



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Rollen til RseP i biofilmdannelse og stresstoleranse i *Staphylococcus haemolyticus*

The role of RseP in biofilm formation and stress
tolerance in *Staphylococcus haemolyticus*

Linn Ustvedt Brechan

Bioteknologi

Forord

Denne oppgaven er skrevet som en del av en mastergrad i bioteknologi ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Oppgaven er basert på laboratoriearbeid utført ved Avdeling for mikrobiologi (MIK) ved Oslo Universitetssykehus og ved Laboratorium for mikrobiell genteknologi (LMG) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet i perioden august 2022 til mai 2023, veiledet av professor Dzung Bao Diep, Dr. Ingrun Alseth, førsteamanuensis Morten Kjos, og Ph.d.-kandidat Thomas F. Oftedal. Det å fullføre denne oppgaven har vært en givende og krevende opplevelse, og jeg vil benytte anledningen til å takke alle som har bidratt til oppgavens ferdigstillelse.

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere, Dzung, Ingrun, Thomas og Morten, for deres uvurderlige støtte og veiledning gjennom hele prosessen. Ingrun ga meg tillit og støtte fra dag én og bidro til å gi meg trygghet og motivasjon selv i de mest krevende stundene. Thomas, som kom inn midtveis i oppgaven, har gjort en fenomenal jobb med sin kunnskap og hjelp, og Morten, som tok over ledelsen av LMG etter Dzungs bortgang, har vært en uvurderlig støtte og en inspirerende leder, som bidro til at overgangen til en hverdag uten Dzung som veileder ble så enkel som den kunne få blitt.

Jeg vil også rette en stor takk til de ansatte på MIK, som har gitt meg verdifull støtte og hjelp når jeg har hatt behov for det. Jeg har følt meg velkommen og tatt imot med åpne armer, og det har gjort en stor forskjell for meg gjennom denne perioden. Jeg vil også takke alle på LMG som har bidratt med uvurderlig hjelp på lab, og som har gjort min forskningsopplevelse både lærerik og minneverdig.

En spesiell takk går til Emilie Victoria Jensen, min sparringspartner gjennom hele oppgaven. Emilie har vært en uvurderlig støtte, en god venn og samtalepartner. Jeg har satt utrolig stor pris på hennes tilbakemeldinger og drøftinger, og jeg kunne ikke gjort dette uten henne.

Til slutt vil jeg takke Dzung, som dessverre gikk bort så alt for tidlig midtveis i oppgaven. Dzung var hjernen bak prosjektet, og jeg lærte utrolig mye av ham. Selv om han ikke kunne være fysisk til stede underveis, har hans innflytelse og veiledning vært til stor hjelp og inspirasjon. Hvil i fred Dzung.

Ski, mai 2023

Linn Ustvedt Brechan

Sammendrag

Staphylococcus haemolyticus er en bakterie som er en del av den vanlige hudmikrobiotaen til mennesker. Samtidig er den ofte en årsak til infeksjoner hos mennesker med nedsatt immunforsvar eller personer med medisinske implantater. Blant koagulasenegative stafylokokker er denne arten en av de som oftest isoleres fra kliniske blodprøver. I tillegg til sin evne til å danne biofilm er antibiotikaresistens stadig mer utbredt hos *S. haemolyticus*, noe som gjør behandling utfordrende. Derfor har bakteriociner blitt undersøkt som en mulig tilleggshandling og/eller alternativ til antibiotika i behandling av infeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus*. Spesielt lovende er medlemmer av en familie bakteriociner kalt LsbB familien. Disse bakteriocinene har en enkel og liten struktur, og er derfor relativt enkle å modifisere og syntetisere. Ved hjelp av peptiddesign ble bakteriocinet hybrid 1 (H1) konstruert ved å kombinere sekvenser fra to forskjellige bakteriociner fra LsbB familien. Dette nye konstruerte bakteriocinet er vist å ha spesielt god antimikrobiell aktivitet mot *S. haemolyticus*.

Bakteriocinet H1 er tenkt å interagere med membranproteinet regulator av sigma-E protease (RseP) for å drepe målcellen, og en mutasjon i dette genet som endrer struktur og/eller interagerende aminosyrer gjør at bakteriocinet ikke lenger fungerer. Funksjonen til RseP i *S. haemolyticus* er ikke kjent, og det er sett at spontane mutasjoner i *rseP* genet lett kan oppstå. RseP er kjent å være involvert i blant annet stressrespons, virulens, og biofilmdannelse hos en rekke bakterier, og det antas derfor at resistensutvikling kommer på bekostning av levedyktighet og virulens.

Formålet med dette studiet var å undersøke om *S. haemolyticus* uten RseP, som er resistente mot H1, hadde redusert motstandsdyktighet, i form av sensitivitet mot ulike kjemiske stoffer og antibiotika. Det ble også undersøkt forskjeller i evnen til å danne biofilm. For å få bedre innsikt i de molekylære mekanismene bak forskjellene ble genuttrykk mellom mutant og villtype av utvalgte gener målt med revers transkripsjon (RT) kvantitativ PCR (qPCR).

I arbeidet ble det isolert muterte stammer av *S. haemolyticus* resistente mot H1, og sekvensering av disse viste at alle hadde mutasjoner knyttet til *rseP*. Fenotypiske tester viste at *rseP* mutantene hadde lavere motstandsdyktighet mot stress og betydelig svekket evne til å danne biofilm. Analyse av genuttrykk viste at villtypen kan respondere på stressende forhold ved å oppregulere *srrA* og nedregulere *ecsB*, noe som ikke ble sett hos *rseP* mutanten. Det ble også sett at genuttrykk var høyere for mutanten enn det sett for villtypen, noe som tyder på

at normalt uttrykk av disse genene avhenger av funksjonelt RseP. Disse funnene gir verdifull innsikt i bruken av bakteriocinet H1 til behandling av infeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus*, samt konsekvensene av resistente celler. Videre kan studien bidra til en dypere forståelse av de mekanismene som reguleres av RseP, og hvordan proteinet kan brukes som et antimikrobielt mål. Dette vil kunne ha betydning for utviklingen av nye og mer effektive behandlingsmetoder for infeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus*.

Abstract

Staphylococcus haemolyticus is a commensal bacterium that is part of the normal skin microbiota of humans. At the same time, it is often a cause of infections in people with weakened immune systems or people with medical implants. Among coagulase-negative staphylococci, this species is one of those most frequently from clinical blood samples. In addition to its ability to form biofilms, antibiotic resistance is becoming more widespread in *S. haemolyticus*, which makes treatment challenging. Therefore, bacteriocins have been investigated as a possible adjunctive treatment and/or alternative to antibiotics for the treatment of infections caused by *S. haemolyticus*. Particularly promising are members of a family of bacteriocins called the LsbB family. These bacteriocins are small, have a simple structure and are therefore relatively easy to modify and synthesize. Using peptide design, the bacteriocin hybrid 1 (H1) was constructed by combining sequences from two different bacteriocins from the LsbB family. This new engineered bacteriocin has been shown to have particularly good antimicrobial activity against *S. haemolyticus*.

The bacteriocin H1 has been thought to interact with the membrane protein regulator of sigma-E protease (RseP) to kill the target cell, and mutations in this gene that change the structure and/or interacting amino acids render cells resistant to the bacteriocin. The function of RseP in *S. haemolyticus* is not well understood, and it has been observed that spontaneous mutants of *rseP* can arise easily. RseP is known to be involved in, among other functions, stress response, virulence, and biofilm formation in several species, and it is therefore likely that resistance carry a fitness cost, such as reduced fitness and virulence.

The aim of this study was to investigate whether *S. haemolyticus* with mutated RseP, which is resistant to H1, had increased susceptibility to various chemical substances and antibiotics. Differences in the ability to form biofilms were also investigated. To gain better insight into the molecular mechanisms behind the differences, gene expression between mutant and wild type of selected genes was measured by reverse transcription quantitative PCR.

In the work, *S. haemolyticus* strains resistant to H1 were isolated, and sequencing of these showed that all had a mutation associated with *rseP*. Phenotypic tests showed that *rseP* mutants had lower resistance to stress and a significantly reduced ability to form biofilm. Analysis of gene expression showed that the wild type can respond to stressful conditions by upregulating *srrA* and downregulating *ecsB*, which was not observed for the *rseP* mutant. It was also noted that gene expression was higher for the mutant than that seen for the wild type,

which suggests that normal expression of these genes depends on functional RseP. These findings provide valuable insight into the use of the bacteriocin H1 in the treatment of infections caused by *S. haemolyticus*, as well as the consequences of resistant cells. Further, this study contributes to a deeper understanding of the mechanisms regulated by RseP, and how the protein can be used as an antimicrobial target. This could have an impact on the development of new and more effective treatment methods for infections caused by *S. haemolyticus*.

Forkortelser

aa – Aminosyre
BHI – Hjerne hjerteinfusjon
CoNS – Koagulasenegative stafylokokker
CoPS – Koagulasepositive stafylokokker
ECF – Ekstracytoplasmisk funksjon
EcsAB – Effekt på eksoproteiner, defekt i kompetanse og sporulering
EntEJ97 – Enterocin EJ97
EntK1 – Enterocin K1
EntQ – Enterocin Q
FIC – Fraksjonell hemmende konsentrasjon
GarKS – Garvicin KS
gDNA – Genomisk DNA
H1 – Hybrid 1
HYP – Hypotetisk protein
MIC – Minste hemmende konsentrasjon
Min – Minutter
MP1 – Micrococcin P1
MRE – Membran gjennomtrengende
NisA – Nisin A
NK – Negativ kontroll
PCR – Polymerasekjedereaksjon
PK – Positiv kontroll
PSM – Fenolløselige moduliner
qPCR – Kvantitativ PCR
RIP – Regulert-intramembran proteolyse
RNAP – RNA polymerase
RseP – Regulator av sigma-E protease
RT – Rever transkripsjon
s – sekunder
S1P – Posisjon-1-protease
S2P – Posisjon-2-protease
SNP – Enkelt nukleotidpolymorfi
SrrAB – Stafylokokk respiratorisk respons AB
TSB-G – Tryptisk soya medium med 1 % glukose
WT – villtype

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
1.2 Virulens	1
1.3 Miljøtilpasning hos bakterier	3
1.4 RseP	4
1.5 Bakteriociner	7
1.6 Mål med oppgaven	10
2. Materiale og metode	11
2.1 Bakteriestammer, lagring og kultivering	11
2.2 Spot-on-lawn assay	11
2.3 Propidiumjodid poredannelse	12
2.4 Sensitivitetstesting	12
2.5 Synergieffekt	13
2.6 Vekstforsøk	14
2.7 Biofilmdannelse	14
2.8 Sekvensering av <i>rseP</i>	15
2.9 Helgenomsekvensering	16
2.10 RT-qPCR	16
2.11 Statistiske analyser	18
3. Resultater	19
3.1 Isolering av H1 resistente <i>S. haemolyticus</i>	19
3.2 H1 resistente stammer av <i>S. haemolyticus</i> har mutasjon i <i>rseP</i>	19
3.3 GarKS lager porer i cellemembranen til <i>S. haemolyticus</i>	20
3.4 RseP påvirker motstandsdyktigheten til <i>S. haemolyticus</i> mot GarKS	21
3.5 RseP er viktig for vekst under stressende forhold	22
3.6 RseP er ikke involvert i sensitivitet mot et utvalg antibiotika i <i>S. haemolyticus</i>	24
3.7 To-komponentbehandling av <i>S. haemolyticus</i> WT og mutanter gir additiv effekt	25
3.8 RseP er viktig for evnen til å danne biofilm	26
3.9 RseP er involvert i genreguleringen av <i>ecsB</i> og <i>srrA</i>	27
4. Diskusjon	28
5. Konklusjon og videre arbeid	34
6. Referanser	35
7. Vedlegg	40

1. Introduksjon

1.1 *Staphylococcus haemolyticus*

Staphylococcus er en slekt av Gram-positive bakterier. Vanligvis deles denne slekten inn i koagulasepositive stafylokokker (CoPS) og koagulasenegative stafylokokker (CoNS), avhengig av deres evne til å koagulere blod eller plasma. *Staphylococcus aureus* regnes som den viktigste CoPS patogene arten¹. Blant CoNS artene regnes de fleste for å være kommensale bakterier, mens noen kan forårsake infeksjoner². Den største gruppen av bakterier som er involvert i opportunistiske infeksjoner er *Staphylococcus epidermidis* gruppen som består av artene *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis*, og *Staphylococcus warneri*³. Blant disse er *S. haemolyticus* arten som nest hyppigst blir isolert fra kliniske blodprøver³. Spesielt kritisk er *S. haemolyticus* sin rolle i infeksjoner knyttet til personer med nedsatt immunforsvar, og som følge av biofilmdannelse på medisinske implantater⁴. Dette gjør at forskning knyttet til *S. haemolyticus* sine regulatoriske systemer, stressrespons og virulens, samt hvordan disse kan utnyttes for effektiv behandling har fått stadig større fokus.

1.2 Virulens

Det har lenge vært få kjente virulensfaktorer hos *S. haemolyticus* og andre CoNS. Antallet sekvenserte CoNS-stammer har imidlertid økt de siste årene, noe som har ført til et høyere antall identifiserte virulensfaktorer. Blant disse anses biofilmdannelse for å være den viktigste virulensfaktoren⁵. Den har også ulike festemolekyler, slik som fibronectin-bindende protein, noe som bidrar til bakteriens evne til å feste seg på verten og medisinsk utstyr⁶. Det er også funnet gener som koder for hemolysin i nosokomiale *S. haemolyticus*, noe som gir bakterien en hemolytisk, nekrotisk og nevrotoksisk egenskap⁷. Proteaser er også funnet som viktige virulensfaktorer hos *S. haemolyticus*, blant disse er det funnet serinproteaser og metalloproteaser³. I tillegg anses resistens mot antibiotika som en viktig egenskap som bidrar til bakteriens virulens⁵.

Biofilmdannelse anses for å være den viktigste virulensfaktoren til CoNS. Biofilm er strukturelle samfunn av mikroorganismer, der mikroorganismene er festet til hverandre og til underlaget, og er innebygd i en struktur bestående av ekstracellulære polymere stoffer.

Biofilm produsert av *S. haemolyticus* består i hovedsak av protein og DNA^{8,9}. I tillegg til at

biofilmdannelse tillater bakteriene å feste til både biotiske og abiotisk overflater, bidrar biofilmdannelse til å beskytte bakteriene mot både antibiotika og vertens immunrespons¹⁰.

Biofilmdannelse er i hovedsak en respons på bakteriens tilstedeværelse i et ugunstig miljø, der et koordinert genuttrykk endres hos bakteriene som følge av stress og quorum sensing¹¹. Flertrinnsprosessen som igangsettes av endringen i genuttrykk kan deles inn i tre faser; feste til en overflate, modning til en kompleks og flercellet struktur, og spredning av celler til miljøet¹². I det første steget fester frie celler seg til en overflate, før celledeling og aggregering bidrar til å lage den komplekse biofilmstrukturen. I modningsfasen blir det produsert ekstracellulære polymere stoffer som bidrar til feste cellene sammen, og er bestanddelen av den beskyttende matrisen¹². I tillegg er fenolløselige moduliner (PSM) viktige for å bygge opp matrisen av ekstracellulære polymere, blant annet ved å danne kanaler i biofilmen slik at næringsstoffer kan transporteres gjennom alle lagene i biofilmen¹³. Til slutt spres celler fra biofilmen til miljøet i form av celleklynger, der denne fasen bidrar til spredning av biofilmen, samt sykdomsoverføring¹².

I tillegg til CoNS sin evne til å danne biofilm er det funnet flere gener som koder for antibiotikaresistens, noe som gjør at behandling mot bakterier som *S. haemolyticus* er svært utfordrende. *S. haemolyticus* er spesielt kjent for være resistent mot meticillin og glykopeptidantibiotika, og *S. haemolyticus* var den første Gram-positive arten der det ble oppdaget resistens mot glykopeptider^{1,3}. Det er observert at *S. haemolyticus* har uvanlig stor genomplastisitet, med et stort antall inversjoner og enkeltnukleotidpolymorfismer (SNP) som bidrar til bakterien sin antibiotikaresistens³. Det er blant annet funnet resistens mot vankomycin og teikoplanin hos *S. haemolyticus*, noe som er sjeldent hos andre arter av *Staphylococcus*¹. Dette gjør at infeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus* er utfordrende å behandle og i tillegg er det knyttet bekymring til *S. haemolyticus* sin evne til å spre gener for resistens til andre beslektede arter, slik som *S. aureus*.

Det er har vært antydnet at *S. haemolyticus* fungerer som et reservoar for antibiotikaresistensgener for andre stafylokokk arter, slik som *S. aureus*. Resistensen mot meticillin og andre penicillin-antibiotika er vist å være koblet til tilstedeværelsen av genet *mecA*¹⁴. Dette genet koder for en modifisert transpeptidase (penicillin-bindende protein) som gjør bakterien resistent mot meticillin¹. Det er gjort analyser av gensekvenser av *mecA* genet i *S. aureus*, *S. haemolyticus* og *S. epidermidis*, noe som har vist 99,95% likhet i genet mellom artene¹. Dette bidrar med å styrke teorien om at *S. haemolyticus* kan bidra til å spre antibiotikaresistensgener til andre *Staphylococcus* arter.

1.3 Miljøtilpasning hos bakterier

S. haemolyticus er art som er svært tilpasningsdyktig, noe som tydeliggjøres med eksempelvis artens evne til å danne biofilm under ugunstige forhold, og dens evne til å tilegne seg resistens mot antibiotika. Bakterien reagerer raskt på ugunstige endringer ved å endre genuttrykk, slik at den er mer motstandsdyktig mot stresset påført fra omgivelsene. Slik regulering i bakterier styres ofte av to-komponentsystemer som reagerer på en stimuli fra miljøet. Slike systemer består av en histidinkinase og en responsregulator. Histidinkinasen er ofte et transmembranprotein som registrerer signaler fra miljøet og overfører en fosfatgruppe til responsregulatoren, som følge av dette binder responsregulatoren på DNAet og bidrar til å regulere uttrykk av forskjellige gener¹⁵.

Ettersom det fremdeles er gjort lite undersøkelser på *S. haemolyticus* er det manglende kunnskap om genreguleringen ved stress, og om mulige to-komponentsystemer som bidrar til riktig stressregulering. Likevel er det mye kunnskap om dette i *S. aureus*, og det antas at noe av denne kunnskapen kan overføres til *S. haemolyticus*. Et slikt to-komponentsystem funnet hos *S. aureus* er stafylokokk respiratorisk respons AB (SrrAB)-systemet. Dette systemet består av SrrA og SrrB, der SrrA er funnet i cytoplasma og fungerer som en responsregulator, mens SrrB er lokalisert i cellemembranen og fungerer som en histidinkinase¹⁶. I dette systemet reagerer SrrB på endringer i oksygenivået som fører til fosforylering av SrrA, som igjen påvirker uttrykket av gener som koder for forskjellige virulensfaktorer¹⁷. Blant annet er det vist at SrrAB-systemet som respons på redusert respirasjonsaktivitet aktiverer uttrykk av gener som er involvert i cellelysis og biofilmdannelse¹⁸. Denne mekanismen er derfor viktig for *S. aureus* sin evne til å tilpasse seg ulike vertsmiljøer, og også forårsake sykdom.

En annen måte genuttrykk blir regulert som følge av endringer i miljøet hos bakterier er med ekstracytoplasmisk funksjon (ECF) σ -faktorer, som regulerer genuttrykk ved å binde til RNA polymerase (RNAP), noe som tillater polymerasen å gjenkjenne spesifikke promotorsekvenser på DNAet. ECF σ -faktorer er ofte vist å kontrolleres av en anti- σ faktor som binder til σ -faktoren, noe som hindrer den i å binde til RNAP under ikke-induserende forhold¹⁹. Når bakterien utsettes for bestemte stimuli, som for eksempel stress, frigjøres σ -faktoren fra anti- σ faktoren ved proteolyse, noe som fører til at σ -faktoren kan binde til RNAP og initiere transkripsjon av målgener²⁰. Det er også vist at ECF σ -faktorer samhandler med to-komponentsystemer for å regulere genuttrykk. Eksempelvis er det vist at PhyK-PhyR fungerer som en positiv regulator av σ^T uttrykk og funksjon hos *Caulobacter crescentus*²¹. Dermed er

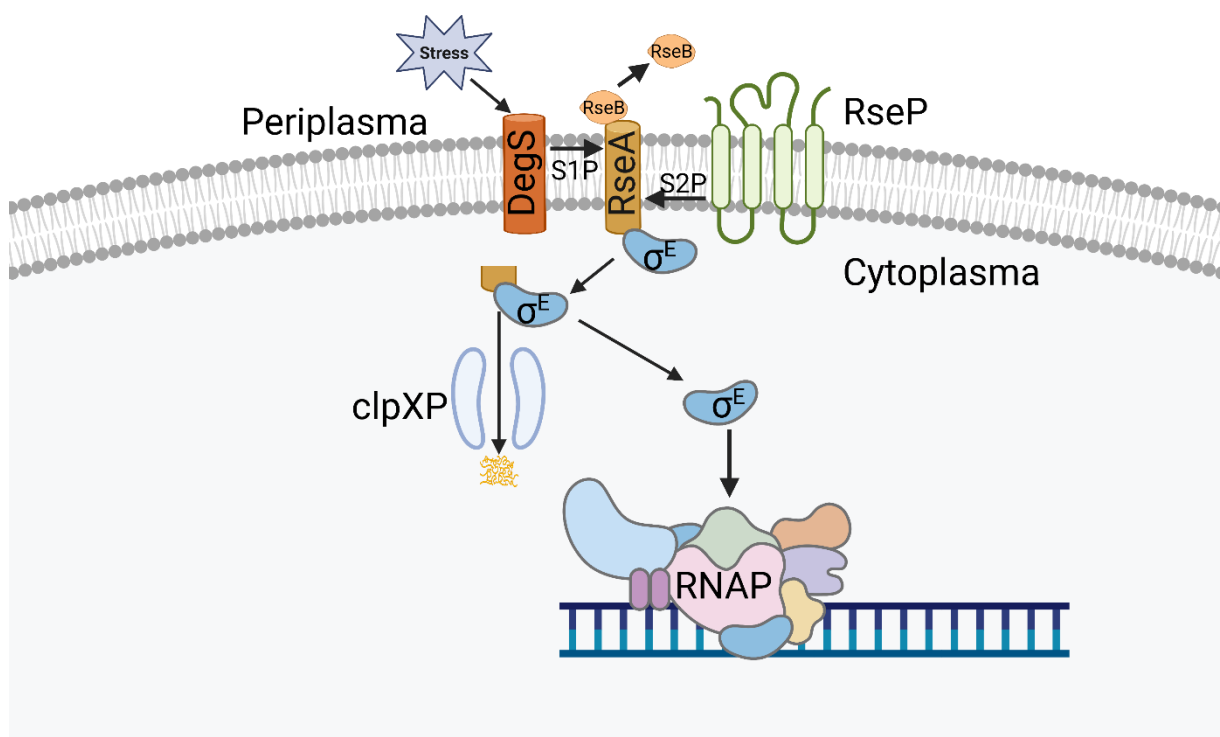
ECF σ -faktorer, i tillegg til to-komponentsystemer, viktige regulatorer av genuttrykk hos bakterier og er viktig i bakteriens evne til å tilpasse seg ulike miljøer.

Det er funnet flere slike σ -faktorer hos *S. aureus*, mens forskningen på dette området hos *S. haemolyticus* er begrenset. De ulike σ -faktorene som er funnet hos *S. aureus* er σ^A , σ^B , σ^H og σ^S , der de tre sistnevnte klassifiseres som alternative σ -faktorer²²⁻²⁵. σ^A er konserverv i alle bakterier, og fungerer som en transkripsjonsfaktor og er ansvarlig for hoveddelen av transkripsjonen ved normal vekst, og gjør den essensiell for bakteriens levedyktighet^{22,26}. σ^H er i *Bacillus subtilis* involvert i sporulering, mens overuttrykk av σ^H i *S. aureus* tyder på at denne σ -faktoren er involvert i regulering av gener som gjør cellen naturlig kompetente²⁴. Den mest beskrevne σ -faktoren hos *S. aureus* er σ^B , denne σ -faktoren har vist seg å være viktig i en rekke prosesser i *S. aureus*; blant annet motstandsdyktighet mot oksidativt stress, proteinsekresjon, biofilmdannelse, motstandsdyktighet mot medikamenter, stress tilpasning, i tillegg til utvikling av sykdom²⁷⁻³⁰. ECF σ -faktoren σ^S er funnet hos *S. haemolyticus* i tillegg til *S. aureus* og andre stafylokokk arter²⁵. Denne er vist å være viktig i stressresponsen til *S. aureus*, der den bidrar til å regulere gener som beskytter organismen mot ugunstige forhold. Spesielt viktig er denne faktoren i regulering av gener under langvarig sult og ved forhøyede temperaturer, i tillegg til at den er viktig i å modulere celleveggstabilitet²⁵. σ^S er også vist å være involvert i virulens hos *S. aureus*, der det ble observert lavere mortalitet hos mus smittet med stammer der σ^S var inaktivert²⁵. Hvordan aktiveringen av σ^S er regulert er ikke kjent.

1.4 RseP

Reguleringen av σ -faktorer er ofte koblet til såkalt regulert intramembran proteolyse (RIP) mekanisme. Dette er en mekanisme der et protein (e.g., anti- σ faktor) blir kløyd i to steg, der kløyving av en posisjon-1 protease (S1P) må komme før kløyvingen av en posisjon-2 protease (S2P). Kløyvingen av S2P skjer i transmembrane segmenter til proteinet, noe som frigjør den intracellulære delen av proteinet. Et eksempel på et protein som utfører slik proteolyse er regulator av sigma-E protease (RseP), tidligere kalt YaeL, som er funnet hos blant annet *Escherichia coli*³¹. Denne proteasen utfører posisjon-2 proteolyse (S2P) og er involvert i kløyving av anti- σ faktoren til σ^E kalt RseA. Ved vanlige forhold holdes σ^E inaktiv av RseA ved at den er forankret til den indre membranen. RseA er et membranprotein med et anti- σ domene i cytosol som vanligvis er bundet til et protein RseB³². Når bakterien utsettes for stress fører det til ufoldede eller feilfoldete proteiner i periplasma, noe som fører til aktivering av proteasen DegS som så utfører posisjon-1 kløyving i det periplasmiske domenet til RseA

(Figur 1.1)³³. RseB fungerer som en ekstra sensor som blokkerer kløyvingen av DegS når den er bundet RseA. RseB løsner fra RseA som en respons på frie lipopolysakkarider i periplasma³⁴. Etterfulgt av den første kløyvingen utfører RseP S2P for å frigi σ^E til cytoplasma, som til slutt blir aktivert av ClpXP^{35,36}. Dette fører til transkripsjon av gener som er involvert i bakteriens stressrespons³². Samme type mekanisme er også sett hos *B. subtilis* der σ^W reguleres av en RIP mekanisme der PrsW er S1P og RasP (RseP) er S2P³⁷. Et lignende system er funnet hos *Enterococcus faecalis* der RseP, også kjent som Eep, er involvert i kløyving av anti- σ faktoren til σ^V i respons på stress, og bidrar til motstandsdyktighet mot blant annet lysozym³⁸.



Figur 1.1 Oversiktsfigur for aktivering av σ^E i *E. coli* som svar på ekstracellulært stress. Stress fører til frigjøring av RseB og aktivering av DegS, som initierer første kløyving (S1P) av RseA. Dette gjør anti- σ^E tilgjengelig for RseP (S2P) som gjør at σ^E løsner til cytoplasma før en siste prosessering av ClpXP gir aktivt σ^E . Frigjort σ^E kan å binde til RNAP og initiere transkripsjon av stressrelaterte gener. Figuren er laget i BioRender.com

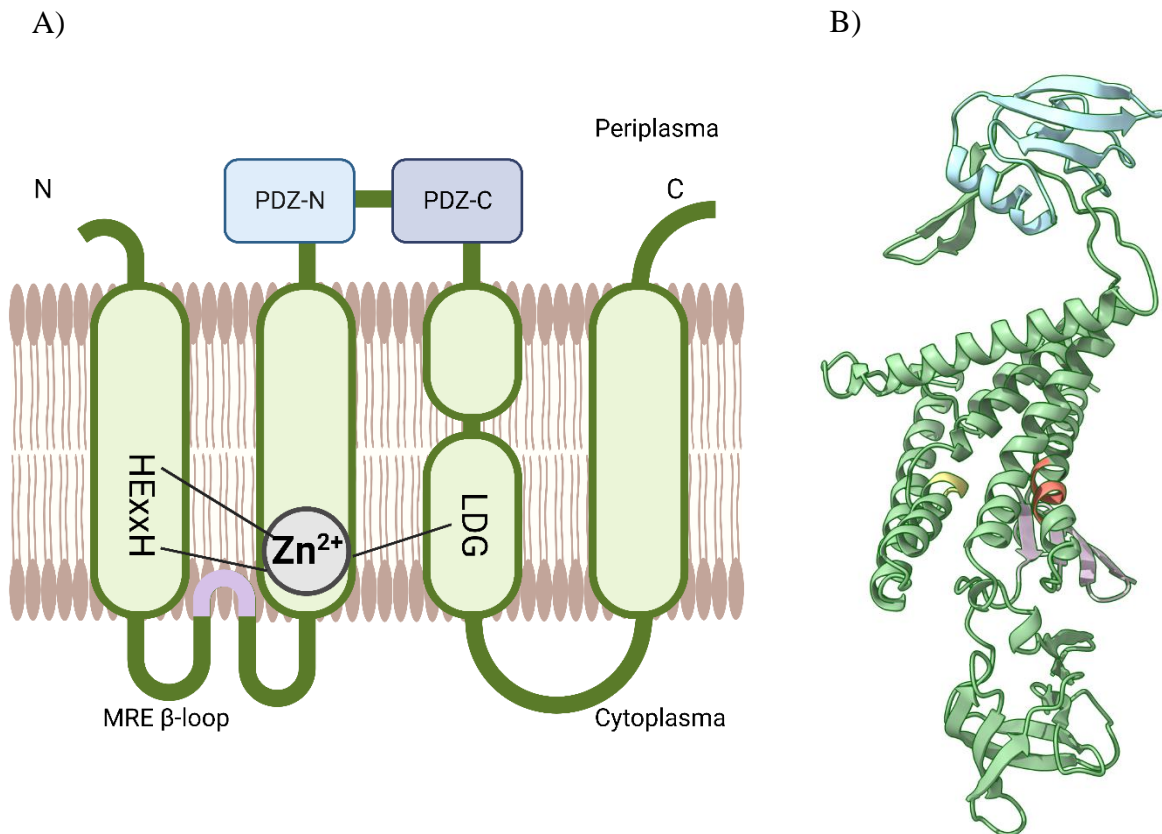
I tillegg til å være involvert i stressrespons hos *E. faecalis* har RseP tidligere vært vist å være involvert i modningen av flere peptidferomoner³⁹. Denne modningen skjer ved nedbrytning av lipoproteiner (forløper-peptid/protein) til små peptider som blir det aktive feromonet³⁹.

Utskillelse av disse feromonene skjer via en ABC-transporter PptAB som består av PptA og PptB, også kalt effekt på eksoproteiner, defekt i kompetanse og sporulering AB (EcsAB)⁴⁰.

Hos *E. faecalis* er det også vist at RseP aktiveres under tidlig bakteriell infeksjon og er vist som viktig i biofilmdannelse, der uttrykk av *rseP* ble økt under dannelse i biofilm, i tillegg til

at mutasjoner i *rseP* ga endret biofilmfenotype⁴¹. Lignende observasjoner er gjort i *S. aureus* der RseP er vist å være ansvarlig for prosesseringen av feromonet cAM373_SA⁴². I tillegg er det vist at RseP hos *S. aureus* bidrar til å feste bakteriecellene på epitelceller, i tillegg til at det er nødvendig for bekjempelse av neutrofiler og overlevelse ved infeksjon av *S. aureus*³⁸. For *S. haemolyticus* er rollen til RseP dårligere kjent. Det er vist at stammer med mutasjon i *ecsAB* har lignende fenotype som stammer med mutasjon i *rseP*⁴³. Dette tyder på at RseP kan ha en liknende rolle i *S. haemolyticus* som i artene beskrevet over, og at RseP og EcsAB er viktig for stressrespons og virulens også i denne arten.

RseP er klassifisert som en intramembran metalloprotease, og består av fire transmembrane segmenter⁴⁴. Det aktive setet ligger i et transmembrant område av proteinet, og består av et konserverte motiv HExxH i den N-terminale delen av proteinet (Figur 1.2A, B)⁴⁴. I tillegg er det et LDG motiv som er lokalisert i et annet transmembrant område som er foreslått å være bindingsstedet for substratet⁴². HExxH og LDG danner det aktive setet og det katalytiske senteret til RseP⁴². De to histidinresiduenes sammen med asparaginsyren koordinerer et sink ion som aktiverer et vannmolekyl som initierer et nukleofilt angrep på peptidbindingen i substratet⁴⁵. I tillegg består RseP av ett eller to koblede PDZ domener i periplasma, som er tenkt å være viktige i nedreguleringen av RseP⁴⁶. Det er foreslått at PDZ har forskjellige roller i moduleringen av RseP sin funksjon ved binding av enten forskjellige eller samme ligand⁴⁶. I tillegg består strukturen av en membran gjennomtrengende β -løkke (MRE β -loop), bestående av fire β -sheets som direkte interagerer med substratet og skyver det inn i det aktive setet⁴⁷.



Figur 1.2 RseP struktur i *E. coli* og *S. haemolyticus*. A) Skjematisk oversikt over RseP i *E. coli*. I den N-terminale enden av RseP finnes den konservative sekvensen HEXxH som koordinerer sink-ionet og som fungerer som aktivt sete sammen med LDG sekvensen. De to PDZ domeneene som regulerer RseP aktivitet er også vist, i tillegg til MRE β -loop farget lilla. Figuren er illustrert i BioRender; Tilpasset fra Imaizumi et al. 2022⁴⁸. B) Strukturen til RseP fra *S. haemolyticus* predikert med AlphaFold (UniProt: A0A855TVQ6) og visualisert med ChimeraX v1.4. PDZ domenet markert i blått og den konservative sekvensen HEXxH som utgjør det aktive setet er markert i oransje. Videre ses LDG-motivet i gult og MRE β -loopen i lilla.

Ettersom RseP virker å være viktig i bakteriens overlevelse og virulens, kan RseP være et ideelt molekylært mål for å bekjempe bakterier som *S. haemolyticus*, eksempelvis under behandling av infeksjoner. Interessant nok så finnes det allerede en familie med antimikrobielle molekyler kalt bakteriociner som utnytter RseP for å drepe målceller.

1.5 Bakteriociner

Bakteriociner er små antimikrobielle peptider som produseres av bakterier og hemmer veksten av andre bakterier i konkurranse om plass og næringsstoffer⁴⁹. De fleste har bare effekt mot nært beslektede bakterier, mens noen virker bredere og fungerer mot celler fra forskjellige arter⁵⁰. Derfor kan disse bakteriocinene potensielt brukes til behandling av bakterielle infeksjoner. Slike peptider produseres av både Gram-positive og negative bakterier og produseres av en rekke bakterieslekter slik som *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, og *Streptococcus*^{51–53}.

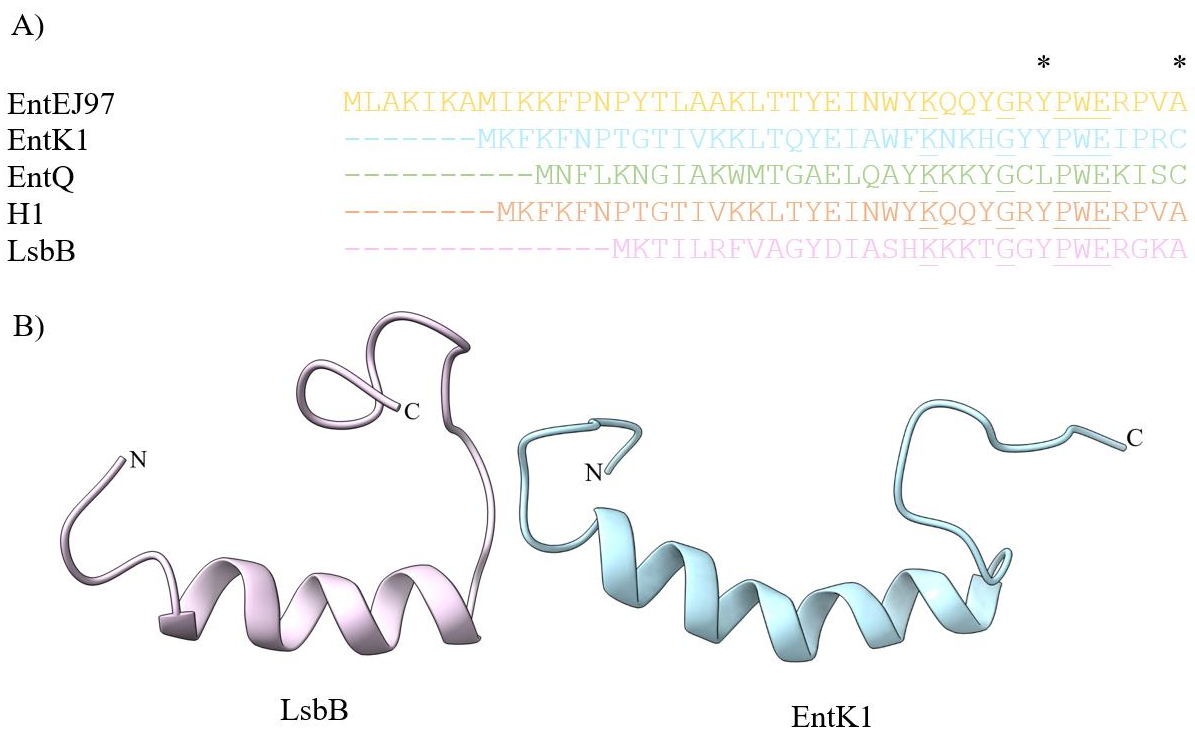
Bakteriociner er hovedsakelig delt inn i tre klasser basert på struktur. Den første klassen består av bakteriociner som er modifisert etter translasjonen⁵⁴. En vanlig egenskap til bakteriocinene i denne klassen er at de inneholder uvanlige aminosyrer, slik som dehydrerte aminosyrer, lantionin og 3-metyllantionin, noe som fører til dannelsen av ringstrukturer med høyere strukturell stabilitet mot varme, pH og proteolyse⁵⁵. Klasse II bakteriociner består av små (<10 kDa) og umodifiserte peptider og som er varmemestabile⁵⁴. Virkemåten til disse er ofte permeabilisering av bakteriemembranene som kommer av at bakteriocinene danner porer⁵⁶. Den siste klassen av bakteriociner kalles for bakteriolysiner, og er varmelabile og lytiske proteiner⁵⁴. Den antimikrobielle aktiviteten til denne klassen bakteriociner er knyttet til enzymatisk aktivitet som forstyrrer integriteten til bakteriens cellevegg⁵⁵.

Klasse I bakteriociner består som nevnt av bakteriociner med uvanlige egenskaper som følge av post-translasjonelle modifikasjoner. Blant disse er kanskje lantibiotika mest kjent. De kan være positivt ladete peptider, og består av bakteriociner som nisin, epidermin og gallidermin⁵⁷. Disse bakteriocinene sin virkemåte er oftest assosiert med poredannelse i membranen hos bakterier⁵⁷. Lantibiotika kan også være globulære og lite fleksible strukturer med en negativ ladning, der virkemåten er knyttet til hemming av celleveggsyntese hos bakterien⁵⁵.

Klasse II bakteriociner derimot er umodifiserte og kan deles inn i underklasse II a-d⁵⁵. Underklasse IIa har lineær struktur, inneholder et konserverte motiv kalt «pediocin-boks» (YGNNG) og er mest aktive mot arter i slekten *Listeria*^{55,58}. Videre er underklasse IIb to-peptidbakteriociner, som innebærer at to peptider er nødvendig for antimikrobiell aktivitet⁵⁹. Underklassen IIc består av små bakteriociner der peptidsekvensen syntetiseres uten et lederpeptid, mens klasse II d består av lineære peptider som mangler pediocin-boksen som er karakteristisk for klasse IIa bakteriociner^{60,61}. Bakteriociner som utnytter og binder til RseP tilhører klasse IIc, mer spesifikt er de medlemmer av LsbB familien av lederløse bakteriociner⁶².

Denne sistnevnte familien av bakteriociner produseres av laktokokker og av ulike enterokokker, og består av bakteriocinene enterocin EJ97 (EntEJ97), enterocin K1 (EntK1), enterocin Q (EntQ) og LsbB (Figur 1.3)⁵⁰. LsbB produseres av *Lactococcus lactis* og består av 30 aminosyrer (aa)⁵⁰. Dette bakteriocinet har et begrenset hemmingspekter og påvirker bare laktokokkarter, mens EJ97, EntK1 og EntQ har et bredere antimikrobielt spekter⁶³. EntEJ97 produseres av bakterien *E. faecalis* og består av 44 aa med et konserverte C-terminalt motiv⁶⁴. Det er vist at dette bakteriocinet virker lytisk på bakterieceller og at den har aktivitet

mot flere Gram-positive bakterier, mens dens effektivitet varierer mellom arter av samme slekt⁶⁴. EntK1 derimot produseres av arten *Enterococcus faecium* og er 37 aa langt⁵⁰. Det er vist at dette bakteriocinet er ustrukturert i vann, mens når det er utsatt for membranliknende miljøer blir det strukturert med en α -heliks struktur på den N-terminale delen med amfifile egenskaper, i tillegg til en ustrukturert C-terminal del. Det er foreslått at α -heliksen er involvert i poredannelse, mens den C-terminale delen er viktig for målspesifisitet^{50,65}. Det er vist at reseptoren for LsbB hos *L. lactis* er en RseP homolog (også kalt YvjB) og at EntEJ97 og EntK1 bruker en RseP-homolog som reseptor i *Enterococcus*^{50,62}.



Figur 1.3 LsbB familien av bakteriociner. A) Sekvenssammenstilling for de ulike bakteriocinene i LsbB familien, med konsensussekvens KxxxGxxPWE understreket, og med aminosyrer som er essensielle for aktiviteten til LsbB bakteriocinene sin aktivitet markert med stjerne (*). B) Strukturen til LsbB (PDB: 2MLV) og EntK1 (PDB: 5L82) basert på kjernemagnetisk resonans, visualisert med ChimeraX v1.4.

Til tross for at det lederløse bakteriociner er vist å kunne hemme veksten av en rekke bakterier er en utfordring at det hyppig oppstår resistente stammer. Det er vist at LsbB familien dreper målcellen ved å interagere spesifikt med RseP, en konsekvens er at mutasjoner i *rseP* som endrer struktur og/eller interagerende aminosyrer gjør at bakteriocinene ikke lenger fungerer⁴³. Eksempelvis er det isolert resistente kolonier etter behandling med EntK1 og EntEJ97 der mutasjoner oftest er i *rseP*⁵⁰. Interessant er at en RseP homolog finnes i nesten alle bakterier, også de mest sentrale patogene artene. En god forståelse av hvordan disse peptidene utnytter RseP kan potensielt benyttes til å utvikle disse

peptidene til å også angripe andre arter. Dermed er det av interesse i å se hvordan endringer av disse peptidene påvirker deres egenskaper, som aktivitet og hemmingsspekter. De lederløse bakteriocinene sine egenskaper, med at de ikke modifiseres og er små av størrelse, gjør disse spesielt godt egnet til syntetisk produksjon og peptiddesign⁵⁰. Et eksempel på et slikt konstruert bakteriocin er hybrid 1 (H1). Dette bakteriocinet ble konstruert ved å kombinere den N-terminale delen av EntK1 med den C-terminale delen av EntEJ97⁴³. Dette bakteriocinet har egenskaper som ligner EntEJ97, men den har økt antimikrobiell effekt mot medlemmer av slekten *Staphylococcus*. H1 har spesielt stor antimikrobiell effekt mot alle stammer av *S. haemolyticus*⁴³. Denne aktiviteten er derimot noe dårligere på bakterier i biofilm, men det er observert at H1 har en evne til å drepe celler i de dypere lagene i biofilmen. Disse observasjonene til tross blir det antimikrobielle potensialet til H1 tilsynelatende begrenset av resistensutvikling⁴³.

1.6 Mål med oppgaven

I likhet med EntEJ97 og EntK1 bakteriocinene utnytter også H1 RseP som reseptor, og det er vist at aminosyrer rundt det aktive setet er viktig for sensitiviteten for bakteriociner^{43,50}. Som nevnt er RseP proteasen involvert i blant annet stressrespons, virulens, og biofilmdannelse hos en rekke bakterier. Det kan derfor antas at resistensutvikling mot H1 som følge av mutasjoner i *rseP*, vil føre til en reduksjon i levedyktighet og virulens i bakterien. Dermed kan H1 som antimikrobiell behandling mot *S. haemolyticus*, være aktuelt på tross av den observerte resistensutviklingen. Dette er vist for EntK1 og EntEJ97, der behandling med disse bakteriocinene ved 45°C ikke ga opphav til resistente kolonier⁵⁰. Hensikten med denne oppgaven er å få mer kunnskap om rollen til RseP i stressresponsen, virulens og biofilmdannelse i *S. haemolyticus*. Dette vil gi en dypere forståelse om hvordan RseP kan være mål for behandling av infeksjoner forårsaket av *S. haemolyticus*.

2. Materiale og metode

2.1 Bakteriestammer, lagring og kultivering

Oversikt over alle bakteriestammer brukt i dette forsøket er listet i Tabell 2.1. Stammer av *S. haemolyticus* (stammer LMGT 4071, LMGT 4072 og LMGT 4073) ble plukket som renstrøkne enkeltkolonier fra vekstskåler og inokulert til 5 ml hjernehjerteinfusjon (BHI)-medium for å lage overnattekultur, som ble inkubert ved 37°C ved risting på 220 rpm over natt (~20 timer). Overnattekulturene ble fryst med 20% glyserol. Frysestocken ble lagret i kryorør ved -80°C som ble brukt som basis for overnatte kulturer brukt i videre forsøk.

Overnattekultur til videre forsøk ble tillaget ved å overføre frysestock, ved bruk av sterile 1 µl inokuleringsloops, til 5 ml BHI-medium. Rørene med overnattekultur ble inkubert ved 37°C med risting på 220 rpm over natt (~20 timer).

Tabell 2.1 Liste over bakteriestammer brukt i dette arbeidet. Alle mutantene med unntak av M3_71 og M13_72 har mutasjon i genet *rseP*.

Stamme	Relevant genotype	Kilde
<i>S. aureus</i> Newman		(Duthie og Lorenz 1952) ⁶⁶
<i>S. aureus</i> MOK124		(Keane et al. 2013) ⁶⁷
<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4		(Novick 1967) ⁶⁸
<i>S. aureus</i> SH1000		(Horsburgh et al. 2002) ²⁷
<i>S. haemolyticus</i> LMGT 4071	WT	(Kranjec et al. 2021) ⁴³
<i>S. haemolyticus</i> LMGT 4072	WT	(Kranjec et al. 2021) ⁴³
<i>S. haemolyticus</i> LMGT 4073	WT	(Kranjec et al. 2021) ⁴³
<i>S. haemolyticus</i> M1_71	c.695C>A	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M3_71		Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M11_72	c.869_870inv; c.876delA	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M12_72	c.533G>T	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M13_72*		Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M17_73	c.1132G>T	Dette arbeidet
<i>S. haemolyticus</i> M18_73	c.88A>T	Dette arbeidet

* Substitusjon (G>A) 12 baser oppstrøms for start kodon i predikert ribosomalt bindesete.

Laboratoriet for Mikrobiell Genteknologi (LMGT), Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Ås, Norge.

2.2 Spot-on-lawn assay

Isolering av H1-resistente celler ble gjort ved bruk av spot-on-lawn assay. Overnattekultur ble fortynnet 125 ganger i 5 ml BHI softagar (Oxoid, UK; 0,75% agar). Softagaren ble spredt utover skåler med BHI-agar, før det ble tilsatt 4 soner med 10 µl H1 med en konsentrasjon på 1 mg/ml. Platene ble inkubert over natt ved 37°C. Etter inkubering ble kolonier innenfor hemmingssonene plukket og renstrøket for å få rene kulturer. Det ble plukket 8 H1 resistente

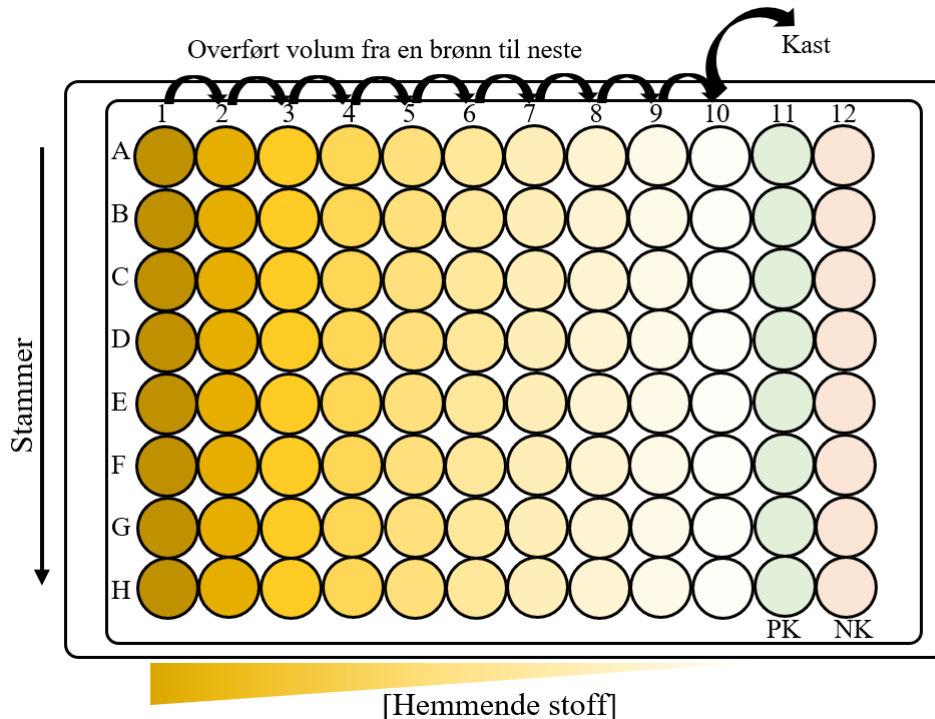
kolonier fra hver villtype (WT) stamme. Frysestock og tillaging av overnattskulturer fra renstrøkene resistente kolonier til videre forsøk ble gjort som i kapittel 2.1.

2.3 Propidiumjodid poredannelse

Frysestock av *S. haemolyticus* LMGT 4073 ble podet til 50 ml kultur og inkubert over natt ved 37°C med risting ved 220 rpm. Cellene ble så sentrifugert (4500g, 2 minutter (min)), og pelleten vasket med PBS én gang (4500g, 2 min). Cellene ble resuspendert i PBS til en OD₆₀₀ ~ 3. I en sort 96-brønns mikrotiterplater ble propidiumjodid og bakteriocin tilsatt til et sluttvolum på 100 µl og konsentrasjon på henholdsvis 40 µM og 0,1 mg/ml. Bakteriocinene som ble brukt var H1 og garvicin KS (GarKS), med micrococcin P1 (MP1) og nisin A (NisA) som kontroll. MP1 er ikke poredannende, mens NisA sin virkemåte er poredannelse. Til slutt ble 100 µl celleduspensjon tilsatt i brønnene før fluorescens ble målt hvert 5. min i 3 timer i en FLUOstar Omega plateleser med eksitasjon 535/20 nm og emisjon 630/40 nm (BMG Labtech, Tyskland).

2.4 Sensitivitetstesting

Det ble også undersøkt motstandsdyktigheten til de forskjellige bakteriestammene og respektive mutanter mot ulike forbindelser. For å kvantifisere for dette, ble minimum hemmende konsentrasjon (MIC₅₀) bestemt for de ulike stoffene. MIC₅₀ ble definert som den konsentrasjonen som hemmet vekst med 50% eller mer sammenlignet med positiv kontroll. Alle assayene ble satt opp med samme fremgangsmåte i en 96-brønn mikrotiterplate med fortyngninger av hemmende stoff i 100 µl BHI-medium. Siste brønn på hver rad fungerte som negativ kontroll og det ble kun tilsatt 200 µl BHI-medium. I nest siste kolonne ble brukt som positiv kontroll og her ble det ikke tilsatt hemmende stoff, kun bakteriekultur og medium (totalvolum 200 µl). I hver av radene ble det satt opp en fortyngningsgradient med stoffet det skulle bli bestemt minste hemmende konsentrasjon, der konsentrasjonen i brønnene ble redusert for hver kolonne (Figur 2.1). Til slutt ble det tilsatt 50 ganger fortynnet overnattskultur til hver brønn til et totalvolum på 200 µl. Mikrotiterplatene ble inkubert ved 37°C i 6 timer før det ble gjort OD₆₀₀-måling av platen med VICTOR® Nivo™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA).

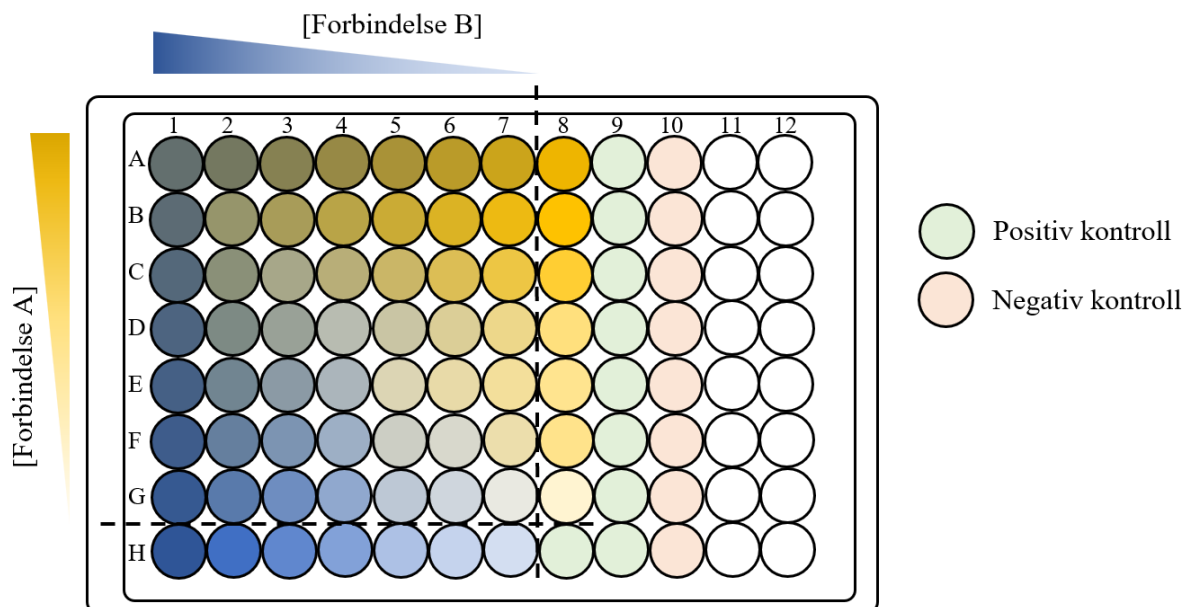


Figur 2.1 Skjematisk oppsett for kvantifisering av motstandsdyktighet mot ulike forbindelser. Det blir laget en fortynningsgradient ved å overføre et fast volum til neste kolonne i platen (illustrert med gul gradient). I tillegg ble det satt opp en positiv kontroll (PK) med kun BHI-medium og fortynnet overnattskultur, og negativ kontroll (NK) med kun BHI-medium. I de ulike radene ble sensitiviteten til de forskjellige stammene testet.

Det ble også gjort undersøkelser av antibiotikasensitivitet for WT og mutanter. Bakteriene ble støpt i agarskåler ved bruk av BHI-softagar (0,75 % agar) med 125 ganger fortynnet overnattskultur, deretter ble antibiotikadisker (Oxoid, UK) plassert på agarskålen. Skåler med diskere ble inkubert over natt ved 37°C før hemningsonene ble undersøkt.

2.5 Synergieffekt

Potensielle synergieffekter ble undersøkt ved bruk av sjakkbrett-assay. Det ble satt opp en fortynningsgradient av den ene forbindelsen som beskrevet over. Så ble det satt opp en fortynningsgradient av det andre stoffet utenfor platen. Denne gradienten ble så overført til platen ved å overføre likt volum fortynnet forbindelse til hver rad, slik at det ble en gradient av den andre forbindelsen mellom radene i mikrotiterplaten (Figur 2.2). Til slutt ble det tilsatt bakteriekultur fortynnet 50 ganger i brønnene med BHI-medium til et totalvolum på 200 µl. Kolonne 8 og rad H inneholdt kun en gradient av hver enkelt forbindelse og fungerte til å bestemme MIC for hver forbindelse. Platene ble inkubert ved 37°C i 6 timer før OD₆₀₀ ble målt som i kapittel 2.4.



Figur 2.2 Oppsett av mikrotiterplate for sjakkbrett-assay. Det ble satt opp en gradient for hver av de to forbindelsene brukt i synergitestingen, der gradienten til forbindelse A (gul) hadde gradient mellom radene og forbindelse B (blå) sin gradient oppstod mellom kolonnene. I kolonne 8 var det kun en gradient av forbindelse A, mens det i rad H kun var en gradient for forbindelse A. I tillegg ble det satt opp positive og negative kontroller illustrert med henholdsvis grønn og rød farge.

2.6 Vekstforsøk

Veksthastighet ble bestemt både med og uten behandling med GarKS. Forsøkene ble satt opp i en 96-brønn mikrotiterplate med 100-ganger fortynt overnattskultur og med et totalvolum på 200 μl i hver brønn. Vekst ble undersøkt med GarKS konsentrasjoner på 0,005 og 0,02 mg/ml. Vekst ble målt med OD-målinger hvert 30 min med VICTOR® Nivo™ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA). Alle forsøkene ble gjennomført med parameterne: biorbital risting ved 300 rpm, måleenhet OD, måletype «Single label», eksitasjonsfilter 600/10 nm og måletid 500 ms.

2.7 Biofilmdannelse

I en 96-brønn mikrotiterplate ble overnattsbakteriekultur fortynt 10 ganger i 3% Tryptisk Soya medium med 1% glukose (TSB-G) til et totalvolum på 100 μl . Platene ble inkubert uten risting ved 37°C over natt. Etter inkubering ble alt medium fjernet fra brønnene. Brønnene ble så vasket med 100 μl 0,9 % NaCl. Biofilm ble så farget ved tilsetning av 150 μl 0,4% krystallfiolett som ble påsatt nær bunden av platen. Deretter inkuberes platen ved romtemperatur i 15 min. Etter inkubering ble overflødig krystallfiolett fjernet, før brønnene ble vasket med 200 μl NaCl tre ganger eller til negativ kontroll var fri for farge. Etter farging ble krystallfiolett løst opp/eluert ved bruk av 96% etanol ved inkubering på romtemperatur i

10 min. Etter inkubering ble oppløst krystallfiolett overført til en ny mikrotiterplate før elueringssteget ble gjentatt. OD ble målt ved 600 nm for å estimere evne til biofilmdannelse. Platene ble satt opp med åtte replikater av hver bakteriestamme og med *S. aureus* som positiv kontroll (Tabell 2.1).

2.8 Sekvensering av *rseP*

Som templat i PCR-reaksjonen ble celler fra frysestock avsatt direkte i PCR rør ved bruk av en 1 µl inokuleringsløkke. PCR rør med cellene ble lysert ved bruk av mikrobølgeovn i 90 sekunder (s). Til PCR-rørene ble det tilsatt GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, USA) og primere til en konsentrasjon på 1 µM i henhold til produsentens protokoll for 25 µl reaksjoner. Primerne brukt til amplifisering av PCR er oppgitt i Tabell 2.2. Start denaturering ble gjort ved 94°C i 3 min, før det ble utført 35 sykluser med templatdenaturering (30 s, 94°C), primerhybridisering (20 s, 60°C) og trådforlengelse (1,5 min, 72°C), før siste trådforlengelse ved 72°C i 5 min.

Tabell 2.2 Primer oversikt. Primerne brukt for *rseP* amplifisering i PCR reaksjonen.

Primer	Sekvens 5'→3'retning
rseP_forward	TTGAGTGCACATTTGACTAGAC
rseP_revers	ACTCAATGCTTCTGCTTCAGC

PCR-produkt (10 µl) ble rensert ved bruk av QIAquick spinn-kolonner (Qiagen, USA) i henhold til produsentens protokoll. Konsentrasjonen av DNA i de rensede PCR-produktene ble bestemt ved bruk av NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA). Primere brukt til sekvensering var samme som brukt til PCR (Tabell 2.2). Prøvene ble sendt til Eurofins Genomics for sekvensering.

Analyse av sekvensdata ble gjort med SnapGene Viewer v6.2 programvaren. Dårlige sekvensområder ble fjernet og fremover og reverstråder ble sammenstilt ved bruk av MUSCLE med standard parametere i programvaren Jalview v2.11.2.6. Der nukleotidet på fremover og reverstråden ikke samsvarte ble riktig nukleotid bestemt ved manuell inspeksjon av kromatogrammene.

De korresponderende aminosyresekvensene ble brukt til å predikere proteinstrukturer ved bruk av ColabFold v.1.5.1⁶⁹. I ColabFold ble AlphaFold2 med MMseqs2 brukt med standard parametere. De predikerte proteinstrukturene ble visualisert i ChimeraX v1.4.

2.9 Helgenomsekvensering

Overnattskultur av stammen ble fortynnet 50 ganger og inkubert i 2 timer for å få celler som er enkle å lysere, samt at kolonnen ikke skulle bli mettet med bakterieceller. Rensing av DNAet ble gjort med «GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit» i henhold til protokoll (Sigma Aldrich, USA), med lysostaphin behandling. Mengde genomisk DNA (gDNA) sendt til sekvensering ble kontrollert ved bruk av Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA) og Qubit™ dsDNA BR Assay Kit i henholdt til protokoll (Invitrogen, USA), mens kvalitet på gDNA ble kontrollert ved bruk av NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA).

Helgenomsekvenseringen ble utført som «Microbial whole genome library (PCR-free 350 bp)» av Novogene, der dekning ligger mellom 150 til 200.

For å finne mutasjoner hos mutantene ble WT genomet benyttet som referanse. PATRIC ble brukt som programvare for å gjennomføre dette⁷⁰. For å sette sammen WT genomet ble verktøyet genomsammenstilling brukt. Der ble paret sekvens bibliotek benyttet, med fremover og revers sekvenser som inputfiler, og sammenstillingstrategi ble satt til «Auto». Deretter ble genene annotert mot referansegenom for *S. haemolyticus* ved bruk av genom annotering. Det sammenstilte genomet ble brukt som input og annoteringsoppskrift ble valgt å være bakterie/arkebakterier. Taksonomi navn ble satt til *Staphylococcus haemolyticus* med taksonomi id 1283. Til slutt ble det gjort en variasjonsanalyse mellom mutant og WT ved bruk av verktøyet variasjonsanalyse. For denne analysen ble også paret sekvens bibliotek benyttet, med fremover og revers sekvenser for mutanten som inputfiler. Referansegenom ble satt til det annoterte WT genomet. Sammenstillere ble satt til BWA-mem, mens SNP utpeker ble satt til FreeBayes.

2.10 RT-qPCR

For revers transkripsjon (RT) kvantitativ PCR (qPCR) ble overnattskultur ble fortynnet 50 ganger i 1 ml BHI-kultur og inkubert i 2 timer ved 37°C med risting til en OD₆₀₀ på ~1 ved målinger på NanoDrop™ One (Thermo Scientific, USA). Etter to timer ble kulturene tilsatt GarKS til en sluttkonsentrasjon på 0,005 mg/ml. I tillegg ble det satt opp kontroller med bakteriestammer uten tilsatt GarKS, i disse rørene ble det tilsatt 1 µl BHI-medium. Deretter ble rørene inkubert ved 37°C med risting i 30 min før cellene ble lagret på -80°C til videre behandling. Før RNA ekstrahering ble cellene høstet ved 12,300g i 4 min. Supernatanten ble kastet, mens celler ble resuspendert i PBS. Etter resuspending ble cellene lysert mekanisk ved bruk av 1 mm silicakuler. Det ble tilsatt ca. 200 µl silicakuler til cellene resuspendert i

200 µl PBS. Blandingen ble så ristet med Precellys 24 homogenizer (Bertin Technologies, Frankrike) ved 5000 rpm i fire ganger i 2x30 s intervaller med 1 min på is mellom hvert intervall. Etter lysing ble cellelysatet oppbevart på is.

RNA ekstrahering ble gjort i to steg ved bruk av KingFisher Duo Prime og NAXtra Magnetic beads (Lybe Scientific, Norge). I tillegg ble også RNA Clean and Concentrator – 5 (Zymo research, Tyskland) benyttet. Den første rensingen av nukleinsyrene fra cellelysatet ble gjort med NAXtra kulene fra Lybe Scientific. En prosesseringsplate ble satt opp som vist i Tabell 2.3. NAXtra kulene ble fortynnet 20 ganger med isopropanol.

Tabell 2.3 Oppsett av prosesseringsplate. Oversikt over oppsett av prosesseringsplater til RNA ekstrahering med KingFisher duo prime.

Rad	Reagens	Volum (µl)
A	KingFisher™ 96 Tip Comb for Deep Well Magnet	
B	400 µl fortynnede magnetkuler	
	100 µl cellelysat	
	200 µl lyseringsbuffer	
C	Isopropanol (100%)	400
D	Etanol (80%)	400
E	Etanol (80%)	400
F	H ₂ O	50

Prosesseringsplaten ble plassert i KingFisher duo prime for isolering av nukleinsyrer før DNase behandling, der det ble utført trinnene for rensing vist i Tabell 2.4. I eluatet ble det tilført 50 µl 0,3 U/µl DNase og inkubert ved romtemperatur i 10 min for å fjerne gDNA. Deretter ble RNA isolert ved bruk av Clean and Concentrator – 5 i henhold til produsentens protokoll. RNA konsentrasjon ble til slutt målt med NanoDrop™ One.

Tabell 2.4 RNA-isolering med KingFisher Duo prime. Oversikt over trinnene i RNA-isoleringen utført av KingFisher Duo prime.

Steg	Tid (sek)	Hastighet	Samling av kuler tid (sek)
Preparering av NAXtra kuler	30	Medium	10
	30	Halvblanding	
	30	Bunblanding	
Vask med isopropanol	30	Rask	5
1. vask med etanol	20	Rask	5
2. vask med etanol	20	Rask	5
Tørk	120	-	-
Eluering	30	Medium	30
	30	Bunblanding	

Primere til RT-qPCR ble designet ved bruk av verktøyet qPCR Primer & Probe Design Tool (Eurofins Genomics), verktøyet ble stilt inn til at produktet ikke skulle være lenger enn 200

bp og at primerne skulle ha lignende smeltepunkt. Oversikt over primerne brukt i RT-qPCR er vist i Tabell 2.5.

Tabell 2.5 Primersekvenser til RT-qPCR. Oversikt over primersekvenser brukt til RT-qPCR.

Primer	Sekvens 5' → 3' retning	Protein aksjonsnummer
DUF418_forward	GCCAATAATATATCGCCTTCCC	WP_016930538
DUF418_reverse	TGCAATACTCTTCGGCTTTTC	
ecsB_forward	GCTATCGTTTCCGATTGTTTC	WP_011275427
ecsB_revers	AGCCTTTAATCACTTCGACATC	
gyrB_forward	TGCATAACCAGCAAGTGCC	WP_046308840
gyrB_revers	GAAGCCGTTTCGTAAAAGACC	
HYP_forward	CGCCAGCGAATAAAATAACAG	WP_048667836
HYP_revers	ACAACAGGGAATGAAAAGGAG	
rseP_forward	GTGCTGGAATAATGTGTCCTG	WP_011275938
rseP_revers	TGGCTCTTCTAAACCGTCTC	
srrA_forward	CCAATCAACCTTACGAATCGC	WP_011274925
srrA_revers	AGCCGCTTCAATCTTCTTAC	
srrB_forward	TCGGAGAAAGCAACGTTTATG	WP_248687498
srrB_revers	ATGAAAGTCGCAAGTTAGGG	

Revers transkripsjon ble utført som beskrevet i QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, USA), der templat først ble normalisert til 1 µg RNA.

For RT-qPCR ble det brukt en reaksjonsblanding med 5 µl PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) med primerkonsentrasjon på 0,1 µM og 10 ng templat (cDNA). RT-qPCR ble kjørt med komparativ C_T (ΔΔC_T) kvantifisering med *gyrB* som referansegen og med smeltekurveanalyse. Prøven ble varmet opp til 95°C i 10 min, før 40 sykluser à 15 s ved 95°C, etterfulgt av 1 min ved 60°C. Smeltekurveanalysen ble gjennomført med oppvarming av prøven til 95°C i 15 s, etterfulgt av 1 min ved 60°C, før ny oppvarming til 96°C i 15 s.

2.11 Statistiske analyser

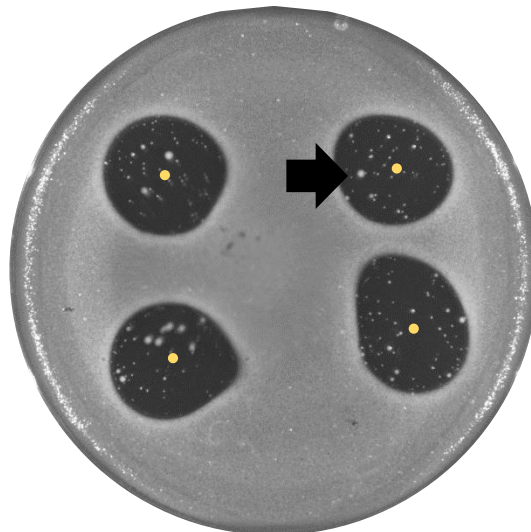
Alle resultater som fremkommer er reproduisert minst tre ganger, med unntak av genuttrykk resultatene som kun ble reproduisert to ganger. Det ble utført statistiske analyser på biofilmdannelse assay, i tillegg til genuttrykksanalyser utført ved bruk av RT-qPCR. For biofilmdannelse assay ble det brukt enveis variasjonsanalyse til å bestemme signifikans mellom WT og tilhørende mutanter. Disse beregningene ble gjort ved bruk av Excel. For å bestemme signifikans for genuttrykk ble det brukt parametriske uparet t-test, der det antas

normalfordeling da det sammenlignes uttrykk av gener innad i en stamme, på tross av at antallet observasjoner er for få til å kunne bestemme dette med sikkerhet.

3. Resultater

3.1 Isolering av H1 resistente *S. haemolyticus*

For å isolere celler med mutert og ikke-funksjonelt RseP gen for videre undersøkelser, ble bakteriocinet H1 (10 µl) av en høy konsentrasjon (1 mg/ml) avsatt på skåler med *S. haemolyticus*. Som forventet ga bakteriocinet tydelige hemmingssoner (Figur 3.1), som viser at H1 effektivt dreper *S. haemolyticus*. Innenfor hver hemningssone vokste det kolonier av bakterier som er motstandsdyktige mot bakteriocinet antakeligvis som følge av mutasjoner i *rseP* (Figur 3.1).



Figur 3.1 Spot-on-lawn assay med hemmingssoner og kolonier (indikert med svart pil) av bakterier som var motstandsdyktige mot bakteriocinet, og som vokste innenfor hemmingssonene. Disse ble vurdert å være potensielle mutanter og plukket til videre fenotyping og sekvensering. Påsatt område for bakteriocinet vises ved gule punkter.

Det ble for hver stamme laget egen skål med hemmingssoner og 8 resistente kolonier ble plukket fra hver skål (i alt 24 kolonier).

3.2 H1 resistente stammer av *S. haemolyticus* har mutasjon i *rseP*

For å undersøke om resistente celler hadde mutasjoner i *rseP* ble det utført PCR av *rseP* genet fra de resistente stammene. Sekvensering av PCR produktene viste mutasjoner i *rseP* hos de fleste stammene. De fleste mutasjonene funnet ved *rseP* sekvensering viste basesubstitusjoner som fører til ikke-synonyme mutasjoner med beliggenhet utenfor the aktive setet. Én mutant

(M18_73) hadde nonsens-mutasjon tidlig i genet, der et stop kodon ble introdusert i aminosyreposisjon 30. Stamme M18_73 antas derfor å ikke ha funksjonelt RseP, og denne stammen ble fokus for en del videre tester. For å sjekke at mutantene ikke hadde mutasjoner også i andre gener som kunne være involvert i stressrespons, virulens, og biofilmdannelse, ble et utvalg av mutantene, inkludert M18_73 helgenomsekvensert. I Tabell 3.1 er en oversikt over mutasjonene funnet fra helgenomsekvensering for utvalget av mutanter.

Tabell 3.1 Mutasjonssted. Oversikt over hvilket gen mutasjonen befinner seg, i tillegg posisjon og type mutasjon i DNA og i aminosyresekvensen. c.; kodende DNA, >; basesubstitusjon, inv; inversjon, del; basedelelesjon, fs; rammeskift, *; terminering/stopp kodon.

Mutant	Gen	Mutasjon i genet	Endring i aminosyre
M1_71	<i>rseP</i>	c.695C>A	p.Thr232Lys
M3_71 ^A			
M11_72	<i>rseP</i>	c.869_870inv; c.876delA	p.E290G; p.E292fs
M12_72	<i>rseP</i>	c.533G>T	p.V178G
M13_72 ^B	<i>rseP</i>		
M17_73	<i>rseP</i>	c.1132G>T	p.Asp378Tyr
M18_73	<i>rseP</i>	c.88A>T	p.Lys30*

^A Ingen mutasjon funnet

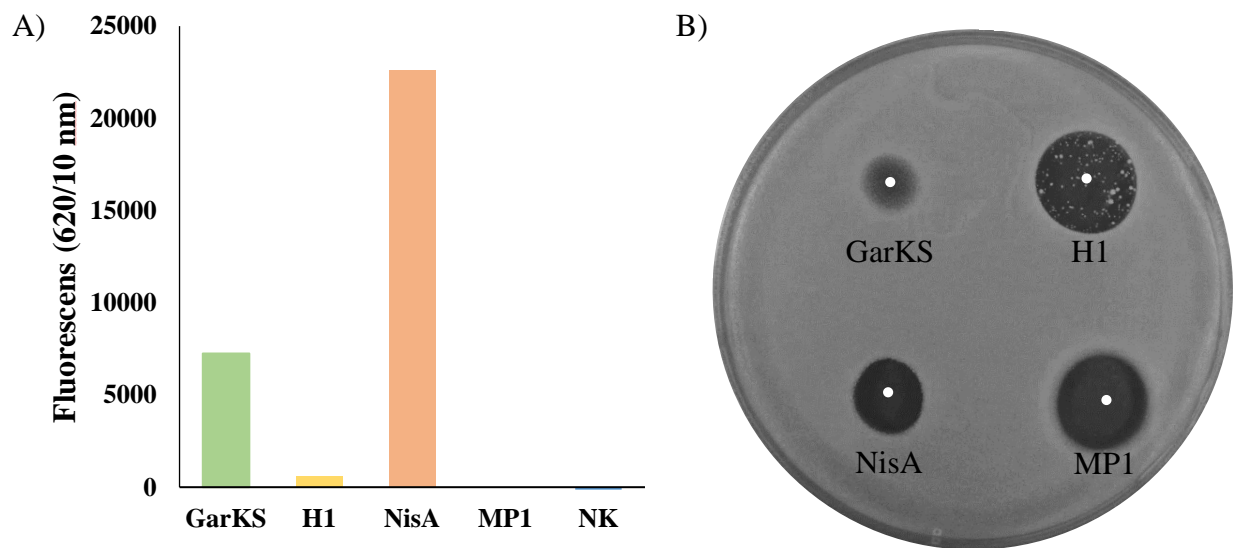
^B Substitusjon (T>C) 12 baser oppstrøms for start kodon i predikert ribosomalt bindesete.

Fra Tabell 3.1 ses det at samtlige mutasjoner funnet ved helgenomsekvensering bare er koblet til *rseP*, med unntak av M3_71 der det ikke ble funnet noen mutasjon. For M13_72 ble det funnet en substitusjon som var utenfor leserammen til *rseP*, men bare 12 nukleotider oppstrøms for start kodon til *rseP*. I denne posisjonen hadde det skjedd en endring der en guanin er byttet ut med adenin (GAGG>AAGG).

3.3 GarKS lager porer i cellemembranen til *S. haemolyticus*

Det er ikke kjent noen spesifikk stimuli som aktiverer RseP, men det er antatt at den deltar i en generell stressresponsmekanisme mot forstyrrelser i cellemembranen. For å undersøke rollen til RseP under stress, ble cellene behandlet med subletale konsentrasjoner av et membran-aktivt bakteriocin GarKS. For å bekrefte at GarKS er membran-aktiv i *S. haemolyticus* og har en virkemåte som involverer cellemembranen, ble det utført et propidiumjodid (PI) poredannelse assay. Til assayet ble bakteriocinene H1, GarKS, NisA og micrococcin P1 brukt. NisA er et kjent poredannende bakteriocin (positiv kontroll) mens MP1 hemmer proteinsyntese (negativ kontroll). Dersom GarKS danner porer i cellemembranen vil propidiumjodid komme inn i cellen og gi fra seg et fluorescerende signal. Fluorescens av celler eksponert for bakteriocinene med PI ble målt etter 1 time (Figur 3.2A). Det ble også

utført spot on lawn for å undersøke den antimikrobielle effekten bakteriocinene hadde på *S. haemolyticus* (Figur 3.2B).



Figur 3.2 Poredannelse av bakteriociner i *S. haemolyticus*. A) Flouescens målt etter en time med konsentrasjon 0,05 mg/ml for bakteriocinene GarKS, H1, NisA og MP1, i tillegg til en negativ kontroll uten bakteriocin tilsatt. B) Spot-on-lawn assay for de ulike bakteriocinene brukt i PI assayet. Omtrentlig påsatt område for bakteriocinet vises ved hvite punkter.

Som forventet ga NisA en tydelig økning i flouescens sammenlignet med negative kontroller MP1 og bare buffer (NK). Det ble også sett at MP1 hadde lav flouescens som NK, i tråd med at dette bakteriocinet ikke er poredannende. Videre ble det sett en et tydelig høyere signal for GarKS sammenlignet med negativ kontroll. Det ble også sett at hemmingssonen til GarKS var mindre enn den sett for de andre bakteriocinene.

3.4 RseP påvirker motstandsdyktigheten til *S. haemolyticus* mot GarKS

Om RseP er involvert i stressrespons i *S. haemolyticus* vil det være forventet at stammer med forstyrret og/eller ødelagt RseP vil ha økt sensitivitet mot stoffer som angriper eller forstyrrer cellekonvolutten (cell envelope). For å undersøke forskjeller i sensitivitet til mutantene ble det utført MIC assay med ulike forbindelser (Tabell 3.2) som er kjent å kunne påføre celler ulike typer stress. Der MIC₅₀ ble bestemt ved den konsentrasjonen der halvparten av veksten ble hemmet. I Tabell 3.2 er det vist en oversikt over stoffene som ble testet, i tillegg til hvor mye mer motstandsdyktig mutantene var mot forbindelsen, sammenlignet med tilhørende WT (Mut/WT).

Tabell 3.2 Minste hemmende konsentrasjon. Oversikt over hvor mange ganger mer motstandsdyktig mutanten er mot stoffer brukt i sensitivitetstesting, sammenlignet med sin respektive villtype (MIC₅₀ Mut / MIC₅₀ WT).

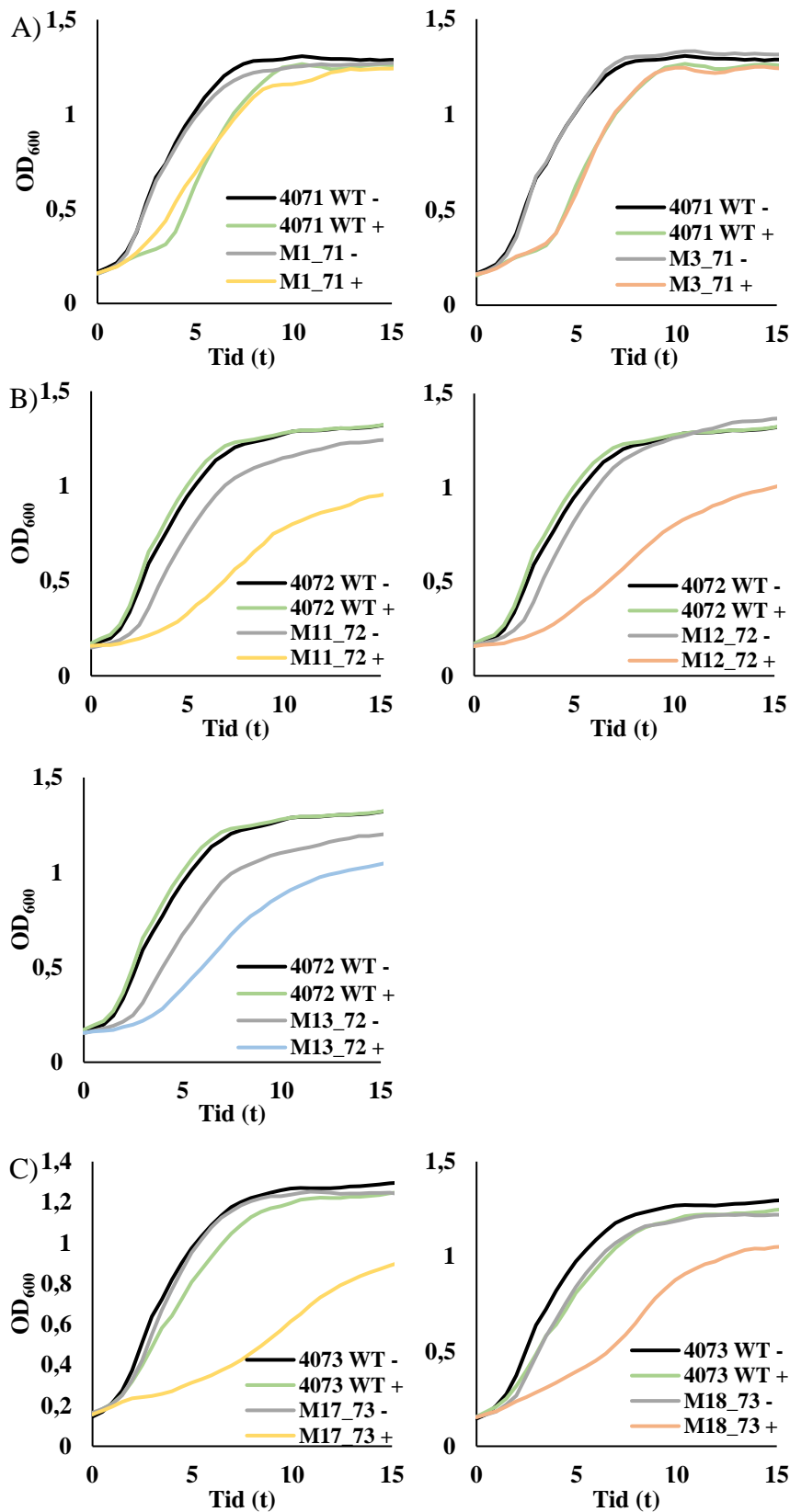
Stoff*	M1_71	M3_71	M11_72	M12_72	M13_72	M17_73	M18_73
Fusarsyre	0,9	1,2	1,3	1,1	0,8	0,9	1,5
GarKS	1,22	1,03	0,41	0,36	0,43	0,40	0,36
H1	>80	>80	>80	>80	>80	>71	>71
Kloramfenikol	1,0	1,5	0,9	0,9	0,9	1,7	0,7
SDS	2	1	1,4	1	1	1,5	1,9

* Etanol, NaCl og lysozym ble også testet, men viste ingen forskjell mellom WT og mutanter.

Fra Tabell 3.2 ses det at samtlige mutanter er mer enn 70 ganger mer motstandsdyktige mot H1 enn WT, og var resistente mot alle konsentrasjoner testet. For SDS ble det observert at de fleste mutantene var like sensitive som WT, mens det for M1_71 og M18_73 ble observert noe større motstandsdyktighet (2x) enn for WT. For stoffene fusarsyre og kloramfenikol ble det sett at motstandsdyktigheten til mutanter og WT er tilnærmet lik for alle stammer. Med unntak av M1_71 og M2 ble det derimot observert at mutanter var betydelig mer sensitive for GarKS.

3.5 RseP er viktig for vekst under stressende forhold

Den økte sensitiviteten til mutantene mot GarKS ble undersøkt ved å måle veksten til de ulike stammene under GarKS-indusert stress med OD, der økt OD defineres som vekst. Vekst ble målt over tid med en subletal konsentrasjon GarKS i mediet. Den subletale konsentrasjonen ble først bestemt for hver stamme som den høyeste konsentrasjonen som ikke betydelig påvirket vekst til villtype. Vekst ble overvåket med og uten tilsatt GarKS ved 37°C.

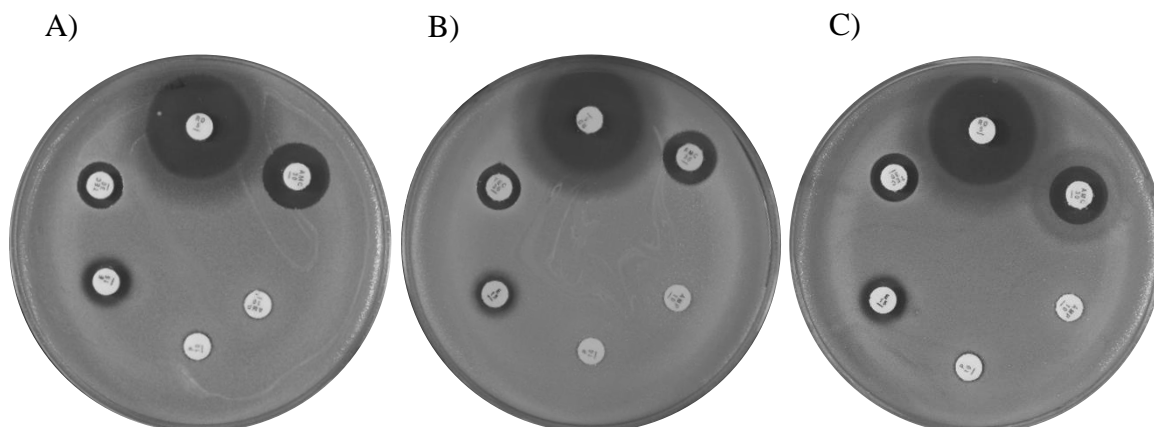


Figur 3.3 Vekstkurver utført med (+) og uten (-) GarKS ved 37°C. **A)** Vekstforsøk med 0,02 mg/ml GarKS i mediet for stamme LMGT4071; til venstre: M1_71, til høyre: M3_71. **B)** Vekstforsøk med 0,005 mg/ml GarKS i mediet for stamme LMGT 4072; til venstre: M11_72, til høyre: M12_72, nede: M13_72 **C)** Vekstforsøk med 0,02 mg/ml GarKS i mediet for stamme LMGT 4073; til venstre M17_73, til høyre M18_73.

Samtlige stammer uten behandling virker å ha bedre vekst enn stammene som er utsatt for behandling med GarKS (Figur 3.3A-C). Videre ses det (Figur 3.3A) at både M1_71 og M3_71 sin vekst med 0,02 mg/ml GarKS i mediet er tilnærmet lik som den som observeres for WT. Videre ses det (Figur 3.3B) at M12_72 uten behandling vokser likt som WT uten behandling, mens M11_72 og M13_72 har noe dårligere vekst enn WT selv når den ikke er utsatt for GarKS. Samtlige mutanter vokser dårligere enn både ubehandlede stammer og WT når det er GarKS til stede i mediet, med unntak av stammen LMGT 4071. Vekst av stamme LMGT 4073 med tilhørende mutanter er tilnærmet lik for de ubehandlede stammene, i tillegg til WT (Figur 3.3C). Det ses derimot at veksten til M17_73 og M18_73 er redusert med GarKS til stede.

3.6 RseP er ikke involvert i sensitivitet mot et utvalg antibiotika i *S. haemolyticus*

Flere klasser med antibiotika angriper også cellekonvolutten til bakterier, spesielt celleveggsyntese. Antibiotika er også spesielt viktig med tanke på behandling og bekjempelse av *S. haemolyticus* infeksjoner i mennesker. For å se om RseP er involvert i antibiotika-sensitivitet ble det utført sensitivitetstesting mot antibiotika ved bruk av disk diffusjonstest. Det ble testet ulike antibiotika med ulike virkningsmåte; hemming av proteinsyntese, hemming av RNA-syntese, samt hemming av celleveggsyntese. Dette for å undersøke om flere mekanismer for motstandsdyktighet kunne være påvirket hos *rseP*-mutantene. I testene utført for antibiotikasensitivitet ble det observert hemmingssoner av tilnærmet samme størrelse for villtype og mutant M17_73 og M18_73 (Figur 3.4). Bare små variasjoner mellom stammene ble observert.



Figur 3.4 Disk diffusjonstest for antibiotikasensitivitet (A) *S. haemolyticus* LMG 4073 WT, (B) M17_73 og (C) M18_73. Rifampicin (RD; 5 µg), amoxycillin/clavulanic acid (AMC; 30 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), penicillin (P; 10 µg), erythromycin (E; 15 µg), teicoplanin (TEC; 30 µg).

3.7 To-komponentbehandling av *S. haemolyticus* WT og mutanter gir additiv effekt

Siden mutantene viste økt sensitivitet mot GarKS men ikke antibiotika, ble undersøkt om forskjellige antibiotika i kombinasjon med GarKS kunne ha en synergisk effekt på *S. haemolyticus* og om dette ville påvirke mutanter forskjellig. I tillegg ble det undersøkt om GarKS kombinert med H1 kunne hindre vekst av resistente celler. Dette ble undersøkt ved bruk av sjakkbrettassay, der det ble satt opp gradienter med forbindelsene i kombinasjon. Fra dette ble det funnet MIC-verdier som videre ble brukt til å beregne FIC (fraksjonell hemmende konsentrasjon (Tabell 3.3).

Tabell 3.3 To-komponentbehandling. Oversikt over FIC-verdier ved synergitesting av kombinasjoner av GarKS, H1, vankomycin og erytromycin. FIC verdier mindre enn 0,5 ble ansett som synergisk effekt, mens verdier mellom 0,5 og 2 ble tolket som additiv effekt ⁷¹.

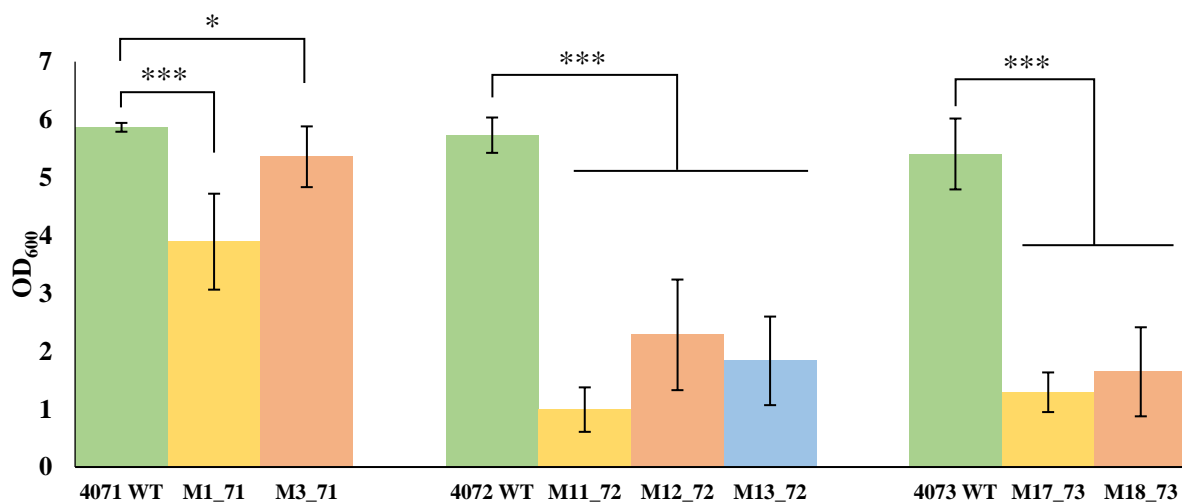
Kombinasjon	4073 WT	M18_73
GarKS x H1	0,7	
GarKS x Vankomycin	1,3	0,9
GarKS x Erytromycin	0,8	0,7
Erytromycin x Vankomycin	0,5	0,5

FIC verdiene viste at det ikke var noen synergieffekt for WT ved bruk av to-komponentbehandling med GarKS og H1, og at denne type behandling ikke var tilstrekkelig til å hemme vekst av H1 resistente celler. Videre ble det hverken for WT eller mutant observert en synergisk effekt ved behandling med GarKS og vankomycin, men det ses at mutanten virker å ha noe dårligere motstandsdyktighet. Lignende funn ble gjort ved behandlingen med GarKS og erytromycin, der det heller ikke ble funnet en FIC-verdi som tilsier synergi. For to-komponentbehandling med erytromycin og vankomycin ble FIC

beregnet til 0,5 for både WT og mutant, noe som tilsier at denne type behandling ikke ga opphav til synergisk effekt. Det bemerkes at denne verdi ligger svært tett opp imot grensen for det som defineres som synergi.

3.8 RseP er viktig for evnen til å danne biofilm

Dannelse av biofilm hos mange arter er ansett å være del av en stressrespons, ettersom biofilm gir cellene et mer motstandsdyktig miljø. For å undersøke om RseP er involvert i prosesser som er viktige for produksjon av biofilm, ble biofilm hos mutantene målt og sammenlignet med villtype. Grad av biofilmdannelse ble bestemt ved bruk av en fargeteknikk, der biofilm farges med krystallfiolett. Fargen blir så ekstrahert og målt, mengden farge representerer mengden biofilm som var til stede. Målinger med OD₆₀₀ over 5 ble bestemt til å være en god biofilm, dette ble basert på tester med *S. aureus* stammer (Tabell 1.1) som er gode biofilmdannere. Forsøkene viste at det er en tydelig forskjell i biofilmdannelse hos mutantene sammenlignet med villtype, mens denne forskjellen er mindre for stammen *S. haemolyticus* LMGT 4071 (Figur 3.5).

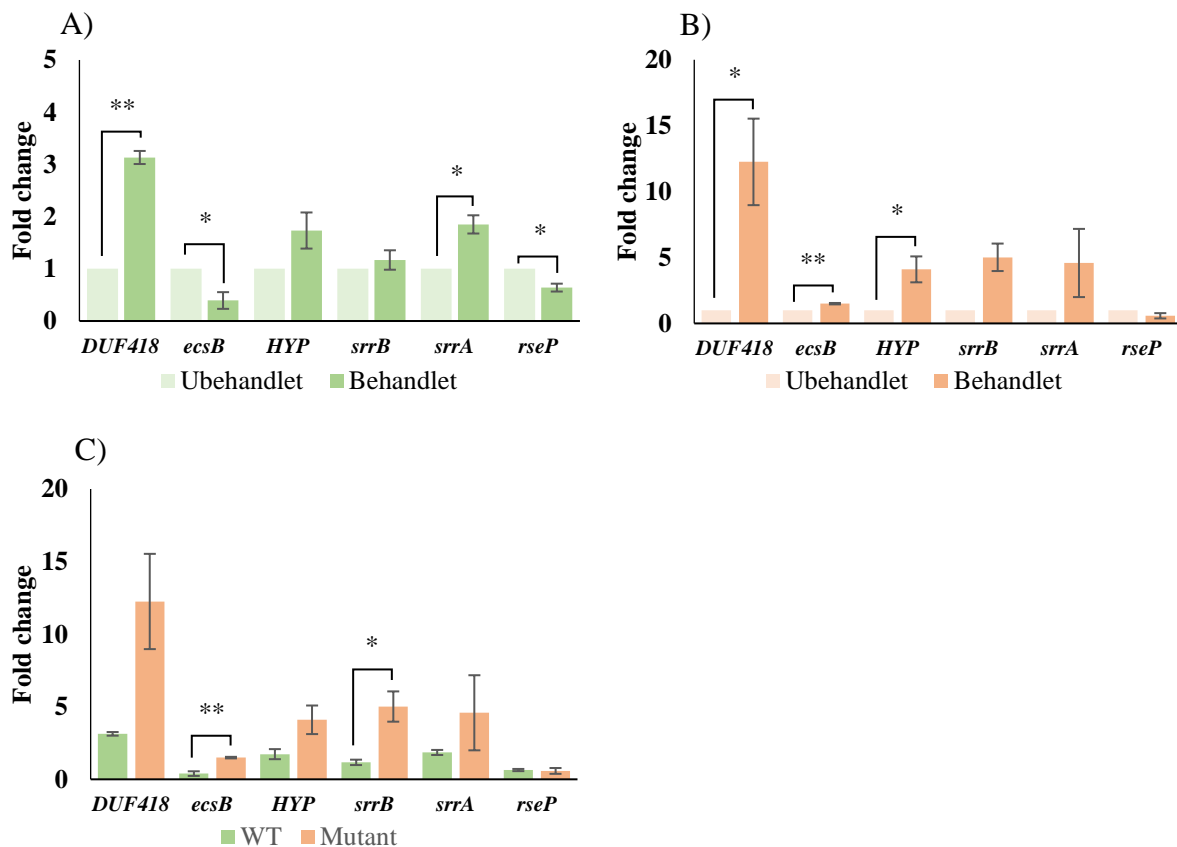


Figur 3.5 Biofilmdannelse assay. Evnen til biofilmdannelse i *S. haemolyticus* villtype (4071, 4072, og 4073) og tilhørende mutanter (M). Hver søyle er gjennomsnittsverdi fra 8 tekniske replikater fra 6 uavhengige forsøk, der feilfeltene viser prøve standardavvik . *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001. Enveis variansanalyse.

Alle WT stammene viste god evne til å danne biofilm med en OD₆₀₀ på over 5, mens mutantene til både LMGT 4072 og 4073 hadde en OD₆₀₀ på 1-3. Spesielt påvirket var biofilmdannelse hos M11_72 og M17_73, som begge hadde en OD₆₀₀ på rundt 1 (5 ganger lavere enn villtype stamme).

3.9 RseP er involvert i genreguleringen av *ecsB* og *srrA*

For å få dypere innsikt i rollen til RseP under stress ble mRNA-nivåene av et utvalg gener som tidligere har vært koblet til RseP i *S. haemolyticus* undersøkt^{43,72}. Blant disse er *srrA* og *srrB* som er del av et to-komponentsystem som er involvert i oksidativt stress. I tillegg ble genene *DUF418* og hypotetisk protein (*HYP*), uten kjent funksjon, undersøkt. Det ble også undersøkt om antallet transkripter av *rseP* ble endret hos mutanten sammenlignet med WT. Til slutt ble det undersøkt om en del av en ABC-transporter, *ecsB*, ble forskjellig uttrykt i WT sammenlignet med mutant, ettersom denne transporteren er kjent å være sterk knyttet til funksjonen til RseP⁴³. Til forsøket ble *S. haemolyticus* LMGT 4073 og M18_73 sammenlignet med og uten 0,005 mg/ml tilsatt GarKS. Mutanten M18_73 ble valgt, da den har ikke-funksjonelt RseP, er mer sensitiv for GarKS og viste sterkt redusert evne til å danne biofilm.



Figur 3.6 Differensielt genuttrykk kvantifisert med RT-qPCR for ubehandlet eller GarKS behandlet (0,005 mg/ml, 30 min) *S. haemolyticus* LMGT 4073 WT, B) Stammen M18_73, og C) *S. haemolyticus* LMGT 4073 WT sammenlignet med M18_73. Beregninger er utført med $\Delta\Delta C_T$ -metoden med *gyrB* som referansegene. Feilfeltene viser prøve standardavvik. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. T-test (parametrisk uparet).

RT-qPCR viste at genene *DUF418* og *srrA* var signifikante høyere nivåer av mRNA transkripter hos *S. haemolyticus* LMGT 4073 WT med GarKS tilsatt (Fig 3.6A). Videre ble det sett at antallet transkripter for genene *ecsB* og *rseP* signifikant reduseres ved stressende

forhold hos WT. For de resterende genene, kodende for *HYP* og *srrB*, ble det ikke observert signifikante forskjeller mellom WT bakterier med og uten behandling med GarKS (Fig 3.6A). *DUF418* mRNA kopier ble signifikant økt hos M18_73 med GarKS, sammenlignet med uten behandling (Fig 3.6B). I tillegg ble antallet transkripter *ecsB* og *HYP* signifikant økt under behandling med GarKS. For *srrB*, *srrA* og *rseP* ble det ikke funnet noen signifikant forskjell mellom behandlede og ikke-behandlede mutant celler (Fig 3.6B). Ved å sammenligne WT og M18_73, sees signifikante forskjeller i mRNA nivåer for *ecsB* og *srrB*, der mutanten hadde en høyere mengde av begge genene enn det sett for WT. I motsetning til M18_73 som ga høyere nivåer *ecsB* mRNA etter tilsatt GarKS, viste villtype en reduksjon i *ecsB* mRNA nivåer. For de resterende genene ble det ikke observert noen signifikante forskjeller i regulering.

4. Diskusjon

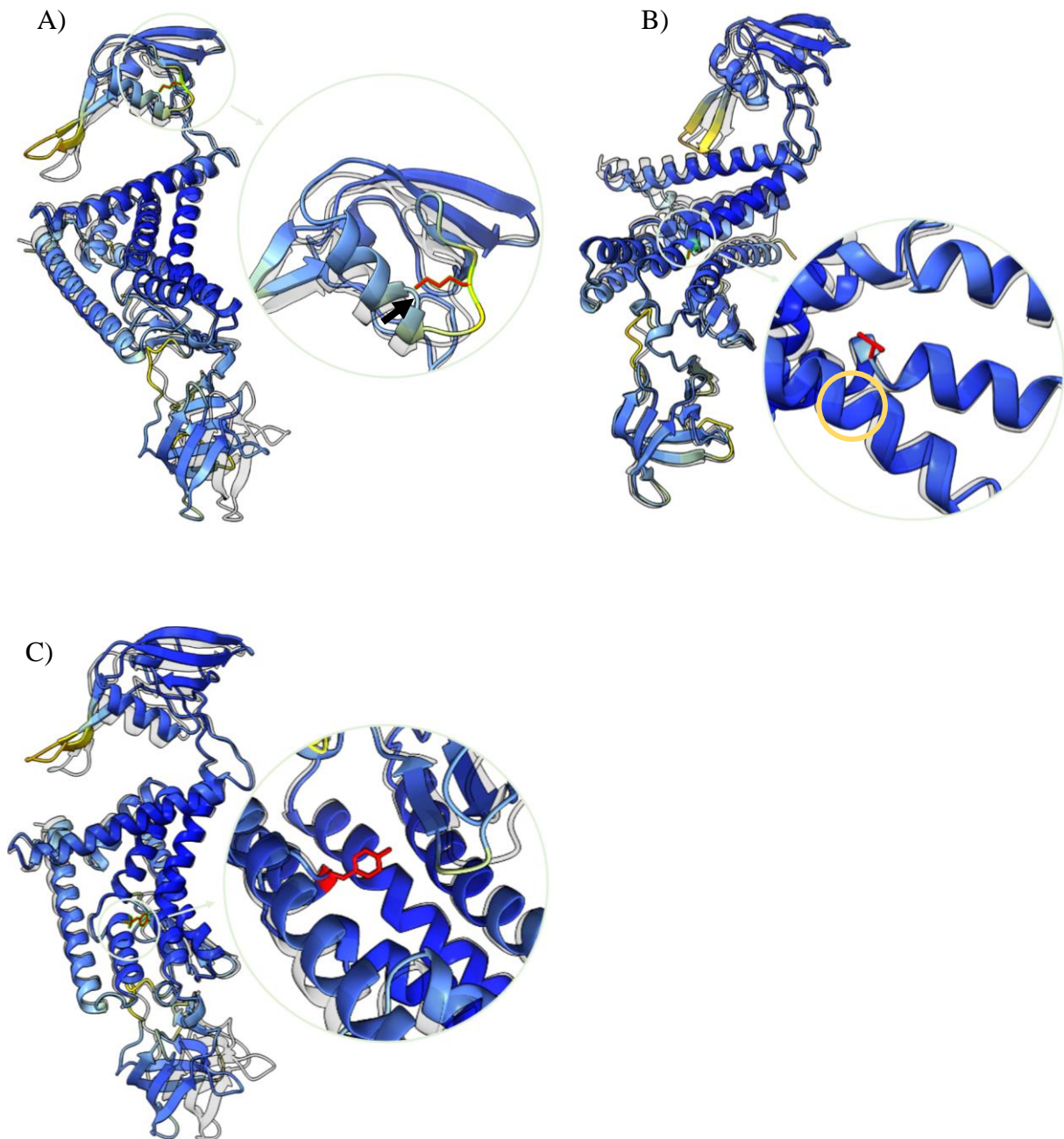
I tråd med tidligere studier ble det i dette arbeidet funnet at behandling av *S. haemolyticus* med hybridbakteriocinet H1 ga opphav til resistente kolonier i løpet av de første 24 timer, noe som tilsynelatende begrenser H1 sitt behandlingspotensial⁴³. For å lære mer om mekanismen bak resistensen mot H1 ble det utført helgenomsekvensering av sju tilfeldig valgte H1-resistente stammer. Blant disse ble det for seks av dem funnet mutasjon i *rseP*, mens for den siste stammen ble det ikke funnet noen mutasjon. Disse funnene er sterke bevis for at RseP er knyttet til den observerte resistensen mot H1, noe som er i samsvar med tidligere undersøkelser der det er vist at RseP er bindingssetet for H1⁴³. Det som imidlertid var overraskende er at funnene i dette arbeidet tyder på at den vanligste årsaken til resistens mot H1 er mutasjon i *rseP*, der 5 av 6 tilfeldig utvalgte stammer hadde mutasjon i dette genet. Tidligere funn har antydnet at det er en annen gengruppe, *ecsAB*, som er hot spot for mutasjoner hos H1 resistente kolonier, da denne er sterkt knyttet til aktiviteten til RseP⁴³. Likevel er ikke disse forskjellene bemerkelsesverdige da begge genproduktene viser seg å være sterkt knyttet til sensitivitet mot H1.

Ettersom RseP i flere bakterier er vist å ha en viktig rolle i regulering av stressrespons ble det hypotetisert at en mutasjon i dette genet vil påvirke levedyktigheten. Dette ble testet med sensitivitetstesting med ulike forbindelser inkludert flere antibiotika. Først ble det vist at samtlige mutanter var resistente for H1 ved alle konsentrasjoner testet, mens WT viste sensitivitet. Deretter ble stammene utsatt for en rekke forbindelser som det var tenkt kunne påføre cellene stress. For de fleste forbindelsene ble det ikke funnet forskjell i sensitivitet mellom WT og mutant, mens for enkelte stoffer ble det funnet noen små ulikheter. Dette kan

muligens forklares med hvilken σ -faktor RseP er involvert i å aktivere, og dermed hvilke prosesser som reguleres av RseP. I en artikkel av Shaw et al. (2004) ble ECF σ^S i *S. aureus* undersøkt, og funnene gjort tydet på at responsen på stress i form av blant annet etanol, SDS og ulike typer antibiotika ikke reguleres av denne σ -faktoren²⁵. Ettersom disse funnene samsvarer med en del av resultatene i dette arbeidet, er det mulig å spekulere i at RseP er involvert i aktiveringen av en homolog σ -faktor i *S. haemolyticus* og at *rseP* mutanter derfor ikke responderer på denne typen stress forskjellig fra WT.

Det ble derimot funnet at mutantene var mer sensitive mot GarKS. Virkemåten til dette bakteriocinet ble undersøkt gjennom propidiumjodid-assay (Figur 3.2). Det ble vist at fluorescens økte ved behandling med GarKS, noe som tyder på at GarKS danner porer cellemembranen til bakterien, som tillater propidiumjodid å lekke inn i cellen og binde til DNAet. Det ble også sett at aktiviteten til GarKS var dårligere enn de andre bakteriocinene, inkludert NisA. Dette kan tyde på at GarKS har god evne til å danne pore, på tross av lav aktivitet. For H1 derimot ble det observert at bakteriocinet hadde stor hemningszone og god aktivitet, mens det kun ble sett lave nivåer av fluorescens, noe som kan bety på at H1 ikke lager porer i bakteriecellen. Det kan virke som at de to bakteriocinene har ulike virkemåter, og påfører cellen ulike typer stress. Dermed kan GarKS brukes til å påføre cellene generell membran-assosiert stress, lignende det påført av antimikrobielle peptider produsert av mennesker⁷³.

Selv om det for de fleste mutantene ble observert høyere sensitivitet mot GarKS enn det sett for WT, ble ikke disse funnene gjort for M1_71 og M3_71 som viste tilnærmet lik motstandsdyktighet mot GarKS som WT. Det spekuleres i om disse observasjonene er knyttet til mutasjonssted i tillegg til hvor stor endring i aminosyresekvensen mutasjonen fører til. Strukturer til mutantene med punktmutasjon ble predikert ved bruk av AlphaFold2 for å bestemme mutasjonssted for punktmutasjonene i RseP (Figur 4.1A-C). Mutasjonen funnet i M1_71 (Thr232Lys) befinner seg i PDZ-domenet i RseP der det tilsynelatende har oppstått et brudd i en alfaheliks som følge av mutasjonen (Figur 4.1 A). Mutasjonen i M12_72 (V178G) er i en av de transmembrane heliksene, som ligger parallelt med det aktive setet (Figur 4.1B). Til slutt ble det sett at mutasjonen i M17_73 befant seg i LDG motivet som er involvert i binding av substratet og utgjør en del av det katalytiske senteret (Figur 4.1C).



Figur 4.1 Oversikt over mutasjonssteder til de ulike *rseP* mutantene. A) Mutasjon p.T234K for M1_71 med er plassert i PDZ-domenet der det tilsynelatende har oppstått et brudd i en alfaheliks som følge av mutasjonen (markert med pil). B) Mutasjonssted for M12_72 med mutasjon p.V128G ligger i umiddelbar nærhet parallelt med det aktive setet (ringet rundt i gul). C) Mutasjonssted for M17_73 med mutasjon p.D378Y befinner seg i det konserverte motivet LDG som er involvert i binding av substrat, som sammen med det aktive setet og sink-ionet utgjør det katalytiske senteret.

For to av mutantene, M11_72 og M18_73, ble det funnet at mutasjonen førte til prematur terminering av aminosyresekvensen, noe som gir et trunkert genprodukt (Tabell 3.1). Disse stammene var henholdsvis 2,5 og 2,8 ganger mindre motstandsdyktige mot GarKS enn det observert for WT. I tillegg ble det funnet en mutasjon i det som antakeligvis er det ribosomale bindingssetet til *rseP* mRNA. Denne mutasjonen resulterte i 2,3 ganger dårligere motstandsdyktighet mot GarKS enn det sett hos WT, noe som kan komme av at initieringen

av translasjonen til RseP er forstyrret i denne stammen. De resterende mutasjonene ble funnet som missense punktmutasjoner. For disse mutasjonene ble det observert at M1_71 var tilnærmet like motstandsdyktig mot GarKS som WT, mens M12_72 og M17_73 tålte behandling med GarKS henholdsvis 2,8 og 2,5 ganger dårligere enn WT. Disse funnene tyder på at trunkert RseP er lite funksjonell og gir dårlig stressrespons når stammene behandles med GarKS. Liknende observasjoner ble gjort der det ble funnet mutasjon i RBS for *rseP*, som ytterligere bekrefter at RseP er viktig i stressregulering når cellene behandles med GarKS. Observasjonene gjort for M12_72 og M17_73 med mutasjoner nært det katalytiske senteret som førte til dårligere motstandsdyktighet mot GarKS, bidrar til å bekrefte at proteaseaktiviteten til RseP er viktig for vekst under stressende forhold. Til slutt ble det observert at mutasjoner i PDZ-domenet tilsynelatende ikke er essensielt for normal stressrespons, eventuelt tillater denne mutasjonen binding av substrat nødvendig for normal stressrespons, mens H1 ikke lenger kan binde i bindingssetet.

Som tidligere nevnt ble det ikke funnet noen mutasjon hos mutanten M3_71. En mulig forklaring er at motstandsdyktighet mot antimikrobielle stoffer kan oppstå som følge av endringer i genuttrykk, uten at den genetiske koden endres. Likevel er denne forklaringen usannsynlig da bakterien er vist å være fullstendig resistent mot H1. En annen mulig forklaring er at mutasjonen ligger i et område som er dårlig dekket av helgenomsekvenseringen. Muligens er dette en mutasjon som påvirker regulering av *rseP* eller *ecsAB*. Eventuelt kan dette være et gen som ikke er annotert, eller være i et område som regulerer uttrykk av disse genene. Dersom man antar at mutasjonen ligger i et regulativt område ville man forventet at stressresponsen hos denne bakterien ville vært dårligere enn den observert for WT, slik som det ble sett for M13_72. Dersom man ser på motstandsdyktighet mot H1 viser det seg imidlertid at M3_71 har lignende motstandsdyktighet mot H1 som WT og M1. Det spekuleres i om disse funnene er stammeavhengig og at LMGT 4071 har en annen regulering av stress enn det sett for LMGT 4072 og LMGT 4073, ettersom denne stammen skiller seg ut fra testene på levedyktighet.

Det ble også undersøkt om veksthastigheten ble påvirket under stressende forhold. Ettersom det ble vist at GarKS hemmet vekst, ble dette stoffet valgt som stressfaktor i disse forsøkene. Resultatene her bekrefter i stor grad funnene gjort ved sensitivitetstesting med GarKS. Det ble sett at M1_71 og M3_71 hadde lignende vekst over tid som WT, og at veksten til disse mutantene tilsynelatende ikke ble påvirket av GarKS. Videre ble det sett at de resterende mutantene hadde dårligere vekst under behandling med GarKS enn det sett for WT. I likhet

med funnene gjort for sensitivitetstesting med GarKS, tyder dette på at disse stammene har fått en fitnesskostnad som følge av mutasjonen som gir resistens mot H1.

Ettersom at det ble observert at behandling med H1 ga opphav til resistente kolonier ble det undersøkt om resistensutvikling kunne unngås ved bruk av to-komponentbehandling og også om det var forskjell mellom WT og mutant sin evne til å motstå denne type behandling. I disse forsøkene ble det kun undersøkt forskjell mellom WT og mutant med ikke-funksjonelt RseP (M18_73) for å se konsekvensen av de mest inngripende mutasjonene. Det ble sett at ved to-komponent behandling med H1 og GarKS oppstod det kun additiv effekt hos WT, mens det hos mutanten kun var GarKS som ga hemmende effekt. Denne type behandling kan derfor ikke sies å være effektiv i behandlingen av *S. haemolyticus* og denne type behandling var ikke i stand til å hindre utvikling H1-resistente kolonier. Dette funnet bekrefter ytterligere begrensingene H1 har som behandlingsmiddel da resistens oppstår også under stressende forhold. Videre ble det også testet forskjell i antibiotikasensitivitet mellom mutant og WT under stress med GarKS. Disse forsøkene viste også kun additive effekter, selv om mutanten virker å være noe mer sensitiv. Den mest effektive to-komponentbehandlingen var mellom erytromycin og vankomycin med en FIC-verdi på 0,5. Disse funnene antyder at kombinasjon av ulike typer antibiotika kan være effektiv behandling mot *S. haemolyticus* LMGT 4073. Likevel ble det ikke observert noen forskjell i sensitivitet mellom WT og M18_73, noe som tyder på at mutanten ikke er enklere å behandle med antibiotika, tross dårligere stressrespons med bruk av GarKS.

Siden biofilmdannelse er en viktig virulensfaktor og stressrespons ble det også undersøkt om H1-resistente mutanter hadde endret evne til å danne biofilm. Det ble sett at M1_71 og M3_71 hadde lignende evne til å danne biofilm som det observert for WT, mens de resterende mutantene hadde dårlig evne til å danne biofilm sammenlignet med WT. Disse funnene korrelerer med funnene gjort ved stressforsøk, der M1_71 og M3_71 vokser likt som WT med GarKS i mediet, mens de resterende mutantene har dårligere vekst med GarKS. Det foreslås at RseP sin naturlige rolle i cellen er sterkt koblet til *S. haemolyticus* sin evne til å danne biofilm. Videre, ettersom M1_71 og M3_71 har normal evne til å danne biofilm, så kan det forklare disse bakterienes evne til å vokse likt som WT med GarKS. Etter som de fleste mutantene har dårligere biofilmdannelse kan det tenkes at H1-resistente kolonier er mindre patogene enn WT. Blant annen er biofilmdannelse viktig for immununngivelse, og det kan tenke seg at denne type mutanter lettere blir drept av immunceller. I tillegg er biofilm viktig for bakteriens evne til å feste seg på abiotiske overflater og dermed deres evne til å leve på

medisinske implantater. Derfor kan det tenkes at *rseP*-mutanter sin reduserte evne til å danne biofilm også fører til redusert virulens, slik at pasienten får et mildere sykdomsforløp, noe som åpner muligheten for at H1 som behandlingsmiddel.

For å få en dypere forståelse rundt RseP sin rolle i stressregulering ble uttrykk av et utvalg gener undersøkt ved bruk av RT-qPCR. I denne analysen ble det funnet at *srrA* mRNA var signifikant høyere i WT når den ble utsatt for stress, mens disse funnene ikke var signifikante for mutanten. Dette tyder på at reguleringen av dette genet er sterkt koblet til funksjonelt RseP. Disse funnene korrelerer med funnene gjort for mutantens evne til å danne biofilm, da det er funnet at SrrA er kjent i å være involvert i aktivering av gener koblet til biofilmdannelse. På tross av funnene gjort for *srrA*, ble det ikke funnet en signifikant høyere antall transkripter av *srrB* selv om disse genene finnes i det samme operonet. Dette kan bidra til å svekke troverdigheten til funnene gjort, og transkripsjonen av disse genene burde undersøkes nærmere for å få en mer definitiv innsikt i RseP sin rolle i reguleringen av dem. Det ble også sett at *DUF418* ble oppregulert med GarKS induisert stress for begge stammene, noe som kan tyde på at dette genet er knyttet til stressregulering, men at reguleringen av dette genet ikke styres av RseP. Det ble også sett at antallet *ecsB* transkripter ble signifikant redusert hos WT, mens det ble signifikant økes mutanten. Lignende ble *rseP* mRNA uttrykket nedregulert hos WT, mens det ikke ble funnet noen signifikant endring i uttrykk av dette genet hos mutanten uten funksjonelt *rseP*. Disse kan tyde på at stressresponsen som styres av RseP er en selvregulerende prosess som senker transkripsjonen av *ecsB* og *rseP* etter aktivering, men dette er mekanismer som må undersøkes videre.

Det ble også sett at *ecsB* og *srrB* mRNA nivåer var signifikant høyere uttrykt hos mutanten enn det sett for WT, i tillegg virker genuttrykket hos mutanten å være generelt høyere enn det sett for WT, selv om dette ikke er statistisk signifikant. Dette på tross av at de fleste genene hos mutanten ikke var signifikant oppregulert, noe som kan indikere et høyere transkripsjonsnivå av de utvalgte genene hos mutanten også uten stress, noe som bekreftes av C_T-verdier fra RT-qPCR analysen (Vedlegg 1; Tabell 7.1). Disse funnene kan tyde på at RseP også har en rolle som negativ regulator av disse genene under normale fysiologiske forhold, og at RseP også har en funksjon også når bakterien ikke er utsatt for stress.

Det ble i dette arbeidet funnet at funksjonelt RseP er viktig for normal vekst under stressende forhold induisert av GarKS. Det ble sett at spesielt evnen til å danne biofilm ble redusert hos *rseP*-mutanter der veksten med GarKS var redusert. Proteinsekvensene til disse stammene ble vist å være forkortet, eller ha mutasjoner i områder som interagerer med det katalytiske

senteret, noe som viser at disse områdene er essensielle for den proteolytiske aktiviteten til RseP. Det ble også funnet at antallet mRNA transkripter av *srrA* økte under stress hos WT, mens disse observasjonene ikke ble gjort for mutanten. Dette gir sterke bevis for at RseP regulerer uttrykk av dette genet, som også er vist å være koblet til biofilmdannelse. Dermed tyder mye på at RseP er viktig for *S. haemolyticus* sin overlevelse under noen typer stress og spesielt gjennom regulering av biofilmdannelse. Ettersom biofilmdannelse er en viktig virulensfaktor vil dermed *rseP*-mutanter ha svekket virulens, noe som understreker potensialet denne proteasen har som antimikrobielt mål.

5. Konklusjon og videre arbeid

For å få en dypere innsikt i reguleringen styrt av RseP vil det være interessant å ytterligere undersøke hvilke gener som styres av denne mekanismen, i tillegg til hvilke gener som aktiveres av SrrA hos *S. haemolyticus*. Eksempelvis kan det spekuleres i om SrrA er involvert i reguleringen av PSM-gener, da disse genene er ansvarlige for å danne kanaler i biofilmen som kan tillate oksygen å nå ned i dypere lag av biofilmen. Det er rimelig å anta at SrrA, som reagerer på respiratorisk stress, vil aktivere disse genene når oksygenivået er lavt, slik at cellene kan tilpasse seg og overleve under slike forhold. Funn gjort av Pragman et al. (2004) tyder på at SrrAB systemet kan påvirke Agr-systemet, som er et quorum-sensing system som omtales som hovedregulatoren for stafylokokkvirulensfaktorer^{16,74}. Dette systemet er igjen vist å være involvert i reguleringen av PSM, noe som indikerer at SrrA indirekte kan være involvert i reguleringen av denne typen gener⁷⁴. En dypere forståelse av reguleringen av utført av SrrA og deres rolle i biofilmdannelse kan ha viktige implikasjoner for utviklingen av nye antimikrobielle strategier rettet mot RseP. Videre undersøkelse av reguleringen av genene via SrrA-systemet hos *S. haemolyticus* vil være verdifullt for både grunnleggende forskning og utviklingen av nye terapeutiske tilnærminger. I tillegg vil det være interessant å få en bedre forståelse av rollen til PDZ-domenet hos *S. haemolyticus* da mutasjoner i dette domenet tilsynelatende ikke endrer fenotypen til mutanten utover dens motstandsdyktighet mot H1. Til slutt vil det være interessant å forstå rollen DUF418 har i stressresponsen hos bakterier, selv om denne tilsynelatende ikke er koblet til RseP.

6. Referanser

1. Czekaj, T., Ciszewski, M. & Szewczyk, E. M. *Staphylococcus haemolyticus* – an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology* **161**, 2061–2068 (2015).
2. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014).
3. Takeuchi, F. *et al.* Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* Uncovers the Extreme Plasticity of Its Genome and the Evolution of Human-Colonizing Staphylococcal Species. *J. Bacteriol.* **187**, 7292–7308 (2005).
4. Silva, P. V. *et al.* The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 812–813 (2013).
5. França, A., Gaio, V., Lopes, N. & Melo, L. D. R. Virulence Factors in Coagulase-Negative Staphylococci. *Pathogens* **10**, 170 (2021).
6. Switalski, L. M. *et al.* Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infect. Immun.* **42**, 628–633 (1983).
7. Pinheiro, L. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* : Molecular Detection of Cytotoxin and Enterotoxin Genes. *Toxins* **7**, 3688–3699 (2015).
8. Abraham, W.-R. Going beyond the Control of Quorum-Sensing to Combat Biofilm Infections. *Antibiotics* **5**, 3 (2016).
9. Fredheim, E. G. A. *et al.* Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1172–1180 (2009).
10. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332 (2010).
11. Kaplan, J. B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J. Dent. Res.* **89**, 205–218 (2010).
12. Otto, M. Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 207–228 (2008).
13. Le, K. Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V. & Otto, M. Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
14. Barros, E. M., Ceotto, H., Bastos, M. C. F., dos Santos, K. R. N. & Giambiagi-deMarval, M. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 166–168 (2012).

15. Tiwari, S. *et al.* Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
16. Pragman, A. A., Yarwood, J. M., Tripp, T. J. & Schlievert, P. M. Characterization of Virulence Factor Regulation by SrrAB, a Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 2430–2438 (2004).
17. Tiwari, N. *et al.* The SrrAB two-component system regulates *Staphylococcus aureus* pathogenicity through redox sensitive cysteines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 10989–10999 (2020).
18. Mashruwala, A. A., van de Guchte, A. & Boyd, J. M. Impaired respiration elicits SrrAB-dependent programmed cell lysis and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *eLife* **6**, e23845.
19. Ho, T. D. & Ellermeier, C. D. Extra Cytoplasmic Function σ Factor Activation. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 182–188 (2012).
20. Helmann, J. D. *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**, 122–132 (2016).
21. Lourenço, R. F., Kohler, C. & Gomes, S. L. A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **80**, 1598–1612 (2011).
22. Deora, R. & Misra, T. K. Characterization of the Primary σ Factor of *Staphylococcus aureus**. *J. Biol. Chem.* **271**, 21828–21834 (1996).
23. Wu, S., de Lencastre, H. & Tomasz, A. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J. Bacteriol.* **178**, 6036–6042 (1996).
24. Morikawa, K. *et al.* A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells* **8**, 699–712 (2003).
25. Shaw, L. N. *et al.* Identification and Characterization of σ S, a Novel Component of the *Staphylococcus aureus* Stress and Virulence Responses. *PLOS ONE* **3**, e3844 (2008).
26. Osmundson, J., Montero-Diez, C., Westblade, L. F., Hochschild, A. & Darst, S. A. Promoter-Specific Transcription Inhibition in *Staphylococcus aureus* by a Phage Protein. *Cell* **151**, 1005–1016 (2012).
27. Horsburgh, M. J. *et al.* σ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* **184**, 5457–5467 (2002).

28. Jonsson, I.-M., Arvidson, S., Foster, S. & Tarkowski, A. Sigma Factor B and RsbU Are Required for Virulence in *Staphylococcus aureus*-Induced Arthritis and Sepsis. *Infect. Immun.* **72**, 6106–6111 (2004).
29. Kullik, I., Giachino, P. & Fuchs, T. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* **180**, 4814–4820 (1998).
30. Rachid, S. *et al.* Alternative Transcription Factor ζ B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate. *J. Bacteriol.* **182**, 6824–6826 (2000).
31. Kanehara, K., Akiyama, Y. & Ito, K. Characterization of the *yaeL* gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. *Gene* **281**, 71–79 (2001).
32. De Las Peñas, A., Connolly, L. & Gross, C. A. The σ E-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ E. *Mol. Microbiol.* **24**, 373–385 (1997).
33. Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A. & Sauer, R. T. OMP Peptide Signals Initiate the Envelope-Stress Response by Activating DegS Protease via Relief of Inhibition Mediated by Its PDZ Domain. *Cell* **113**, 61–71 (2003).
34. Lima, S., Guo, M. S., Chaba, R., Gross, C. A. & Sauer, R. T. Dual Molecular Signals Mediate the Bacterial Response to Outer-Membrane Stress. *Science* **340**, 837–841 (2013).
35. Alba, B. M., Leeds, J. A., Onufryk, C., Lu, C. Z. & Gross, C. A. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the ζ E-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* **16**, 2156–2168 (2002).
36. Kim, D. Y. Two stress sensor proteins for the expression of sigmaE regulon: DegS and RseB. *J. Microbiol.* **53**, 306–310 (2015).
37. Ellermeier, C. D. & Losick, R. Evidence for a novel protease governing regulated intramembrane proteolysis and resistance to antimicrobial peptides in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **20**, 1911–1922 (2006).
38. Varahan, S., Iyer, V. S., Moore, W. T. & Hancock, L. E. Eep Confers Lysozyme Resistance to *Enterococcus faecalis* via the Activation of the Extracytoplasmic Function Sigma Factor SigV. *J. Bacteriol.* **195**, 3125–3134 (2013).
39. Chandler, J. R. & Dunny, G. M. Characterization of the Sequence Specificity Determinants Required for Processing and Control of Sex Pheromone by the Intramembrane Protease Eep and the Plasmid-Encoded Protein PrgY. *J. Bacteriol.* **190**, 1172–1183 (2008).

40. Varahan, S., Harms, N., Gilmore, M. S., Tomich, J. M. & Hancock, L. E. An ABC Transporter Is Required for Secretion of Peptide Sex Pheromones in *Enterococcus faecalis*. *mBio* **5**, e01726-14 (2014).
41. Frank, K. L. *et al.* Use of Recombinase-Based In Vivo Expression Technology To Characterize *Enterococcus faecalis* Gene Expression during Infection Identifies In Vivo-Expressed Antisense RNAs and Implicates the Protease Eep in Pathogenesis. *Infect. Immun.* **80**, 539–549 (2012).
42. Cheng, D. *et al.* Roles of the Site 2 Protease Eep in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **202**, e00046-20 (2020).
43. Kranjec, C. *et al.* A bacteriocin-based treatment option for *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Sci. Rep.* **11**, 13909 (2021).
44. Schneider, J. S. & Glickman, M. S. Function of site-2 proteases in bacteria and bacterial pathogens. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 2808–2814 (2013).
45. Feng, L. *et al.* Structure of a Site-2 Protease Family Intramembrane Metalloprotease. *Science* **318**, 1608–1612 (2007).
46. Inaba, K. *et al.* A Pair of Circularly Permutated PDZ Domains Control RseP, the S2P Family Intramembrane Protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **283**, 35042–35052 (2008).
47. Akiyama, K. *et al.* Roles of the membrane-reentrant β -hairpin-like loop of RseP protease in selective substrate cleavage. *eLife* **4**, e08928.
48. Imaizumi, Y. *et al.* Mechanistic insights into intramembrane proteolysis by *E. coli* site-2 protease homolog RseP. *Sci. Adv.* **8**, eabp9011 (2022).
49. Benítez-Chao, D. F., León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J. A. & Morones-Ramírez, J. R. Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
50. Ovchinnikov, K. V. *et al.* The Leaderless Bacteriocin Enterocin K1 Is Highly Potent against *Enterococcus faecium*: A Study on Structure, Target Spectrum and Receptor. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
51. Cintas, L. M., Casaus, P., Fernández, M. F. & Hernández, P. E. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* **15**, 289–298 (1998).
52. Nes, I. F., Diep, D. B. & Holo, H. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**, 1189–1198 (2007).

53. Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegård, C., Haugen, H. S. & Kristiansen, P. E. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 19–37 (2009).
54. Kumariya, R. *et al.* Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb. Pathog.* **128**, 171–177 (2019).
55. Simons, A., Alhanout, K. & Duval, R. E. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms* **8**, 639 (2020).
56. Oscáriz, J. C. & Pisabarro, A. G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **4**, 13–19 (2001).
57. Bierbaum, G. & Sahl, H.-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 2–18 (2009).
58. Devi, S. M. & Halami, P. M. Detection and Characterization of Pediocin PA-1/AcH like Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria. *Curr. Microbiol.* **63**, 181–185 (2011).
59. Héchard, Y. & Sahl, H.-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**, 545–557 (2002).
60. Perez, R. H., Zendo, T. & Sonomoto, K. Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
61. Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. & Kuipers, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2939–2951 (2016).
62. Miljkovic, M. *et al.* LsbB Bacteriocin Interacts with the Third Transmembrane Domain of the YvjB Receptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 5364–5374 (2016).
63. Gajic, O. *et al.* Novel Mechanism of Bacteriocin Secretion and Immunity Carried Out by Lactococcal Multidrug Resistance Proteins *. *J. Biol. Chem.* **278**, 34291–34298 (2003).
64. Gálvez, A. *et al.* Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol.* **171**, 59–65 (1998).
65. Kjos, M. *et al.* Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* **157**, 3256–3267 (2011).
66. Duthie, E. S. & Lorenz, L. L. Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *Microbiology* **6**, 95–107 (1952).
67. Keane, O. M., Budd, K. E., Flynn, J. & McCoy, F. Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex aetiology. *Vet. Rec.* **173**, 17 (2013).

68. Novick, R. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* **33**, 155–166 (1967).
69. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* **19**, 679–682 (2022).
70. Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center | Nucleic Acids Research | Oxford Academic.
<https://academic.oup.com/nar/article/45/D1/D535/2605866>.
71. Meletiadis, J., Pournaras, S., Roilides, E. & Walsh, T. J. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and In Vitro-In Vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 602–609 (2010).
72. Solberg, K. K. Cost of resistance : stress tolerance and gene expression in wild type and mutant strains of *Staphylococcus haemolyticus* LMG4071. (Norwegian University of Life Sciences, Ås, 2022).
73. Wang, G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals* **7**, 545–594 (2014).
74. Kretschmer, D., Nikola, N., Dürr, M., Otto, M. & Peschel, A. The Virulence Regulator Agr Controls the Staphylococcal Capacity to Activate Human Neutrophils via the Formyl Peptide Receptor 2. *J. Innate Immun.* **4**, 201–212 (2012).

7. Vedlegg

Tabell 7.1 Viser oversikt over gjennomsnittlige C_T -verdier for ubehandlede celler av WT og M18_73 funnet ved RT-qPCR.

	WT	Mutant
DUF418	21,923	19,993
<i>ecsB</i>	24,436	22,128
<i>gyrB</i>	18,203	18,579
Hypotetisk protein	25,494	23,855
<i>rseP</i>	25,873	25,565
<i>srrA</i>	33,028	31,424
<i>srrB</i>	22,586	20,506



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway