



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2022 30 stp**

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap  
Morten Kjos

# **Bruk av CRISPR interferens til å studere gener i *Staphylococcus aureus* som er viktige for interaksjon med bakterier i jurmikrobiotaen**

Using CRISPR interference to study genes in *Staphylococcus aureus* important for interaction with udder microbiome bacteria

Ingrid Petersheim

Kjemi og bioteknologi

## Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført som en del av det femårige masterstudiet i kjemi og 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.

Først og fremst vil jeg takke veilederen min, Dr. Morten Kjos, for veiledning gjennom dette arbeidet. Takk for at du alltid har tatt deg tid til å besvare mine spørsmål og tusen takk for god hjelp både på lab og spesielt under skriveprosessen. Jeg vil også takke min medveileder, Dr. Davide Porcellato, for gode tips og for stammesamlingen brukt i dette arbeidet.

Jeg vil rette en stor takk til Marita Torrissen Mårli for veiledning gjennom dette arbeidet. Tusen takk for kjempegod opplæring på laboratoriet, for grundige og gode forklaringer på resultater fra CRISPRi-sekvenseringen utført i dette arbeidet og for alle gode råd. Jeg vil også takke Dr. Anja Ruud Winther for preparering av prøver fra dette arbeidet til Illuminasekvensering.

Tusen takk til resten av laboratoriegruppen, som har bidratt med støtte og veiledning, og ikke minst for å ha skapt et supert arbeidsmiljø med mange morsomme stunder å se tilbake på. Jeg ønsker også å gi en ekstra takk til Zhian Salehian for alltid å være tilgjengelig for hjelp på laboratoriet, uansett hva det måtte være. Tusen takk, Zhian, for god opplæring i praktisk arbeid, for gode råd og ditt gode humør.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter Rebekka, Jennie, Tiril, Vilde og Anne for støtte under dette arbeidet. Takk for at dere har bidratt med deres erfaringer, både på lab og under skriveprosessen og takk for mange fine samtaler og opplevelser gjennom dette året.

Ingrid Petersheim

Ås, mai 2022

## Sammendrag

*Staphylococcus aureus* er et av de hyppigste årsakene til utvikling av bovin mastitt, som er en av de mest utfordrende sykdommene hos melkekyr på verdensbasis. Mastitt forårsaker problemer som redusert helsetilstand hos kyrene, kostnader til behandling, økt antibiotikabruk, tidligere slakting, reduksjon i melkeproduksjon, dårlig melke kvalitet, redusert produktkvalitet og matsvinn. For å redusere disse store økonomiske tapene i meieriindustrien må nye effektive metoder for forebygging og behandling av mastitt utvikles. En bedre innsikt i infeksjonsprosessen til mastittpatogener i juret kan bidra på veien til dette.

I dette arbeidet ble gener i *S. aureus* som er viktige for interaksjon med andre bakterier i jurmikrobiotaen studert ved bruk av CRISPR interferens (CRISPRi). Ved CRISPRi kan gener nedreguleres og endring av bakteriens fitness som følge av nedreguleringen kan bestemmes. For å kunne studere dette, ble det her utviklet en metode for kokultivering av et *S. aureus* CRISPRi-genomskalabibliotek med jurmikrobiotabakterier, før et kokultiveringsforsøk og CRISPRi-sekvensering (CRISPRi-seq) ble utført. CRISPRi-systemet ble vist å være funksjonelt i UHT-melk, et vekstmedium som likner miljøet i jurmikrobiotaen, som var en forutsetning for å kunne utføre kokultiveringsforsøket. I den utviklede kokultiveringsmetoden ble *S. aureus* CRISPRi-biblioteket dyrket sammen med jurmikrobiotabakterien *Streptococcus dysgalactiae* med en 1:8 inokuleringsratio av bakteriene. Genfitnessanalyse fra CRISPRi-seq viste to gener som var mer essensielle under kokultiveringen med *S. dysgalactiae* sammenliknet med *S. aureus* dyrket alene (*glnR* og *pyrG*), og to mindre essensielle gener (*htsA* og *fhuC*). *glnR* og *pyrG* assosieres med biosyntese og omdannelse av glutamin mens *htsA* og *fhuC* assosieres med jernopptak.

CRISPRi-seq av kokultiveringsforsøket viste få gener med signifikant forskjell i genfitness for *S. aureus* dyrket alene og dyrket med *S. dysgalactiae*, noe som kan skyldes lite interaksjon mellom bakteriene. Dette tyder på at metoden utviklet her kan forbedres ved å bedre legge til rette for interaksjoner i kokultiveringen i fremtiden. CRISPRi-seq er en screening metode og i fremtiden bør også disse resultatene valideres med for eksempel vekstforsøk med 'knockout' mutanter eller ved å undersøke individuelle CRISPRi-stammer med de mer og mindre essensielle genene nedregulert av sgRNA. Dette vil danne grunnlag for å videre forstå hvordan *S. aureus* påvirkes ved kokultivering med *S. dysgalactiae*.

## Summary

*Staphylococcus aureus* is a major cause of bovine mastitis, which is one of the most challenging diseases in dairy cows worldwide. Mastitis leads to issues like reduced animal health, treatment costs, increase in usage of antibiotics, early culling, reduced milk production, reduced milk quality, reduced product quality and spoilage. New and more efficient methods to prevent and treat mastitis needs to be developed to reduce these major economic losses in the dairy industry. A better insight of the infection process of mastitis pathogens in the udder can contribute to this goal.

In this work, *S. aureus* genes important for interaction with other bacteria in the udder microbiota was studied with the use of CRISPR interference (CRISPRi). Genes can be downregulated with CRISPRi, and change in fitness of the bacteria due to this downregulation can be determined. To be able to study this, a method for cocultivation of a *S. aureus* CRISPRi genome wide library with udder microbiota bacteria was developed, before a cocultivation experiment and a CRISPRi sequencing (CRISPRi-seq) was performed. The CRISPRi system was shown to be functional in UHT-milk, a growth medium that resembles that of the udder, with was a prerequisite to conduct the cocultivation experiment. In the designed cocultivation method the *S. aureus* CRISPRi library was cultivated with the udder microbiota bacteria *Streptococcus dysgalactiae* with a 1:8 inoculum ratio of the bacteria. A gene fitness analysis from CRISPRi-seq showed two genes that was more essential under cocultivation with *S. dysgalactiae* compared to *S. aureus* grown alone (*glnR* og *pyrG*), and two less essential genes (*htsA* og *fhuC*). *glnR* og *pyrG* is associated with biosynthesis and conversion of glutamine, while *htsA* og *fhuC* is associated with iron uptake.

CRISPRi-seq of the coculture experiment showed few genes with significant differences in gene fitness of *S. aureus* grown as a monoculture and grown with *S. dysgalactiae*, which can be due to little interaction between bacteria. This suggests that the designed method can be improved in the future by better facilitating for interactions in the coculture. CRISPRi-seq is a screening method and in the future the results also need to be verified with for instance growth assays with knockout mutants or by examining individual CRISPRi strains with the significantly essential or less essential genes downregulated by sgRNA. This will form the basis of further understanding of how *S. aureus* is affected by being cultivated with *S. dysgalactiae*.

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning.....</b>	<b>1</b>
1.1	Bovin mastitt.....	1
1.1.1	Mastitt.....	1
1.1.2	Jurmikrobiota.....	2
1.1.3	Bekjempelse.....	3
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.2.1	Virulensfaktorer og antibiotikaresistens.....	4
1.2.2	<i>S. aureus</i> i mennesker og dyr.....	5
1.2.3	Opptak av jern i <i>S. aureus</i> .....	6
1.2.4	Biosyntese og omdanning av glutamin i <i>S. aureus</i> .....	8
1.3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> .....	9
1.4	Kontroll av genuttrykk med CRISPR interferens og CRISPRi-biblioteker.....	10
1.4.1	CRISPRi.....	10
1.4.2	Genomskala CRISPRi-bibliotek og CRISPRi-sekvensering i <i>S. aureus</i> .....	13
1.5	Oppgavens mål.....	15
<b>2</b>	<b>Materialer.....</b>	<b>16</b>
2.1	Plasmider.....	16
2.2	Primere.....	16
2.3	Stammer.....	17
2.4	Enzymer og kjemikalier.....	18
2.5	Kits, instrumenter og utstyr.....	19
2.6	Vekstmedier, buffere og løsninger.....	19
<b>3</b>	<b>Metoder.....</b>	<b>22</b>
3.1	Dyrking og lagring av <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> og jurisolater.....	22
3.2	DNA- og plasmidisolering.....	22
3.2.1	Miniprep plasmidisolering.....	22
3.2.2	Midiprep plasmidisolering.....	23
3.2.3	Fastprep genomisk DNA-isolering.....	23
3.3	Polymerase Chain Reaction.....	23
3.3.1	PCR screening.....	25
3.3.2	Overlapp PCR.....	26
3.4	Restriksjonskutting og ligering.....	26
3.5	Agarosegelelektroforese.....	27
3.6	DNA- og plasmidrensing.....	28

3.6.1	Rensing av DNA og plasmid etter PCR-screening og restriksjonskutting .....	28
3.6.2	Rensing av DNA og plasmid fra agarosegel etter PCR og restriksjonskutting .....	28
3.7	Transformasjon .....	29
3.7.1	Transformasjon i <i>E. coli</i> .....	29
3.7.2	Transformasjon i <i>S. chromogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> og <i>S. dysgalactiae</i> .....	29
3.8	DNA sekvensering .....	30
3.8.1	Måltrettet gensekvensering .....	30
3.8.2	Illumina amplikonsekvensering .....	30
3.9	Konstruksjon av kloramfenikolresistente <i>S. epidermidis</i> , <i>S. chromogenes</i> og <i>S. dysgalactiae</i> stammer .....	31
3.10	Analyse av bakterievekst med mikrotiterplateleser .....	33
3.10.1	Vekstkurver .....	33
3.10.2	Minimal inhibitory concentration .....	34
3.11	Analyse av vekst i melk .....	34
3.12	Plasmidstabilitetstest .....	35
3.13	Kokultiveringsforsøk .....	36
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>38</b>
4.1	CRISPRi-systemet er funksjonelt i melk .....	38
4.2	Jurisolater har lav toleranse for kloramfenikol .....	40
4.3	Plasmidet pVL2336 i <i>S. aureus</i> CRISPRi-stammer er ikke stabilt ved dyrking uten kloramfenikol .....	41
4.4	CRISPRi-systemet kan brukes ved en kloramfenikolkonsentrasjon på 5 µg/ml .....	42
4.5	Konstruksjon av kloramfenikolresistente <i>S. dysgalactiae</i> stammer .....	44
4.5.1	Plasmidet pVL2336 lar seg ikke transformere inn i jurisolater .....	44
4.5.2	Konstruksjon av plasmidene pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla .....	44
4.5.3	Plasmidene pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla gir økt toleranse for kloramfenikol i <i>S. dysgalactiae</i> .....	45
4.6	Optimal kokultivering av <i>S. aureus</i> CRISPRi-biblioteket og <i>S. dysgalactiae</i> er ved en 1:8 inokuleringsratio .....	46
4.7	Kokultivering av <i>S. aureus</i> CRISPRi-biblioteket og <i>S. dysgalactiae</i> .....	46
4.7.1	<i>S. aureus</i> CRISPRi-biblioteket vokste bedre enn <i>S. dysgalactiae</i> under kokultiveringsforsøket .....	46
4.7.2	<i>pyrG</i> , <i>glnR</i> , <i>fhuC</i> og <i>htsA</i> i <i>S. aureus</i> er mer- eller mindre essensielle under kokultivering med <i>S. dysgalactiae</i> enn i en monokultur av <i>S. aureus</i> .....	47
<b>5</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>52</b>
5.1	CRISPRi-systemet er funksjonelt i melk, men mister sin funksjon ved dyrking av <i>S. aureus</i> CRISPRi-stammer i over 7 timer .....	52

## Innledning

5.2	Optimalisering av kokultiveringsoppsettet .....	52
5.3	<i>S. aureus</i> vokste bedre enn <i>S. dysgalactiae</i> under kokultiveringsforsøket, som trolig skyldes et oppsett lite tilpasset kokulturen .....	54
5.4	Kokultiveringsanalyse viste liten forskjell i genfitness for kokultivering sammenliknet med monokultur i melk.....	55
5.5	<i>glnR</i> og <i>pyrG</i> i <i>S. aureus</i> er mer essensielle under kokultivering med <i>S. dysgalactiae</i> enn i en monokultur av <i>S. aureus</i> .....	57
5.6	<i>htsA</i> og <i>fhuC</i> i <i>S. aureus</i> er mindre essensielle under kokultivering med <i>S. dysgalactiae</i> enn i en monokultur av <i>S. aureus</i> .....	58
<b>6</b>	<b>Konklusjon og videre arbeid .....</b>	<b>59</b>
	<b>Referanser .....</b>	<b>60</b>

# 1 Innledning

## 1.1 Bovin mastitt

Bovin mastitt er en inflammasjon i juret hos storfe som utvikles ved at et patogen invaderer juret og skaper en infeksjon (Ruegg, 2017). Mastitt har eksistert i mange tusen år og er fortsatt en av de mest utfordrende sykdommene til melkekyr over hele verden (Ashraf & Imran, 2018; Derakhshani et al., 2018; Ruegg, 2017). Bovin mastitt er årsaken til store økonomiske tap for meieriindustrien. Jurbetennelse forårsaker problemer som redusert helsetilstand hos kyr, økte kostnader for behandling av kyrene, tidligere slakting, reduksjon i melkeproduksjon og dårligere kvalitet på melken (Ashraf & Imran, 2018; Ruegg, 2017). Dårlig melkekvalitet kan videre føre til redusert produktkvalitet og matsvinn. Mastitt påvirker også fertiliteten til kua og har ført til redusert unnfangelse. Bovin mastitt er også årsaken til stor antibiotikabruk for infeksjonsbehandling og forebygging (Ruegg, 2017). Denne store bruken av antibiotika kan føre til at mastittpatogener blir resistente, noe som igjen kan påvirke folke- og dyrehelse negativt (Derakhshani et al., 2018; Ruegg, 2017).

### 1.1.1 Mastitt

Mastitt er en inflammasjon av brystkjertelen som oppstår etter infeksjon av patogener (Ashraf & Imran, 2018). Hos kyr utvikles mastitt ved at et patogen invaderer juret, formerer seg, og produserer skadelige molekyler som leder til at kuas immunforsvar svarer med inflammasjon (Dufour et al., 2019; Ruegg, 2017). Ekstern kontaminering av spenekanal etterfulgt av bevegelse inn i jur eller translokasjon av bakterier fra for eksempel tarm via blod til jur er to mulige kilder til mikroorganismer i melk (Porcellato et al., 2020). Når bakterier først har kommet seg inn i juret, trives de svært godt og formerer seg raskt, selv med kuas immunsystem som angriper dem med ulike inflammatoriske responser (Derakhshani et al., 2018; Porcellato et al., 2020). Dette skyldes at melk inneholder et bredt spekter med næring og temperaturen er optimal for vekst av mesofile bakterier.

Det er to typer mastitt, nemlig klinisk mastitt og subklinisk mastitt (De Vliegher et al., 2012). Ved kliniske mastitt-tilfeller kan fysiske symptomer observeres, som endring av melkens utseende og forandringer i juret (Ashraf & Imran, 2018). Typiske forandringer i juret er hevelser, rødhet, økt varme og smerte (Whist & Sølvørød, 2017). Subklinisk mastitt er vanskeligere å oppdage da det ikke er noen synlige symptomer for denne inflammasjonen. Ved å se på antall somatiske celler (SCC) som er til stede i blodet til kua kan også subkliniske mastitt-tilfeller fanges opp (Derakhshani et al., 2018; Ruegg, 2017; Sharma et al., 2010). Subklinisk mastitt hos kyr regnes fra et somatisk celletall på over 200.000 celler/ml (Porcellato et al., 2021a).



## Innledning

Mastitt skiller seg ut fra de fleste andre sykdommer hos dyr ved at flere svært ulike bakterier kan infisere juret. Mastittpatogener deles inn i to kategorier, nemlig smittsomme patogener og miljøpatogener (Dufour et al., 2019). Smittsomme patogener sprer seg mellom kyr, mens miljøpatogener befinner seg rundt omkring der kyrne oppholder seg. De smittsomme patogenene, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* og *Corynebacterium bovis*, og miljøpatogenene, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* er de hyppigst forekomne mastittpatogenene (De Vliegher et al., 2012; Derakhshani et al., 2018; Dufour et al., 2019; Porcellato et al., 2021a; Ruegg, 2017). I Norge er *S. aureus* (se kapittel 1.2 for detaljer om *S. aureus*) den bakterien som oftest er blitt isolert fra prøver av kyr med klinisk mastitt, etterfulgt av *S. dysgalactiae* (se kapittel 1.3 for detaljer om *S. dysgalactiae*) (Reksen et al., 2006; Østerås, 2016). Andre viktige mastittpatogener er ikke-aureus stafylokokker (NAS). NAS finner man ofte i mikrobiotaen i melka, i spenekanalen og på huden til kyr (Porcellato et al., 2020). NAS-stammene som oftest isoleres fra melk er *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus* og *Staphylococcus epidermidis*.

### 1.1.2 Jurmikrobiota

Nye studier tyder på at det finnes en mikrobiota i jur, i motsetning til det tradisjonelle synet om at friske jur er sterile (Derakhshani et al., 2018). Nyere DNA-sekvenseringsteknikker har vist til mangfold av bakterier i melk, hvor opportunistiske- og kommensale bakterier i tillegg til mastittpatogener kan leve i juret til kua. Studier av mikrobiotaen i jur er derimot så variable at det ikke ennå er mulig å definere et generelt mikrobiom. Dette skyldes blant annet at metoden for å ta ut prøver ikke er godt nok etablert og bidrar til stor variasjon i resultater (Porcellato et al., 2020). Studier hvor nyere DNA-sekvenseringsteknikker er blitt tatt i bruk kan derimot gi et bilde av mangfoldet i mikrobiotaen. I en studie av Parente et al. (2020) ble det funnet at bakterier fra taksonene *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* og *Corynebacteriaceae* dominerte i råmelk-kjernemikrobiotaen (Parente et al., 2020). Porcellato et al. (2020) fant en melkemikrobiota hvor familiene *Corynebacteriaceae* og *Staphylococcaceae* dominerte. Slekten *Corynebacterium* i familien *Corynebacteriaceae* har også tidligere blitt funnet i spenekanal og livmor hos kyr (Porcellato et al., 2020). Andre taksoner som er assosiert med mastitt, som *Aerococcaceae*, *Clostridiales*, *Streptococcaceae* og *Enterococcaceae*, ble også funnet i Porcellato et al. (2020) sin studie. I en ny studie fra Porcellato et al. (2021) ble de mest forekommende slektene i bulk tank melk på lang sikt identifisert til å være *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactococcus* og *Streptococcus*, mens *Pseudomonas*, *Macroccoccus*, *Corynebacterium* og *Streptococcus* ble funnet til å være de mest dominerende slektene på kort sikt. I denne studien ble kumelk fra 37 gårder analysert med to års mellomrom for å finne komposisjonen av mikrobiotaen på lang sikt, mens for å finne mikrobiotakomposisjonen på kort sikt ble kumelk fra fem gårder over en tidsperiode på 7 måneder analysert.

## Innledning

Interaksjonen mellom et mangfold av bakterier i jurmikrobiotaen er viktig for kyrs helse. En optimal diversitet av jurmikrobiotaen, med en balanse mellom ulike bakterier, er ønskelig (Porcellato et al., 2020). Med dette mangfoldet av bakterier i mikrobiotaen vil det foregå interaksjoner mellom mange ulike bakterier. Disse forskjellige interaksjonene bidrar til balanse mellom pro- og anti-inflammatoriske responser og sørger derfor for opprettholdelse av homeostase (Derakhshani et al., 2018). Mastitt assosieres derimot med dysbiose, en endring av normalmikrobiotaen der mikrobiotaen får et lavere mangfold, færre kommensale bakterier og ofte et større antall patogene bakterier. En lavere diversitet i mikrobiotaen i juret kan kobles opp mot dårligere jurhelse, hvor et langt mindre mangfold av bakterier interagerer med hverandre (Porcellato et al., 2020). Om dysbiose i mikrobiotaen forårsaker eller er resultatet av mastitt er derimot usikkert (Derakhshani et al., 2018). Dersom kommensalene kun delvis gjenopprettes i jurmikrobiotaen til behandlede kyr vil nye infeksjoner lettere oppstå (Derakhshani et al., 2018). NAS er et godt eksempel på at interaksjoner mellom bakterier og interaksjoner mellom bakterier og vertsceller er viktige. NAS bidrar både positivt og negativt til homeostase i juret, hvor noen arter forårsaker mastitt mens andre arter beskytter mot jurbetennelse. For eksempel er NAS-arten *S. chromogenes* en kommensal og kan produsere et stort spekter av bakteriociner, som inhiberer vekst av mastittpatogener og dermed hindrer utvikling av mastitt (De Vliegher et al., 2012; Derakhshani et al., 2018). Her bidrar bakterieinteraksjoner til å forhindre mastitt. På den andre siden bidrar samme art, som et patogen, til at NAS er den bakteriegruppen som vanligst forårsaker bovin subklinisk mastitt (Condas et al., 2017; De Visscher et al., 2016). Her sørger både interaksjoner med vertsceller og bakterier til dannelsen av mastitt.

### 1.1.3 Bekjempelse

Det finnes flere metoder for bekjempelse og forebygging av bovin mastitt, slik at dyrevelferden kan forbedres og det store tapet i meieriindustrien kan reduseres. Kua selv beskytter mot mastitt, flere forbyggende tiltak mot mastitt er blitt utviklet og nyere studier undersøker blant annet hvor viktig mikrobiomet i juret er for dannelsen av mastitt. Kua har flere forsvarsmekanismer som beskytter mot mastitt. Spenehuden og spenekanalene er de første leddene i forsvaret, som fungerer som fysiske barrierer mot bakterier (Whist & Sølverød, 2017). Melka til kua inneholder også et stort spekter av immunregulerende molekyler, som blant annet immunglobuliner, lysozym, laktoferrin, antimikrobielle peptider og oligosakkarider, som beskytter mot mastittpatogener (Derakhshani et al., 2018). Skjer det en infeksjon vil også immunsystemet til kua aktiveres, hvor hvite blodceller transporteres til melka for bekjempelse av bakterier (Whist & Sølverød, 2017).

Mastitt har, som nevnt, eksistert i mange tusen år og gjennom disse årene har ulike forebyggende tiltak blitt satt i verk for bekjempelse av mastitt. Et viktig steg i reduksjon av mastitt er å hindre at spenekanalene

## Innledning

eksponeres for et stort antall bakterier (Ruegg, 2017). Dette gjøres ved grep som etter-melking, spenedypping, sørge for hygienisk melking og vedlikeholdelse av melkeutstyr. Et annet forebyggende tiltak mot mastitt er vaksinerings av kyr, noe som har ført til en raskere behandling og forhindret dannelse av mastitt (Ruegg, 2017). For å redusere infeksjonstiden til syke kyr og for å forhindre nye infeksjoner i friske kyr, blir kyr med mastitt isolert og behandlet (Ruegg, 2017; Whist & Sølverød, 2017). I Norge anbefales det at kyr behandles ved moderat eller alvorlig mastitt (Whist & Sølverød, 2017). Lakterende kyr med klinisk mastitt kan behandles med antibiotika ved lokal behandling med salve, og ved alvorlig mastitt med ytterligere antibiotikabehandling (Krömker & Leimbach, 2017). Antibiotika brukes også på ikke-lakterende kyr, hvor kyrne behandles ca. seks uker før kalving. Kyr med ustabil kronisk mastitt kan bli slaktet for å redusere spredning av mastittpatogener (Ruegg, 2017; Whist & Sølverød, 2017).

Å se på hvilken rolle jurmikrobiotaen spiller i utviklingen av mastitt kan gi muligheter for utvikling av metoder som bekjemper dannelse av mastitt i fremtiden. Nye genredigeringsteknikker og DNA sekvenseringsteknikker gjør det mulig å studere interaksjoner mellom bakterier i jurmikrobiotaen. Her kan blant annet samspillet mellom mikrobiomet i juret og mastittpatogener undersøkes ved å se på genuttrykket til bakteriene. Blir viktige gener for mastittpatogener funnet kan disse videre for eksempel brukes som target i infeksjonsbehandling, og mastitt kan dermed forbygges. En annen innfallsvinkel kan være å finne kommensaler som bekjemper mastitt og i fremtiden sørge for at disse bakteriene trives i juret.

### 1.2 *Staphylococcus aureus*

Stafylokokker ble først oppdaget av Alexander Ogston på tidlig 1880-tallet. Denne slekten av bakterier er gule, kuleformede og vokser i klynger (Lowy, 1998; Ogston, 1881; Ogston, 1882). Stafylokokkene fikk navnet *Staphylococcus* etter deres drueliknende morfologi, hvor *Staphyle* fra gresk betyr «drueklase» (Lowy, 1998). *S. aureus* er gram positive kokker og hører til ordenen *Bacillales* og familien *Staphylococcaceae*. *S. aureus* sitt genom inkluderer et sirkulært kromosom på ca. 2800 kbp, som ofte inneholder transposoner og profager, og plasmider (John et al., 2019; Lowy, 1998).

#### 1.2.1 Virulensfaktorer og antibiotikaresistens

Mer enn 100 år etter å ha blitt oppdaget, er fortsatt *S. aureus* en stor utfordring innen medisin og veterinærmedisin (Lowy, 1998; Peton & Le Loir, 2013). Dette skyldes blant annet at *S. aureus* produserer en rekke forskjellige virulensfaktorer (Cheung et al., 2021). Eksempler på disse virulensfaktorene er celleveggforankrede-proteiner, toksiner, som cytotoxiner og superantigener, og ekstracellulære enzymer. Celleveggforankrede-proteiner bidrar blant annet med å binde til og invadere vertsceller, unngå immunsystemet og bidra til biofilmdannelse (Foster et al., 2014). Cytotoxiner bidrar med å lysere celler som erytrocytter, endotelceller, epitelceller og leukocyter (Grimminger et al., 1997;

## Innledning

Inoshima et al., 2011; Nygaard et al., 2012). Stafylokokk superantigener er svært motstandsdyktige toksiner og tåler varme, uttørking og proteolyse (Spaulding et al., 2013; Tam & Torres, 2019). Disse toksinene forstyrrer immunforsvaret ved for eksempel å sørge for overstimulering eller hindre opsonisering. Ekstracellulære enzymer, som nukleaser, proteaser og lipaser, påvirker også immunresponser og sørger for degradering av vertens vev (Tam & Torres, 2019).

Dette store spekteret av virulensfaktorer, sammen med muligheten til opptak av nytt DNA gjennom horisontal genoverføring, gjør *S. aureus* svært allsidig. Gjennom horisontal genoverføring kan virulens- og antibiotikaresistensgener på kromosomet og plasmider overføres mellom stafylokokker (Lindsay, 2010). *S. aureus* utvikler stadig nye antibiotikaresistente stammer og har en enorm evne til å tilpasse seg nye omgivelser (Zecconi & Scali, 2013). For eksempel, kort tid etter introduksjon av antibiotikaene penicillin, meticillin og vankomycin, har *S. aureus* utviklet resistens mot disse antibiotikaene (Chambers & Deleo, 2009; Jevons, 1961; Stamsas et al., 2018). Bakterien er også en opportunist og kan kolonisere seg på flere steder i både dyr og mennesker og forårsake en rekke forskjellige sykdommer i ulike vertsarter (Otto, 2014; Sheppard et al., 2018; Tam & Torres, 2019).

### 1.2.2 *S. aureus* i mennesker og dyr

Mange mennesker lever med *S. aureus* uten å merke det, og omtrent 30 % av jordas befolkning er asymptomatiske bærere av bakterien. *S. aureus* koloniserer seg på hud, i hals og nesebor eller på perineum og i vaginaen hos mennesker, hvor den fremre delen av nesa er der bakterien som oftest bosetter seg (Lindsay, 2014; Sollid et al., 2014; Wertheim et al., 2005; Williams, 1963). *S. aureus* lever i disse miljøene som et opportunistisk patogen, hvor bakterien lever som en kommensal til eventuelt omgivelsene gir den et overtak og derfor begynner å leve som et patogen på samme vert. *S. aureus* kan som et patogen forårsake et stort omfang av sykdommer i mennesker, som hud-, ledd- og bløtvevsinfeksjoner, byller i hjerne, muskler og innvoller, betennelser i bein, hjerte, lunger og hjernehinne, blodforgiftning, toksisk sjokksyndrom og matforgiftning (Josse et al., 2015; Kadlec et al., 2012; Lowy, 1998; Schoenfelder et al., 2017; Thammavongsa et al., 2015; Tong et al., 2015; Wendlandt et al., 2015).

*S. aureus* finnes også i mange dyrearter, hvor infeksjoner av bakterien er blitt rapportert i sau, geiter, dyr fugler og kyr (Haag et al., 2019; Peton & Le Loir, 2013). I dyr koloniserer *S. aureus* seg på hud og slimhinner (Wertheim et al., 2005; Williams, 1963). *Staphylococcus* er tilpasset miljøet rundt huden og juret til kua (Porcellato et al., 2021a). Infeksjonene i dyr gir alt fra overfladiske sykdommer til blodforgiftning (Peton & Le Loir, 2013). Den mest vanlige *S. aureus* infeksjonen hos dyr er altså mastitt hos kyr, hvor bakterien kan forårsake både klinisk og subklinisk mastitt (Olde Riekerink et al., 2008; Osterås et al., 2006; Porcellato et al., 2021a) (se kapittel 1.1.1).

## Innledning

### 1.2.3 Opptak av jern i *S. aureus*

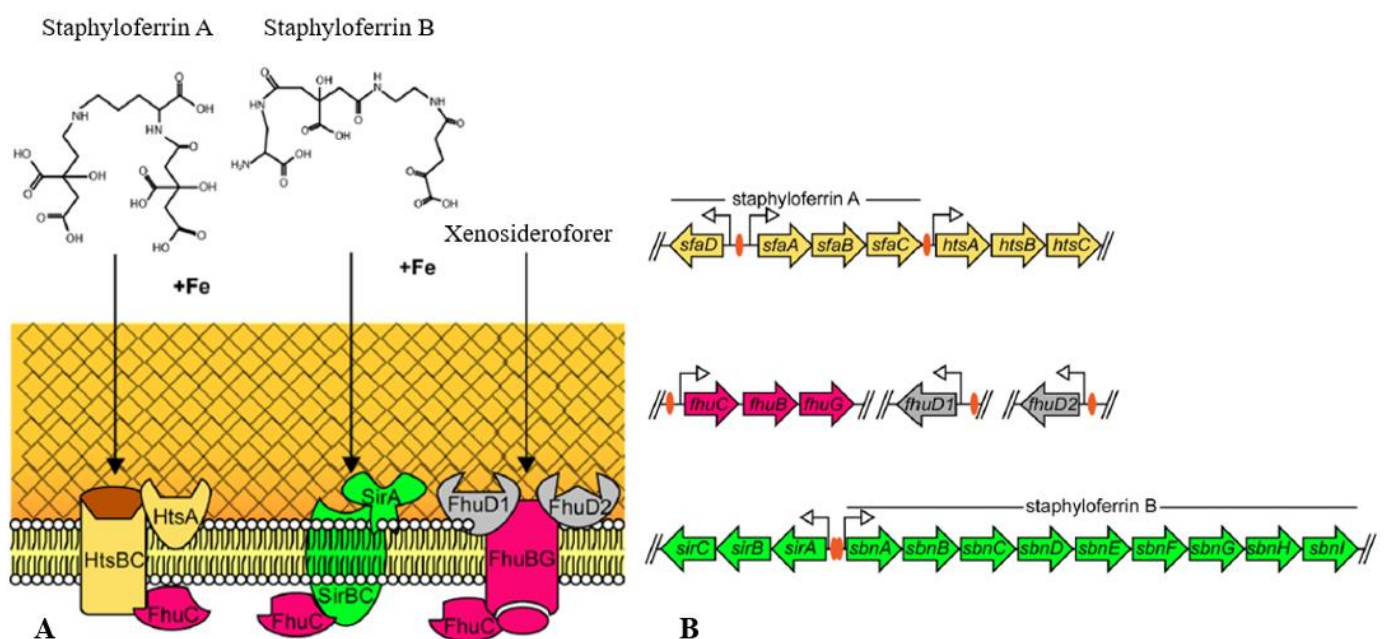
Jern er et grunnstoff som er essensielt for mikroorganismer. Jern er blant annet en del av det katalytiske senteret i ulike enzymer og er dermed involvert i viktige prosesser som DNA syntese og elektrontransport (Speziali et al., 2006). Det finnes tilnærmet ingen fri jern i organismer. Omtrent 90 % av jerninnholdet i pattedyr befinner seg intracellulært, som gjør jern lite tilgjengelig for ekstracellulære mikroorganismer (Hammer & Skaar, 2011). Omtrent 80 % av pattedyrs jern er bundet til hem. Hemoglobin, som er bygget opp av fire hem-molekyler, er det hemoproteinet det er mest av i pattedyr (Hammer & Skaar, 2011). Proteiner hos pattedyr, som transferrin og laktoferrin, er glykoproteiner med høy affinitet til fritt jern som er i stand til å binde seg til ekstracellulært jern (Hammer & Skaar, 2011).

*S. aureus* har flere mekanismer til stede for å klare å ta til seg jern i et jernfattig miljø, noe som bidrar til bakteriens evne til å kolonisere de fleste pattedyr, og disse mekanismene bidrar dermed til patogenisitet og kan regnes som virulensfaktorer (Grigg et al., 2010). Tilgjengeligheten av jern vil også påvirke konkurranse mellom bakterier, som ble studert i dette arbeidet. En av disse mekanismene for jernopptak innebærer produksjon av små molekyler med en høy affinitet til jern (sideroforer) og transport av jern bundet til disse molekylerne inn i bakteriecella ved hjelp av proteiner på celleoverflaten (Grigg et al., 2010; Speziali et al., 2006). *S. aureus* produserer sideroforer som stjeler jern fra transferrin og laktoferrin. Sideroforer har så høy affinitet for jern at den binder jern sterkere enn mange av vertens egne jern-bindende proteiner (Hammer & Skaar, 2011). Sideroforene, staphyloferrin A og staphyloferrin B, blir produsert av *S. aureus* (figur 1.1AB). *sfaABCD* operonet koder for proteinene som er involvert i staphyloferrin A syntese (figur 1.1B). Staphyloferrin A har en masse på 479 Dalton og er bygget opp av D-ornitin og to molekyler av citrat (Hammer & Skaar, 2011). Staphyloferrin B er en alfa-hydroksykarboksylat siderofor og har en masse på 448 Dalton. Sideroforen er bygget opp av L-2,3-diaminpropionsyre, 1,2-etylendiamin og alfa-ketoglutarsyre. Operonet *sbnABCDEFGH* koder for proteinene som sørger for staphyloferrin B syntese (figur 1.1B) (Hammer & Skaar, 2011).

*S. aureus* har spesifikke transportere som er nødvendige for å ta opp sideroformolekylerne etter at de har bundet jern (figur 1.1A). *htsABC* operonet, som finnes ved siden av *sfa* operonet, koder for en ABC-transporter som er nødvendig for import av staphyloferrin A (figur 1.1AB). Det er også rapportert at HtsBC sørger for import av hem, og denne transporteren er derfor muligens viktig for transport av ulike kilder til jern (Hammer & Skaar, 2011). Mens selve ABC-transporteren utgjøres av proteinene HtsB og HtsC, er HtsA lipoproteinreseptoren til staphyloferrin A. HtsA gjennomgår en konformasjonsendring når den binder staphyloferrin A. Det er imidlertid lite sannsynlig at denne reseptoren binder hem gitt strukturen komplekset HtsA-staphyloferrin har (Hammer & Skaar, 2011). Den jernregulerte transporteren SirABC sørger for import av staphyloferrin B og kodes av *sirABC* operonet (figur 1.1AB). SirA er

## Innledning

staphyloferrin B sin lipoproteinreseptor, og i likhet med HtsA gjennomgår denne en konformasjonsendring når den binder staphyloferrin B. SirBC antas å sørge for transport av staphyloferrin B til cytoplasma og dermed være en membran permease (Hammer & Skaar, 2011). SirABC og HtsABC sørger altså for transport av sideroforer gjennom membranen, noe som krever energi. Til tross for dette koder hverken *sirABC* eller *htsABC* operonet for en ATPase. Det er *fhuCBG* som koder for ATPasen, FhuC, som gir energi til SirABC og HtsABC (figur 1.1AB) (Hammer & Skaar, 2011). Inhibering av FhuC kan dermed gjøre det vanskelig for *S. aureus* å ta opp jern. *S. aureus* kan også utnytte såkalte xenosideroforer for opptak av jern, selv om ikke bakterien produserer disse selv. FhuCBG sammen med FhuD1 og FhuD2 sørger for opptak av xenosideroforer hos *S. aureus*. FhuD1 og FhuD2 er lipoproteinreseptorer og binder seg til xenosideroforer og FhuBG er permeasen som transporterer xenosideroforene gjennom membranen. Til forskjell fra SirA og HtsA så skjer det en mye mindre forandring i konformasjon hos FhuD1 og FhuD2 ved binding. Dette gjør muligens at reseptorene har mindre affinitet til sideroforer, men kan på en annen side kanskje har muligheten til å binde flere xenosideroforer. Ved å opprettholde opptak av staphyloferrin A og B samtidig som *S. aureus* kan stjele xenosideroforer fra andre bakterier, kan *S. aureus* få en stor konkurransefordel i jernfattig miljø (Hammer & Skaar, 2011).



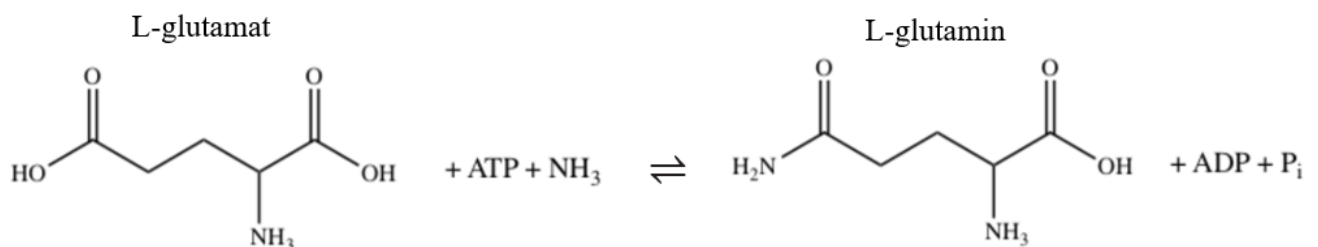
**Figur 1.1 Opptakssystemer for sideroforer bundet til jern i *S. aureus*.** A) Jern bundet til staphyloferrin A tas opp av HtsA reseptoren og HtsBC permeasen. Reseptoren SirA og permeasen SirBC bidrar til import av jern bundet til staphyloferrin B. FhuD1 og FhuD2 reseptorene og FhuBG permeasen bidrar til opptak av xenosideroforer, produsert av andre bakterier, med binding til jern. ATPasen FhuC bidrar med energien som trengs for sideroforopptak. B) Genetiske loci som er involvert i produksjon av staphyloferrin A og B og deres opptakssystemer. Genene som trengs for staphyloferrin A syntese kodes av *sfa* operonet, *sfn* operonet koder for genene til staphyloferrin B syntese. Den oransje ovale sirkelen indikerer promotor regioner som inneholder *fur* box, som Fur regulatoren binder seg til for regulering av jernimport. Figuren er med tillatelse tilpasset fra Hammer & Skaar, 2011.

## Innledning

*S. aureus* har mekanismer som regulerer produksjonen av sideroforene, staphyloferrin A og staphyloferrin B. Ekspresjon av genene som koder for staphyloferrin A og B og opptakssystemene er regulert av regulatoren Fur. Staphyloferrin A og staphyloferrin B blir maksimalt uttrykt når det er lite jern til stede i miljøet (Hammer & Skaar, 2011). Ved lite jern i miljøet til *S. aureus* endrer bakterien dramatisk sitt uttrykk av proteiner. Den jernavhengige transkripsjonsrepressoren Fur binder seg til en DNA sekvens som ligger oppstrøms for *fur* regulerte gener, som heter *fur* box (figur 1.1B), når jern er til stede. Når tilgangen på jern er liten derimot, slipper Fur seg fri fra DNAet og gjør det mulig med transkripsjon av *fur* regulerte gener. Fur regulerer også uttrykk av ulike virulensfaktorer hos stafylokokker som påvirker binding til vertsceller og biofilm (Hammer & Skaar, 2011).

### 1.2.4 Biosyntese og omdanning av glutamin i *S. aureus*

Nitrogen er et annet essensielt grunnstoff hos bakterier som er nødvendig i produksjon av blant annet RNA og DNA. Nitrogen gjøres tilgjengelig for andre essensielle reaksjoner ved at det først inkorporeres inn i aminosyra glutamin. Flere ulike reaksjoner i bakterier involverer glutamin. Glutamin syntetase (GS) katalyserer biosyntese av L-glutamin fra L-glutamat og ammoniakk. GS syntetiserer amidering av glutamat og danner glutamin ved hjelp av ATP (figur 1.2). GS bidrar med dette til assimilering av ammoniakk og er et viktig enzym som sørger for at nitrogen er tilgjengelig til syntese av bakteriens nitrogenholdige komponenter (Schreier et al., 2000).



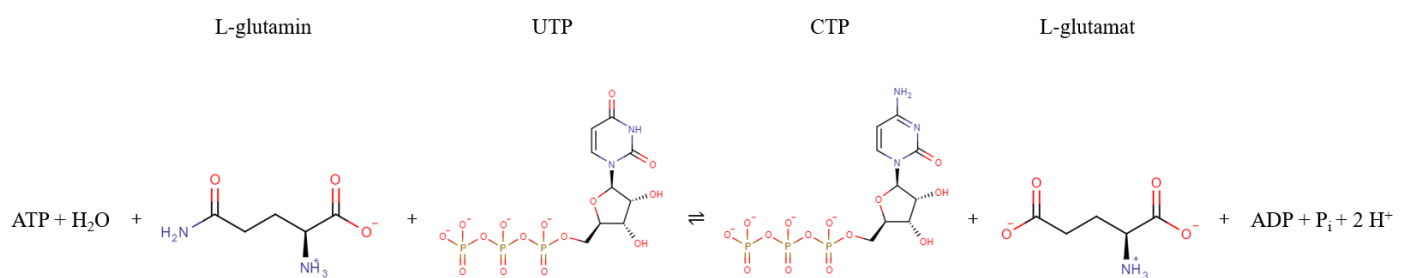
**Figur 1.2 Biosyntese av glutamin.** Reaksjon mellom L-glutamat, ammoniakk og adenosintrifosfat (ATP) danner L-glutamin, adenosindifosfat (ADP) og fosfat.

Hos *Bacillus subtilis* ligger genet *glnA*, som koder for GS, på samme operon som repressoren (*glnRA*). Interaksjonen mellom GlnR og GS er undersøkt i detalj hos *B. subtilis* (Schreier et al., 2000). GlnR regulerer uttrykket av *glnRA* operonet. GlnR binder seg, som en dimer, til operatorene inntil og ved siden av *glnRA* promotoren med høy affinitet og hindrer dermed transkripsjon (Schreier et al., 2000). *S. aureus* har også en svært lik symmetrisk sekvens ved siden av *glnRA* promotoren som *B. subtilis* og det er derfor sannsynlig at binding av GlnR til disse sekvensene kontrollerer uttrykket av *glnRA* i *S. aureus* på samme måte (Schreier et al., 2000). Aktiviteten til GlnR sørger for at det er høyere nivå av GS når det er lave

## Innledning

nivåer av ammoniakk. GlnR hos *S. aureus* fungerer muligens som en global nitrogenregulator, noe som er vist hos *B. subtilis* (Schreier et al., 2000).

Et annet enzym som er involvert i omdannelsen av glutamin er cytidintrifosfat (CTP) syntetase. Cytidintrifosfat er et pyrimidin-nukleotid som er essensielt for RNA, DNA og fosfolipidbiosyntese i bakterier (Endrizzi et al., 2004; Goto et al., 2004; Yoshida et al., 2012). CTP syntetase (PyrG), som kodes av genet *pyrG*, katalyserer det siste steget i *de novo* pyrimidin biosyntese i bakterier (Lauritsen et al., 2011; Meng et al., 2004; Mori et al., 2015), nemlig reaksjonen fra uridintrifosfat (UTP) til cytidintrifosfat (CTP). Den fullstendige reaksjonen som PyrG katalyserer er vist i figur 1.3 (Anderson, 1983; Yoshida et al., 2012).



**Figur 1.3 Biosyntese av cytidintrifosfat.** Reaksjon mellom adenosintrifosfat (ATP), H<sub>2</sub>O, L-glutamin, uridintrifosfat (UTP) danner cytidintrifosfat (CTP), L-glutamat, adenosindifosfat (ADP), fosfat og hydrogenioner.

I denne energikrevende reaksjonen konverteres UTP til CTP ved at en aminogruppe settes på UTP (Long & Pardee, 1967; Mori et al., 2015; Willemoës et al., 2005). Aminogruppen for syntese av CTP kommer fra hydrolyse av glutamin, slik at det dannes ammoniakk og glutamat (Goto et al., 2004).

### 1.3 *Streptococcus dysgalactiae*

*S. dysgalactiae* ble beskrevet av Diernhofer i 1932 og ble en offisiell egen art i 1983 (Garvie et al., 1983). *S. dysgalactiae* er kjedeformede, gram positive kokker og hører til ordenen *Lactobacillales* og familien *Streptococcaceae*. Bakterien deles inn i de to undergruppene, subspecies *dysgalactiae* (SDSD) og subspecies *equisimilis* (SDSE) (Vieira et al., 1998). SDSD infiserer som oftest dyr, mens SDSE forårsaker forskjellige infeksjoner i mennesker og husdyr (Porcellato et al., 2021b).

*S. dysgalactiae* har flere virulensgener som bidrar til at bakterien binder seg til vert, unnviker immunresponser og sprer seg (Porcellato et al., 2021b). Pili brukes i SDSE til å binde bakterien til ulike overflater hos verten. SDSD koder derimot ikke for pilus, men andre molekyler som det fibronektin-bindende proteinet FnbA, det fibrinogen-bindende proteinet DemA og mulig et Srr-glykoprotein kan bidra til adhesjon i denne undergruppen av *S. dysgalactiae*. Proteiner som immunglobulin-bindende protein G i SDSE og det makroglobulin- og immunglobulin-bindende proteinet MIG og det



## Innledning

makroglobulin-, albumin- og immunglobulin-bindende proteinet MAG i SDSD forsvarende bakteriene mot vertens immunsystem. Dette er noen av flere virulensfaktorer som bidrar til at *S. dysgalactiae*, som kommensal og patogen, kan kolonisere seg i flere ulike verter.

*S. dysgalactiae* er et viktig patogen i både human- og veterinærmedisin (Porcellato et al., 2021b). *S. dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* er kjent for å forårsake mastitt hos kyr (Baracco, 2019; Rato et al., 2011). Mastitt fører blant annet til dårlig melk, hvor *dys* og *galactia* fra gresk henholdsvis betyr «dårlig» og «melk» (Garvie et al., 1983). SDSD er også en hyppig årsak til mastitt i dromedarer og ulike infeksjoner i lam (Baracco, 2019). SDSD har også blitt rapportert til å gi toksisk sjokk liknende syndrom i kyr, polyartritt i lam, bakteriemi i hunder og blodforgiftning i fisk. *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis* er en kommensal i mennesker, men forårsaker også et stort omfang av sykdommer (Baracco, 2019; Rantala, 2014). Sykdommer i mennesker forårsaket av SDSE er alt fra milde infeksjoner, som hud- og bløtvevsinfeksjoner, til alvorlige livstruende infeksjoner, som toksisk sjokksyndrom.

### 1.4 Kontroll av genuttrykk med CRISPR interferens og CRISPRi-biblioteker

I dette arbeidet ønsket vi å sette opp metoder for systematisk å studere hvilke gener i *S. aureus* som er essensielle for overlevelse i konkurranse med andre bakterier. Essensielle gener defineres her som gener som er nødvendige for at bakterier skal kunne vokse, hvor mangel på et essensielt gen vil føre til at bakterien dør. Om gener er essensielle eller ikke avhenger av miljøet bakterien er i. Genetiske teknikker, som for eksempel transposonmutagenese, er en vanlig framgangsmåte for å generere knockoutmutanter av gener som kan studeres videre (de Bakker et al., 2022). Slike framgangsmåter begrenser seg imidlertid til ikke-essensielle gener, siden knockoutmutanter av essensielle gener er letalt. For å gjøre det mulig å studere alle gener, både essensielle og ikke-essensielle, trengs det derfor metoder for å nedregulere gener (Qi et al., 2013). Det finnes flere metoder for dette, som for eksempel RNA interferens (RNAi), zink finger og transcription-activator-like effector (TALE) proteiner. Disse metodene er imidlertid ofte vanskelige, tidkrevende og kostbare, spesielt om man ønsker å simultant nedregulere mange gener. Et alternativ og nyere metoder, er CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) interferens (CRISPRi). I dette arbeidet benyttes CRISPRi og genomskala CRISPRi-biblioteker med mål om å undersøke effekten av alle gener i *S. aureus* simultant.

#### 1.4.1 CRISPRi

CRISPR systemet er en ny teknologi, hvor man raskt, enkelt og billig kan redigere gener. Her kan alt fra delesjoner, insersjoner, enkeltmutasjoner og nedregulering av gener utføres. Denne teknologien er utviklet fra CRISPR systemet som naturlig forekommer hos ca. 40 % av alle bakterier som et forsvarssystem mot bakteriofager (Kick et al., 2017; Qi et al., 2013). Ulike bakterier har forskjellige CRISPR systemer, hvor type II CRISPR systemet er hentet fra *Streptococcus pyogenes*. Type II CRISPR

## Innledning

systemet, også kjent som CRISPR/Cas9 (CRISPR assosiert protein 9), er et av de enkleste CRISPR systemene som brukes innenfor genredigering (Qi et al., 2013; Zhang et al., 2014), og dette er også benyttet i dette arbeidet.

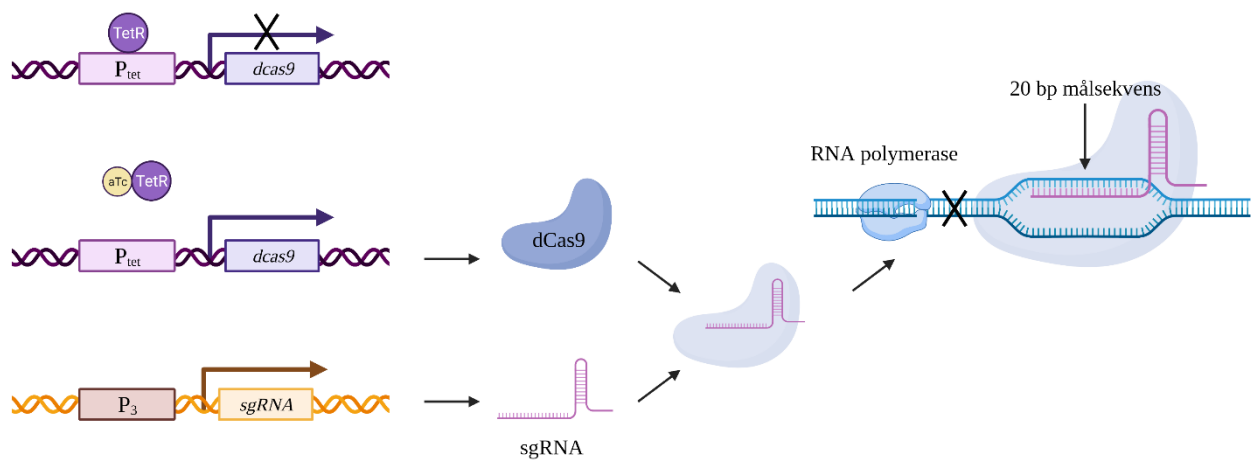
CRISPR/Cas9 systemet beskytter bakterier mot inntrengende virus og plasmider ved bruk av CRISPR RNA (crRNA), transaktiverende crRNA (tracrRNA) og Cas9 som sammen gjenkjenner, binder seg til og kutter DNA sekvenser (Guzzo et al., 2020; Roy et al., 2018; Zhang et al., 2014). Bakterienes CRISPR/Cas9 immunforsvar gjenkjenner ukjent DNA ved å lagre arvesoffet fra inntrengerne i sitt eget DNA. En Cas nuklease deler det ukjente DNAet i små fragmenter, protospacers, som settes inn i et CRISPR lokus (Zhang et al., 2014). CRISPR lokuset består av flere forskjellige protospacere som er separert av konserverte repeterende sekvenser. crRNA, som kommer fra protospacerene, og et annet RNA-molekyl, tracrRNA transkribes fra CRISPR lokuset (Guzzo et al., 2020; Kim & Kim, 2014). tracrRNA-crRNA komplekset fører Cas9, som er en dsDNA nuklease, til en målsekvens på det ukjente DNAet. Det fremmede DNAet blir gjenkjent av 20 komplementære baser på crRNA og en tre baser lang PAM (protospacer adjacent motif) sekvens (Guzzo et al., 2020; Kim & Kim, 2014; Roy et al., 2018). Etter binding klipper Cas9 nukleasen det ukjente DNAet med et dobbeltrådet kutt og hindrer dermed inntrengelse av ukjent DNA (Zhang et al., 2014).

For å benytte dette systemet som et genetisk verktøy, er en modifisert versjon av CRISPR/Cas9 systemet utviklet. Dette består kun av to komponenter; et Cas9 protein og et single guide RNA (sgRNA) for å redigere ulike gener (Qi et al., 2013). Her er crRNA og tracrRNA erstattet med et sgRNA, som etterlikner crRNA-tracrRNA-komplekset, og dette kan modifiseres slik at Cas9 proteinet dirigeres til ønsket målsekvens. Videre fungerer systemet på samme vis som beskrevet over, hvor Cas9 ender med å kutte DNAet. Cellenes DNA reparasjonssystemer, som ikke-homolog-endebinding og homolog rekombinasjon brukes deretter til å reparere bruddet, noe som leder til ønskede delesjoner, insesjoner eller substitusjoner på mål-DNAet (Roy et al., 2018; Zhang et al., 2014). CRISPR/Cas9 systemet gjør det dermed mulig å sikte seg inn på et spesifikt gen og redigere dette genet.

CRISPR interferens (CRISPRi), som ble benyttet i dette arbeidet, er en videreutvikling av CRISPR/Cas9, hvor man utfører genregulering istedenfor genredigering (figur 1.4). I CRISPRi-systemet brukes et katalytisk dødt Cas9 (dCas9) protein sammen med et sgRNA for å kontrollere genuttrykket (Qi et al., 2013). På grunn av mutasjoner i det aktive setet til Cas9, kan dCas9 ikke utføre dobbeltrådet klipping av DNA og vil kun binde seg til DNA sammen med sgRNA (Qi et al., 2013; Stamsas et al., 2018). CRISPRi-systemet vil dirigere binding av dCas9-sgRNA komplekset til et ønsket gen, og dette komplekset vil fungere som en barriere for RNA polymerase og dermed forstyrre transkripsjonen (Stamsas et al., 2018). CRISPRi-systemet gjør det dermed mulig å nedregulere transkripsjonen av spesifikke gener med

## Innledning

reversibel effekt (Qi et al., 2013). Nedreguleringen med dette systemet er svært spesifikk og fører sjeldent til off-target effekter. En utfordring med CRISPRi-systemet i bakterier er derimot at genene ofte er organisert i operon. Når CRISPRi-systemet har et gen i et operon som target, vil mest sannsynlig alle gener etter mål-genet i operonet vil bli nedreguet (Kjos, 2019). CRISPRi-systemet, som kun består av to komponenter, er enkelt å designe og svært fleksibelt, hvor kun de 20 basene på sgRNAet trengs å endres på for å angripe nye DNA sekvenser (Kjos, 2019; Qi et al., 2013). Store bibliotek av sgRNA stammer kan dermed også lett utvikles med CRISPRi-systemet (se kapittel 1.4.2). Flere gener kan også nedreguleres på samme tid og i tillegg til ikke-essensielle gener kan også essesielle gener studeres med dette systemet (Qi et al., 2013).



**Figur 1.4 CRISPRi-systemet i *S. aureus*.** Her er en versjon av CRISPR/Cas9 systemet fra *S. pyogenes* klonet inn i *S. aureus*, som ikke selv koder for et slikt CRISPR-system. dCas9 uttrykkes på kromosomet fra den tetracycline induserbare promotoren  $P_{tet}$  og sgRNA uttrykkes på pVL2336-plasmidet fra den konstitutive promotoren  $P_3$ . Med anhydrotetrasyklin (aTc) induksjon uttrykkes dCas9, et dCas9-sgRNA-kompleks dannes og transporteres til og blokkerer transkripsjon av målsekvens. Laget med BioRender.com.

Et CRISPRi-system i *S. aureus* har blitt utviklet av Stamsås et al. (2018) og dette systemet er videreutviklet av Mårli og Kjos (M. Mårli & M. Kjos, personlig kommunikasjon; Stamsås et al., 2018). I CRISPRi-systemet i *S. aureus* utviklet av Mårli og Kjos (figur 1.4) uttrykkes dCas9 på kromosomet og sgRNA på plasmidet pVL2336. dCas9 uttrykkes fra den tetrasyklininduserbare-promotoren,  $P_{tet}$ , ved å tilsette tetrasyklin eller anhydrotetrasyklin (aTc), et derivat av tetrasyklin som ikke er toksisk og ikke brytes ned (Sorg et al., 2020). Repressoren, TetR, som uttrykkes på kromosomet, binder seg til  $P_{tet}$  og hindrer transkripsjon. aTc gjør  $P_{tet}$  fri fra TetR ved å selv binde seg til repressoren og med dette endre repressorens konformasjon. Uten TetR bundet til promotoren kan transkripsjonen starte og dCas9 uttrykkes. Proteinene TetM uttrykkes også på kromosomet og gjør *S. aureus*-stammen mer tolerant mot høye konsentrasjoner av tetrasyklin (Liu et al., 2021). sgRNA blir uttrykt fra den konstitutive promotoren  $P_3$  på plasmidet pVL2336 hentet fra *E. coli* VL2336. For å beholde plasmidet inne i cellen benyttes en seleksjon for kloramfenikolresistens ( $cam^R$ ). For *S. aureus* CRISPRi-systemet vil dermed en tilsetning av aTc sørge

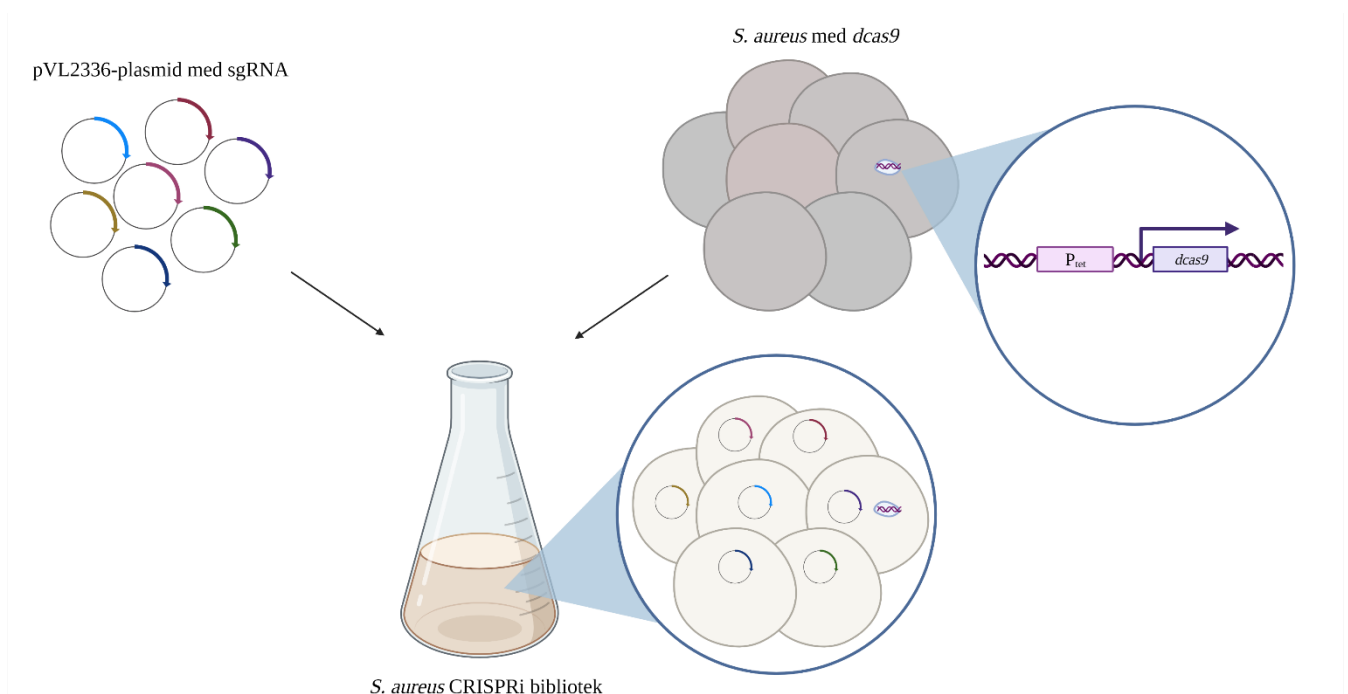
## Innledning

for at dCas9 uttrykkes og komplekset dCas9-sgRNA dannes. Dette komplekset sørger videre for blokkering av transkripsjon ved å binde mål-sekvens og dermed nedregulering av mål-genet.

### 1.4.2 Genomskala CRISPRi-bibliotek og CRISPRi-sekvensering i *S. aureus*

Ved CRISPRi-metoden beskrevet over (figur 1.4) er det mulig å dirigere systemet til å nedregulere enkeltgener. Som nevnt, er målet i arbeidet vårt å bruke genomskala biblioteker, hvor tilnærmet alle gener i et genom kan studeres samtidig, for å undersøke effekten av alle gener i *S. aureus* simultant. Slike genomskala forsøk er tidligere blitt utført med såkalte transposon-bibliotek, men problemet med disse er at essensielle gener ikke kan studeres (de Bakker et al., 2022; Kjos, 2019). CRISPRi-metoden er imidlertid mulig å oppskalere og genomskala CRISPRi-bibliotek kan til forskjell fra transposon-bibliotek nedregulere alle gener. Med et genomskala CRISPRi-bibliotek kan dermed alle gener i et genom studeres, noe som muliggjør utallige studier av essensielle og ikke-essensielle gener i ulike bakterier.

Et genetisk bibliotek i *S. aureus* basert på CRISPRi-systemet beskrevet over (figur 1.4) har blitt utviklet i stammen NCTC8325-4 (figur 1.5) (M. Kjos, personlig kommunikasjon, upubliserte resulater). *S. aureus* sitt genom inneholder ca. 3000 gener, som er fordelt på rundt 2000 transkripsjonsenheter eller operoner (Baba et al., 2008; Lindsay & Holden, 2004). Genomskala *S. aureus* CRISPRi-biblioteket inneholder en samling av 1928 NCTC8325-4 stammer, hvor hver celle har et sgRNA som nedregulerer et spesifikt gen eller transkripsjonsenhet, og gjør at biblioteket nesten dekker alle gener i stammen.



**Figur 1.5 *S. aureus* «pooled» CRISPRi-bibliotek.** CRISPRi-bibliotek i *S. aureus* NCTC8325-4 med 1928 ulike celler, hvor hver av de unike cellene har et *dcas9* gen på kromosomet og et unikt *sgRNA* gen, på plasmidet pVL2336, med target til et spesifikt gen i bakteriens genom. I *S. aureus* CRISPRi-biblioteket induisert med anhydrotetrasyklin (aTc) nedreguleres tilnærmet alle gener i stammen. Laget med BioRender.com.

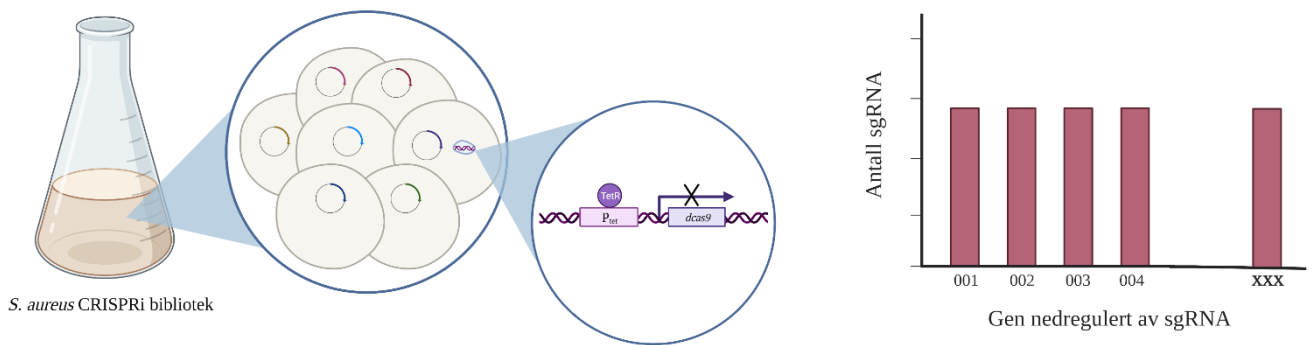
## Innledning

CRISPRi-sekvensering (CRISPRi-seq) kan brukes til å studere gener i bakterier ved ulike veksttiltander på et genomskala nivå (de Bakker et al., 2022). Med CRISPRi-seq kombineres et pooled CRISPRi-bibliotek med neste-generasjonssekvensering (NGS). *S. aureus* CRISPRi-biblioteket er altså en kultur som inneholder en pool av stammer som inneholder 1928 ulike sgRNAer. I et CRISPRi-bibliotek kan alle eller flere av genene i genomet til en bakteriestamme simultant nedreguleres og fordelingen mellom stammer med ulike sgRNAer vil endre seg ut fra hvilke gener som er viktige under ulike forhold. For å bestemme fordelingen av sgRNAer i kulturen, brukes Illuminasekvensering. Denne metoden kalles CRISPRi-sekvensering (CRISPRi-seq) (de Bakker et al., 2022). Illuminasekvensering er en neste-generasjonssekvenseringsteknologi videreutviklet fra første-generasjonssekvensering, Sangersekvensering (Park & Kim, 2016). Illumina er en av de ledende teknologiene innen NGS, hvor opp til 6 milliarder reads med en lengde på 150 bp kan genereres i en omgang. Med Illuminasekvensering kan mange millioner sekvenseringsreaksjoner parallelt sekvenseres, noe som gjør sekvenseringsteknikken godt egnet til sekvensering av et stort antall amplicons, som ble benyttet her.

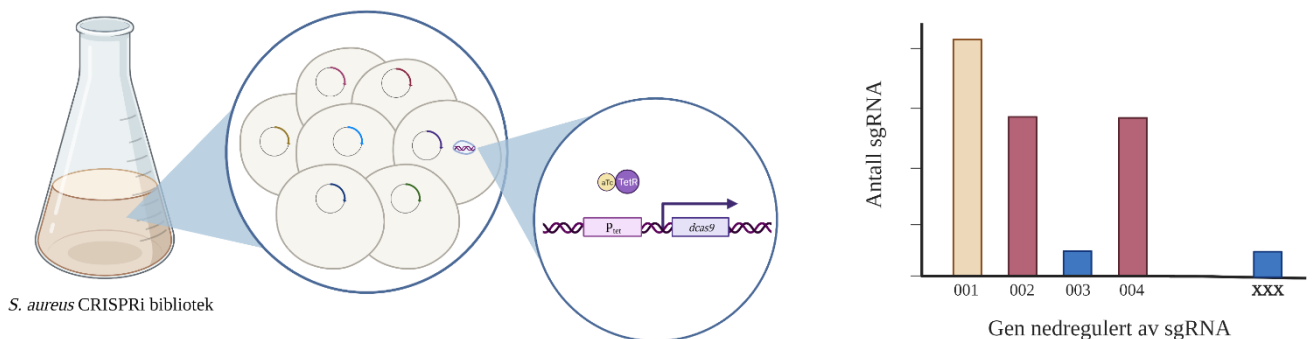
Ved genomskala CRISPRi-seq kan det altså undersøkes hvordan gener bidrar til bakteriens fitness under ulike vekstforhold, ved å bestemme hvor mye det er av hvert sgRNA (de Bakker et al., 2022). Mengden sgRNA finner man ved å utføre Illumina ampliconsekvensering av CRISPRi-bibliotekets sgRNAer for en kontrolltilstand og ønsket veksttilstand og sammenligne mengden av hvert sgRNA. Genenes fitness reflekteres i endringer i sgRNA mengde; er det redusert mengde sgRNA, tyder dette på at målgenet er essensielt for vekst. Er det derimot økt mengde eller ingen endring i mengde sgRNA, viser dette til gener som er kostbare eller nøytrale under gitte vekstforhold (figur 1.6). Med CRISPRi-seq kan dermed viktige gener for en veksttilstand undersøkes.

## Innledning

### A CRISPRi system er ikke aktivt under ønsket veksttilstand



### B CRISPRi system er aktivt under ønsket veksttilstand



**Figur 1.6 CRISPRi-sekvensering.** Illustrering av genes fitness etter at et CRISPRi-bibliotek er dyrket ved en ønsket veksttilstand med et A) ikke-aktivt CRISPRi-system (kontroll) og B) et aktivt CRISPRi-system. Røde barer viser nøytrale gener, brun bar viser kostbart gen og blå barer viser essensielle gener. Laget med BioRender.com.

## 1.5 Oppgavens mål

*S. aureus* er blant de hyppigste årsakene til mastitt hos melkekyr. Det overordnede målet med dette prosjektet er å studere hvilke genetiske faktorer hos *S. aureus* som er viktige for interaksjon med andre bakterier som er en del av jurmikrobiotaen. For å studere dette, er det ønsket å bruke et genomskala CRISPRi-bibliotek som allerede er tilgjengelig for *S. aureus*, og kokultivere dette med jurmikrobiotabakterier. Denne type forsøk har ikke blitt gjort tidligere, og metoden må derfor etableres. Delmålene i dette prosjektet var derfor:

- Undersøke om *S. aureus* CRISPRi-systemet er funksjonelt ved dyrking i melk.
- Finne fram til eksperimentelt oppsett for kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og jurmikrobiotastammer.
- Utføre initial CRISPRi-sekvensering for å studere interaksjoner mellom *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og utvalgte jurmikrobiotastammer.

## 2 Materialer

### 2.1 Plasmider

**Tabell 2.1** Liste over plasmider brukt i dette arbeidet med en kort beskrivelse av karakteristikkk.

Plasmid	Karakteristikk <sup>1</sup>	Kilde
pVL2336	<i>E. coli</i> og <i>S. aureus</i> plasmid vektor, <i>mcherry</i> , amp <sup>R</sup> og cam <sup>R</sup>	MolMik, ikke publisert
pVL2336-sgRNA(kontroll)	pVL2336, <i>mcherry::sgRNA(kontroll)</i> , ingen target	MolMik, ikke publisert
pVL2336-sgRNA( <i>pbp1</i> )	pVL2336, <i>mcherry::sgRNA(pbp1)</i> , sgRNA med <i>pbp1</i> som target	MolMik, ikke publisert
pFD116	Ptet <i>dcas9</i> term PpflB sgRNA oriT i pLZ12, amp <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Depardieu og Bikard (2020)
pFD116-mCherry-cat-bla	amp <sup>R</sup> , cam <sup>R</sup> og spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
pFD116-cat-bla	amp <sup>R</sup> , cam <sup>R</sup> og spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet

<sup>1</sup> amp<sup>R</sup>; ampicillinresistens, cam<sup>R</sup>; kloramfenikolresistens, spc<sup>R</sup>; spektinomycinresistens

### 2.2 Primere

**Tabell 2.2** Liste over primere benyttet i dette arbeidet.

Navn	Sekvens 5'-3'	Kilde
5R	TAACACATGCAAGTCGAACG	Invitrogen
11F	GGTTACCTTGTACGACTT	Invitrogen
mm64_seq_pFD116_R	GGAATCCTGCTCTGCGAGG	MolMik, ikke publisert
mk25_pCG248_R_check	AAATCTCGAAAATAATAGAGGGA	Stamsås et al. (2018)
mk26_pCG248_F_check	GGATAACCGTATTACCGCCT	Stamsås et al. (2018)
ip1_pFD116_ori_over_pVL_F	ATCAAGCAAAGTGACAGGCGACAACAAACATGCTA CAATTAG	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip2_pFD116_ori_over_pVL_R	CAGTAATATTAATATGTACACAATAATCCCTCCTCT CAATAAATC	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip3_pVL2336_F	TGTACATATTAATATTACTGAACAAAATGATATAT TTAAAC	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip4_pVL2336_R	CGCCTGTCACCTTGCTTG	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip5_mCherry_XbaI_F	GTGTCTTCTAGATCGTCGGCAGCGTCAGATG	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip6_mCherry_over_cat_R	CTTGATAATACCTAGGTGGGCGTCTCGTGGGCTCGG AGATG	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip7_cat_F	GCCCACCTAGGTATTATCAAG	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip8_cat_XbaI_F	GTGTCTTCTAGAGCCCACCTAGGTATTATCAAG	Dette arbeidet <sup>1</sup>
ip9_bla_BglIII_R	TGCTTCAGATCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACG	Dette arbeidet <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Primerdesign ble utført av Marita Torrissen Mårli (NMBU)

## 2.3 Stammer

Tabell 2.3 Liste over stammer benyttet i dette arbeidet med en kort beskrivelse av genotype og karakteristikk.

Stamme	Genotype og karakteristikk <sup>1</sup>	Kilde
<i>Aerococcus viridans</i>		
MM275	B1-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM276	B102-4, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
<i>Corynebacterium amycolatum</i>		
MM287	BO186-2, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM288	BO422-4, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
<i>Enterococcus faecalis</i>		
MM281	B37-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM282	B199-2, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
<i>E. coli</i>		
DC10B	DH10B, <i>Δdcm</i>	Monk et al. (2012)
IM08B	DC10B, <i>Δdcm, hsdMS</i>	Monk et al. (2015)
IP5	IM08B, pVL2336, amp <sup>R</sup> , cam <sup>R</sup>	Dette arbeidet
IP6	DC10B, pVL2336, amp <sup>R</sup> , cam <sup>R</sup>	Dette arbeidet
IP7	IM08B, pFD116-mCherry-cat-bla, cam <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
IP8	IM08B, pFD116-cat-bla, cam <sup>R</sup> , amp <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
Stab13	HB101, <i>F<sub>mcrB</sub> mrrhsdS20(τ<sub>B</sub>, m<sub>B</sub>) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str<sup>R</sup>) xyl-5 λ-leumtl-1</i>	ThermoFisher Scientific
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
MM283	B46-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM284	B404-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
<i>S. aureus</i>		
NCTC8325-4	NCTC8325	Novick (1967)
MM267LG	NCTC8325-4, tetR_Ptet_dCas9, tetM, pVL2336-sgRNA, cam <sup>R</sup>	MolMik, ikke publisert
MM268	NCTC8325-4, tetR_Ptet_dCas9, tetM, pVL2336-sgRNA(kontroll), cam <sup>R</sup>	MolMik, ikke publisert
MM269	NCTC8325-4, tetR_Ptet_dCas9, tetM, pVL2336-sgRNA( <i>pbp1</i> ), cam <sup>R</sup>	MolMik, ikke publisert
<i>S. chromogenes</i>		
MM279	B221-2, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM280	B23-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
IP13	B221-2, pFD116-mCherry-cat-bla, cam <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
IP15	B221-2, pFD116-cat-bla, cam <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
<i>S. epidermidis</i>		
MM277	B28-2, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM278	BO92-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
IP9	B28-2, pFD116-mCherry-cat-bla, cam <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
IP11	B28-2, pFD116-cat-bla, cam <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
<i>S. dysgalactiae</i>		
MM256	Stdys015-MB3-33-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM257	Stdys047-01-2245-17, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
IP17	Stdys015-MB3-33-1, pFD116-mCherry-cat-bla, cam <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
IP26	Stdys015-MB3-33-1, pFD116-cat-bla, cam <sup>R</sup> , spc <sup>R</sup>	Dette arbeidet
<i>S. uberis</i>		
MM285	BO249-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU
MM286	B94-1, isolert fra melk fra friske kyr	D. Porcellato, NMBU

<sup>1</sup> amp<sup>R</sup>; ampicillinresistens, cam<sup>R</sup>; kloramfenikolresistens, spc<sup>R</sup>; spektinomycinresistens



## Materialer

### 2.4 Enzymer og kjemikalier

**Tabell 2.4** Liste over enzymer og kjemikalier benyttet i dette arbeidet.

Forbindelse	Kjemisk formel	Produktnummer	Leverandør
1 kb DNA ladder		D0428	New England BioLabs
Agarose		15510-027	Invitrogen
Agarpulver		20767.298	VWR International
Ampicillin	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	A-9518	Sigma-Aldrich
Anhydrotetrasyklin	$C_{22}H_{22}N_2O_7$	37919	Sigma-Aldrich
Bacto™ Yeast Extract		212750	BD Diagnostics
BglIII		R0144S	New England BioLabs
Brain Heart Infusion		CM1135	Oxoid
dNTP		B8101R	TaKaRa
Etanol 96 %	$C_2H_5OH$	20824.365	VWR chemicals
Glasskuler		G4649	Sigma-Aldrich
Glyserol 85%	$C_3H_8O_3$	1.04094.1000	Merck
Kloramfenikol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	C0378	Sigma-Aldrich
KpnI-HF™		R3142S	New England BioLabs
Lysostaphin		L9043	Sigma-Aldrich
Lysozym		L2979	Sigma-Aldrich
Natriumklorid	NaCl	27810	VWR LIFE SCIENCE
NcoI-HF		R3193L	New England BioLabs
peqGreen		PEQL37-501	Saveen Werner
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase		M0530	New England BioLabs
QuickCip		M0525S	New England BioLabs
SaII-HF		R3138L	New England BioLabs
Spektinomycin (dihydroklorid pentahydrat)	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl \cdot 5H_2O$	S9007	Sigma-Aldrich
Sukrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	84100	Sigma-Aldrich
T4 DNA ligase		M0202L	New England BioLabs
Trypton		LP0042	Oxoid
XbaI		R0145S	New England BioLabs
XhoI		R0146L	New England BioLabs

## Materialer

### 2.5 Kits, instrumenter og utstyr

**Tabell 2.5** Liste over kits, instrumenter og utstyr som er benyttet i dette arbeidet.

<b>Kit/instrument/utstyr</b>	<b>Produktnummer/modell</b>	<b>Leverandør</b>
96-brønn polystyren mikrotiterplater	82.1581.001	Sarstedt
Celleknuser	FastPrep®-24	MP™ Biomedicals
Elektroforesekar	Mini-Sub Cell® GT	BioRad
Elektroforesemaskin	POWER PAC 200	BioRad
Elektroporeringsapparat del 1	Gene Pulser	BioRad
Elektroporeringsapparat del 2	PULSE CONTROLLER	BioRad
E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I	D6943-02	Omega Bio-Tek
Gel-imager	GelDoc-1000	BioRad
Mikrotiterplateleser	FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH
Mikrotiterplateleser	Hidex Sense	Hidex
Mikrotiterplateleser	Synergy H1 Hybrid Reader	BioTek®
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	740609.250	Machnery-Nagel
PCR-maskin	2720 Thermal cycler	Applied Biosystems
PCR-maskin	ProFlex PCR systems	Applied Biosystems
QIAGEN Plasmid Mini, Midi and Maxi kits	12143 og 12145	QIAGEN
Spektrofotometer	NanoDrop 2000	Thermo-Fisher Scientific

### 2.6 Vekstmedier, buffere og løsninger

**Tabell 2.6** Liste over ferdiglagde vekstmedier, buffere og løsninger benyttet i dette arbeidet.

<b>Forbindelse</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Leverandør</b>
5x Phusion HF reaction buffer	B0518S	New England BioLabs
10x NEBuffer 3.1	B7203S	New England BioLabs
10x T4 DNA ligase buffer	B0202A	New England BioLabs
Citratvann		
CutSmart Buffer	B7204S	New England BioLabs
UHT-melk	TF3165U2201.08860.0040	TINE
Loadingbuffer lilla (6x)	B7025S	New England BioLabs
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	M5520AA	New England BioLabs
Red Taq 2x MasterMix	20F2202	VWR LIFE SCIENCE

## Materialer

### **Brain Heart Infusion (BHI) medium**

BHI medium ble laget ved å løse opp 37 g BHI-pulver i 1L dH<sub>2</sub>O og ble deretter sterilisert ved autoklaving.

### **Lysogeny broth (LB) medium**

LB medium ble laget ved å løse opp 10 g NaCl, 10 g trypton og 5 g gjærekstrakt i en 1L dH<sub>2</sub>O og ble deretter sterilisert ved autoklaving.

### **Lysogeny broth (LB) medium med 1 % glukose**

LB medium ble laget ved å løse opp 10 g NaCl, 10 g trypton og 5 g gjærekstrakt i en 1L dH<sub>2</sub>O og ble deretter sterilisert ved autoklaving. LB medium med 1 % glukose ble laget ved å blande 50 ml LB medium med 1,25 ml autoklavert 40 % glukose.

### **Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium**

SOC medium lages ved å løse opp 2 g trypton, 0,5 g gjærekstrakt, 333,3 µl 3M NaCl og 83,3 µl 3M KCl i 96 ml dH<sub>2</sub>O og steriliseres ved autoklaving. 2 ml 1M MgCl<sub>2</sub> og 1 ml 2M glukose blir sterilisert ved sterilfiltrering gjennom et 0,20 µm filter før de steriliserte løsningene blir settes sammen.

### **Tryptic Soy Broth (TSB) medium med 0,5 M sukrose**

TSB medium lages ved å løse opp 30 g TSB pulver i 1L dH<sub>2</sub>O og steriliseres ved autoklaving. TSB medium med 0,5 M sukrose lages ved å blande 50 % 2x TSB medium og 50 % 2x 1 M sukrose.

### **Kloramfenikol-stock (10 mg/ml)**

Kloramfenikol-stock ble laget ved å løse opp 100 mg kloramfenikolpulver i 10 ml 70 % etanol for deretter å bli sterilisert ved sterilfiltrering gjennom et 0,20 µm filter.

### **Ampicillin-stock (100 mg/ml)**

Ampicillin-stock ble laget ved å løse opp 500 mg ampicillinpulver i 5 ml dH<sub>2</sub>O for deretter å bli sterilisert ved sterilfiltrering gjennom et 0,20 µm filter.

### **Spektinomycin-stock (100 mg/ml)**

Spektinomycin-stock ble laget ved å løse opp 500 mg spektinomycinpulver i 5 ml dH<sub>2</sub>O for deretter å bli sterilisert ved sterilfiltrering gjennom et 0,20 µm filter.

### **Agarskåler**

Agarskåler med vekstmedium og antibiotika ble laget ved å tilsette 15 g agarpulver til vekstmediene før tilsetning av 1L dH<sub>2</sub>O og autoklaving. Vekstmediene ble kjølt ned i et 55 °C vannbad og deretter tilsatt antibiotika når dette var nødvendig. BHI og TSB agar ble tilsatt kloramfenikol (sluttkonsentrasjon 5 µg/ml eller 10 µg/ml) eller spektinomycin (sluttkonsentrasjon 100 µg/ml) og LB agar ble tilsatt ampicillin (sluttkonsentrasjon 100 µg/ml) eller spektinomycin (sluttkonsentrasjon 60 µg/ml). BHI- og LB agar ble helt i petriskåler, satt til å tørke og lagret ved 4 °C.

## Materialer

### **10 % glyserol**

10 % glyserol ble laget ved å blande 60 ml autoklavert 85 % glyserol med 440 ml autoklavert dH<sub>2</sub>O.

### **1 M sukrose**

1 M sukrose ble laget ved å løse opp 172 g sukrose med dH<sub>2</sub>O til et volum på 500 ml og ble deretter sterilisert ved autoklaving.

### **10 % glyserol med 0,5 M sukrose**

10 % glyserol med 0,5 M sukrose ble laget ved å blande 25 ml autoklavert 10 % glyserol med 25 ml autoklavert 1 M sukrose.

### **Staphylococcus lysis buffer (40 mM NaOH, 0,2 % SDS)**

Staphylococcus lysis buffer lages ved å blande 667 µl 3M NaOH med 1 ml 10 % SDS og 48,33 ml dH<sub>2</sub>O.

### **1 % agarose gel**

1 % agarose gel ble laget ved å blande 0,5 g agarose i 50 ml TAE buffer og koke dette i mikrobølgeovn til agarosen var fullstendig oppløst, deretter ble 1 µl peqGreen tilsatt.

### **50x Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer**

TAE buffer lages ved å blande 424 g Tris base, 57,1 ml eddiksyre og 100 ml 0,5M EDTA (pH 8.0) og justeres til 1L med dH<sub>2</sub>O.

## 3 Metoder

### 3.1 Dyrking og lagring av *E. coli*, *S. aureus* og jurisolater

Eksperimenter ble utført på stammene, *A. viridans*, *C. amycolatum*, *E. faecalis*, *P. pentosaceus*, *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. dysgalactiae* og *S. uberis* (tabell 2.3). *E. coli* DC10B og IM08B ble brukt til kloning. *E. coli* stammer ble dyrket i lysogeny broth (LB) medium, på lysogeny broth agar (LA) eller på tryptic soy broth agar (TSA) med ampicillin (100 µg/ml), spektinomycin (60 µg/ml) eller kloramfenikol (10 µg/ml) for seleksjon. *S. aureus* og jurisolatene ble dyrket i brain heart infusion (BHI) medium. *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae* ble i tillegg dyrket på BHI agar, tilsatt enten kloramfenikol (10 µg/ml eller 5 µg/ml) eller spektinomycin (100 µg/ml) for seleksjon. *S. aureus* og *S. dysgalactiae* ble også dyrket i UHT-melk (uten risting) med kloramfenikol (10 µg/ml eller 5 µg/ml) for seleksjon. *E. coli*, *S. aureus*, *S. chromogenes* og *S. epidermidis* ble dyrket med risting (200 rpm) i flytende medium, mens *A. viridans*, *C. amycolatum*, *E. faecalis*, *P. pentosaceus*, *S. dysgalactiae* og *S. uberis* ikke ble ristet. Alle bakteriestammene ble dyrket ved 37°C.

Startkulturer ble laget for *S. aureus* og *S. dysgalactiae* ved å fortynne overnattkulturer 1:50 (100 µl overnattkultur til 5 ml BHI med kloramfenikol), og kulturen ble deretter dyrket til OD<sub>600</sub> = 0,8. For langtidslagring av kulturer og startkulturer ble frysestock laget ved å tilsette glyserol til en sluttkonsentrasjon på ca. 15 %. Frysestockene ble deretter lagret ved -80°C.

### 3.2 DNA- og plasmidisolering

#### 3.2.1 Miniprep plasmidisolering

Plasmider ble isolert med E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I ved å følge protokollen beskrevet av produsenten (Omega Bio-Tek). Miniprep-protokollen ble brukt for isolering av plasmider fra *E. coli* og *S. aureus*. For plasmidisolering fra *E. coli*, ble celler fra 1-5 ml overnattkultur høstet ved sentrifugering (10 000 x g, 1 min). Cellepelletten ble resuspendert i 250 µl buffer I, som inneholder RNase A som degraderer RNA. Lysering av celler ble utført ved å tilsette 250 µl av buffer II, som er en alkalisk lysis buffer. Eppendorfrøret ble her forsiktig vendt opp og ned flere ganger for å få et klart lysat. For å nøytralisere sur pH, ble 350 µl buffer III tilsatt og eppendorfrøret ble raskt vendt opp og ned flere ganger for utfelling av kromosomalt DNA og proteiner. Deretter ble løsningen sentrifugert (13 000 x g, 10 min), hvor pellet inneholdt kromosomalt DNA og proteiner og supernatant inneholdt plasmid DNA etter sentrifugering. Supernatanten ble så overført til en ekvilibrert HiBind DNA mini kolonne i et oppsamlingsrør, sentrifugert (13 000 x g, 1 min) og filtrat fjernet. For at plasmid DNA skulle binde silikakolonnen ble 500 µl HBC buffer med isopropanol tilsatt, løsningen sentrifugert (13 000 x g, 1 min) og filtrat fjernet. Videre ble 700 µl DNA vaskebuffer med etanol tilsatt for å vaske vekk kontaminasjoner, løsning sentrifugert (13 000 x g, 30 sek) og filtrat fjernet. For å fjerne alle etanolrester ble tom kolonne

## Metoder

sentrifugert (13 000 x g, 2 min) og videre overført til et nytt eppendorfrør. Til slutt ble 30-100 µl elueringsbuffer eller steril dH<sub>2</sub>O tilsatt kolonna og løsningen sentrifugert (13 000 x g, 1 min). Isolert plasmid i eppendorfrør ble lagret ved -20 °C.

For isolering av plasmid fra *S. aureus* dyrket i melk, ble celler høstet fra 5 ml prøver. Prøvene ble tint (om nødvendig), sentrifugert (8000 rpm, 4 °C, 10 min) og supernatanten deretter fjernet. For å vaske vekk komponenter fra melken ble pellet løst i citratvann i to omganger. Først ble pelleten resuspendert i 5 ml citratvann, sentrifugert (8000 rpm, 4 °C, 5 min) og supernatant fjernet. Deretter ble pellet resuspendert i 1 ml citratvann, overført til 1,5 ml eppendorfrør, sentrifugert (13 000 x g, 3 min) og supernatant fjernet. *S. aureus* er Gram-positiv og har dermed et tykt lag med peptidoglykan i celleveggen, noe som gjør den vanskelig å lysere. *S. aureus* er resistent mot lysozym, som nettopp mange bakterieisolasjonsteknikker bruker for lysering (Bera et al., 2007; Huff & Silverman, 1968). For å bryte ned celleveggen til *S. aureus* ble derfor høstede celler resuspendert i 250 µl buffer I, 1 µl lysostaphin (10 mg/ml) og 2 µl lysozym (100mg/ml) og deretter inkubert i 37 °C i 30 minutter. For videre isolering av plasmid ble miniprep-protokollen, som er beskrevet over, brukt.

### 3.2.2 Midiprep plasmidisolering

Isolering av plasmider med QIAGEN Midiprep ble utført av Zhian Salehian (NMBU) som beskrevet i protokollen til produsenten (QIAGEN, 2005). Midiprep-protokollen ble brukt for plasmidisolering fra *E. coli* i de tilfellene hvor isolering med vanlig miniprep ikke gav høye nok konsentrasjoner av plasmidet. Renset plasmid ble lagret ved -20°C.

### 3.2.3 Fastprep genomisk DNA-isolering

Genomisk DNA-isolering fra jurisolater (tabell 2.3) ble utført med FastPrep-24 (MP Biomedicals) kombinert med miniprep. For alle jurisolater ble pelleten fra sentrifugering (13 000 x g, 1 min) av en 1-5 ml overnattekultur, løst i 250 µl buffer I og overført til fastprep-rør med 0,5 g glasskuler (<106 nm). Løsningen ble så fastpreppet (4 m/s, 3x 20 sek), hvor celler lyses og DNA fragmenteres. 100 µl lysat og 150 µl buffer I ble overført til et eppendorfrør. Miniprep-protokollen (beskrevet i kapittel 3.2.1) ble videre brukt for de resterende stegene i DNA-isoleringsprosessen.

## 3.3 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode som brukes til å amplifisere et høyt antall spesifikke DNA-fragmenter fra en DNA-sekvens (Lorenz, 2012; Persing, 1991). En PCR gjennomgår repeterende sykluser av DNA syntese *in vitro*, og inkluderer stegene denaturering, hybridisering og elongering. Hver syklus repeteres 25-30 ganger, hvor antallet DNA-fragmenter omtrent dobles for hver syklus. Komponentene som må være til stede for å utføre en PCR er DNA-templat, primere, DNA-polymerase og deoxynukleotid trifosfatene (dNTP), dATP, dTTP, dGTP og dCTP (Lorenz, 2012). Målsekvensen som

## Metoder

amplifiseres ligger i DNA-templatet, primere binder seg til hver ende av målsekvensen og fungerer som startsekvenser til DNA polymerase, som binder sammen nukleotidene til PCR-produktet.

Det første steget i en PCR er denaturering, hvor dobbeltrådet DNA (dsDNA) separeres til to enkelttrådede DNA (ssDNA). Her brytes hydrogenbindingene som holder DNA-trådene sammen ved å varme PCR-løsningen opp til 94-98 °C, som ligger over smeltepunktet ( $T_M$ ) til dsDNA (Garibyan & Avashia, 2013; Lorenz, 2012). Videre følger hybridiseringen, hvor primerne binder seg til de komplementære sekvensene på ssDNA. Temperaturen og tiden som må til for hybridisering av primere avhenger av  $T_M$  til primerne som igjen er avhengig av primernes GC-innhold og lengde (Ramesh et al., 1992). Under hybridisering ligger temperaturen ofte mellom 40-65 °C, hvor primerne brukt i denne oppgaven har en  $T_M$  på 58-60 °C. I det siste steget, elongering, forlenger DNA polymerasen primerne ved å binde fri dNTP på DNAet fra den frie 3'OH-enden av primerne. Temperaturen og tiden til elongering avhenger av DNA polymerasen, hvor elongeringsfasen normalt har en temperatur på 70-80 °C (Lorenz, 2012). Det nylig syntetiserte DNAet etter elongering blir så brukt som templat i neste syklus, noe som fører til en eksponentiell akkumulering av DNA (Ramesh et al., 1992).

I dette arbeidet ble to ulike DNA polymeraser brukt, Phusion High-Fidelity (HF) (New England BioLabs) og RedTaq (VWR LIFE SCIENCE). Phusion HF polymerase har høyere proofreadingaktivitet enn RedTaq polymerase og produserer derfor mer presise PCR-produkter med høy hastighet, hvor en amplifisering av 1000 basepar skjer på omtrent 30 sekunder (Lahr & Katz, 2009). RedTaq polymerase produserer derimot mindre presise PCR-produkter og har en lavere amplifiseringshastighet (1000bp/min) (VWR LIFE SCIENCE, 2017). RedTaq polymerase ble derfor brukt i PCR-screening, hvor presisjonen av PCR-produktet er mindre viktig, mens Phusion HF polymerase ble brukt i kloningsforsøk (se kapittel 3.9 for detaljer om kloningene).

For PCR ved bruk av Phusion HF polymerase ble en reaksjonsmiks bestående av polymerasen, plasmid, dNTP, primere, en 5x Phusion HF buffer og dH<sub>2</sub>O laget på is. Volum og sluttkonsentrasjoner for hver reagent er listet opp i tabell 3.1 (plasmider som ble brukt er listet opp i tabell 2.1 og primere i tabell 2.2).

**Tabell 3.1** Reagenser for Phusion High Fidelity PCR.

Reagens	Volum/reaksjon	Sluttkonsentrasjon
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl	1,0 U/50 µl PCR
Plasmid	1 µl	< 250 ng
dNTP (10 mM)	1 µl	200 µM
Foroverprimer (10 µM)	2,5 µl <sup>1</sup>	0,5 µM
Reversprimer (10 µM)	2,5 µl <sup>2</sup>	0,5 µM
5x Phusion High-Fidelity buffer	10 µl	1x
dH <sub>2</sub> O	til et totalvolum på 50 µl	

<sup>1,2</sup> Det ble tilsatt 1 µl forover- og reversprimer under kloning av pVL2336-pFD116(ori) og ved skjøting av mCherry med cat-bla (se kapittel 3.9 for detaljer).

## Metoder

PCR-programmet ble justert etter lengden på målsekvensen på DNA-templatet, effektiviteten til DNA polymerasen og  $T_M$  til primerne. Standardprogrammet for Phusion HF PCR brukt er listet i tabell 3.2.

**Tabell 3.2** Standardprogram for Phusion High Fidelity PCR

Steg	Temperatur	Tid	Sykluser
Initiell denaturering	98°C	5-10 min	1x
Denaturering	98°C	30 sek	
Annealing	45-72°C <sup>1</sup>	30 sek	25-30x
Elongering	72°C	30 sek/kb	
Utfylling av ender	72°C	5-10 min	1x
Lagring	4°C	∞	

<sup>1</sup> Annealingstemperaturen ble justert etter  $T_M$  for primerne. Primerne brukt i dette arbeidet hadde en  $T_M$  på 58-60°C.

### 3.3.1 PCR screening

RedTaq DNA polymerase PCR ble brukt for screening og amplifisering av 16S rRNA-sekvenser hos jurisolater, for screening etter mulige transformanter i *E. coli*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae* og for screening av *S. aureus* CRISPRi-transformanter. Primerne som ble benyttet var designet for å spesifikt amplifisere ønskede fragmenter.

For RedTaq polymerase PCR av jurisolater, ble først DNA fra stammer isolert med fastprep genomisk DNA isolering (kapittel 3.2.3). Red Taq 2x MasterMix, primere og dH<sub>2</sub>O ble deretter tilsatt rør med DNA (se tabell 3.3 for volum tilsatt av hver komponent). Red Taq 2x MasterMix består av buffer, dNTP, Taq DNA polymerase, et rødt fargestoff og en stabilisator (VWR LIFE SCIENCE, 2017). PCR-programmet brukt for RedTaq polymerase er likt som for Phusion HF polymerase med unntak av at denatureringsstegene ble satt til en temperatur på 94 °C og elongeringstegene ble satt til 1 minutt per kilobase, da RedTaq polymerasen er noe mindre termostabil og har en lavere amplifiseringshastighet.

For PCR screening av *E. coli*-transformanter, ble først kolonier lysert ved å plukke kolonier, resuspendere de i 10 µl dH<sub>2</sub>O og koke løsningen i mikrobølgeovnen (maksimal effekt, 2 min). Videre ble lysatet kjølt ned på is i 5 minutter for deretter å tilsette reagenser (tabell 3.3) og følge programmet beskrevet i tabell 3.2.

For *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae* PCR screening, ble celler lysert ved å plukke en koloni eller tilsette 2-4 µl overnattkultur i 30 µl Staphylococcus lysis buffer. Blandingen ble så inkubert ved 95 °C i 5 minutter, kjølt ned på is i 5 minutter og fortynnet med 200 µl dH<sub>2</sub>O. 2-4 µl av lysatet sammen reagensene listet opp i tabell 3.3 ble blandet før PCR-programmet for RedTaq polymerase ble benyttet.



## Metoder

**Tabell 3.3** Reagenser for Red*Taq* polymerase PCR

Reagens	Volum/reaksjon	Sluttkonsentrasjon
Red Taq 2x MasterMix <sup>1</sup>	25 µl <sup>3</sup>	1x
Foroverprimer (10 µM)	1 µl <sup>4</sup>	0,2 µM
Reversprimer (10 µM)	1 µl <sup>5</sup>	0,2 µM
DNA-templat <sup>2</sup>	2-4 µl	< 500 ng
dH <sub>2</sub> O	til et sluttvolum på 50 µl <sup>6</sup>	

<sup>1</sup> Red Taq 2x MasterMix består av buffer, dNTP, *Taq* DNA polymerase, fargestoff og stabilisator (VWR LIFE SCIENCE, 2017).

<sup>2</sup> DNA-templat; Plasmider (kapittel 2.1) eller genomisk DNA

<sup>3, 4, 5, 6</sup> Det ble tilsatt 5 µl Red Taq 2x MasterMix, 0,2 µl forover- og reversprimer og dH<sub>2</sub>O til et sluttvolum på 10 µl for screening av *E. coli*, *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae*.

### 3.3.2 Overlapp PCR

Overlapp PCR baserer seg på standard PCR (kapittel 3.3) og brukes til å skjøte sammen DNA-sekvenser til større fragmenter (Lu et al., 2018). I en overlapp PCR må fragmentene som skal skjøtes sammen ha overlappende 3'-ender (Horton, 1995). Overlappende 3'-ender oppnås ved å bruke primere med overheng i 5'-enden, som er komplementær til 3'-enden til det andre fragmentet. Overlapp PCR består av to steg; i det første steget amplifiseres DNA-fragmentene som skal skjøtes sammen og i det siste steget skjøtes de amplifiserte fragmentene sammen ved hjelp av primere og overlappende sekvenser. I dette arbeidet ble overlapp PCR sammen med restriksjonskutting og ligering (kapittel 3.4) brukt til å konstruere et kloramfenikolresistent plasmid, pFD116-mCherry-cat-bla (se kapittel 3.9 for detaljer).

### 3.4 Restriksjonskutting og ligering

Ved restriksjonskutting og ligering utnyttet restriksjonsenzymene til å kutte DNA og DNA ligase til å lime sammen de kuttete DNA-fragmentene til kloning av nye plasmider. Restriksjonsenzymene kutter spesifikke dsDNA sekvenser, som resulterer i komplementære blunt -eller sticky ender (Di Felice et al., 2019). To kloramfenikolresistente plasmider, pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla, ble konstruert ved denne metoden (se kapittel 3.9 for mer detaljer). Restriksjonskutting ble også brukt til å utføre restriksjonsanalyse av disse klonede plasmidene.

Restriksjonsreaksjonene (tabell 3.4) ble inkubert ved 37 °C i 2 timer. For restriksjonskuttingen av pFD116 (se kapittel 3.9) ble 1 µl QuickCip (New England BioLabs) tilsatt etter 1,5 timer inkubering. Cip er en alkalisk fosfatase som hindrer at vektor, uten insert, religeres ved å defosforilere DNAet (Gilpatrick et al., 2020). Fragmenter fra restriksjonsreaksjonene ble separert ved agarosegelelektroforese (kapittel 3.5.) og ønskede fragmenter ble rensset fra gel (kapittel 3.6.2) eller på kolonne (kapittel 3.6.1).

## Metoder

**Tabell 3.4** Reagenser for restriksjonskutting av mCherry-cat-bla, cat-bla og pFD116

Reagens	Volum/reaksjon
DNA <sup>1</sup>	6-25 $\mu\text{l}^2$
10x NEBuffer 3.1	3 $\mu\text{l}$
BglII	1 $\mu\text{l}$
XbaI	1 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	til et sluttvolum på 30 $\mu\text{l}$

<sup>1</sup> DNA; plasmider eller PCR-fragmenter

<sup>2</sup> Det ble tilsatt 25  $\mu\text{l}$  mCherry-cat-bla (3,3 ng/ $\mu\text{l}$ ), 20  $\mu\text{l}$  cat-bla (22,5 ng/ $\mu\text{l}$ ) og 6  $\mu\text{l}$  pFD116 (133 ng/ $\mu\text{l}$ ).

Restriksjonskuttet insert og vektor ble deretter satt sammen ved å danne fosfodiesterbindinger mellom 5' fosfat og 3' hydroksyl ender (Di Felice et al., 2019). Denne reaksjonen katalyseres av T4 ligase. Ligeringsreaksjonen består av 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA ligase, 20  $\mu\text{l}$  insert, 2,5  $\mu\text{l}$  vektor og 2,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA ligase buffer og denne blandingen ble inkubert ved 16 °C overnatt. Ligeringsreaksjonene ble deretter lagret ved -20 °C eller direkte transformert inn i ønsket vert.

For restriksjonsanalyse av plasmidene, pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla, ble reaksjonene fra tabell 3.5 inkubert i 2 timer ved 37°C og analysert ved gelelektroforese (kapittel 3.5).

**Tabell 3.5** Reagenser for restriksjonsanalyse av pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla

Reagens	Volum
Plasmid	3 $\mu\text{l}$
Cutsmart	2 $\mu\text{l}$
XhoI <sup>1</sup>	1 $\mu\text{l}$
XbaI <sup>2</sup>	1 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	Til et sluttvolum på 20 $\mu\text{l}$

<sup>1,2</sup> Restriksjonsenzymene NcoI og KpnI ble brukt for restriksjonsanalyse av pFD116-mCherry-cat-bla.

### 3.5 Agarosegelelektroforese

Ved agarosegelelektroforese blir DNA-fragmenter med ulike størrelser separert (Lee et al., 2012). En agarosegelelektroforese består av en agarosegel plassert i et elektroforesekar, som er koblet til en spenningskilde, fylt med en buffer med god ledningsevne. Selve agarosegelen inneholder et nettverk av agarosepolymerer som stabiliseres av hydrogenbånd. Dette nettverket inneholder små porer som muliggjør transport av DNA-molekyler. Porestørrelsen til nettverket er avhengig av agarosekonsentrasjonen, hvor høy konsentrasjon gir mindre porestørrelse (Lee et al., 2012). Prøvene, som inneholder DNA, blir applisert i små brønner i på gelen. DNA, som inneholder negativt ladede fosfatgrupper, er negativt ladet ved nøytral pH. Med elektrisk spenning i karet vil de negativt ladede DNA-fragmentene bevege seg gjennom agarosegelen mot den positivt ladde anoden. Her vil mindre molekyler bevege seg raskere gjennom gelen enn store molekyler, og separering av DNA-fragmenter kan

## Metoder

dermed utføres basert på størrelse (Lee et al., 2012). *peqGreen*, et fluorescerende molekyl som binder og synliggjør DNA under UV-lys, blir tilsatt i gelen for å visualisere DNA.

I dette arbeidet ble agarosegelelektroforese brukt for analyse av plasmider og genomisk DNA (gDNA). 1 % Agarosegel (kapittel 2.6) ble helt i en klargjort gelramme med kammer, som danner brønnene til DNA applisering, og satt til å stivne. Kammene ble forsiktig tatt ut av stivnet gel og gelen flyttet til et elektroforesekar (BioRad), hvor gelen ble dekket med TAE-buffer. Videre ble prøver og ladder applisert i brønner. Ladder, som inneholder DNA-fragmenter av kjent størrelse, ble tilsatt for å bestemme størrelse på DNA-fragmenter i de andre prøvene. For å applisere og visualisere prøvene på gelen inneholdt reaksjonsmiksen for RedTaq PCR et rødt fargestoff og en stabilisator (VWR LIFE SCIENCE, 2017). Phusion PCR-produkter inneholdt derimot ikke disse stoffene og 3 µl loadingbuffer ble derfor tilsatt før applisering til brønnene for disse produktene. Videre ble gelelektroforese utført ved 90 V i 20-40 minutter. Etter at DNA-fragmenter var tilstrekkelig separert, ble de visualisert under UV-lys i GelDoc-1000 (BioRad).

### 3.6 DNA- og plasmidrensing

#### 3.6.1 Rensing av DNA og plasmid etter PCR-screening og restriksjonskutting

Rensing av DNA etter PCR screening og rensing av restriksjonskuttete plasmider ble gjort med et NucleoSpin Gel og PCR Clean up kit, hvor produsentens protokoll ble benyttet (Machery-Nagel). Et volum prøve, som inneholder DNA, ble blandet med to volum av buffer NT1. Videre ble opp til 700 µl av løsningen overført til en Nucleospin Gel og PCR Clean up kolonne, sentrifugert (11 000 x g, 30 sek) og filtrat dekantert av. I dette steget bidrar chaotropiske salter i buffer NT1 til at DNA binder seg til silikamembranen i kolonnen. For å vaske vekk kontaminasjoner ble kolonnen tilsatt 700 µl NT3 buffer, sentrifugert (11 000 x g, 30 sek) og filtrat dekantert av. En tørr kolonne ble så sentrifugert (11 000 x g, 1 min) for å fjerne alle rester av NT3 bufferen. For eluering ble kolonnen overført til et nytt eppendorfrør, 15-30 µl NE buffer tilsatt og kolonne sentrifugert (11 000 x g, 1 min) etter inkubasjon i romtemperatur i 1 minutt. Renset DNA ble lagret ved -20 °C.

#### 3.6.2 Rensing av DNA og plasmid fra agarosegel etter PCR og restriksjonskutting

Rensing av PCR-produkter og restriksjonskuttete plasmider fra agarosegel ble gjort med NucleoSpin Gel og PCR Clean up kit og produsentens protokoll ble benyttet (Machery-Nagel). Ønsket DNA-fragment ble kuttet ut av agarosegelen med en steril skalpell og satt i NT1 buffer, hvor 200 µl buffer ble tilsatt for hver 100 mg agarosegel. Løsningen ble inkubert på 55 °C vannbad i 5-10 minutter og vortexet hvert 2-3 minutt for å løse opp gelen. Etter at gelen var fullstendig løst opp ble videre steg utført slik som beskrevet i kapittel 3.6.1.

### 3.7 Transformasjon

#### 3.7.1 Transformasjon i *E. coli*

CaCl<sub>2</sub> varmesjokktransformasjon ble brukt til å sette inn fremmed DNA i *E. coli*. Funksjonen til Ca<sup>2+</sup> er mulig å legge til rette for at ukjent DNA kan binde seg til celleoverflaten. Behandling med kalsium har også vist seg å forstyrre membranen. Ved varmesjokk åpnes porer i cellemembranen. Kombinasjonen av CaCl<sub>2</sub> og varmesjokk fører dermed til at festet DNA på overflaten kan entre cellen (Chang et al., 2017; Liu et al., 2006; Sambrook & Russell, 2006).

Kjemisk kompetente *E. coli* IM08B og DC10B ble laget ved å fortynde 5 ml overnattkultur i LB medium, i en erlenmeyerkolbe, til OD = 0,05. Videre ble kulturen dyrket til OD<sub>600</sub> = 0,4, celler høstet ved sentrifugering (6000 rpm, 4°C, 5 min) og supernatant fjernet. Resten av stegene i prosedyren ble utført ved 4°C. Pelleten ble resuspendert i halve kulturvolumet av 0,1M iskald CaCl<sub>2</sub> og inkubert på is i 1-2 timer. Videre ble celler sentrifugert (4000 rpm, 4°C, 5 min), supernatant fjernet og pelleten resuspendert i 1/10 kulturvolum 0,1M CaCl<sub>2</sub>. Kompetente celler ble så tilsatt iskald, steril glyserol til en sluttkonsentrasjon på ca. 15 %, alikvotert i eppendorfrør og lagret ved -80°C.

For transformasjon i *E. coli* IM08B og DC10B ble 50 µl kompetente celler av stammen tint på is, blandet med 2-10 µl plasmid og inkubert på is i 30 minutter. Videre ble cellene utsatt for varmesjokk ved 42°C i 30 sekunder og kjølt ned på is i 2-5 minutter. Deretter ble 250 µl SOC medium eller LB med 1% glukose tilsatt og cellene inkubert ved 37°C i en time. Til slutt ble 50 µl og 200 µl av cellene platet ut på LB agar med ampicillin (100 µg/ml) og eventuelt resten av cellene på TSA med kloramfenikol (10 µg/ml) for seleksjon av transformanter og inkubert overnatt. Transformanter ble bekreftet med PCR screening (kapittel 3.3.1) og sekvensering (kapittel 3.8.1).

#### 3.7.2 Transformasjon i *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae*

Elektroporering ble benyttet til å introdusere ukjent DNA inn i *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae*. Ved elektroporering blir en elektrisk puls påført, som produserer et elektrisk felt gjennom cellemembranen (Grosser & Richardson, 2016; Weaver & Chizmadzhev, 1996). Dette elektriske feltet sørger for en spenningsforskjell mellom innsiden og utsiden av membranen samtidig som at porer i cellemembranen dannes. Negativt ladet DNA kan dermed vandre gjennom porene i membranen mot den positivt ladde polen og entre cytoplasma.

Elektrokompetente celler av *S. chromogenes* (B221-2 og B23-1), *S. epidermidis* (B28-2 og BO92-1) og *S. dysgalactiae* (Stdys015-MB3-33-1 og Stdys047-01-2245-17) ble laget før elektroporering ble utført. Protokollen som er etablert for *S. aureus* ble benyttet (Löfblom et al., 2007). For *S. chromogenes* og *S. epidermidis* ble prosedyren utført i aerobe betingelser, mens for *S. dysgalactiae* ble stegene utført

## Metoder

anaerobt. Elektrokompente celler ble produsert ved å lage en 1/100 fortykning av overnattkulturer i BHI. Dette ble gjort ved å tilsette 500 µl overnattkultur til 50 ml BHI i en erlenmeyerkolbe. Cellene ble videre dyrket ved 37°C til OD<sub>600</sub> = 0,4 og deretter overført til 50 ml nunc-rør og inkubert på is i 10 minutter. Celler ble så høstet ved sentrifugering (4000 rpm, 4°C, 10 min) og supernatant helt av. De resterende stegene i prosedyren ble utført ved 4°C. Pellet ble vasket med 40 ml iskald 10 % glyserol og sentrifugert (4000 rpm, 4°C, 5 min). Dette steget ble utført fire ganger, hvor 30 ml 10 % glyserol ble tilsatt andre runde og 20 ml ble tilsatt tredje og fjerde runde. Pelleten ble til slutt løst i 2-3 ml iskald glyserol med 0,5M sukrose og 200 µl alikvotert til eppendorfrør og lagret i -80°C.

Elektroporering ble utført ved å tine 50 µl av elektrokompente celler på is og blande 2-10 µl plasmid med de kompetente cellene. 50 µl av cellene ble overført til en 1 mm elektroporeringskyvette og elektroporering ble utført (2.1 kV, 100 Ω, 25 µF). Etter elektroporering ble 950 µl TSB med 0,5 M sukrose tilsatt og cellene inkubert ved 37 °C i 2 timer. 250 µl, 500 µl eller 1000 µl av transformasjonsreaksjonen ble deretter platet ut på BHI agar med kloramfenikol (10 µg/ml) og BHI agar med spektinomycin (100 µg/ml). Skåler ble inkubert overnatt eller eventuelt over to netter ved 37 °C og transformanter ble bekreftet med PCR screening (kapittel 3.3.1).

### 3.8 DNA sekvensering

#### 3.8.1 Målrettet gensekvensering

Målrettet gensekvensering med Sangersekvensering ble utført for å bekrefte arter ved 16S rRNA sekvensering og for å bekrefte riktig konstruksjon av plasmider i *E. coli*. For 16S rRNA sekvensering, ble DNA-fragmenter først amplifisert med PCR med primere 5R og 11F (se kapittel 3.3.1 for detaljer). Videre ble fragmentene rensert (kapittel 3.6.1) og konsentrasjon bestemt med NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Deretter ble 2 µl av forover -eller reversprimere (5R og 11F), 2-3 µl rensert 16S rRNA DNA og 5 µl dH<sub>2</sub>O blandet for sekvensering. For sekvensering av plasmider, ble 2 µl primer (mm64) og 8 µl isolert plasmid blandet. Sangersekvenseringen ble utført av GATC, Eurofins Genomics.

#### 3.8.2 Illumina amplikonsekvensering

Illuminasekvensering av PCR-produkter fra *S. aureus* CRISPRi-biblioteket ble benyttet for å bestemme sammensetningen av sgRNAer i ulike prøver (se kapittel 4.7.2). Plasmider ble isolert (kapittel 3.2.1) fra *S. aureus* CRISPRi-bibliotekene etter dyrking, og prøver til Illuminasekvensering ble preparert av Anja Ruud Winther (NMBU). Her ble PCR satt opp og normalisering av prøver utført før Illuminasekvensering ble utført av Novogene. Dataanalysen ble utført av Marita Torrissen Mårli (NMBU).

### 3.9 Konstruksjon av kloramfenikolresistente *S. epidermidis*, *S. chromogenes* og *S. dysgalactiae* stammer

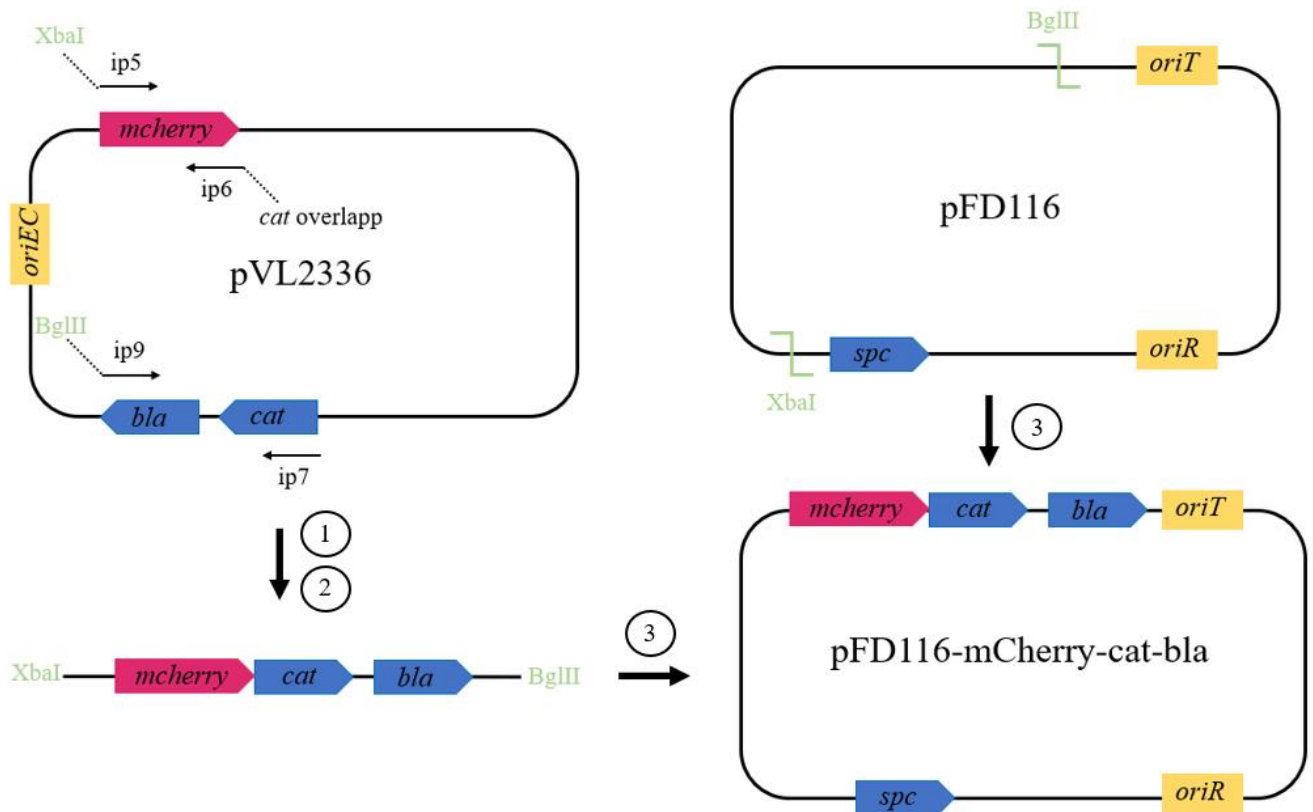
For å konstruere kloramfenikolresistente stammer i *S. epidermidis*, *S. chromogenes* og *S. dysgalactiae* ble tre ulike plasmider som uttrykker kloramfenikolresistens konstruert basert på de to plasmidene pVL2336 og pFD116. pFD116 plasmidet koder for resistens mot spektinomycin og er et plasmid som replikerer i en rekke Gram-positive bakterier. Plasmidet pVL2336 er det samme som brukes i *S. aureus* CRISPRi-biblioteket med unntak av at sgrNAet er byttet ut med mCherry. mCherry er et fluorescerende protein som gir en rosa farge, og rosa kolonier etter transformasjon bekrefter derfor transformering. pVL2336 inneholder *bla* genet og *cat* genet, som henholdsvis koder for resistens mot ampicillin i *E. coli* og kloramfenikol i *S. aureus*.

Konstruksjon av pVL2336-pFD116(ori). Replikasjonsorigin (ori) fra pFD116 ble amplifisert med primerne ip1 og ip2 (primerdesign utført av Marita Torrissen Mårli (NMBU)), mens vektoren, pVL2336, uten replikasjonsorigin ble amplifisert med primere ip3 og ip4. Primerne ip1 og ip2 inneholder sekvenser som overlapper med den amplifiserte pVL2336 vektoren. PCR produktene ble rensset (kapittel 3.6.2) og konsentrasjon målt. De to fragmentene ble forsøkt satt sammen ved å følge HiFi DNA Assembly protokollen; på is ble 1 µl insert (76 ng/µl), 4 µl vektor (16,7 ng/µl), 5 µl dH<sub>2</sub>O og 10 µl NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs) blandet og reaksjon ble inkubert ved 50°C i 15 eller 60 minutter. Reaksjonsblandingen ble så transformert inn i *E. coli* IM08B (kapittel 3.7.1).

Konstruksjon av pFD116-mCherry-cat-bla. Phusion PCR ble utført (kapittel 3.3), hvor primere ip5 og ip6 ble brukt til å amplifisere mCherry fra pVL2336 og primere ip7 og ip9 ble brukt til å amplifisere fragmentet cat-bla fra pVL2336. For senere å restriksjonskutte og ligere ble restriksjonssetene XbaI og BglII introdusert på hver ende av fragmentene ved overheng i primerne (figur 3.1). Fragmentene ble rensset fra gel (kapittel 3.6.2) og de to fragmentene ble fusert ved overlapp PCR (som beskrevet i kapittel 3.3 med unntak av at 20 sykluser av reaksjon uten primere først ble utført før 1 µl av ip5 og ip9 ble tilsatt). Fusert mCherry-cat-bla ble deretter rensset fra gel og ligert inn i vektor pFD116 ved restriksjonskutting med enzymene XbaI og BglII (utført som beskrevet i kapittel 3.4). Plasmidet ble deretter transformert inn i *E. coli* IM08B (kapittel 3.7.1) og 150 µl av transformasjonsreaksjonen ble platet ut på LB agar med ampicillin (100 µg/ml) og LB agar med spektinomycin (60 µg/ml). *E. coli* IM08B kolonier med plasmidet ble bekreftet med RedTaq PCR screening (kapittel 3.3.1) med primere ip7 og mm64. Plasmidet ble isolert fra *E. coli* (kapittel 3.2.2) og isolert plasmid ble verifisert med sekvensering med primer mm64 (kapittel 3.8.1) og restriksjonsanalyse med enzymene NcoI og KpnI (kapittel 3.4). Til slutt ble pFD116-mCherry-cat-bla elektroporert inn i *S. chromogenes* (B221-2 og B23-1), *S. epidermidis* (B28-2 og BO92-1) og *S.*

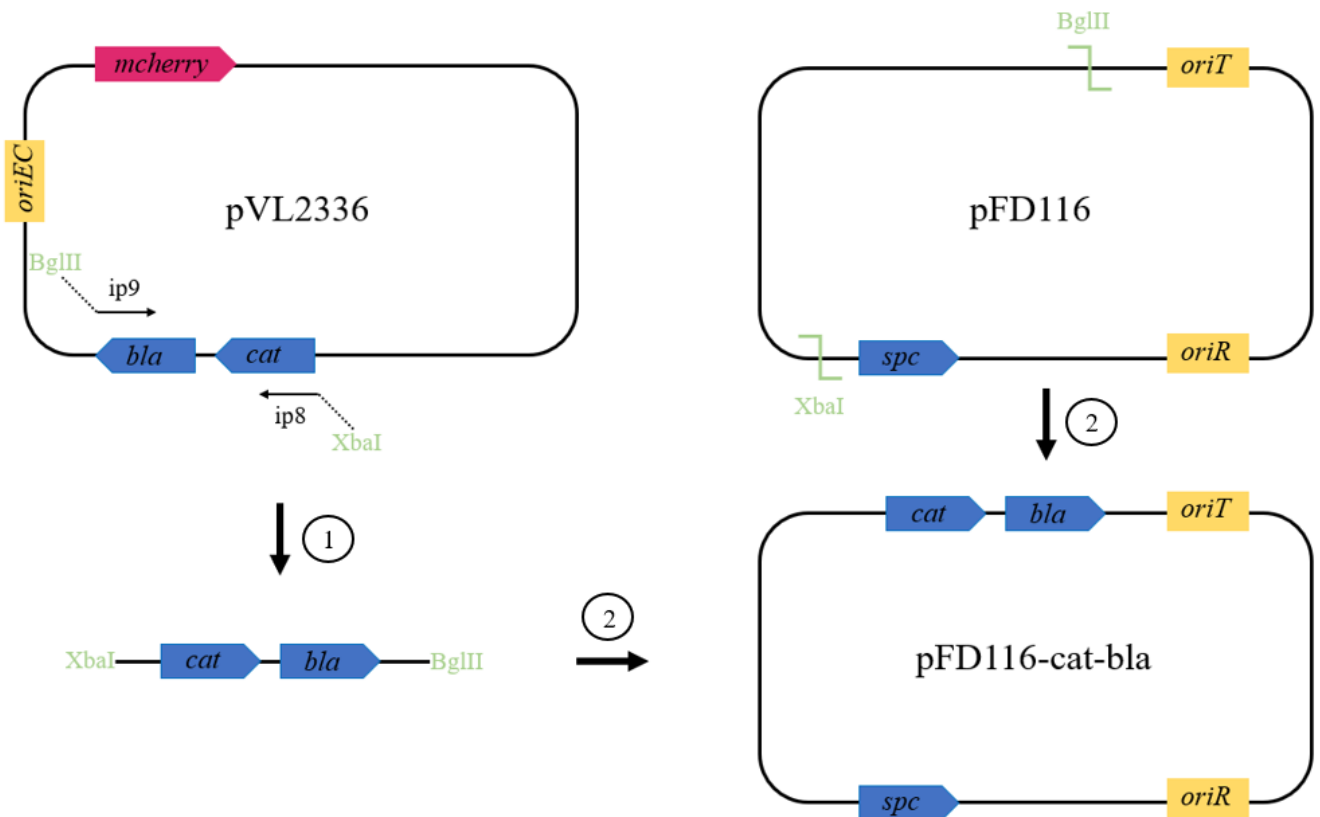
## Metoder

*dysgalactiae* (Stdys015-MB3-33-1 og Stdys047-01-2245-17) (kapittel 3.7.2). Kolonier på transformasjonsskålene ble forsøkt verifisert med PCR med primerne ip7 og ip9 (kapittel 3.3.1).



**Figur 3.1 Konstruksjon av plasmidet pFD116-mCherry-cat-bla ved restriksjonskutting og ligering.** Primere brukt er illustrert med piler, hvor stiplede linjer på primeren indikerer en overlappende hale eller en hale som introduserer et restriksjonssete. 1) Amplifisering av mCherry med primerne ip5 og ip6, og cat-bla fragmentet med primerne ip7 og ip9 ved bruk av pVL2336-plasmidet som templat. ip5 introduserer et XbaI restriksjonssete til mCherry, ip6 introduserer en overlapp til cat, og ip9 introduserer et BglII restriksjonssete til cat-bla fragmentet. 2) De amplifiserte sekvensene ble satt sammen med overlapp PCR, med primerne ip5 og ip9. Dette resulterte i det fuserte fragmentet mCherry-cat-bla. 3) mCherry-cat-bla og pFD116 ble deretter kuttet ved bruk av restriksjonsenzymene XbaI og BglII og ligert sammen for å oppnå det endelige plasmidet.

**Konstruksjon av pFD116-cat-bla.** Primerne ip8 og ip9 ble brukt til å amplifisere cat-bla fra pVL2336 med Phusion PCR (kapittel 3.3), hvor restriksjonssetene XbaI og BglII ble introdusert på hver ende av fragmentet (figur 3.2). Fragmentet ble rensset fra gel (kapittel 3.6.2) og ligert inn i vektoren, pFD116, ved restriksjonskutting med XbaI og BglII (kapittel 3.4). Plasmidet ble deretter transformert inn i *E. coli* IM08B, *S. chromogenes* (B221-2 og B23-1), *S. epidermidis* (B28-2 og BO92-1) og *S. dysgalactiae* (Stdys015-MB3-33-1 og Stdys047-01-2245-17) og bekreftet og verifisert slik som beskrevet over for pFD116-mCherry-cat-bla. Restriksjonsanalysen av pFD116-cat-bla isolert fra *E. coli* ble utført med enzymene XhoI og XbaI.



**Figur 3.2 Konstruksjon av plasmidet pFD116-cat-bla ved restriksjonskutting og ligering** Primere brukt er illustrert med piler, hvor stiplede linjer på primeren indikerer en hale som introduserer et restriksjonssete. 1) Amplifisering av *cat-bla* fragmentet med primerne ip8 og ip9 ved bruk av pVL2336-plasmidet som templat. ip8 introduserer et *XbaI* restriksjonssete og ip9 introduserer et *BglII* restriksjonssete til *cat-bla* fragmentet. 2) *cat-bla* og pFD116 ble deretter kuttet ved bruk av restriksjonsenzymene *XbaI* og *BglII* og ligert sammen for å oppnå det endelige plasmidet.

### 3.10 Analyse av bakterievekst med mikrotiterplateleser

Mikrotiterplatelesere kan brukes til analyse av bakterievekst under forskjellige betingelser. Disse plateleserne måler automatisk optisk tetthet (OD) spektrofotometrisk og kan innstilles til å måle OD et ønsket antall timer og med ønskede antall målinger. I dette prosjektet ble mikrotiterplatelesere benyttet for å analysere vekst og for å bestemme minimal inhibitory concentration (MIC) for bakteriestammer dyrket i standard vekstmedium.

#### 3.10.1 Vekstkurver

Vekst av *S. aureus* CRISPRi-stammer og *S. dysgalactiae* med klonet plasmid ble undersøkt i BHI medium ved bruk av mikrotiterplatelesere. CRISPRi-stammer dyrket i BHI medium med kloramfenikol (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ved 37°C overnatt, ble fortynnet 1:50 og inkubert til  $\text{OD}_{600} = 0,5$ . For å undersøke vekst fra tidlig eksponentiell fase ble kulturer fortynnet til  $\text{OD}_{600} = 0,05$ . Kulturer, med og uten aTc (30 ng/ml) i BHI med kloramfenikol (0, 2,5, 3, 4, 5 eller 10  $\mu\text{g/ml}$ ), ble deretter overført til brønner på en 96-brønnsmikrotiterplate (Sarstedt) med tre parallelle brønner for hver stamme. 300  $\mu\text{l}$  kultur ble tilsatt hver



## Metoder

brønn. Alternativt ble startkulturene (kapittel 3.1) fortynnet 1:1000 før kulturene ble tilsatt en 96-brønnsmikrotiterplate som beskrevet over. Volum tilsatt av *S. dysgalactiae* var enten likt som for *S. aureus* eller 2, 4, 8 eller 10 ganger større. Stammene ble dyrket i 18-20 timer ved 37°C og OD<sub>600</sub> ble målt hvert tiende minutt.

### 3.10.2 Minimal inhibitory concentration

For bestemmelse av minimal inhibitory concentration (MIC) for kloramfenikol for jurisolater (tabell 2.3) ble også mikrotiterplatelesere benyttet. Jurisolater ble dyrket i BHI overnatt uten antibiotika, mens *S. epidermidis* B28-2 og *S. chromogenes* B221-2 med klonet plasmid (pFD116-mCherry-cat-bla eller pFD116-cat-bla) ble dyrket med spektinomycin (100 µg/ml) som seleksjonsmarkør og *S. dysgalactiae* 015 med klonet plasmid (pFD116-mCherry-cat-bla eller pFD116-cat-bla) med kloramfenikol (10 µg/ml) for seleksjon. For å bestemme MIC, ble en to-folds fortytningrekke av kloramfenikol satt opp på følgende måte: i en 96-brønnsmikrotiterplate ble først 200 µl BHI med kloramfenikol (20 µg/ml) tilsatt i brønn 1 og 100 µl BHI i brønn 2-12, videre ble 100 µl overført fra brønn 1 til brønn 2, for deretter følge en lik prosedyre fram til brønn 11. Brønn 12 fungerte som en kontroll uten kloramfenikol. Overnattkulturen ble så fortynnet 1:250 i BHI og 100 µl ble deretter tilsatt hver brønn. Stammene ble til slutt inkubert ved 37°C i 20 timer og OD<sub>600</sub> målt hvert tiende minutt. MIC og MIC<sub>100</sub> ble definert som henholdsvis minste konsentrasjon av kloramfenikol som fører til en redusert vekst av bakterien og minste konsentrasjon som fører til totalinhibering av vekst.

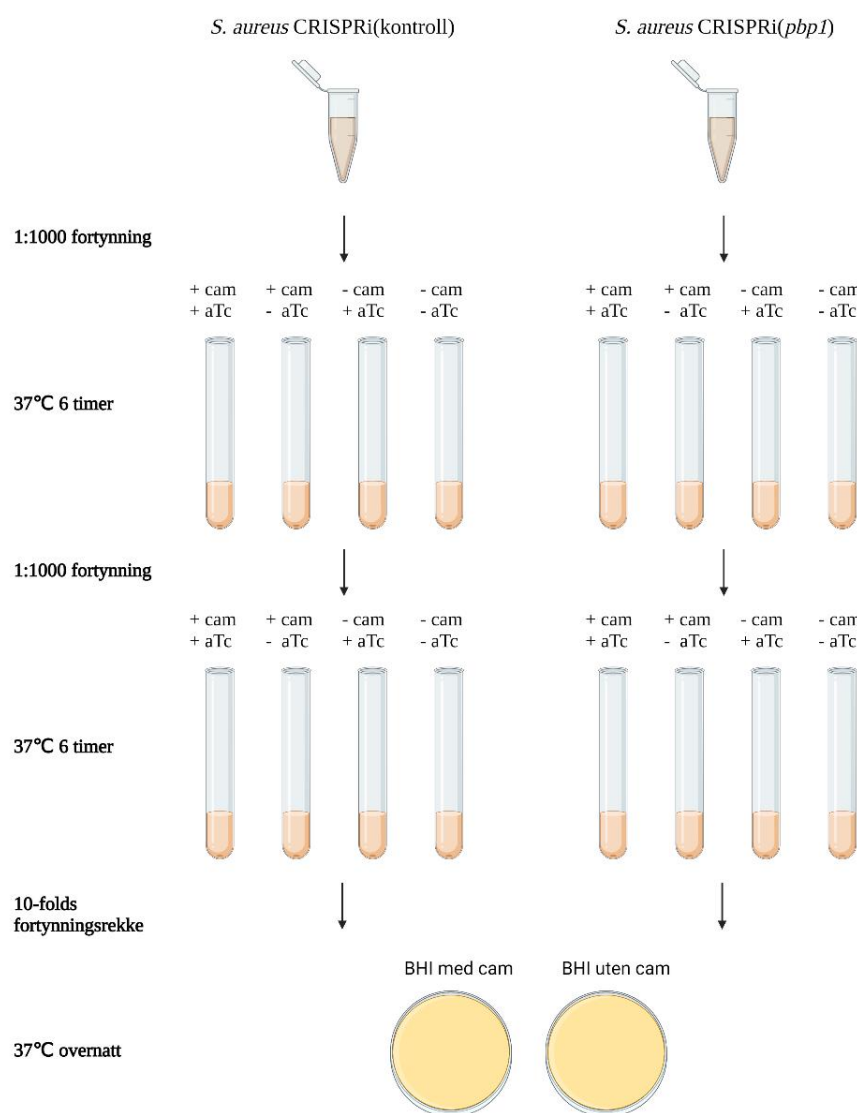
### 3.11 Analyse av vekst i melk

CRISPRi-systemets funksjonalitet i melk ble undersøkt ved å se på veksten til CRISPRi-stammene, *S. aureus* CRISPRi(kontroll) og *S. aureus* CRISPRi(*pbp1*). CRISPRi-stammene har et *dcas9*-gen integrert i kromosomet og et sgRNA på plasmidet pVL2336, hvor dCas9 uttrykkes ved induksjon av aTc slik som beskrevet i kapittel 1.4.1. Overnattkulturer av CRISPRi-stammene (dyrket i BHI med kloramfenikol (10 µg/ml)), ble fortynnet 1:10.000 ved å tilsette 10 µl overnattkultur til 100 ml UHT-melk med kloramfenikol (10 µg/ml) og med/uten aTc (30ng/ml). Til seks kulturrør, ble 5 ml av fortynnet kultur overført og fem av kulturrørene inkubert ved 37°C. Etter 0, 2, 4, 6, 8 og 24 timer ble en 10-folds fortyttingsrekke satt opp på følgende måte: 900 µl UHT-melk med kloramfenikol (10 µg/ml) ble tilsatt i eppendorfrør og 100 µl kultur ble deretter tilsatt til det første eppendorfrøret, blandet og 100 µl deretter overført til neste eppendorfrør for videre å følge lik prosedyre fram til siste eppendorfrør. 100 µl fra tre fortytninger ble platet ut på tre BHI agar skåler med kloramfenikol (10 µg/ml), hvor økende fortytninger ble platet ut for kulturene inkubert over lenger tid. Skåler ble deretter inkubert ved 37°C overnatt og CFU/ml bestemt for hvert tidspunkt for hver stamme.

## Metoder

### 3.12 Plasmidstabilitetstest

For å teste plasmidstabiliteten til *S. aureus* CRISPRi-biblioteket uten kloramfenikolseleksjon ble startkulturer (kapittel 3.1) av CRISPRi(kontroll)- og CRISPRi(*pbp1*)-stammer fortynnet 1:1000 i BHI med/uten aTc (30 ng/ml) og med/uten kloramfenikol (10 µg/ml) slik som illustrert i figur 3.3. Kulturene ble dyrket ved 37°C i seks timer (til OD<sub>600</sub> = 0,8), igjen fortynnet 1:1000 og inkubert i seks nye timer. En 10-folds fortynningsrekke (se kapittel 3.11) ble laget i BHI av kulturene etter dyrking i 6 og 12 timer. For å bestemme CFU/ml ble 100 µl fra fortynninger platet ut på BHI agarskåler med og uten kloramfenikol (10 µg/ml) for alle kulturer (se figur 3.3) og skåler inkubert ved 37°C overnatt. PCR screening (kapittel 3.3.1) av kulturer etter dyrking i 6 og 12 timer ble også utført.



**Figur 3.3 Skjematisk framstilling av plasmidstabilitetstest.** *S. aureus*-stammene, CRISPRi(kontroll) og CRISPRi(*pbp1*), ble satt opp i BHI med/uten kloramfenikol (cam) (10 µg/ml) og med/uten anhydrotetrasyklin (aTc) (30 ng/ml). Kulturene ble dyrket ved 37°C i 6 timer, fortynnet 1:1000 og deretter dyrket i 6 nye timer. Deretter ble fortynninger av kulturene platet ut på BHI agar med og uten kloramfenikol (to utplattninger av fortynninger mellom 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-8</sup>) og dyrket overnatt. Laget med BioRender.com.

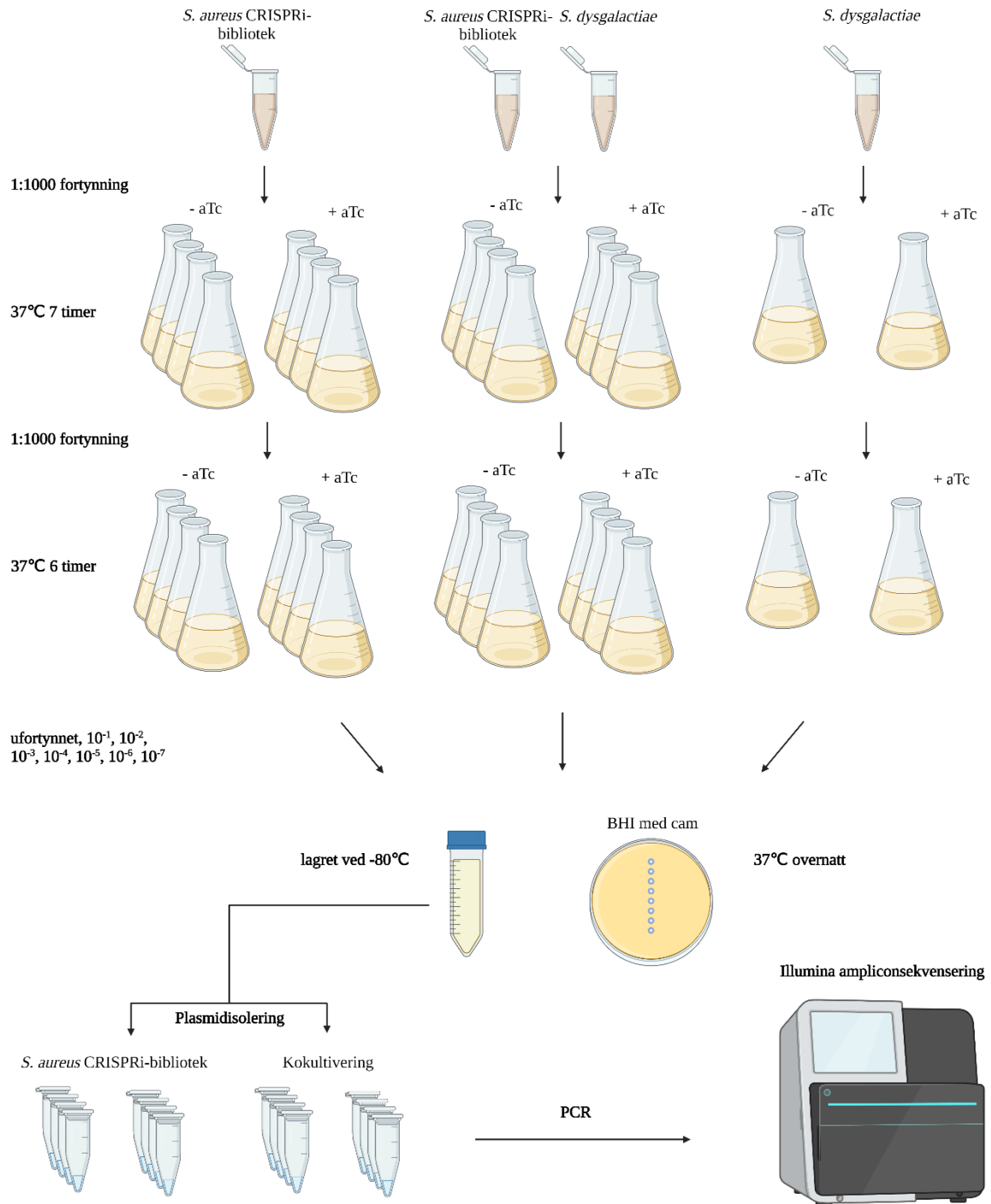
## Metoder

For å teste plasmidstabiliteten til *S. aureus* CRISPRi-biblioteket med lavere konsentrasjoner av kloramfenikol enn 10 µg/ml ble startkultur av CRISPRi(*pbp1*)-stammen laget (kapittel 3.1). Startkulturen ble fortynnet 1:1000 i BHI med aTc (30 ng/ml) og med kloramfenikol med konsentrasjoner på 0,15 µg/ml, 0,50 µg/ml, 2,5 µg/ml og 5 µg/ml. En positiv- og negativ kontroll av CRISPRi(*pbp1*)-stammen ble også laget, med en kloramfenikolkonsentrasjon på henholdsvis 10 µg/ml og 0 µg/ml. Kulturene ble dyrket i seks timer ved 37°C og en 10-folds fortynningsrekke av kulturer ble deretter laget (se kapittel 3.11). For å bestemme CFU/ml ble 100 µl fra fortynninger av hver kultur platet ut på BHI agarskåler med og uten kloramfenikol (10 µg/ml) og skåler dyrket ved 37°C overnatt.

### 3.13 Kokultiveringsforsøk

Kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* 015 med pFD116-cat-bla ble utført for å undersøke hvordan *S. aureus* sine gener påvirkes av å dyrkes med *S. dysgalactiae* i melk. Startkulturer av *S. dysgalactiae* 015 med pFD116-cat-bla (kapittel 3.1) og startkulturer av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket med OD<sub>600</sub> = 0,8 (laget av Marita Torrissen Mårli (NMBU)) ble laget. En skjematisk oversikt over forsøksoppsettet vises i figur 3.4. Seks ulike kulturer ble satt opp i melk med kloramfenikol (5 µg/ml), hvor to kulturer kun inneholdt *S. aureus* CRISPRi-biblioteket, to kulturer inneholdt både *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* og to kulturer kun inneholdt *S. dysgalactiae*. For de tre forskjellige tilstandene ble det laget kulturer med og uten aTc (30 ng/ml). I 250 ml erlenmeyerkolber ble startkultur fortynnet 1:1000 ved at det ble tilsatt 100 µl startkultur av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og/eller 800 µl startkultur av *S. dysgalactiae* til 100 ml melk med kloramfenikol (5 µg/ml), og eventuelt aTc (30 ng/ml). Fire paralleller ble laget av kulturer med *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og kulturer av kokultiveringen, mens en parallell ble laget for *S. dysgalactiae*-kulturene. Kulturene ble inkubert ved 37°C i 7 timer, deretter fortynnet 1:1000 i nye 250 ml kolber, hvor 100 µl kultur ble tilsatt likt volum av melk med kloramfenikol og aTc som beskrevet over (figur 3.4), og dyrket ved 37°C i 6 timer. For å bestemme CFU/ml, ble 10-folds fortynningsrekker, fra ufortynnet til 10<sup>-7</sup> fortynning, fra hver kultur laget i 96-brønnsmikrotiterplater. Fra hver fortynning, ble 2 µl spottet på BHI agar med kloramfenikol (5 µg/ml) og BHI agar med spektinomycin (100 µg/ml) og skåler inkubert ved 37°C overnatt. 50 ml av resterende kulturer ble overført til nunc-rør og lagret ved -80°C. Fra disse ble plasmid isolert (kapittel 3.2.1) for alle parallellene av *S. aureus* monokultur og kokultur. Illumina ampliconsekvensering for å bestemme fordeling av sgRNAene ble deretter utført av Anja Ruud Winter og Marita Torrissen Mårli som beskrevet i kapittel 3.8.2.

## Metoder



**Figur 3.4 Kokultiveringsforsøk.** Monokulturer av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) og en kokultur av disse to bakteriene ble satt opp i melk med kloramfenikol (cam) (5 µg/ml) og med/uten anhydrotetrasyklin (aTc) (30 ng/ml). Fire paralleller ble satt opp av *S. aureus* monokultur og kokultur, mens kun en parallelle ble satt opp for *S. dysgalactiae*. Kulturene ble dyrket ved 37°C først i 7 timer, fortynnet og deretter dyrket i 6 nye timer. Fortynninger av kulturene ble spottet på BHI agar med kloramfenikol. De resterende av kulturene ble overført til nunc-rør og lagret ved -80°C. Fra disse ble plasmider isolert for videre CRISPRi-sekvensering. *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) inneholder plasmidet pFD116-cat-bla, som gir stammen en høyere toleranse for kloramfenikol. Laget med BioRender.com.

## 4 Resultater

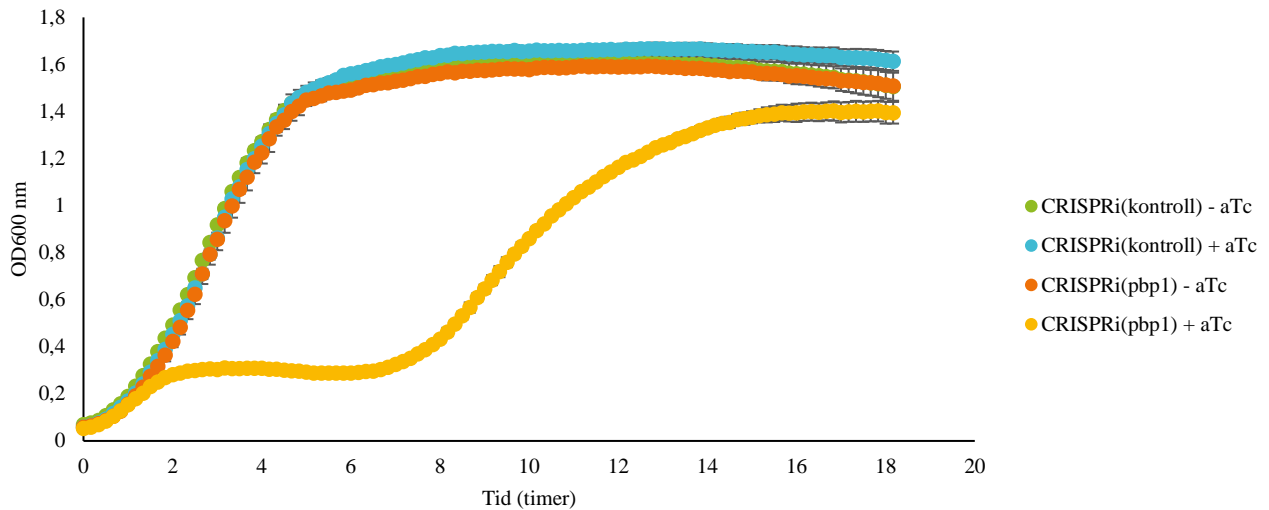
### 4.1 CRISPRi-systemet er funksjonelt i melk

Et av målene i dette arbeidet er at *S. aureus* CRISPRi-biblioteket skal kokultiveres med andre bakterier som normalt er en del av jurmikrobiotaen. Denne kokultiveringen skal skje i melk, for å ha et vekstmedium som likner miljøet i jurmikrobiotaen. *S. aureus* CRISPRi-stammene som ble benyttet i denne oppgaven har et *dcas9*-gen integrert på kromosomet og et sgRNA på plasmidet pVL2336. *dcas9* ekspresjonen induseres ved tilsetning av aTc til vekstmediet, mens sgRNAet uttrykkes konstitutivt. pVL2336 plasmidet som stammene bærer koder for et kloramfenikolresistensgen slik at bakterien vil beholde plasmidet ved dyrking med kloramfenikol til stede.

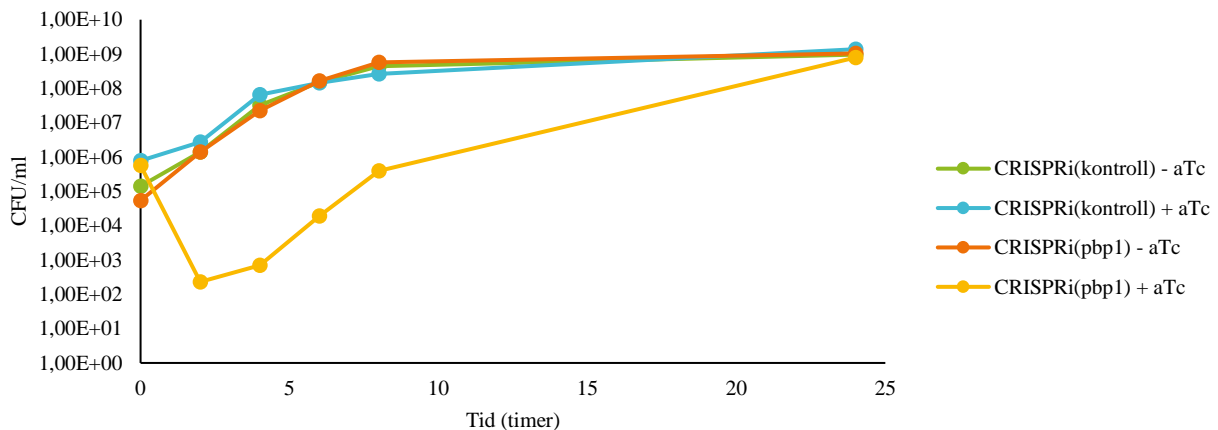
Dette CRISPRi-systemets funksjonalitet i BHI har blitt testet tidligere (M. Mårli, personlig kommunikasjon), mens om CRISPRi-systemet fungerer ved dyrking i melk er derimot ikke tidligere blitt testet. For å undersøke dette ble to CRISPRi-stammer benyttet; en kontrollstamme uten target (CRISPRi(kontroll), stamme MM268) og en annen stamme hvor CRISPRi-systemet har det essensielle *pbp1*-genet som target (CRISPRi(*pbp1*), stamme MM269). Stammene skiller seg altså fra hverandre ved at sgRNAet til kontrollstammen har et mål som ikke er til stede i bakterien (ingen target), mens målet til CRISPRi(*pbp1*)-sgRNAet er et essensielt gen. For å sjekke stammene, ble først vekst av CRISPRi(kontroll)- og CRISPRi(*pbp1*)-stammer målt med og uten induksjon med aTc i BHI ved å måle optisk tetthet ved 600 nm (OD<sub>600</sub>). Som forventet, påvirket ikke induksjonen vekst av kontrollstammen *S. aureus* CRISPRi(kontroll), siden denne har et sgRNA uten target i kromosomet (figur 4.1). Også som forventet, hadde *S. aureus* CRISPRi(*pbp1*)-stammen redusert vekst etter induksjon sammenliknet med den samme stammen dyrket uten induksjon (figur 4.1) (se kapittel 1.4.1 for teori om CRISPRi). Sistnevnte vokste likt som kontrollstammen (figur 4.1).

Vekst av CRISPRi(kontroll)- og CRISPRi(*pbp1*)-stammene ble deretter undersøkt i melk. Dette ble gjort ved å dyrke stammene på 37 °C med og uten aTc i kulturrør for deretter å plates ut etter inkubering i 0, 2, 4, 6, 8 og 24 timer for bestemmelse av CFU/ml. Resultatene viser at stammene dyrket i melk (figur 4.2) viser samme trend som ved dyrking i BHI (figur 4.1); en klar veksthemming ble observert i den induserte CRISPRi(*pbp1*)-stammen sammenliknet med uindusert stamme og kontrollstammen. Dette viser altså at CRISPRi-systemet er funksjonelt i melk, og at det er mulig å gå videre med dette systemet i de videre forsøkene.

## Resultater



**Figur 4.1** Vekstkurver av *S. aureus* CRISPRi-stammer dyrket i BHI-medium med og uten aTc induksjon. To *S. aureus*-stammer, CRISPRi(kontroll) og CRISPRi(*pbp1*) med et integrert CRISPRi-system ble dyrket i BHI med kloramfenikol (10 µg/ml) og med og uten anhydrotetrasyklin (aTc) (30ng/ml) i triplikater og vekst ved OD<sub>600nm</sub> ble målt hvert tiende minutt i 18 timer. CRISPRi(kontroll) er en kontrollstamme, hvor sgRNA ikke har et target, mens sgRNAet til CRISPRi(*pbp1*)-stammen har det essensielle genet *pbp1* som target.



**Figur 4.2** Vekstkurver av *S. aureus* CRISPRi-stammer dyrket i melk med og uten aTc induksjon. To *S. aureus*-stammer, CRISPRi(kontroll) og CRISPRi(*pbp1*) med et integrert CRISPRi-system ble først dyrket i melk med kloramfenikol (10 µg/ml) og med og uten anhydrotetrasyklin (aTc) (30ng/ml) i 0, 2, 4, 6, 8 og 24 timer. Etter dyrking i 0, 2, 4, 6, 8 og 24 timer ble melkekulturene dyrket på BHI agar med kloramfenikol (10 µg/ml) overnatt, hvor vekst i CFU/ml ble målt. CRISPRi(kontroll) er en kontrollstamme, hvor sgRNA ikke har et target, mens sgRNAet til CRISPRi(*pbp1*)-stammen har det essensielle genet *pbp1* som target.

Det er imidlertid verdt å legge merke til at veksten til den induserte CRISPRi(*pbp1*)-stammen ikke forblir redusert over tid i hverken BHI eller i melk. Det vises en tydelig økning i vekst etter ca. 7-8 timer i BHI (figur 4.1) og ca. 6 timer i melk (figur 4.2). Dette er noe som også tidligere har blitt observert ved bruk av CRISPRi-systemet i BHI (M. Mårli, personlig kommunikasjon). Lengre inkubering av CRISPRi-stammene (over 7-8 timer) bør derfor unngås i senere forsøk.

## Resultater

### 4.2 Jurisolater har lav toleranse for kloramfenikol

Det ble videre forsøkt å identifisere bakteriestammer fra jurmikrobiotaen som har de rette egenskapene til å kunne kokultiveres med *S. aureus* CRISPRi-biblioteket. Dette vil si at de bør være resistente mot 10 µg/ml kloramfenikol, siden kloramfenikolseleksjon brukes ved dyrking av CRISPRi-biblioteket. Til sammen 16 jurisolater ble derfor valgt ut (fra stammesamling D. Porcellato, NMBU) for å finne ut om noen av disse har potensiale til å kunne kokultiveres med CRISPRi-biblioteket. Tabell 4.1 viser hvilke stammer av jurisolater som ble valgt ut. 16S rRNA PCR ble utført og bekreftet artsidentiteten til de valgte jurisolatene.

Deretter ble bestemmelse av MIC (minimal inhibitory concentration) for kloramfenikol utført på de 16 jurisolatene (tabell 4.1). Tabell 4.1 viser MIC (definert som minste konsentrasjon av kloramfenikol som fører til en redusert vekst av bakterien) og MIC100 (definert som den minste kloramfenikolkonsentrasjonen som fører til at bakterien ikke vokser i det hele tatt). Alle jurisolatene viste en lav toleranse for kloramfenikol med MIC og MIC100 verdier på henholdsvis 0,16-1,25 µg/ml og 1,25-10 µg/ml (tabell 4.1). Dette viser at ingen av de utvalgte jurisolatene vil være i stand til å vokse med 10 µg/ml kloramfenikol, som hittil ble brukt ved dyrking av CRISPRi-biblioteket.

**Tabell 4.1 MIC for kloramfenikol for jurisolater.** MIC100 defineres som minste kloramfenikolkonsentrasjon som fører til at bakterien ikke vokser i det hele tatt, mens MIC defineres som minste konsentrasjon av kloramfenikol som fører til en redusert vekst av bakterien.

Jurisolater		MIC100	MIC
Art	Stamme	cam <sup>1</sup> µg/ml	cam <sup>1</sup> µg/ml
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1	1,25	0,15625
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys047-01-2245-17	2,5	0,3125
<i>A. viridans</i>	B1-1	5	0,625
<i>A. viridans</i>	B102-4	5	0,625
<i>S. epidermidis</i>	B28-2	5	0,625-0,078125
<i>S. epidermidis</i>	BO92-1	10	0,3125
<i>S. chromogenes</i>	B221-2	5	1,25
<i>S. chromogenes</i>	B23-1	2,5	0,625
<i>E. faecalis</i>	B37-1	5	0,3125
<i>E. faecalis</i>	B199-2	5	0,3125
<i>P. pentosaceus</i>	B46-1	2,5	0,3125-0,00976563
<i>P. pentosaceus</i>	B404-1	2,5	0,625
<i>S. uberis</i>	BO249-1	2,5	0,625
<i>S. uberis</i>	B94-1	2,5	0,3125
<i>C. amycolatum</i>	BO186-2	0,625	0,3125
<i>C. amycolatum</i>	BO422-4	5	0,625

<sup>1</sup> cam; kloramfenikol

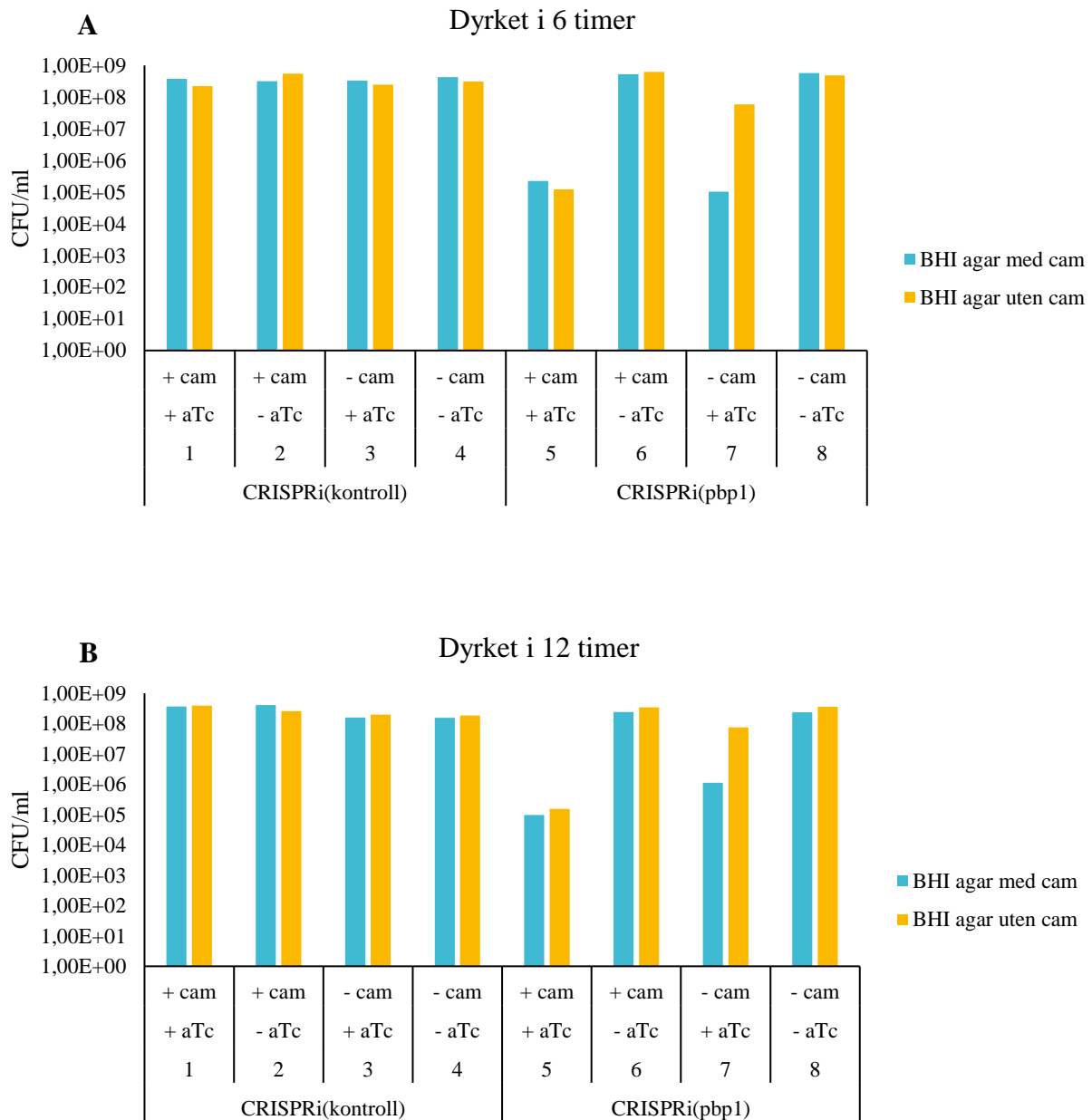
### 4.3 Plasmidet pVL2336 i *S. aureus* CRISPRi-stammer er ikke stabilt ved dyrking uten kloramfenikol

CRISPRi-biblioteket blir altså i utgangspunktet dyrket på 10 µg/ml kloramfenikol for å være sikre på at plasmidet pVL2336, som har et kloramfenikolresistensgen, ikke frastøtes av cellene. Jurisolatene viste seg derimot å ikke være særlig tolerante ovenfor kloramfenikol. Jurisolater og CRISPRi-biblioteket må kunne vokse under samme betingelser, og det ble derfor undersøkt om plasmidet pVL2336 er stabilt i *S. aureus* CRISPRi-stammer også uten kloramfenikolseleksjon. Dersom CRISPRi-systemet er funksjonelt også uten kloramfenikol til stede, vil veksthemmingen som ble observert i den induerte CRISPRi(*pbp1*)-stammen opptre likt ved dyrking i medium med og uten kloramfenikol. For å teste dette ble CRISPRi(kontroll)- og CRISPRi(*pbp1*)-stammene dyrket ved fire ulike betingelser i BHI; med/uten aTc og med/uten kloramfenikol. Kulturene ble dyrket i til sammen 12 timer og CFU på skåler med og uten kloramfenikol ble bestemt etter 6 og 12 timer (se kapittel 3.12 for detaljer om plasmidstabilitetstesten). Dersom ingen av cellene mister plasmidet, forventes antallet av kolonier å være likt på skåler med og uten kloramfenikol, mens dersom plasmidet frastøtes forventes det et større antall kolonier på skåler uten kloramfenikol.

Kontrollstammen dyrket med de fire ulike sammensetningene av kloramfenikol og aTc vokste alle likt på BHI agar med og uten kloramfenikol etter seks timer ( $10^8$ - $10^9$  CFU/ml, forsøk 1-4 i figur 4.3A). Dette var også tilfellet for de uinduserte kulturene av CRISPRi(*pbp1*)-stammen (forsøk 6 og 8 i figur 4.3A). Dette er forventet, siden det ikke er redusert vekst i noen av disse tilfellene (figur 4.2). Kulturene av CRISPRi(*pbp1*)-stammen som ble dyrket med aTc viste derimot betydelig redusert vekst sammenliknet med kontrollstammer. For CRISPRi(*pbp1*)-stammen dyrket med både kloramfenikol og aTc, var CFU/ml redusert til  $10^5$  (forsøk 5, figur 4.3A). Antall kolonier er tilnærmet likt når disse cellene ble platet ut på BHI agar med og uten kloramfenikol, som viser at det ikke var noen celler i kulturen som hadde mistet plasmidet. For CRISPRi(*pbp1*)-stammen dyrket uten kloramfenikol, men med aTc (forsøk 7, figur 4.3A) var veksten på BHI agar med og uten kloramfenikol imidlertid ulik. Når disse cellene ble platet ut på BHI uten kloramfenikol var CFU/ml tilnærmet lik veksten til kontrollstammene (ca.  $10^8$  CFU/ml), mens vekst på BHI med kloramfenikol var like lav som for CRISPRi(*pbp1*)-stammen dyrket med kloramfenikol og aTc (ca.  $10^5$  CFU/ml). Dette viser at når CRISPRi-systemet dyrkes uten kloramfenikol og har et essensielt gen som target (*pbp1*), frastøtes plasmidet og celler uten sgRNA plasmider vokser opp. CRISPRi-systemet er altså ikke funksjonelt under disse forholdene. Dette viser at CRISPRi-stammer ikke kan brukes uten kloramfenikol. CRISPRi(kontroll)- og CRISPRi(*pbp1*)-stammer vokste på samme vis etter tolv timer (figur 4.3B) som etter seks timer (figur 4.3A).



## Resultater



**Figur 4.3** Plasmidstabilitet hos *S. aureus* CRISPRi-stammene CRISPRi(kontroll) og CRISPRi(*pbp1*). Vekst i CFU/ml på BHI agar med og uten kloramfenikol (cam) (10 µg/ml) fra kulturer dyrket i BHI i A) seks timer og B) tolv timer. CRISPRi(kontroll)- og CRISPRi(*pbp1*)-kulturer vokser ved fire ulike betingelser 1 og 5) med kloramfenikol (10 µg/ml) og anhydrotetrasyklin (aTc) (30 ng/ml), 2 og 6) kun med kloramfenikol (10 µg/ml), 3 og 7) kun aTc (30ng/ml) og 4 og 8) med hverken kloramfenikol eller aTc. CRISPRi(kontroll) er en kontrollstamme, hvor sgRNA ikke har et target, mens sgRNAet til CRISPRi(*pbp1*)-stammen har det essensielle genet *pbp1* som target.

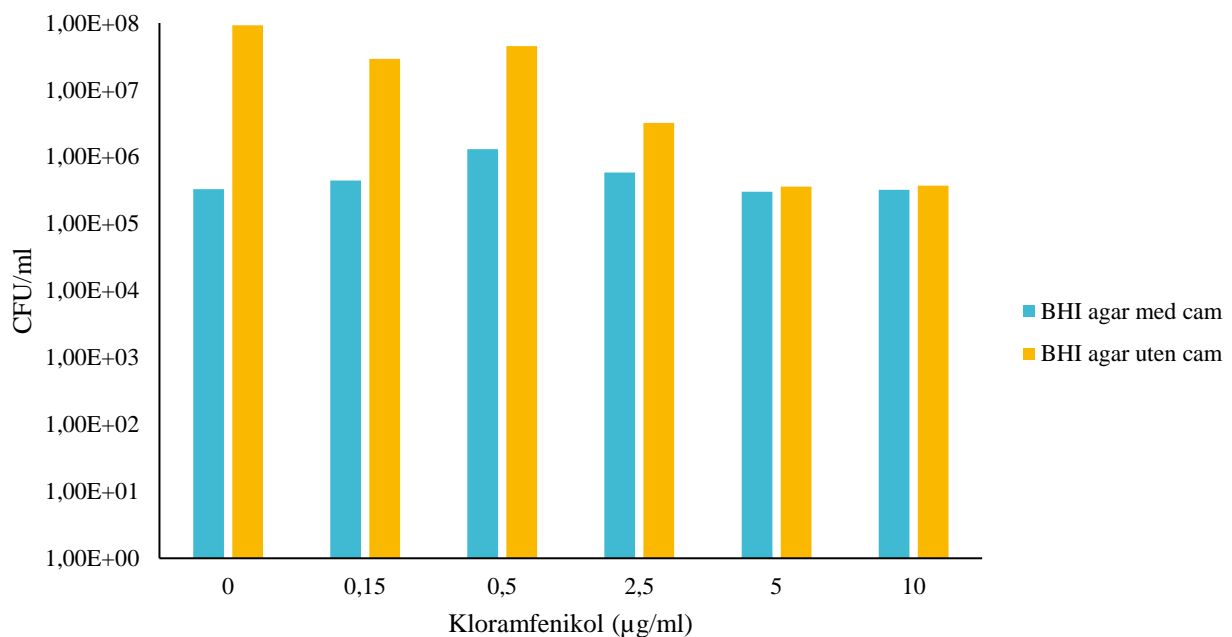
### 4.4 CRISPRi-systemet kan brukes ved en kloramfenikolkonsentrasjon på 5 µg/ml

Da CRISPRi-systemet ikke fungerer uten kloramfenikol ble det undersøkt om det kunne fungere ved lavere kloramfenikolkonsentrasjoner enn 10 µg/ml. Dette ble undersøkt ved å utføre tilsvarende plasmidstabilitetstest som over (figur 4.3) med CRISPRi(*pbp1*)-stammen dyrket med aTc og i ulike kloramfenikolkonsentrasjoner på 0,15 µg/ml, 0,50 µg/ml, 2,5 µg/ml og 5 µg/ml. I tillegg ble stammen

## Resultater

satt til å vokse uten kloramfenikol og ved 10 µg/ml kloramfenikol som henholdsvis negativ kontroll og positiv kontroll basert på tidligere forsøk. Etter dyrking i seks timer ble kulturene plattet ut på BHI agar med og uten kloramfenikol og dyrket ved 37 °C overnatt.

CRISPRi(*pbp1*)-kulturene som ble dyrket med 0,15 og 0,50 µg/ml kloramfenikol vokste relativt likt som kontrollen uten kloramfenikol (figur 4.4). Det er en stor andel celler i kulturen hvor plasmid blir frastøtt (når CFU/ml på  $10^8$  når dyrket på BHI agar uten kloramfenikol) og CRISPRi-systemet ikke er funksjonelt. For kulturen dyrket med 2,5 µg/ml kloramfenikol er CFU/ml betydelig lavere etter dyrking på BHI agar uten kloramfenikol ( $10^6$ - $10^7$  CFU/ml, figur 4.4) sammenlignet med de lavere fortynningene, men er derimot fortsatt en god del høyere enn veksten for samme kultur dyrket på BHI agar med kloramfenikol, og en del celler frastøter plasmidet også her. Kulturen dyrket med 5 µg/ml kloramfenikol (figur 4.4) vokser derimot likt som positiv kontroll med 10 µg/ml, hvor veksten på BHI agar med og uten kloramfenikol begge er like mye redusert (ca.  $10^5$  CFU/ml). Plasmidet er altså stabilt når CRISPRi-stammen vokser med 5 µg/ml kloramfenikol, og det vil være mulig å benytte denne konsentrasjonen videre.



**Figur 4.4 Plasmidstabilitet hos *S. aureus* CRISPRi(*pbp1*)-stammen ved ulike kloramfenikolkonsentrasjoner.** Vekst i CFU/ml på BHI agar med og uten kloramfenikol (cam) (10 µg/ml) fra kulturer dyrket i BHI med kloramfenikol og anhydrotetrasyklin (aTc) (30 ng/ml) i seks timer. CRISPRi(*pbp1*)-stammen har et sgRNA som har det essensielle genet *pbp1* som target.

## 4.5 Konstruksjon av kloramfenikolresistente *S. dysgalactiae* stammer

### 4.5.1 Plasmidet pVL2336 lar seg ikke transformere inn i jurisolater

Da CRISPRi-systemet må dyrkes på kloramfenikol for å fungere og jurisolatene ikke er særlig resistente mot kloramfenikol ble det undersøkt om jurisolatene kan gjøres resistente mot kloramfenikol slik at en kokultivering kan utføres. Plasmidet pVL2336, som koder for kloramfenikolresistens, ble derfor først forsøkt transformert inn i ulike jurisolater. pVL2336 inneholder *cat* genet, som koder for enzymet kloramfenikol acetyltransferase (CAT). Dette enzymet inaktiverer kloramfenikol ved å kovalent binde en acetyl-gruppe fra acetyl-CoA til kloramfenikol, noe som gjør at antibiotikumet ikke lenger kan binde 70S ribosomer (Li et al., 2011).

pVL2336 isolert fra *E. coli* Stab13 og *E. coli* IM08B ble forsøkt elektroporert inn i kompetente celler av *S. dysgalactiae* 047 og *S. dysgalactiae* 015. Transformasjonen ga imidlertid ingen kolonier for *S. dysgalactiae* 047 eller *S. dysgalactiae* 015 med plasmidene isolert fra hverken *E. coli* Stab13 og *E. coli* IM08B. Videre ble pVL2336 isolert fra *E. coli* DC10B forsøkt elektroporert inn i elektrokompetente celler av *S. epidermidis* B28-2, *S. epidermidis* BO92-1, *S. chromogenes* B221-2 og *S. chromogenes* B23-1 for å gjøre disse stammene resistente mot kloramfenikol. Heller ikke her fungerte det å transformere pVL2336 inn i hverken *S. epidermidis* eller *S. chromogenes*.

### 4.5.2 Konstruksjon av plasmidene pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla

Siden transformasjon av pVL2336 inn i jurisolatene ikke fungerte, ble det bestemt å arbeide videre med *S. dysgalactiae* og lage nye plasmider som kan transformeres inn i *S. dysgalactiae* og gjøre disse resistente for kloramfenikol.

Det kan være at pVL2336 ikke kunne transformeres inn i *S. dysgalactiae* fordi replikasjon av dette plasmidet ikke fungerer i denne bakterien. Først ble det derfor forsøkt å lage et nytt plasmid der replikasjonsorigin (*ori*) fra pFD116 (et plasmid som er vist å replikere i *S. dysgalactiae*) ble flyttet inn i pVL2336, hvor *S. aureus* replikasjonsorigin (*ori*) samtidig fjernes. Denne kloningen var ikke vellykket.

Da ovennevnte kloning ikke fungerte, ble to nye plasmider konstruert ved overlapp PCR og restriksjonskloning; pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla (se figur 3.1 og 3.2). Disse plasmidene koder for henholdsvis kloramfenikolresistens (*cat*), ampicillinresistens i *E. coli* (*bla*) og det fluorescerende proteinet mCherry (mCherry). I tillegg koder pFD116-plasmidet for resistens for spektinomycin. Plasmidene ble bekreftet ved PCR, restriksjonskutting og sekvensering.

## Resultater

### 4.5.3 Plasmidene pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla gir økt toleranse for kloramfenikol i *S. dysgalactiae*

De to nye plasmidene, pFD116-mCherry-cat-bla og pFD116-cat-bla, ble deretter forsøkt elektroporert inn i to *S. dysgalactiae* stammer (047 og 015), to *S. epidermidis* stammer (B28-2 og BO92-1) og to *S. chromogenes* stammer (B221-2 B23-1) og transformasjonsreaksjonene ble platet ut på BHI agar med 100 µg/ml spektinomycin eller 10 µg/ml kloramfenikol. For *S. epidermidis* og *S. chromogenes* kunne ikke korrekte transformanter verifiseres. For *S. dysgalactiae* 047 vokste det verken opp kolonier på spektinomycin- eller kloramfenikolskålene, mens transformanter av *S. dysgalactiae* 015 vokste kolonier opp både på spektinomycin og kloramfenikol. PCR screening av *S. dysgalactiae* 015 med plasmid viste at 10/10 plukkede kolonier var korrekte. MIC undersøkelse av *S. dysgalactiae* 015 med plasmid viste en betydelig høyere kloramfenikoltoleranse enn *S. dysgalactiae* 015 uten plasmid (kontroll) (tabell 4.2). MIC resultatene (tabell 4.2) viser at *S. dysgalactiae* 015 med plasmid kan vokse på kloramfenikol konsentrasjoner opp mot 2,5 µg/ml uten å hemmes samtidig som at kloramfenikol konsentrasjon helt opp til 10 µg/ml ikke gir fullstendig hemming. Selv om optimalt stammen burde vist enda bedre resistens, ble det bestemt å gå videre med stammen som ga høyest resistens, *S. dysgalactiae* 015 pFD116-cat-bla, for kokultivering.

**Tabell 4.2 MIC mot kloramfenikol for jurisolater med plasmider.** MIC100 defineres som minste kloramfenikolkonsentrasjon som fører til at bakterien ikke vokser i det hele tatt, mens MIC defineres som minste konsentrasjon av kloramfenikol som fører til en redusert vekst av bakterien.

Jurisolater		Plasmid	MIC100 <sup>1</sup>	MIC
Art	Stamme		cam <sup>2</sup> µg/ml	cam <sup>2</sup> µg/ml
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1	ingen plasmid (kontroll)	1,25	0,3125
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-1	pFD116-mCherry-cat-bla	-	0,625
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-2	pFD116-mCherry-cat-bla	-	0,625
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-3	pFD116-mCherry-cat-bla	-	1,25
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-4	pFD116-cat-bla	-	1,25
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-5	pFD116-cat-bla	-	1,25
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-6	pFD116-cat-bla	-	2,5
<i>S. dysgalactiae</i>	Stdys015-MB3-33-1-7	pFD116-cat-bla	-	1,25

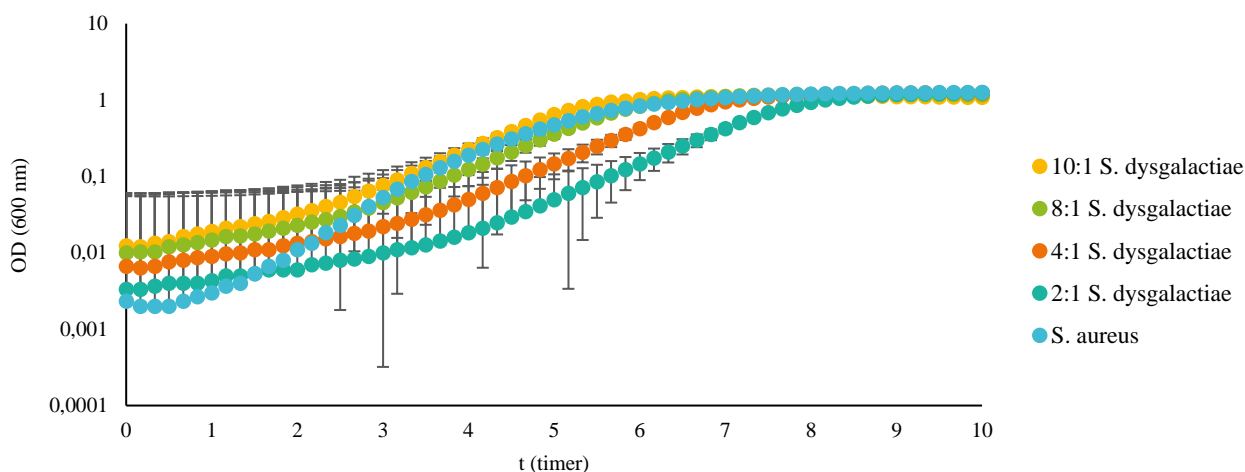
<sup>1</sup>Det er ingen totalinhibering (-) av *S. dysgalactiae* med plasmid ved kloramfenikolkonsentrasjoner ≤ 10 µg/ml.

<sup>2</sup>cam; kloramfenikol.

## Resultater

### 4.6 Optimal kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* er ved en 1:8 inokuleringsratio

For at *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* begge skal kunne vokse under kokultiveringen samtidig som CRISPRi-systemet er funksjonelt, ble det undersøkt hvilket blandingsforhold mellom *S. aureus* CRISPRi-stammen og *S. dysgalactiae*-stammen som sørger for likest mulig vekst. CRISPRi-systemet er stabilt ved en kloramfenikolkonsentrasjon på 5 µg/ml og dermed undersøkes vekst av begge stammer ved denne konsentrasjonen. Ulike inokuleringsratioer mellom *S. aureus* CRISPRi(*pbp1*)-stammen og *S. dysgalactiae* 015-MB3-33-1-6 pFD116-cat-bla ble testet. Det ble testet inokuleringsratioer med 2, 4, 8 og 10 ganger mer av *S. dysgalactiae* enn av *S. aureus* CRISPRi(*pbp1*)-stammen (figur 4.6). Ved dyrking i 5 µg/ml kloramfenikol med åtte ganger mer *S. dysgalactiae* inokulert, er veksten svært lik (figur 4.6) og dette forholdet ble valgt til kokultiveringsforsøket.



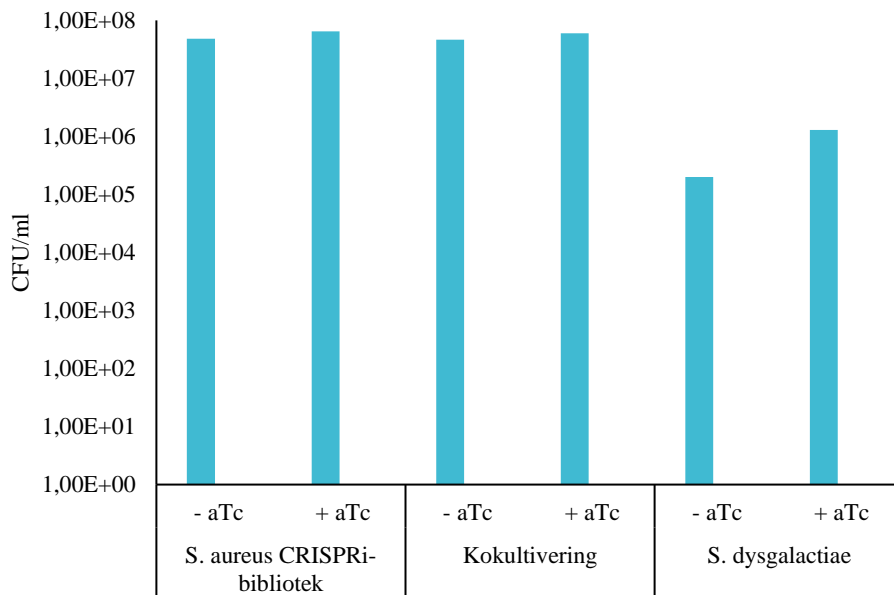
**Figur 4.6** Vekstkurver av *S. aureus* og *S. dysgalactiae* dyrket i BHI medium. Inokuleringsratioer med 2, 4, 8 og 10 ganger mer *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) enn *S. aureus* CRISPRi(*pbp1*)-stammen ble dyrket i BHI med kloramfenikol (5 µg/ml) i triplikater og vekst ved OD<sub>600nm</sub> ble målt hvert tiende minutt i 16 timer (graf viser de ti første timene). *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) inneholder plasmidet pFD116-cat-bla, som gir stammen en høyere toleranse for kloramfenikol.

### 4.7 Kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae*

#### 4.7.1 *S. aureus* CRISPRi-biblioteket vokste bedre enn *S. dysgalactiae* under kokultiveringsforsøket

Et pilotforsøk med kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* 015 ble utført med mål om å finne ut hvilke gener hos *S. aureus* som påvirkes av å dyrkes sammen med en annen jurbakterie. For å ha relativt likt miljø som i juret, ble kokultiveringen utført i melk slik som illustrert i figur 3.4. Etter endt forsøk ble CFU/ml i hver kultur estimert (figur 4.7), og dette viste at *S. aureus* CRISPRi-biblioteket ( $10^7$ - $10^8$  CFU/ml) har vokst mye bedre enn *S. dysgalactiae* under forsøket ( $10^5$  -  $10^6$  CFU/ml).

## Resultater

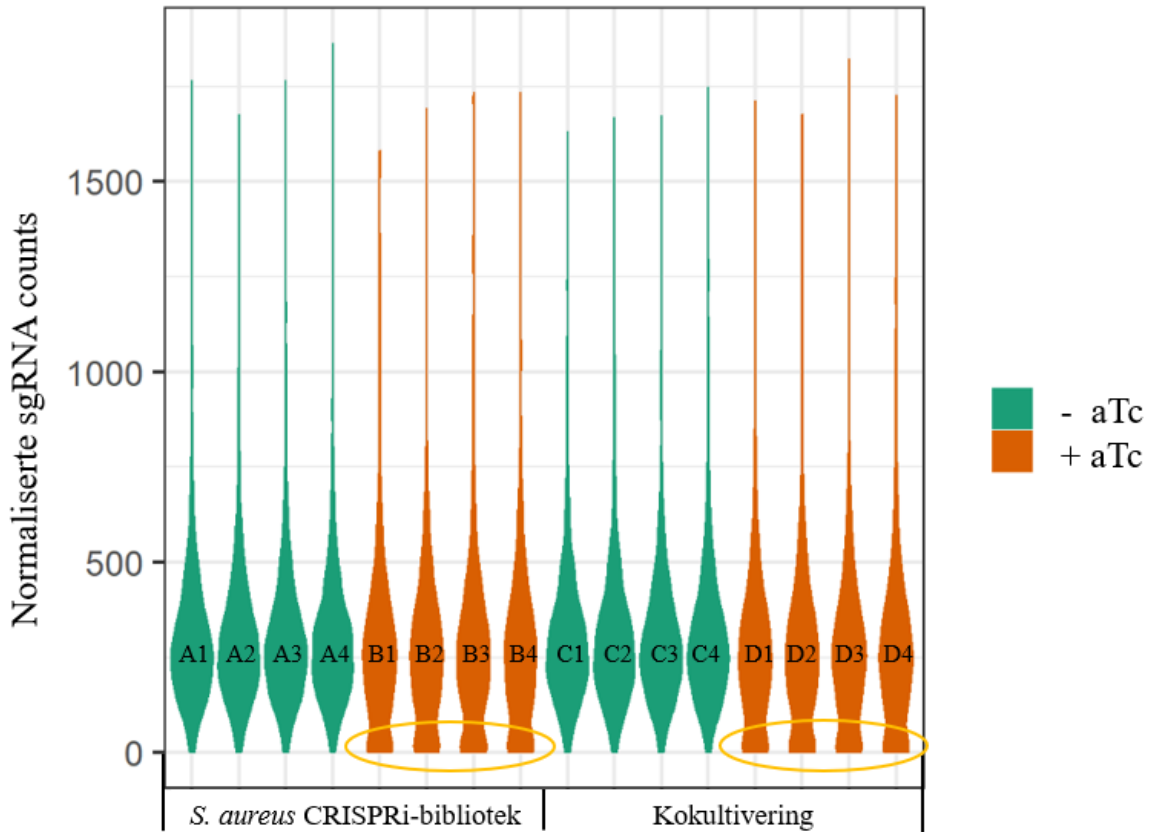


**Figur 4.7 Vekst av *S. aureus* CRISPRi-bibliotek, kokultivering og *S. dysgalactiae* i melk.** Vekst i CFU/ml på BHI agar med kloramfenikol (5 µg/ml) fra kulturer av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket, kokultivering og *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) dyrket i melk med kloramfenikol (5 µg/ml) og med/uten anhydrotetrasyklin (aTc) (30 ng/ml) i først syv og deretter seks timer. *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* dyrkes sammen under kokultiveringen. *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) inneholder plasmidet pFD116-cat-bla, som gir stammen en høyere toleranse for kloramfenikol.

### 4.7.2 *pyrG*, *glnR*, *fhuC* og *htsA* i *S. aureus* er mer- eller mindre essensielle under kokultivering med *S. dysgalactiae* enn i en monokultur av *S. aureus*

Videre ble det isolert sgRNA-plasmid fra alle paralleller, hvor det deretter ble utført CRISPRi-seq (se kapittel 1.4.2) for å bestemme hvilke gener som er differensielt essensielle mellom dyrking av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket alene (kontroll), sammenlignet med dyrking sammen med *S. dysgalactiae*. Dette ble gjort ved å først finne gener som var signifikant essensielle for kontrolltilstanden og kokultiveringstilstanden for deretter å sammenlikne genene for disse to tilstandene. CRISPRi-seq analyseprotokollen utviklet av de Bakker et al. (de Bakker et al., 2022), som baserer seg på DESeq2-pakken i R ble brukt for å telle antall sgRNA av hver type og identifisere signifikante forskjeller mellom *S. aureus* CRISPRi-monokultur og kokultiveringen med *S. dysgalactiae*. Denne analysen ble utført av Marita Torrissen Mårli (NMBU).

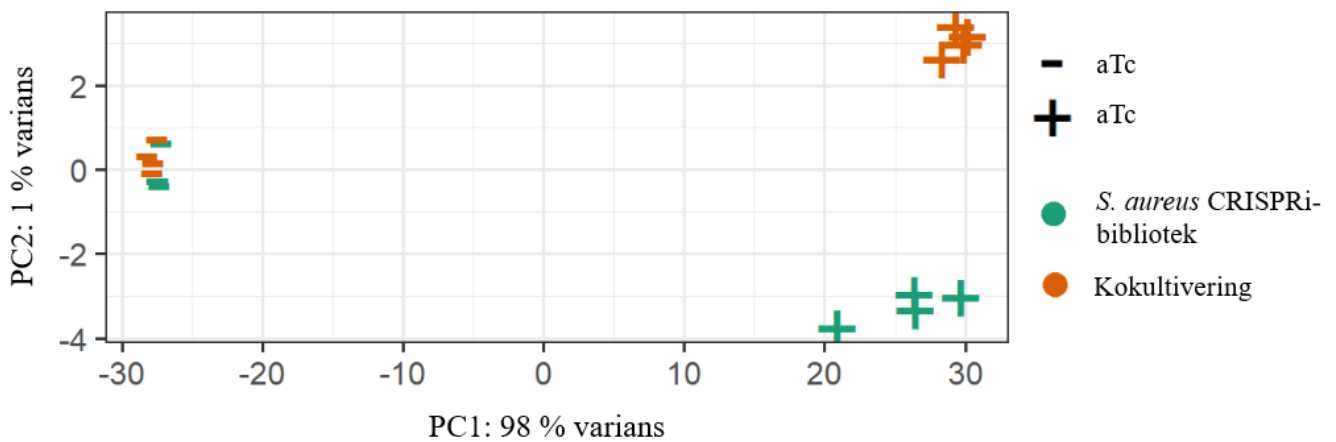
For å undersøke kvaliteten til dataene og parallellene, ble antallet av hvert sgRNA plottet i et fiolindiagram (figur 4.8) som viser fordelingen av antall sgRNAer. I denne figuren vises det at det er flere sgRNAer med lavt antall (counts) hos induerte prøver enn uinduserte prøver. Dette stemmer godt med teorien, hvor de lave sgRNA tallene skyldes sgRNA som nedregulerer transkripsjon av gener som er essensielle for vekst.



**Figur 4.8 Fordeling av antall sgRNA i *S. aureus* CRISPRi-bibliotek og kokultivering.** Fiolindiagram som viser fordeling av antall sgRNA for *S. aureus* CRISPRi-biblioteket (kontroll) (A og B med fire paralleller hver) og kokultiveringen (C og D med fire paralleller hver) dyrket i melk med kloramfenikol (5 µg/ml) og med og uten anhydrotetrasyklin (aTc) (30ng/ml). *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) dyrkes sammen under kokultiveringen. Gul oval sirkel viser sgRNA med økt antall lave counts. Diagrammet er laget fra dataene hentet fra Illuminasekvenseringen av kokultiveringsforsøket med DESeq2-pakken i R av Marita Torrissen Mårli.

Fra datasettet ble det videre utført en prinsipalkomponentanalyse (PCA) av parallellene (figur 4.9), som viser hvilke prøver som ligner på hverandre i sgRNA-innhold. I figuren vises den største spredningen mellom induerte og uinduserte prøver. Spredningen mellom induerte og uinduserte prøver ligger på PC1-aksen, som bidrar med 98 % av variansen, og dette skyldes gener som blir essensielle. Det er også en spredning mellom induerte prøver av kontroll og kokultivering, men denne variansen er svært liten da spredningen ligger på PC2-aksen med kun 1 % varians. Dette tyder på at det er forskjeller i sgRNA fordelingen mellom monokulturen og kokultiveringen, men forskjellene er relativt små. På den andre siden er uinduserte prøver svært like og parallellene for alle vekstforholdene er lokalisert i nærheten av hverandre. PCA-diagrammet illustrerer hvor 99 % av variansen kommer fra og kun 1 % av variansen er støy.

## Resultater



**Figur 4.9 PCA-diagram for *S. aureus* CRISPRi-bibliotek og kokultivering.** Diagrammet viser hvilke prøver som likner i sgRNA-innhold for *S. aureus* CRISPRi-biblioteket (kontroll) og kokultiveringen dyrket i melk med kloramfenikol (5 µg/ml) med og uten induksjon av anhydrotetrasyklin (aTc) (30 ng/ml). *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) dyrkes sammen under kokultiveringen. Diagrammet er laget fra dataene hentet fra Illuminasekvenseringen av kokultiveringsforsøket med DESeq2-pakken i R av Marita Torrissen Mårli.

Diagrammene i figur 4.8 og 4.9 indikerer et vellykket kokultiveringsforsøk, selv om forskjellene mellom monokulturen og kokulturen ser ut til å være små. Videre ble en dypere analyse utført, hvor det ble undersøkt om hvert unike sgRNA signifikant hadde økt eller falt i antall i induserte prøver sammenlignet med uinduserte prøver. Dette reflekterer genenes fitness; om *S. aureus* sine gener er mer essensielle, nøytrale eller mindre essensielle når indusert kultur vokser i melk sammenlignet med uinduserte kulturer. Dette ble undersøkt for både monokulturen av CRISPRi-biblioteket (figur 4.10A) og kokultiveringen (figur 4.10B). Deretter ble sgRNA-tallene for monokultur og kokultivering sammenlignet for å se hvilke sgRNA som sørger for signifikante forskjeller mellom disse to tilstandene (4.10C). Denne forskjellen i effekten med og uten *S. dysgalactiae* kalles interaksjonseffekten.

Figur 4.10A og 4.10B viser vulkanplott hvor endringen i sgRNA counts mellom indusert og uindusert prøve ( $\log_2$  fold change,  $\log_2FC$ ) plottes sammen med den assosierte p-verdien. Med en p-verdi mindre enn 0,05 og  $\log_2$  fold change verdier over 1 eller under -1 er gener henholdsvis signifikant mindre essensielle og mer essensielle. Vulkanplottene viser et stort antall unike sgRNA som signifikant har et lavere antall sgRNA ved induksjon sammenlignet med uinduserte prøver både for monokulturen og kokultiveringen. Et lavere antall sgRNA ved induksjon viser til at genene sgRNA nedregulerer er essensielle. Det er 277 gener (sgRNAer) hos *S. aureus* som er essensielle når bakterien vokser i melk alene, mens bakterien har 296 essensielle gener (sgRNAer) når den vokser sammen med *S. dysgalactiae* i melk (tabell 4.3). I figur 4.10C vises interaksjonseffekten, hvor to gener hos *S. aureus* er vist å være signifikant mer essensielle og to gener signifikant mindre essensielle under kokultivering i melk sammenlignet med dyrking av *S. aureus* alene i melk.



## Resultater

**Tabell 4.3 Signifikante essensielle- og mindre essensielle gener hos *S. aureus* dyrket i melk.** Fordeling av antall signifikante essensielle- og mindre essensielle gener hos *S. aureus* dyrket med eller uten *S. dysgalactiae* i melk og fordeling av antall signifikante essensielle- og mindre essensielle gener når interaksjonseffekten mellom disse to tilstandene ble studert. Tallene er hentet fra Illuminasekvenseringsdata av kokultiveringsforsøket og funnet fram med DESeq2-pakken i R av Marita Torrissen Mårli.

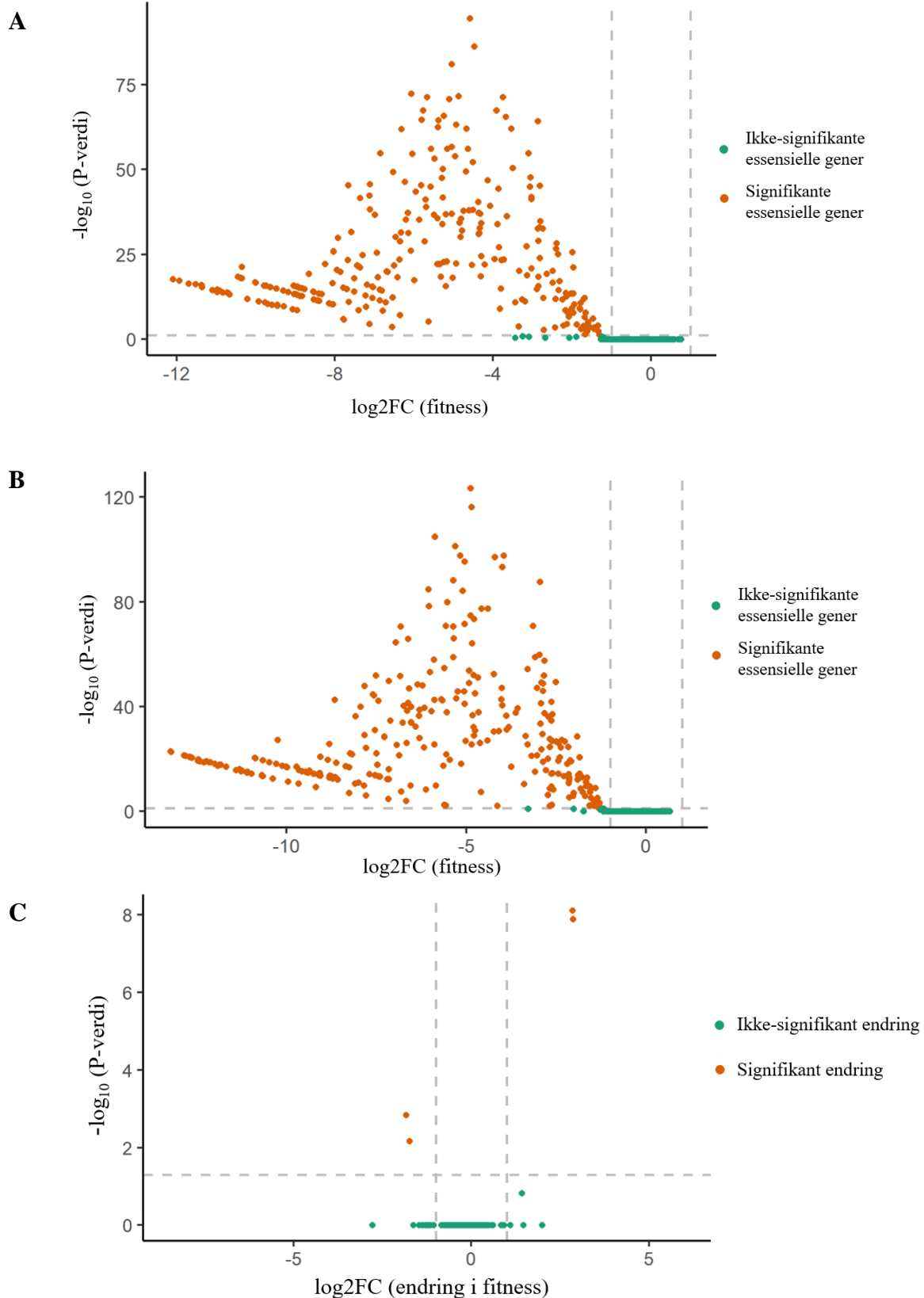
	Essensielle gener	Mindre essensielle gener
<i>S. aureus</i> dyrket i melk	277	0
<i>S. aureus</i> og <i>S. dysgalactiae</i> dyrket i melk	296	0
Interaksjonseffekt	2	2

De to mer essensielle genene under kokultivering er *pyrG* og *glnR* og de to mindre essensielle genene er *fhuC* og *htsA* (tabell 4.4). *pyrG* koder for CTP syntetase (PyrG), *glnR* i *glnRA* operonet koder for repressoren GlnR, som undertrykker glutamin syntetase (GS), *fhuC* koder for ATPasen FhuC, som sørger for dannelse av ATP ved transport av jern og *htsA* i *htsABC* operonet koder for lipoproteinreseptoren til staphyloferrin A, som har høy affinitet til jern.

**Tabell 4.4 Gener som signifikant er mer- eller mindre essensielle hos *S. aureus* dyrket i melk med *S. dysgalactiae*.** Signifikante essensielle- og mindre essensielle gener funnet når interaksjonseffekten mellom *S. aureus* dyrket med og uten *S. dysgalactiae* i melk ble studert. Genene *pyrG* og *glnR* i *S. aureus* går fra å være nøytrale i melk til å bli essensielle i melk dyrket med *S. dysgalactiae*. Genene *fhuC* og *htsA* i *S. aureus* går fra å være essensielle i melk til å bli mindre essensielle i melk dyrket med *S. dysgalactiae*. Tallene er hentet fra Illuminasekvenseringsdata av kokultiveringsforsøket og funnet fram med DESeq2-pakken i R av Marita Torrissen Mårli.

Gennavn	Log2FC	P-verdi	Predikert genfunksjon
<i>pyrG</i>	-1,74	6,69E-3	Katalyserer det siste steget i <i>de novo</i> pyrimidin biosyntese
<i>glnR</i>	-1,84	1,45E-3	Regulerer transkripsjon glutamin syntetase
<i>fhuC</i>	2,85	1,27E-8	ATPase aktivitet i jerntransport
<i>htsA</i>	2,84	7,68E-9	Lipoproteinreseptor aktivitet i jerntransport

## Resultater



**Figur 4.10 Vulkanplot som viser signifikante essensielle- og mindre essensielle gener hos *S. aureus* dyrket i melk.** Signifikante essensielle gener hos *S. aureus* i melk vises for A) *S. aureus* CRISPRi-biblioteket (kontroll) og B) kokultiveringen og det vises C) signifikante endringer av geneses fitness (om geneene er essensielle, nøytrale eller mindre essensielle) ved sammenlikning av fitness for kontroll og kokultivering. *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* (015-MB3-33-1-6) dyrkes sammen under kokultiveringen. Figuren er laget fra dataene hentet fra Illuminasekvenseringen av kokultiveringsforsøket med DESeq2-pakken i R av Marita Torrissen Mårli.

## 5 Diskusjon

Bovin mastitt forårsaker store problemer for meieriindustrien, hvor *S. aureus* er et av de hyppigst forekomne mastittpatogenene. Det var ønsket å studere hvilke gener hos *S. aureus* som er viktige for interaksjon med jurmikrobiotabakterier, for å kunne forbygge utvikling av og finne nye behandlingsmåter for mastitt fra dette patogenet i fremtiden. Dette ble studert ved å kokultivere et *S. aureus* genomskala CRISPRi-bibliotek med bakterier fra jurmikrobiotaen i melk og utføre CRISPRi-seq av kokultiveringen.

### 5.1 CRISPRi-systemet er funksjonelt i melk, men mister sin funksjon ved dyrking av *S. aureus* CRISPRi-stammer i over 7 timer

Det var ønskelig å utføre kokultiveringsforsøkene i UHT melk, et vekstmedium som likner miljøet i jurmikrobiotaen. Det har ikke tidligere blitt testet om *S. aureus* CRISPRi-systemet fungerer ved dyrking i melk, mens det derimot var kjent at *S. aureus* CRISPRi-systemet er funksjonelt i BHI (M. Mårli, personlig kommunikasjon) (figur 4.1). Ved å benytte CRISPRi-stammene CRISPRi(kontroll), som har et sgRNA uten target i kromosomet, og CRISPRi(*pbp1*) som har det essensielle *pbp1*-genet som target, ble det her vist at CRISPRi-systemet med aTc induksjon fungerer ved bruk av melk som vekstmedium. Transpeptidasen PBP1, som kodes av *pbp1*, katalyserer dannelse av peptidkryssbindinger under peptidoglykansyntese i celleveggen hos *S. aureus* (Pinho et al., 2013). *pbp1* er et essensielt gen da bakterier dør uten en cellevegg, veksthemming vil derfor observeres i en stamme med nedregulert *pbp1*. Veksten av stammene dyrket i melk (figur 4.2) viste samme trend som ved dyrking i BHI (figur 4.1), hvor veksten til den induserte CRISPRi(*pbp1*)-stammen var betydelig redusert sammenliknet med uindusert stamme og kontrollstammen. Dette stemmer overens med teorien (kapittel 1.4.1) og CRISPRi-systemet er funksjonelt i melk. Det er verdt å merke seg at vekstforsøkene viste en økning i vekst av den induserte CRISPRi(*pbp1*)-stammen etter inkubering i ca. 6-7 timer i både BHI (figur 4.1) og melk (figur 4.2). Dette har også tidligere blitt observert ved bruk av CRISPRi-systemet i BHI (M. Mårli, personlig kommunikasjon). Altså begynner stammen med nedregulert *pbp1* å vokse som normalt etter en viss tid. Grunnen til normal vekst i denne stammen kan være at *pbp1* ikke lenger nedreguleres. Årsaken til dette er ukjent, men dette kan skyldes at aTc etter 6-7 timer ikke lenger er funksjonelt eller at det oppstår mutasjoner i *dcas9*-genet som gjør at det inaktiveres. CRISPRi-systemet er altså ikke funksjonelt over tid i hverken BHI eller melk. I en kokultivering bør dermed ikke CRISPRi-biblioteket dyrkes i mer enn 7 timer.

### 5.2 Optimalisering av kokultiveringsoppsettet

For å finne jurmikrobiotastammer til kokultivering ble 16 jurisolater (fra stammesamling D. Porcellato, NMBU) valgt ut. MIC analyse viste at alle jurisolatene hadde en lav toleranse for kloramfenikol med MIC og MIC<sub>100</sub> verdier på henholdsvis 0,16-1,25 µg/ml og 1,25-10 µg/ml (tabell 4.1). Altså vil dyrking

## Diskusjon

av jurisolater i 10 µg/ml kloramfenikol, som er vanlig for CRISPRi-biblioteket, føre til en totalinhibering av alle stammene og en dyrking i over 0,16 µg/ml kloramfenikol føre til redusert vekst for alle stammer.

Kloramfenikolseleksjon (10 µg/ml) brukes ved dyrking av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket for at pVL2336-plasmidet som koder for sgRNAet, ikke skal frastøtes av cellene (se kapittel 1.4.1). En rekke plasmidstabilitetsforsøk ble derfor utført for å finne ut om CRISPRi-systemet kunne fungere like godt uten eller med lavere konsentrasjoner av kloramfenikol. Det ble først vist at CRISPRi-systemet ikke er funksjonelt uten kloramfenikolseleksjon. sgRNA-plasmidet frastøtes ved dyrking av CRISPRi(*pbp1*)-stammer uten kloramfenikol (forsøk 7, figur 4.3A). Frastøtning av plasmidet kan skyldes at cellene ønsker å vokse optimalt i fravær av seleksjonspress og dermed kvitter seg med plasmidet som sørger for redusert vekst. Det ble deretter undersøkt om pVL2336 var stabilt ved dyrking av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket ved lavere kloramfenikolkonsentrasjoner enn 10 µg/ml. Disse forsøkene viste at sgRNA-plasmidene er stabile ved dyrking av CRISPRi-stammer med en kloramfenikolkonsentrasjon på 5 µg/ml (figur 4.4).

CRISPRi-biblioteket kan altså dyrkes ved 5 µg/ml kloramfenikol. Dette er likevel fortsatt en høyere kloramfenikolkonsentrasjon enn noen av jurisolatene tåler (tabell 4.1), og jurisolater ble derfor forsøkt gjort resistente mot kloramfenikol med genetisk modifisering med plasmider som koder for kloramfenikolresistens (*cat*; kloramfenikol acetyltransferase). Først ble plasmidet pVL2336 forsøkt transformert inn i *S. dysgalactiae*, *S. epidermidis* og *S. chromogenes*, uten suksess. Mislykket transformasjon kan skyldes at replikasjon av pVL2336 ikke fungerer i jurisolatene. En annen årsak til den mislykkede transformasjonen kan være at bakterien har såkalte restriksjonsbarrierer for opptak av fremmed DNA (Monk et al., 2015). Restriksjonsmodifiseringsbarrierer (RM barrierer) hindrer opptak av ukjent DNA i *S. aureus* og mulig også i *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae* ved at de gjenkjenner ukjent DNA som mangler verts-spesifikke metyleringsprofiler og ukjent DNA blir dermed degradert (Monk et al., 2015). For å hindre at RM barrierer gjenkjenner ukjent DNA blir plasmider transformert inn i kunstig modifiserte i *E. coli*, som enten gjør at plasmidene ikke blir metylerte (DC10B) eller som gir verts-spesifikke metyleringsprofiler (IM08B). Dette bidro ikke til å løse problemet, og pVL2336 isolert fra de ulike *E. coli* stammene lot seg ikke transformere inn i jurisolatene. Metoden brukt for å unngå RM barrierer er utformet for *S. aureus* og det kan dermed være at metoden ikke fungerer i *S. chromogenes*, *S. epidermidis* og *S. dysgalactiae*.

To nye plasmider, pFD116-mCherry-*cat*-*bla* (figur 3.1) og pFD116-*cat*-*bla* (figur 3.2), ble deretter konstruert og forsøkt transformert inn i *S. dysgalactiae* (047 og 015), *S. epidermidis* (B28-2 og BO92-1) og *S. chromogenes* (B221-2 og B23-1). Disse plasmidene koder for resistens mot kloramfenikol (*cat*). MIC analyse av kolonier fra *S. dysgalactiae* 015 ga en stamme som kan vokse på konsentrasjoner opp mot 2,5 µg/ml uten å hemmes og hvor en konsentrasjon helt opp til 10 µg/ml ikke fører til fullstendig

## Diskusjon

hemming (tabell 4.2). *S. dysgalactiae* 015 (pFD116-cat-bla) ble dermed valgt ut for videre å kokultiveres med CRISPRi-biblioteket. Likevel var det noe overraskende at det ikke var mulig å lage stammer med enda høyere toleranse for kloramfenikol. Funksjonen til kloramfenikol acetyltransferase enzymet (CAT) er å hindre kloramfenikol å binde seg til 70S ribosomer ved å binde en acetyl-gruppe fra acetyl-CoA til kloramfenikol (Li et al., 2011). Dette skjer antagelig intracellulært (Sorg et al., 2016). Forhold i disse stammene kan kanskje gjøre at CAT ikke klarer å inaktivere kloramfenikol like effektivt som i *S. aureus*, men årsaken til dette er ukjent. Muligens skjer ikke bindingen av acetyl-gruppen til kloramfenikol raskt nok eller så binder mulig kloramfenikol seg lettere til 70S ribosomer i disse stammene.

### **5.3 *S. aureus* vokste bedre enn *S. dysgalactiae* under kokultiveringsforsøket, som trolig skyldes et oppsett lite tilpasset kokulturen**

Det ble funnet fram til et eksperimentelt oppsett for kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og jurmikrobiotastammer. Vekstforsøket i figur 4.6 viste lik vekst av *S. aureus* og *S. dysgalactiae*, som har lavere toleranse for kloramfenikol enn *S. aureus*, med en inokuleringsratio på 1:8. Dette vekstforsøket sammen med resultatene diskutert i kapittel 5.1 og 5.2 bestemte kokultiveringsoppsettet, hvor CRISPRi-biblioteket ble dyrket med *S. dysgalactiae* 015 (pFD116-cat-bla), med en inokuleringsratio på 1:8, i melk med 5 µg/ml kloramfenikol. Kulturer med og uten induksjon ble først inkubert i 7 timer, fortynnet og deretter inkubert i 6 timer. Kokultivering, kontroll med kun *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og kontroll med kun *S. dysgalactiae* ble også dyrket i disse forholdene. Fortynninger av kulturene ble spottet på BHI agar med kloramfenikol (5 µg/ml) og BHI agar med spektinomycin (100 µg/ml).

Monokulturer og kokultur ble dyrket på spektinomycin- og kloramfenikol-skåler for å bestemme ratioen av *S. aureus*- og *S. dysgalactiae*-kolonier. På grunn av at *S. aureus*-stammene overraskende viste toleranse for spektinomycin (data ikke vist, M. Mårli, personlig kommunikasjon), var det ikke mulig å bruke spektinomycin seleksjon for å bestemme ratio av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* i den endelige kulturen. mCherry var også planlagt å brukes for å bestemme ratio av *S. aureus* og *S. dysgalactiae* under kokultivering. mCherry er et fluorescerende protein som gir en rosa farge og rosa kolonier dannes for stammer som har dette proteinet. Hadde pFD116-mCherry-cat-bla plasmidet vært mer resistent mot kloramfenikol kunne *S. dysgalactiae* med dette plasmidet blitt brukt i kokultiveringen. Da kunne *S. dysgalactiae* blitt bestemt ved rosa kolonier og *S. aureus* blitt bestemt med gule kolonier. I fremtiden kan derimot 16S rRNA sekvensering av fryste kulturer utføres for å bestemme ratioen i den endelige kulturen.

Det vokste flere kolonier av *S. aureus* monokultur ( $10^7$ - $10^8$  CFU/ml) enn av *S. dysgalactiae* ( $10^5$ - $10^6$  CFU/ml) (figur 4.7). Altså tyder resultatene på at *S. aureus* vokste betydelig bedre enn *S. dysgalactiae* ved de endelige betingelsene som ble valgt. Dette var i utgangspunktet ikke som forventet da disse

## Diskusjon

bakteriene i vekstforsøket i figur 4.6 ble funnet til å vokse likt med inokuleringsratioen brukt i kokultivering. Forskjellen i vekst skyldes imidlertid trolig ulikt oppsett for dyrking av kulturer. I vekstforsøket, som bestemte inokuleringsratioen av *S. aureus* og *S. dysgalactiae* brukt i kokultiveringsforsøket, ble bakteriene dyrket i BHI med kloramfenikol i 16 timer. I kokultiveringsforsøket derimot ble bakteriene dyrket i melk med kloramfenikol i først 7 timer, deretter fortynnet og dyrket i 6 nye timer. Figur 4.6 viser at mengden av *S. aureus* og *S. dysgalactiae*, med en inokuleringsratio 8 ganger større enn *S. aureus*, er lik etter dyrking i BHI i 7 timer. Om dette også er tilfellet ved dyrking av bakteriene i melk, vil bakteriene starte med lik mengde i den siste delen av kokultiveringsforsøket. I de første 7 timene vil altså bakteriene dyrkes til en lik mengde, altså er ratioen mellom bakteriene lik, og bakterier med samme sluttratio fortynnes. Dette fører til at inokuleringsratioen mellom *S. aureus* og *S. dysgalactiae* er 1:1 under dyrking av bakteriene i melk de 6 siste timene. Da *S. dysgalactiae* vokser dårligere i kloramfenikol en *S. aureus* CRISPRi-biblioteket vil dermed dyrking med denne ratioen føre til en betydelig lavere vekst av *S. dysgalactiae* sammenliknet med *S. aureus*. For å sørge for lik vekst av *S. aureus* og *S. dysgalactiae* under kokultivering i fremtiden kan kokultiveringsforsøket legges opp slik at fortynningen av kulturene gjøres før ratioen mellom bakteriene er lik. Fra figur 4.6 vises det at fortynningen da må gjøres før dyrking i 2,5 timer. For å detektere sgRNA for alle gener i genomet, også de som påvirker vekst i liten grad, trengs det derimot en lang inkuberingstid (de Bakker et al., 2022). Dette kan løses ved å legge til flere fortynninger for å forlenge inkuberingstiden.

### **5.4 Kokultiveringsanalyse viste liten forskjell i genfitness for kokultivering sammenliknet med monokultur i melk**

Interaksjoner mellom *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og *S. dysgalactiae* ble videre undersøkt med CRISPRi-seq. CRISPRi-seq analysen viser liten forskjell i genfitness for monokultur og kokultur av *S. aureus* i melk. Av 1928 gener i *S. aureus* er 277 (figur 4.10A, tabell 4.3) mer essensielle når bakterien dyrkes i melk og 296 gener (figur 4.10B, tabell 4.3) mer essensielle når bakterien dyrkes sammen med *S. dysgalactiae* i melk, hvor mange av de samme genene er essensielle i monokultur og kokultur. Det er 19 gener som skiller kulturene fra hverandre, men kun fire gener (tabell 4.4) ble bestemt å være signifikant mer- eller mindre essensielle i kokulturen (figur 4.10C, tabell 4.3). Denne forskjellen skyldes trolig at de fleste av de 19 genene faller rett over / under terskelverdien for å defineres som essensiell i de to forsøkene, og at de det egentlig ikke er noen signifikant forskjell mellom dem. Disse små forskjellene i genfitness kan skyldes liten interaksjon mellom *S. dysgalactiae* og *S. aureus* under kokultivering. Monokulturen av *S. dysgalactiae* vokste, som nevnt, betydelig mindre enn monokulturen av *S. aureus* i melk (figur 4.7) og kan være en årsak til mindre grad av interaksjon mellom bakteriene enn ønsket. Ved liten interaksjon vil *S. aureus* i kokulturen ha vokst tilnærmet likt som i monokulturen, og *S. aureus* sine genes fitness vil være påvirket av kokultiveringen. Disse resultatene tyder på et mindre vellykket forsøk.

## Diskusjon

På den andre siden ble det funnet signifikant forskjell i genfitness mellom monokultur og kokultur for *pyrG* og *glnR* (kapittel 5.5) og *fhuC* og *htsA* (kapittel 5.6). *pyrG* og *glnR* er gener som er relatert til biosyntese og omdannelse av glutamin og *fhuC* og *htsA* er gener som brukes til import av jern. Ved dyrking av *S. aureus* med *S. dysgalactiae* i melk blir altså gener som bidrar til glutaminsyntese og omdannelse mer viktige og gener for import av jern mindre viktige. Det er verdt å merke seg at de fire differensielt mer- eller mindre essensielle genene uttrykker proteiner med funksjoner som er koplet til hverandre samtidig som at genene ligger langt fra hverandre i genomet. Disse resultatene sammen med resultater fra en prinsipalkomponentanalyse (PCA) indikerer et vellykket forsøk. De ulike prøvene i PCA ble plassert som forventet i diagrammet, hvor den største forskjellen i sgRNA innhold var mellom induerte og uinduserte prøver (figur 4.9). PCA viste derimot, i tråd med den lille forskjellen i genfitness som ble funnet, liten forskjell i sgRNA-fordelingen mellom induerte prøver av monokultur og kokultur.

For å få et mer representativt bilde på genenes fitness i kokultivering bør det legges bedre til rette for interaksjoner mellom bakteriene. I en studie av Harcombe (2010), hvor *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium* og en *E. coli* mutant ble dyrket på agarplater og i flytende medium med laktose, ble det vist at arter kan interagere med hverandre på forskjellige måter avhengig av type medium som brukes. Kokultiveringen viste at artene utviklet et samarbeid for overlevelse ved dyrking på agarskåler, mens artene ikke gjorde dette ved dyrking i flytende medium (Harcombe, 2010). Dyrking av kulturene på faste bestemte steder på agarskåler gjorde det mulig for bakteriene å utveksle fordelaktige molekyler og dermed samarbeide om overlevelse. Kim et al. (2008) utviklet et kokultiveringsoppsett med artene *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus licheniformis*, and *Paenibacillus curdlanolyticus* ved bruk av et mikroflytende apparat. Med dette systemet ble artene separert fra hverandre, mens kjemisk kommunikasjon ble opprettholdt gjennom en nanoporøsmembran (Kim et al., 2008). Her kan bakteriene vokse i egne lokale miljøer og vekstforholdene til den enkelte bakterien optimaliseres. I denne studien ble det også vist at ved å dyrke kulturer på bestemte plasser i rommet klarte bakteriene å utveksle molekyler som bidro til vekst, mens ved dyrking uten å strukturere hvor i rommet bakteriene skulle være var det lite interaksjon mellom bakteriene. Denne faktoren, om hvor i rommet bakteriene befinner seg i forhold til hverandre, kan mulig også ha noe å si for interaksjonen mellom *S. aureus* og *S. dysgalactiae*. Det kan undersøkes nærmere om bakteriene bør ha en direkte kontakt eller være delvis separert, slik som i studien til Kim et al. (2008), for optimal interaksjon. Ved direkte kontakt, som ble utført i dette arbeidet og i studien til Harcombe (2010), blir bakteriene dyrket i samme miljø med like betingelser (Goers et al., 2014). Dette utføres ofte på bakterier som har like vekstkrav. Det var ønsket at *S. aureus* og *S. dysgalactiae* skulle ha like vekstkrav, men *S. dysgalactiae* endte med å ha en lavere toleranse for kloramfenikol enn *S. aureus* i dette arbeidet. For å sørge for at *S. aureus* og *S. dysgalactiae* dyrkes med optimal avstand til hverandre kan et oppsett likt som studiene til enten Harcombe (2010) eller Kim et al.

## Diskusjon

(2008) mulig brukes. Altså kan kokultiveringsoppsettet forbedres ved å dyrke bakteriene på agarplater for å sørge for fysisk interaksjon eller med mikroflytende systemer for å sørge for interaksjoner mellom bakteriens molekyler. Da *S. dysgalactiae* ikke har like vekstkrav som *S. aureus* kan oppsettet til Kim et al. (2008) vurderes da separasjon av bakteriene gjør det mulig å dyrke *S. dysgalactiae* uten kloramfenikol og dermed vokse mer optimalt, samtidig som at *S. aureus* CRISPRi-biblioteket kan vokse med kloramfenikolseleksjon. Dette er derimot et mer komplisert oppsett og for et enklere, men godt kokultiveringsoppsett trengs det mulig kun å gå fra flytende kultur til fast kultur, som å bruke agarskåler. Andre systemer som kan legge til rette for interaksjoner i en kokultur er mikroflytende systemer, hvor for eksempel lokale miljøer kan separeres av semipermeable membraner eller en væskekanal, eller dyrking på fast underlag som i en gel eller på glassplater (Goers et al., 2014).

### **5.5 *glnR* og *pyrG* i *S. aureus* er mer essensielle under kokultivering med *S. dysgalactiae* enn i en monokultur av *S. aureus***

Analysen av CRISPRi-sekvensering av *S. aureus* monokultur og kokultur viste at *glnR* og *pyrG* genene i *S. aureus* er mer essensielle når bakterien dyrkes i melk med *S. dysgalactiae* enn dyrket i melk alene (tabell 4.4). *glnR* koder for repressoren GlnR og ligger på operonet *glnRA*, hvor *glnA* koder for glutamin syntetase (GS) (kapittel 1.2.4). GS katalyserer reaksjonen mellom L-glutamat og ammonium som danner L-glutamin. Syntese av glutamin er viktig i bakterier på grunn av molekylets rolle som aminosyre i proteinsyntese, glutamins bidrag i biosyntese av nitrogenholdige komponenter og i assimilering av ammonium (Forchhammer, 2007). GlnR regulerer *glnRA* operonet og dermed uttrykket av GS, hvor repressoren sørger for et høyere nivå av GS ved et lavt nivå av ammoniakk. Ved lite tilgang på ammoniakk bidrar altså *glnR* til å gjøre nitrogen tilgjengelig ved å legge til rette for dannelse av glutamin. Glutamin bidrar med sitt nitrogen i mange essensielle reaksjoner i bakterier, som blant annet det siste steget i pyrimidin biosyntese. I denne reaksjonen settes en aminogruppe, hentet fra hydrolyse av glutamin, på uridintrifosfat (UTP) og danner cytidintrifosfat (CTP) (kapittel 1.2.4). Denne reaksjonen katalyseres av enzymet CTP syntetase (PyrG), som kodes av *pyrG*. Genene *glnR* og *pyrG*, som ble vist å være mer essensielle i kokultur, uttrykker altså proteiner som inngår i biosyntese og omdanning av glutamin.

CRISPRi-seq viste at *glnRA* og *pyrG* i *S. aureus* var nøytrale ved dyrking av *S. aureus* i melk og ble essensielle når *S. aureus* ble dyrket med *S. dysgalactiae* i melk. For å finne årsakene til dette må disse resultatene studeres nærmere. Det kan derimot spekuleres i at *S. dysgalactiae* bidrar til at *glnRA* og *pyrG* blir mer essensielle i *S. aureus*. Melk inneholder mye proteiner, som er bygget opp av aminosyrer. Er det mye tilgang på organisk nitrogen, som aminosyrer, er aktiviteten til glutamin syntetase lav (Forchhammer, 2007). Dette skyldes at bakterien i dette tilfellet kun trenger glutamin som nitrogendonor i anabolske reaksjoner og ikke trenger å assimilere nitrogen. GlnR repressoren vil da sørge for lav aktivitet



## Diskusjon

av GS ved å hindre transkripsjon av enzymet (kapittel 1.2.4). Aktiviteten til *glnR* bidrar her til at kun næring som kreves metabolsk tas opp og dermed til opprettholdelse av metabolsk homeostase (Forchhammer, 2007). Tilgjengeligheten til glutamin vil også påvirke syntesen av det essensielle nukleotidet CTP. Resultatene kan derfor tyde på at *S. dysgalactiae* påvirker tilgjengeligheten til aminosyrer og spesielt glutamat/glutamin i kulturen, slik at *glnRA* operonet og *pyrG* blir viktigere for *S. aureus*. Ytterligere forsøk er nødvendige for å kunne forstå dette bedre.

### **5.6 *htsA* og *fhuC* i *S. aureus* er mindre essensielle under kokultivering med *S. dysgalactiae* enn i en monokultur av *S. aureus***

Under kokultivering av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket med *S. dysgalactiae* var *htsA* og *fhuC* genene i *S. aureus* mindre essensielle sammenlignet med vekst i melk alene (tabell 4.4). *htsABC* operonet koder for reseptoren (HtsA) og ABC-transporteren (HtsB og HtsC) til staphyloferrin A (kapittel 1.2.3). Staphyloferrin A er en siderofor med høy affinitet til jern produsert av *S. aureus*. HtsABC sørger for import av jern bundet til staphyloferrin A og bidrar dermed til opptak av det essensielle grunnstoffet jern. ATPasen FhuC, som kodes av *fhuC*, bidrar med energien som trengs for opptak av sideroforer (kapittel 1.2.3). *htsA* og *fhuC* gener, som er på ulike steder i kromosomet, er altså funksjonelt koblet sammen ved at begge genene bidrar til jernopptak i *S. aureus*.

For å finne årsakene til at *htsA* og *fhuC* genene i *S. aureus* er mindre essensielle i kokultur enn i monokultur må resultatene studeres nærmere, men det kan spekuleres i at egenskaper hos *S. dysgalactiae* bidrar til dette. Ved dyrking av *S. aureus* alene i melk, som inneholder lite jern, er *htsA* og *fhuC* essensielle. *htsA* og *fhuC* blir derimot mindre essensielle når *S. aureus* kokultiveres med *S. dysgalactiae* i melk. *S. dysgalactiae* kan under kokultiveringen mulig bidra til at *S. aureus* klarer å ta opp jern slik at disse genene essensielle for jernopptak blir mindre essensielle. *S. aureus* kan, i tillegg til staphyloferrin A og B, ta opp jern bundet til xenosideroforer (kapittel 1.2.3). Xenosideroforer er sideroforer som ikke produseres av *S. aureus*. FhuBG bidrar sammen med reseptorene, FhuD1 og FhuD2, til import av jern bundet til xenosideroforer. ATP som trengs for import av disse sideroforene produseres også av FhuC. En mulig hypotese er derfor at *S. dysgalactiae* produserer xenosideroforer, og at *S. aureus* derfor bruker FhuCBG for opptak av sideroforer framfor HtsABC. Om HtsABC brukes i mindre grad vil *fhuC* og *htsA* og genene bli mindre essensielle. Dette kan undersøkes ved videre forskning ved for eksempel å mutere *fhuD1* og *fhuD2*, slik at ikke xenosideroforer binder seg til disse reseptorene på FhuBG og heller ikke transporteres inn i *S. aureus*.

## 6 Konklusjon og videre arbeid

CRISPRi-systemet ble vist å være funksjonelt i melk ved dyrking av stammer med CRISPRi-systemet, og dette var en forutsetning for å kunne utføre forsøkene. CRISPRi-systemet er derimot ikke funksjonelt ved dyrking av CRISPRi-stammer i over 7 timer. Fremtidig arbeid kan undersøke hvorfor ikke CRISPRi-systemet fungerer over tid, ved for eksempel å undersøke om *dcas9* er blitt mutert.

Et kokultiveringsoppsett av *S. aureus* CRISPRi-biblioteket og jurmikrobiotastammen *S. dysgalactiae* 015 ble utviklet, hvor kokultivering med en 1:8 inokuleringsratio av bakteriene ble dyrket i melk med 5 µg/ml kloramfenikol i to omganger, først i 7 timer og deretter i 6 timer. Gjennomføringen av pilotforsøket var vellykket, men resultatene viste at det er mulig å forbedre forsøksoppsettet. Blant annet bør det i framtidige oppsett være mulig å mer direkte måle hvor mye hver av stammene vokser under kokultivering. For eksempel kan fluorescerende stammer eller stammer med andre seleksjonsmarkører enn spektinomycin brukes for å studere ratioen mellom bakteriene under kokultivering. 16S rRNA sekvensering av fryste kulturer fra kokultiveringsforsøket kan også utføres for å bestemme ratio mellom de to bakteriene.

CRISPRi-seq av kokultur viste et vellykket forsøk, men det var få gener med signifikant forskjell i genfitness for *S. aureus* dyrket alene og dyrket med *S. dysgalactiae*. De få forskjellene på monokultur og kokultur kan skyldes lite interaksjon mellom bakteriene. I videre arbeid kan interaksjon mellom bakteriene økes ved å øke konsentrasjonen av *S. dysgalactiae* eller dyrke kulturer fra kokultiveringsforsøk på agarskåler, hvor man vet sikkert at bakterier fysisk interagerer på en annen måte enn i flytende kultur. Av de genene som ble funnet å være signifikant forskjellige, er *pyrG* og *glnR*, gener som bidrar i syntese og omdannelse av glutamin, mens *fhuC* og *htsA*, begge bidrar i jernopptak. Det er derimot viktig å nevne at disse resultatene kun gjelder kokultivering av *S. aureus* med *S. dysgalactiae* og at en kokultivering med andre bakterier i jurmikrobiotaen kan gi andre resultater. CRISPRi-seq er en screening metode og i fremtiden bør disse resultatene valideres med for eksempel vekstforsøk med 'knockout' mutanter eller ved å undersøke individuelle CRISPRi-stammer med de mer og mindre essensielle genene nedregulert av sgRNA. Dette vil danne grunnlag for å videre forstå hvordan *S. aureus* påvirkes ved kokultivering med *S. dysgalactiae*.

Forskning som dette kan gi en større forståelse for jurmikrobiotaens rolle i utvikling av mastitt og en større innsikt i infeksjonsprosessen. Viser gener i mastittpatogener seg å være essensielle for infeksjon og kolonisering, kan disse brukes som mål for infeksjonsbehandling. Dette kan bidra til å utvikle metoder som bekjemper og forebygger mastitt i fremtiden.

## Referanser

- Anderson, P. M. (1983). CTP Synthetase from *Escherichia coli*: An Improved Purification Procedure and Characterization of Hysteretic and Enzyme Concentration Effects on Kinetic Properties. *American Chemical Society*, 22 (13): 3285-3292. doi: 0006-2960/83/0422-3285S01.50/0.
- Ashraf, A. & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. *Trop Anim Health Prod*, 50 (6): 1193-1202. doi: 10.1007/s11250-018-1629-0.
- Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F. & Hiramatsu, K. (2008). Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *Journal of bacteriology*, 190 (1): 300-310.
- Baracco, G. J. (2019). Infections Caused by Group C and G Streptococcus (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiol Spectr*, 7 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0016-2018.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., Kulauzovic, E., Weidenmaier, C., Peschel, A. & Götz, F. (2007). Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 189 (1): 280-3. doi: 10.1128/jb.01221-06.
- Chambers, H. F. & Deleo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 7 (9): 629-41. doi: 10.1038/nrmicro2200.
- Chang, A. Y., Chau, V., Landas, J. A. & Pang, Y. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1: 22-25.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12 (1): 547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- Condas, L. A. Z., De Buck, J., Nobrega, D. B., Carson, D. A., Naushad, S., De Vliegheer, S., Zadoks, R. N., Middleton, J. R., Dufour, S., Kastelic, J. P., et al. (2017). Prevalence of non-aureus staphylococci species causing intramammary infections in Canadian dairy herds. *J Dairy Sci*, 100 (7): 5592-5612. doi: 10.3168/jds.2016-12478.
- de Bakker, V., Liu, X., Bravo, A. M. & Veening, J. W. (2022). CRISPRi-seq for genome-wide fitness quantification in bacteria. *Nat Protoc*, 17 (2): 252-281. doi: 10.1038/s41596-021-00639-6.
- De Visscher, A., Piepers, S., Haesebrouck, F. & De Vliegheer, S. (2016). Intramammary infection with coagulase-negative staphylococci at parturition: Species-specific prevalence, risk factors, and effect on udder health. *J Dairy Sci*, 99 (8): 6457-6469. doi: 10.3168/jds.2015-10458.
- De Vliegheer, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S. & Barkema, H. W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci*, 95 (3): 1025-40. doi: 10.3168/jds.2010-4074.
- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., Plaizier, J. C. & Khafipour, E. (2018). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J Dairy Sci*, 101 (12): 10605-10625. doi: 10.3168/jds.2018-14860.
- Di Felice, F., Micheli, G. & Camilloni, G. (2019). Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *Journal of Biosciences*, 44 (2): 38. doi: 10.1007/s12038-019-9856-8.
- Dufour, S., Labrie, J. & Jacques, M. (2019). The Mastitis Pathogens Culture Collection. *Microbiol Resour Announc*, 8 (15). doi: 10.1128/mra.00133-19.
- Endrizzzi, J. A., Kim, H., Anderson, P. M. & Baldwin, E. P. (2004). Crystal structure of *Escherichia coli* cytidine triphosphate synthetase, a nucleotide-regulated glutamine

- amidotransferase/ATP-dependent amidoligase fusion protein and homologue of anticancer and antiparasitic drug targets. *Biochemistry*, 43 (21): 6447-63. doi: 10.1021/bi0496945.
- Forchhammer, K. (2007). Glutamine signalling in bacteria. *Front Biosci*, 12: 358-70. doi: 10.2741/2069.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol*, 12 (1): 49-62. doi: 10.1038/nrmicro3161.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133 (3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Garvie, E. I., Farrow, J. A. E. & Bramley, A. J. (1983). *Streptococcus dysgalactiae* (Diernhofer) nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33 (2): 404-405. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-33-2-404>.
- Gilpatrick, T., Lee, I., Graham, J. E., Raimondeau, E., Bowen, R., Heron, A., Downs, B., Sukumar, S., Sedlazeck, F. J. & Timp, W. (2020). Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nature biotechnology*, 38 (4): 433-438.
- Goers, L., Freemont, P. & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*, 11 (96): 20140065.
- Goto, M., Omi, R., Nakagawa, N., Miyahara, I. & Hirotsu, K. (2004). Crystal structures of CTP synthetase reveal ATP, UTP, and glutamine binding sites. *Structure*, 12 (8): 1413-23. doi: 10.1016/j.str.2004.05.013.
- Grigg, J. C., Cooper, J. D., Cheung, J., Heinrichs, D. E. & Murphy, M. E. P. (2010). The *Staphylococcus aureus* Siderophore Receptor HtsA Undergoes Localized Conformational Changes to Enclose Staphyloferrin A in an Arginine-rich Binding Pocket. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (15): 11162-11171. doi: 10.1074/jbc.M109.097865.
- Grimminger, F., Rose, F., Sibelius, U., Meinhardt, M., Pöttsch, B., Spriestersbach, R., Bhakdi, S., Suttorp, N. & Seeger, W. (1997). Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol*, 159 (4): 1909-16.
- Grosser, M. R. & Richardson, A. R. (2016). Method for Preparation and Electroporation of *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Methods Mol Biol*, 1373: 51-7. doi: 10.1007/7651\_2014\_183.
- Guzzo, M., Castro, L. K., Reisch, C. R., Guo, M. S. & Laub, M. T. (2020). A CRISPR Interference System for Efficient and Rapid Gene Knockdown in *Caulobacter crescentus*. *mBio*, 11 (1). doi: 10.1128/mBio.02415-19.
- Hammer, N. D. & Skaar, E. P. (2011). Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu Rev Microbiol*, 65: 129-47. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102851.
- Harcombe, W. (2010). NOVEL COOPERATION EXPERIMENTALLY EVOLVED BETWEEN SPECIES. *Evolution*, 64 (7): 2166-2172. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00959.x>.
- Horton, R. M. (1995). PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol*, 3 (2): 93-9. doi: 10.1007/bf02789105.
- Huff, E. & Silverman, C. S. (1968). Lysis of *Staphylococcus aureus* cell walls by a soluble staphylococcal enzyme. *J Bacteriol*, 95 (1): 99-106. doi: 10.1128/jb.95.1.99-106.1968.
- Haag, A. F., Fitzgerald, J. R. & Penades, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiol Spectr*, 7 (3). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019.

- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G. A., Powers, M. E., Frank, K. M., Wang, Y. & Bubeck Wardenburg, J. (2011). A *Staphylococcus aureus* pore-forming toxin subverts the activity of ADAM10 to cause lethal infection in mice. *Nat Med*, 17 (10): 1310-4. doi: 10.1038/nm.2451.
- Jevons, M. P. (1961). "Celbenin" - resistant Staphylococci. *British Medical Journal*, 1 (5219): 124-125.
- John, J., George, S., Nori, S. R. C. & Nelson-Sathi, S. (2019). Phylogenomic Analysis Reveals the Evolutionary Route of Resistant Genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol Evol*, 11 (10): 2917-2926. doi: 10.1093/gbe/evz213.
- Josse, J., Velard, F. & Gangloff, S. C. (2015). *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol*, 5: 85. doi: 10.3389/fcimb.2015.00085.
- Kadlec, K., Fessler, A. T., Hauschild, T. & Schwarz, S. (2012). Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, 18 (8): 745-55. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03842.x.
- Kick, L., Kirchner, M. & Schneider, S. (2017). CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials. *Bioengineered*, 8 (3): 280-286. doi: 10.1080/21655979.2017.1299834.
- Kim, H. & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 15 (5): 321-34. doi: 10.1038/nrg3686.
- Kim, H. J., Boedicker, J. Q., Choi, J. W. & Ismagilov, R. F. (2008). Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (47): 18188-18193. doi: doi:10.1073/pnas.0807935105.
- Kjos, M. (2019). Transcriptional Knockdown in Pneumococci Using CRISPR Interference. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. doi: 10.1007/978-1-4939-9199-0\_8.
- Krömker, V. & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 52 Suppl 3: 21-29. doi: 10.1111/rda.13032.
- Lahr, D. J. & Katz, L. A. (2009). Reducing the impact of PCR-mediated recombination in molecular evolution and environmental studies using a new-generation high-fidelity DNA polymerase. *Biotechniques*, 47 (4): 857-866.
- Lauritsen, I., Willemoës, M., Jensen, K. F., Johansson, E. & Harris, P. (2011). Structure of the dimeric form of CTP synthase from *Sulfolobus solfataricus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67 (Pt 2): 201-8. doi: 10.1107/s1744309110052334.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (62): e3923.
- Li, W., Ruf, S. & Bock, R. (2011). Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. *Plant Mol Biol*, 76 (3-5): 443-51. doi: 10.1007/s11103-010-9678-4.
- Lindsay, J. A. & Holden, M. T. (2004). *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends in microbiology*, 12 (8): 378-385.
- Lindsay, J. A. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 300 (2-3): 98-103. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013.
- Lindsay, J. A. (2014). *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. *Int J Med Microbiol*, 304 (2): 103-9. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.11.010.
- Liu, I., Liu, M. & Shergill, K. (2006). The Effect of Spheroplast Formation on the Transformation Efficiency in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 9: 81-85.

- Liu, X., Kimmey, J. M., Matarazzo, L., de Bakker, V., Van Maele, L., Sirard, J. C., Nizet, V. & Veening, J. W. (2021). Exploration of Bacterial Bottlenecks and *Streptococcus pneumoniae* Pathogenesis by CRISPRi-Seq. *Cell Host Microbe*, 29 (1): 107-120 e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.10.001.
- Long, C. W. & Pardee, A. B. (1967). Cytidine triphosphate synthetase of *Escherichia coli* B. I. Purification and kinetics. *J Biol Chem*, 242 (20): 4715-21.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* (63): e3998. doi: 10.3791/3998.
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*, 339 (8): 520-532. doi: 10.1056/NEJM199808203390806.
- Lu, Y., Xiao, S., Yuan, M., Gao, Y., Sun, J. & Xue, C. (2018). Using overlap-extension PCR technique to fusing genes for constructing recombinant plasmids. *J Basic Microbiol*, 58 (3): 273-276. doi: 10.1002/jobm.201700455.
- Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, S. & Wernérus, H. (2007). Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *Journal of applied microbiology*, 102 (3): 736-747.
- Meng, Q., Turnbough, C. L., Jr. & Switzer, R. L. (2004). Attenuation control of *pyrG* expression in *Bacillus subtilis* is mediated by CTP-sensitive reiterative transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (30): 10943-8. doi: 10.1073/pnas.0403755101.
- 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.
- Mori, G., Chiarelli, L. R., Esposito, M., Makarov, V., Bellinzoni, M., Hartkoorn, R. C., Degiacomi, G., Boldrin, F., Ekins, S., de Jesus Lopes Ribeiro, A. L., et al. (2015). Thiophenecarboxamide Derivatives Activated by EthA Kill *Mycobacterium tuberculosis* by Inhibiting the CTP Synthetase PyrG. *Chem Biol*, 22 (7): 917-27. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.05.016.
- Nygaard, T. K., Pallister, K. B., DuMont, A. L., DeWald, M., Watkins, R. L., Pallister, E. Q., Malone, C., Griffith, S., Horswill, A. R., Torres, V. J., et al. (2012). Alpha-toxin induces programmed cell death of human T cells, B cells, and monocytes during USA300 infection. *PLoS One*, 7 (5): e36532. doi: 10.1371/journal.pone.0036532.
- Ogston, A. (1881). Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *The British Medical Journal*, 1 (1054): 369-375. doi: 10.1136/bmj.1.1054.369.
- Ogston, A. (1882). Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol*, 16 (Pt 4): 526-567.
- Olde Riekerink, R. G., Barkema, H. W., Kelton, D. F. & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*, 91 (4): 1366-77. doi: 10.3168/jds.2007-0757.
- Osterås, O., Sølverød, L. & Reksen, O. (2006). Milk culture results in a large Norwegian survey--effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *J Dairy Sci*, 89 (3): 1010-23. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1.
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr Opin Microbiol*, 17: 32-7. doi: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
- Parente, E., Ricciardi, A. & Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *International Dairy Journal*, 107. doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104714.
- Park, S. T. & Kim, J. (2016). Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurol J*, 20 (Suppl 2): S76-83. doi: 10.5213/inj.1632742.371.
- Persing, D. H. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol*, 29 (7): 1281-5. doi: 10.1128/jcm.29.7.1281-1285.1991.

- Peton, V. & Le Loir, Y. (2013). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect Genet Evol*, 21: 602-15. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.011.
- Pinho, M. G., Kjos, M. & Veening, J. W. (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 11 (9): 601-14. doi: 10.1038/nrmicro3088.
- Porcellato, D., Meisal, R., Bombelli, A. & Narvhus, J. A. (2020). A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. *Sci Rep*, 10 (1): 21608. doi: 10.1038/s41598-020-77054-6.
- Porcellato, D., Smistad, M., Bombelli, A., Abdelghani, A., Jorgensen, H. J. & Skeie, S. B. (2021a). Longitudinal Study of the Bulk Tank Milk Microbiota Reveals Major Temporal Shifts in Composition. *Front Microbiol*, 12: 616429. doi: 10.3389/fmicb.2021.616429.
- Porcellato, D., Smistad, M., Skeie, S. B., Jorgensen, H. J., Austbø, L. & Oppegaard, O. (2021b). Whole genome sequencing reveals possible host species adaptation of *Streptococcus dysgalactiae*. *Scientific Reports*, 11 (1): 17350. doi: 10.1038/s41598-021-96710-z.
- 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.
- QIAGEN. (2005). *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. [https://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN\\_QIAGENPlasmidPurification\\_EN.pdf](https://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAGENPlasmidPurification_EN.pdf).
- Ramesh, R., Munshi, A. & Panda, S. K. (1992). Polymerase chain reaction. *Natl Med J India*, 5 (3): 115-9.
- Rantala, S. (2014). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* bacteremia: an emerging infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33 (8): 1303-1310. doi: 10.1007/s10096-014-2092-0.
- Rato, M. G., Nerlich, A., Bergmann, R., Bexiga, R., Nunes, S. F., Vilela, C. L., Santos-Sanches, I. & Chhatwal, G. S. (2011). Virulence gene pool detected in bovine group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates by use of a group A *S. pyogenes* virulence microarray. *J Clin Microbiol*, 49 (7): 2470-9. doi: 10.1128/jcm.00008-11.
- Reksen, O., Sølverød, L., Branscum, A. J. & Osterås, O. (2006). Relationships between milk culture results and treatment for clinical mastitis or culling in Norwegian dairy cattle. *J Dairy Sci*, 89 (8): 2928-37. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72565-6.
- Roy, B., Zhao, J., Yang, C., Luo, W., Xiong, T., Li, Y., Fang, X., Gao, G., Singh, C. O., Madsen, L., et al. (2018). CRISPR/Cascade 9-Mediated Genome Editing-Challenges and Opportunities. *Front Genet*, 9: 240. doi: 10.3389/fgene.2018.00240.
- Ruegg, P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci*, 100 (12): 10381-10397. doi: 10.3168/jds.2017-13023.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2006). Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride. *CSH Protoc*, 2006 (1). doi: 10.1101/pdb.prot3932.
- Schoenfelder, S. M., Dong, Y., Fessler, A. T., Schwarz, S., Schoen, C., Kock, R. & Ziebuhr, W. (2017). Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Vet Microbiol*, 200: 79-87. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.04.019.
- Schreier, H. J., Caruso, S. M. & Maier, K. C. (2000). Control of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase expression by *glnR* from *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*, 41 (6): 425-9. doi: 10.1007/s002840010162.



- Sharma, N., Singh, N. K. & Bhadwal, M. S. (2010). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24 (3): 429-438.
- Sheppard, S. K., Guttman, D. S. & Fitzgerald, J. R. (2018). Population genomics of bacterial host adaptation. *Nat Rev Genet*, 19 (9): 549-565. doi: 10.1038/s41576-018-0032-z.
- Sollid, J. U., Furberg, A. S., Hanssen, A. M. & Johannessen, M. (2014). *Staphylococcus aureus*: determinants of human carriage. *Infect Genet Evol*, 21: 531-41. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.020.
- Sorg, R. A., Lin, L., van Doorn, G. S., Sorg, M., Olson, J., Nizet, V. & Veening, J. W. (2016). Collective Resistance in Microbial Communities by Intracellular Antibiotic Deactivation. *PLoS Biol*, 14 (12): e2000631. doi: 10.1371/journal.pbio.2000631.
- Sorg, R. A., Gallay, C., Van Maele, L., Sirard, J. C. & Veening, J. W. (2020). Synthetic gene-regulatory networks in the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117 (44): 27608-27619. doi: 10.1073/pnas.1920015117.
- Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P. L., Horswill, A. R., Leung, D. Y. & Schlievert, P. M. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 26 (3): 422-47. doi: 10.1128/cmr.00104-12.
- Speziali, C. D., Dale, S. E., Henderson, J. A., Vines, E. D. & Heinrichs, D. E. (2006). Requirement of *Staphylococcus aureus* ATP-binding cassette-ATPase FhuC for iron-restricted growth and evidence that it functions with more than one iron transporter. *J Bacteriol*, 188 (6): 2048-55. doi: 10.1128/JB.188.6.2048-2055.2006.
- Stamsas, G. A., Myrbraten, I. S., Straume, D., Salehian, Z., Veening, J. W., Havarstein, 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.
- Tam, K. & Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr*, 7 (2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D. & Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol*, 13 (9): 529-43. doi: 10.1038/nrmicro3521.
- Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. & Fowler, V. G., Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28 (3): 603-61. doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- Vieira, V. V., Teixeira, L. M., Zahner, V., Momen, H., Facklam, R. R., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. & Castro, A. C. D. (1998). Genetic relationships among the different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48 (4): 1231-1243. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1231>.
- VWR LIFE SCIENCE. (2017). VWR Red Taq DNA Polymerase Master Mix. [https://no.vwr.com/assetsvc/asset/no\\_NO/id/21936874/contents](https://no.vwr.com/assetsvc/asset/no_NO/id/21936874/contents).
- Weaver, J. C. & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41 (2): 135-160. doi: [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05062-3](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05062-3).
- Wendlandt, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Li, B., Zhang, W. J., Fessler, A. T., Wu, C. & Schwarz, S. (2015). Multidrug resistance genes in staphylococci from animals that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. *Trends Microbiol*, 23 (1): 44-54. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.002.
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus*



## Referanser

- infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5 (12): 751-762. doi: 10.1016/s1473-3099(05)70295-4.
- Whist, A. C. & Sølverød, L. (2017). *Jurhelse*. 3. utg.: Tine Rådgiving, Fagavdelingen.
- Willemoës, M., Mølgaard, A., Johansson, E. & Martinussen, J. (2005). Lid L11 of the glutamine amidotransferase domain of CTP synthase mediates allosteric GTP activation of glutaminase activity. *Febs j*, 272 (3): 856-64. doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04525.x.
- Williams, R. E. (1963). Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev*, 27 (1): 56-71.
- Yoshida, T., Nasu, H., Namba, E., Ubukata, O. & Yamashita, M. (2012). Discovery of a compound that acts as a bacterial PyrG (CTP synthase) inhibitor. *J Med Microbiol*, 61 (Pt 9): 1280-1285. doi: 10.1099/jmm.0.046052-0.
- Zecconi, A. & Scali, F. (2013). *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett*, 150 (1-2): 12-22. doi: 10.1016/j.imlet.2013.01.004.
- 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.
- Østerås, O. (2016). *Helsekortordningen, storfe 2016 - statistikkksamling*. TINE Rådgiving/Helsetjenesten for storfe.



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway