellene blitt kategorisert basert på om den observerte HADA innmerkingen er normal eller unormal (illustrert i **Figur 4.1C**). Statistikken viser en tydelig økning i andel celler med

4. Resultater

unormal celleveggsyntese ved $SmdA^{ned}$ sammenlignet med tall for kontroll (1,93 % for kontroll (vilttype) sammenlignet med 27,4 % for $SmdA^{ned}$).

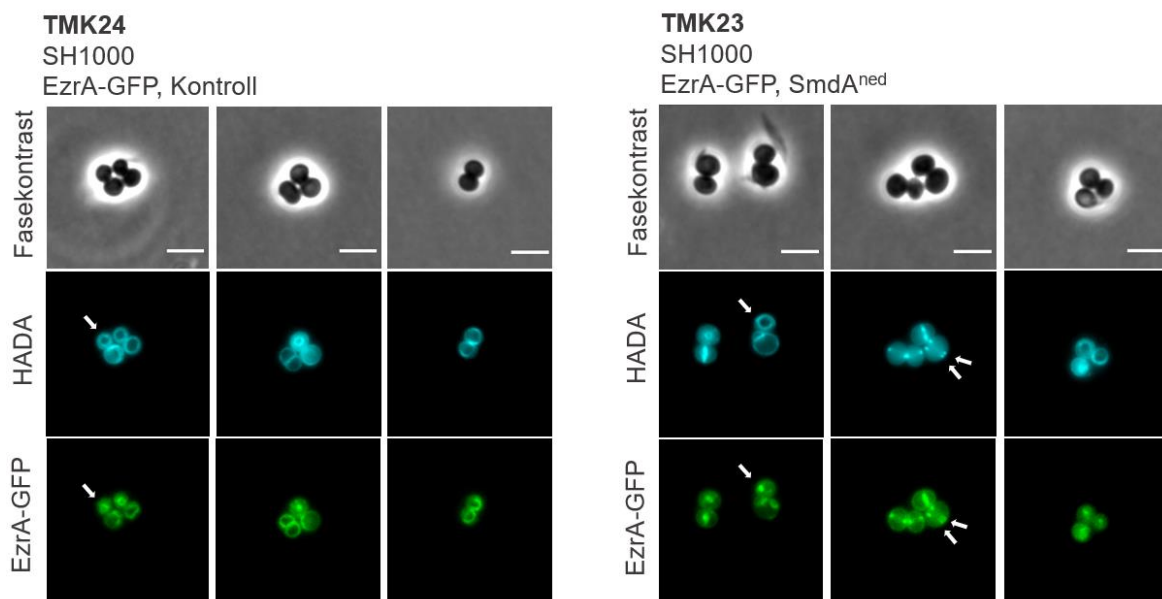


Figur 4.1 $SmdA^{ned}$ påvirker aktiv celleveggsyntese og septumdannelse i NCTC8325-4 og SH1000. (A) Fasekontrast, HADA og overlay av NCTC8325-4 kontroll CRISPRi (no target) (TMK2) og CRISPRi (*smdA*) (TMK12) og SH1000 kontroll CRISPRi (no target) (TMK16) og CRISPRi (*smdA*) (TMK15) dyrket ved 37°C. Størrelsesbarer er 3 μ m. Piler peker på celler med unormal HADA markering. (B) Statistisk frekvensanalyse over observert normal og unormal HADA markering i *S. aureus* NCTC832-5 ved $SmdA^{ned}$ utført av Dr. Ine Myrbråten og Dr. Morten Kjos (Myrbråten et al., 2022). Beregnet prosentandel celler med normale HADA markeringer for kontroll (pLOW-dCas9) 98,07 % og unormale 1,93%, og normale markeringer i celler for $SmdA^{ned}$ 72,6% og unormale 27,4%. Antallet celler analysert er 259 for kontroll og 179 for $SmdA^{ned}$. (C) Eksempler på normal og unormal HADA markeringer av nyinnsatt cellevegg.

4. Resultater

4.2 SmdA^{ned} påvirker lokaliseringen av delingsproteinet EzrA og videre koordinering av divisomet

Under celledeling koordinerer Z-ringen dannelsen av ny cellevegg i *S. aureus*. Da det ble observert flere innsettelsespunkter for celleveggsyntese i SmdA^{ned}, var det interessant å studere om SmdA også kan påvirke dannelsen av Z-ringen, og som en følge den videre koordineringen av divisomet under celledeling. For å studere dette ble det benyttet stammer som uttrykker celledelingsproteinet EzrA fusert til GFP (Myrbråten et al., 2022). EzrA er et av delingsproteinene som binder tidlig til Z-ringen under celledeling (Jorge et al., 2011). CRISPRi-systemet for nedregulering av *smdA* ble innført i stammen som uttrykker EzrA-GFP, og cellene ble merket med HADA for å samtidig studere lokalisering av Z-ringen og aktiv celleveggsyntese. **Figur 4.2** viser mikroskopibilder av HADA og EzrA-GFP.



Figur 4.2 SmdA^{ned} påvirker dannelsen av Z-ring i *S. aureus* SH1000. Mikroskopibilder med fasekontrast, HADA og GFP-markering av delingsproteinet EzrA i kontroll *ezrA-gfp*, CRISPRi sgRNA (no target) (TMK24) og *ezrA-gfp*, CRISPRi sgRNA(*smdA*) (TMK23). Størrelsesmarkeringer er 3 μ m.

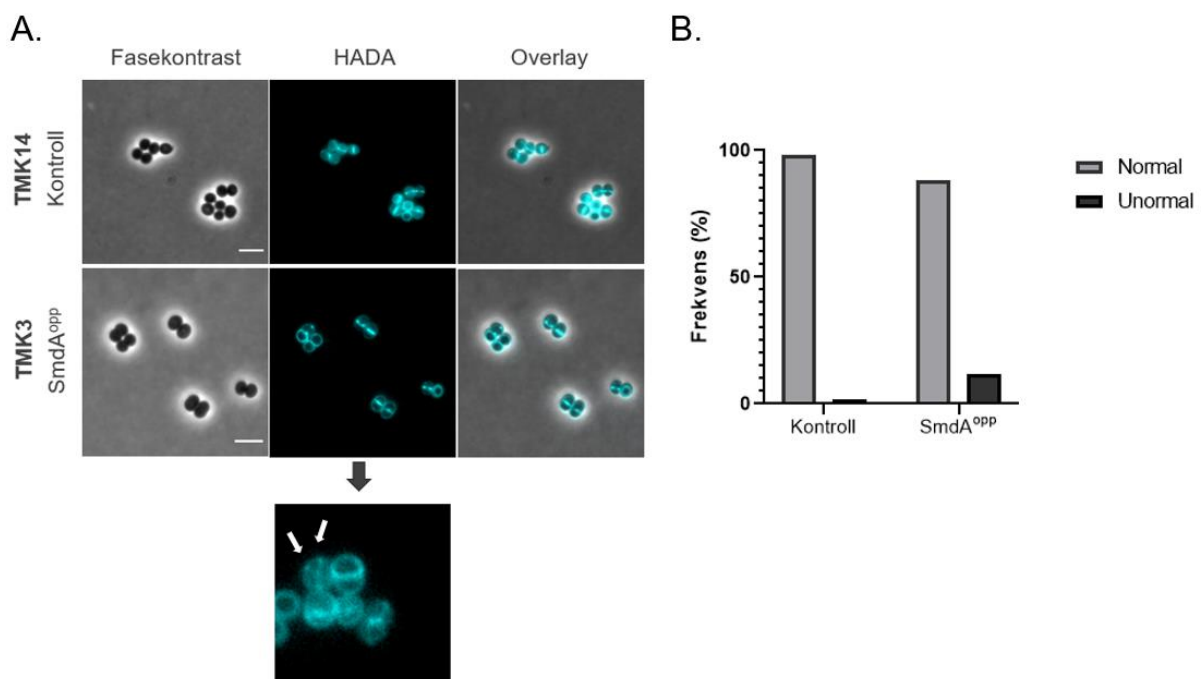
I kontrollcellene (CRISPRi no target, TMK24) er delingsringen (i grønt) lokalisert som forventet i cellene, og kan sees enten som en ring (illustrert i **Figur 1.2**) eller en strek på tvers av cellene (avhengig av orienteringen av cellene under mikroskopet). I motsetning til dette, ble unormal lokalisering av EzrA-GFP ofte observert i SmdA^{ned} (TMK23). I denne stammen sees celler hvor delingsringen er lokalisert nære ytterkanten, og det er synlig at noen celler har dannet to Z-ringer, som resulterer i flere punkter for septumdannelse synlig ved HADA farging.

4. Resultater

Resultatene indikerer dermed at SmdA enten er direkte eller indirekte involvert i koordineringen av divisomet i *S. aureus* SH1000 under celledeling, og at celler uten SmdA vil som en følge av dette kunne få defekter i syntese og lokalisering av ny cellevegg.

4.3 SmdA^{opp} påvirker celleveggsyntese, men ikke vekst i *S. aureus* NCTC8325-4

Resultatene over (Seksjon 4.1) viser at nedregulering av *smdA* (SmdA^{ned}) fører til celler med abnormal cellemorfologi i *S. aureus* på grunn av unormal lokalisering av divisomet og celleveggsyntesen. Videre i dette arbeidet ble det studert hvordan oppreguleringen av SmdA (heretter SmdA^{opp}) ville påvirke uttrykt fenotype. For oppregulert genuttrykk av SmdA ble plasmidet pLOW-*smdA* konstruert av Dr. Ine Myrbråten (Myrbråten et al., 2022), benyttet. Ved hjelp av dette plasmidet, som ble innført i *S. aureus* NCTC8325-4, kan SmdA^{opp} induseres ved tilsetning av IPTG. HADA ble benyttet til å visualisere innsettelse av nysyntetisert cellevegg og septumdannelse i *S. aureus*, på samme måte som tidligere. Mikroskopibilder av SmdA^{opp} samt frekvensdata for observert normal og unormal morfologi i celler er presentert i **Figur 4.3**.

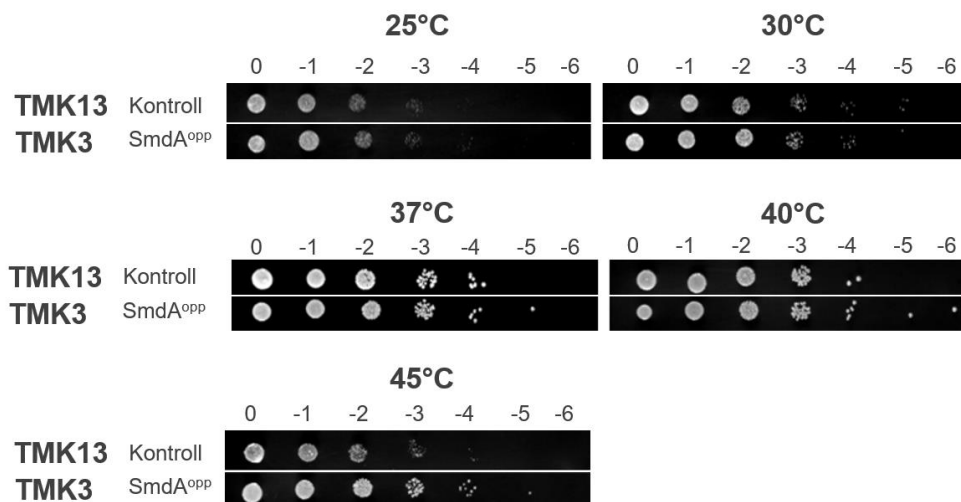


Figur 4.3 SmdA^{opp} påvirker septumdannelse og resulterer i abnormal celleveggsyntese. (A) Fasekontrast, HADA farging og overlagsbilder av *S. aureus* NCTC8325-4 SmdA^{opp} (TMK3) og kontroll villtype (TMK14) dyrket ved 37°C. Størrelsesmarkeringer er 3 μm. (B) Statistisk frekvensanalyse over observert normal og unormal HADA markering ved SmdA^{opp} utført av Dr. Ine Myrbråten og Dr. Morten Kjos (Myrbråten et al., 2022). Beregnet prosentandel celler med normal HADA markering for kontroll (pLOW-dCas9) 98,07 % og unormale 1,93%, for SmdA^{opp} var andelen normale 88,33% og unormale 11,67%. Antallet celler analysert er 259 for kontroll og 189 for SmdA^{opp}.

4. Resultater

SmdA^{opp} (TMK3) har også noe påvirkning på septumdannelse i NCTC8325-4 (**Figur 4.3A**) sammenlignet med villtype (TMK14). Det dannes multiple innsettelsespunkter langs celleveggen som fører til at den aktive celleveggsyntese er mislokalisert i cellene. Statistisk analyse (**Figur 4.3B**) viser imidlertid at celler med abnormal celleveggsyntese ved SmdA^{opp} observeres med en relativ lav frekvens sammenlignet med SmdA^{ned}; omtrent 11,67% av SmdA^{opp} cellene har abnormal HADA markering der 27,4% av SmdA^{ned} har dette.

Da det ble observert at SmdA^{opp} kan resultere i abnormal celleveggsyntese i celler av *S. aureus*, ble det videre undersøkt om overuttrykket kunne ha innvirkning på vekst. For vekstanalyse ble stammer predyrket og indusert med IPTG til eksponentiell vekst som beskrevet i **Seksjon 3.1.2**. OD₆₀₀-verdier ble normalisert før tillaging av 10-ganger fortynningsrekker, som videre ble spottet på agarskåler og inkubert ved varierende temperatur i ~ 17 timer. I **Figur 4.4** er resultat av vekstanalysen for SmdA^{opp} (TMK3) og kontroll (pLOW-dCas9, TMK13) presentert. SmdA^{opp} ser ikke ut til å påvirke vekst av *S. aureus* NCTC8325-4 ved 25 °C, 30 °C, 37 °C eller 40 °C. Ved 45 °C ser overuttrykk av SmdA ut til å påvirke veksten positivt. Vekstkurver i **Appendiks A5** gjennomført ved 37 °C viser heller ingen forskjell i vekst ved SmdA^{opp}.



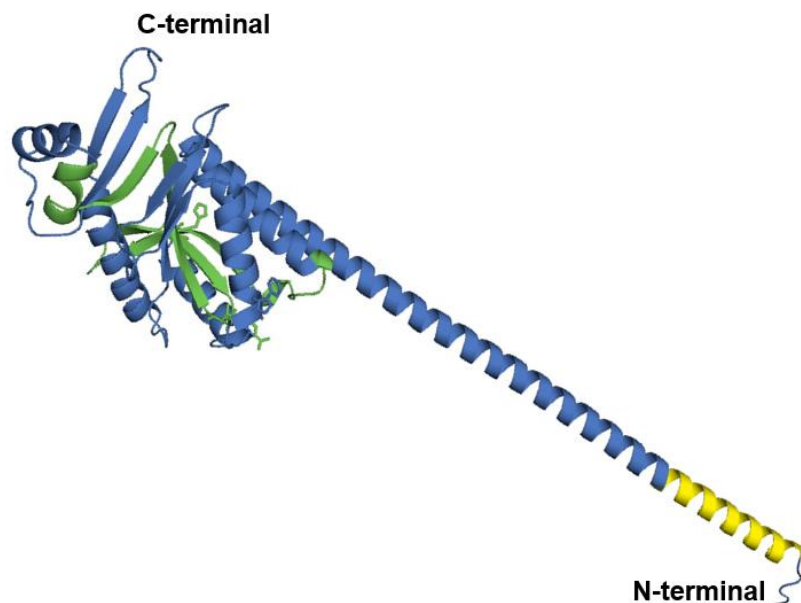
Figur 4.4 SmdA^{opp} påvirker ikke vekst ved ulike temperaturer i *S. aureus*. Vekstanalyse av oppregulert uttrykk av *S. aureus* NCTC8325-4 SmdA^{opp} (TMK3) og kontroll pLOW-dCas9_extra_lacO (TMK13). Vekst ble studert gjennom punktvis avsettelse av 10-ganger fortynningsrekker av kulturene på agarskåler. Agarskålene ble inkubert ~ 17 timer ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C.

4. Resultater

4.4 Studier av membrantopologi til SmdA

For å videre forstå funksjonen til SmdA, var det ønskelig å få mer innsikt i strukturen til proteinet og hvordan det lokaliserer i membranen. SmdA, som er et septumanrikt protein, er predikert å ha en lang N-terminal transmembran heliks samt en C-terminal del med et såkalt NERD-domene (vist i **Figur 1.5B**). Strukturen til proteinet, predikert i AlphaFold (Jumper et al., 2021), ble videre studert i det molekylære visualiseringssystemet PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) i **Figur 4.5**. Det transmembrane domenet (vist i gult) ankrer SmdA til cellemembranen og det predikerte NERD-domenet (i grønt) er en del av den intracellulære delen av SmdA.

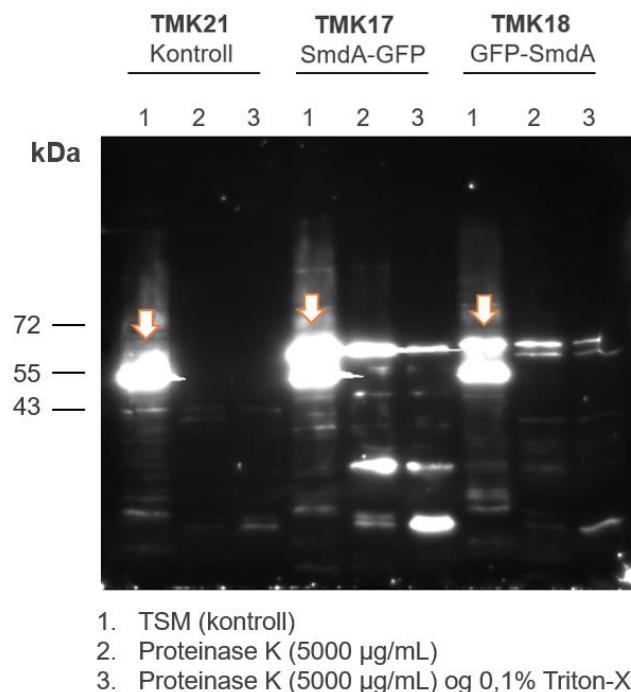
Den predikerte membrantopologien til SmdA (tidligere vist i **Figur 1.5B**), ble forsøkt verifisert gjennom en Proteinase K beskyttelsesanalyse i *S. aureus* SH1000 (metodebeskrivelse **Seksjon 3.10**). Stammer benyttet i forsøket ble konstruert av Dr. Ine Myrbråten (Myrbråten, 2021). Stammer med N- og C-terminal GFP-fusjonert SmdA benyttet i dette forsøket, ble først mikroskopert (**Appendiks A3.1**). Celler med C-terminal GFP-fusjonert SmdA (TMK17) viste som forventet et fluorescerende signal langs celleveggen med et beriket signal i septum. Celler med et N-terminalt GFP-fusjonert SmdA viste derimot et ujevnt fluorescerende signal langs celleveggen. Det ble ikke like tydelig observert fluorescens i septum i disse cellene. Resultatene tyder derfor på at N-terminal fusjonering av GFP virker forstyrrende for SmdA sin lokalisering.



Figur 4.5 Predikert struktur og membrantopologi for SmdA. Presenterer predikert struktur av membranproteinet SmdA. Strukturen er predikert i AlphaFold (Jumper et al., 2021), og visualisert i det molekylære visualiseringssystemet PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC). SmdA er predikert å ha en N-terminal transmembran heliks (gult) og et NERD-domene (grønt) i den intracellulære delen av strukturen.

4. Resultater

Proteinase K beskyttelsesanalysen ble likevel gjennomført og resultater fra Western blot med et antistoff mot GFP er vist i **Figur 4.6**. Protoplaster ble dannet ved behandling med lysostaphin. Dersom GFP er eksponert på utsiden av protoplastene, vil GFP bli brutt ned av Proteinase K, og det fluorescerende signalet i cellene vil forsvinne. Ved et tapt signal vil dette tyde på at SmdA er orientert med en ekstracellulær N-terminal. Samtidig vil intracellulær GFP være beskyttet mot Proteinase K. En stamme som uttrykker det intracellulære proteinet LacA fusjonert til GFP (LacA-GFP, TMK21) ble inkludert som kontroll. Resultatene (**Figur 4.6**) viser at GFP-fusjonerte proteiner ble uttrykt som forventet (se piler kolonne 1, enten LacA-GFP, SmdA-GFP eller GFP-SmdA). Etter behandling med proteinase K, ser store deler av signalet til å forsvinne både for SmdA-GFP og GFP-SmdA (**Figur 4.6**, kolonne 2), som tyder på delvis nedbrytning av GFP-proteinet i begge. For kontrollen LacA-GFP, hvor det i utgangspunktet ikke var forventet noen nedbrytning, siden dette er et intracellulært protein, observeres full nedbrytning av GFP (**Figur 4.6**, brønn 2 for kontroll). Forsøket ble repetert med tilsvarende resultater. Mikroskopering av protoplastene (**Figur A3.2**) tyder på at problemer knyttet til lysering etter tilsetning av TSM, og i noe grad proteinase K behandling, kan forklare noe av disse resultatene (**Appendiks A3.2**). Basert på resultater i **Figur 4.6** er det ikke mulig å verken bekrefte eller avkrefte om den predikterte membrantopologien til SmdA er korrekt.



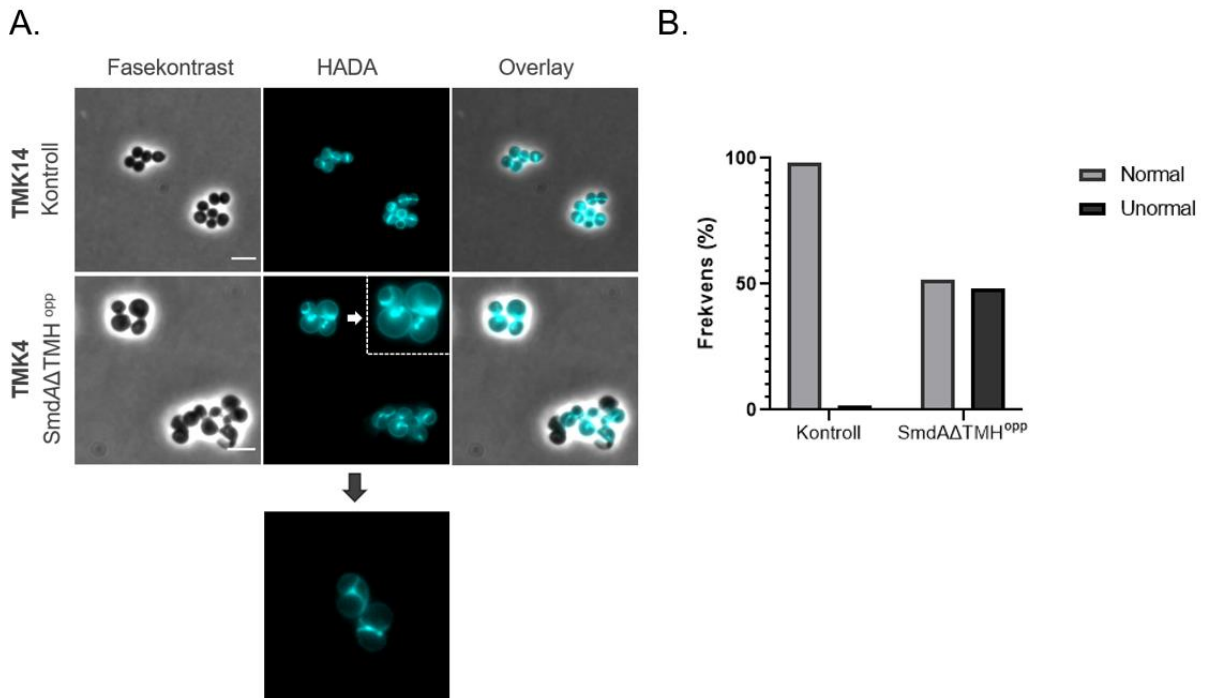
Figur 4.6 Proteinase K beskyttelsesanalyse for verifisering av SmdA membrantopologi i *S. aureus* SH1000. Western blotting for å detektere fluorescerende signal fra LacA-GFP (TMK21), SmdA-GFP (TMK17) og GFP-SmdA (TMK18) behandlet med TSM buffer (50 mM Tris-Hcl (pH 7,5), 0,5 M sukrose og 10 mM MgCl₂) som kontroll, proteinase K (5000 µg/mL) og 0,1% Triton X.

4.5 Membranlokaliseringen av SmdA er viktig for proteinets funksjon i *S. aureus* NCTC8325-4

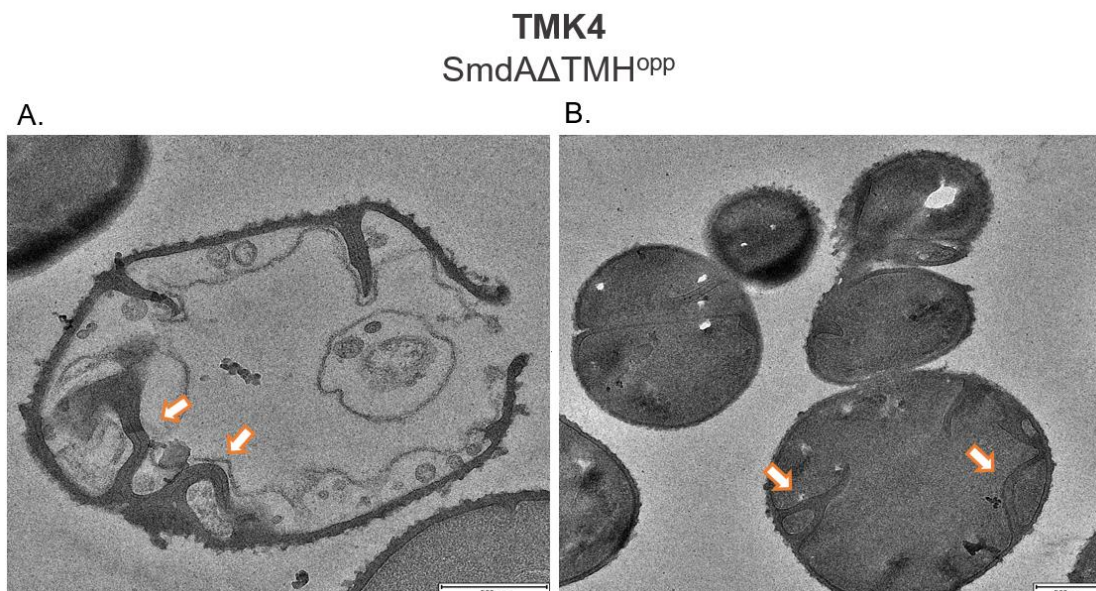
Videre forsøk ble basert på at den predikerte membrantopologien til SmdA er korrekt. Det N-terminale transmembrane domenet (**Figur 1.5B**) ankrer SmdA til cellemembranen, og er derfor trolig helt avgjørende for lokaliseringen av proteinet i cellen. For å verifisere dette, ble det laget en mutant av SmdA hvor hele det predikerte transmembrane domenet var fjernet (SmdA Δ TMH-GFP). Som forventet mistet dette proteinet sin lokalisering i septum og membranen, og fikk en cytoplasmisk lokalisering (forsøk utført av Dr. Ine Myrbråten). Interessant nok, viste disse forsøkene at SmdA Δ TMH^{opp} var toksisk for celler av *S. aureus*, og dette ble videre studert i dette arbeidet. For undersøkelse av uttrykt fenotype ved overekspressjon av cytoplasmisk-lokalisert SmdA (SmdA Δ TMH^{opp}), ble det benyttet et IPTG-induserbart plasmid pLOW-*smdA* Δ TMH (Myrbråten et al., 2022). Dette resulterer i at SmdA ikke lenger er ankret til membranen, og gjør det dermed mulig å undersøke påvirkningen fra lokasjon av SmdA vil ha på *S. aureus*.

Mikroskopibilder med HADA markering av aktiv celleveggsyntese samt frekvensdata for observerte normale og unormale celler er presentert i **Figur 4.7**. Mikroskopering av SmdA Δ TMH^{opp} (TMK4) i **Figur 4.7A** viser klyngedannelser samt celler av varierende størrelser sammenlignet med villtype kontrollcellene (TMK14). Cellene med SmdA Δ TMH^{opp} har høy grad av mis-lokalisert septumdannelse (48.2%) som resulterer i at splittelsen til nye datterceller ikke er tilstrekkelig. Et utvalg celler har en abnormal celleform med flere septa. Dette vises spesielt i TEM bilder (**Figur 4.8**), hvor en enkelt celle har dannet flere tydelige defekte kryssvegger som ikke er i midten av cellen. Dette resulterer også i lyserte celler, som vist (**Figur 4.8A**). Oppregulert uttrykk av SmdA Δ TMH^{opp} gir større grad av fenotypisk defekt sammenlignet med full lengde av SmdA^{opp} i **Figur 4.3**.

4. Resultater



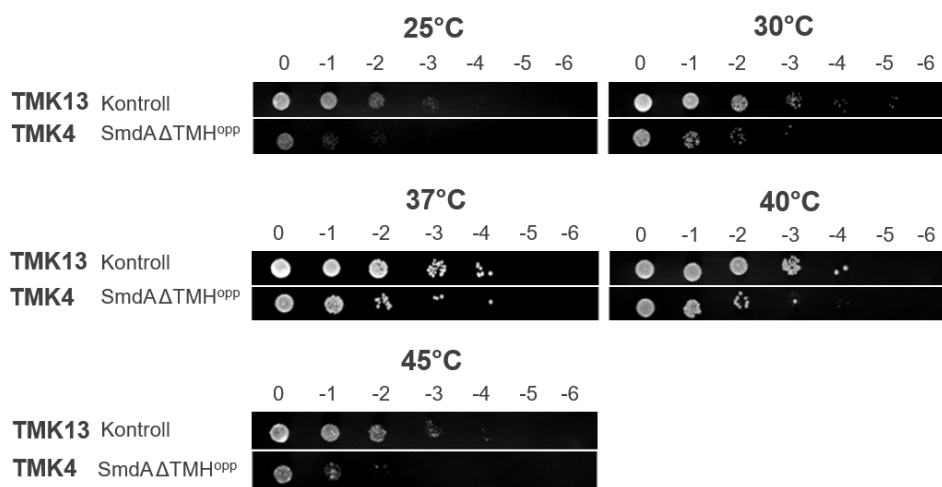
Figur 4.7 Transmembran ankring av SmdA er viktig for proteinets funksjon og vekst i *S. aureus*. (A) Fasekontrast, HADA farging og overlagsbilder av *S. aureus* NCTC8325-4 SmdAΔTMH^{opp} (TMK4) og kontroll villtype (TMK14) dyrket ved 37°C. Størrelsesbarer er 3 μm. (B) Statistisk frekvensanalyse av observert HADA innmerking utført av Dr. Ine Myrbråten og Dr. Morten Kjos (Myrbråten et al., 2022). Beregnet prosentandel celler med normal HADA markering for kontroll (pLOW-dCas9) 98,07 % og unormale 1,93%, for SmdAΔTMH^{opp} var beregnet andel 51,8% for normale og unormale 48,2%. Antallet celler analysert er 259 for kontroll og 82 for SmdAΔTMH^{opp}.



Figur 4.8 Transmisjonselektronmikroskopi av SmdA med cytoplasmisk lokalisering. Mikroskopibilder av *S. aureus* NCTC8325-4 SmdAΔTMH^{opp} (TMK4). Panel A viser en lysert celle, mens mørke celler i panel B er intakte. Oransje piler indikerer defekt og feilplassert septumdannelse. Hvite flekker i cellene er artefakter med ukjent årsak. Størrelsesmarkører er 500 μm.

4. Resultater

Med utgangspunkt i den observerte dramatiske effekten på fenotype ved $SmdA\Delta TMH^{OPP}$, var det videre interessant å se i hvilken grad fjerning av det transmembrane domenet påvirker vekst i *S. aureus* NCTC8325-4. **Figur 4.9** viser resultat av vekstanalysen ved $SmdA\Delta TMH^{OPP}$. $SmdA\Delta TMH^{OPP}$ (TMK4) har negativ effekt på veksten av *S. aureus* NCTC8325-4 ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C etter ~ 17 timer inkubasjon sammenlignet med kontroll (pLOW-dCas9, TMK13). Vekstkurver gjennomført ved 37 °C (**Appendiks A5**) viser samme resultater, der et induisert uttrykk av $SmdA\Delta TMH^{OPP}$ resulterer i redusert vekst sammenlignet med uindusert.



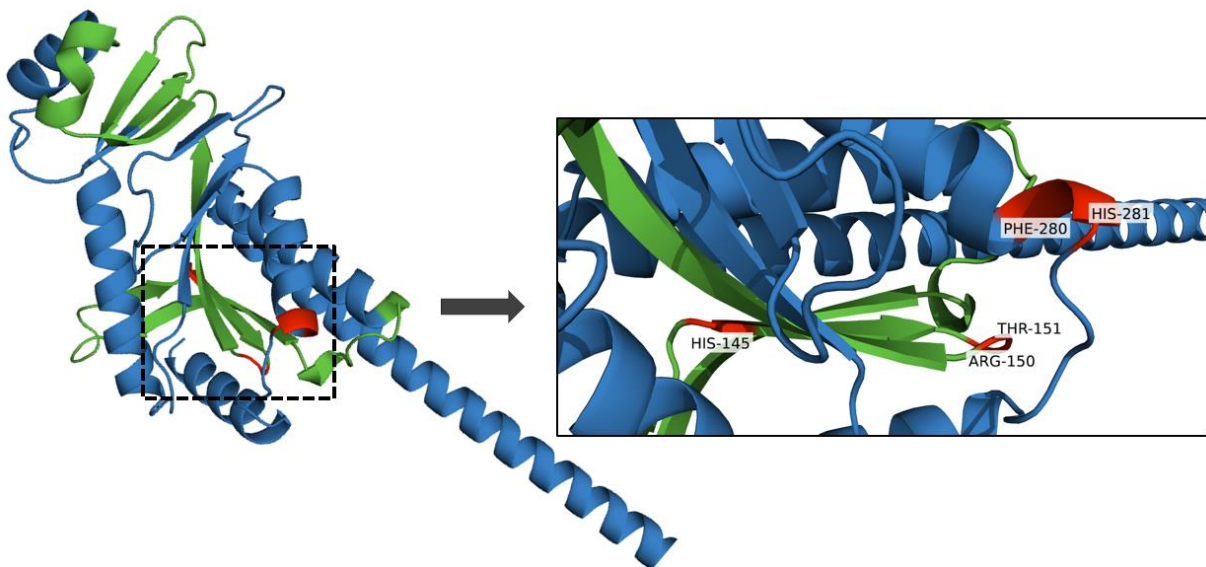
Figur 4.9 Membranlokalisering av SmdA påvirker vekst i *S. aureus* NCTC8325-4. Vekstanalyse ved overuttrykk av *S. aureus* NCTC8325-4 $SmdA\Delta TMH^{OPP}$ (TMK4) og kontroll pLOW-dCas9_extra_lacO (TMK13). Vekst ble studert gjennom punktvis avsettelse av 10-ganger fortynningsrekker av kulturene på agarskåler. Agarskålene ble inkubert ~ 17 timer ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C.

4.6 Det predikerte NERD-domenet og C-terminus er essensielt for funksjonen til SmdA

Den cytoplasmiske delen av SmdA inneholder et predikert NERD-domene. Funksjonen til NERD-domener har i liten grad blitt studert tidligere (Myrbråten et al., 2022). Siden $SmdA\Delta TMH^{OPP}$ resulterte i dramatisk effekt på cellemorfologi og vekst i *S. aureus*, ble dette benyttet videre til å finne ut hvilken betydning det predikerte NERD-domenet har for funksjonen til SmdA. Studier av homologer brukes til å vise hvilke deler av proteinet som er konservert på tvers av slekter i *Staphylococcaceae* familien. Homologe proteinsekvenser til SmdA ble identifisert ved BLAST®-søk (Database resources of the National Center for

4. Resultater

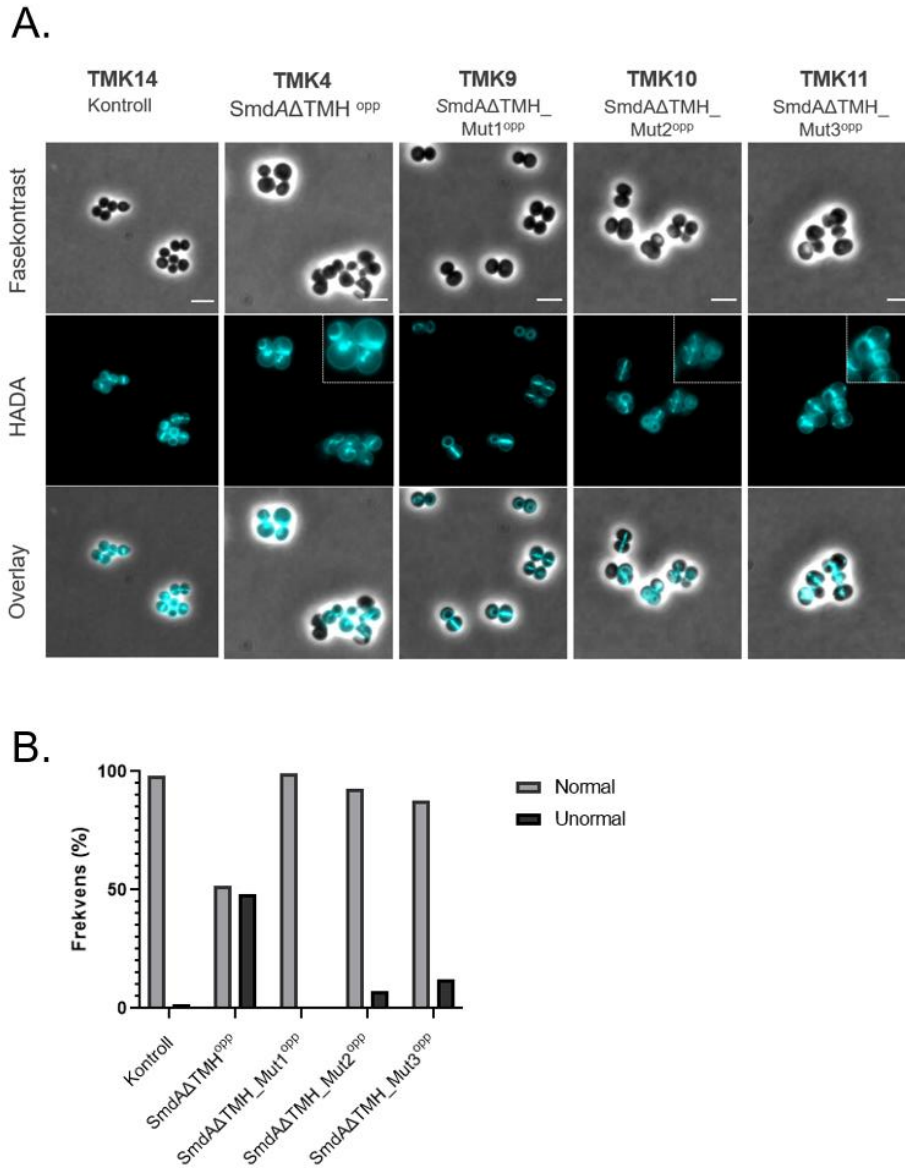
Biotechnology Information, 2016) i databaser, og videre benyttet i en multipl sekvenssammenstilling (**Appendiks A4**) gjennomført i Clustal Omega (Sievers et al., 2011) Sammenstillingen viste at det predikerte NERD-domenet har enkelte residuer fullstendig konserververt, mens også den C-terminale delen av SmdA har høy grad av konservering og flere fullstendige konserverte residuer. For å studere hvor viktig slike konserverte resider er for funksjonen til SmdA, ble det benyttet tre versjoner av SmdA Δ TMH med mutasjoner i henholdsvis NERD-domenet og C-terminal del. **Figur 4.10** viser mutasjonene markert i rødt i SmdA proteinstrukturen. De to første mutasjonene (Mut1 og Mut2) finnes i NERD-domenet; i Mut1 er H145 mutert til alanin, og i Mut2 er R150 og T151 mutert til alaniner. Den tredje mutasjonen (Mut3) er i C-terminal del av SmdA, hvor F280 og H281 er mutert til alaniner.



Figur 4.10 Muterte residuer i det predikerte NERD-domenet og C-terminus av SmdA. SmdA proteinstrukturen er predikert i AlphaFold (Jumper et al., 2021), og visualisert i det molekylære visualiseringssystemet PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC). Figuren viser det predikerte NERD-domenet av SmdA fremhevet med en grønn farge, hvor områder med muterte residuer er farget i rødt. Gjennomførte mutasjoner er markert med tilhørende tekst for residubeskrivelse. I arbeidet er det benyttet tre stammer med gjennomførte mutasjoner. Mut1 = H145A og Mut2 = R150A, T151A i NERD-domenet, og Mut3 = F280A, H281A i C-terminalen av SmdA.

Mikroskopianalyse av de tre muterte stammene inkubert ved 37°C i *S. aureus* er presentert i **Figur 4.11**. HADA innmerking av aktiv celleveggsyntese i **Figur 4.11A** viser, på samme måte som i **Figur 4.7A**, at SmdA Δ TMH^{OPP} (TMK4) fører til defekt fenotype med stor andel celler med unormal morfologi og lokalisering av celleveggsyntese sammenlignet med villtypecellene i kontrollen (TMK14). I de tre mutantene derimot, er andelen unormale celler klart redusert sammenlignet med SmdA Δ TMH^{OPP}, og cellene likner mer på villtypeceller (kontroll).

4. Resultater

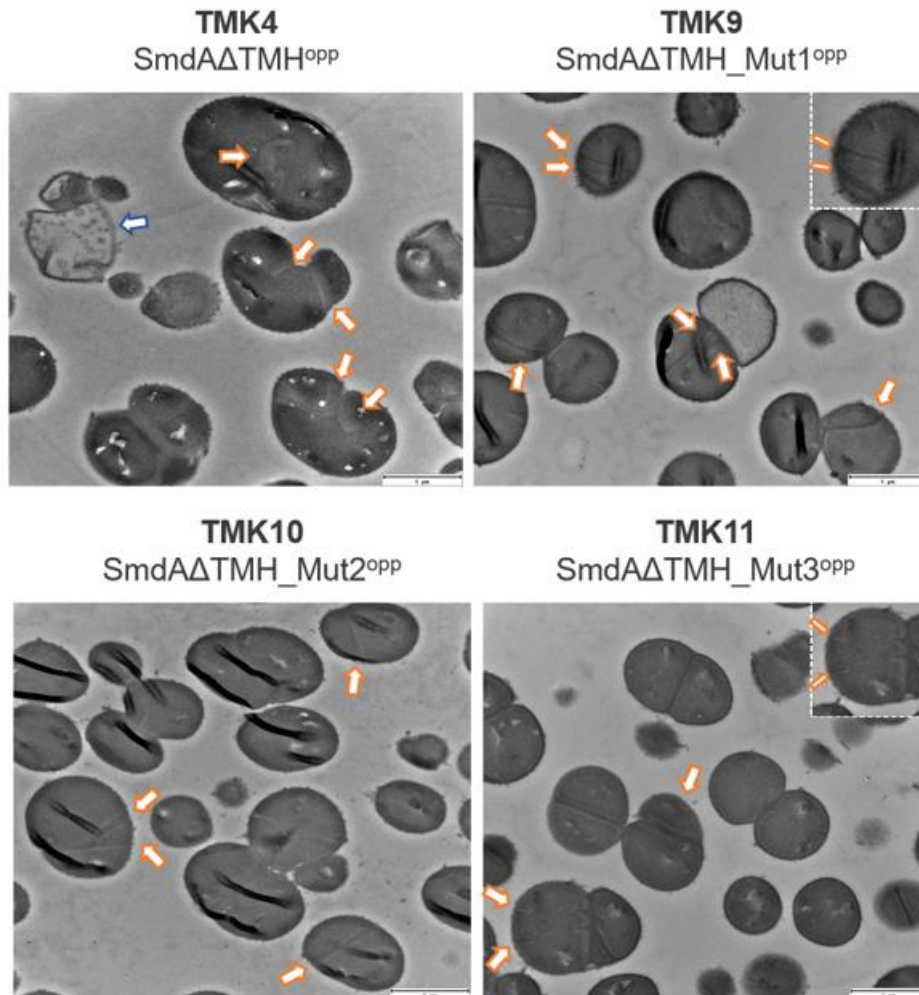


Figur 4.11 Konserverte residuer i NERD-domenet og C-terminal av SmdA påvirker septumdannelse. (A) Fasekontrast, HADA og overlagsbilder av *S. aureus* NCTC8325-4 kontroll villtype (TMK14), SmdAΔTMH^{opp} (TMK4), SmdAΔTMH_Mut1^{opp} (TMK9), SmdAΔTMH_Mut2^{opp} (TMK10) og SmdAΔTMH_Mut3^{opp} (TMK11) dyrket ved 37°C. Størrelsesbarer er 3 μm. (B) Statistisk frekvensanalyse av observert HADA innmerking utført av Dr. Ine Myrbråten og Dr. Morten Kjøs (Myrbråten et al., 2022). Beregnet prosentandel normal innmerking i celler for kontroll (pLOW-dCas9) 98,07 % og unormale 1,93%. Beregnet prosentandel for stammer med mutasjoner: for SmdAΔTMH^{opp} 51,8% og unormale 48,2%, SmdAΔTMH_Mut1^{opp} normale 99% og unormale 1%, SmdAΔTMH_Mut2^{opp} normale 92,9% og unormale 7,1%, SmdAΔTMH_Mut3^{opp} normale 88% og unormale 12%. Antallet celler analysert er 259 for kontroll, 82 for SmdAΔTMH^{opp}, 101 for _Mut1^{opp}, 113 for _Mut2^{opp} og 122 for _Mut3^{opp}.

Dette vises også i TEM (**Figur 4.12**), hvor stammer med innførte mutasjoner har en noe mer sfærisk morfologi i tillegg til at celler av SmdAΔTMH^{opp} i større grad har en eller flere defekte kryssvegger. Resultatene tyder på at de muterte residuene er viktige for funksjonen til proteinet, siden SmdAΔTMH^{opp} har (delvis) mistet funksjonen sin når disse residuene er mutert.

4. Resultater

Frekvensdata sammen med presenterte mikroskopibilder (**Figur 4.11**) viser at andelen unormale celler er enda lavere i Mut1 (1%) sammenlignet med Mut2 (7,1%) og Mut3 (12%). Dette kan tyde på at residuet mutert i Mut1 er viktigere for SmdA sin funksjon sammenlignet med de i Mut2 og Mut3, da SmdA i større grad mister proteinfunksjon under førstnevnt mutasjon.

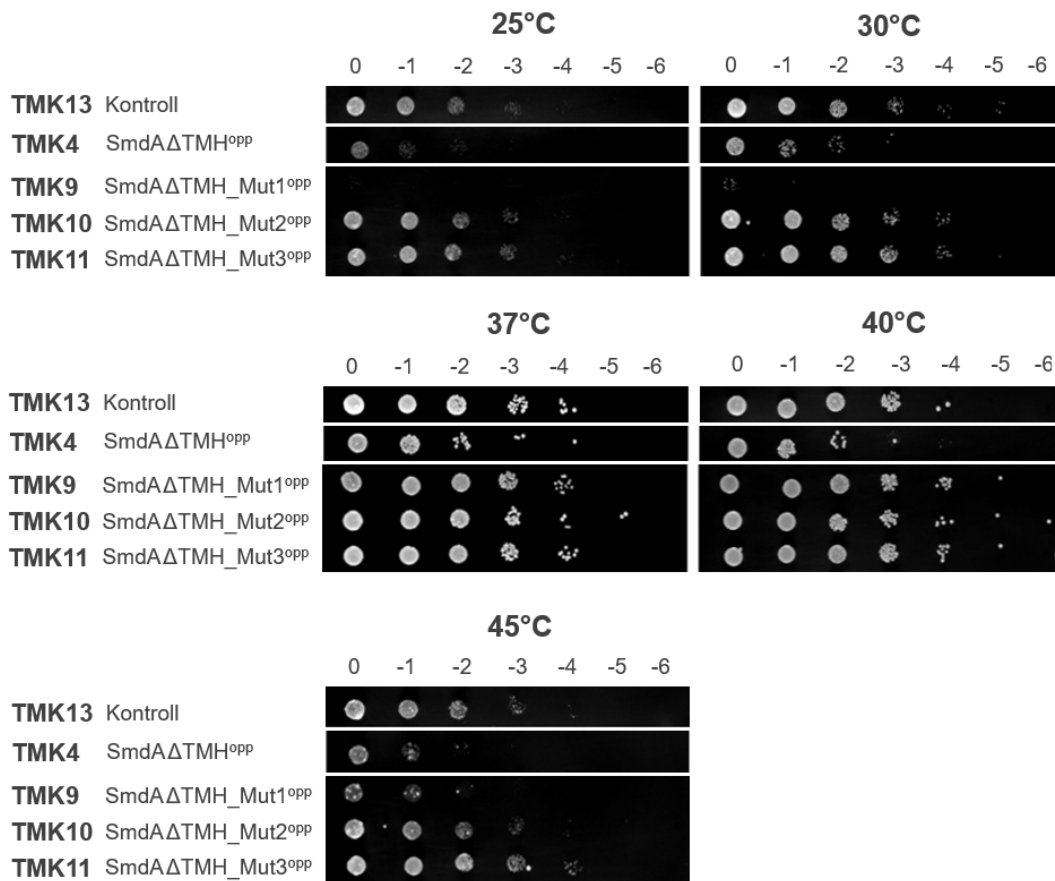


Figur 4.12 Transmisjonselektronmikroskopi av stammer med mutasjoner i konserverte residuer i det predikerte NERD-domenet og C-terminus av SmdA. Mikroskopibilder viser *S. aureus* NCTC8325-4 SmdAΔTMH^{opp} (TMK4), SmdAΔTMH_Mut1^{opp} (TMK9), SmdAΔTMH_Mut2^{opp} (TMK10) og SmdAΔTMH_Mut3^{opp} (TMK11). Oransje piler indikerer defekt septumdannelse og blå pil indikerer lysert celle. Hvite flekker og svarte streker over cellene er artefakter av ukjent årsak. Størrelsesmarkører er 1 μm.

Fra observert morfologisk defekt av mutasjoner i NERD-domenet og C-terminal av SmdA, var det videre ønskelig å studere hvordan de tre mutasjonene påvirker vekst i *S. aureus* NCTC8325-4. Vekstanalyse med spotting er fremvist i **Figur 4.13**. Resultater fra inkubasjonen ved 37 °C viser at de tre stammene med innførte mutasjoner (TMK9, 10, 11) vokser noe bedre enn SmdAΔTMH (TMK4) og likt som kontroll (pLOW-dCas9, TMK13). Dette resultatet samsvarer

4. Resultater

med vekstkurver for stammene ved 37 °C i **Appendiks A5**. Disse effektene ser imidlertid ut til å være noe avhengig av temperaturer, spesielt for Mut1 (TMK9) som vokser svært dårlig ved lave temperaturer (25 °C, 30 °C) og høye (45 °C) temperaturer sammenlignet med kontroll (pLOW-dCas9, TMK13). Mut2 og Mut3 vokser mer likt som kontrollen (TMK13) og bedre enn SmdAΔTMH ved alle temperaturer. Årsaken til denne temperatureffekten er ikke kjent.

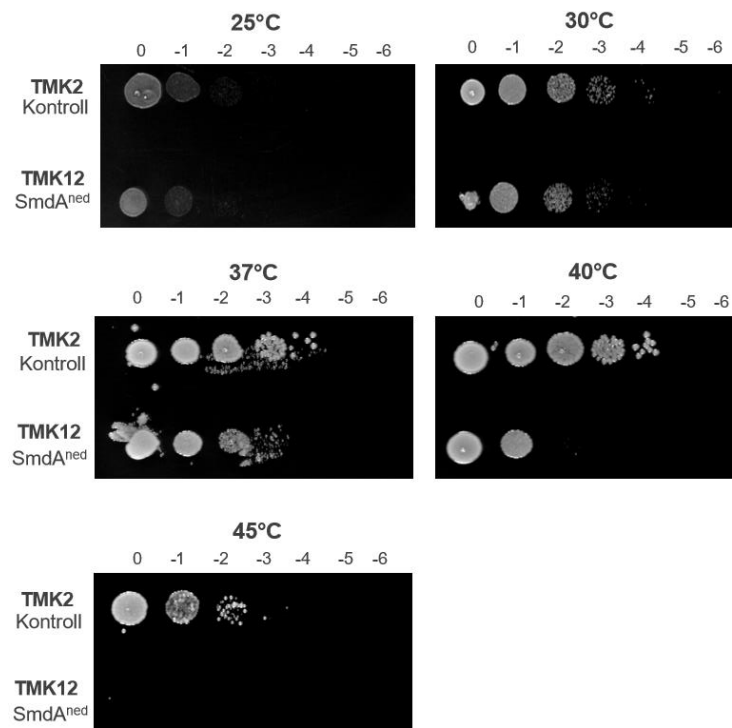


Figur 4.13 NERD-domenet og C-terminal del av SmdA er viktig for vekst i *S. aureus*. Vekstanalyse ved overuttrykk av *S. aureus* NCTC8325-4 kontroll pLOW-dCas9_extra_lacO (TMK13), SmdAΔTMH^{opp} (TMK4), SmdAΔTMH_Mut1^{opp} (TMK9), SmdAΔTMH_Mut2^{opp} (TMK10) og SmdAΔTMH_Mut3^{opp} (TMK11). Vekst ble studert gjennom punktvis avsettelse av 10-ganger forfynningsrekker av kulturene på agarskåler. Agarskålene ble inkubert ~ 17 timer ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C.

4. Resultater

4.7 SmdA er et essensielt protein under vekst ved høye temperaturer og ved induisering av termotoleranse i *S. aureus*

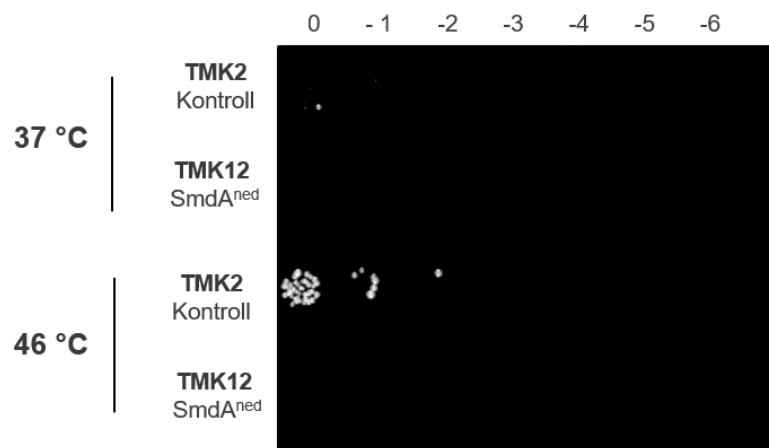
Vekstanalysene av SmdA, SmdA Δ TMH og ulike mutanter (**Figur 4.4, figur 4.9, figur 4.13**), viser at resultatene i noen tilfeller avhenger veksttemperatur. Tidligere vekstanalyse av SmdA depleksjonsmutant (SmdA^{ned}), har bare blitt gjort ved 37°C. Dette gjorde det interessant å analysere vekst av SmdA^{ned} også ved ulike temperaturer. **Figur 4.14** viser vekstanalysen gjennomført i NCTC8325-4 på ulike temperaturer med inkubasjon i ~ 17 timer. Som kjent fra tidligere, fører SmdA^{ned} (TMK12) til noe redusert vekst i *S. aureus* ved 37°C. Sammenlignet med kontrollstammen (CRISPRi no target, TMK2), ble imidlertid vekstreduksjonen forsterket ved 40 °C, og fullstendig hemmet ved 45 °C. Forsøk ble også utført i *S. aureus* stammene SH1000, JE2 og COL (**Appendiks A6**). Her ble samme type kontroll (CRISPRi no target) inkludert for hver av stammene. Dette viser samme trend for SmdA^{ned}: veksten hemmes fullstendig (SH1000) eller i stor grad (JE2) ved 45°C sammenlignet med kontrollene. For stammen COL vokste verken SmdA^{ned} eller kontrollen ved 45°C. Vekstanalysene viser at SmdA er essensiell for vekst under høyere temperaturer i *S. aureus* NCTC8325-4 og SH1000, og i noe grad i JE2.



Figur 4.14 SmdA^{ned} hindrer vekst av *S. aureus* NCTC8325-4 ved høyere temperaturer. Vekstanalyse ved nedregulering av SmdA i *S. aureus* NCTC8325-4 kontroll CRISPRi (no target) (TMK2) og CRISPRi (*smdA*) (TMK12). Vekst ble studert gjennom punktvis avsettelse av 10-ganger fortynningsrekker av kulturene på agarskåler. Agarskålene ble inkubert ~ 17 timer ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C.

4. Resultater

Resultater fra en RNA-sekvensering gjennomført i laboratoriegruppen (**Appendiks A7**), viste at ved $SmdA^{ned}$ vil CtsR-regulonet og enkelte Clp-proteiner med chaperon-aktivitet oppreguleres i *S. aureus*. Clp-ATPaser og Clp-proteolytiske komplekser er svært viktige under stresstilstander, eksempelvis temperaturøkning, da dette øker graden av proteinaggregering og misfolding (**Seksjon 1.4.1**) (Frees et al., 2004; Roncarati & Scarlato, 2017). Et kjennetegn ved stammer med mutasjoner i Clp-systemet, er at de har redusert termotabilitet; en evne til å overleve ved høye temperaturer (**Seksjon 1.4.2**). Det at $SmdA^{ned}$ påvirker vekst ved høyere temperaturer i *S. aureus*, sett i sammenheng med det økte uttrykket av Clp-proteiner med chaperon-aktivitet, gjorde det interessant å studere om $SmdA$ er involvert i induisering av termotoleranse i *S. aureus*. For å undersøke dette ble hver kultur splittet i to like deler for inkubasjon ved 37 °C eller 46 °C i 30 minutter. Etter endt inkubering ble alle kulturer eksponert for 60 °C i 7 minutter, før det ble tillaget 10-ganger fortyningsserier og som ble spottet på agarskåler. Skålene ble inkubert ved 37 °C i ~ 17 timer. Vekstanalysen (**Figur 4.15**) viser at preeksoneringen ved 46 °C, i motsetning til ved 37 °C, gjør det mulig for kontrollstammen (CRISPRi no target, TMK2) å overleve eksponering ved 60 °C. Det er dette som kalles induert termotoleranse (Frees et al., 2004). $SmdA^{ned}$ (TMK12) viser imidlertid ingen slik induert termotoleranse, da det ikke er vekst for noen av preeksoneringene. Dette indikerer at $SmdA$ er et essensielt protein for å induere termotoleranse i *S. aureus* NCTC8325-4.

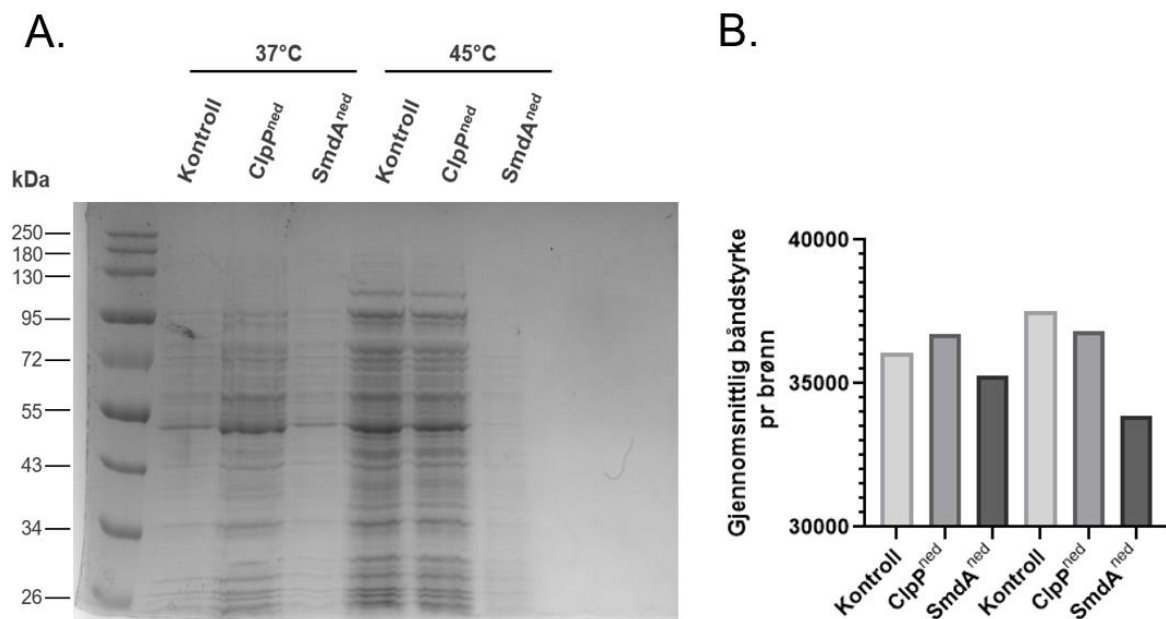


Figur 4.15 $SmdA$ er essensiell for induisering av termotoleranse i *S. aureus* NCTC8325-4. Vekstanalyse med spotting gjennomført i *S. aureus* NCTC8325-4 kontroll CRISPRi (no target) (TMK2) og CRISPRi ($smdA$) (TMK12). Alle kulturer ble splittet i to halvdel, der ene halvdel ble preeksonert for 37 °C i 30 minutter og andre halvdel eksponert tilsvarende ved 46 °C. Etter endt inkubasjon ble alle kulturer eksponert for 60 °C i 7 minutter, før det ble tillaget 10-ganger fortyningsserier som ble spottet på agarskåler. Agarskåler ble inkubert ved 37 °C i ~ 17 timer.

4. Resultater

4.8 SmdA påvirker dannelsen av proteinaggregater i *S. aureus*

Videre var interessant å studere hvordan reduksjonen i termotoleranse og redusert vekst under høye temperaturer i SmdA^{ned} (Seksjon 4.7) henger sammen med det oppregulerte uttrykket av CtsR-regulonet (Appendiks A7). I forsøket ble det forsøkt å finne ut om den presumptivt økte chaperonaktiviteten ved SmdA^{ned} ville påvirke mengden proteinaggregater i celler dyrket på høy temperatur. Mengden proteinaggregater ble sammenlignet mellom kulturer dyrket på 37 °C i 4 timer og mellom kulturer inkubert ytterligere i 2 timer på 45 °C (metodebeskrivelse Seksjon 3.11) i en SDS-PAGE (Figur 4.16A, båndene viser proteinaggregater). En stamme med nedregulert ClpP protein (ClpP^{ned}), hvor økning i proteinaggregater er forventet (Stahlhut et al., 2017), ble inkludert i forsøket. Ved 37 °C viser ClpP^{ned} en klart større mengde proteinaggregater i kulturene sammenlignet både med kontrollstammen (CRISPRi no target, TMK2) og SmdA^{ned}, ut ifra antall bånd og kvantifisering av proteinbåndene i gelen (Figur 4.16B).



Figur 4.16 Deteksjon og kvantifisering av proteinaggregater ved SmdA^{ned}. (A) Gjennomført SDS-PAGE for separasjon av proteinaggregater i *S. aureus* NCTC8235-4 kontroll CRISPRi (no target) (TMK2), CRISPRi *clpP* (TMK49) og CRISPRi *smdA* (TMK12). Tre av kulturene er dyrket på 37 °C i 4 timer før isolering av proteinaggregater, og de tre resterende er inkubert i ytterligere 2 timer på 45°C. (B) Gjennomsnittlig målt båndintensitet (gjennomført i programmet Azurespot 1D gel analysis) i hver brønn er: 37 °C kontroll CRISPRi (no target) 36072, ClpP^{ned} 36741, SmdA^{ned} 34264, 45 °C kontroll CRISPRi (no target) 37535, ClpP^{ned} 36849, SmdA^{ned} 33876. Det er ikke trukket fra bakgrunnsstøy ved målt båndstyrke.

4. Resultater

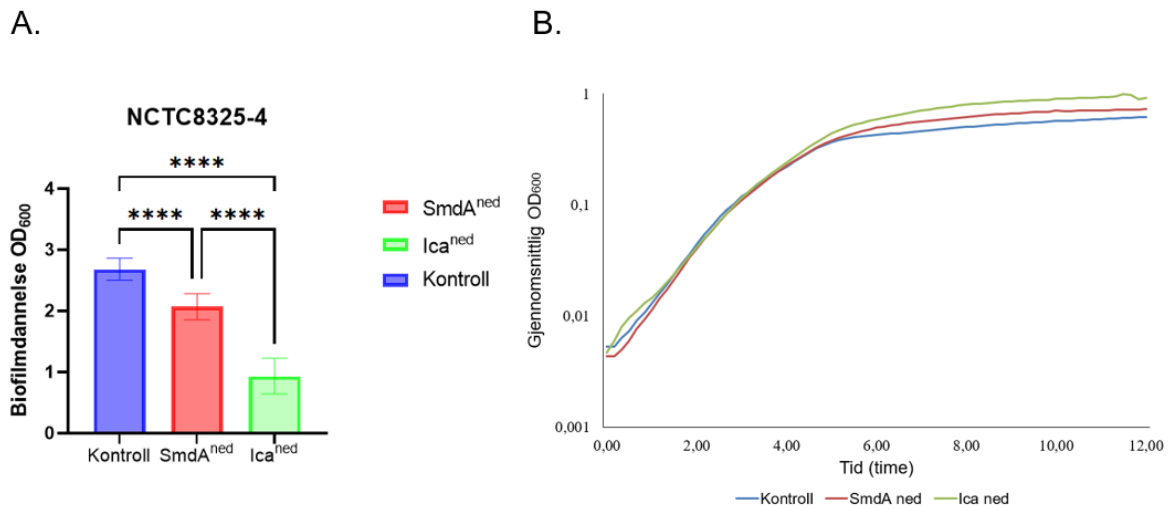
Det er større mengde proteinaggregater i kultur fra 45 °C sammenlignet med 37 °C for kontrollen, for ClpP^{ned} er det omtrent likt mengde, mens for SmdA^{ned} er det en mindre mengde proteinaggregater i kulturen fra 45 °C enn 37 °C. Resultatene indikerer at det er mindre proteinaggregater i *S. aureus* ved SmdA^{ned}. Forsøket er repetert i to omganger, hvor andre gjennomføring er vist i **Appendiks A8**. Resultatene her er tilsvarende som beskrevet over.

4.9 SmdA^{ned} har en signifikant påvirkning på biofilmdannelse i *S. aureus* NCTC8325-4

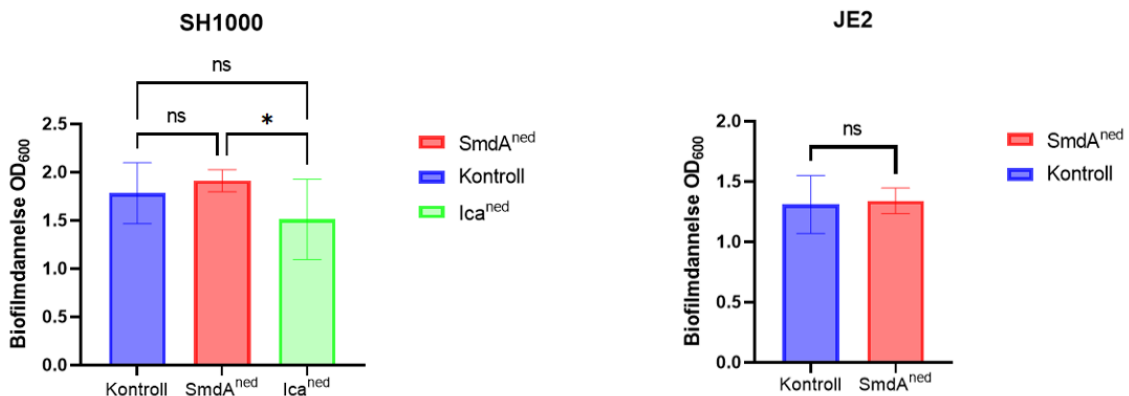
Resultater fra RNA-sekvensering (**Appendiks A7**) viste at gener i *ica*-operonet var blant genene som blir nedregulert ved SmdA^{ned}. *ica*-operonet er involvert i biofilmdannelse, og det var derfor interessant å undersøke om SmdA^{ned} ville påvirke dannelsen av biofilm i *S. aureus*. Mengden biofilm dannet ved 37 °C ble studert ved biofilmfarging med krystallfiolett (se **Seksjon 3.12** for fremgangsmetode). **Figur 4.17** viser signifikansnivåer mellom dannet biofilm samt vekstkurver for kulturene de første 12 timene av inkubasjonen i NCTC8325-4. I **Figur 4.17A** er det en statistisk signifikant reduksjon i dannet biofilm ved SmdA^{ned} sammenlignet med kontrollen (CRISPRi no target, TMK2). En stamme med nedregulert uttrykk av *ica* (Ica^{ned}) ble inkludert i forsøket, hvor reduksjonen i biofilmdannelse er enda tydeligere. SmdA^{ned} fører dermed til reduksjon i biofilmdannelse sammenlignet med kontroll, men reduksjonen er ikke like stor som med Ica^{ned}. Vekstkurver i **Figur 4.17B** viser at de tre stammene vokser tilnærmet likt de første 12 timene av inkubasjonen. Vekst har dermed ikke vært en påvirkende faktor under biofilmdannelsen.

Samme analyse av biofilm ble gjennomført i to andre *S. aureus* stammer; SH1000 og JE2. Sammenlignet med biofilmdannelse i NCTC8325-4, er det ikke en statistisk signifikant differanse mellom kontroll (CRISPRi no target) og SmdA^{ned} i verken SH1000 eller JE2 vist i **Figur 4.18**. Det er verdt å merke seg at heller ikke Ica^{ned} har signifikant effekt på biofilmdannelse i SH1000 sammenlignet med kontroll. Vekstkurver for SH1000 og JE2 (**Appendiks A9**) viser at stammene vokser tilnærmet likt de første 12 timene, og vekst har heller ikke påvirket biofilmdannelsen av disse stammene. Resultatene tyder på at SmdA^{ned} har en signifikant påvirkning på biofilmdannelse i NCTC8325-4, men det samme er ikke tilfellet for SH1000 og JE2.

4. Resultater



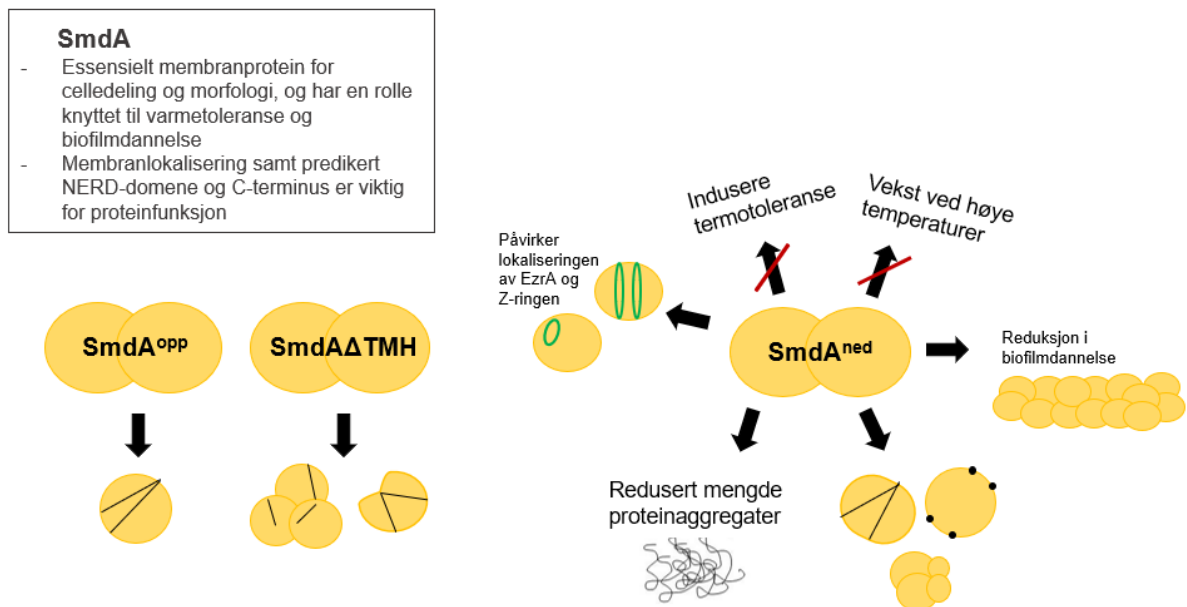
Figur 4.17 Biofilmdannelse ved SmdA^{ned} i NCTC8325-4. (A) Biofilmdannelse målt ved OD₆₀₀ (gjennomsnitt av tre separate målinger) i kontroll CRISPRi (no target) (TMK2), CRISPRi (*smdA*) (TMK12) og CRISPRi (*ica*) (TMK52). Utført statistisk enveis ANOVA-analyse etterfulgt av Tukey's metode i GraphPad Prism for analyse av signifikante differanser i biofilmdannelse (Versjon 9.3.1, GraphPad Software, www.graphpad.com). * viser nivå av signifikans (* p-verdi < 0,05, ** p-verdi < 0,01, *** p-verdi < 0,001, **** p-verdi < 0,0001). (B) Vekstkurver for målt gjennomsnittlig OD₆₀₀ over 12 timer for kontroll, SmdA^{ned} og Ica^{ned}.



Figur 4.18 Biofilmdannelse ved SmdA^{ned} i SH1000 og JE2. (A) Biofilmdannelse målt ved OD₆₀₀ (gjennomsnitt av tre separate målinger) for SH1000 i kontroll CRISPRi (no target) (TMK16) og CRISPRi (*smdA9*) (TMK15) og CRISPRi (*ica*) (TMK51) og for JE2 kontroll CRISPRi (no target) (TMK48) og CRISPRi (*smdA*) (TMK43). Utført statistisk enveis ANOVA-analyse etterfulgt av Tukey's metode for *S. aureus* SH1000 og uparet T-test for JE2 i GraphPad Prism for analyse av signifikante differanser i biofilmdannelse (Versjon 9.3.1, GraphPad Software, www.graphpad.com). * viser nivå av signifikans (* p-verdi < 0,05, ** p-verdi < 0,01, *** p-verdi < 0,001, **** p-verdi < 0,0001).

5. Diskusjon

Tidligere studier av SmdA har vist at proteinet har en viktig rolle for normal celledeling og morfologi i *S. aureus*, i tillegg til at et nedregulert uttrykk av proteinet gir økt sensitivitet mot celleveggangripende antibiotika. Målet med dette arbeidet var derfor å få en dypere forståelse for hvordan SmdA påvirker celsyklus og morfologi i *S. aureus*. Arbeidet har resultert i en bredere forståelse for SmdA sin rolle under celledeling, men også i sammenheng med termosensitivitet og under biofilmdannelse i *S. aureus*. En oversikt over resultatene utarbeidet er vist i **Figur 5.1**.



Figur 5.1 Oversikt over resultater fra gjennomførte funksjonelle studier av SmdA i arbeidet. Figuren gir en oversikt over hvilke effekter ulike uttrykte nivåer samt mutantstammer av SmdA vil ha på celledeling, celledeling, celledeling, celledeling, celledeling og proteinaggregater i celler av *S. aureus*. SmdA^{OPP} og SmdA^{ned} indikerer henholdsvis overuttrykk og et nedregulert uttrykk av SmdA.

5.1 Et nedregulert uttrykk av SmdA påvirker celledeling og lokalisering av EzrA

Tidligere studier av SmdA viste at et nedregulert uttrykk av proteinet ga redusert vekst ved 37 °C, men vekstreduksjonen var ikke fullstendig (Myrbråten, 2021). Det ble derfor forsøkt i dette arbeidet å konstruere en *smdA*-delesjonsmutant ved bruk av den temperatursensitive vektoren pIMAY (**Seksjon 3.8.3**), men til tross for gjentatte forsøk var det ikke mulig å bekrefte korrekt integrasjon av vektoren. Sett i sammenheng med at tidligere forsøk for å lage en delesjonsmutant i andre *S. aureus* stammer heller ikke vært vellykkede (Dr. Morten Kjos, personlig kommunikasjon), kan dette tyde på at *smdA* er et essensielt gen i *S. aureus* og at en delesjon derfor er letal. Dersom *smdA* er et essensielt gen, er det overraskende at det nedregulerte uttrykket av proteinet ikke resulterer i full veksthemming ved 37 °C (**Figur 4.14**). Er *smdA* essensielt, bør genet være uunnværlig for at *S. aureus* skal kunne vokse, noe resultatene i dette arbeidet ikke tyder på. En årsak kan være at uttrykket av SmdA ikke er fullstendig nedregulert i SmdA^{ned}-stammen, selv om tidligere forsøk tyder på dette (Myrbråten et al., 2022). I videre forsøk for å konstruere en delesjonsmutant av *smdA*, kan det være delesjonen er gjennomførbar dersom det uttrykkes en ektopisk induserbar kopi av proteinet fra et plasmid. Det induserte uttrykket av SmdA vil potensielt gjøre at delesjonen ikke blir letal for cellen, og videre kan uttrykket av SmdA fra den ektopiske kopien reguleres ut ifra induserkonsentrasjonen tilsatt.

For å studere hvordan et nedregulert uttrykk av SmdA (SmdA^{ned}) påvirker cellemorfologi og celleveggsyntese i *S. aureus* NCTC8325-4 og SH1000 ble fasekontrast- og fluorescensmikroskopi benyttet. Ved fasekontrastmikroskopi (**Figur 4.1**) ble det observert celler med varierende størrelser og klyngedannelser samt celler med en annen form enn typisk sfærisk morfologi for *S. aureus*. Celledelingsproteinene EzrA er en av faktorene som avgjør cellestørrelse i *S. aureus* (Jorge et al., 2011), og siden det er bekreftet en protein-protein interaksjon mellom SmdA og EzrA (Myrbråten et al., 2022), kan dette være en årsak til at SmdA^{ned} ikke gir celler av rett størrelse. Et oppregulert uttrykk av SmdA viser på en annen side ikke samme størrelsesvariasjon (**Figur 4.3**). Klyngedannelsene observert kan oppstå som en følge av at septum ikke splittes tilstrekkelig av autolysiner, og cellene vil derfor henge sammen selv etter dannelsen av datterceller. I *S. aureus* er Atl det viktigste autolysinet (Oshida et al., 1995; Zhou et al., 2015), og ble vist å fysisk interagere med SmdA i en pull-down analyse gjennomført i (Myrbråten et al., 2022). Som Myrbråten et al. (2022) også poengterer, er Atl et ekstracellulært protein. En forklaring på manglende autolyse-aktivitet i cellene kan derfor være

5. Diskusjon

at SmdA har en rolle enten direkte eller indirekte knyttet til transport av Atl til septum. Ved gjennomføring av flere forsøk for verifisering av fysisk proteininteraksjon mellom SmdA og Atl, eksempelvis BACHT (bacterial two-hybrid) analyse (Karimova et al., 1998), kan en påvist positiv interaksjon styrke hypotesen om at det er mangel på SmdA som fører til redusert autolyse av Atl.

Fluorescensmikroskopi med HADA markering (**Figur 4.1**), viste at et nedregulerte uttrykk av SmdA resulterer i flere aktive punkter for celleveggsyntese som igjen gir flere septa i cellene. SmdA^{ned} ble videre også vist å påvirke lokaliseringen av celledelingsproteinet EzrA i **Figur 4.2**. SmdA^{ned} ble vist å gi unormal lokaliseringen av EzrA-GFP, der lokaliseringen av delingsringen var mot ytterkanten av enkelte celler fremfor i midten. Det ble også observert flere Z-ringer, som kan forklare hvorfor SmdA^{ned} resulterer i flere aktive punkter for celleveggsyntese, da FtsZ er involvert i å rekruttere PBP og andre enzymer til divisomet etter etablering av ringstrukturen (Bisson-Filho et al., 2017). I tillegg viste Myrbråten et al. (2022) at SmdA fysisk interagerer med PBP1-3 (Myrbråten et al., 2022). En forklaring på hvorfor celleveggsyntesen skjer i flere punkter, kan derfor være at lokaliseringen til en eller flere PBP vil endres under septumdannelsen uten SmdA til stede. Om PBP endrer lokalisering, og eventuelt hvilke, krever ytterligere studier. Siden SmdA^{ned} fører til en mis-lokalisering av EzrA, tyder dette på feil koordinering av hele divisomet ved SmdA^{ned}. Det er likevel ikke mulig å konkludere med dette helt sikkert, da effekten observert på divisomet kan skyldes feil lokalisering av kun EzrA.

SmdA vist å lokalisere til septum etter både EzrA og FtsZ (Myrbråten et al., 2022). Et stort spørsmål er derfor hvordan SmdA^{ned} kan påvirke lokaliseringen av Z-ringen, og dermed rekrutteringen av proteiner i divisomet, slik at det dannes flere delingsplan i cellene. Som Myrbråten et al., 2022 også viser er SmdA beriket i septum under dannelse av Z-ringen. Dette kan gi grunn til å tro at fraværet av SmdA påvirker den dynamiske bevegelsen, treadmilling, av Z-ringen, og at det som en følge av defekt treadmilling etableres flere punkter for peptidoglykansyntese og dermed flere delingsplan. En annen forklaring kan være at SmdA interagerer med andre faktorer som bidrar til å stabilisere Z-ringen (og dermed avgjøre delingsplanet), slik som GpsB. Dersom SmdA enten direkte eller indirekte påvirker funksjonen til GpsB, kan fraværet av SmdA bidra til mindre stabilisering og organisering av FtsZ filamentene (Eswara et al., 2018). Om SmdA direkte påvirker og endrer lokaliseringen av PBP under septumdannelsen, eller har en mer direkte eller indirekte påvirkning på Z-ringen, er ikke mulig å anslå ut ifra de presenterte resultatene.

5.2 Membranlokalisering i tillegg til det predikerte NERD-domene og C-terminus er viktig for SmdA sin funksjon

Det ble videre gjennomført forsøk for å mer innsikt i hvordan proteinstrukturen og lokaliseringen av SmdA kan ha en betydning for funksjonen. Den predikerte membrantopologien til SmdA (**Figur 1.5B**) ble forsøkt bekreftet gjennom en Proteinase K beskyttelsesanalyse (**Figur 4.6**). Basert på resultatene var det ikke mulig å bekrefte eller avkrefte om den predikerte topologien var korrekt. Stammer konstruert for gjennomføring av selve forsøket med N- og C-terminal GFP-fusjonert SmdA, ble først mikroskopert (**Appendiks A3.1**). Som forventet viste C-terminal GFP-fusjonert SmdA et fluorescerende signal langs celleveggen med et beriket signal i septum, men i N-terminal GFP-fusjonert SmdA var det overraskende kun et ujevnt signal langs celleveggen. Det ujevne signalet i celleveggen samt at det ikke ble observert tydelig signal i septum viser at GFP-fusjoneringen i N-terminalen kan være noe forstyrrende for lokaliseringen av SmdA. Dette resultatet kan indikere at GFP blokkerer for mulige interaksjoner i N-terminalen av SmdA, som på et vis fører til at SmdA ikke blir rekruttert rett til septum.

Resultater fra gjennomført Western blot i selve Proteinase K beskyttelsesanalysen (**Figur 4.6**), viste at GFP-fusjonerte proteiner (SmdA-GFP og GFP-SmdA i tillegg til LacA-GFP) ble uttrykt som forventet. Problematisk var det likevel at signalet ser ut til å forsvinne i noe grad for både SmdA-GFP og GFP-SmdA etter behandling med Proteinase K, når det i utgangspunktet kun var forventet at signalet i N-terminal GFP-fusjonert SmdA skulle brytes ned. Signalet skulle heller ikke brytes ned for LacA-GFP siden dette er et intracellulært protein som ble brukt som kontroll, men det observeres likevel at signalet brytes helt ned. Noe av problemene med nedbrytning av GFP kan knyttes til lysering etter tilsetning av TSM buffer, og i noe grad etter behandling med Proteinase K (**Appendiks A3.2**). I begge repetisjoner av forsøket ble det benyttet en vesentlig høyere konsentrasjon av Proteinase K (5000 µg/mL og 10 000 µg/mL) sammenlignet med i tilsvarende forsøk, men det er ikke helt kjent hvilken effekt dette har hatt på cellene. Problematisk er det også i forsøket at det fremdeles er signal etter behandling med kombinasjonen av Proteinase K og detergenten Trion-X. Dette viser at SmdA-GFP og GFP-SmdA ikke er sensitive for proteinase K, mest sannsynlig fordi cellemembranen ikke er brutt tilstrekkelig ned eller en annen ukjent årsak. Ved videre oppfølging av dette forsøket bør det testes en annen detergent, eventuelt benyttes en annen metode for å bekrefte membrantopologien. Dette kan være gjennom bruk av antistoff som vil binde et spesifikt domene av SmdA, eller innføring av enzymatiske domener i proteinet.

5. Diskusjon

Det transmembrane domenet (**Figur 1.5B**) ankrer SmdA i cellemembranen, og er derfor viktig for lokaliseringen av proteinet i cellen. Interessant nok viste resultatene fra uttrykt fenotype ved SmdA Δ TMH^{opp} (**Figur 4.7**) at den cytoplasmiske lokaliseringen av SmdA fører til store morfologiske endringer. Cellene viser klyngedannelser samt høy grad av mis-lokalisert septumdannelse med flere septa og unormal form. Sammenlignet med SmdA^{opp} (**Figur 4.3A**), vil SmdA Δ TMH^{opp} i større grad påvirke morfologi i *S. aureus*. Samtidig bør det også nevnes at det ikke er kjent om SmdA kan interagere med seg selv, og eventuelt også den forkortede versjonen (SmdA Δ TMH). Om dette er tilfellet, så kan noe av effekten vi ser på morfologi skyldes nettopp en slik interaksjonen. I et videre arbeid kan en protein-protein analyse som BACHT gjennomføres for å bekrefte eller avkrefte den mulige interaksjonen. Det ble også gjennomført forsøk hvor TMH i SmdA er byttet ut med et annet transmembrant domene fra en annen bakterieart (resultater ikke inkludert). Utskiftningen av domene ga samme påvirkning på morfologi som observert for SmdA Δ TMH^{opp}, og basert på dette kan det være mulig å anslå at domenet i seg selv ikke har en så stor betydning for funksjon, men lokaliseringen i membranen er svært viktig for SmdA sin proteinfunksjon.

Siden NERD-domener i liten grad har blitt studert tidligere (Myrbråten et al., 2022), var det videre interessant i arbeidet å finne ut hvilken betydning det predikerte NERD-domenet i SmdA har for proteinfunksjon. Da SmdA Δ TMH^{opp} viste en markant påvirkning på cellemorfologi, ble det tatt utgangspunkt i dette resultatet for å videre studere konserverte reisdUER i NERD-domenet og den C-terminale delen av SmdA. I de tre versjonene av SmdA Δ TMH benyttet, var Mut1 og Mut2 i NERD-domenet og Mut3 i den C-terminale delen (**Figur 4.10**). Mikroskopi med HADA innmerking av aktiv celleveggsyntese (**Figur 4.11**) viser at et oppregulert uttrykk av de tre mutantene, sammenlignet med SmdA Δ TMH^{opp}, helt klart reduserer andelen unormale celler og cellene har en morfologi mer lignende villtype. Sammen med mikroskopibilder viser også frekvensdata (**Figur 4.11B**) at andelen unormale celler i Mut1 er lavere sammenlignet med Mut2 og Mut3, som kan tyde på at Mut1 er viktigere for proteinfunksjonen til SmdA. Ut ifra resultatet er det ikke mulig å vite om SmdA Δ TMH mister proteinfunksjonen helt eller delvis på grunn av selve mutasjonene eller om mutasjonene fører til feilfolding av proteinet. Det er samtidig lite sannsynlig at kun en konservert aminosyre (som i Mut1) er avgjørende for rett folding av SmdA.

Basert på resultatene i dette arbeidet er det vanskelig å anslå en direkte funksjon for det predikerte NERD-domenet. Som Myrbråten et al., (2022) poengterer har ikke NERD-domenet i SmdA de mest konserverte residuene som finnes i andre homologer av NERD-domenet, og

5. Diskusjon

derfor kan det predikerte domenet i SmdA ha en helt annen funksjon enn relatert til nuklease-aktivitet (Grynberg & Godzik, 2004). For å finne ut om NERD-domenet i SmdA har en sammenheng med DNA-prosessering kan det være interessant å studere for eksempel segregering av DNA ved fluorescensmikroskopi i Mut1 og Mut2 sammenlignet med eksempelvis villtype *S. aureus*.

5.3 SmdA er essensiell for termosensitivitet og indusering av termotoleranse i *S. aureus*

Resultater fra vekstanalysene viser at SmdA^{ned} gir noe redusert vekst ved 37 °C i *S. aureus* NCTC8325-4 (**Figur 4.14**). Sammenlignet er vekstreduksjonen tydeligere ved 40 °C, og veksten er fullstendig hemmet ved 45 °C i denne stammen. Vekstanalyse av SmdA^{ned} gjennomført i andre *S. aureus* stammer (**Appendiks A6**), viser tilsvarende resultater hvor veksten hemmes fullstendig i SH1000 og i stor grad i JE2 ved 45 °C. Årsaken til at verken SmdA^{ned} eller kontrollen (CRISPRi no target) av *S. aureus* COL vokste ved 45 °C er ukjent. Slik som SmdA er vist å være et essensielt protein for vekst ved høyere temperaturer i *S. aureus* NCTC8325-4, SH1000 og i JE2, er samme termosensitivitet observert i mutanter av gener involvert i celledeling (for eksempel autolysinet LytH (Do et al., 2020)), og chaperoner ClpB og ClpC i *S. aureus* NCTC8325-4 (Frees et al., 2004). Frees et al., (2004) viser også at ClpC mutanter er i noe grad mer termosensitive enn ClpB mutanter.

Den økte termosensitiviteten vist ved SmdA^{ned} i sammenheng med det oppregulerte uttrykket av CtsR-regulonet (negativ regulator varmesjokk) og Clp-proteiner (chaperoner) fra RNA-sekvensering ved SmdA^{ned} (**Appendiks A7**), gjorde det videre interessant å se om SmdA er involvert i indusering av termotoleranse i *S. aureus*. Termotoleranse er en tilstand som indueres etter preeksposering for en temperaturøkning, og gir cellen bedre stresshåndteringsevne og overlevelse ved et senere varmesjokk som ellers ville vært letalt (Pespeni et al., 2005). Resultatene (**Figur 4.15**) viste at preeksposeringen for 46 °C, i motsetning til 37 °C, gjør at kontrollstammen (CRISPRi no target) induserer termostabilitet og som en følge klarer å overleve eksponeringen for 60 °C. SmdA^{ned} viste ingen vekst og dermed ikke induert termotoleranse i *S. aureus* NCTC8325-4. Det er også kjent at ClpB mutanter i *S. aureus* NCTC8325-4 heller ikke kan indusere termotoleranse (Frees et al., 2004). Et pull-down forsøk gjennomført viser en protein-protein interaksjon mellom SmdA og ClpB, men også ClpC (Myrbråten et al., 2022). Gjennomført protein-protein analyse ved BACHT bekrefter også dette,

5. Diskusjon

ved en svak interaksjon mellom SmdA og ClpB (resultater ikke vist). Som vist i Frees et al., (2004) vil en ClpB-mutant likevel kun ha noe effekt på induseringen i *S. aureus* SH1000. Det er derfor viktig å påpeke selv om SmdA^{ned} ikke fører til induisert termotoleranse i NCTC8325-4, så er det ikke kjent om dette er tilsvarende i andre stammer av *S. aureus*. Forsøket bør derfor gjentas i andre stammer for å kunne bekrefte dette.

Sammen med oppregulert uttrykk av *ctsR-clpC*-operonet og *clpB* vist i RNA-sekvenseringen (**Appendiks A7**), blir også andre stressoperoner som *hrcA-dnaK* og *groESL* oppregulert ved SmdA^{ned}. CtsR er som tidligere nevnt også en negativ regulator av disse operonene (**Seksjon 1.4.2**). Med det økte uttrykket av *ctsR* er det noe overraskende at transkripsjonen av disse også øker (Roncarati & Scarlato, 2017). En interaksjon mellom CtsR og SmdA ble heller ikke påvist i protein-protein analyse BACHT (resultater ikke vist). Det kan derfor tyde på at SmdA^{ned} fører til en form for induisert stressrespons i cellen med oppregulert chaperon-aktivitet, tilsvarende som indueres ved varmesjokk. Likevel blir ikke *clpP* som en del av CtsR-regulonet signifikant oppregulert ved SmdA^{ned}. Som kjent kan ClpP danne proteolytiske komplekser sammen med ClpC eller ClpX i *S. aureus*, hvor ClpCP er et viktigere kompleks for degradering av skadede eller feilfoldede proteiner (Roncarati & Scarlato, 2017; Stahlhut et al., 2017). Selv om uttrykket av *clpC* oppreguleres, er det derfor usikkert om responsen fører til økt proteolytisk-aktivitet. Resultater vist i RNA-sekvenseringen av opp- og nedregulerte genuttrykk ved SmdA^{ned}, bør verifiseres i et videre arbeid med flere biologiske replikater. I dette arbeidet ble det forsøkt å verifisere det oppregulerte uttrykket av *clpB* (resultater ikke vist), men resultatet var inkonklusivt.

Videre i arbeidet var det interessant å studere hvordan manglende induksjon av termotoleranse og redusert vekst ved SmdA^{ned} henger sammen med det oppregulerte uttrykket av CtsR-regulonet vist i RNA-sekvenseringen (**Appendiks A7**). Det ble derfor gjennomført et forsøk for å studere om mengden proteinaggregater i celler med SmdA^{ned} ville påvirkes av den økte chaperon-aktiviteten. Proteinaggregater ble kvantifisert i en SDS-PAGE fra kulturer dyrket på 37 °C i 4 timer og fra kulturer inkubert ytterligere i 2 timer på 45 °C. Ut ifra kvantifikasjon av bånd og båndstyrke (**Figur 4.16**) viser resultatene i stammene dyrket ved 37 °C at ClpP^{ned}, som forventet, har et større antall proteinaggregater sammenlignet med både kontroll (CRISPRi no target) og SmdA^{ned}. I kulturer dyrket ved 45 °C har Clp^{ned} omtrent samme mengde proteinaggregater som dyrket ved 37 °C, mens kontrollen (CRISPRi no target) har en økt mengde. Basert på resultater fra gjennomføringen av to separate paralleller av forsøket (**Figur 4.16A, Appendiks A8**), ser det ut til å dannes mindre proteinaggregater ved SmdA^{ned} i *S. aureus*

5. Diskusjon

NCTC8325-4 sammenlignet med villtype. Dette kan forklares ut ifra det oppregulerte uttrykket av chaperoner ved SmdA^{ned}. Spesielt det økte uttrykket av *clpB* i cellen, som er antatt å kunne løse opp proteinaggregater i Gram-positive bakterier slik som i *E. coli* og gjær under varmesjokk (Frees et al., 2007), kan være en av årsakene til at SmdA^{ned} gir mindre proteinaggregater. På en annen side er det likevel noe overraskende at mengden aggregater er mindre, da SmdA^{ned} som tidligere nevnt ikke fører til et signifikant økt genuttrykk av den katalytiske subenheten ClpP i proteolytiske komplekser.

Det bør også nevnes at i gjennomføringen av forsøket (metodebeskrivelse **Seksjon 3.11**) så er det ikke inkludert noe form for kontroll på om det forsvinner proteinaggregater underveis i det eksperimentelle oppsettet. Fra proteinkonsentrasjonen måles og frem til prøvene appliseres på SDS-PAGE, er det en rekke inkubasjonstrinn, hvor det er en mulighet for at aggregater kan forsvinne. Likevel er det gjennomført to separate paralleller av forsøket, hvor resultatene samsvarer, som igjen styrker indikasjonen om at SmdA^{ned} fører til redusert mengde proteinaggregater.

Med utgangspunkt i at det dannes mindre proteinaggregater ved SmdA^{ned}, skulle det samtidig vært naturlig å anta at *S. aureus* ville ha en økt stresstoleranse og vært mer termostabil. Dette resultatet er derfor motstridende med at *S. aureus* NCTC8325-4 har fullstendig hemmet vekst uten SmdA ved 45 °C og heller ikke kan inducere termotoleranse etter preeksponering for 46 °C. Hvorfor stresshåndteringsevnen begrenses ved økt temperatur uten SmdA, selv om mengden proteinaggregater samtidig reduseres, er et komplekst spørsmål som krever flere studier.

5.4 *S. aureus* NCTC8325-4 danner mindre biofilm uten SmdA til stede

Blant nedregulerte genuttrykk i RNA-sekvenseringen ved SmdA^{ned} (**Appendiks A7**), var *ica*-operonet et av de mest interessante funnene, da det er tilknyttet biofilmdannelse. *Ica*-operonet koder for det eksopolysakkaridet som utgjør hoveddelen av ekstracellulær matriks i *S. aureus*, og som er viktig for å feste celler og for formering av biofilmen (Nguyen et al., 2020). Den påviste nedregulerte uttrykket gjorde det derfor interessant å studere om SmdA^{ned} ville påvirke dannelsen av biofilm i *S. aureus*. Mengden biofilm dannet ved 37 °C ble studert ved krystallfiolett farging (**Seksjon 3.13**), hvor mengden krystallfiolett fanget i biofilmmatriksen vil tilsvare mengden biofilm dannet. Resultatet viser at det er en statistisk signifikant reduksjon i biofilmdannelse (**Figur 4.17A**) ved SmdA^{ned} sammenlignet med kontroll (CRISPRi no target)

5. Diskusjon

i *S. aureus* NCTC8325-4, men Ica^{ned} viser en større reduksjon. Årsaken til dette er trolig at Ica^{ned} har enda lavere uttrykk av *ica* enn $SmdA^{ned}$. Siden $SmdA^{ned}$ gir en svært tydelig påvirkning på morfologi, kunne redusert vekst vært en påvirkende faktor under biofilmdannelsen. Vekstkurver for kulturene (**Figur 4.17B**) viser likevel stammene vokser likt de første 12 timene av inkubasjonen. Andre forsøk gjennomført i laboratoriegruppen viser også at $SmdA^{ned}$ fører til redusert dannelse av eksopolysakkaridet PIA uttrykt fra *ica*-operonet (**Seksjon 1.1.1**) (upublisert). Basert på disse resultatene, kan det være at $SmdA$ enten direkte eller indirekte vil kunne påvirke uttrykket av *ica*-operonet, og derfor dannelsen av biofilm i NCTC8325-4. Hvordan $SmdA$ er involvert i dette er ikke kjent.

Som tidligere diskutert fører $SmdA^{ned}$ til økte klyngedannelser av celler (**Seksjon 5.1**), som gjør at $SmdA$ kan mistenkes å påvirke funksjonen til autolysinet Atl på et vis. Atl er ikke kun involvert i splittelsen av datterceller i *S. aureus*, men også et viktig protein for å feste celler til overflater, derav polystyrene, og multiplisering av celler under biofilmdannelse (Biswas et al., 2006; Moormeier et al., 2014). Siden det dannes mindre biofilm ved mangel på $SmdA$, kan en derfor spekulere i om en hypotetisk enten direkte eller indirekte interaksjon mellom $SmdA$ og Atl også vil spille en rolle for festelse og etablering av biofilm i forsøket. Om $SmdA$ interagerer med andre proteiner som bidrar til å feste celler og etablere biofilm er ikke kjent.

For de andre *S. aureus* stammene SH1000 og JE2, er det sammenlignet med NCTC8325-4, ikke en statistisk signifikant differanse i biofilmdannelse mellom $SmdA^{ned}$ og kontrollen (CRISPRi no target) i noen av stammene (**Figur 4.18**). Interessant nok har heller ikke Ica^{ned} en påvirkning på mengde biofilm dannet i SH1000. Hvorfor et nedregulert uttrykk av *ica*-operonet ikke påvirker biofilmdannelsen i SH1000 er ikke kjent, men det tidligere studier viser at stammen mulig har en mekanisme for biofilmformering uavhengig av *ica*-operonet. Det er derfor mulig at *ica*-operonet er nedregulert også i disse stammene, men at dette ikke gir utslag i endret biofilmdannelse. Likevel er det flere usikkerheter knyttet til metoden benyttet. Forsøket baserer seg på at krystallfiolett vil bli fanget i biofilmmatriksen, og derfor vil mengden krystallfiolett korrelere med mengden biofilm dannet. De ulike inkubasjons- og vasketrinnene i forsøket medfører en stor del manuelt arbeid med biofilmen, og dermed en sjanse for at noe av biofilmen kan gå tapt. Derfor er det viktig at det gjennomføres flere paralleller av forsøket. Dette er det tatt høyde for i arbeidet, ved at OD_{600} verdier for biofilmdannelse er gjennomsnitt av tre separate målinger.

6. Konklusjon og videre arbeid

Hensikten med dette studiet var å undersøke og få dypere innsikt i den funksjonelle rollen til det nylig identifiserte membranproteinet SmdA, vist å påvirke celledeling og morfologi hos *S. aureus* (Myrbråten et al., 2022). Gjennom innføring av CRISPRi-systemet i *S. aureus* ble det, som tidligere, vist at et nedregulert uttrykk av SmdA fører til en tydelig påvirket cellemorfologi samt celleveggsyntese med dannelse av flere septa. Det ble også vist at fravær av SmdA påvirker lokaliseringen av celledelingsproteinet EzrA, og dermed den videre koordineringen av divisomet. SmdA ser derfor ut til å være viktig for flere trinn av celledelingsprosessen i *S. aureus*. Resultatene i dette arbeidet indikerer i tillegg at SmdA har en bredere rolle tilknyttet termosensitivitet og stresstoleranse ved eksponering for høyere temperaturer. Gjennom vekstanalyser ble det vist at *S. aureus* har fullstendig hemmet vekst ved 45 °C uten SmdA, og har redusert induisering av termotoleranse etter preeksponering for høyere temperaturer uten proteinet til stede. Lokaliseringen av SmdA i membranen i tillegg til NERD-domenet og C-terminal del av strukturen, ble vist å være viktig for proteinfunksjonen. Det er likevel ikke kjent hvilken betydning disse domenene har for funksjon. I tillegg kan det antas fra dette arbeidet at SmdA har en påvirkning, enten direkte eller indirekte, på uttrykk av *ica*-operonet og dermed biofilmdannelse i *S. aureus* NCTC8325-4.

Myrbråten et al., (2021) foreslår en funksjon for SmdA som et scaffold protein, og at det dermed samhandler med og koordinerer interaksjoner mellom andre proteiner. Basert på resultatene i dette studiet er det ikke mulig å fastslå den eksakte molekylære mekanismen til SmdA. Likevel indikerer resultatene at SmdA er et essensielt membranprotein i *S. aureus* som deltar enten aktivt eller passivt i flere fundamentale cellulære prosesser, og en rolle som scaffold protein kan derfor være passende. For å nærmere kunne fastslå den spesifikke funksjonen vil det være nyttig å finne ut mer om SmdA sin bindings- og interaksjonsevne. Om det predikerte NERD-domenet har en funksjon i tilknytning til DNA, om SmdA kan binde signalmolekyler eller om proteinet har enzymatisk aktivitet, er flere aktuelle spørsmål i den videre forskningen. I tillegg ble det i Myrbråten et al., (2022) vist at andre proteiner involvert i folding, degradering og eksport av proteiner ble ekstrahert sammen med SmdA i en pull-down analyse, og det vil videre være interessant å kunne bekrefte en fysisk proteininteraksjon med disse.

Et av de mest interessante spørsmålene etter dette arbeidet, er hvorfor stresshåndteringsevnen og termostabiliteten reduseres ved økt temperatur uten SmdA, selv om mengden proteinaggregater samtidig reduseres og ekspresjonen av Clp-proteinene øker. Det vil videre

6. Konklusjon og videre arbeid

være nyttig å se om celler av *S. aureus* med et nedregulert uttrykk av SmdA vil påvirkes av andre stressfaktorer på samme måte som varme.

For å kunne finne nye angrepspunkt for antibiotika er det viktig studere funksjonen til essensielle gener. Som beskrevet innledningsvis er det observert en drastisk økning av resistente *S. aureus* MRSA stammer, men også VRSA. At et nedregulert uttrykk av SmdA er vist å føre til økt sensitivitet mot β -laktamer (Myrbråten et al., 2022), gjør at SmdA potensielt kan være et nytt angrepspunkt i kombinasjon med bruk av mer bredspektret antibiotika.

Referanser

- Ajduk, A. & Szkulmowski, M. (2019). Light microscopy of mammalian gametes and embryos: methods and applications. *Int J Dev Biol*, 63 (3-4-5): 235-244. doi: 10.1387/ijdb.180300aa.
- Andersson, D. I. & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*, 12 (7): 465-78. doi: 10.1038/nrmicro3270.
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., et al. (2017). Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol*, 43 (3): 313-351. doi: 10.1080/1040841x.2016.1208146.
- Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsis, B. & Torres, V. J. (2017). *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis*, 75 (1). doi: 10.1093/femspd/ftx005.
- Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S. & Blanot, D. (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32 (2): 168-207. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x.
- Berlanga, M. & Guerrero, R. (2016). Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microbial Cell Factories*, 15 (1): 165. doi: 10.1186/s12934-016-0569-5.
- Bisson-Filho, A. W., Hsu, Y. P., Squyres, G. R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M. S., et al. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, 355 (6326): 739-743. doi: 10.1126/science.aak9973.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G. & Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett*, 259 (2): 260-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13 (1): 42-51. doi: 10.1038/nrmicro3380.
- Bonilla, C. Y. (2020). Generally Stressed Out Bacteria: Environmental Stress Response Mechanisms in Gram-Positive Bacteria. *Integr Comp Biol*, 60 (1): 126-133. doi: 10.1093/icb/icaa002.
- Bottomley, A. L., Liew, A. T. F., Kusuma, K. D., Peterson, E., Seidel, L., Foster, S. J. & Harry, E. J. (2017). Coordination of Chromosome Segregation and Cell Division in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*, 8: 1575. doi: 10.3389/fmicb.2017.01575.
- Cebrián, G., Condón, S. & Mañas, P. (2009). Heat-adaptation induced thermotolerance in *Staphylococcus aureus*: Influence of the alternative factor sigmaB. *Int J Food Microbiol*, 135 (3): 274-80. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.010.
- Chan, H., Söderström, B. & Skoglund, U. (2020). Spo0J and SMC are required for normal chromosome segregation in *Staphylococcus aureus*. *Microbiologyopen*, 9 (4): e999. doi: 10.1002/mbo3.999.
- Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A. & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods*, 1 (22-25).
- Chastanet, A., Fert, J. & Msadek, T. (2003). Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 47 (4): 1061-1073. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03355.x.
- Côté-Gravel, J. & Malouin, F. (2019). Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. *J Dairy Sci*, 102 (5): 4727-4740. doi: 10.3168/jds.2018-15272.

- Database resources of the National Center for Biotechnology Information. (2016). *Nucleic Acids Res*, 44 (D1): D7-19. doi: 10.1093/nar/gkv1290.
- David, M. Z. & Daum, R. S. (2017). Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. I: Bagnoli, F., Rappuoli, R. & Grandi, G. (red.) *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, s. 325-383. Cham: Springer International Publishing.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74 (3): 417-33. doi: 10.1128/membr.00016-10.
- Derré, I., Rapoport, G. & Msadek, T. (1999). CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 31 (1): 117-131. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01152.x>.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M. & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 68 (6): 2950-8. doi: 10.1128/aem.68.6.2950-2958.2002.
- Do, T., Schaefer, K., Santiago, A. G., Coe, K. A., Fernandes, P. B., Kahne, D., Pinho, M. G. & Walker, S. (2020). *Staphylococcus aureus* cell growth and division are regulated by an amidase that trims peptides from uncrosslinked peptidoglycan. *Nat Microbiol*, 5 (2): 291-303. doi: 10.1038/s41564-019-0632-1.
- Dong, X., Jin, Y., Ming, D., Li, B., Dong, H., Wang, L., Wang, T. & Wang, D. (2017). CRISPR/dCas9-mediated inhibition of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods*, 139: 79-86. doi: 10.1016/j.mimet.2017.05.008.
- Eswara, P. J., Brzozowski, R. S., Viola, M. G., Graham, G., Spanoudis, C., Trebino, C., Jha, J., Aubee, J. I., Thompson, K. M., Camberg, J. L., et al. (2018). An essential *Staphylococcus aureus* cell division protein directly regulates FtsZ dynamics. *Elife*, 7. doi: 10.7554/eLife.38856.
- Fey, P. D., Endres, J. L., Yajjala, V. K., Widhelm, T. J., Boissy, R. J., Bose, J. L. & Bayles, K. W. (2013). A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *mBio*, 4 (1): e00537-12. doi: 10.1128/mBio.00537-12.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8 (9): 623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sørensen, K., Hill, P., Msadek, T. & Ingmer, H. (2004). Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 54 (5): 1445-1462. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04368.x.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P. & Ingmer, H. (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 63 (5): 1285-95. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133 (3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Grynberg, M. & Godzik, A. (2004). NERD: a DNA processing-related domain present in the anthrax virulence plasmid, pXO1. *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (3): 106-110. doi: 10.1016/j.tibs.2004.01.002.
- Gründling, A. & Schneewind, O. (2006). Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 188 (7): 2463-72. doi: 10.1128/jb.188.7.2463-2472.2006.
- Hecker, M., Schumann, W. & Völker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 19 (3): 417-28. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.396932.x.

- Helle, L., Kull, M., Mayer, S., Marincola, G., Zelder, M. E., Goerke, C., Wolz, C. & Bertram, R. (2011). Vectors for improved Tet repressor-dependent gradual gene induction or silencing in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)*, 157 (Pt 12): 3314-3323. doi: 10.1099/mic.0.052548-0.
- Horsburgh, M. J., Aish, J. L., White, I. J., Shaw, L., Lithgow, J. K. & Foster, S. J. (2002). sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol*, 184 (19): 5457-67. doi: 10.1128/jb.184.19.5457-5467.2002.
- Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. & O'Gara, J. P. (2011). Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun*, 79 (3): 1153-65. doi: 10.1128/iai.00364-10.
- Hsu, Y.-P., Rittichier, J., Kuru, E., Yablonowski, J., Pasciak, E., Tekkam, S., Hall, E., Murphy, B., Lee, T. K., Garner, E. C., et al. (2017). Full color palette of fluorescent d-amino acids for in situ labeling of bacterial cell walls. *Chemical Science*, 8 (9): 6313-6321. doi: 10.1039/C7SC01800B.
- Jevons, M. P., Coe, A. W. & Parker, M. T. (1963). Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet*, 1 (7287): 904-7. doi: 10.1016/s0140-6736(63)91687-8.
- Johannessen, M., Sollid, J. E. & Hanssen, A. M. (2012). Host- and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. *Front Cell Infect Microbiol*, 2: 56. doi: 10.3389/fcimb.2012.00056.
- Jorge, A. M., Hoiczuk, E., Gomes, J. P. & Pinho, M. G. (2011). EzrA contributes to the regulation of cell size in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 6 (11): e27542. doi: 10.1371/journal.pone.0027542.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596 (7873): 583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Jun, S. & Wright, A. (2010). Entropy as the driver of chromosome segregation. *Nat Rev Microbiol*, 8 (8): 600-7. doi: 10.1038/nrmicro2391.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (10): 5752-6. doi: 10.1073/pnas.95.10.5752.
- Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. (2019). Electroporation. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019 (7). doi: 10.1101/pdb.top096271.
- Kumar, S., Singh, S., Kumar, V., Datta, S., Dhanjal, D. S., Sharma, P. & Singh, J. (2020). Pathogenesis and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. I: Siddhardha, B., Dyavaiah, M. & Syed, A. (red.) *Model Organisms for Microbial Pathogenesis, Biofilm Formation and Antimicrobial Drug Discovery*, s. 99-115. Singapore: Springer Singapore.
- Kurien, B. T. & Scofield, R. H. (2015). Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*, 1312: 17-30. doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5.
- Kwiecinski, J. M. & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol*, 53: 51-60. doi: 10.1016/j.mib.2020.02.005.
- Lauderdale, K. J., Boles, B. R., Cheung, A. L. & Horswill, A. R. (2009). Interconnections between Sigma B, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect Immun*, 77 (4): 1623-35. doi: 10.1128/iai.01036-08.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* (62). doi: 10.3791/3923.

- Liew, A. T. F., Theis, T., Jensen, S. O., Garcia-Lara, J., Foster, S. J., Firth, N., Lewis, P. J. & Harry, E. J. (2011). A simple plasmid-based system that allows rapid generation of tightly controlled gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)*, 157 (Pt 3): 666-676. doi: 10.1099/mic.0.045146-0.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339 (8): 520-32. doi: 10.1056/nejm199808203390806.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S. & Du, S. (2012). Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69 (10): 778-90. doi: 10.1002/cm.21054.
- Middleton, J. R. (2008). *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 7 (6): 805-15. doi: 10.1586/14760584.7.6.805.
- Monk, I. R., Shah, I. M., Xu, M., Tan, M.-W., Foster, T. J. & Novick, R. P. (2012). Transforming the Untransformable: Application of Direct Transformation To Manipulate Genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio*, 3 (2): e00277-11. doi: doi:10.1128/mBio.00277-11.
- Monk, I. R., Tree, J. J., Howden, B. P., Stinear, T. P. & Foster, T. J. (2015). Complete Bypass of Restriction Systems for Major *Staphylococcus aureus* Lineages. *mBio*, 6 (3): e00308-15. doi: 10.1128/mBio.00308-15.
- Monteiro, J. M., Pereira, A. R., Reichmann, N. T., Saraiva, B. M., Fernandes, P. B., Veiga, H., Tavares, A. C., Santos, M., Ferreira, M. T., Macário, V., et al. (2018). Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis. *Nature*, 554 (7693): 528-532. doi: 10.1038/nature25506.
- Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R. & Bayles, K. W. (2014). Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*, 5 (5): e01341-14. doi: 10.1128/mBio.01341-14.
- Moormeier, D. E. & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*, 104 (3): 365-376. doi: 10.1111/mmi.13634.
- Mott, M. L. & Berger, J. M. (2007). DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 5 (5): 343-54. doi: 10.1038/nrmicro1640.
- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*, 262 (4): 56-61, 64-5. doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.
- Myrbråten, I. S. (2021). *Functional insights into novel factors affecting cell division in Gram-positive bacteria*. Doktorgradsavhandling Norwegian University of Life Sciences
- Myrbråten, I. S., Stamsås, G. A., Chan, H., Morales Angeles, D., Knutsen, T. M., Salehian, Z., Shapaval, V., Straume, D. & Kjos, M. (2022). SmdA is a Novel Cell Morphology Determinant in *Staphylococcus aureus*. *mBio*: e0340421. doi: 10.1128/mbio.03404-21.
- Mårli, M. T. (2020). *Using CRISPR interference to study novel biofilm-associated genes in Staphylococcus aureus* Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science. Master's Thesis Brage NMBU: Norwegian University of Life Sciences
- Neckers, L. & Tatu, U. (2008). Molecular chaperones in pathogen virulence: emerging new targets for therapy. *Cell Host Microbe*, 4 (6): 519-27. doi: 10.1016/j.chom.2008.10.011.
- New England BioLabs. (2022). *Phusion (R) High-Fidelity DNA Polymerase* Tilgjengelig fra: <https://international.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information%20Related%20Products> (lest 11.03.2022).
- Nguyen, H. T. T., Nguyen, T. H. & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J*, 18: 3324-3334. doi: 10.1016/j.csbj.2020.10.027.
- Ni, D., Xu, P. & Gallagher, S. (2017). Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc Protein Sci*, 88: 10.10.1-10.10.37. doi: 10.1002/cpps.32.

- Novick, R. (1967). Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology*, 33 (1): 155-66. doi: 10.1016/0042-6822(67)90105-5.
- O'Gara, J. P. (2007). ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270 (2): 179-88. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x.
- Ogston, A. (1881). Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br Med J*, 1 (1054): 369.b2-375. doi: 10.1136/bmj.1.1054.369.
- Ogston, A. (1882). Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol*, 16 (Pt 4): 526-67.
- Oliveira, D., Borges, A. & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel)*, 10 (6). doi: 10.3390/toxins10060252.
- Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34 (5): 877-86. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z.
- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y. M., Suginaka, H. & Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1): 285-9. doi: 10.1073/pnas.92.1.285.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S. & Hecker, M. (2006). The σ B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *International Journal of Medical Microbiology*, 296 (4): 237-258. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.11.011.
- Pespeni, M., Hodnett, M. & Pittet, J. F. (2005). In vivo stress preconditioning. *Methods*, 35 (2): 158-64. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.08.006.
- Pinho, M. G., Kjos, M. & Veening, J.-W. (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (9): 601-614. doi: 10.1038/nrmicro3088.
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152 (5): 1173-83. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- Rajagopal, M. & Walker, S. (2017). Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 404: 1-44. doi: 10.1007/82_2015_5021.
- Reichmann, N. T., Tavares, A. C., Saraiva, B. M., Jousselin, A., Reed, P., Pereira, A. R., Monteiro, J. M., Sobral, R. G., VanNieuwenhze, M. S., Fernandes, F., et al. (2019). SEDS–bPBP pairs direct lateral and septal peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nature Microbiology*, 4 (8): 1368-1377. doi: 10.1038/s41564-019-0437-2.
- Roncarati, D. & Scarlato, V. (2017). Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output. *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (4): 549-574. doi: 10.1093/femsre/fux015.
- Saraiva, B. M., Sorg, M., Pereira, A. R., Ferreira, M. J., Caulat, L. C., Reichmann, N. T. & Pinho, M. G. (2020). Reassessment of the distinctive geometry of *Staphylococcus aureus* cell division. *Nat Commun*, 11 (1): 4097. doi: 10.1038/s41467-020-17940-9.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32 (2): 234-58. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7: 539. doi: 10.1038/msb.2011.75.

- Sjøberg, N. O. (2017). *Molekylær genetikk. Genteknologi - humant DNA*. 5. utgave utg. Drammen: Forlaget Vett & Viten.
- Stahlhut, S. G., Alqarzaee, A. A., Jensen, C., Fisker, N. S., Pereira, A. R., Pinho, M. G., Thomas, V. C. & Frees, D. (2017). The ClpXP protease is dispensable for degradation of unfolded proteins in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 7 (1): 11739. doi: 10.1038/s41598-017-12122-y.
- Stamsås, G. A., Myrbråten, I. S., Straume, D., Salehian, Z., Veening, J. W., Håvarstein, L. S. & Kjos, M. (2018). CozEa and CozEb play overlapping and essential roles in controlling cell division in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 109 (5): 615-632. doi: 10.1111/mmi.13999.
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S. & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Sci Rep*, 6: 38828. doi: 10.1038/srep38828.
- Tabor, S. (2001). Phosphatases and kinases. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 3: Unit3.10. doi: 10.1002/0471142727.mb0310s00.
- Tsien, R. Y. (1998). THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annual Review of Biochemistry*, 67 (1): 509-544. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- Vestergaard, M., Frees, D. & Ingmer, H. (2019). Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiol Spectr*, 7 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0057-2018.
- Weih, F., Wacnik, K., Turner, R. D., Culley, S., Henriques, R. & Foster, S. J. (2018). Heterogeneous localisation of membrane proteins in *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 8 (1): 3657. doi: 10.1038/s41598-018-21750-x.
- WHO. (2021). *Antimicrobial resistance* World Health Organization. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (lest 02.05.2022).
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2017). *Prescott's Microbiology*. Tenth edition utg.: McGraw-Hill Education.
- Xia, G., Kohler, T. & Peschel, A. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 300 (2-3): 148-54. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.10.001.
- Yu, W., Herbert, S., Graumann, P. L. & Götz, F. (2010). Contribution of SMC (structural maintenance of chromosomes) and SpoIIIE to chromosome segregation in *Staphylococci*. *J Bacteriol*, 192 (15): 4067-73. doi: 10.1128/jb.00010-10.
- Zhang, F., Wen, Y. & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 23 (R1): R40-6. doi: 10.1093/hmg/ddu125.
- Zhou, X., Halladin, D. K., Rojas, E. R., Koslover, E. F., Lee, T. K., Huang, K. C. & Theriot, J. A. (2015). Bacterial division. Mechanical crack propagation drives millisecond daughter cell separation in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 348 (6234): 574-8. doi: 10.1126/science.aaa1511.

Appendiks

A1 Tabell med oversikt over mutantstammer benyttet i arbeidet

Tabell A1.1 Oversikt over mutantstammer samt genotype og karakteristikk benyttet i arbeidet.

Stammenavn	Genotype og karakteristikk ^a	Referanse
<i>S. aureus</i> NCTC8325-4		
TMK14	NCTC8325-4 villtype	Stammesamling
TMK13	TMK14 + pLOW-dCas9_extra_lacO, ery ^R	Stammesamling
TMK2	TMK13 + pVL2336-sgRNA(no target), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK12	TMK13 + pCG248-sgRNA(<i>smdA</i>), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK3	pLOW- <i>smdA</i> , ery ^R	Stammesamling
TMK4	pLOW- <i>smdA</i> Δ <i>TMH</i> , ery ^R	Stammesamling
TMK9	pLOW- <i>smdA</i> Δ <i>TMH</i> Mut1(H145A), ery ^R	Stammesamling
TMK10	pLOW- <i>smdA</i> Δ <i>TMH</i> Mut2 (T151A, R150A), ery ^R	Stammesamling
TMK11	pLOW- <i>smdA</i> Δ <i>TMH</i> Mut3 (F280A, H281A), ery ^R	Stammesamling
TMK49	TMK13 + pVL2336-sgRNA(<i>clpP</i>), ery ^R , cam ^R	Dette arbeidet
TMK52	TMK13 + pVL2336-sgRNA(<i>icaA</i>), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
<i>S. aureus</i> SH1000		
MK1424	pLOW-dCas9, ery ^R	Dr. Morten Kjos
TMK15	X + pCG248-sgRNA(<i>smdA</i> dobbel), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK16	X + pCG248-sgRNA(<i>luc</i>), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK17	pLOW- <i>smdA</i> -m(sf)gfp, ery ^R	Stammesamling
TMK18	pLOW-m(sf)gfp- <i>smdA</i> , ery ^R	Stammesamling
TMK21	pLOW-lacA-m(sf)gfp, ery ^R	Stammesamling
TMK22	pLOW-SA1721-m(sf)gfp, ery ^R	Stammesamling
TMK23	MK1424, men <i>gfp</i> fusjonert til <i>ezrA</i> + pVL2336-sgRNA(<i>smdA</i>), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK24	MK1424, men <i>gfp</i> fusjonert til <i>ezrA</i> + pVL2336-sgRNA (no target), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK51	MK1424 + pVL2336-sgRNA(<i>icaA</i>), ery ^R , cam ^R	Stammesamling
<i>S. aureus</i> JE2		
TMK42	pLOW-dCas9_aad9, spc ^R	Stammesamling
TMK43	TMK42 + pCG248(<i>smdA</i>), spc ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK48	TMK42+ pCG248-sgRNA(no target), spc ^R , cam ^R	Stammesamling
<i>S. aureus</i> COL		
IM287	pLOW-dCas9_aad9, spc ^R	Dr. Ine Myrbråten
TMK46	IM287 + pCG248-sgRNA(<i>smdA</i>), spc ^R , cam ^R	Stammesamling
TMK47	IM287 + pCG248-sgRNA(no target), spc ^R , cam ^R	Stammesamling

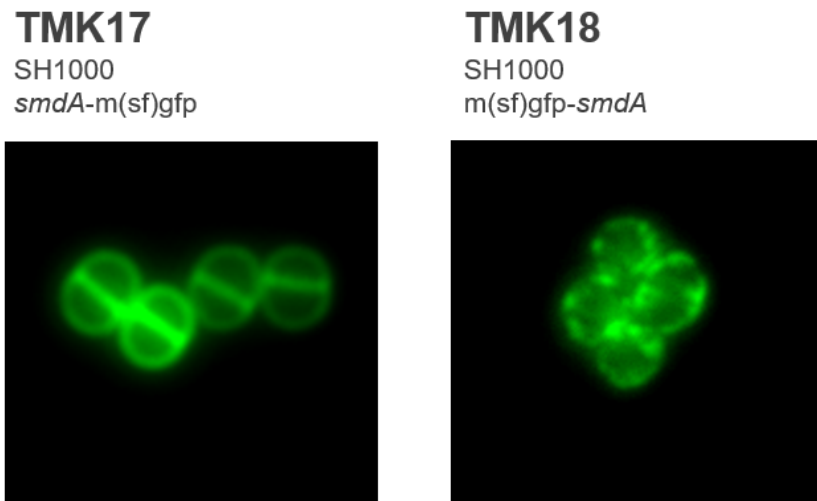
^a ery^r = erytromycin resistens, cam^r = kloramfenikol resistens, spc^r = spektinomycin resistens

A2 Tabell med kjemikalier benyttet i arbeidet

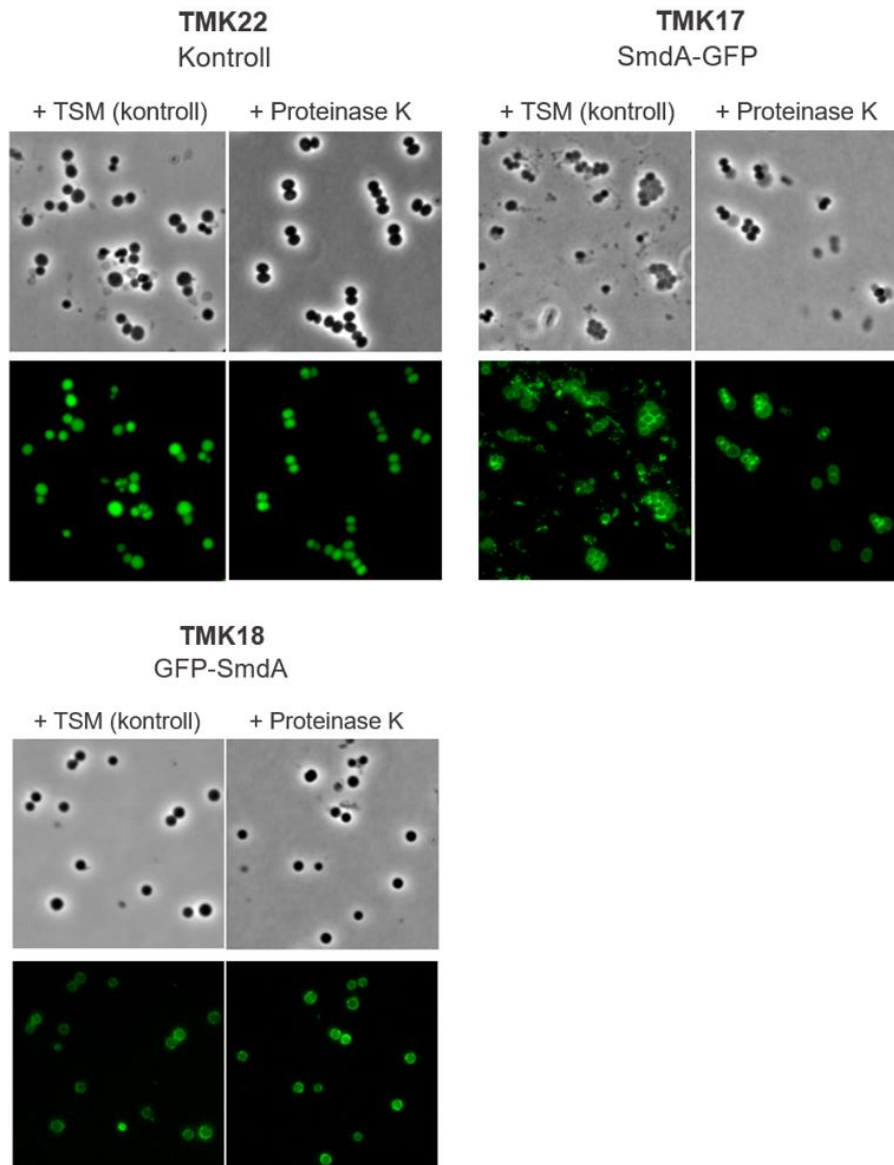
Tabell A2.1 Oversikt over kjemikalier samt produktnummer og leverandør benyttet i arbeidet.

Kjemikalie	Formel	Produkt nummer	Leverandør
7-hydroxyxoumarincarbonylamino-D-alanine (HADA)	$C_{13}H_{13}CIN_2O_6$	HY-131045	MedChemExpress
Agarose (gelelektroforese)	-	15510-027	Invitrogen
Akrylamid 4x (40%) (2-propenamid)	C_3H_5NO	A0962.1000	VWR
Ammonium persulfat (APS) 10%	$(NH_4)_2S_2O_8$	1610700	Bio-Rad
Bacto™ Agar (1,5%)	-	20768.292	VWR
Bacto™ Brain Heart Infusion	-	CM1135	Oxoid
Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB)	-	211825	Becton, Dickinson and Company
Bacto™ Yeast Extract	-	212750	Becton, Dickinson and Company
Bromfenolblå	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	115-39-9	Sigma-Aldrich
Certified Molecular Biology Agarose (mikroskopi)	1613100	-	Bio-Rad
CHAPS	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	1001050085	Sigma-Aldrich
Coomassie brilliant blue	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	20278	Thermo Scientific
Crystal Violet	-	C0775	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenfosfat	Na_2HPO_4	106586	Merck
di-Natriumhydrogenfosfat -dihydrat	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	106580	Merck
DL-Dithiothreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$	D0632-10G	Sigma-Aldrich
Etanol (96%)	C_2H_5OH	-	
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	108418	Merck
GFP antibody rabbit	-	PABG1	ChromoTek GmbH
Glutaraldehyd (GA) 1,25 %	$OHC(CH_2)_3CHO$	G5882	Sigma-Aldrich
Glyserol (50%)	$C_3H_8O_3$	49781-1L	Sigma-Aldrich
Hydrogenklorid (HCl)	HCl	100317	Merck
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	$C_9H_{18}O_5S$	A1008.0005	PanReac AppliChem
peqGREEN	-	PEQL37-501	Saveen Werner
Kaliumdihydrogenfosfat	KH_2PO_4	1.04873.1000	Merck
Kaliumklorid	KCl	1.04936.1000	Merck
Kalsiumklorid (0,2 M)	$CaCl_2$	102378	Merck
Magnesiumklorid	$MgCl_2$	B0510A	New England BioLabs®
Maleinsyre	$C_4H_4O_4$	-	Sigma-Aldrich
Natriumhydroksid	NaOH	1.06498.1000	Merck
Natriumklorid	NaCl	27810.295	VWR
N,N,N',N'-terametylenediamine (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	1610800	Bio-Rad
Paraformaldehyd (PFA) 2 %	$(CH_2O)_n$	-	Sigma-Aldrich
Skim milk powder	-	1.15363.0500	Merck Millipore
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	05030	Merck
Supersignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	-	34580	Thermo Scientific
Tiourea	CH_4N_2S	RPN6301	Sigma-Aldrich
Trypton	-	LP0042	OXOID
Triton® X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ (n=9-10)	118K0095	Sigma-Aldrich
Tween® 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	1706531	Bio-Rad
Urea, 98+%	CH_4N_2O	U5378	Sigma Life Science

A3 Proteinase K beskyttelsesanalyse for verifisering av membrantopologi



Figur A3.1 Mikroskopering av GFP-fusjonert SmdA i N- og C-terminal i *S.aureus* SH1000. Bildene presenterer mikroskopering av GFP-fusjonert SmdA uttrykt fra pLOW i C-terminal (TMK17) og i N-terminal (TMK18).



Figur A3.2 Mikroskopering av Proteinase K beskyttelsesanalyse i *S. aureus* SH1000. Fasekontrast- og fluorescensbilder av *S. aureus* SH1000 SA1721-GFP (TMK22), SmdA-GFP (TMK17) og GFP-SmdA (TMK18). Stammene er behandlet med TSM som kontroll og Proteinase K (10 000 µg/mL).

A4 Multippel sekvenssammenstilling av SmdA homologer

<i>Nococomiicoccus</i>	-----MSTEI	LTEPLFIIVAALLLTVIISFL	26
<i>Aliicoccus</i>	-----MNTDI	FLDPIFIIVAALLLIVLTWFL	26
<i>Salinicoccus</i>	-----MNTEI	FTNPVIAIALAVLLIVAVSFL	26
<i>Jeotgalicoccus</i>	-----MNTEI	FTNPIFIATAVLLIIVWIFL	26
<i>Auricoccus</i>	-----MNINMDFD	MIHWIMFGLALLLLILLIFFI	30
<i>Abyssicoccus</i>	-----MNINMDFD	MIHWIMFGLALLLLILLVFFI	30
<i>Macroccoccus epidermidis</i>	-----MSVEVGS	TLFYVLIGLGLVALLFFVLWL	28
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	MQFYFLINLSKTMKLDMFFFIMKLLNIRKVRAMSLSNLQ	PMHYIVLGLAAALLLFIVLFI	60
<i>Staphylococcus sciuri</i>	-----MSQLE	PIHYGLIAAIVIAILFIILFF	26
<i>Staphylococcus intermedius</i>	-----MTQFG	PMEIGLIAAIVVAALFFILFL	26
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	-----MSQLD	PIQIGLIAVSVLALLFVLVFL	26
<i>Staphylococcus hyicus</i>	-----MGPLE	IGLVAAIVIAVIFLILFL	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	-----MDLSS	PIVIGLIIAVVIALTFVFLFL	26
<i>Staphylococcus simiae</i>	-----MDFSS	PIVIGLIAAVVIALTFVLYL	26
<i>Staphylococcus warneri</i>	-----MSLSS	PIGIGLIVAVVIAITFFVFLFL	26
<i>Staphylococcus capitis</i>	-----MSLSS	PIVIGLIVAITVAILFFILFL	26
<i>Mycobacteroides abscessus</i>	-----MDFSS	PTVIGLIVAIIPVAVLFFVFLFL	26
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-----MDFSS	PTVIGLIVAILVAVLFFILFL	26
<i>Staphylococcus arlettae</i>	-----MNSFG	PIEIGLIVAVIVAVICLILFL	26
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-----MNSFG	PIEIGLIVAVIVAVICLILFI	26
<i>Staphylococcus carnosus</i>	-----MNSFG	PIEIGLIAAIVVAVIICLILFL	26
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	-----MNSLG	PMEIGLIVAVVIALICLILFF	26
	..	:	::
<i>Nococomiicoccus</i>	IYY	VKHRNEVEENERLYKKEETLIESYVKNQEDERMAHKKEVSHLNEKYLEDTLLLNK	86
<i>Aliicoccus</i>	VYY	FRSRNRVNKLT EEFDFHEKQTLIEDYEATQEEDRLSHKKEVSGLNEKYNKDTQLNKR	86
<i>Salinicoccus</i>	VYF	LKNRNRINTLTDEYSKEKEGLIEKYESNQEERLNHKKKEVSTLNEKYHTDTLLLNK	86
<i>Jeotgalicoccus</i>	VYY	FKHRNQKVVENNHAKEKESLVQKYESEHEAERLEHKKELSNLNEKYNDTLLDNK	86
<i>Auricoccus</i>	VKM	IKANKQYKELQQARDREKLLTSDYEKRIETERVDGKKKFSEQQSKYDAIVDDQSSQ	90
<i>Abyssicoccus</i>	VKM	IKANKQYKELQQARDREKLLTSDYEKRIETERVDGKKKFSEQQSKYDAIVDDQSSQ	90
<i>Macroccoccus epidermidis</i>	LAL	SSKKKSIARKEEEFRKAQKIRSDEYHDESEKSRLOQYKKELAEQKELQKTIDEKSSH	88
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	YAL	SSKRKAIRAKEEALNKERSEMKSNEYEESSEKSRITFKKELAEQKDTYEAQLSTQNAQ	120
<i>Staphylococcus sciuri</i>	VSL	KQKQKSLNKIQEAHKKENETLKSEHKELDHERVENKVVLTQKEETHQEAISQKERE	86
<i>Staphylococcus intermedius</i>	VAL	KSKKKAKQTYATQYQTKQDKLTHEHQEELKVRIDKKAETRHKEEYETMVSSKNRE	86
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	FAL	RSKKKAKETYANQYQSRETKLNNEHKEALEKARIEKKKSDTRHKEEYDTMVSSKNRE	86
<i>Staphylococcus hyicus</i>	TAL	NSKKKAQQQAEQYEAKEKSLKDNYEDELKERVEHKKVTVKQRADFATVDSKDRE	83
<i>Staphylococcus aureus</i>	VAL	GSKKKVKRQTEEKYEQQEQNIKKSHHEALEKERIQNKKTITKQQEDYNHMVSTKDRE	86
<i>Staphylococcus simiae</i>	VAL	GSKKKVKRQTEEKYEQQEQNIKKTHEEQLEKERIENKKTITKQQEDYNEMVSTKDRE	86
<i>Staphylococcus warneri</i>	IAL	NSKKKIKQQTEEEYQKQESIKASHEEAL EKERIENKKTITVKQKEDYEATVNSKERE	86
<i>Staphylococcus capitis</i>	VAN	HSKKKIKNQTEAQYKEKEQHMKKSHHEALEKERVENKKAIVTKQKEDFATVSSKDRE	86
<i>Mycobacteroides abscessus</i>	VAN	HSKKKVKNQTEAHYKEKEQHLKESHEEAL EKERVENKVVTKQQEDFVTVSNKNRE	86
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	VAN	HSKKKVKNQTEAHYKEKEQHLKESHEEAL EKERVENKVVTKQKEDFVTVSNKNRE	86
<i>Staphylococcus arlettae</i>	VTL	KSKKKAQQKAE EHYQKKEQLQDSYAEEL EKERIENKKTITVKQKEDYDHTVSNKNRE	86
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	VAL	KSKKKAQEKVEAQYKSREQQLSDEHEEEL EKERIENKKTITVKQKEEYTAAVNSKDRE	86
<i>Staphylococcus carnosus</i>	VTL	KSKNNIKQNTKEEYSLKEQMLKESHEEAL EKERIENKKTITVKQKEDFATISGKNRE	86
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	VAL	RNNKIKRQTVDEYKLEKQMQESHDEALEKERIENKKTITVKQKENYEATVNSKERE	86
	..	:	::

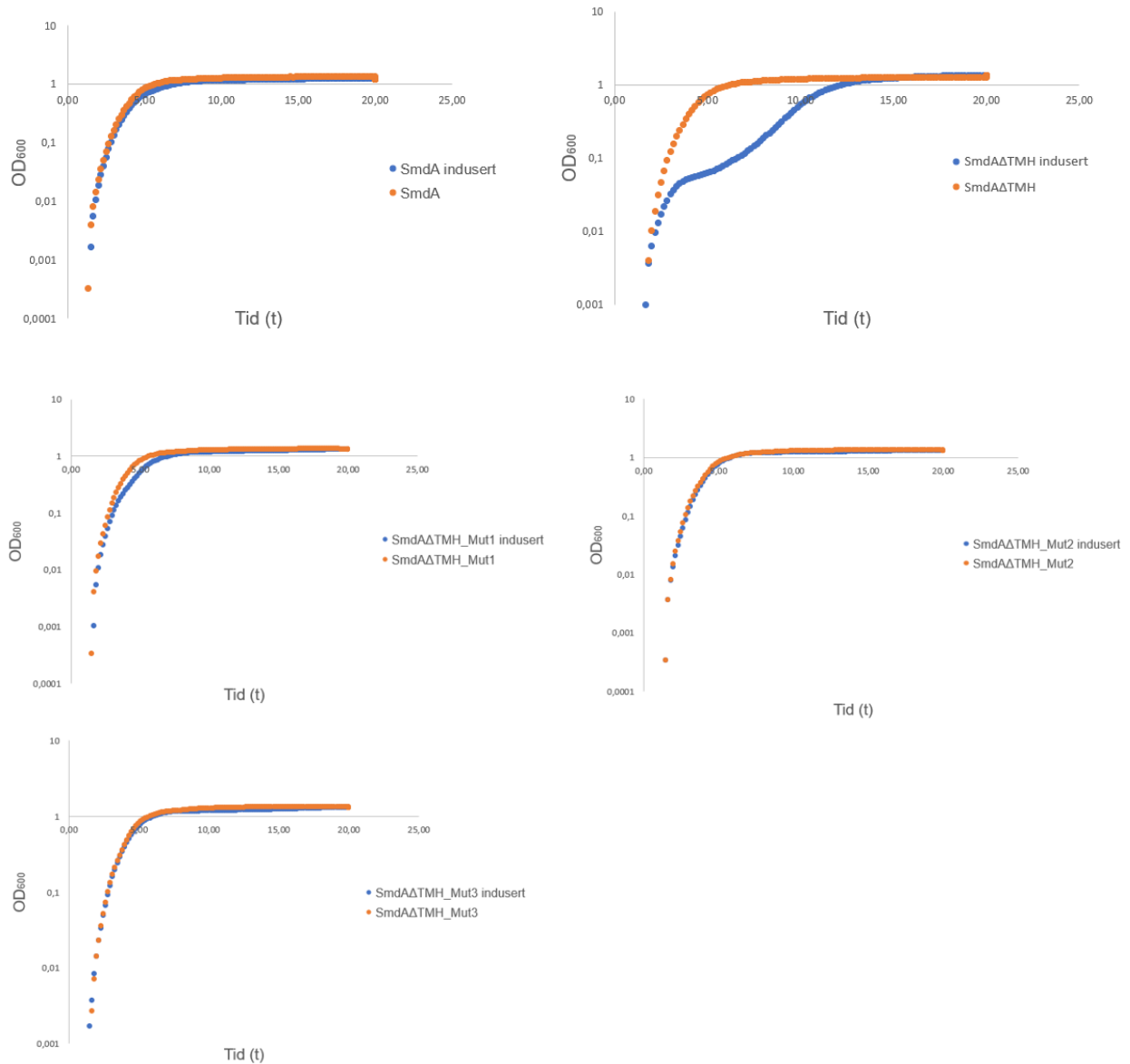
Appendiks

<i>Nococomiicoccus</i>	EKVAVNYNNTIEDTEMTAEKLRNVLKLQFDVVP I IYFNP KDNGGHTIMNYATNSNAKVI	264
<i>Aliicoccus</i>	LNVTVSHFNHMEIEAKLTAEKLRNVLKLQFDVVPVFFNPEDNGNYSIANYSNDPSVKVL	264
<i>Salinicoccus</i>	KNVSVNHYNDDTIDETKTAEKLRNVLKLQYDVP I IYFNP KDNGNYSITNYSADPSVKVL	264
<i>Jeotgalicoccus</i>	KNVSVNHYNGVIDETKITAELKNLKLQYDVP I IYFNP KDNGNYSITNYSDEPSIRVI	264
<i>Auricoccus</i>	GEVVMHPLDHQIQDLKVTAEKIRNLIKQYVPVKTIMFYNEQETKRNVSINYSTDKDVIIVL	268
<i>Abyssicoccus</i>	GEVVMHPLDHQIQDLKVTAEKIRNLIKQYVPVKTIMFYNEQETKRNVSINYSTDKDVIIVL	268
<i>Macroccoccus epidermidis</i>	GNAEFRTYNHSIEALKLKAERLEKVFELPYPVTP IAYYNAEGVSGEHTNYSRDNGVKVI	266
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	GSAQFKSYKHSIEELKLKAERLEKVFELPYPVTP IAYYNAEGVSGEHTNYSRDNSVKVI	298
<i>Staphylococcus sciuri</i>	KTAAFHSYTDDEVKEVDNTEELQRQLELKYTPTP I IYFHPNVESEATISNYSQDPNIVL	265
<i>Staphylococcus intermedius</i>	NTLSVVDYTDRLAHVEALAVKLQKELDLKYTPTP ILYFNPRHEGDVTISNYASHGVTKVL	266
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	QKLTVIDYTKHLDSEVEKLATTLQKLNLYAPTP ILYFNPRHEGDITISNYAPQSGTKVL	265
<i>Staphylococcus hyicus</i>	QSATFVNYSKQLHYVEQLADALQRQLNLYTPMALLYFNPKNEGAVTISNYAQNTNTKVL	262
<i>Staphylococcus aureus</i>	RSLSFVNYSQIEAIEKQLAEDLQKELGAKYTPTS ILYFNLNKNEGVDVTISNYSQNSAVKVL	265
<i>Staphylococcus simiae</i>	KSLSFVNYSQIEAIEKQLAEDLQKELGAKYTPTS ILYFNPKNDGDVTISNYSQNSAAVKVL	265
<i>Staphylococcus warneri</i>	KSLSFVNYSQIEAIEKQLAEDLQKELGAKYTPTS ILYFNPKNEGVDVTISNYAQNSNVKVL	265
<i>Staphylococcus capitis</i>	QSLSFVNYSQIEAIEKQLAEDLQKELGAKYTPTS ILYFNPKNDGDVTISNYSQNSAVKVL	265
<i>Mycobacteroides abscessus</i>	HLSLFVNYSQIEAIEKLAGDLQNELNLYTPMALLYFNPKNDGDVTISNYAQNSAVKVL	265
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	HLSLFVNYSQIEAIEKLAGDLQNELNLYTPMALLYFNPKNDGDVTISNYAQNSAVKVL	265
<i>Staphylococcus arlettae</i>	QSLSVNYSNHLAEVEKLAGDLQNELNLYTPMALLYFNPKNDGDVTISNYAQNSAVKVL	265
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	DALS FVNYSQIEAIEKLAGDLQNELNLYTPMALLYFNPKNDGDVTISNYAQNSAVKVL	265
<i>Staphylococcus carnosus</i>	SSLSFVNYSQIEAIEKLAGDLQNELNLYTPMALLYFNPKNDGDVTISNYAQNSAVKVL	265
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	SSLSFLDYSAQLAEIKLAGDLQNELNLYTPMALLYFNPKNDGDVTISNYAQNSAVKVL	265

<i>Nococomiicoccus</i>	VGTEQLEDYFNKHVFQGRFQYTVKDLDEIAESLMRLNP	302
<i>Aliicoccus</i>	IGNEELDEYFKKYVFHGRFQYTVKDLTDIVDQLKALNP	302
<i>Salinicoccus</i>	VGEEELAEFFLKYVFHGRFQYTVKDLDEIAEEIFNLNP	302
<i>Jeotgalicoccus</i>	VGQEDLEAFFLKYVFHGRFQYTVKDLDEIADAILQSL	302
<i>Auricoccus</i>	MGKPELEEFYFKHVFHGRFQYTVKDLDEIADAILQSL	306
<i>Abyssicoccus</i>	MGKPELEEFYFKHVFHGRFQYTVKDLDEIADAILQSL	306
<i>Macroccoccus epidermidis</i>	VGEEELQTFEKFVFHGRFQYKVEALENIMDQIEHLNP	304
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	VGEKELEHFFEFKVFHGRFQYKVEALEEVRAAIEHLNP	336
<i>Staphylococcus sciuri</i>	VGEKQLQHFFNKVFHGRFQYVSDLERIMDEIEKFN	303
<i>Staphylococcus intermedius</i>	VGPEQLNEFFNRFVFHGRIQYDVNQLQIMDEIESFN-	303
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	VGPAQLDEFFNKVFHGRIQYDVNDLQAIMDEIEAFN-	302
<i>Staphylococcus hyicus</i>	VGAEQLDEYFNKVFHGRIQYNVEDLARIMEEIESFN-	299
<i>Staphylococcus aureus</i>	VGAEQLDEFFNKVFHGRIQYNVEDLQMMMDKIESFN-	302
<i>Staphylococcus simiae</i>	VGKEQLDEFFNKVFHGRIQYNVDDLQIMDKIESFN-	302
<i>Staphylococcus warneri</i>	VGPEQLDEFFNKVFHGRIQYNVDDLQQIMEQIESFN-	302
<i>Staphylococcus capitis</i>	VGPEQLDEFFNKVFHGRIQYNVDELQTIMDKIESFN-	302
<i>Mycobacteroides abscessus</i>	VGPEQLEEFNKVFHGRIQYNVDDLQDQIMDKIESFN-	302
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	VGPEQLDEFFNKVFHGRIQYNVDDLQDQIMDKIESFN-	302
<i>Staphylococcus arlettae</i>	VGPEQLDEYFNKVFHGRIQYNVEDLQQVMDKIESFN-	302
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	VGPEQLDEFFNKVFHGRIQYNVEDLQQRVMDEIESFN-	302
<i>Staphylococcus carnosus</i>	VGPEQLDEFFNKVFHGRIQFNVEELQSIMDKIETFN-	302
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	VGPEQLNEFFNKVFHGRIQYNVDDLQEIIMTKIESFN-	302

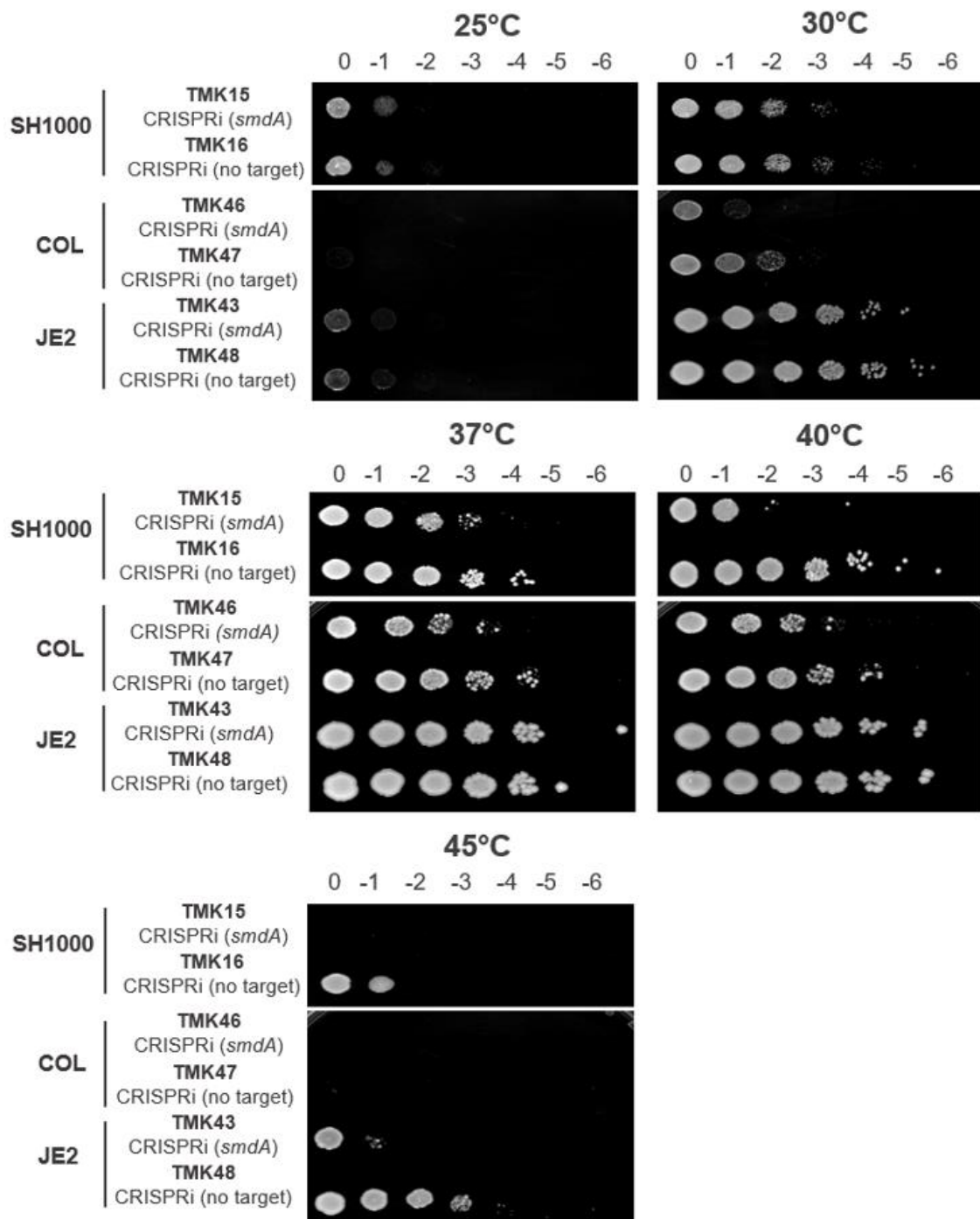
Figur A4.1 Multipl sekvenssammenstilling av homologe proteinsekvenser av SmdA mellom ulike slekter i *Staphylococcaceae* familien. Sekvenssammenstillingen av homologe proteinsekvenser med høy grad av identitet til SmdA i NCTC8325-4 *S. aureus* fra BLAST® (Database resources of the National Center for Biotechnology Information, 2016). Multipl sekvenssammenstilling av proteinsekvensene er gjennomført i Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Det predikerte N-terminale transmembrane domenet av SmdA er markert i gult og NERD-domenet er markert i grønt. Muterte konserverte residuer i arbeidet er markert med rød firkant.

A5 Vekstkurver for SmdA^{opp}, SmdAΔTMH^{opp}, SmdAΔTMH_Mut1^{opp}, SmdAΔTMH_Mut2^{opp} og SmdAΔTMH_Mut3^{opp}



Figur A5.1 Vekstkurver med målt OD₆₀₀ for overuttrykk av SmdA. Vekstkurver av SmdA^{opp}, SmdAΔTMH^{opp}, SmdAΔTMH_Mut1^{opp}, SmdAΔTMH_Mut2^{opp} og SmdAΔTMH_Mut3^{opp} gjennomført ved 37° over 20 timer.

A6 Vekstanalyse ved SmdA^{ned} i *S. aureus* SH1000, COL og JE2



Figur A6.1 Vekstanalyse ved spotting i *S. aureus* SH1000, COL og JE2. Vekstanalysen er gjennomført ved punktvis avsetning av 10-ganger fortynningsserier på agarskåler inkubert ved 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C og 45 °C i ~ 17 timer.

A7 Resultater fra RNA-sekvensering med SmdA^{ned}.

OPP

Navn	Ratio ^a	Lokus tag
hypothetical protein CDS	16,55	SAOUHSC_01388
hypothetical protein CDS	10,17	SAOUHSC_02939
<i>spa</i>	7,21	SAOUHSC_00069
<i>clpB</i>	6,67	SAOUHSC_00912
<i>epiA</i>	6,02	SAOUHSC_01953
<i>hrcA</i>	5	SAOUHSC_01685
<i>cwrA</i>	5	SAOUHSC_02872
<i>grpE</i>	4,61	SAOUHSC_01684
<i>mcsB</i>	4,56	SAOUHSC_00504
<i>ctsR</i>	4,4	SAOUHSC_00502
<i>mcsA</i>	4,23	SAOUHSC_00503
<i>dnaK</i> CDS	4,18	SAOUHSC_01683
hypothetical protein CDS	4,14	SAOUHSC_02251
<i>vraX</i>	3,98	SAOUHSC_00561
<i>groES</i> CDS	3,92	SAOUHSC_02255
<i>carB</i> CDS	3,82	SAOUHSC_01170
<i>pyrF</i>	3,82	SAOUHSC_01171
hypothetical protein CDS	3,79	SAOUHSC_00378
<i>lacA</i>	3,79	SAOUHSC_02455
<i>carA</i>	3,77	SAOUHSC_01169
<i>clpC</i>	3,75	SAOUHSC_00505
<i>groEL</i> CDS	3,66	SAOUHSC_02254
<i>pyrC</i> CDS	3,51	SAOUHSC_01168
<i>pstS</i>	3,5	SAOUHSC_01389
<i>sbnB</i>	3,49	SAOUHSC_00076
<i>pyrE</i> CDS	3,47	SAOUHSC_01172
<i>dnaI</i>	3,27	SAOUHSC_01682
<i>sstB</i>	3,26	SAOUHSC_00747
<i>pyrB</i> CDS	3,21	SAOUHSC_01166

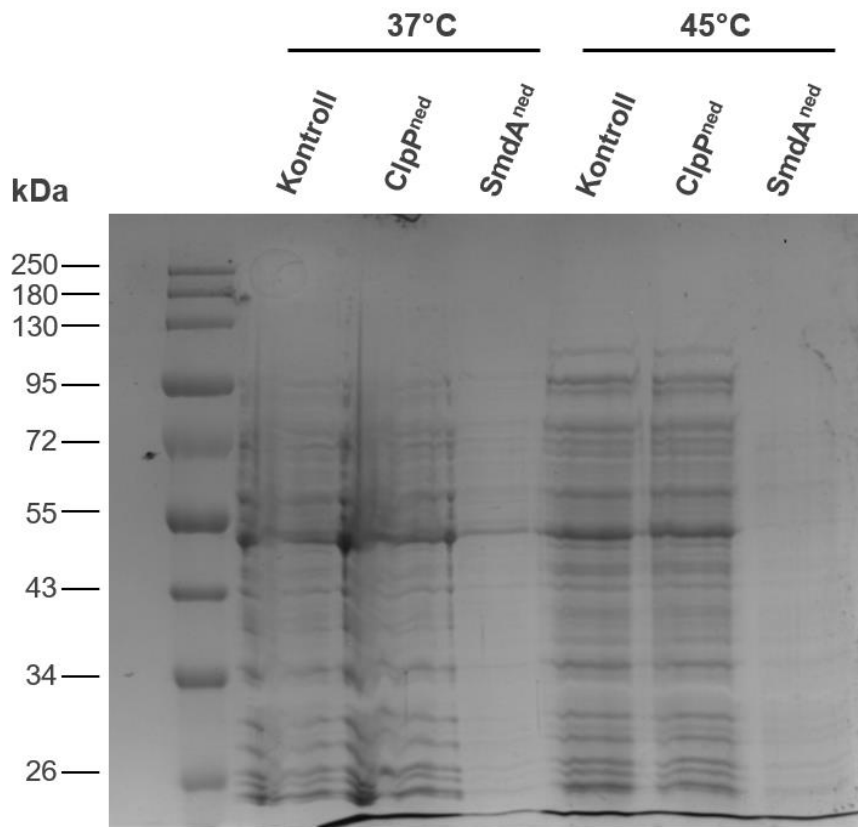
NED

Navn	Ratio ^a	Lokus tag
<i>smdA</i>	-85,64	SAOUHSC_01908
hypothetical protein CDS	-15,84	SAOUHSC_00111
ABC transporter ATP-binding protein CDS	-9,3	SAOUHSC_01311
<i>icaA</i>	-4,96	SAOUHSC_03002
<i>icaD</i>	-4,68	SAOUHSC_03003
hypothetical protein CDS	-4,43	SAOUHSC_01109
hypothetical protein CDS	-3,96	SAOUHSC_00745
<i>icaB</i>	-3,75	SAOUHSC_03004
<i>gatB</i>	-2,94	SAOUHSC_00215
hypothetical protein CDS	-2,9	SAOUHSC_00212
Staphylococcal secretory antigen SsaA	-2,8	SAOUHSC_02883
<i>pflA</i>	-2,75	SAOUHSC_00188
hypothetical protein CDS	-2,72	SAOUHSC_02701
Truncated transposase, putative	-2,7	SAOUHSC_01805
hypothetical protein CDS	-2,69	SAOUHSC_00029
hypothetical protein CDS	-2,65	SAOUHSC_00134
<i>cspA</i>	-2,6	SAOUHSC_03045
<i>phnD</i>	-2,58	SAOUHSC_00105
leukotoxin LukE CDS	-2,58	SAOUHSC_01955
<i>capA</i>	-2,54	SAOUHSC_00114
<i>capI</i>	-2,43	SAOUHSC_00122
50S ribosomal protein L7 serine acetyltransferase CDS	-2,43	SAOUHSC_00324
hypothetical protein CDS	-2,41	SAOUHSC_02774
hypothetical protein CDS	-2,37	SAOUHSC_01293
<i>proP</i>	-2,36	SAOUHSC_00556
<i>cspC</i>	-2,3	SAOUHSC_00819
<i>sarZ</i>	-2,26	SAOUHSC_02669
hypothetical protein CDS	-2,24	SAOUHSC_01937
<i>capG</i>	-2,22	SAOUHSC_00120

^a Differanseuttrykksratio, log₂ verdier.

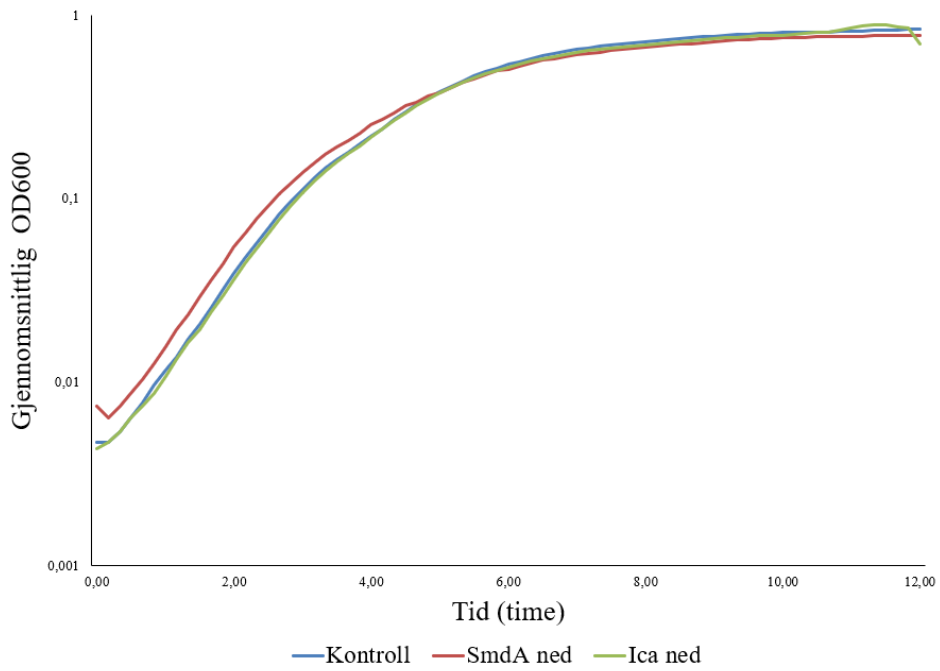
Figur A7.1 Resultater fra RNA-sekvensering som viser gener oppregulert og nedregulert ved SmdA^{ned}. Piler indikerer interessante gener studert videre i arbeidet. Fargene klassifiserer genene etter egenskaper: grønn farge indikerer chaperoner eller chaperon-aktivitet, rosa er gener involvert i celleveggstress, blå er virulensgener, grå er gener i pyrimidin polysakkarid biosyntese, rødt er gener involvert i biofilm og gult er gener involvert i kapsel polysakkarid biosyntese.

A8 Deteksjon og kvantifisering av proteinaggregater ved SmdA^{ned}

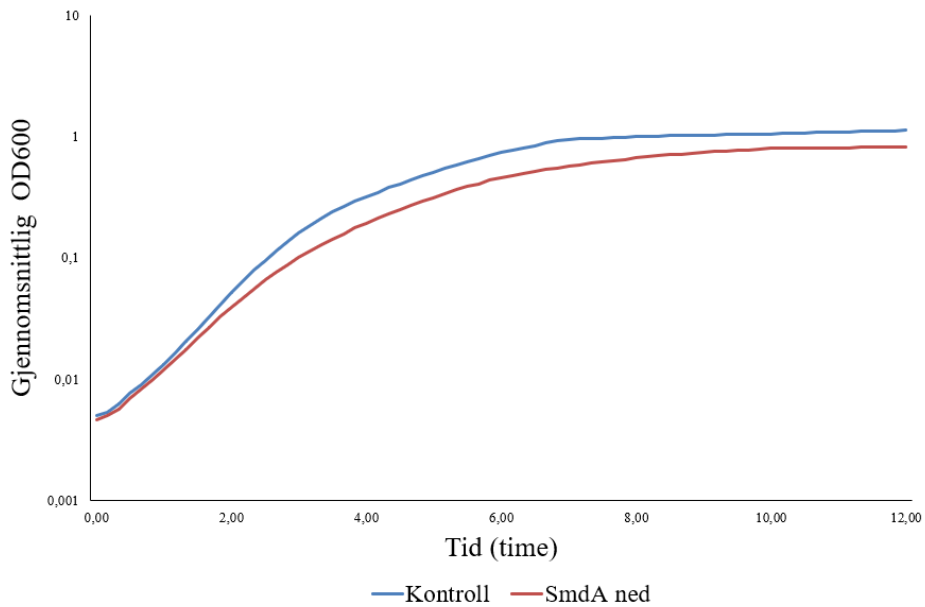


Figur A8.1 Andre repetisjon av kvantifisering av proteinaggregater ved SmdA^{ned}

A9 Vekstkurver over biofilmdannelse ved SmdA^{ned} i *S. aureus* SH1000 og JE2



Figur A9.1 Vekstkurver ved SmdA^{ned} i *S. aureus* SH1000.



Figur A9.2 Vekstkurver ved SmdA^{ned} i *S. aureus* JE2



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway