



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2023 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Daniel Straume

Etablering av gendeplesjons- systemet ComRS i et penicillinresistent klinisk isolat av *Streptococcus pneumoniae* for studier av resistensfaktorer

Establishment of the gene depletion system
ComRS in a penicillin resistant clinical isolate of
Streptococcus pneumoniae for studies of resistance
factors

Mari Gjeitnes

Bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven ble fullført som den del av masterprogrammet i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Arbeidet ble utført og veiledet i samarbeid med forskningsgruppen Molekylær Mikrobiologi ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) fra august 2022 til juli 2023.

Jeg vil starte med takke mine veiledere Dr. Daniel Straume og Ragnhild Sødal Gjennestad for all veiledning i både laboratoriearbeidet og i skriveprosessen. Takk for at dere er løsningsorienterte og ser muligheter i laboratoriearbeidet, og hatt troen på meg og oppgaven min. Dere har alltid hatt en åpen dør for både smarte og mindre smarte spørsmål, og ikke vært beskjeden med å dele kunnskapen deres. Ikke minst vil jeg takke dere for å ha gitt meg tilliten til å gjennomføre min masteroppgave ved Molekylær mikrobiologigruppen og latt meg ta del i deres forskning.

Jeg vil også takke alle ved forskningsgruppen Molekylær Mikrobiologi for all hjelp, veiledning og samtaler. Dere har lagt til rette for et godt arbeidsmiljø, både for læring og sosialt. Jeg vil rette en spesiell takk til Zhian Salehian for å alltid følge opp laboratoriearbeidet, og tips og triks for vanskelige PCR-reaksjoner og effektivt laboratoriearbeid. Jeg har en stor beundring for ditt arbeid og all kunnskapen du har. Jeg vil også takke mine medmasterstudenter for et godt samarbeid, og ønsker lykke til videre.

Til slutt, vil jeg takke familie og venner for all støtte, oppmuntring og lunsj-quizer, både i masterperioden og i løpet av studietiden. Takk for at dere har gjort mine fem år på NMBU uforglemmelige, lærerik og minnerik. Jeg sitter igjen med mange minner å se tilbake på og gode venner å se fremover med.

Mari Gjeitnes

Juli 2023, Ås

Sammendrag

Verdens helseorganisasjon erklærte *Streptococcus pneumoniae* (pneumokokker) som en av 12 prioriterte patogener. Både på grunnlag av dødeligheten og smittsomheten, men og på grunn av den økende forekomsten av antibiotikaresistens, særlig mot penicillin. Penicillin etterligner penicillin-bindende proteiners (PBP) naturlige substrat for transpeptidering, og inhiberer PBPene ved å binde kovalent til enzymenes aktive sete. Dermed hemmes syntesen av den essensielle celleveggen hos bakterier. Penicillinresistens i pneumokokker er hovedsakelig forårsaket av tilegnelsen av muterte versjoner av PBPer som har lavere affinitet til penicillin. Lavaffinitets-PBPer kan utføre transpeptidering tross lavere affinitet til penicillin. Dette peker mot andre faktorer enn PBPer som i seg selv bidrar til penicillinresistensen, eller som kompenserer for tilegnelsen av mindre effektive lavaffinitets-PBPer. Disse faktorene kan være potensielle mål for å re-sensitivere resistente pneumokokker mot eksisterende penicilliner.

Et fremtidig mål utover dette masterprosjektet er å identifisere ikke-PBP faktorer som bidrar til resistens hos pneumokokker. Ved å revertere et penicillinresistent klinisk isolat ved å gjeninnføre høyaffinitets-PBPer og deretter teste om bakterien fortsatt har høyere toleranse for penicillin, er det mulig å identifisere ikke-PBP faktorer. I dette masterprosjektet har et peptidregulert system for ektopisk genuttrykk i pneumokokker, kalt ComRS-systemet, blitt etablert i et penicillinresistent klinisk isolat for å gjøre det mulig å substituere de native lavaffinitets-PBP2x, -PBP2b og -PBP1a til respektive høyaffinitets-PBPene fra en penicillinsensitiv stamme. Funksjonaliteten til ComRS-systemet i det kliniske isolatet ble testet ved å genere en mutant med ektopiske regulering av lavaffinitets-PBP2b. Deplesjon av det essensielle PBP2b-proteinet førte til redusert bakterievekst, og bekreftet at ComRS-systemet var funksjonelt.

Penicillinresistente isolater har ofte økt mengde forgrenede stempeptider i celleveggen sammenliknet med sensitive isolater. En foreslått hypotese har vært at lavaffinitets-PBPer har unormalt høy affinitet for forgrenede stempeptider. Etersom flere studier indikerer en sammenheng mellom PBP2b og en økning av forgrenede stempeptider i celleveggen, ble lavaffinitets-PBP2b overuttrykt i det resistente isolatet ved hjelp av ComRS-systemet for å undersøke om mengden forgrenet stem-peptid ville øke dramatisk sammenliknet med en penicillinsensitiv stamme. Cellevegganalyse av denne stammen indikerte at isolat med overuttrykk av lavaffinitets-PBP2b hadde en liknende andel indirekte kryssliskninger, som den

penicillinsensitive stammen. Dette viser at resistens mot penicillin kan oppnås i pneumokokker uten at mengde forgrenede stempeptider i celleveggen er høyere enn i en sensitiv stamme.

Ligasen MurM katalyserer binding av første aminosyre i forgreinede stempeptider på lipid II (forløpermolekyl for peptidoglykan). Det er tidligere vist at penicillinresistente isolater med økt mengde forgreinede stempeptider uttrykker en mutert *murM*-versjon, og at delesjon av dette genet fører til en dramatisk reduksjon av resistensnivået. Det resistente isolatet som er studert i dette prosjektet uttrykker en normal versjon av MurM, og kan være en forklaring på at mengden forgrenede stempeptider i celleveggen var tilnærmet lik en sensitiv pneumokokk. Videre ble det konstruert en $\Delta murM$ -mutant for å teste om en normal versjon av MurM var viktig for resistensnivået til isolatet. MIC-test viste at resistensen mot penicillin ble signifikant redusert. Dette kan bety at det ikke bare er i isolater med mutert MurM og høyt forgreinet cellevegg at proteinet er viktig for å opprettholde penicillinresistens, men også at en vanlig MurM er viktig i pneumokokker med en tilnærmet normal stempeptidkomposisjon. Virkningsmekanismene til MurM er enda ukjent, men det ble i denne studien sannsynligvis utelukket at den påvirker affiniteten mellom penicillin og PBPene. Uansett, reduserer inhibering av MurM penicillinresistensen betydelig. Dermed er det et stort potensial for bruk av et inhiberende stoff mot MurM i kombinasjon med penicillinbehandling av infeksjoner forårsaket av penicillinresistente pneumokokker.

Summary

The World Health Organization declared *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) as one of 12 prioritized pathogens. This was based on both its mortality and morbidity, as well as the increasing prevalence of antibiotic resistance, particularly against penicillin. Penicillin mimics the natural substrate of penicillin-binding proteins (PBPs) for transpeptidation and inhibits PBPs by covalently binding to their active site. This inhibits the synthesis of the essential cell wall in bacteria. Penicillin resistance in pneumococci is mainly caused by the acquisition of mutated versions of PBPs that have lower affinity for penicillin. Despite having lower affinity, these low-affinity PBPs can still carry out transpeptidation. This suggests that factors other than PBPs themselves contribute to penicillin resistance or compensate for the acquisition of less effective low-affinity PBPs. These factors could be potential targets for resensitizing resistant pneumococci to existing penicillins.

A future goal beyond this master's project is to identify non-PBP factors that contribute to resistance in pneumococci. By reversing the penicillin resistance of a clinical isolate through reintroduction of high-affinity PBPs and then testing if the bacteria still exhibit higher tolerance to penicillin, it is possible to identify non-PBP factors. In this master's project, a peptide-regulated system for ectopic gene expression in pneumococci, called the ComRS system, has been established in a penicillin-resistant clinical isolate to enable substitution of the native low-affinity PBP2x, PBP2b, and PBP1a, with their respective high-affinity PBPs from a penicillin-sensitive strain. The functionality of the ComRS system in the clinical isolate was tested by generating a mutant with ectopic regulation of low-affinity PBP2b. Depletion of the essential PBP2b protein resulted in reduced bacterial growth, confirming the functionality of the ComRS system.

Penicillin-resistant isolates often have an increased amount of branched stem peptides in the cell wall compared to sensitive isolates. A proposed hypothesis has been that low-affinity PBPs have abnormally high affinity for branched stem peptides. As several studies indicate a connection between PBP2b and an increase in branched stem peptides in the cell wall, low-affinity PBP2b was overexpressed in the resistant isolate using the ComRS system to investigate whether the amount of branched stem peptides would increase dramatically compared to a penicillin-sensitive strain. Cell wall analysis of this strain indicated that the isolate with overexpression of low-affinity PBP2b had a similar proportion of indirect cross-linking as the penicillin-sensitive strain. This demonstrates that resistance to penicillin can be

achieved in pneumococci without the amount of branched stem peptides in the cell wall being higher than in a sensitive strain.

The ligase MurM catalyzes the binding of the first amino acid in branched stem peptides to lipid II (the precursor molecule for peptidoglycan). It has been previously shown that penicillin-resistant isolates with an increased amount of branched stem peptides express a mutated version of MurM, and deletion of this gene leads to a dramatic reduction in the level of resistance. The resistant isolate studied in this project expresses a normal version of MurM, which could explain why the amount of branched stem peptides in the cell wall was approximately similar to that of a sensitive pneumococcus. Furthermore, a $\Delta murM$ mutant was constructed to test if a normal version of MurM was important for the resistance level of the isolate. MIC assay showed a significant reduction in resistance to penicillin. This suggests that not only in isolates with mutated MurM and highly branched cell walls, but also in pneumococci with an almost normal stem peptide composition, a regular MurM is important for maintaining penicillin resistance. The mechanisms of action of MurM are still unknown, but in this study, it was likely excluded that it affects the affinity between penicillin and PBPs. Nonetheless, inhibition of MurM significantly reduces penicillin resistance. Thus, there is great potential for using an inhibitory compound against MurM in combination with penicillin treatment for infections caused by penicillin-resistant pneumococci.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	3
1.1 Antibiotikaresistens – et stadig økende folkehelseproblem	3
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> – en viktig humanpatogen bakterie.....	4
1.3 Cellevegg syntesen hos <i>S. pneumoniae</i>	5
1.3.1 Penicillinbindende proteiner (PBP).....	7
1.4 Penicillinresistens i <i>S. pneumoniae</i>	8
1.5 Naturlig kompetanse for genetisk transformasjon – pådriver for evolusjon og et genetisk verktøy <i>in vitro</i>	11
1.5.1 ComRS-systemet – et peptidregulert gendeplesjonssystem utviklet for <i>S. pneumoniae</i>	14
1.6 Studiens hensikt.....	17
2. Materialer	18
3. Metoder	20
3.1 Vekst og lagring av <i>S. pneumoniae</i>	20
3.2 Minimum Inhibitorisk Konsentrasjon (MIC)-analyse.....	20
3.3 Mikroskopering	20
3.4 Polymerase kjede reaksjon (PCR).....	21
3.4.1 Overlapp-PCR	21
3.4.2 Gelelektroforese for visualisering og separasjon av PCR-produkter	23
3.5 Genetisk transformasjon i <i>S. pneumoniae</i>	24
3.5.1 Screening av transformanter ved bruk av koloni-PCR.....	24
3.5.2 Sanger sekvensering	25
3.6 Delesjon av kapselgener og <i>murM</i> ved bruk av genetisk transformasjon.....	26
3.7 Etablering av ComRS-systemet i klinisk isolat.....	26
3.8 Deplesjon av essensielle gener ved hjelp av ComRS-systemet	28

3.9 Substitusjon av native <i>pbper</i> som koder for lavaffinitets-PBPer til <i>pbper</i> som koder for høyaffinitets-PBPer, ved bruk av ComRS-systemet	29
3.10 Isolering av cellevegg.....	31
3.11 Høypresisjons væskechromatografi (HPLC)	32
3.12 Merking av PBPer med bocillin FL	33
3.12.1 Natriumdodecylsulfat - polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)	34
4. Resultater.....	35
4.1 Valg av klinisk isolat og delesjon av kapsel	36
4.2 Etablering av ComRS-systemet i et penicillinresistent klinisk isolat	38
4.3 Substitusjon av native <i>pbper</i> som koder for lavaffinitets-PBPer til <i>pbper</i> som koder for høyaffinitets-PBPer	40
4.3.1 Deplesjon av <i>pbp2b^{LA}</i> i stamme MG22 bekrefter et velfungerende ComRS-system	42
4.4 Cellevegganalyse av penicillinresistent isolat som overuttrykker <i>pbp2b^{LA}</i>	45
4.5 MurM og forgreinede lipid II-molekyler sin effekt på penicillins affinitet til PBPer	47
5. Diskusjon.....	51
5.1 Etablering av Janus- og ComRS-systemene i penicillinresistent klinisk pneumokokkisolat	51
5.1.1 Substitusjon av lavaffinitets-PBP2x og -PBP2b til korresponderende høyaffinitetsversjoner i et klinisk isolat	52
5.1.2 Deplesjon av <i>pbp2b^{LA}</i> ved hjelp av ComRS-systemet i klinisk isolat.....	54
5.2 Stempeptidkomposisjonen i celleveggen til penicillinresistent klinisk isolat	56
5.3 MurM påvirker nivå av penicillinresistens, men trolig ikke affiniteten mellom PBPer og penicillin.....	58
6. Konklusjon og videre arbeid	63
7. Referanser.....	65
8. Vedlegg.....	75

1. Introduksjon

1.1 Antibiotikaresistens – et stadig økende folkehelseproblem

Etter Alexander Flemings oppdagelse av penicillin i 1928, har antibiotika vært livreddende medisin for å behandle pasienter med bakterielle infeksjoner (1). Antibiotika har gitt store muligheter for moderne medisin som kreftbehandling og kirurgi, og i tillegg for agrikultur og akvakultur (1–3). Dessverre var gleden kortvarig, for ikke lenge etter kommersialisering av klinisk bruk av antibiotika på 1930-tallet, ble første tilfelle av penicillinresistens identifisert i 1940 (1,4). Siden den gang har resistens mot penicillin og andre typer antibiotika blitt et økende problem globalt, og har blitt erklært som den moderne tids «stille pandemi». Definisjonen på bakteriell antibiotikaresistens er omdiskutert, men kan defineres som når en bakterie tilegner seg egenskaper som hindrer den hemmende eller drepende effekten av antibiotikumet (3,5). Verdens helseorganisasjon har lenge advart mot den økende resistensproblematikken og hvordan den truer fremtidige behandlingsmuligheter (6). Om antibiotika ikke kan brukes i behandling lenger kan mindre alvorlige infeksjoner potensielt bli dødelige, samtidig som moderne medisin trues ettersom risiko for infeksjoner forårsaket av resistente bakterier økes (6). Bakteriell antibiotikaresistens har gitt store konsekvenser for individer, folkehelsen og økonomien i samfunnet.

Det medisinske tidsskriftet *The Lancet* publiserte i 2022 en omfattende rapport som beskriver den globale byrden av bakteriell antibiotikaresistens i 2019 (7). Rapporten estimerte 4,95 million dødsfall assosiert med antibiotikaresistens i 2019, hvorav 1,27 millioner av disse kan direkte knyttes til resistens (7). Nedre luftveisinfeksjoner er den sykdomsgruppen som er ansvarlig for flest dødsfall, med 1,5 million dødsfall assosiert med antibiotikaresistens (7). Dette viser den enorme innvirkningen antibiotikaresistens har på pasienter, men også helsearbeidere, farmasøytiske organisasjoner, helseinstitusjoner, samt nasjonale og internasjonale politiske institusjoner (8). Årsaken til dette er både den økonomiske belastningen og økende behov for arbeidskraft og forbyggende tiltak (8,9).

Antibiotikaresistens fører til en økonomisk belastning for samfunnet. Verdensbankens rapport om antibiotikaresistens fra 2017 viser at en økning i sykdom og dødelighet, gir en direkte og en indirekte kostnad for samfunnet (9). Direkte kostnader omfatter ressurser brukt for behandling som innleggelse og medisiner, hvor antall sykedager og behandlingsbehov øker ved infeksjon av resistente bakterier (9). Indirekte kostnader omfatter nåværende og fremtidig tap

Introduksjon

av ressurser grunnet sykdom, funksjonstap og prematur død som fører til redusert arbeidskraft og tapt inntekt (9). ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) og EMEA (European Medicines Agency) estimerte et økonomisk tap på minimum 1,5 milliard euro i 2007 grunnet produktivitetstap og ekstra kostnader hos helsevesenet (8). Særlig påvirkes lavinntektsland sammenlignet med høyninntektsland, på grunn av flere tilfeller av infeksjon og en større avhengighet av inntekt (8,9). Den økende forekomsten av antibiotikaresistens begrenser derfor den globale og nasjonale økonomiske veksten, og truer derfor FNs bærekraftsmål 1 - å utrydde fattigdom (10).

Den høye forekomsten av antibiotikaresistens er trolig en konsekvens av overforbruk og feilbruk av antibiotika i agrikultur, akvakultur og pasientbehandling (3,11). Det har ført til naturlig seleksjonspress hvor bakterier som eksponeres for antibiotika må tilegne seg egenskaper for resistens for å overleve (3,11). For å bekjempe denne utviklingen krever det globale og nasjonale tiltak. Ulike strategier er informering og bevisstgjøring, overvåking av infeksjoner og restriktiv antibiotikaforbruk, samt forhindre feilbruk ved utvikling av diagnostiske verktøy og tilpasset behandling (3,7). I tillegg kan antibiotikabruken reduseres ved forhindre infeksjoner gjennom hygieniske tiltak og vaksinerings (7,12,13). Ikke minst, så er det svært viktig å investere i utvikling av nye antibiotikum (7,14,15). Uansett så er det bred enighet om behovet for tiltak mot den økende resistensen og forskning for å øke kunnskapen om resistens (7,14).

1.2 *Streptococcus pneumoniae* – en viktig humanpatogen bakterie

Streptococcus pneumoniae, også kalt pneumokokker, er en Gram-positiv, opportunistisk patogen bakterie og regnes som en av de viktigste humanpatogene mikroorganismene (16). Pneumokokker tilhører genuset *Streptococcus*, som videre kan deles inn i 8 fylogenetiske grupper basert på 16S rRNA-sekvenser: pyogenes, anginosus, mitis, salivarius, bovis og mutans (17). Pneumokokker hører til i mitis-gruppen, som er de dominante artene blant den kommensale mikrobiotaen i munnhulen og øvre luftveier (18). Pneumokokker spres mellom mennesker gjennom dråpesmitte, og koloniserer seg asymptomatisk på slimhinnelaget i nasofarynx (16). Omtrent 20-50 % av friske barn og 5-30 % av friske voksne er bærere av bakterien (19).

Siden pneumokokker er opportunistiske bakterier kan de forårsake sykdom hos verten om de spres til andre organer (16,18). Særlig er barn opptil fem år, eldre over 70 år og immunsvekkede

Introduksjon

utsatt for pneumokokkinfeksjon (16). For å kunne forårsake infeksjon benytter bakterien seg av en rekke virulensfaktorer, som for eksempel pneumolysin (lyserer vertens celler), overflateproteinene PspA, PavB og polysakkaridkapselen, som omslutter bakteriecellen (20). Kapselen er viktig for at pneumokokker skal unngå å bli fagocyttert av vertens immunforsvar. Videre kan den spre seg til bihulene, mellomøret, blodstrømmen, hjertet og lungene, og føre til bihulebetennelse, mellomørebetennelse, bakteriemi og blodforgiftning, hjertearytmi og lungebetennelse (20). Pneumokokkinfeksjoner behandles med antibiotika, nærmere bestemt β -laktamer som penicillin og amoxicillin som inhiberer celleveggsyntesen hos bakterien (21). Det er derimot blitt mer utfordrende å bekjempe infeksjoner da det er en økende forekomst av penicillin- og amoxicillinresistens blant pneumokokker (22). Allerede i 1965 ble det identifisert penicillinresistens hos *S. pneumoniae*, mens nå er andelen av penicillinmotstandsdyktige pneumokokkisolater mellom <5 % til 50 % varierende fra land til land (4).

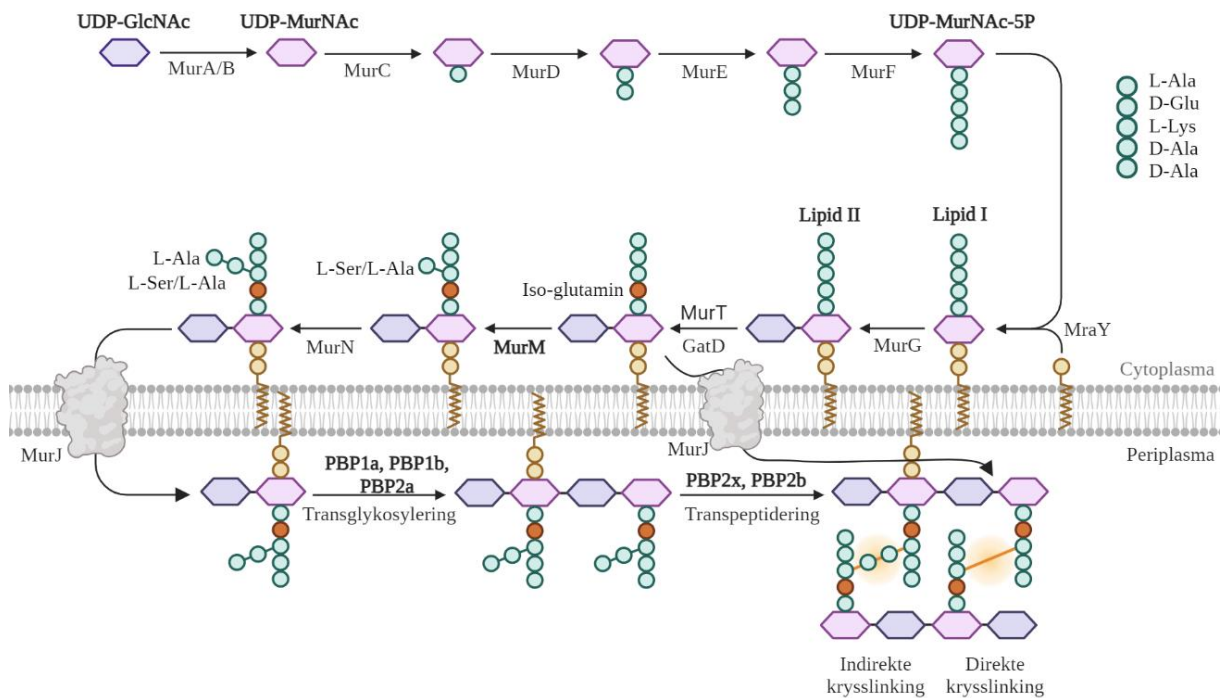
Verdens helseorganisasjon erklærte i 2017 at pneumokokker er en av 12 patogener som bør prioriteres med hensyn på utvikling av nye antimikrobielle strategier (15). Dette på grunnlag av dødeligheten og smittsomheten i tillegg til den høye forekomsten av antibiotikaresistens (15). Nedre luftveisinfeksjoner er hovedårsaken til sykdom og dødelighet verden over, hvor pneumokokker er ansvarlig for omtrent halvparten av tilfellene med ca. en million årlige dødsfall (23). I tillegg er pneumokokker en av de patogene bakteriene som forårsaker flest dødsfall grunnet antibiotikaresistens, med omtrent 600 000 dødsfall i 2019 (7). Med den store trussel pneumokokker og særlig bakteriens økende forekomst av penicillinresistens utgjør for menneskers helse, er det viktig å øke kunnskapen om bakterien og resistensmekanismer for å redusere sykdomstilfeller og forbedre behandling av infeksjoner.

1.3 Celleveggsyntesen hos *S. pneumoniae*

Celleveggen er en viktig strukturell enhet i de fleste bakterier, og er avgjørende for cellens overlevelse. Hovedfunksjonene er å opprettholde celleformen, beskytte cellen mot intracellulært trykk (turgortrykk) og forankre overflateproteiner og polysakkarider i kapselen (24). Hos innkapslede Gram-positive bakterier slik som pneumokokker, er cytoplasma omgitt av en plasmamembran med et tykt peptidoglykan og en polysakkaridkapsel utenfor (25–27). Peptidoglykanet består av glykankjeder dannet av alternerende β -1-4-bundet N-acetylmuraminsyre (MurNAc) og N-acetylglukosamin (GlcNAc), krysskoblet av peptidbroer (25,28,29). I tillegg til at peptidoglykanet beskytter cellen fra det ekstracellulære miljøet, formes cellemorfologien og celledivisjon av peptidoglykansyntesen. β -laktamer, som for

Introduksjon

eksempel penicillin, inhiberer celleveggsyntesen, og det er derfor viktig å forstå proteiner og prosesser i syntesen for å forstå resistensmekanismene og hvordan vi eventuelt kan omgå disse (28). Peptidoglykansyntesen er illustrert i Figur 1.3-1.



Figur 1.3-1 Illustrasjon av peptidoglykansyntesen. Figuren viser en illustrasjon av peptidoglykansyntesen, hvor en blå plasmamembran skiller det cytoplasmiske rommet og perioplasmatiske rommet. Proteiner merket i fet skrift er særlig viktig for denne studien. Figuren er illustrert i BioRender, med utgangspunkt i mal laget av Anna York og Victoria Tokarz.

Syntese av peptidoglykan vist i Figur 1.3-1, begynner i cytoplasma med omdanning av UPD(uridindifosfat)-GlcNAc til UPD-MurNAc (30). Deretter katalysert av flere ulike Mur-ligaser (MurCDEF) dannes en pentapeptidkjede på UPD-MurNAc, som består av aminosyrene L-Ala-L-Glu-L-Lys- D-Ala-D-Ala (29). Denne UPD-MurNAc med peptidkjede kobles på en baktoprenol i cellemembranen og danner lipid I (30). Videre binder lipid I til UPD-GlcNAc som danner en peptidoglykansubenhett som er lipid II (30). MurT/GatD-komplekset omdanner L-Glu i pentapeptidet på lipid II til iso-glutamin (iGln) (31). Lipid II kan da flippes ut til perioplasm av flippasen MurJ, og danner direkte krysslinkinger mellom stempeptidene (32,33). Eller, lipid II kan bli ytterligere modifisert ved at ligasen MurM katalyserer en alanin eller serin til lysinresiduen i peptidkjeden, deretter katalyserer ligasen MurN en alanin til alanin/serin (34). Dette gir peptidkjedene er L-Ser-L-Ala eller L-Ala-L-Ala, og danner indirekte krysslinking mellom stempeptidene (29). Disse modifiserte Lipid II-molekylene flippes også ut til perioplasm av MurJ, hvor peptidoglykansyntesen fortsetter (32,33).

Introduksjon

På periplasmatisk side inkorporeres lipid II i peptidoglykan i to steg – transglykosylering etterfulgt av transpeptidering som er markert i Figur 1.3-1 (35). Transglykosylering er når lipid II mister sin forankring til membranen og suktermolekylene til MurNAc og GlcNAc kobles sammen til den alternerende peptidoglykankjeden (35). Denne prosessen katalyseres av SEDS (form («shape»)), elongering, divisjon og sporulering) polymeraser (RodA og FtsW) og av tre klasse A penicillinbindende proteinene (PBP) PBP1a, PBP1b og PBP2a (35,36). Transglykosyleringen er etterfulgt av transpeptidering hvor kryssligninger mellom lipid II dannes, både direkte kryssligninger mellom lineære stempeptider og indirekte kryssligninger mellom forgreinede stempeptider (35). Det er PBP-er som katalyserer denne reaksjonen, og PBP2x og PBP2b er særlig ansvarlig for dette (35,37). Men også PBP1a, PBP1b og PBP2a har transpeptideringsdomener og kan derfor katalysere transpeptidering (37). Transpeptidase-domenet har et aktivt sete som kobler D-Ala i posisjon 4 på et pentapeptid med L-Lys i posisjon 3 på et annet pentapeptid hos en nærliggende glykantråd (35,38). Kløyving av båndet mellom D-Ala-D-Ala frigjør energien som skal til for å danne kryssligning, både direkte og indirekte (38).

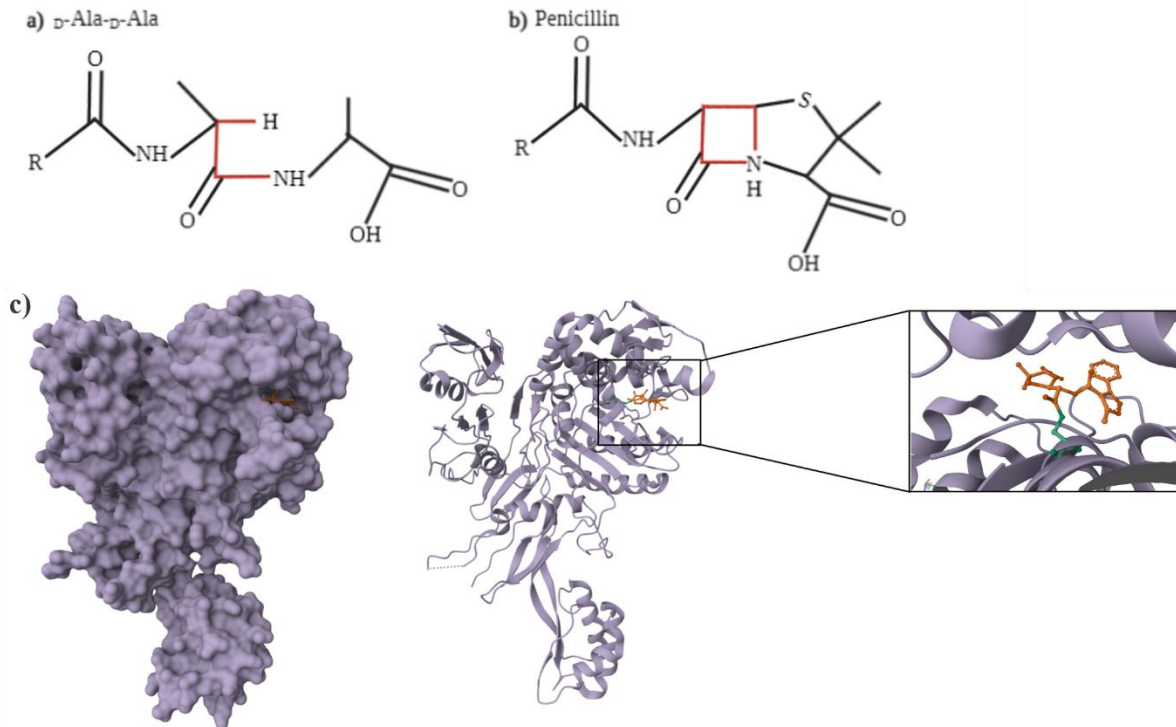
1.3.1 Penicillinbindende proteiner (PBP)

Penicillinbindende proteiner (PBP) er som nevnt proteiner som katalyserer transpeptidering og transglykosylering i celleveggsyntesen (39). Disse proteinene har fått navnet sitt fordi penicillin binder kovalent til de ulike PBP-ene (39). Pneumokokker har seks PBP-er, som klassifiseres i de to gruppene lavmolekylærvekt (LMV) PBP-er og høymolekylærvekt (HMV) PBP-er, og videre klassifiseres i klassene A, B og C basert på sekvenslikhet (39). PBP2x og PBP2b er HMV klasse B PBP-er, og er essensielle for bakterien (35). De har transpeptidase-domener, og katalyserer henholdsvis den septale og den perifere peptidoglykansyntesen (35). PBP1a, PBP1b og PBP2a er HMV klasse A PBP-er, og er ikke-essensielle proteiner (35). De har både transpeptidase- og transglykosylase-domener, og er autonome enzymer som katalyserer inkorporeringen av lipid II i peptidoglykanet (35). Videre kan de utføre transpeptidering av sin egen-syntetiserte glykantråd (35). Etersom PBP2x og PBP2b ikke har transglykosylase-aktivitet, danner de kompleks med hver sin transglykosylase, henholdsvis FtsW og RodA, som produserer glykankjeder til transpeptidering (36,40). Pneumokokker har én LMV klasse D PBP3 med et D-karboksy-peptidase-domene (35). PBP3 reduserer tilgjengeligheten for nye lipid II å inkorporeres i peptidoglykanet, ved å kløyve den femte aminosyren fra pentapeptidet på lipid II som allerede er integrert i peptidoglykanet (35).

1.4 Penicillinresistens i *S. pneumoniae*

Penicillinresistente eller ikke-sensitive pneumokokker har blitt stadig mer prevalent. En av årsakene til at pneumokokker blir motstandsdyktig mot penicillin er en lavere affinitet mellom penicillin og PBPer, i tillegg til β -laktamaser som er enzymer som bryter ned β -laktamer som penicillin (41,42). Penicillin er en strukturell analog til transpeptideringssubstratet D -Ala- D -Ala i pentapeptidkjeden på lipid II (Figur 1.4-1a, b), og vil binde kovalent til PBPene (Figur 1.4-1c) (35,41,42). Dette fører til inhibering av transpeptideringsaktiviteten. Cellen er avhengig av en streng regulering av transpeptidering og transglykosylering, og inhibering av transpeptidering fører til en stor andel glykankjeder som ikke er krysslinket og derfor tap av den rigide strukturen av peptidoglykanet (35). I tillegg fører tap av denne kontrollen til feilaktig aktivering av autolytiske hydrolaser, som i normalt tilstand er viktig for inkorporering av nye lipid II i peptidoglykanet (35). Sammen fører dette til at cellen går inn i lysis og dør (35). Pneumokokker som ikke hemmes av penicillin uttrykker muterte *pbp*-gener som koder for lavaffinitets-PBPer, det vil si PBPer med lavere affinitet for penicillin (43–45). Disse lavaffinitets-PBPene har motstandsdyktige pneumokokker tilegnet seg gjennom horisontal genoverføring fra resistente stammer av samme art eller nært beslektede arter (35). Dette gjør at høyere konsentrasjoner av penicillin er nødvendig for å behandle pasienter for pneumokokkinfeksjoner. Av de seks PBPene er særlig lavaffinitetsversjoner av PBP2x, PBP2b og PBP1a assosiert med penicillinresistens (46,47).

Introduksjon



Figur 1.4-1 Kjemisk struktur av D-Ala-D-Ala og penicillin, og 3D-struktur av PBP2x i kompleks med β -laktam. a) kjemisk struktur av dipeptidet D-Ala-D-Ala i peptidkjeden i lipid II, som er substratet for PBPer under transpeptidering. b) kjemisk struktur av penicillin. Røde streker indikerer β -laktamringen i penicillin og den strukturelle enheten i D-Ala-D-Ala som β -laktamringen har likhet med. Figuren er inspirert av Zapun et al. 2008 og Silver et al. 2007 (41,42). c) 3D-struktur av PBP2x (lilla) fra pneumokokker i kompleks med β -laktamet oxacillin (oransje) med serin289 som acyleres (grønn). PDB-nummer til strukturen er 5OIZ, hvorav modifikasjoner er utført av Dr. Daniel Straume.

Selv om PBP2x, PBP2b og PBP1a er anerkjent som proteinene ansvarlig for penicillinresistens, er det flere publikasjoner som indikerer at det også er andre genetiske mutasjoner som kan bidra til økt penicillinresistens. Blant annet utførte en studie et eksperiment hvor genomisk DNA fra en penicillinresistent pneumokokk ble transformert inn i en penicillinsensitiv pneumokokk etterfulgt av seleksjon på en økende gradient av penicillinkonsentrasjoner (48). De observerte at endringer i *pbp2x*, *pbp2b* og *pbp1a* ga opphav til penicillinresistens i den opprinnelige sensitive stammen, men likevel ikke oppnådde tilsvarende resistens som donorstammen (48). Dette tyder på at det er andre determinanter for penicillinresistens i pneumokokker i tillegg til sistnevnte *pbp*-genene (48). I tillegg peker det faktum at lavaffinitets-PBPer kan utføre transpeptidering selv med lavere affinitet til substratet som har store likheter med penicillin, mot at det er andre faktorer som bidrar til penicillinresistens (31).

I tillegg til å ha lavaffinitets-PBPer er det i flere resistente pneumokokker observert høyere andel av forgreinede (L -Ala- L -Ala og L -Ser- L -Ala) stempeptider i celleveggen og en mutert versjon av *murM* som koder for et overaktivt MurM-enzym (34,49). Ligasene MurM og MurN

Introduksjon

er som nevnt ansvarlig for addisjon av henholdsvis den første aminosyren serin/alanin og den andre aminosyren alanin til lysinresiduen i peptidkjeden på forgreinede stempeptider (34,50). Det er tidligere demonstrert at ved delesjon av *murN* dannes det indirekte krysslinking bestående av kun én aminosyre, mens ved delesjon av *murM* dannes det kun direkte krysslinkinger av lineære stempeptider i peptidoglykanet (50). Dette viser at MurM er den primære determinanten for tilstedeværelsen av indirekte krysslinking i peptidoglykanet (50). En mutert *murM* sørger for økt mengde forgrenede stempeptider og derav indirekte krysslinkinger i peptidoglykanet, sammenlignet med stammer uten mutert *murM* (35,47,49,51). Etersom resistente pneumokokker ofte har disse to egenskapene har det blitt foreslått at mutasjoner i *murM*, og følgelig en mer forgreinet cellevegg, blir selektert for på grunn av dens bidrag til penicillinresistens (35,49,50).

Flere studier har vist at forgrenede lipid II molekyler er viktig for pneumokokkers resistens mot β -laktamer, ved at delesjon av *murM* i resistente stammer gir et tilnærmet fullstendig tap av resistens (35,47,49–52). Dette kan indikere at MurM er essensiell for penicillinresistens i pneumokokker (34). Det er tidligere utført eksperimenter hvor lavaffinitets-PBP2x, -PBP2b og -PBP1a fra en penicillinresistent stamme ble introduserte i en sensitiv stamme (35,48). Da ble ikke tilsvarende resistensnivå som den resistente stammen oppnådd før også den muterte *murM* ble introdusert i den opprinnelig sensitive stammen (35,48). Imidlertid er det observert at en sensitiv stamme ikke kan bli resistent mot penicillin kun ved å uttrykke en mutert *murM* selv om den tilegnet seg samme peptidoglykankomposisjon som en resistent stamme (51). Det er dermed nødvendig med både mutert *murM* og muterte *pbp2x*, *pbp2b* og *pbp1a* for å oppnå resistens, og *murM* alene kan ikke gi opphav til resistens (51).

Videre, har flere studier funnet en sammenheng mellom *pbp2b* og *murM* for penicillinresistens. Ved sammenligning av gensekvensene av *pbp2b* og *murM* i resistente isolater var spesifikke mutasjoner i lavaffinitets-*pbp2b* korrelert med spesifikke mutasjoner i *murM* (52). Dette indikerer at uttrykk av en lavaffinitets-PBP2b krever en mutert *murM* for at bakterien skal oppnå høy resistens mot penicillin (52). Det har også blitt observert at mengde indirekte krysslinking i peptidoglykanet øker ved lavere uttrykk av PBP2b, noe som også tyder på en link mellom PBP2b og MurM (35,53). Samme studie så også at en konsekvens av delesjon av *murM* var at cellen krevde høyere uttrykk av PBP2b for å opprettholde vekst (53). Dessuten er det også observert at PBP2b krever tilstedeværelse av MurM for å kunne gi opphav til penicillinresistens (47). Sammen hentyder disse studiene at MurM og dermed andelen indirekte

Introduksjon

krysslinking ikke bare har en trolig sammenheng med PBPer og penicillinresistens, men særlig med PBP2b.

En mulig løsning for hvordan lavaffinitets-PBPer kan utføre peptidoglykansyntese selv med endringer i det aktive bindesete slik at den får lavere affinitet til penicillin, kan dermed være MurM og forgreinede lipid II molekyler. Ettersom lavaffinitets-PBPer er muterte, risikerer det også en høy sannsynlighet for endringer i de aktive setene for peptidoglykansyntese (35). En hypotese er at lavaffinitets-PBPer har høyere affinitet for lipid II molekyler med forgrenede stempeptider enn lineære stempeptider, og dermed utkonkurrerer penicillin i binding med PBPer (35,50,54). En annen hypotese er at forgreinede lipid II molekyler har en ukjent rolle i peptidoglykansyntesen som er viktig for bakterien når det er penicillin til stede, slik at kun lineære lipid II forhindrer celledeling ved eksponering av penicillin (49). Hvilke mekanismer som ligger bak MurM sin påvirkning på PBPer og penicillinresistens, særlig sammenhengen mellom MurM og PBP2b, er enda ikke forstått. Ved å finne ut om MurM er en determinant for penicillinresistens i pneumokokker og hvilke mekanismer som ligger bak, kan MurM være et potensielt angrepsmål i tillegg til penicillin som kan forbedre behandlingen av infeksjoner forårsaket av penicillinresistente pneumokokker.

1.5 Naturlig kompetanse for genetisk transformasjon – pådriver for evolusjon og et genetisk verktøy *in vitro*

Bakterier har en enorm evne til å tilpasse seg omgivelsene ved at de både har kort generasjonstid og har muligheter for horisontal genoverføring (55,56). Horisontal genoverføring vil si overføring av genetisk materiale fra en donorcelle til en mottakende celle som ikke er direkte avkom av hverandre (56). Det er tre ulike mekanismer for horisontal genoverføring – konjugasjon, transduksjon og naturlig transformasjon (56). Konjugasjon er direkte overføring av genetisk materiale mellom to bakterier, transduksjon er overføring av gener via bakteriofager (virus som angriper bakterier) og naturlig transformasjon er opptak av fritt DNA fra det ekstracellulære miljøet (56). Det vil gi mulighet for bakterien å tilegne seg nye egenskaper og bedre håndtere stress (57,58). Dette kan for eksempel være å tilegne seg gener for antibiotikaresistens, unngåelse av immunforsvaret til en vertsorganisme eller vaksiner, eller bedre opptak av næring (57,58). Ofte er det genetisk materiale fra egen art eller nære slektninger som kan tas opp i cellen, men også genetisk materiale mellom fjernt beslektede organismer kan utveksles og resulterer i en enda større diversitet i genomet (58).

Introduksjon

Pneumokokker har evnen til å indusere naturlig kompetanse for genetisk transformasjon (57,59,60). Kompetanse er en forbigående tilstand som tilrettelegger for at bakterien kan ta opp genetisk materiale fra omgivelsene og rekombinere inn gener i genomet (60). Indusering av kompetanse fører til transkripsjon av gener som koder for proteiner bakterien trenger for DNA-opptak og homolog rekombinasjon (57,60). Pneumokokker er spesialister på å utføre naturlig transformasjon, noe som gjør at denne bakterien raskt kan ta opp resistensgener og spre disse videre til sine nære slektninger.

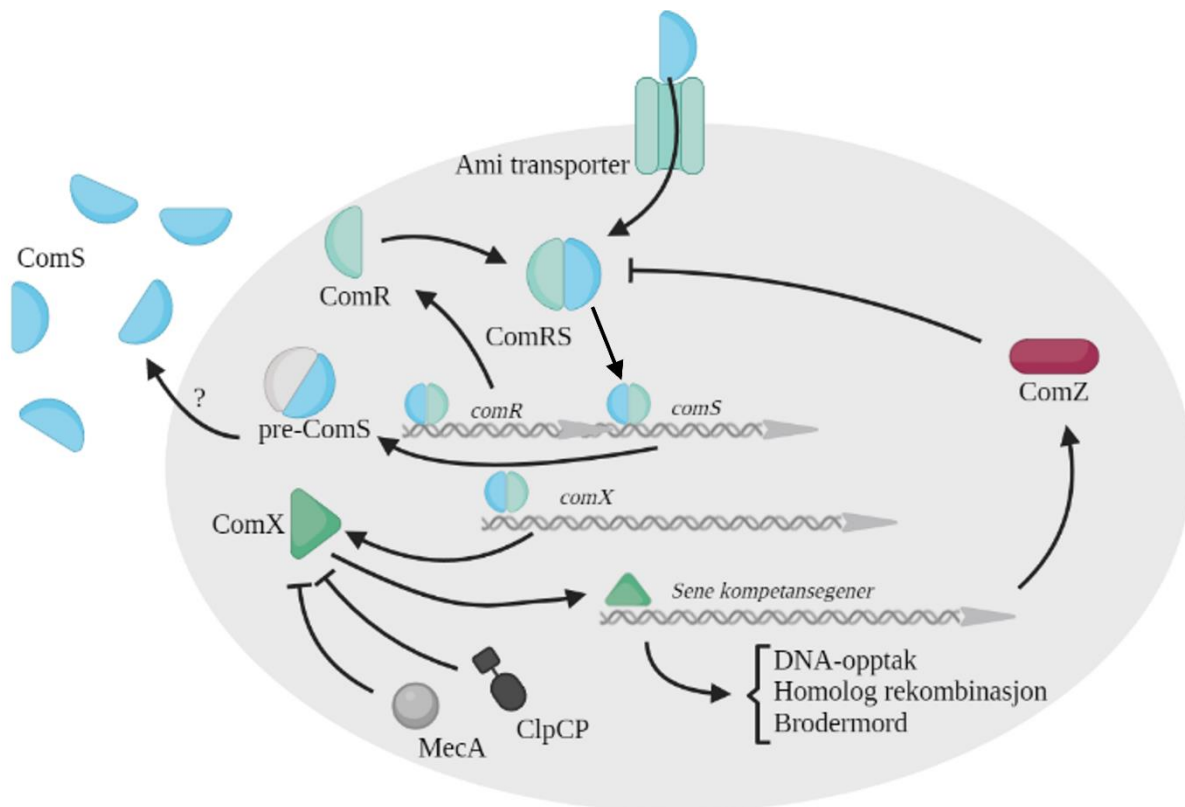
I pneumokokker reguleres naturlig kompetanse for genetisk transformasjon av det quorum-sansende ComABCDE-systemet (Figur 1.5-1) (59). Kompetanse stimuleres av det kompetansestimulerende peptidet CSP, som er kodet av *comC* som uttrykker prepeptidet ComC (61). ComC modnes og eksporteres ut av cellen til peptidet CSP av ComAB-transporteren, slik at ekstracellulær CSP kan binde reseptoren ComD (61). Dette fører til en autofosforylering av ComD slik at responsregulatoren ComE blir fosforylert og virker som en transkripsjonell aktivator for såkalte tidlige kompetansegener (59,62). De tidlige kompetansegenene (Figur 1.5-1), inkluderer *comABCDE* og gir derfor en positiv feedback-loop som amplifiserer kompetansesignalene (57,59,62). Blant de tidlige kompetansegenene er også genet *comX*, som koder for en alternativ sigmafaktor (63). ComX gjenkjenner promotorsekvensen til såkalte sene kompetansegener som koder for blant annet DNA-opptak og homolog rekombinasjon (63). Når de sene kompetanseproteinene er uttrykt, er bakterien kompetent for naturlig transformasjon.

Introduksjon

Overføring av genetisk materiale gjennom horisontal genoverføring kan også utnyttes *in vitro* for genmodifisering, ved å bruke bakterienes native systemer for DNA-opptak og homolog rekombinasjon. I pneumokokker brukes naturlig genetisk transformasjon som et genetisk verktøy for genmodifiseringer, ved å utnytte ComABCDE-systemet. Dette utføres ved tilsetning av syntetisk CSP slik at bakteriekulturen induserer kompetanse, og dermed vil den utføre genetisk transformasjon og implementere utvalgt DNA ved homolog rekombinasjon. Kompetanse og genetisk transformasjon er derfor ikke bare en nyttig egenskap for pneumokokker og en av de største pådriverne for evolusjon av denne bakterien, men også et nyttig genetisk verktøy *in vitro*.

1.5.1 ComRS-systemet – et peptidregulert gendeplesjonssystem utviklet for *S. pneumoniae*

I 2011 utviklet Berg et al. et induserbart gendeplesjonssystem for pneumokokker kalt ComRS-systemet (67). ComRS-systemet baserer seg på systemet som induserer naturlig kompetanse hos *Streptococcus thermophilus* (Figur 1.5.1-1) (64). Kompetanse i *S. thermophilus* induseres av signaliseringspeptidet ComS (for «*competence signal*»), på samme måte som CSP induserer naturlig kompetanse hos pneumokokker (68). Genet *comS* koder for prepeptidet ComS, og som antakeligvis skilles ut av cellen gjennom en ABC-type-transport som modent ComS (67–69). Moden ComS binder til det oligopeptidbindende proteinet AmiA3 og importeres deretter inn i cellen gjennom Ami transporteren (AmiCDEF) (Figur 1.5.1-1) (68,70). Intracellulær ComS binder den cytoplasmiske transkripsjonsfaktoren ComR (for «*competence regulator*») (68). Dette ComRS-komplekset fungerer som en transkripsjonell aktivator, på samme måte som ComE i pneumokokker. Bindingen av ComS til ComR fører til frigjøring av HTH-domenet på ComR slik at binding til DNA er mulig (71). Transkripsjonsaktivatoren ComRS gjenkjenner en DNA-sekvens kalt ComR-boksen, som ligger i promotorene oppstrøms for genene *comS*, *comR* og *comX* (Figur 1.5.1-1) (71). Transkripsjon av *comS* og *comR* gir en positiv feedback-loop ved at ekspresjonen av ComS og ComR amplifiseres (69). Dette kan igjen sammenlignes med den positive feedback loopen som ComE sørger for i pneumokokker. Videre, fører transkripsjon av *comX* til ekspresjon av den alternative sigmafaktoren ComX, som fører til uttrykk av sene kompetansegener (70,71)

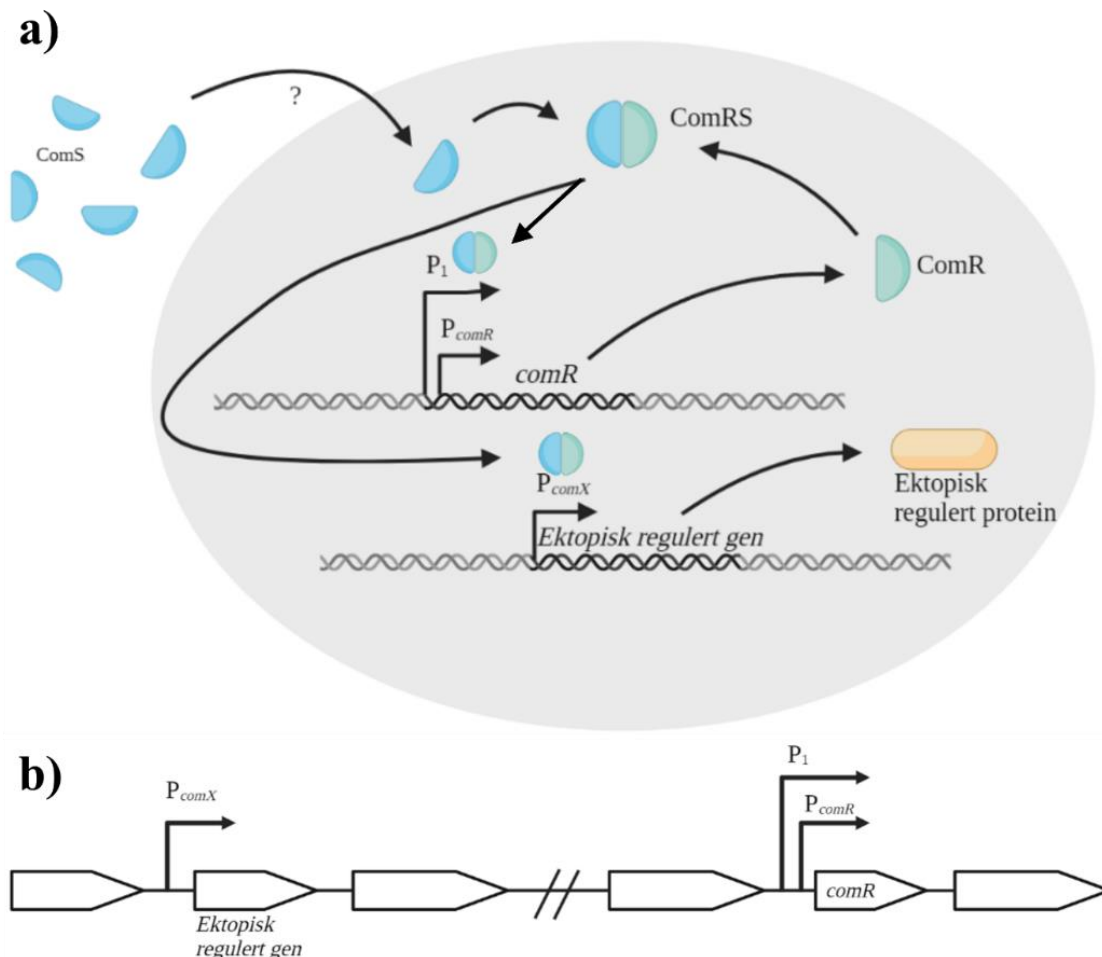


Figur 1.5.1-1 Skjematisk fremstilling av kompetanse for genetisk transformasjon i *S. thermophilus* ved ComRS-systemet. Kompetanse induseres ved transkripsjon av *comS* som koder for pre-ComS. Når pre-ComS transporteres ut av cellen kløyves signalpeptidet av og modent ComS dannes ekstracellulært. Videre binder ComS til Ami transporteren og importeres i cellen, hvor den binder ComR. ComRS fungerer som en transkripsjonell aktivator for de tidlige kompetansegene, som fører til en positiv feedback-loop som amplifiserer gener for kompetanse. Blant de tidlige kompetansegene er genet *comX*, som fører til uttrykk av den alternative sigmafaktoren ComX. ComX virker som en transkripsjonell aktivator for de sene kompetansegene, som fører til uttrykk av gener for DNA-opptak, homolog rekombinasjon og brodermord. Terminering av kompetanse er utført av proteinene ComZ, MecA og ClpCP. Illustrasjonen er inspirert av Berg et al. 2012, Haustenne et al. 2015 og Fontaine et al. 2010 (64,68,72).

For å utnytte ComRS-systemet som et gendeplesjonssystem i *S. pneumoniae* har *comR*-genet og promotoren til *comX*, P_{comX} har blitt introdusert på to ulike lokus i genomet (67). Genet *comR* er konstitutivt transkribert i tillegg til å bli induisert i respons av tilstedeværelse av ComS (67). ComS-aktivert ComR binder også til den andre promotoren P_{comX} som er plassert oppstrøms for genet som skal uttrykkes ektopisk (67). På denne måten er det mulig å induisere uttrykk av ønsket protein i respons til tilsetning av ComS (Figur 1.5.1-2) (67). Ved å benytte induiser i mediet under transformasjon og i vekstmediet, kan det utføres delesjon av essensielle gener i det native lokus om genet er ektopisk uttrykt ved bruk av ComRS-systemet (67). Dermed, er det mulig å utføre depleksjon («depletion»), altså å kontrollere mengden genuttrykk og se effekter på cellen ved høye eller lave uttrykk av genet (67). Siden bakterien må uttrykke det essensielle genet for overlevelse, vil depleksjon med lavt ektopisk uttrykk kunne gi hentydninger for hvilke resultater delesjon av genet ville gitt (67).

Introduksjon

For å implementere ComRS-systemet i pneumokokker må dermed to gensekvenser implementeres, nemlig sekvensen $P_1:P_{comR}:comR$ som gir genproduktet ComR og P_{comX} som gir ektopisk ekspresjon av ønsket gen (Figur 1.5.1-2b) (67). Oppstrøms for genet $comR$ er dens native promotor P_{comR} og en syntetisk konstitutiv promotor P_1 (67). Promotoren P_1 er nødvendig for å uttrykke lave mengder ComR før ComS-induksjon, siden den native promotoren P_{comR} ikke er tilstrekkelig (67,73,74). Ved tilstedeværelse av ComS fører dermed dette til ektopisk genregulering av genet nedstrøms for P_{comX} som er direkte ekvivalent med konsentrasjonen av ComS (Figur 1.5.1-2) (67). Dermed utgjør ComRS-systemet et nyttig genetisk verktøy i pneumokokker fordi det gjør det mulig å utføre deplasjon av essensielle gener og delesjon av essensielle gener i det native lokuset.



Figur 1.5-2 Skjematisert fremstilling av ComRS-systemet - det peptidregulerte gendeplasjonssystemet i pneumokokker. **a)** illustrerer ComRS-systemet etablert i pneumokokker. Ved tilsetning av ComS dannes den transkripsjonelle aktivatoren ComRS, som videre aktiverer transkripsjon av $comR$ ved binding av promotorene P_1 og P_{comR} , og transkripsjon av ektopisk regulert gen ved binding av promotoren P_{comX} . **b)** Skjematisert fremstilling av genmodifiseringer i pneumokokkers genom ved etablering av ComRS-systemet. Illustrasjon b) er inspirert av Berg et al. 2011 (67).

1.6 Studiens hensikt

Ettersom penicillinresistens er et stadig økende problem hos pneumokokker, er kunnskap om hvilke faktorer som bidrar til resistens svært nyttige. Som tidligere nevnt i innledningen forårsakes penicillinresistens av at pneumokokker tar opp gener som koder for lavaffinitets-PBPer. Men selv om lavaffinitets-PBPer kan forklare resistensutviklingen, har også flere studier pekt på at det også er andre mulig faktorer som kan bidra til resistens. Enten det er genetiske mutasjoner som i seg selv bidrar til penicillinresistens, eller det er mutasjoner som gjør at cellen kompenserer for tilegnelsen av lavaffinitets-PBPer som er mindre effektive enzymer, kan disse være potensielle nye mål for fremtidig antibiotika. På denne måten kan det utvikles behandlingsalternativer eller forbedringer av penicillinbehandling mot penicillinresistent pneumokokkinfeksjoner. Denne studiens hensikt er å undersøke determinanter for penicillinresistens i pneumokokker ved bruk av et gendeplesjonssystem i resistente kliniske isolater.

2. Materialer

Bakteriestammer benyttet og konstruert for denne studien er listet under i Tabell. 2-1. Andre materialer er listet i tabeller i følgende vedlegg:

Vedlegg F1. Primere benyttet i denne studien.

Vedlegg F2. Peptider benyttet i denne studien.

Vedlegg F3. Antibiotikum, enzymer, kjemikalier og ferdiglagde buffere benyttet i denne studien.

Vedlegg F4. Kits og utstyr benyttet i denne studien.

Vedlegg F5. Programvarer benyttet i denne studien.

Vedlegg F6. Oppskrifter på vekstmedier, buffere og diverse benyttet i denne studien.

Tabell 2-1. Stammer av *S. pneumoniae* benyttet og konstruert i denne oppgaven. Tabellen viser alle stammer av *S. pneumoniae* brukt og laget for prosjektet, med relevante egenskaper og kilden for bakterien.

Stamme	Genotype / relevante egenskaper	Kilde
MG1	Klinisk isolat	FHI
MG2	Klinisk isolat	FHI
MG3	Utgangsstamme for penicillinresistent klinisk isolat benyttet i denne studien	FHI
MG4	Klinisk isolat	FHI
MG5	Klinisk isolat	FHI
MG6	Klinisk isolat	FHI
MG7	Klinisk isolat	FHI
MG8	MG3 $\Delta cps::spm^R$	Denne studien
MG12	MG8 $\Delta rpsl::sm^R$	Denne studien
MG14	MG12 $\Delta bgaA::Janus^{(b)}$	Denne studien
MG15	MG14 $\Delta Janus::P_1:P_{comR}:comR$	Denne studien
MG16	MG8 $\Delta murM$	Denne studien
MG17	MG15 $\Delta IS-element::P_{comX}:Janus$	Denne studien
MG18	MG17 $\Delta P_{comX}:Janus::P_{comX}:pbp2x^{LA}$	Denne studien
MG19	MG17 $\Delta P_{comX}:Janus::P_{comX}:pbp2b^{LA}$	Denne studien
MG20	MG17 $\Delta P_{comX}:Janus::P_{comX}:pbp1a^{LA}$	Denne studien
MG21	MG18 $\Delta pbp2x^{LA}::Janus$ (native lokus)	Denne studien
MG22	MG19 $\Delta pbp2b^{LA}::Janus$ (native lokus)	Denne studien
MG23	MG8 $\Delta pbp1a^{LA}::Janus$ (native lokus)	Denne studien
RH425	Penicillinsensitiv laboratoriestamme	(73)
RSG66	RH425 $\Delta murM::Janus$	Ragnhild Sødal Gjennestad

Materialer

Pen6	Transformant av R6Hex med genomisk DNA fra penicillinresistent isolat 8249 og selektert for penicillinresistens (49)	(75)
RSG183	Pen6 $\Delta murM::Janus$	Ragnhild Sødal Gjennestad
RH426	Templat for <i>Janus</i> -kassetten	(73)
ds907	Templat for <i>aad1</i> for delesjon av kapselgener	Dr. Daniel Straume
ds1021	Templat for DNA-sekvensen $P_I:P_{comR}:comR$	Dr. Daniel Straume
SPH131	Templat for $P_{comX}:Janus$	(67)
MH151	Templat for $\Delta murM::Janus$	Maria Heggenhougen

^(a)Spm er spectinomycin, Sm er streptomycin, Kan er kanamycin.

^(b)*Janus* representerer *Janus*-kassetten og inneholder kanamycinresistens (Kan^R) og dominant streptomycinsensitivitet (Sm^S).

^{LA} vil si lavaffinitets, som betyr *pbp*-gen i penicillinresistent klinisk isolat av *S. pneumoniae*

3. Metoder

3.1 Vekst og lagring av *S. pneumoniae*

Alle eksperiment utført i denne studien ble utført med *S. pneumoniae*. De ble dyrket ved 37 °C i flytende C-medium eller på TH-agar-skåler. Dyrkning på TH-agar ble utført i en lufttett beholder sammen med en Anaerogen-pose (Oxoid) som reduserer oksygenivået til under 5% i løpet av 5 minutter. For seleksjon av transformanter ble 400 µg/ml streptomycin, 200 µg/ml kanamycin eller 200 µg/ml spectinomycin benyttet. Mens for MIC (minimal inhibitorisk konsentrasjon)-analyser ble det brukt en 2-fold-fortynningsrekke fra høyeste konsentrasjon 10 µg/ml Penicillin G. For gendeplesjonseksperimenter ble det tilsatt enten 2 µM, 0,5 µM, 0,2 µM eller 0,05 µM syntetisk ComS-induser for ektopisk ekspresjon av essensielle gener. Bakteriekulturer ble lagret på -80 °C med 15 % glyserol.

3.2 Minimum Inhibitorisk Konsentrasjon (MIC)-analyse

For å estimere nivå av penicillinresistens ble pneumokokker dyrket i mikrotiterplater og OD₅₅₀ ble målt med en plateleser. Eksponentielt voksende pneumokokker ble fortynnet i ferskt C-medium til OD₅₅₀ = 0,05 og deretter overført til en mikrotiterplate inneholdende en 2-fold-fortynningsrekke av Penicillin G fra 10 µg/ml. Plateleserne Synergy H1 Hybrid Plate Reader eller Hidex Plate Reader ble benyttet i denne studien. OD₅₅₀ ble avlest hvert 5. minutt i 14-16 timer med risting før hver avlesning, ved 37 °C. MIC₉₀-verdien ble avlest ved den penicillin G-konsentrasjonen hvor mer enn 90 % av bakterieveksten hemmes grunnet antibiotikumet.

3.3 Mikroskopering

Bakteriekulturer ble mikroskopert på glassplater dekket med 1,2 % (w/v) agarose i PBS for å forsikre at bakteriene ble immobilisert og befant seg i samme fokusplan. 1,2 % agarose ble laget dagsfersk og oppbevart på 56 °C. Bakteriekulturen ble inkubert på 37 °C til OD₅₅₀ 0,3-0,4 og dermed satt på is for å hindre videre vekst. 0,5 µl bakteriekultur ble overført på glassplate med 1,2 % agarose med dekkglass over. For mikroskopering av celler med deplesjon av *pbp2b* ble det overført 0,5 µl bakteriekultur direkte fra plateleser fra deplesjonseksperiment beskrevet i kapittel 3.8. Prøvene ble mikroskopert med Axio Observer Z1/ LSM700 med 100X forstørrelse med olje Ph3.

3.4 Polymerase kjede reaksjon (PCR)

Polymerase kjede reaksjon (Polymerase Chain Reaction, PCR) ble brukt for å amplifisere DNA-sekvenser for sekvensering, konstruere DNA-fragment for genetisk transformasjon og screening av transformanter. Prinsippet for PCR er å amplifisere DNA-fragmenter ved å justere temperaturen i en løsning med DNA-templat, DNA-polymerase og de fire basene adenin, tymin, cytosin og guanin (76). DNAet amplifiseres i tre hovedsteg ved å først øke temperaturen for å denaturere DNA-templatet, deretter senke temperaturen for at primere binder DNAet og til slutt øke temperaturen igjen slik at DNA-polymerasen kan lage en komplementær DNA-tråd fra primerne (76). For DNA-fragmenter for genetisk transformasjon ble det brukt metoden overlapp-PCR, beskrevet i kapittel 3.4.1. En PCR-syklus består av seks steg og er som følger:

Initiell denaturering	98 °C	10m	
Denaturering	98 °C	30s	} 25x
Annealing	58-62 °C	30s	
Forlengelse	72 °C	Phusion: 30s/1000bp	
		RedTaq: 1m/1000bp	
Endelig forlengelse	72 °C	3m	
	4 °C	∞	

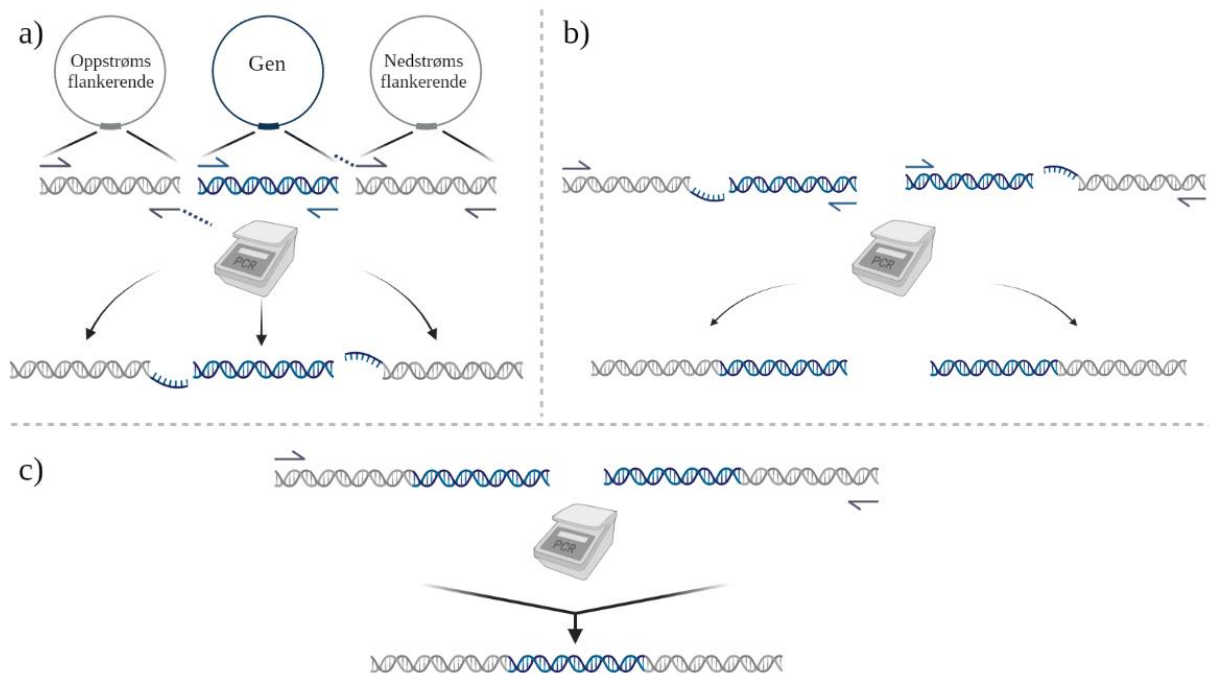
Det ble brukt to ulike DNA-polymeraser avhengig av formålet for PCR, enten Phusion polymerase eller RedTaq polymerase. Phusion polymerase ble brukt ved tilfeller hvor PCR-produktet ble brukt for transformasjon eller sekvensering, det vil si formål som krever høy nøyaktighet og lav feilrate (77). Formål som ikke krever høy nøyaktighet siden PCR-produktet ikke ble brukt videre, slik som screening, ble RedTaq polymerase benyttet. Denne polymerasen har > 50 ganger lavere «korrekturlesning» enn Phusion polymerase, men en lavere kostnad (77). I tillegg ble annealingstemperaturen justert etter smeltetemperaturen for primere konstruert for reaksjonen. For å visualisere PCR-produktet ble det utført gelelektroforese, beskrevet i kapittel 3.4.2.

3.4.1 Overlapp-PCR

Ettersom naturlig kompetanse for genetisk transformasjon i pneumokokker utføres ved homolog rekombinasjon, var det nødvendig at genkassetene som ble brukt i eksperimentet hadde oppstrøms og nedstrøms flankerende DNA-fragmenter for genet som er homologe til 5' og 3' regionen til genet som ble byttet ut. På denne måten danner flankerende fragmenter

Metoder

grunnlaget for homolog rekombinasjon. Overlapp-PCR ble benyttet for å fusjonere DNA-fragmenter (78). I dette arbeidet ble denne teknikken brukt for å fusjonere flankerende regioner med homologi for genetisk transformasjon til hver ende av utvalgte genkassett (73). PCR-produktet fra overlapp-PCR inneholder et oppstrøms flankerende og et nedstrøms flankerende fragment på omtrent 1000 bp fra stammen det skal transformeres inn i, og det genet som skal transformeres inn i stammen. I og med at DNA-fragmentene ble benyttet til genetisk transformasjon og dermed krever høy nøyaktighet, ble det brukt Phusion polymerase (77). PCR-syklus for Phusion polymerase er beskrevet i kapittel 3.4.



Figur 3.4.1-1 Flytskjema for overlapp-PCR. Figuren viser et generelt flytskjema over overlapp-PCR for å danne et DNA-fragment for genetisk transformasjon, bestående av genet som skal inkorporeres i genomet med homologe flankerende regioner fra transformerende stamme. De grå DNA-fragmentene er oppstrøms og nedstrøms flankerende fragment amplifisert fra bakterien som skal bli transformert. Det blå DNA-fragmentet er genet som skal inkorporeres inn i genomet til den transformerende bakterien. **a)** Viser første PCR av tre PCR-reaksjoner, hvorav tre DNA fragment ble amplifisert fra bakteriestammer med de valgte DNA-sekvensene. To av primerne har en hale revers komplementær til senere naboliggende DNA-fragment. **b)** Viser andre PCR-reaksjon, hvorav et flankerende DNA-fragment og genet ble amplifisert sammen grunnet overlapp dannet av primer med hale med flankerende primere. **c)** Viser tredje og siste PCR-reaksjon, hvor det endelige PCR-produktet ble dannet. Genfragmentene i de to templatene danner grunnlag for overlapp.

Figur 3.4.1-1 viser et flytskjema for overlapp-PCR, hvor a, b og c representerer hver av de tre PCR-reaksjonene. Første PCR-reaksjon (Figur 3.4.1-1a) ble utført for å amplifisere tre DNA-fragment: ~1000 bp oppstrøms region (PCR1), genkassett (PCR2) og ~1000 bp nedstrøms region (PCR3). Revers primer for PCR1 har en ~20 bp «hale» i 5'-ende som er komplementær til forward primer for PCR2. Forward primer for PCR3 har en ~20 bp «hale» som er komplementær til revers primer for PCR2. Oppstrøms sekvens og nedstrøms sekvens for ønsket

Metoder

lokus for transformasjonen ble amplifisert fra gDNA fra bakteriestammen som skal transformeres. Andre PCR-reaksjon (Figur 3.4.1-1b) ble utført for å lime sammen PCR1 med PCR2 og PCR3 med PCR2 ved bruk av de komplementære sekvensene i endene av de respektive PCR-produktene. For denne reaksjonen ble de flankerende primerene brukt. Sluttproduktene var da et fragment bestående av PCR1-PCR2, og et fragment av PCR2-PCR3. Tredje PCR-reaksjon (Figur 3.4.1-1c) amplifiserte det ferdige DNA-fragmentet som senere ble brukt for genetisk transformasjon. Igjen, ble de flankerende primerne brukt. Gensekvensen fra de to templatene, altså PCR-produktet fra andre PCR, dannet overlappende sekvenser slik at templatene ble fusjonert på grunn av homologi.

Etter hver PCR-reaksjon ble det utført gelelektroforese av PCR-produktet (kap. 3.4.2), for å undersøke størrelse på fragmentet og fjerne uspesifikke PCR-produkter fra løsningen. PCR-produktet ble så rensset in-gel for å sørge for renest mulig PCR-produkt med minst mulig bakgrunn. Bånd av riktig størrelse ble kuttet ut av gelen og rensset med NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (79). Gelekstraksjon ble utført på varmebad på 50 °C i 5-10 minutter med jevnlig risting i en NTI bindingsbuffer som løser opp agarosen i gelen. Deretter ble gelløsningen sentrifugert over en kolonne med en silica-membran som binder DNA på grunn av en negativ ladning. Kolonnen ble vasket i vaskebuffer NT3 med høyt etanolinnhold, ved sentrifugering to ganger. Kolonnen ble tørket med sentrifugering, før elueringsbuffer NE ble tilsatt og inkubert i romtemperatur i ett minutt. Elueringsbufferen har høyere affinitet til kolonnen slik at PCR-produktet kan elueres ved sentrifugering (79). DNA-konsentrasjonen ble målt på NanoDrop 2000 spektrofotometer. Om det ikke ble visualisert PCR-produkt ble enten annealingstemperaturen justert avhengig av temperaturen for primere benyttet i reaksjonen, tilsatt 2 µl MgCl₂ for å øke saltkonsentrasjonen eller designet nye primere. Ved noen tilfeller ble step-down-PCR benyttet om ingen av de sistnevnte metodene forbedret betingelsene, eller det er store forskjeller i temperaturen til primerne. Da benyttes tre ulike annealingstemperaturer, med 5 sykluser av de to første temperaturene og 20 sykluser med siste temperatur. Annealingstemperaturen med justert med 2 °C forskjell for hver innstilling.

3.4.2 Gelelektroforese for visualisering og separasjon av PCR-produkter

Agarose gelelektroforese ble benyttet for å separere og visualisere PCR-produkt. Metoden baserer seg på separasjon med hensyn på størrelse grunnet nukleinsyrers ladning over et elektrisk felt og poretetthet i agarosegelen. PCR-produktene ble tilsatt 6 X loading dye som inneholder 40% sukrose slik at tettheten på prøven blir høyere enn elektroforesebufferen, og

Metoder

prøven vil da synke ned i brønnen i gelen. Til 50 ml smeltet agarose ble 5 µl PeqGreen tilsatt slik at DNA kan visualiseres under UV-lys i Gel Doc™ XR+ med Image Lab™ 6.0 Software. Det ble brukt 1kb DNA ladder for å estimere antall basepar for båndene og detektere ønsket PCR-produkt. Det ble benyttet 1 % agarosegel, og gelkammer ble fylt med 1 X TAE buffer. For gelelektroforese ble Power PAC 200 benyttet, med 90 V i 20-30 minutter til tilstrekkelig separasjon var oppnådd.

3.5 Genetisk transformasjon i *S. pneumoniae*

Den naturlige evnen pneumokokker har for kompetanse for genetisk transformasjon ble utnyttet *in vitro* for genmodifisering. Ved å indusere kompetanse i cellen ved tilsetning av syntetisk CSP-1, kan cellens eget maskineri for DNA-opptak og homolog rekombinasjon utnyttes. I tillegg må det tilsettes et DNA-konstrukt til bakteriekulturen, som har ~1000 bp flankerende sekvenser med homologi til sekvensene som flankerer det ønskede genet på genomet som skal transformeres. Dette DNA-konstruktet ble konstruert og amplifisert ved bruk av overlapp-PCR med Phusion polymerase for høy nøyaktighet (kap. 3.4.1). På denne måten ble det enkelt utført genetisk transformasjon i pneumokokker.

Allerede predyrket bakteriekulturer ble resuspendert i ferskt C-medium til $OD_{550} = 0,025$, og deretter inkubert ved 37 °C i 20-30 minutter til $OD_{550} = 0,05$. I eppendorfrør ble det tilberedt 1 ml cellekultur med 100 µl/ml CSP-1 og 200-250 ng DNA. Som negativ kontroll ble det tilberedt 1 ml cellekultur og 100 µl/ml CSP-1, uten DNA. Prøvene ble inkubert ved 37 °C i 2 timer, for indusering av kompetanse og genetisk transformasjon. Deretter ble 50 µl potensielt transformanter strøket ut på TH-plater med antibiotikum for seleksjon. Type antibiotikum ble valgt ettersom hvilken resistens transformanter er introdusert for som seleksjonsmarkør. TH-platene ble inkubert anaerobt ved 37 °C over natt. Transformanter ble neste dag dyrket opp og screenet ved bruk av koloni-PCR, beskrevet i kapittel 3.5.1.

3.5.1 Screening av transformanter ved bruk av koloni-PCR

Transformantene ble screenet ved bruk av koloni-PCR, hvor en enkeltkoloni ble plukket både for dyrking i flytende C-medium og for PCR for screening av transformanter. Kolonien ble plukket opp ved bruk av tannpirker, tappet to ganger i bunnen av et sterilt PCR-rør og deretter overført i et NUNC-rør med ferskt C-medium og relevant antibiotikum for seleksjon. Transformantene ble inkubert på 37 °C i 6-10 timer til synlig vekst var oppnådd. For screening

Metoder

ble det brukt primerpar hvor en primer annealer genet som ble transformert inn og en primer enten oppstrøms eller nedstrøms flankerende sekvens. På denne måten ble kun kolonier som inneholder genet og flankerende sekvens resultere i et PCR-produkt, og indikerer dermed en vellykket transformant. Ved koloni-PCR ble ikke PCR-produktet brukt videre, dermed ble RedTaq polymerase benyttet (kap. 3.4).

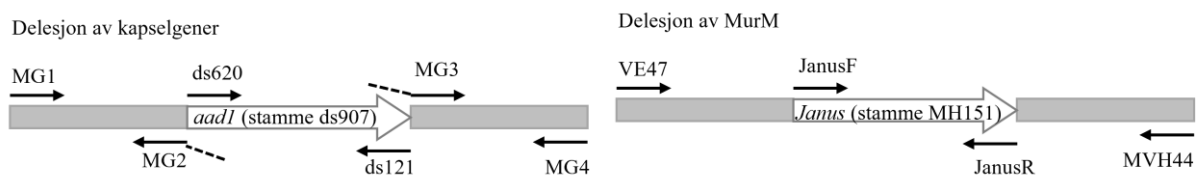
3.5.2 Sanger sekvensering

For verifisering om genetiske transformasjoner var vellykket ble de sendt til Sanger sekvensering hos Eurofins. Sanger sekvensering baserer seg på prinsippene for DNA-replikasjon, men det benyttes modifiserte dNTPer (deoxyribose nukleotidtrifosfat) av hver av de fire basene (80). De modifiserte dNTPene stanser videre forlengelse av DNA-tråden grunnet manglende 3' hydroksylgruppe, og dermed danner DNA-fragmenter av ulike størrelser som kan separeres og detekteres (80). Ved å kombinere disse DNA-fragmentene i et «mønster» kan baserekkefølgen til DNA-sekvensen avleses (80). Som forberedelser til Sanger sekvensering ble først gensekvenser med 1000 bp flankerende sekvenser oppstrøms og nedstrøms for sekvensen som skal sekvenseres, amplifisert med PCR med Phusion buffer for å sikre høy nøyaktighet (kap. 3.4). Det ble utført gelelektroforese på kun 5 µl av PCR-produktet for å undersøke størrelsen på DNA-fragmentet (kap.3.4.2). Dette fordi det ikke er ønskelig med rester av PeqGreen i prøvene fordi det forstyrrer sekvenseringen. Resterende prøve (45 µl) ble renset med NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit som beskrevet i kapittel 3.4.2, for å fjerne komponenter (nukleotider, primere, DNA-polymerase og buffer) fra PCR-reaksjonen. Til sekvenseringsreaksjonen ble det tilsatt en primer, templat DNA (50-150 ng avhengig av lengden på PCR-produktet) og dH₂O til et sluttvolum på 10 µl . Primere ble designet slik at sekvenseringen starter omtrent 250 bp oppstrøms for gensekvensen som skal sekvenseres.

Resultatene fra sekvenseringen ble analysert i et online DNA-sekvensanalyseverktøy kalt Benchling, og sammenstilt med teoretisk DNA-sekvens. Ved tilfeller hvor mutasjoner i nukleotidsekvensen ble observert, ble aminosyresekvensene sammenstilt for å undersøke effekten av mutasjonen. Da ble nukleotidsekvensen oversatt til aminosyresekvens ved bruk av databasen ExPASy. Videre ble aminosyresekvensene parvis sammenstilt med databasen EMBOSS Needle med Needleman-Wunsch algoritmen.

3.6 Delesjon av kapselgener og *murM* ved bruk av genetisk transformasjon

Ved bruk av pneumokokkers naturlige evne for kompetanse for genetisk transformasjon ble det utført delesjon av kapselgenene og *murM* i det kliniske isolatet, som beskrevet i kapittel 3.5. Det ble valgt å fjerne kapselen på det kliniske isolatet i arbeidet med denne studien for å redusere patogenitet. Kapselgenene ble fjernet ved delesjon av kapselgenene med *aadI* som koder for spectinomycinresistens som seleksjonsmarkør. Den genetiske kassetten ble konstruert ved overlapp-PCR, hvorav primere og templat for *aadI*-genet er beskrevet i Figur 3.5.3-1. Det ble også utført delesjon av genet *murM* som koder for ligasen MurM, med Janus-kassetten (kap. 3.7). Genetiske kassetten ble amplifisert fra stamme MH151 som illustrert i Figur 3.6-1, og transformert med genetisk transformasjon (Kap. 3.5).



Figur 3.6-1 Illustrasjon av genetiske kassetter konstruert for delesjon av kapselgener og *murM*. Grå felt indikerer oppstrøms og nedstrøms flankerende sekvenser for genet i hvit. Primere er indikert med piler, komplementær hale er indikert med prikket linje.

3.7 Etablering av ComRS-systemet i klinisk isolat

ComRS-systemet er et peptidregulert gendeplesjonssystem utviklet for bruk i pneumokokker. Systemet muliggjør funksjonelle studier av essensielle gener (67). ComRS-systemet består hovedsakelig av tre komponenter – signalpeptidet ComS, transkripsjonsfaktoren ComR og promotoren P_{comX} (67). Genet for ComR har to promotorer oppstrøms – den native promotoren P_{comR} og den syntetisk konstitutive promotoren P_1 (67). Disse komponentene er originalt fra kompetansesystemet hos *S. thermophilus*, og genene for disse komponentene kan genetisk transformeres inn i *S. pneumoniae* for å danne et genetisk verktøy (67). For å etablere ComRS-systemet må DNA-sekvensen $P_1:P_{comR}:comR$ og P_{comX} genetisk transformeres inn i lokus i genomet som ikke gir en morfologisk eller funksjonell effekt som kan påvirke effekter av det genet som skal undersøkes. Signalpeptidet ComS derimot, tilsettes bakteriekulturen og er ikke kodet av bakterien selv.

Først må Janus-systemet etableres i bakterien. Janus-kassetten benyttes som en negativ seleksjonsmarkør i en tottrinns transformasjonsprosess, og gjør det mulig å selektere transformanter ved både tilegnelsen og tapet av kassetten (81). Det er en bicistronisk kasset,

Metoder

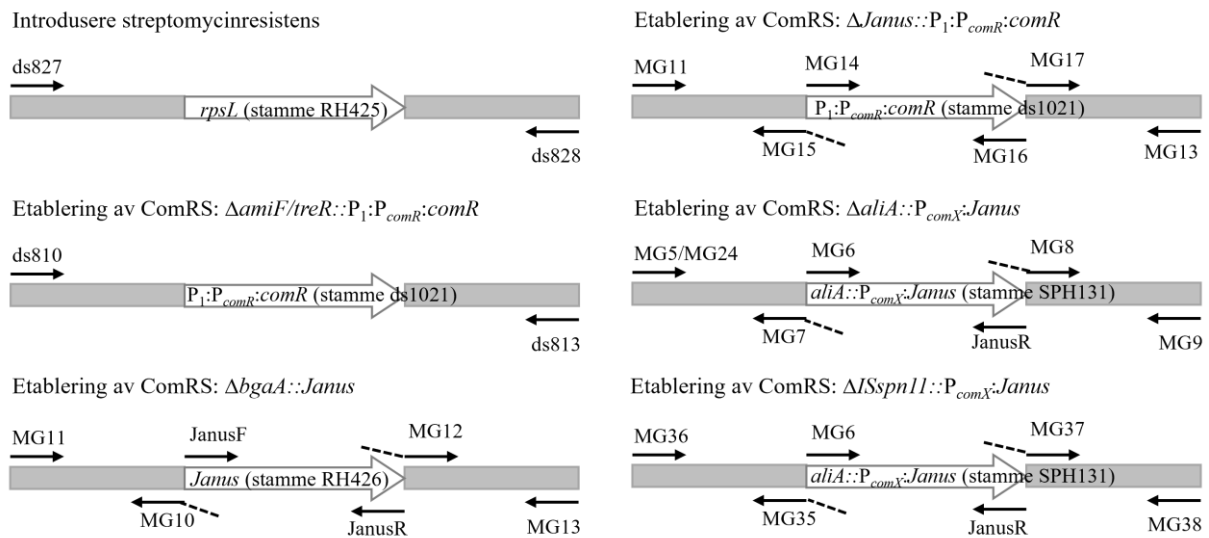
som betyr at den inneholder to gener som uttrykkes sammen (81). Det ene genet koder for kanamycinresistens, og det andre koder for dominant streptomycinsensitivitet ($rpsL^+$) (81). Det forutsettes derfor at bakterien har det recessive muterte allelet av $rpsL$ som gjør den streptomycinresistent før Janus-kassetten benyttes (81). Følgelig, kan transformanter selekteres på kanamycin ved tilegnelse av Janus-kassetten, i og med at den blir resistent mot Kanamycin og dominant sensitivitet mot streptomycin (81). Motsatt, ved tap av Janus-kassetten kan transformanter selekteres på streptomycin siden den har mutert $rpsL$ som gjør den streptomycinresistent, mens alle bakterier hvor Janus fortsatt sitter i genomet vil ikke klare å vokse på medium med streptomycin (81). Dermed ble først transformasjonen $\Delta rpsL^+::rpsL$ utført for å gjøre bakterien streptomycinresistent. $rpsL$ -genet med 1000 bp flankerende sekvenser oppstrøms og nedstrøms ble amplifisert fra *S. pneumoniae* RH425 med primerne ds827 og ds828 (Figur 3.7-1), og transformert inn i stamme MG8 (Δcps). Dermed var Janus-systemet etablert i stamme MG12.

Etter at Janus-systemet var etablert, ble sekvensen $P_1:P_{comR}:comR$, som koder for ComR, genetisk transformert inn i stamme MG12. Basert på valg av lokus av Berg et al. i 2011 ble det først forsøkt transformasjonen $\Delta amiF/treR::P_1:P_{comR}:comR$ (67), hvorav genetisk kassett ble amplifisert fra stamme ds1021 som illustrert i Figur 3.7-1. Deretter ble det endret lokus for $P_1:P_{comR}:comR$ til å erstatte genet $bgaA$, som koder for β -galaktosidasen BgaA (82). BgaA bidrar til karbohydratutnyttelse, resistens mot opsonofagocytose og binding til epitelceller i pneumokokker (82). Basert på disse funksjonene var ikke deleksjon av $bgaA$ antatt å gi ytterligere påvirkninger som kan forveksles med effekten av endret genuttrykk av pbp -genene. Først ble $bgaA$ erstattet med Janus-kassetten, og deretter Janus-kassetten erstattet med $P_1:P_{comR}:comR$. De genetiske kassetten ble konstruert ved overlapp-PCR (Figur 3.7-1), og transformert inn i henholdsvis stamme MG12 og MG14. Dette ga opphav til stamme MG15 med $P_1:P_{comR}:comR$.

Lokus for promotoren P_{comX} ble først valgt til å erstatte IS-element $IS66$ oppstrøms genet $aliA$, som er involvert i peptidopptak. Den genetiske kassetten ble konstruert ved overlapp-PCR (Figur 3.6-1), men ga ikke opphav til transformanter. Deretter ble det forsøkt å erstatte et IS-element nedstrøms for $licT$, $ISspn11$, da det ikke var ansett å påvirke ytterligere funksjoner utenfor endret genuttrykk av pbp -genene. P_{comX} ble transformert med Janus-kassetten nedstrøms. Både for negativ seleksjon av transformasjonen $\Delta ISspn11::P_{comX}$, og for seleksjon av senere transformasjoner hvor Janus-kassetten erstattes med pbp -gener som skal ektopisk reguleres av ComRS-systemet. Den genetiske kassetten konstruert ved overlapp-PCR (Figur

Metoder

3.7-1) ble transformert inn i stamme MG15 og ga opphav til stamme MG17, med et fullstendig ComRS-system etablert i det penicillinresistente kliniske isolatet.



Figur 3.7-1 Illustrasjon av genetiske kassetter nødvendig for etablering av ComRS-systemet i det kliniske isolatet (MG3). Grå felt indikerer oppstrøms og nedstrøms flankerende sekvenser for genet i hvit. Primere er indikert med piler, komplementær hale er indikert med prikket linje.

3.8 Deplesjon av essensielle gener ved hjelp av ComRS-systemet

Deplesjon vil si å ektopisk nedregulere ekspresjonen av et gen nedstrøms for P_{comX} ved tilsetning av syntetisk ComS-induser til en konsentrasjon hvor manglende genproduktet kan observeres, uten at bakterien dør (67). Dette gjelder spesielt for eksperiment med essensielle gener, slik som *pbp2b*, hvor delesjon av genet fører til celledød. For å utføre delesjon kreves det delesjon av det native genet, og at genet er plassert nedstrøms for P_{comX} . Dermed vil genuttrykket av *pbp2x* og *pbp2b*, være direkte ekvivalent med konsentrasjonen av ComS i løsningen ved hjelp av ComRS-systemet. Selv om ComS fjernes fra mediet, er det likevel ekspresjon av genet nedstrøms for P_{comX} en viss tid etter ComS fjernes (67). Årsaken til dette er intracellulært ComS, hvorav konsentrasjonen av intracellulært ComS reduseres av peptidaser og av celledeling (67). Dette betyr at cellene må fortynnes for å faktisk redusere konsentrasjonen av ComS, altså genuttrykket.

I dette eksperimentet ble det valgt å dyrke opp bakteriene i 0,2 μM og 0,05 μM . Det er vist at 0,2 μM ComS resulterte i en tilnærmet normal vekst og morfologi, og er derfor en god negativ kontroll mot depleksjonseksperimentet (67). For å undersøke ytterligere underuttrykk av genet ble det også testet med en konsentrasjon på 0,05 μM ComS. Bakterien ble predyrket i C-medium med 0,2 μM og 0,05 μM ComS, for så å resuspenderes til OD₅₅₀ 0,05 i C-medium uten ComS

Metoder

to ganger for å sikre at all ekstracellulært ComS er fjernet. Kulturene ble splittet i to, en med 0,2 eller 0,05 μM ComS og en uten ComS. På en 96-brønns mikrotiterplate ble det laget 2-fold-fortynningsrekker som starter på 2. fortynning for alle bakteriekulturer. OD₅₅₀ ble målt hvert 5. minutt på plateleseren Synergy H1 Hybrid Reader med Gen5 software ved 37 °C i 16,5 timer. Basert på output fra plateleser ble det laget vekstkurver som viser depleksjon, med OD₅₅₀ på y-aksen og tid i timer på x-aksen.

3.9 Substitusjon av native *pbp*er som koder for lavaffinitets-PBPer til *pbp*er som koder for høyaffinitets-PBPer, ved bruk av ComRS-systemet

For å kunne manipulere de essensielle genene *pbp2x* og *pbp2b* må de ektopisk uttrykkes til enhver tid for å kunne utføre deleksjon av de native genene. Dermed må ComRS-systemet benyttes. For å substituere de native *pbp2x* og *pbp2b* som koder for lavaffinitets-PBPer til *pbp*er som koder for høyaffinitets-PBPer, ble valgt et eksperimentoppsett med fire ulike transformasjoner for hvert *pbp*-gen.

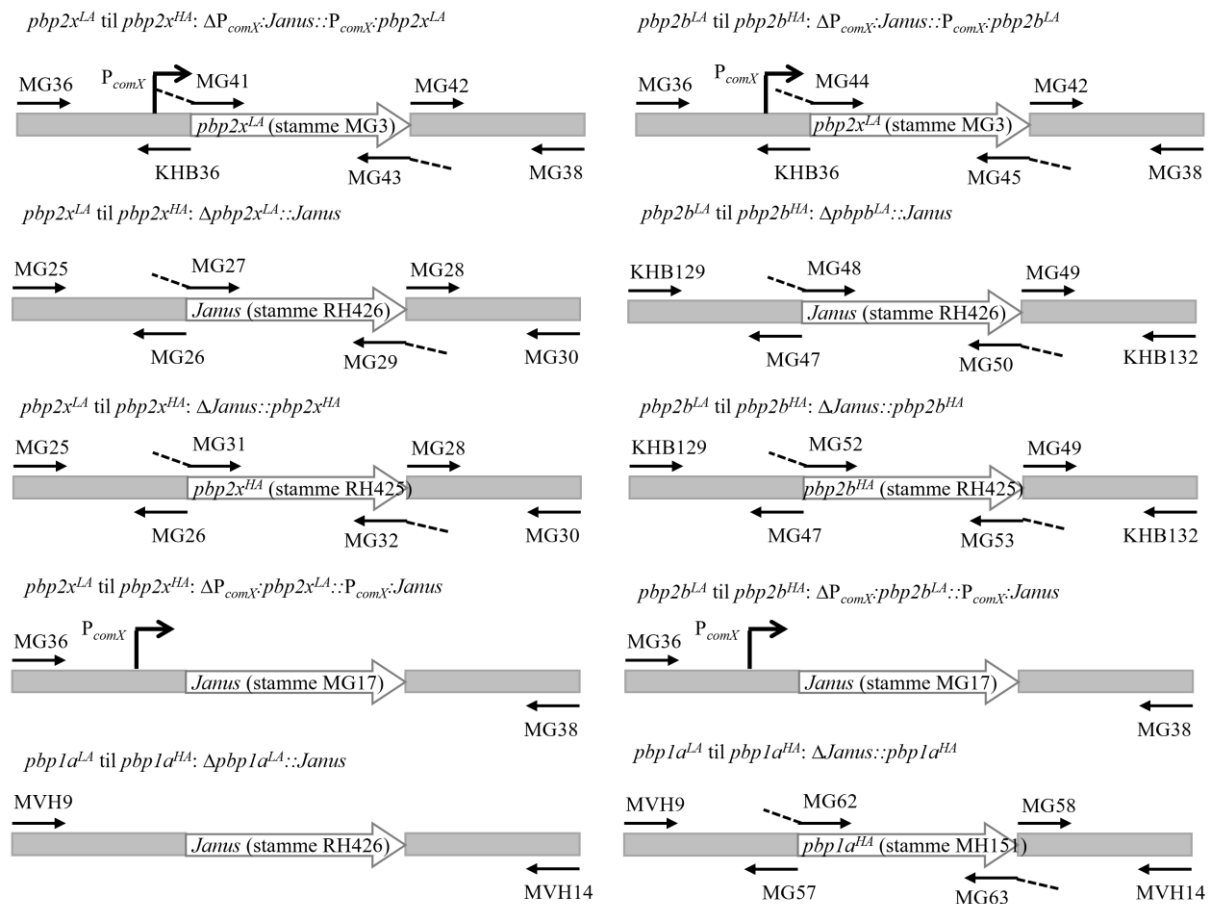
Første genetisk transformasjon var å erstatte Janus-kassetten nedstrøms for P_{comX} med respektive *pbp*-gen i stamme MG17 med ComRS-systemet etablert. Genetiske kassetter benyttet for transformasjonen ble konstruert ved bruk av overlapp-PCR som illustrert i Figur 3.9-1. Dette ga opphav til stammene MG18 for *pbp2x*-stamme og MG19 for *pbp2b*-stamme. Den andre genetisk transformasjon var å erstatte det native *pbp*-genet med Janus-kassetten, men med ektopisk ekspresjon av *pbp*-genet nedstrøms P_{comX}. Ektopisk ekspresjon ble oppnådd ved å tilsette syntetisk ComS til bakteriekulturen. Genetisk transformasjon ble utført som beskrevet i kapittel 3.5, men ComS ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,2 μM samtidig som DNA og CSP-1 ble tilsatt, og strøket ut 50 μl 50 mM ComS på TH-platen. Genetiske kassetter benyttet for transformasjonene er illustrert i Figur 3.9-1. Dette ga da opphav til stammene MG21 for deleksjon av native *pbp2x* og stamme MG22 med deleksjon av native *pbp2b*, begge med ektopisk regulering av respektive *pbp*-gen.

Den tredje transformasjon var å erstatte Janus-kassetten i det native lokuset for *pbp*-gen med respektive høyaffinitets-*pbp* fra penicillinsensitive laboriestedstammen RH425. Genetiske kassetter for transformasjonene er illustrert i Figur 3.9-1. Likt som for tredje transformasjon kreves det ektopisk ekspresjon av *pbp*-gen nedstrøms P_{comX} innen transformasjonen er fullført med *pbp*-gen i native lokus. Det ble utført flere metoder for tilsetning av ComS. En likt som tredje transformasjon med sluttkonsentrasjon på 0,2 μM ComS i mediet under hele

Metoder

transformasjonen og strøket ut på TH-platen, og en med kun ComS i mediet og ikke på TH-platen. Det ble også forsøkt å resuspendere i C-medium uten ComS 1 time etter inkubering med CSP-1 og DNA, og resuspendere i C-medium uten ComS ved tilsetning av CSP-1 og DNA. Fjerde transformasjon, altså erstatte lavaffinitets-*pbp* bak P_{comX} med Janus-kassetten, ble ikke utført grunnet begrensninger i eksperimentet og tid, men genetiske kassetter er illustrert i Figur 3.9-1. Dette vil bli videre diskutert i resultater og diskusjonen.

Ettersom *pbp1a* ikke er et essensielt gen kan genet derfor manipuleres ved bruk av Janus-systemet. Det vil si delesjon av native *pbp1a*^{LA} med Janus-kassetten og dermed erstatte Janus-kassetten med *pbp1a*^{HA} fra penicillinsensitive RH425. Illustrasjon av genetiske kassetter benyttet for transformasjonen er gitt i Figur 3.9-1.



Figur 3.9-1 Illustrasjon av konstruksjon av genetiske kassetter nødvendig for substitusjon av *pbp2x*, *pbp2b* og *pbp1a* som koder for lavaffinitets-PBPer til *pbper* som koder for høyaffinitets-PBPer. Grå felt indikerer oppstrøms og nedstrøms flankerende sekvenser for genet i hvit. Primere er indikert med piler, komplementær hale er indikert med prikket linje.

3.10 Isolering av cellevegg

I denne studien ble stempeptidkomposisjonen fra stammen med ektopisk regulering av *pbp2b^{LA}* ved overuttrykk, «normaluttrykk» og underuttrykk av genet, analysert. Det ble først dyrket opp tre bakteriekulturer i 500 ml C-medium. For bakteriekulturen med underuttrykk av *pbp2b* ble en celler predyrket i 10 ml C-medium med 0,05 μ M ComS, dermed resuspendert i C-medium uten ComS og tilsatt til 500 ml C-medium i en gitt mengde celler som gir en sluttkonsentrasjon med 16 x fortynningsgrad i 500 ml C-medium, slik som i vedlegg B merket med rød farge. Bakteriekulturene i 500 ml med overuttrykk (2 μ M ComS) og normaluttrykk (0,5 μ M ComS) ble høstet ved OD₅₅₀ 0,3-0,4, mens prøve med underuttrykk ble høstet ved OD₅₅₀ 0,2. Dette for å høste kulturene i eksponentiell vekstfase og for å unngå anormaliteten i vekstkurvene ved OD₅₅₀ 0,25-0,3 ved depleksjon (vedlegg B). Hvilken OD₅₅₀ kulturen ble høstet ved ble bestemt basert på vekstkurver fra depleksjonseksperimentene (Figur 4.3.2-1). Bakteriene ble høstet ved sentrifugering på 10 000 g i 10 minutter på 4 °C, for så å bli resuspendert i 40 ml iskald 50 mM Tris-HCl pH 7,0.

Deretter ble 120 ml kokende 5 % SDS tilsatt dråpevis og inkubert 15 minutter ved kokepunkt, for å løse opp membraner og proteiner som ikke er kovalent bundet til celleveggen, samt lysere cellene og inaktivere autolysiner. Etter løsningen var kjølt ned til romtemperatur ble prøvene sentrifugert ved 12 000 g i 10 minutter ved romtemperatur, for å høste celleveggmateriale i pelleten. Pelleten ble vasket for resterende SDS ved repeterende resuspending og sentrifugering på 12 000 g i 10 minutter ved romtemperatur, med 2 x 20 ml 1 M NaCl og 4 x 20 ml dH₂O. Celleveggmateriale ble mekanisk knust ved like mengder dH₂O og syrevasket glasskuler (150-212 mesh, Sigma) i FastPrep FP120 med 6-8 pulser på 20 sekunder med maksimum fart. Knust celleveggmateriale var da i supernatanten, som ble sentrifugert på 2000 g i 5 minutter for nedfelling av uknuste celler og resterende glasskuler. Den knuste celleveggen ble så sentrifugert på 25 000 g i 15 minutter ved romtemperatur for å sedimentere celleveggen. Pelleten med knuste cellevegg ble behandlet med 2 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,5 med 20 mM MgSO₄, 10 μ g/ml DNase og 50 μ g/ml RNase, og inkubert i 37 °C i 2 timer. Etter to timer tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 10 mM CaCl₂ og 100 μ g/ml trypsin. Prøvene ble inkubert ved 37 °C med risting over natt. De siste stegene ble utført for å fjerne nukleinsyrer og proteiner fra løsningen.

Etter inkubering over natt ble 8 % SDS tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1 %, og deretter inkubert på 80 °C i 15 minutter for å fjerne enzymer fra tidligere steg. Dermed ble volum juster

Metoder

til 20 ml med dH₂O og sentrifugert på 13 000 g i en time ved romtemperatur for å fjerne SDS fra prøven. Pelleten ble resuspendert i 10 ml 8 M LiCl og inkubert i 20 minutter ved 37 °C. Etter sentrifugering som forrige steg, ble pelleten resuspendert i 10 ml 100 mM EDTA pH 7,0 og inkubert i 20 minutter ved 37 °C. Celleveggen ble sedimentert ved sentrifugering som tidligere. EDTA og LiCl tilsettes for fjerne ionisk bundet materialer til celleveggen. Celleveggen vaskes ved repeterende resuspending og sentrifugering på 13 000 g i en time ved romtemperatur, med 20 ml dH₂O, 20 ml aceton og deretter 20 ml dH₂O. Den vaskede celleveggen ble resuspendert i 1 ml dH₂O og frysetørket, før mengden cellevegg ble målt i mg. Celleveggen fra kulturen var da isolert.

3.11 Høypresisjons væskekromatografi (HPLC)

Revers fase høypresisjons væskekromatografi («High-Performance Liquid Chromatography»), forkortet HPLC, er en kromatografisk metode for separasjon, deteksjon og kvantifisering av organisk, hydrofobt prøvemateriale, som i denne studien er peptider fra celleveggen (83). Under HPLC transporteres prøvematerialet inn i en kolonne kalt den stasjonære fasen, av en væske kalt den mobile fasen (83). I denne studien ble en C18-kolonne med høy affinitet til hydrofobe komponenter benyttet, og den mobile fasen besto av de to løsningene 0,05 % TFA og 0,05 % TFA i 100 % ACN. Ved tilstedeværelse av kun TFA-løsningen vil peptider hydrofobt binde til kolonnen, mens ACN vil konkurrere med peptidene i binding med kolonnen (83). Dermed ved å påføre en gradient av ACN-løsningen vil peptider løsne fra kolonnen basert på hydrofobisitet, hvorav tiden et peptid bruker for å løsne fra kolonnen er kalt retensjonstid (83). Peptider detekteres deretter ved bruk av UV-lys med en absorbans på 206 nm, som gir et kromatogram som output (83). Kromatogrammet viser absorbans som en funksjon av retensjonstiden, med topper som representerer et spesifikt peptid hvor størrelsen på toppen er proporsjonal med kvantiteten av peptidet (83). I dette arbeidet ble peptider eluert med en lineær gradient av ACN fra 0-15% over 120 minutter.

Før stempeptidene i celleveggen kan analyseres med HPLC, må de frigjøres fra peptidoglykanet. Aller først ble den frysetørkede celleveggen løst opp i dH₂O til en sluttkonsentrasjon på 20-50 mg/ml. Til 1 mg cellevegg ble det tilsatt en sluttkonsentrasjon på 5 µg/ml LytA, 10 mM fosfatbuffer pH 7,0 og dH₂O opp til et sluttvolum på 100 µl. Løsningen ble inkubert over natt ved 37 °C. LytA hydrolyserer celleveggen ved å spalte laktylamidbindingen mellom glykankjeden og peptidkjeden i peptidoglykanet (84). Etter inkubering over natt ble LytA felt ut ved å varme opp løsningen til 95 °C, og deretter sentrifugert

Metoder

ved 14 000 g i 10 minutter. Supernatanten ble overført til nye eppendrofrør og sentrifugert ved 14 000 g i 5 minutter. Supernatanten med peptidene ble pH-justert til pH 3 ved bruk av 20 % orto-fosforsyre.

HPLC ble satt til 0,5 ml/min flow med absorbans på 206 nm, med 5 minutters vask og 120 minutter eluering fra 0-15 % ACN og 15 minutters kolonneregenerering med den mobile fasen. På en C18-kolonne ble 70 µl 0,3 mg/75 µl peptider tilsatt. Basert på kromatogrammer fra HPLC ble ratio av areal av topper mellom prøver beregnet, for å nærmere sammenligne celleveggkomposisjonen.

3.12 Merking av PBPer med bocillin FL

Bocillin FL er et fluorescerende Penicillin V, og vil derfor binde PBPer på samme måte som penicillin (85). Å merke PBPer med Bocillin FL er derfor en rask og effektiv metode for å visualisere PBPer på, ved å eksitere Bocillin FL med lys på 530 nm for så å måle lysemisjonen ved ca. 570 nm (85). Denne metoden gjør det derfor mulig å visualisere affiniteten mellom penicillin og PBPer. I denne studien ble det PBPer merket med bocillin FL (Boc-FL) både i cellelysat og i intakte celler.

Først ble bakteriekulturer dyrket i 35 ml C-medium til $OD_{550} = 0,2$. Umiddelbart ble 10 ml til merking av PBPer med Boc-FL i cellelysat overført til is for å hindre videre vekst. Resterende prøver ble brukt for merking av PBPer med Boc-FL i intakte celler. De ble umiddelbart sentrifugert og resuspendert i 1 ml C-medium og tilsatt Boc-FL til en sluttkonsentrasjon på 3,3 µM. Etter inkubering i 30 minutter ved 37 °C, ble cellene resuspendert 3 ganger i 10 X PBS for å vaske bort overflødig Boc-FL. Dette for å unngå videre binding mellom PBP og Boc-FL etter cellelysering. For å lysere cellene og bryte opp celleveggen ble prøvene tilsatt 100 µl 20 mM natriumfosfat buffer pH 7.2 med 0,2 % Triton X-100. Triton X-100 initierer autolysinet LytA i bakterien slik at cellene lyserer (86). Prøvene ble inkubert ved 37 °C i 5 minutter. Deretter ble de tilsatt 100 µl 2 X SDS sample buffer og kokt ved 95 °C i 5 minutter for å denaturere proteinene. Prøvene ble sentrifugert i 30 sekunder for nedfelling av cellerester, og SDS-PAGE ble utført på øvre væskelag, beskrevet i kapittel 3.12.1.

De 10 ml overført for Boc-FL-merking av PBPer i cellelysat ble sentrifugert og resuspendert i 100 µl 20 mM natriumfosfat buffer pH 7.2 med 0,2 % Triton X-100, og inkubert ved 37 °C i 5 minutter. Cellelysaten ble tilsatt Boc-FL til en sluttkonsentrasjon på 3,3 µM etterfulgt av inkubering på 37 °C i 30 minutter. 15 µl av merket cellelysat ble tilsatt 15 µl 2 X SDS sample

Metoder

buffer og varmet ved 95 °C i 5 minutter for å denaturere proteinene. Prøvene ble separert ved bruk av SDS-PAGE, beskrevet i kapittel 3.12.1.

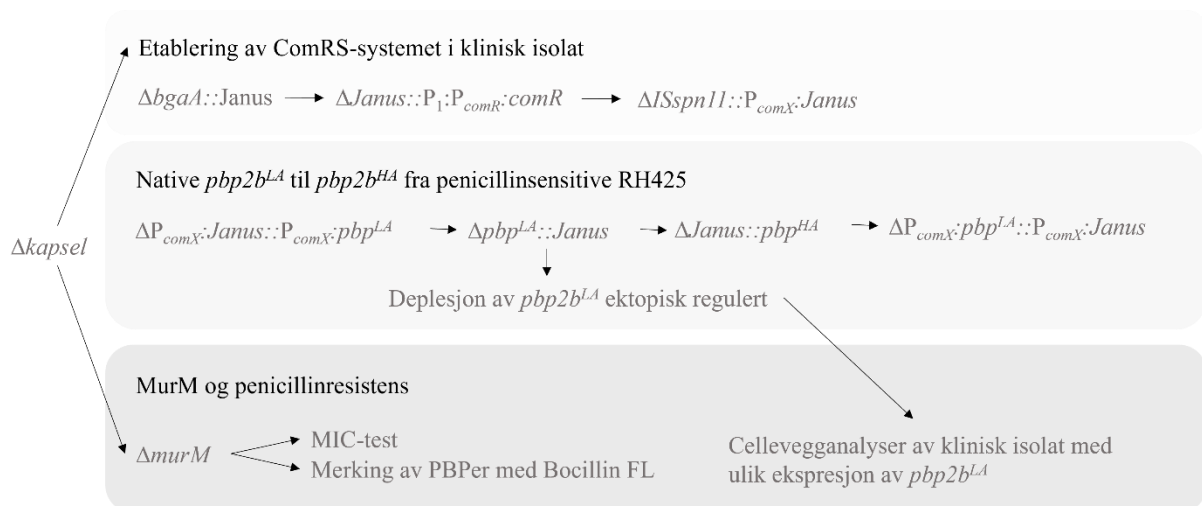
3.12.1 Natriumdodecylsulfat - polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)

Natriumdodecylsulfat - polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) er en metode utviklet for å separere og visualisere proteiner kun basert på proteinets størrelse (87). Natriumdodecylsulfat (SDS) er en anionisk detergent med et negativt ladd sulfat (87). SDS binder seg til peptidkjeden hos proteiner og fjerner den tertiære og sekundære proteinstrukturen og sørge for at proteiner er negativt ladd på grunn av binding med SDS-molekyler (87). I tillegg var det tilsatt β -merkaptoetanol som reduserer eventuelle disulfidbroer mellom cysteiner, internt og mellom proteiner, slik at proteinene lineariseres fullstendig. Som et resultat av dette vil hastigheten proteiner inkubert i SDS vandre mot en positiv pol gjennom en polyakrylamidgel, være kun basert på proteinets størrelse (87). Polyakrylamidgelen består av porer med ulike størrelser og lengder (87). Som et resultat vil proteiner av mindre størrelse vandre raskere gjennom gelen på grunn av større tilgjengelighet gjennom porene, sammenlignet med større proteiner (87). Dermed ved bruk av både SDS og polyakrylamidgel kan proteiner separeres på størrelse over et elektrisk felt.

Til SDS-PAGE ble det støpt en gel bestående av 4 % stacking gel og 10 % separasjonsgel, for å sørge for god separasjon av PBPene (Vedlegg F6.3 for fremgangsmåte og innhold). Det ble tilsatt 15 μ l av hver prøve i respektive brønner, og elektroforesekammerne ble fylt med 1 X SDS running buffer. Et elektrisk felt ved bruk av Power Pac 300 ble tilsatt kammeret for at proteinene skal vandre. Det ble først benyttet 120 V i 15-20 minutter til alle prøvene var vandret frem til separasjonsgelen. Deretter ble det benyttet 200 V i 90-120 minutter til tilstrekkelig separasjon av HMV klasse A og B PBPPer var oppnådd. LMV klasse D PBP3 ble ikke undersøkt, og dermed ble SDS-PAGE utført frem til PBP3 vandret ut av gelen for å optimalisere separasjonen av de fem resterende PBPene. Gelene ble visualisert med fluorescens i Azure Biosystem c400 bildetaker og cSeries Capture Software, med 2 minutter eksponering med cy3 fluorescens og 2 μ m resolusjon. Ved bruk av programvaren Azurespot ble intensiteten av fluorescens målt for hvert bånd.

4. Resultater

Formålet med denne studien var å undersøke determinanter for penicillinresistens i pneumokokker ved bruk av gendeplesjonssystemet ComRS i et penicillinresistent klinisk isolat (Figur 4-1). Ettersom stadig flere infeksjoner forårsakes av pneumokokker som ikke er sensitive mot penicillin, er det viktig å forske på ulike faktorer som påvirker resistensutviklingen. Det har lenge vært kjent at penicillinresistente pneumokokker har lavaffinitets-PBPer (41,42). Likevel er det flere studier som indikerer at også andre faktorer kan påvirke penicillinresistensen, enten det er determinanter som i seg selv bidrar til resistens eller andre faktorer som kompenserer for byrden det er å uttrykke mindre effektive lavaffinitets-PBPer (31,35,47,48,52,88). For å identifisere potensielle resistensbidrag fra ikke-PBP faktorer ønsket vi å bytte *pbp*-genene som koder for lavaffinitets-PBPer i et resistent klinisk isolat til *pbp*-gener som koder for høyaffinitets-PBPer fra penicillinsensitive RH425. Siden PBP2x og PBP2b er essensielle ble genekspresjonssystemet kalt ComRS etablert i det kliniske isolatet. ComRS-systemet gjør det mulig å deletere og gjeninnføre essensielle gener i pneumokokker (67). I tillegg kan systemet brukes til å studere effekten av å skru av et essensielt gen (67). ComRS-systemet ble derfor også brukt til å undersøke sammenhengen mellom uttrykk av økt lavaffinitets PBP2b og en økt forgreinet celleveggstruktur som resistente isolater ofte har. Ettersom ligasen MurM er ansvarlig for indirekte kryssligninger, ble det valgt å undersøke effekten MurM har som en ytterlig faktor som bidrar til penicillinresistens.

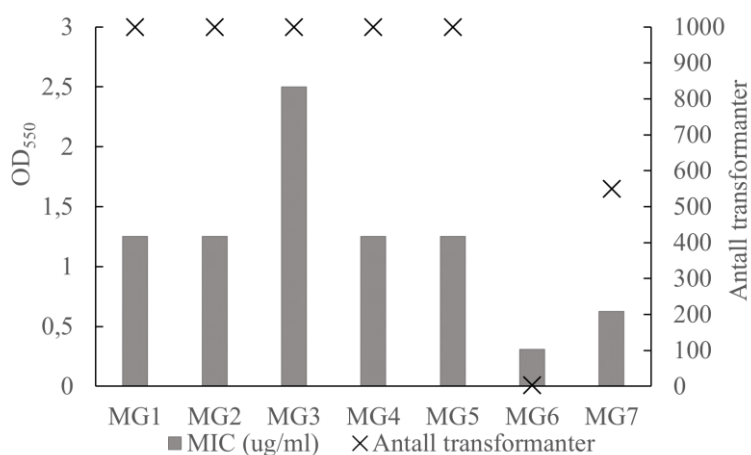


Figur 4-1 Flytskjema for eksperimenter utført i denne studien. Flytskjema viser eksperimenter som ble utført for å oppnå bedre forståelse av effekten av *pbp*^{LA}, samt hvordan *murM* og indirekte kryssligning påvirker penicillinresistensen. Studien er delt i tre bolker, lysegrå for etablering av ComRS-systemet, grå for transformasjoner for å endre *pbp*^{LA} til *pbp*^{HA}, og mørkegrå for eksperimenter med *murM* og indirekte kryssligning i peptidoglykanet.

4.1 Valg av klinisk isolat og delesjon av kapsel

Kliniske isolater av pneumokokker er bakteriestammer som tidligere har forårsaket sykdom hos bæreren av bakterien. Disse har over tid hatt mulighet til å tilegne seg blant annet virulensfaktorer og antibiotikaresistensmekanismer i en naturlig setting. Dette utgjør et godt utgangspunkt for å studere ulike gener og mutasjoner som bidrar til penicillinresistens. Tidligere studier som har undersøkt resistensdeterminanter i pneumokokker har brukt genomisk DNA fra resistente isolater for å transformere penicillinsensitive laboriøse stammer (89). Å ta utgangspunkt i et penicillinresistent klinisk isolat hvor mutasjoner som har ført til resistens har oppstått i en naturlig setting, kan man undersøke resistensdeterminanter motsatt vei. Nemlig å gjøre det resistente isolatet sensitiv for penicillin igjen ved å bytte ut lavaffinitets-PBPer med høyaffinitets-PBPer fra sensitiv laboriøse stamme.

Dermed, ble det først testet et utvalg kliniske isolater for resistensnivå og transformasjonsevne ved naturlig transformasjon. Resistensnivå ble målt som vekst over tid i ulike konsentrasjoner av penicillin og ble definert som minimum inhibitorisk konsentrasjon (MIC_{90}), som er konsentrasjonen av penicillin som hemmer 90 % eller mer av veksten til bakterien. For å teste transformasjonsevne for naturlig transformasjon, ble isolatene transformert etter standard protokoll beskrevet i kapittel 3.5, med genomisk DNA fra stamme cp1500 og antall transformanter ble benyttet for å definere transformasjonsevnen. Det var stor variasjon av MIC_{90} og transformasjonsevne hos de ulike isolatene, vist i Figur 4.1-1. Av de syv isolatene som ble testet (MG1-7), ble MG3 brukt til videre eksperimenter i dette arbeidet grunnet høyest MIC_{90} -verdi og transformasjonsevne (over 1000 transformanter observert).



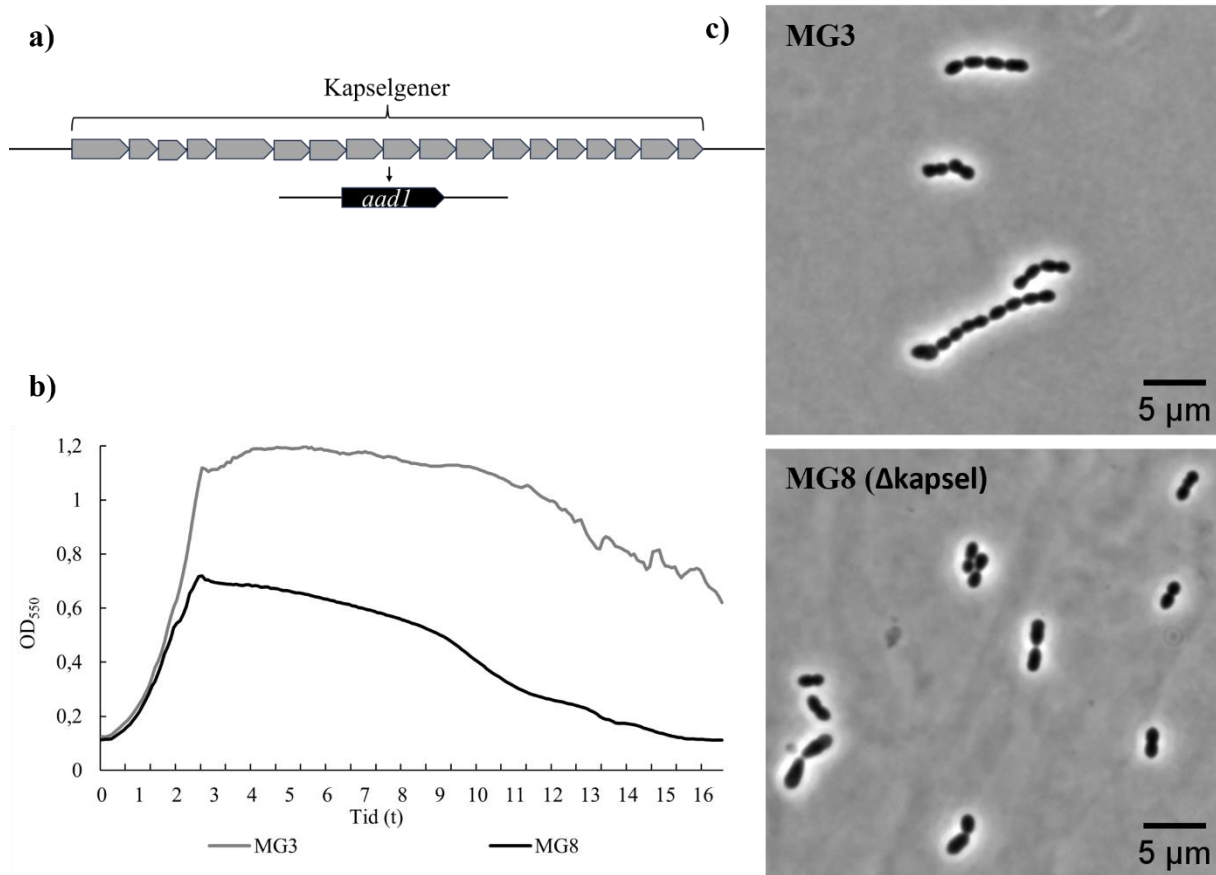
Figur 4.1-1 MIC_{90} -verdier og transformasjonsevne for naturlig transformasjon av de syv utvalgte kliniske isolatene. Figuren viser MIC_{90} -verdi ved en parallell vist ved stolper og evnen for naturlig transformasjon ved antall transformanter etter inkubering over natt vist ved X, for de syv utvalgte isolatene. Merk at for verdier ved 1000 transformanter ble det over 1000 kolonier oppnådd.

Resultater

Ettersom kliniske isolater tidligere har gitt infeksjonssykdom hos mennesker ble det utført delesjon av kapselgenene ved å erstatte kapsellokuset (*cps*) med en spectinomycinresistensmarkør, vist i Figur 4.1-2a. Sammenlignet med ikke-innkapslet pneumokokker, har innkapslet pneumokokker en bedre evne til å unngå slimhinnelaget på grunn av den negative ladningen og pHen i kapselen, slik at den stabilt kan kolonisere seg på vertens epiteloverflate (90,91). Vertens slimhinnelag promoterer eliminering av patogener gjennom opsonofagocytose, en prosess hvor fagocytter gjenkjenner og bryter ned patogener opsonisert med antistoffer og/eller komplementproteiner (16,91). Kapselen begrenser opsonisering av immunoglobuliner og andre immunologiske proteiner slik at den ikke blir oppdaget av fagocytter (16,90). En ikke-kapsellert pneumokokk kan derfor bare i ytterst få tilfeller forårsake infeksjon (16,90).

Både stammen uten kapsel (MG8) og utgangsstammen ble testet for endringer i MIC₉₀-verdien mot penicillin, bakterievekst og morfologi. Gjennomsnittlige MIC₉₀ av fem replikater for utgangsstammen MG3 var 5,5 µg/ml (SD=2,45), mens gjennomsnittlig MIC₉₀ av åtte replikater var litt lavere for stamme uten kapsel MG8 og var 4,06 µg/ml (SD=1,21) (vedlegg A). Delesjon av kapselen ga flere endringer i veksten til bakteriene og er vist i vekstkurver i Figur 4.1-2b. Veksthastigheten var uforandret hos Δcps -mutanten, men maksimal vekst definert ved OD₅₅₀ ble lavere, samt bakteriekulturen går raskere i autolyse når kapselen er fjernet. Derimot viste mikroskopi av bakteriekulturene ingen vesentlig endring i morfologi ved delesjon av kapselgener (Figur 4.1-2c). Det ble muligens observert høyere grad av diplokokker enn kjeder for Δcps -mutanten (MG8) sammenlignet med utgangsstammen (MG3).

Resultater



Figur 4.1-2 Illustrasjon av delesjon av kapselgener med seleksjonsmarkør *aad1*, samt vekstkurver og mikroskopi av MG3 og MG8. **a)** Illustrasjon av delesjon av kapselgener med spectinomycin-kassetten *aad1*. **b)** Vekstkurver av utgangsstammen MG3 (grå) og Δ kapsel MG8 (svart) uten penicillin i mediet. X-aksen viser tid i timer og y-aksen viser OD₅₅₀. **c)** Mikroskopibilder av utgangsstamme og stamme uten kapsel. Bilder er behandlet i Fiji ImageJ, hvor det ble beskåret og satt på målestokk på 5 μ m.

4.2 Etablering av ComRS-systemet i et penicillinresistent klinisk isolat

Ettersom denne studien hadde som mål å undersøke ikke-PBP-faktorerers involvering i penicillinresistens hos pneumokokker var det et ønske å reversere et penicillinresistent klinisk isolat til en sensitiv. Hvis en slik mutant fortsatt har høyere MIC-verdi mot penicillin enn en sensitiv villtype, betyr det at den har mutasjoner i genomet utenfor *pbp*-lokusene og at disse mutasjonene bidrar til resistens. Å reversere en pneumokokk fra høy- til lavresistent har ikke tidligere blitt utført, til dels fordi man ikke kan selektere for mutanter med penicillin når resistente lavaffinitets-PBPer byttes med sensitive høyaffinitets-PBPer. Siden PBPene er essensielle, byr det også på utfordringer med hensyn på å lage levedyktige mutanter. I litteraturen blir lav-affinitetsversjoner av PBP2x, PBP2b og PBP1a beskrevet som viktige for en penicillinresistent fenotype (46,47). Både PBP2x og PBP2b er essensielle proteiner og delesjon er derfor ikke mulig (35). For å ha muligheten til å studere essensielle gener i *S. pneumoniae* ble det i 2011 utviklet et gendeplesjonssystem i pneumokokker basert på

Resultater

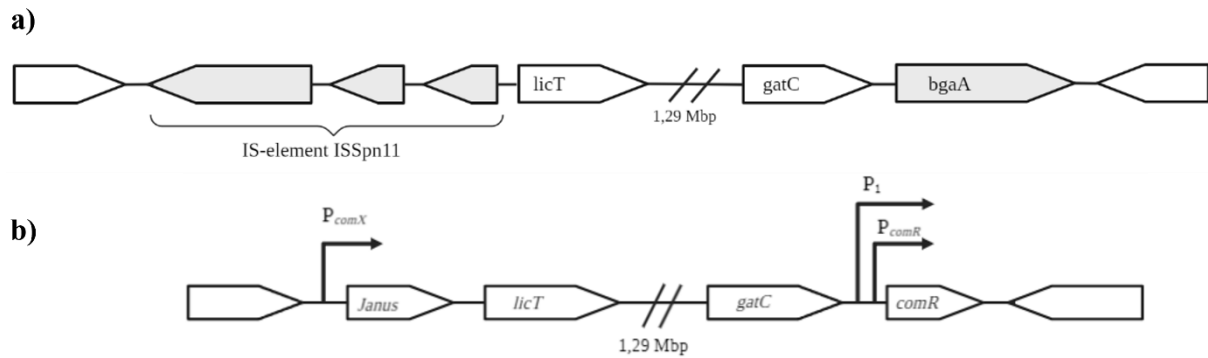
kompetansesystemet i *S. thermophilus* (beskrevet i kap. 1.5.1) (67). For å bytte ut de essensielle PBP2x og PBP2b ble det samme gendepleksjonssystemet etablert i det resistente kliniske isolatet slik at de essensielle genene kan uttrykkes ektopisk samtidig som det native genet kan erstattes, samt utføre gendepleksjonseksperimenter.

For å etablere ComRS-systemet benyttes Janus-systemet, som først måtte etableres i stammen uten kapsel (MG8). Det vil si å introdusere streptomycinresistens, siden den bicistroniske Janus-kassetten inneholder kanamycinresistens og dominant streptomycinsensitivitet som gjør det mulig å selekttere transformanter både ved tilegnelsen og tapet av kassetten (kap. 3.6) (81). Dermed ble en streptomycinresistent stamme (MG12) laget ved å transformere kapselløs klinisk isolat (MG8) med *rpsL* fra streptomycinresistent laboratoriestamme (RH425). Denne stammen (MG12) ble brukt som utgangsstamme for resterende mutanter i denne oppgaven.

For å etablere ComRS-systemet i MG12 må to elementer innføres i genomet: (i) genet som koder for regulatoren ComR og (ii) promotoren P_{comX} som induseres av aktivert ComR (67). Det ble først forsøkt å innføre *comR* med tilhørende promotorer ($P_1:P_{comR}:comR$) i samme lokus som Berg et al. 2011 (nedstrøms *amiF* og oppstrøms *treR*) (67). To forsøk ga ingen transformanter, og det ble derfor forsøkt å endre lokus for innsetting av $P_1:P_{comR}:comR$. Det nye lokus ble valgt til å erstatte genet *bgaA* (koder for en β -galaktosidase, hvor begrunnelse er gitt i kapittel 3.6). Transformasjonen for å sette inn Janus-kassetten i *bgaA* var vellykket og ga opphav til stamme $\Delta bgaA::Janus$ (MG14). Videre ble Janus-kassetten erstatte med $P_1:P_{comR}:comR$ (MG15).

Lokus for plassering av promotoren P_{comX} for ektopisk genuttrykk har originalt blitt plassert mellom to kapselgener (67). Etersom alle kapselgener ble fjernet i MG8, ble et nytt lokus valgt for innsetting av denne promotoren. $P_{comX}:Janus$ ble erstattet med IS-element *IS66* oppstrøms genet *aliA* (involvert i peptidopptak). Denne transformasjonen var noe utfordrende og etter fire forsøk ga kun et forsøk noen få transformanter. Det ble erfart underveis i prosjektet at transformasjonsevnen (antall kolonier på TH-skål ved å følge standard protokoll i kap. 3.5) til den kliniske stammen varierte avhengig av lokus. Derfor ble det besluttet å endre lokus for innsetting av $P_{comX}:Janus$ ettersom det skal utføres transformasjoner i dette lokuset flere ganger og høyere transformasjonsevne er ønsket. Det nye lokuset ble bestemt til å erstatte IS-elementet *ISspn11* oppstrøms *licT* (transkripsjonell antiterminator). Plasseringen av $\Delta ISspn11::P_{comX}:Janus$ (MG17) var vellykket ved første forsøk, og denne mutanten har da etablert alle genetiske elementer nødvendig for ComRS-systemet, skjematisert i Figur 4.2-1.

Resultater



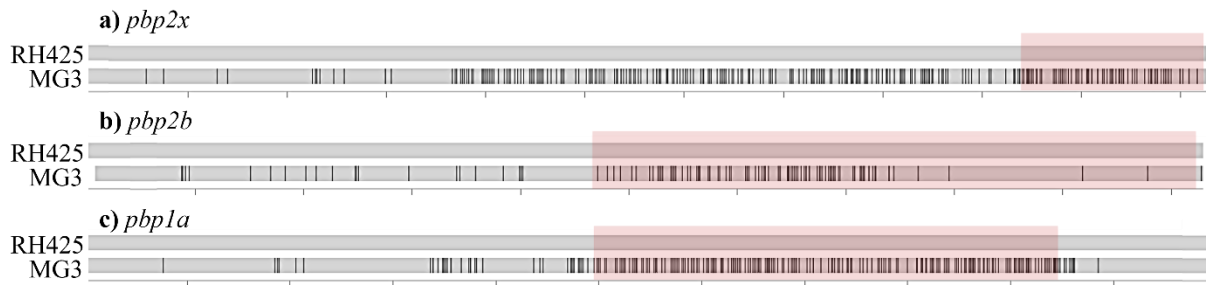
Figur 4.2-1 Skjematisk fremstilling av modifikasjoner i genomet til det kliniske isolatet ved etablering av ComRS-systemet. Figuren viser plassering av genetiske elementer som er nødvendig for etablering av ComRS-systemet. *ISSpn11* ble erstattet med P_{comX} og *bgaA* ble erstattet med $P_1:P_{comR}:comR$. **a)** Genomet til klinisk isolat før etablering av ComRS-systemet. **b)** Genomet etter etablering av ComRS-systemet.

MIC₉₀ for stamme før innsetting av ComRS-systemet (MG3 og MG8) og etter innsettingen (MG17) ble testet for å sikre at ikke ComRS-systemet gjorde utslag på den resistente fenotypen til isolatet. Ingen betydelige endringer i MIC₉₀ ble observert (vedlegg A).

4.3 Substitusjon av native *pbp*er som koder for lavaffinitets-PBPer til *pbp*er som koder for høyaffinitets-PBPer

Kliniske penicillinresistente isolater utgjør et godt utgangspunkt for å studere ulike gener og mutasjoner som bidrar til resistens i en naturlig genetisk bakgrunn. Tidligere er det forsøkt å undersøke determinanter for penicillinresistens ved å transformere penicillinsensitive laboriestammer med genomisk DNA fra resistente isolater (89). I denne studien ønsket vi å gå motsatt vei; å omgjøre et resistant klinisk isolat til å bli sensitiv ved å bytte ut *pbp*-genene med korresponderende gener som koder for høy-affinitets PBPer. Det ble utført en sammenstilling av DNA-sekvensen for *pbp2x*, *pbp2b* og *pbp1a* hos laboriestammen RH425 og isolatet MG3 (Figur 4.3-1). Genene hos MG3 viser en stor andel mutasjoner som er ansett som årsaken til lavere affinitet mellom PBPer og penicillin, også i transpeptidase-domenene (Figur 4.3-1). Ved å endre et *pbp*-gen kan effekten av mutasjoner på penicillinresistensen av dette genet og samspillet mellom PBPer ved eksponering av penicillin undersøkes. I tillegg var det et langsiktig mål å undersøke om det er resterende penicillinresistens grunnet ytterligere determinanter, og om det er andre mutasjoner i genomet som kan bidra til resistensutvikling.

Resultater



Figur 4.3-1 Sammenstilling av DNA-sekvenser for *pbp2x*, *pbp2b*, *pbp1a* fra penicillinresistent klinisk isolat og penicillinsensitiv laboratoriestamme. Hver sekvens er merket med hvilket gen (a, b eller c) og fra hvilken stamme (Sensitiv laboratoriestamme RH425 eller resistent klinisk isolat MG3). Svart horisontale streker betyr mutasjon i nukleotidsekvensen sammenstilt mot stamme RH425, grå heldekkende farge betyr identisk nukleotidsekvenser. Transpeptidase-domenet er markert med rødt. Intervall mellom markeringer på målestokk er 200 basepar. Sekvenser er sammenstilt i Benchling.

Etttersom *pbp1a* ikke er et essensielt gen ble Janus-systemet i en tottrinns transformasjonsprosess benyttet for substitusjon av *pbp1a^{LA}* til *pbp1a^{HA}*. Det vil si delesjon av native *pbp1a^{LA}* med Janus-kassetten for så å bytte ut Janus-kassetten med *pbp1a^{HA}* fra stamme RH425. Det ble kun utført delesjon av native *pbp1a^{LA}*, og resulterte i stamme MG23.

Fordi *pbp2x* og *pbp2b* er essensielle gener er det nødvendig å bruke ComRS-systemet for å manipulere genene. For å endre *pbp2x^{LA}* og *pbp2b^{LA}* til *pbp2x^{HA}* og *pbp2b^{HA}* var det nødvendig med fire transformasjoner ved bruk av ComRS-systemet slik at genet er uttrykt i cellen til enhver tid. Den første transformasjonen var innsetting av *pbp^{LA}*-gen nedstrøms P_{comX} . Mens den andre transformasjonen var delesjon av det native genet med Janus-kassetten, samtidig som uttrykket av ektopisk *pbp^{LA}* induseres med induksjonsspeptidet ComS. Videre ble Janus substituert med et *pbp^{HA}*-gen. Til slutt ble den ektopiske kopien av *pbp^{LA}* deletert ved innsetting av Janus-kassetten bak P_{comX} igjen.

Sekvensering av *pbp2x^{LA}* og *pbp2b^{LA}* plassert nedstrøms P_{comX} (henholdsvis stamme MG18 og MG19) viste at *pbp2b^{LA}* inneholdt en SNP (enkeltnukleotidpolymorfi) A530G. Siden det ikke førte til aminosyreendringer ble det valgt å fortsette med denne transformanten likevel. Delesjon av nativt *pbp2b^{LA}* ga transformanter ved første forsøk (MG22), mens delesjon av native *pbp2x^{LA}* genererte ingen transformanter. Ved første forsøk oppsto det spontan streptomycinresistens slik at Janus-kassetten ikke kunne benyttes for videre transformasjoner, og ved det andre forsøket viste PCR og Sanger sekvensering at nativt *pbp2x^{LA}* fortsatt var til stede i det native lokuset. Det ble derfor valgt å fokusere på å plassere *pbp2b^{HA}* i det native *pbp2b*-lokuset i stamme MG22. Substitusjon av Janus-kassetten med *pbp2b^{HA}* ble forsøkt i stamme MG22 ($\Delta pbp2b^{LA}::Janus$). Flere forsøk med ulike metoder for å justere den

Resultater

intracellulære konsentrasjonen av ComS-induser under transformasjonen ble testet (kapittel 3.9 for nærmere beskrivelse av metodene), men likevel ble ingen mutanter generert.

I denne studien ble det ikke utført alle transformasjonene som kreves for substitusjon av *pbp2x^{LA}*, *pbp2b^{LA}* og *pbp1a^{LA}* til *pbper* som koder for høyaffinitets-PBPer. Videre årsak og diskusjon er begrunnet i kapittel 5. diskusjon.

4.3.1 Depleksjon av *pbp2b^{LA}* i stamme MG22 bekrefter et velfungerende ComRS-system

For å bekrefte at ComRS-systemet kunne brukes til depleksjon av essensielle gener i det kliniske isolatet, ble det utført gendepleksjon av ektopisk *pbp2b^{LA}* i stamme MG22. Siden *pbp2b* er et essensielt gen, forventes det at cellene får redusert vekst når nivåene av *pbp2b^{LA}* minkes. I tillegg åpnet konstruksjonen av denne stammen (MG22) og etableringen av ComRS-systemet, muligheter for å undersøke om PBP2b^{LA} påvirker mengden indirekte kryssløyper i peptidoglykanet. Ettersom det i denne stammen kan uttrykkes ulike ekspresjonsnivå av PBP2b^{LA}, kan det utføres cellevegganalyser under ulike ektopiske ekspresjoner. Dermed var det nødvendig å undersøke ved hvilken ComS-konsentrasjon depleksjon ble observert, og derav hvilke konsentrasjoner som skal benyttes i cellevegganalyser.

Depleksjon ble utført ved å dyrke MG22 i C-medium med ComS (sluttkonsentrasjon på 0,05 µM eller 0,2 µM) til OD₅₅₀ = 0,2 – 0,3. Deretter ble cellene vasket med ComS-fritt C-medium før de ble fortynnet i en 2-fold-fortynningsrekke med utgangspunkt i OD₅₅₀ = 0,05. Hensikten med fortynningsrekken er å redusere den intracellulære konsentrasjonen av ComS via antall celledelinger. I tillegg ble det laget en fortynningsrekke med tilsatt ComS-induser (sluttkonsentrasjon på 0,05 µM eller 0,2 µM comS) som en positiv kontroll for sammenligning mot depleksjonsprøven. Bakteriekulturene ble inkubert i en plateleser hvor OD₅₅₀ ble målt hvert 5. minutt. I tillegg ble det utført mikroskopi av depleksjonskulturen og den induserte kulturen for å undersøke om depleksjon av *pbp2b^{LA}* har en effekt på cellemorfologien. Det var forventet å observere lengre kjeder bestående av komprimerte celler sammenlignet med elongerte celler i par som normalt (53).

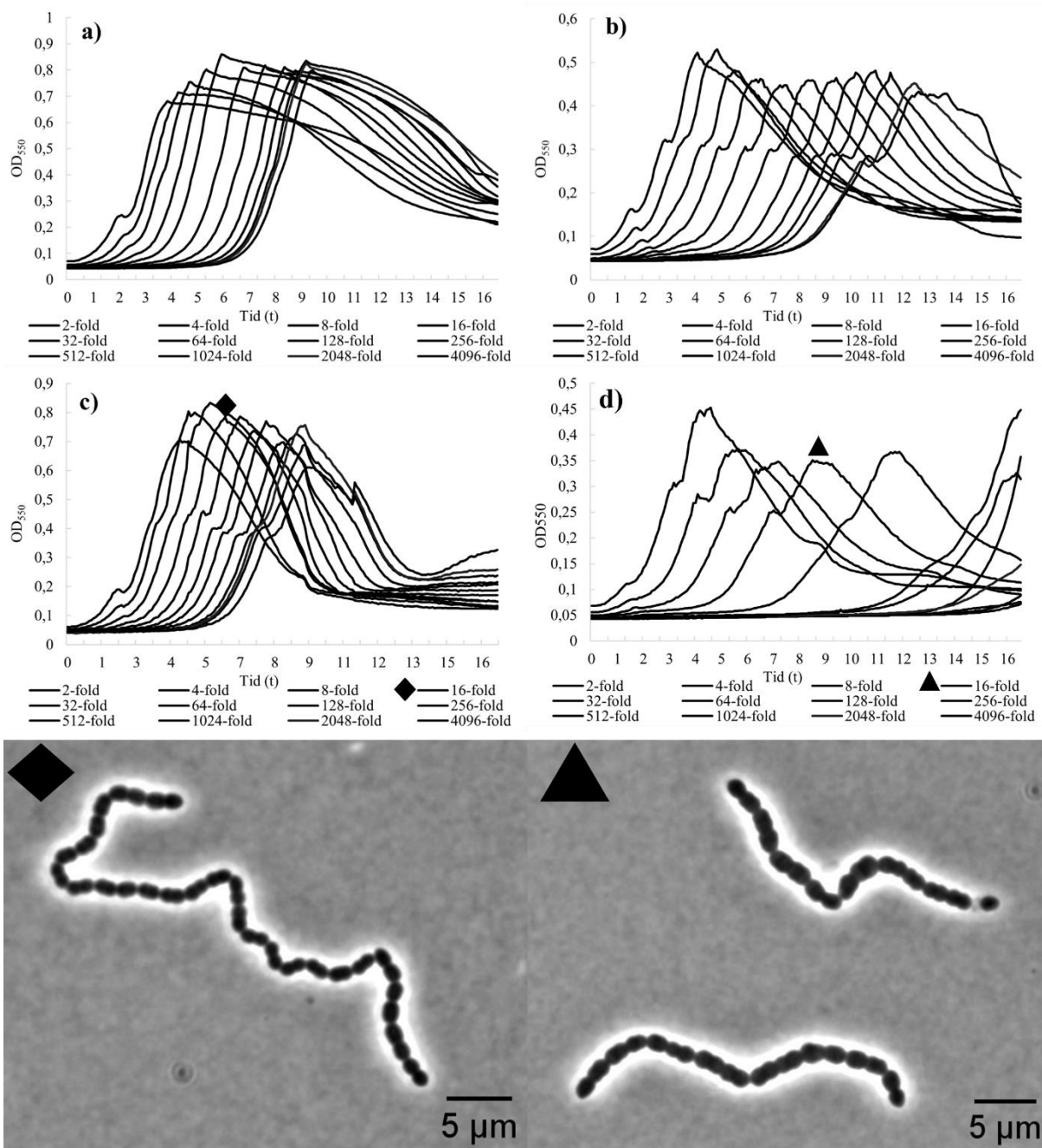
Depleksjon av *pbp2b^{LA}* ble observert som forventet ved sammenligning av vekstkurver, og vises i form av en forsinket og lavere veksthastighet sammenlignet med ComS-induserte celler (Figur 4.3.2-1). For bakteriekultur predyrket i både 0,05 µM eller 0,2 µM ComS ble redusert vekst observert allerede ved første fortynning. Maksimum OD₅₅₀ ble redusert fra OD₅₅₀ 0,8-0,9 i den positive kontrollen til OD₅₅₀ 0,3-0,5 i depleksjonsprøvene, hvorav kulturen predyrket med 0,05

Resultater

μM ComS oppnådde lavere OD_{550} enn cellene predyrket med $0,2 \mu\text{M}$ ComS (Figur 4.3.2-1). Den forsinkede bakterieveksten ble observert ved 8-fold fortytning for depletede celler predyrket med $0,2 \mu\text{M}$ ComS, mens for depletede celler predyrket med $0,05 \mu\text{M}$ ComS ble forsinket vekst observert ved 4-fold fortytning (Figur 4.3.2-1). I tillegg ble det observert en drastisk reduksjon i veksthastighet ved $\text{OD}_{550} 0,25-0,3$ for alle fortytningene hvor cellene ble dyrket uten ComS-induser (underuttrykk av *pbp2b^{LA}*, Figur 4.3.2-1). Denne reduksjonen i veksthastighet varte i omtrent 30 minutter før vekstraten tiltok.

Mikroskopering av *pbp2b^{LA}*-depleksjonsmutant viste ingen tydelige forskjeller mellom bakteriekulturer induisert med ComS og kulturer under depleksjon (Figur 4.3.2-1). Det ble observert større grad av kjededannelse for begge, sammenlignet med mikroskopering av utgangsstammen MG3 (Figur 4.1-2). Det var muligens en effekt på cellemorfologien grunnet depleksjon av *pbp2b^{LA}* ved komprimerte celler slik at den native elongerte celleformen var mer linseformet, men det var derimot ikke en tydelig endring. Basert på at cellene fikk en signifikant reduksjon i vekstrate ved depleksjon av *pbp2b^{LA}* (Figur 4.3.2-1) bekrefter dette at ComRS-systemet har blitt etablert og kan brukes som et gendepleksjonssystem i denne genetiske bakgrunnen.

Resultater



Figur 4.3.2 -1 Depleksjon av *pbp2b^{LA}* i klinisk penicillinresistent isolat (MG22). Figuren viser depleksjon av *pbp2b^{LA}* ved fortynning av ComS i kulturen i to paralleller med ulike ComS-konsentrasjoner. **a)** Positiv kontroll med 0,2 μM ComS tilsatt bakteriekulturen. **b)** Depleksjon av *pbp2b^{LA}* uten ekstracellulært ComS i bakteriekulturen, men pre dyrket i 0,2 μM ComS før resuspendert i C-medium uten ComS og fortynnet i en 2-fold-fortynningsrekke. **c)** Positiv kontroll med 0,05 μM ComS tilsatt bakteriekulturen. **d)** Depleksjon av *pbp2b^{LA}* uten ekstracellulært ComS i bakteriekulturen, men pre dyrket i 0,05 μM ComS før resuspendert i C-medium uten ComS og fortynnet i en 2-fold-fortynningsrekke. ♦ Mikroskopibilder av bakteriekultur med 16-fold fortynningsgrad. Vekstkurver viser tid i timer på X-aksen og serier er fortynningsgrad i en 2-fold-fortynningsrekke som begynner på 2-fold. ▲ Mikroskopibilde av bakteriekultur dyrket opp i 0,05 μM ComS før resuspendert i C-medium uten ComS og fortynnet 16 ganger. Bakteriekulturer ble høstet fra plateleser under depleksjonseksperiment etter inkubering ved 37 °C i 4,5 timer. Mikroskopibilder ble behandlet i Fiji ImageJ, og ble beskåret og satt på målestokk på 5 μm.

4.4 Cellevegganalyse av penicillinresistent isolat som overuttrykker *pbp2b^{LA}*

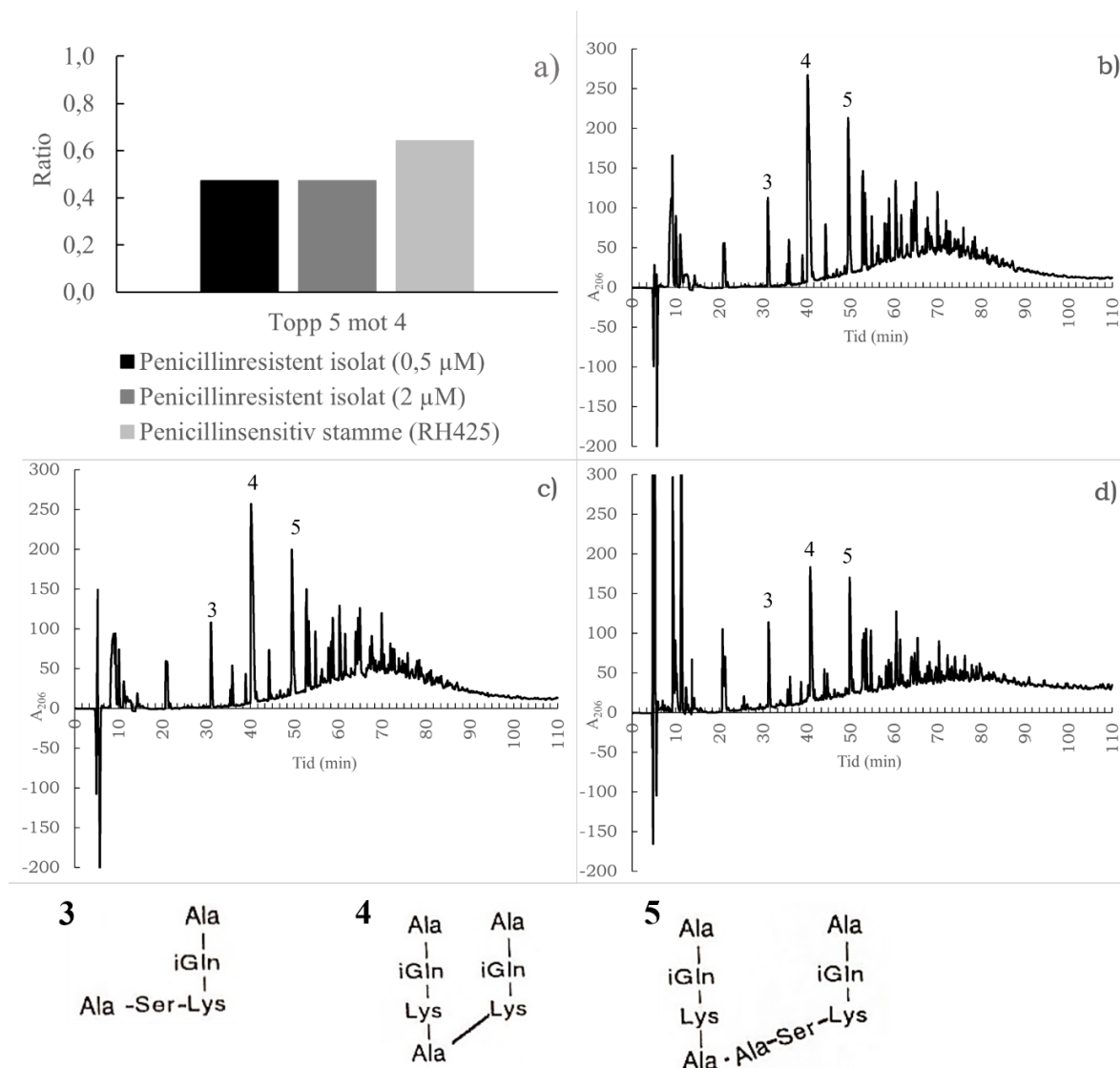
Ettersom det var utfordrende med substitusjon av *pbp2x^{LA}*, *pbp2b^{LA}* og *pbp1a^{LA}* til høyaffinitetsalleler, ble det valgt å undersøke nærmere sammenhengen mellom ekspresjonen av *pbp2b^{LA}* og mengden indirekte krysslinking i peptidoglykanet i det kliniske isolatet. Upubliserte resultater i Molekylær Mikrobiologi-gruppen ved NMBU har vist en sammenheng mellom PBP2b^{LA} og økt mengde indirekte krysslinking i celleveggen. I tillegg økte andelen forgreinede stempeptider ved depleksjon av *pbp2b* i en penicillinsensitiv pneumokokk R6 sammenlignet med normalekspresjon (53). Tatt i betraktning at evnen til å syntetisere cellevegg med indirekte krysslinkinger er essensielt for penicillinresistens hos mange isolater (35,47,49–52), ønsket vi å studere linken mellom PBP2b^{LA} og indirekte peptid-krysslinker nærmere. Vil nivået av PBP2b^{LA} påvirke mengden indirekte peptid-krysslinker i celleveggen til en allerede penicillinresistent pneumokokk? På grunnlag av dette ble *pbp2b^{LA}*-depleksjonsmutanten (MG22) benyttet for å undersøke effekten av overuttrykk og depleksjon av *pbp2b^{LA}* i det kliniske isolatet for celleveggkomposisjonen.

Cellevegganalysen ble utført ved å isolere cellevegg fra bakteriekulturer med enten overuttrykk (sluttkonsentrasjon på 2 µM ComS), et tilnærmet normaluttrykk (sluttkonsentrasjon på 0,5 µM ComS) og depleksjon av *pbp2b^{LA}* (16-fold fortykning av celler pre dyrket i 0,05 µM ComS vist med rødt i Vedlegg B). Den isolerte celleveggen ble analysert ved bruk av revers fase-HPLC hvor komposisjonen av stempeptider mellom prøvene ble sammenlignet. På denne måten kan det undersøkes om *pbp2b^{LA}* foretrekker økt mengde forgreinede stempeptider eller lineære stempeptider som substrat for transpeptidering. Det var utfordrende å isolere cellevegg fra depleksjonsprøven, og stempeptidkomposisjonen ble derfor ikke generert ved hjelp av revers fase-HPLC. Det ble derimot isolert cellevegg fra kulturen med overuttrykk (2 µM) og «normaluttrykk» (0,5 µM), og stempeptidkomposisjonen til disse celleveggprøvene ble analysert ved hjelp av HPLC (Figur 4.4-1).

Stempeptidkomposisjonen mellom «normaluttrykk» (0,5 µM, Figur 4.4-1b) og overuttrykk (2 µM, Figur 4.4-1c) viser ingen tydelige forskjeller, både i toppene (mengden av gitt stempeptid) og den generelle profilen. Dette tyder på at overuttrykk av *pbp2b^{LA}* ikke påvirker mengden indirekte krysslinking i peptidoglykanet i det kliniske isolatet. Som en kontroll ble stempeptidkomposisjonene fra isolatet (MG22, Figur 4.4-1b og c) sammenlignet med stempeptidkomposisjonen fra en penicillinsensitiv laborierstamme (RH425, Figur 4.4-1d). Stempeptidkomposisjonen til det penicillinresistente kliniske isolatet (MG22) har høy likhet i

Resultater

toppene og den generelle profilen til den penicillinsensitive laboriøstammen (RH425). Ved beregning av ratio av arealet mellom toppene som representerer lineære stempeptider (topp 4) og forgreinende stempeptider (topp 5) ved overuttrykk av *pbp2b^{LA}*, var det ingen tydelige forskjeller i relativ mengde indirekte krysslinking i cellevegg til MG22 som overuttrykte PBP2b^{LA} (Figur 4.4-1a). Dette tyder også på at mengden indirekte krysslinkinger ikke økte ved overekspressjon av *pbp2b^{LA}*. Ratioen mellom indirekte og direkte krysslinking hos det resistente MG22 isolatet var relativt lik ratioen beregnet for laboriøstammen (RH425). Likevel må det for alle beregnede ratioverdier bli tatt hensyn til en usikkerhet i målingen av areal for toppene.



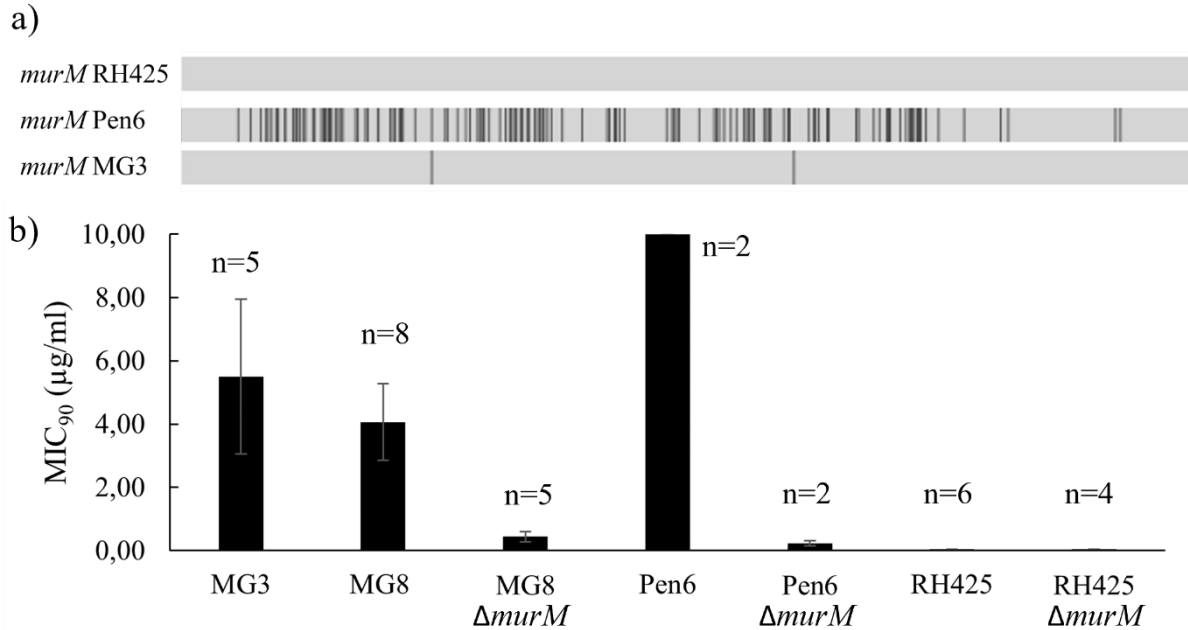
Figur 4.4-1 Stempeptidkomposisjon av peptidoglykanet fra penicillinresistent klinisk isolat ved ulike mengder uttrykt lavaffinitets-PBP2b, og av penicillinsensitiv laboriøstamme (RH425). **a)** Ratio av areal mellom topper fra kromatogrammer i samme figur. Ratio er vist på Y-aksen, og rådata for målt areal av topper er vist i vedlegg D. **b)** Klinisk isolat (MG22) med tilnærmet normaluttrykk av *pbp2b^{LA}* induisert ved 0,5 µM ComS. **c)** Klinisk isolat (MG22) med overuttrykk av *pbp2b^{LA}* induisert ved 2 µM ComS. **d)** Penicillinsensitiv laboriøstamme (RH425), hvorav rådata er hentet med tillatelse fra masteroppgave av Silje Henriette Aadne. Foreslått peptidstruktur basert på massespektrometrianalyse av Berg et al. i 2013 er vist for topper 1,3,4 og 5 (53). Figur b), c) og d) viser kromatogrammer med absorbans ved 206 nm på Y-aksen og tid i minutter på X-aksen.

4.5 MurM og forgreinede lipid II-molekyler sin effekt på penicillins affinitet til PBPer

Penicillin er en strukturell analog av substratet D-Ala-D-Ala til transpeptiderings-domenet hos PBPer (35,41,42). Det er derfor et paradoks at lavaffinitets-PBPer kan utføre transpeptidering med D-Ala-D-Ala som substrat samtidig som de har lavere affinitet for penicillin. En hypotese er at en andel lavaffinitets-PBPer har høyere enn normal affinitet for lipid II med forgreinede stempeptider, og at forgreinet lipid II dermed utkonkurrer penicillin i binding til PBPer (35,50,54). Ligasen MurM katalyserer addisjon av den førte aminosyren serin eller alanin til lysinresiduen i peptidkjeden på forgreinede, og er derfor også ansvarlig for indirekte krysslinking i peptidoglykanet (34,50). Viktigheten av forgreinede stempeptider for resistens mot penicillin er vist i flere penicillinresistente isolater som mister resistensen når *murM* deleteres (35,47,49–52). I tillegg er det også observert en mutert *murM* som koder for en overaktiv versjon av MurM i resistente stammer (35,47–49,51).

Det var derfor av interesse å undersøke om penicillinresistens hos det kliniske isolatet også var avhengig av MurM. Hvis resistensen reduseres i fravær av *murM*, var det ønsket å utnytte denne mutanten til å teste om noen av lavaffinitets-PBPer fikk høyere affinitet for penicillin når de ikke hadde tilgang på forgreinede lipid II som substrat. Det fluorescerende penicillinet bocillin FL ble brukt til dette formålet. Først ble MurM i det kliniske isolatet sammenlignet med MurM i en penicillinsensitiv laboriostamme (RH425), og en penicillinresistent stamme (Pen6) som uttrykker *murM* med høy andel mutasjoner som gir økt resistens og indirekte krysslinking av peptidoglykanet (49,50). Det kliniske isolatet hadde en MurM-versjon nesten identisk til den penicillinsensitive stammen (RH425) (Figur 4.5-1a). Det var to nukleotidmutasjoner i *murM* i det kliniske isolatet sammenstilt mot laboriostammen (RH425), hvorav en var en stille mutasjon og den andre førte til aminosyresubstitusjon V101A (vedlegg C). For å verifisere at en tilnærmet normal versjon av MurM var viktig for resistensen i det kliniske isolatet, ble MIC₉₀ analysert i en mutant hvor *murM* ble deletert med Janus-kassetten. Resultatet viste at resistensen ble redusert betydelig ved tap av MurM i det kliniske isolatet (Figur 4.5-1b). Dette eksperimentet indikerer dermed at en tilnærmet normal MurM er viktig for penicillinresistens også i det kliniske isolatet.

Resultater



Figur 4.5-1 Sekvenssammenstilling av DNA-sekvensen av *murM* mellom penicillinsensitive RH425, penicillinresistens Pen6 og klinisk isolat MG3, samt MIC₉₀ for utgangsstammer og *murM*-mutanter. a) Sekvenssammenstilling av *murM* fra stamme RH452, Pen6 og MG3, hvor svarte horisontale streker indikerer mutasjon i nukleotidsekvensen sammenstilt mot stamme RH425, grå heldekkende farge betyr identisk nukleotidsekvenser. Sekvenser er sammenstilt i Benchling. b) Gjennomsnittlig MIC₉₀ for utgangsstammer og respektive *murM*-mutanter. Y-aksen viser MIC₉₀ verdi i verdi i µg/ml. Hver stolpe er markert med antall parallelle (n) og standardavvik.

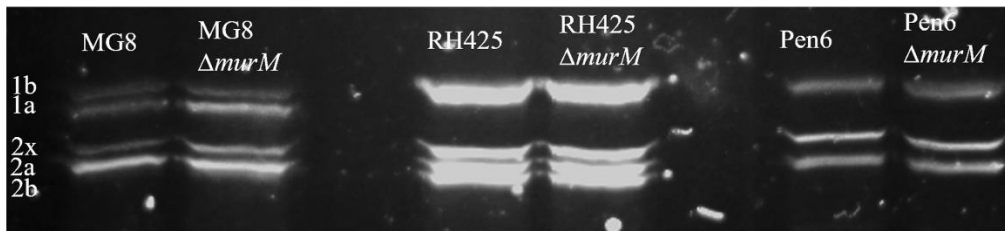
Ettersom MurM og dermed forgreinede stempeptider som gir indirekte krysslanking er viktig for penicillinresistensen i det kliniske isolatet og Pen6, ble det valgt å undersøke om det er mulig å visualisere forskjeller i affinitet mellom penicillin og klasse A og B PBPer, ved delesjon av *murM*. Dette ble visualisert ved å merke PBPer med bocillin FL. Det er et penicillin konjugert til et fluorescerende molekyl, slik at PBPer med affinitet til penicillin separert ved bruk av SDS-PAGE kan visualiseres ved å eksitere bocillin FL med lys på ~530 nm. Standard protokoll for å merke PBPer med bocillin FL er å lysere cellene før innmerking, men i denne oppgaven var det ønsket å undersøke om noen av lavaffinitets-PBPene fikk høyere affinitet for penicillin når bakterien ikke uttrykker MurM (PBPene har bare tilgang på lineære lipid II-molekyler). Siden MIC₉₀ blir drastisk redusert i mutanter som mangler MurM, kan det tyde på at en eller flere av PBPene får høyere affinitet for penicillin. PBPer ble derfor merket med bocillin FL i intakte celler hvor de fortsatt er del av celleveggsyntesemaskineriet og bruker lipid II, samt i cellelysat som en kontroll. Dette ble utført på det kliniske isolatet og videre sammenlignet med sensitiv laborierstamme (RH425) for å visualisere binding av bocillin FL til høyaffinitets-PBPer, og resistent stamme (Pen6) hvor MurM var viktig for resistensen som en kontroll på at eventuelle forskjeller ikke var stammespesifikt (Figur 4.5-2a og b).

Resultater

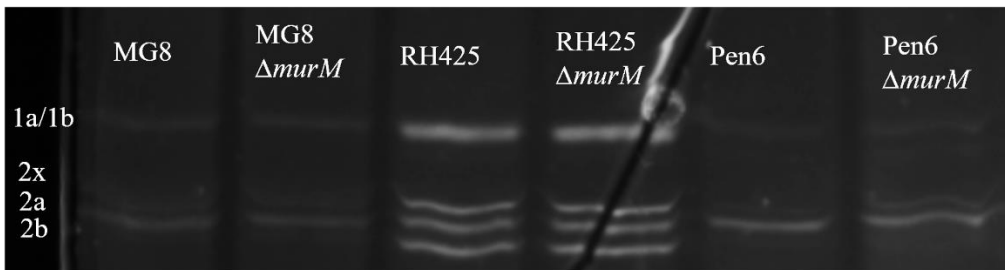
Ved merking av PBPer både i intakte celler og cellelysat ble det visualisert en generelt lavere affinitet mellom bocillin FL og PBPer i prøvene med isolater og den resistente stammen, sammenlignet med den sensitive stammen (Figur 4.5-2a og b). Generelt ble det ikke observert noen drastisk endring i affiniteten mellom penicillin og PBPer ved fravær av MurM, til tross for en betydelig reduksjon i resistens. Det ble likevel observert økt intensiteten for båndene som representerer PBP2x og PBP1a i $\Delta murM$ -mutanten av isolatet da hele celler ble behandlet med bocillin (Figur 4.5-2a). Siden en intern tilsetningskontroll mangler i forsøksoppsettet, ble PBP2a benyttet som en kontroll for hver prøve da den ikke er viktig for penicillinresistens og i teorien skal binde like mye bocillin i alle prøver. Fluorescens for PBP2x- og PBP1a-båndene ble derfor analysert relativt mot fluorescens til PBP2a-båndet for samme prøve (Figur 4.5-2c). Ratioen mellom PBP1a og PBP2a indikerte ingen signifikant økning av bocillinbinding til PBP1a i $\Delta murM$ -mutanten for det kliniske isolatet (Figur 4.5-2c). For PBP2x derimot så det ut som mer bocillin bandt til proteinet i $\Delta murM$ -mutanten (Figur 4.5-2c). Denne forskjellen ble derimot ikke observert for stamme Pen6. Bånd for PBP1a kan ikke visualiseres på gelen for sistnevnte, men om det er manglede separasjon som er årsaken er det derimot forventet at båndet PBP1a/PBP1b hadde høyere intensitet om en forskjell i affinitet er til stede.

Resultater

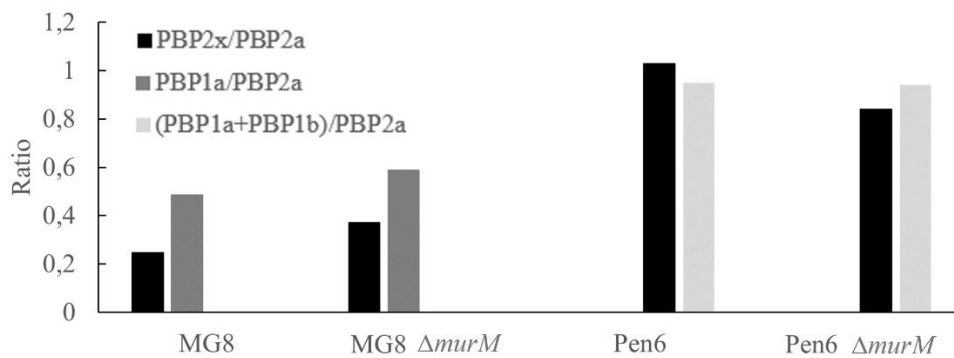
a) Merking av PBPer i intakte celler



b) Merking av PBPer i cellelysatsat



c) Ratio av intensitet av fluorescens mellom PBPer



Figur 4.5-2 Sammenligning av affinitet mellom bocillin FL og PBPer ved delesjon av *murM*. PBPer ble merket med bocillin FL, separert på SDS-PAGE og fluorescens visualisert med Azure Biosystems c400 med eksponering av cy3 fluorescens. Bånd for PBP1b, PBP1a, PBP2x, PBP2a og PBP2b er indikert, samt prøver av klinisk isolat (MG8) og *murM*-mutanten (MG16), penicillinsensitiv laboriestedamme (RH425) og *murM*-mutanten (RSG66) og penicillinresistent laboriestedamme (Pen6) og *murM*-mutanten (RSG183). **a)** Merking av PBPer i intakte celler. **b)** Merking av PBPer i cellelysatsat. **c)** Beregnet ratio av intensitet av fluorescens mellom utvalgte PBPer og PBP2a for sammenligning mellom klinisk isolat (MG8) og *murM*-mutant (MG16), og mellom resistant stamme (Pen6) og *murM*-mutant (RSG183). X-aksen viser ratio, og rådata for målt intensitet av fluorescens er vist i vedlegg E.

5. Diskusjon

Et fremtidig mål med dette arbeidet var å undersøke om et klinisk penicillinresistent isolat som uttrykker høy-affinitets-PBPer fortsatt har høyere toleranse for penicillin enn en sensitiv laboriestamme. Siden både *pbp2x* og *pbp2b* er essensielle gener, var det nødvendig å etablere et genekspressjonssystem i et resistent isolat som muliggjorde ektopisk genekspressjon. Hensikten med denne studien var å undersøke determinanter for penicillinresistens i pneumokokker ved bruk av et gendeplesjonssystem i et resistent klinisk isolat. Et kliniske isolat har tilegnet seg determinanter for penicillinresistens i en naturlig setting, og er derfor egnet for å oppdage ytterligere determinanter utenom de anerkjente lavaffinitets-PBPene, PBP2x, PBP2b og PBP1a. Enten mutasjoner som bidrar til penicillinresistens, eller mutasjoner som kompenserer for tilegnelsen av lavaffinitets-PBPene, som er mindre effektive enzymer sammenlignet med de native PBPene. Disse determinantene kan benyttes som ytterligere angrepsmål i tillegg til PBPene for å forbedre behandling av infeksjoner forårsaket av resistente pneumokokker.

5.1 Etablering av Janus- og ComRS-systemene i penicillinresistent klinisk pneumokokkisolat

For å velge et kliniske isolat som var best egnet til å etablere Janus- og ComRS-systemene i, ble et utvalgt kliniske isolater først testet for resistensnivå mot penicillin og transformasjonsevne. Isolat MG3 ble valgt for videre eksperimenter grunnet høyest resistensnivå og fordi den var blant de med best transformasjonsevne (Figur 4.1-1). For å redusere virulens før ComRS-systemet implementeres, ble genene som koder for kapselproduserende enzymer deletert i isolatet. Dette førte til en noe redusert MIC₉₀ for penicillin G og bakterievekst i form av lavere maksimum OD₅₅₀ som må tas hensyn til ved tolkning av senere resultater (Figur 4.1-2).

Innsettingen av de genetiske elementene nødvendig for ComRS-systemet (Figur 4.2-1), var utfordrende i det kliniske isolatet. Det krevdes forsøk med to ulike lokus for hvert element ($P_1:P_{comR}:comR$ og P_{comX}), med varierende antall transformanter oppnådd for hver transformasjon. Dette peker mot en lokusavhengig transformasjonsevne i isolatet, hvor antall transformanter er mye bestemt av hvilket lokus som ble benyttet for transformasjonen. Ved valg av lokus for promotoren P_{comX} var det særlig viktig at hadde høy transformasjonsevne, ettersom lokuset skal benyttes for transformasjoner ved senere eksperimenter. Selv om det ble oppnådd

Diskusjon

et fåtall transformanter etter flere forsøk ved innsetting av P_{comX} i lokus nedstrøms for *aliA*, ble det likevel valgt å endre lokus fra *aliA* til å erstatte IS-elementet *ISspn11* oppstrøms *licT*. Det var ønsket høyere transformasjonsevne, og det ble oppnådd ved det nye lokuset. Et funksjonelt ComRS-system ble bekreftet med deplesjon av *pbp2b^{LA}* (Figur 4.3.2-1), og førte ikke til betydelige endringer i MIC₉₀ eller bakterievekst (Vedlegg A). Det vil si at MIC₉₀ ble noe redusert fra utgangsstammen (MG3, 5,5 µg/ml mot MG17, 5 µg/ml), men målt til noe høyere enn isolat uten kapselgener (MG8, 4,06 µg/ml mot MG17, 5µg/ml). Det tyder derfor på noe usikkerhet i målingene, men trolig er effekten av ComRS-systemet mye på grunn av påvirkningen delesjon av kapselgener hadde på vekst og penicillintoleransen (Vedlegg A).

5.1.1 Substitusjon av lavaffinitets-PBP2x og -PBP2b til korresponderende høyaffinitetsversjoner i et klinisk isolat

Det ble valgt å substituere de native *pbp*-genene som koder for lavaffinitets-PBPer i isolatet med gener som koder for høyaffinitets-PBPer fra en penicillinsensitiv laborierstamme (RH425) ved bruk av ComRS-systemet. En sammenstilling av DNA-sekvensen av *pbp2x*, *pbp2b* og *pbp1a* fra isolatet og den laborierstammen (RH425) viste høy andel mutasjoner i isolatet sammenlignet med laborierstammen (Figur 4.3-1). I tillegg var transpeptidase-domenene muterte for alle tre sekvensene (Figur 4.3-1), noe som sannsynligvis er årsaken til at de har lavere affiniteten til penicillin. Fremgangsmåten for å substituere *pbp2x* og *pbp2b* var å benytte ComRS-systemet i en firetrinns transformasjonsprosess med Janus-kassetten som beskrevet i kapittel 3.9. For substitusjon av *pbp1a* var det derimot kun nødvendig å bruke Janus-kassetten direkte, siden genet ikke er essensielt for cellen. For substitusjon av *pbp2x^{LA}* ble kun transformanter for første transformasjon oppnådd, som betyr ektopisk ekspresjon av *pbp2x^{LA}*, men native gen fremdeles intakt. For substitusjon av *pbp1a* ble kun delesjon av *pbp1a^{LA}* med Janus-kassetten utført. For substitusjon av *pbp2b^{LA}* ble det oppnådd en mutant som uttrykte *pbp2b^{LA}* ektopisk bak P_{comX} og hvor den native kopien av *pbp2b^{LA}* var deletert med Janus-kassetten

Den tredje transformasjonen, det vil si innsetting av *pbp2b^{HA}* i det native lokuset i denne mutant, ble forsøkt ved flere metoder uten å lykkes. Dette indikerte at cellen ikke aksepterte å uttrykke to ulike alleler av *pbp2b* på samme tid, hvorav i dette forsøket var det *pbp2b^{LA}* ektopisk uttrykt og *pbp2b^{HA}* uttrykt nativt. Denne observasjonen stemmer overens med tidligere erfaringer i molekylær mikrobiologigruppen, hvor forsøk på å systematisk innføre lavaffinitets-PBPer i en penicillinsensitiv *S. pneumoniae* resulterte i liknende utfordringer

Diskusjon

(upublisert data). Årsaken til at to ulike alleler av samme PBP2b er toksisk i pneumokokker er ukjent. Protein-protein interaksjonsstudier har vist at PBP2b kan danne homo-dimerer (92), og kan derfor bety at å uttrykke en annen versjon av PBP2b forstyrrer dannelsen av homodimerer. For eksempel ved at det dannes heterodimerer bestående av to ulike versjoner av PBP2b. Det kan tenkes at en slik hetero-dimerer er mindre funksjonelle eller ikke kompatible med interaksjon til RodA. Bakterien vil derfor ikke lage en funksjonell cellevegg, som igjen fører til celledød. Hvis hypotesen om at det er toksisk for bakterien å uttrykke to ulike alleler av samme *pbp2b*-gen er riktig, er det en hårfin balanse å finne den korrekte ComS-konsentrasjonen for at cellen aksepterer transformasjonen. Det må være såpass lite ComS, både intra- og ekstracellulært, slik at ektopisk ekspresjonen av *pbp2b^{LA}* er lav nok til at cellen aksepterer uttrykk av *pbp2b^{HA}* i nativt lokus etter transformasjon. Samtidig må ekspresjonen av *pbp2b^{LA}*, det vil si ComS-konsentrasjonen, være høy nok slik at cellen overlever og kan indusere kompetanse for naturlig transformasjon.

I denne studien ble det forsøkt fire ulike metoder for å justere ComS-konsentrasjonen, både den intracellulære og den ekstracellulære. Kort oppsummert ble det forsøkt (i) en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M ComS i C-mediet og på TH-platen, (ii) en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M kun i C-mediet og ComS-fri TH-plate, (iii) oppdyrking av bakteriekulturen i en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M i C-mediet og deretter resuspendere i C-medium uten ComS en time etter inkubering med CSP-1 og DNA, (iv) og til slutt oppdyrking av bakteriekultur i en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M ComS og deretter inkubering med CSP-1 og DNA i ComS-fritt C-medium. I litteratur om kompetanse for naturlig transformasjon i pneumokokker er maksimum ekspresjon av ComE-regulerte gener (dvs. tidlige kompetansegener) målt til tre minutter etter tilsetning av CSP, og ComX-regulerte gener (dvs. sene kompetansegener) målt til 10 minutter etter tilsetning av CSP (57). Det betyr at ideelt sett om cellen ikke aksepterer to ulike alleler av *pbp2b*, burde den ektopiske ekspresjonen av *pbp2b^{LA}* være omtrent fullstendig redusert 10 minutter etter CSP-1 ble tilsatt kulturen. Dette fordi 10 minutter etter tilsetning av CSP, er *pbp2b^{HA}* i det native lokuset teoretisk sett inkorporert og uttrykt, slik at det ektopiske uttrykket av *pbp2b^{LA}* burde være avskrudd. Sammenlignet med depleksjon av *pbp2b^{LA}* (Figur 4.3.2-1b) hvor bakteriekulturen var dyrket opp i C-medium med en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M ComS og deretter 2-fold fortykning i ComS-fritt medium, ble det observert relativt høy ektopisk ekspresjon av *pbp2b^{LA}* selv ved den laveste fortykningen. Det betyr at metodene forsøkt i denne studien ikke var tilstrekkelig for å redusere den ektopiske ekspresjonen av PBP2b^{LA} til at

Diskusjon

bakterien aksepterte en kopi av *pbp2b^{HA}* i nativt *pbp2b*-lokus, og kan forklare hvorfor den tredje transformasjonen ikke oppnådde transformanter.

Det er tidligere utført substitusjon av høyaffinitets-PBP2x til lavaffinitets-PBP2x fra *Streptococcus mitis* B6 ved hjelp av ComRS-systemet i en pneumokokkstamme (36). Det betyr at å endre *pbp*-gener til et annet allel ved å bruke ComRS-systemet skal være mulig å utføre, men at metodene som ble benyttet i denne studien må justeres. Eventuelt kan innsetting av *pbp2b^{HA}* i stedet for *pbp2b^{LA}* før delesjon av native *pbp2b^{LA}* være en løsning. For så å justere den ektopisk ekspresjon av *pbp2b^{HA}* nedstrøms P_{comX} basert på litteratur om kompetanse ved tidspunktet da delesjon av native *pbp2b^{LA}* skal skje. Alternativt, er det mulig å prøve en femtrinns transformasjonsprosess i stedet for firetrinns som ble forsøkt i dette eksperimentet. Da kan *pbp2b^{LA}* nedstrøms P_{comX} erstattes med *pbp2b^{HA}*, før *pbp2b^{HA}* transformeres inn i det native lokuset. På denne måten unngås to ulike alleler i cellen på samme tid. Både ved at cellen uttrykker PBP2b^{LA} både ektopisk og nativt ved delesjon av native *pbp2b^{LA}*-gen, og at ved innsetting av *pbp2b^{HA}* i det native lokuset uttrykker cellen kun PBP2b^{HA} både ektopisk og nativt.

Hvis en av de alternative fremgangsmåtene beskrevet over gjør det mulig å bytte ut PBP2b^{LA}, PBP2x^{LA} og PBP1a^{LA} med høy-affinitetsversjoner i det penicillinresistente isolatet, kan det måles om det er resterende penicillinresistens igjen etter alle de tre PBPene er endret til høyaffinitetsalleler. Hvis dette er tilfellet, kan det ved bruk av helgenomsekvensering utforskes hvilke mutasjoner som kan være bidragsyter til penicillinresistens utenom PBP2x, PBP2b og PBP1a. Eller studere om det er andre mutasjon i genomet som har oppstått som en kompensasjon for redusert «fitness» på grunn av tilegnelsen av lavaffinitets-PBPer, som trolig er mindre effektive enzymer.

5.1.2 Depleksjon av *pbp2b^{LA}* ved hjelp av ComRS-systemet i klinisk isolat

For å verifisere at ComRS-systemet var funksjonelt i det kliniske isolatet, ble det depleksjon av ektopisk *pbp2b^{LA}* ved å fjerne ComS-induser fra vekstmediet. Hvis ComRS-systemet var funksjonelt, var det forventet at cellene vil få redusert vekst og elongering (53). Sammenlignet med ComS-induserte celler, ble det observert redusert maksimum OD₅₅₀ og redusert vekstrate for PBP2b^{LA}-depletede celler. (Figur 4.3.2-1). Dette viste at depleksjon av *pbp2b^{LA}* var vellykket. Likevel, sammenlignet med depleksjon av *pbp2b* utført av Berg et al. i 2013 viste det eksperimentet en større effekt som følge av *pbp2b*-depleksjon (53). Både ved at maksimum bakterievekst reduserte og forsinkelsen av bakterievekst økte over fortyningene av

Diskusjon

intracellulært ComS, og ved tydelig endring i cellemorfologien av celler med deplesjon *pbp2b* ved mikroskopering (53). Cellemorfologien av celler med mindre PBP2b var forventet å observere lengre kjeder og komprimerte celler mer linseformet enn elongerte celler, fordi PBP2b katalyserer den perifere peptidoglykansyntesen (35,53). Det ble kun observert antydninger til denne effekten på cellemorfologien i dette eksperimentet. Muligens ble bakteriekulturene som ble mikroskopert i dette eksperimentet, høstet fra fortyninger med for lite PBP2b-deplesjon. Om det ble mikroskopert bakterier fra en mer fortynt kultur ved et senere tidspunkt kunne muligens den samme effekten blitt observert i isolatet også.

En annen årsak til at PBP2b^{LA}-deplesjon i det kliniske isolatet ikke førte til like dramatiske fenotypiske forandringer tilsvarende det som har blitt observert tidligere, kan skyldes såkalt transkripsjonell lekkasje fra P_{comX}-promotoren. Dette kan bety at cellen kan overleve med lave mengder PBP2b i cellen. En måte å redusere lekkasjen av PBP2b^{LA}-uttrykk er å mutere Shine-Dalgarno-sekvensen som utgjør det ribosomale bindesete i P_{comX}-promotoren(93). Shine-Dalgarno-sekvensen ligger 4-13 baser oppstrøms startkodon på mRNA og fungerer som bindingssete for ribosomer under translasjonsinitiering (93). Når denne sekvensen er optimal for binding med ribosomer, vil flere ribosomer klare å initiere translasjon enn hvis denne sekvensen er sub-optimal. I stammen benyttet for deplesjon (MG22) er Shine-Dalgarno-sekvensen som følger 5'-TGGAGGT-3' (konsensus, 5'-AGGAGG-3' (93)), som i utgangspunktet er en effektiv promotor for bakterien *in vivo*. Derimot er denne promotoren for effektiv for å kontrollere ekspresjonen ektopisk, og for å redusere ekspresjonen fullstendig. Løsningen er derfor å innføre en nukleotidsubstitusjon i sekvensen som reduserer effektiviteten nok til å oppnå tilstrekkelig kontroll. Dette ble utført av Berg et al. i 2013 med sekvensen 5'-TCGAGGT-3' (53). Om denne sekvensen ble benyttet i stedet, har det trolig blitt oppnådd en bedre deplesjon av *pbp2b*^{LA}.

Fra eksperiment med deplesjon av *pbp2b*^{LA} var det særlig en uventet effekt. Ved alle fortyningene hvor cellene ble depleted for PBP2b^{LA} (Figur 4.3.2-1b,c,d) var det en drastisk reduksjon i veksthastigheten ved OD₅₅₀ 0,25-0,3, som varte i omtrent 30 minutter før vekstraten tiltok. Det betyr potensielt at lav ekspresjon av *pbp2b* ved en gitt celledensitet gir en effekt på cellen som igjen øker tilpasningsevnen som kompensasjon for mindre PBP2b i cellen. Det er ukjent hva som er årsaken og det ble ikke analysert videre i denne studien, men diskuteres videre.

Det ble spekulert i om årsaken kan være selvindusering av kompetanse for naturlig transformasjon. Dette krever ekstra energi som kan gi redusert vekstrate. I tillegg vil kompetente pneumokokker uttrykke fratricinet CbpD som lyserer ikke-kompetente nære

Diskusjon

slektninger (64). Det er vist at PBP2b-depletede pneumokokker er hypersensitive mot sin egen CbpD, selv om de uttrykker CbpD-immunitetsproteinet ComM (92). Den synkrone reduksjonen i celledetthet som ble observert ved $OD_{550} = 0,25-0,3$, kan derfor skyldes et resultat av CbpD-produksjon. Deplesjon påfører gjerne cellen stress, hvorav kompetanse er en stressrespons og kan gi beskyttelse for cellen (57,60). Dette kan utelukkes ved delesjon av *comAB*, som koder for transporteren av CSP, og dermed kan ikke cellen inducere kompetanse uten denne transporteren (61). Det ble forsøkt delesjon av *comAB* med et gen som koder for erythromycinresistens, men transformanter kunne ikke selekteres da isolatet allerede var resistent mot erythromycin.

En annen årsak kan være at det har oppstått supressormutasjoner som kompensasjon for mindre PBP2b. Eksempelvis reduseres behovet for PBP2b i cellen, ved mutasjoner i *eloR* som fører til inaktivering av proteinet EloR (94). Denne forklaringen er dog mindre sannsynlig siden den transiente reduksjonen i vekst oppstod ved eksakt samme celledetthet for alle PBP2b^{LA}-depletede kulturer. For å utelukke om supressormutasjoner er årsaken er det nødvendig med helgenomsekvensering. Helgenomsekvensering vil også detektere om det er andre mutasjoner som er årsaken at cellen tilpasses den lavere mengden PBP2b. For eksempel kan det være mutasjoner i *comR* fra ComRS-systemet, som fører til konstitutivt uttrykk av ComR og dermed også av *pbp2b^{LA}*.

5.2 Stempeptidkomposisjonen i celleveggen til penicillinresistent klinisk isolat

PBP2b^{LA} er antageligvis et mindre effektivt enzym enn PBP2b^{HA} grunnet endringer i det aktive setet, som gir enzymet lavere affinitet for sitt substrat og derav en mindre effektiv transpeptidase. Likevel kan celler med lavaffinitets-PBP2b utføre transpeptidering som normalt selv om affiniteten til penicillin, som er en analog til substratet for transpeptidering, svekkes. Som nevnt er en hypotese at lavaffinitets-PBP2b har høyere affinitet for forgreinede stempeptider enn lineære stempeptider, som dermed utkonkurrer penicillin i binding til PBP2b (35,50,54). En alternativ hypotese er at krysskoblede muropeptider har en ukjent rolle i peptidoglykansyntesen, som er viktig for bakterien når det er penicillin til stede, slik at tilgang på kun lineære muropeptider forhindrer celledeling ved eksponering for penicillin (49). For å støtte disse hypotesene, var det derfor forventet at isolatet med lavaffinitets-PBP2b hadde en høyere andel indirekte kryssligninger enn direkte kryssligninger i celleveggen, sammenlignet med en penicillinsensitiv laboriestamme med høyaffinitets-PBP2b. I tillegg var det forventet at andelen indirekte kryssligninger økte ved høyere uttrykk av lavaffinitets-PBP2b.

Diskusjon

Det ble derfor utført analyse av stempeptidkomposisjonen i cellevegg fra isolatet ved ulike uttrykk av *pbp2b^{LA}*, og sammenlignet med stempeptidkomposisjonen i celleveggen fra penicillinsensitiv laboratoriestamme (RH425) (Figur 4.4-1).

Det ble utført analyse av stempeptidkomposisjonen i det kliniske isolatet ved induksjon av ekspresjon av *pbp2b^{LA}* ved tilnærmet normaluttrykk (0,5 μ M ComS), overuttrykk (2 μ M ComS), samt deplesjon («0» μ M ComS) av *pbp2b^{LA}* ved å fortynne kulturen 16 ganger i ComS-fritt C-medium etter oppdyrking i 0,05 μ M ComS. Det ble kun generert resultater av stempeptidkomposisjonen for celler dyrket i medium med 0,5 μ M og 2 μ M ComS (Figur 4.4-1b, c). Dette fordi det ble isolert cellevegg fra deplesjonsprøven under deteksjonsgrensen for HPLC, som trolig er på grunn av at cellene ble høstet ved en lavere OD₅₅₀ for å unngå denne tidligere nevnte reduksjonen i veksthastigheten (Figur 4.3.2-1). Ved sammenligning av komposisjonen av prøver med 0,5 μ M og 2 μ M ComS tilsatt var det ingen betydelig forskjell i antall topper og deres retensjonstid (Figur 4.4-1b, c). Arealet av topp for direkte krysslinking (topp 4) og topp for indirekte krysslinking (topp 5) tydet heller ikke på noe forskjell mellom de to prøvene (Figur 4.4-1a). Det kan bety at ved høyere uttrykk av lavaffinitets-PBP2b i cellen øker ikke mengden indirekte krysslinkinger i peptidoglykanet, og antyder derfor at lavaffinitets-PBP2b ikke påvirker mengden indirekte krysslinkinger. Det er derimot tidligere vist at PBP2b påvirker mengden indirekte og direkte krysslinkinger ved at deplesjon av høyaffinitets-PBP2b fører til en relativ økning av indirekte krysslinkinger i celleveggen (53).

Hvorfor stempeptidkomposisjonen ikke ble endret ved overuttrykk av *pbp2b^{LA}* sammenlignet med «normaluttrykk», som er motstridende resultater sammenlignet med litteraturen, kan forklares med oppsettet av eksperimentet. I retrospekt ville det vært mer ideelt å endre ComS-konsentrasjonen for «normaluttrykk», da denne prøven trolig også har overuttrykk av *pbp2b^{LA}*. Fluorescerende merking av PBP2b med bocillin FL i en laboratoriestamme har vist at en sluttkonsentrasjon på 0,2 μ M ComS resulterer i overuttrykk av PBP2b sammenlignet med en stamme med nativ ekspresjon av PBP2b (53). Derfor har sannsynligvis *pbp2b^{LA}* også blitt overuttrykt i cellene som ble dyrket med 0,5 μ M ComS. Det betyr at de to stempeptidkomposisjonene sammenlignet fra isolatet (Figur 4.4-1b,c) var begge overuttrykk, og kan forklare hvorfor det ikke er forskjell mellom dem med hensyn på andelen indirekte krysslinkinger mot direkte krysslinkinger i peptidoglykanet. For å optimalisere oppsettet av eksperimentet har en analyse av hvilken ComS-konsentrasjon som gir normaluttrykk og overuttrykk av PBP2b i isolatet vært ideelt, da den ikke nødvendigvis er lik som laboratoriestammen henvist tidligere (53). For å analysere dette kunne ektopisk regulert PBP2b

Diskusjon

(fra stamme MG22) induisert med en gradient av ComS-konsentrasjoner merkes med bocillin FL, og sammenlignet mot utgangsstammen (MG3/MG8).

Videre ble stempeptidkomposisjonene av isolatet, men da begge prøvene trolig overuttrykk av *pbp2b^{LA}* (Figur 4.4-1b,c), sammenlignet med komposisjonen fra penicillinsensitiv laboratoriestamme (RH425, Figur 4.4-1d). Interessant nok var det ikke en høyere andel indirekte krysslinking eller store forskjeller i den generelle profilen ved overuttrykk av *pbp2b^{LA}* i det resistente isolatet enn i den sensitive stammen. Dette var ikke som forventet siden det i flere resistente stammer med lavaffinitets-PBPer er observert en høyere andel indirekte krysslinkinger enn direkte krysslinkinger (35,49,50).

Sett i lys av hypotesen om at forgreinede stempeptider utkonkurrere penicillin i binding med PBP2b, indikerer det faktum at overuttrykk av *pbp2b^{LA}* i isolatet har liknende stempeptidkomposisjon som en penicillinsensitiv stamme, at forgreinede stempeptider trolig ikke utkonkurrerer penicillin i binding med lavaffinitets-PBP2b. Likevel er ikke dette resultatet tilstrekkelig for å motbevise hypotesen, men gir heller en indikasjon i den retning. Ettersom det kun ble analysert celler med overuttrykk av *pbp2b^{LA}* og peptidoglykankomposisjonen trolig endres ved ulike uttrykk av denne PBPen, er det derfor fremdeles en mulighet for at depleksjon og normaluttrykk av lavaffinitets-PBP2b viser større forskjeller fra laboratoriestammen. Stempeptidkomposisjonen fra celler med depleksjon av *pbp2b^{LA}* har kunnet gi flere svar. Eksempelvis har en mindre andel forgreinede stempeptider kunne indikere at lavaffinitets-PBP2b foretrekker forgreinede stempeptider som substrat for transpeptidase. Følgelig endringer i det aktive bindesetet slik at det er høyere affinitet til forgreinede stempeptider som substrat for transpeptidering enn penicillin. Motsatt har det vært forventet at overuttrykk av *pbp2b^{LA}* ville ført til mer indirekte krysslinkinger, noe som ikke var tilfellet i dette eksperimentet.

5.3 MurM påvirker nivå av penicillinresistens, men trolig ikke affiniteten mellom PBPer og penicillin

Det faktum at lavaffinitets-PBPer kan utføre transpeptidering, tross lavere affinitet til substratanalogen penicillin er et paradoks som indikerer at det er andre faktorer som bidrar til penicillinresistens i pneumokokker (31). I flere resistente pneumokokker er det observert en mutert versjon av *murM*, som sørger for økt indirekte krysslinking i celleveggen (35,47,49,51). I tillegg har denne muterte versjonen vist seg å være viktig for penicillinresistens, ved at deleksjon av genet fører til betydelig redusert motstandsdyktighet mot penicillin (35,47,49–52).

Diskusjon

Det var derfor interessant å utforske om den samme effekten er vist i det kliniske isolatet som har en cellevegg med stempeptidkomposisjon lik en sensitiv pneumokokk. Det kan bety at MurM har potensiale som et ytterligere angrepsmål for å forbedre behandling med penicillin for pneumokokkinfeksjoner.

Ettersom indirekte krysslinkinger er mye forårsaket av ligasen MurM ble gensekvensen *murM* i isolatet studert videre. Gensekvensen ble sammenstilt mot den penicillinsensitive laboratoriestammen (RH425) siden isolatet hadde store likheter i celleveggkomposisjonen (Figur 4.4-1). I tillegg ble den sammenstilt mot en penicillinresistent laboratoriestamme (Pen6), hvor MurM bidrar betydelig til penicillinresistens og sørger for økt indirekte krysslinking i peptidoglykanet (49,50). Sammenstillingen (Figur 4.5-1a) viste at *murM* i isolatet høyst sannsynlig var den samme funksjonelle ligasen som den sensitive stammen (RH425), og ikke den resistente stammen (Pen6) tross et høyt resistensnivå i isolatet. Det var kun en konservert aminosyresubstitusjon V101A, valin til alanin i forskjell, hvorav kun en metylgruppe er ulik mellom aminosyrene. *murM* i den resistente laboratoriestammen (Pen6) derimot var svært mutert. Ettersom sekvenssammenstillingen av *murM* og celleveggkomposisjonen i isolatet er mer lik den sensitive stammen kan det indikere at hvilket allel av *murM* stammen har, påvirker i stor grad andelen av indirekte krysslinking. Dette beviset er dog ikke tilstrekkelig for å konstatere det, men gir likevel en indikasjon.

At isolatet hadde en ikke-mutert *murM*, åpnet muligheten for å utforske om det er en mutert *murM* eller bare tilstedeværelsen av MurM som påvirker penicillinresistens. Delesjon av *murM* har, som nevnt, redusert nivå av penicillinresistens i flere resistente pneumokokker (35,47,49–52). Dette ble utført i isolatet, og resultatene viste at også MIC₉₀ ble redusert over 10-fold ved delesjon av den ikke-muterte MurM (fra MG8 med 4.06 µg/ml til MG16 med 0,44 µg/ml), på samme måte som i den resistente laboratoriestammen (Pen6) (Figur 4.5-1b). Dette kan bety at det ikke nødvendigvis er en mutert *murM* som bidrar til penicillinresistens, men heller tilstedeværelsen av MurM og da sannsynligvis indirekte krysslinking i peptidoglykanet, som er viktig for å opprettholde resistens mot penicillin. Det vil si at PBP_{ene} er avhengig av MurM for å danne peptidbroer i peptidoglykanet, for å være motstandsdyktig mot penicillin tross den lavere affiniteten mellom PBP_{ene} og penicillin. Dette er lovende for MurM som et ytterligere angrepsmål i tillegg til PBP_{ene}, ved behandling med penicillin av infeksjoner forårsaket av resistente pneumokokker. Likevel er det viktig å forstå mekanismene bak MurM's påvirkning på penicillinresistens for å benytte dette som angrepsmål i klinisk behandling for å unngå fremtidig utvikling av resistensmekanismer.

Diskusjon

Ettersom nivå av penicillinresistens dropper ved delesjon av *murM*, uansett hvilket allel, kunne det tenkes at en eller flere av PBPene får økt affinitet for penicillin ved fraværet av MurM, det vil si kun lineære stempeptider. Det var derfor ønsket å undersøke om noen av klasse A og B PBPer bandt penicillin sterkere uten MurM uttrykt i cellen. Dette ble utført ved å merke PBPene med bocillin FL, separere de med SDS-PAGE og visualisere intensiteten av fluorescens fra PBPene. PBPer i cellelysatsat og i intakte celler ble merket med bocillin, for å også undersøke om tilgangen på lipid II (forgreinet eller lineære) ville påvirke affiniteten for penicillin. Dette ble utført med klinisk isolat (MG8), resistent laboriestedamme (Pen6) og sensitiv stamme (RH425), samt respektive $\Delta murM$ -mutanter (henholdsvis MG16, RSG183, RSG66).

På tross av en betydelig reduksjon i MIC₉₀ ved delesjon av *murM*, ble det ikke visualisert en tydelig trend i endringer i affiniteten mellom penicillin og klasse A og B PBPer (Figur 4.5-2). Både mellom den generelle affiniteten mellom celler med og uten MurM, eller mellom enkelte PBPer fra celler med og uten MurM (Figur 4.5-2). Det ble muligens observert en forskjell i affiniteten hos PBP2x og PBP1a ved delesjon av *murM* ved gelbilder (Figur 4.5-2a), men denne forskjellen ble ikke observert da intensiteten av fluorescens ble målt og ratio beregnet (Figur 4.5-2c). I tillegg ble ikke denne observasjonen repetert hos den resistente laboriestedammen (Pen6 og RSG66), som var nødvendig for å faktisk konstatere en endring i affinitet grunnet MurM. Uansett, var det bemerkelsesverdig at PBPene i $\Delta murM$ -mutanten av isolatet (MG16) ikke bandt mer bocillin FL ettersom resistensnivået var såpass redusert. Dette kan bety at PBPene har lik affinitet til penicillin uansett tilstedeværelse av MurM. Altså, PBPene er like mye inhibert i MurM-positive celler som i en $\Delta murM$ mutant, men at en cellevegg kun bestående av lineære stem peptider krever høyere grad av transpeptidering enn en cellevegg bestående av forgrenede stem peptider for å motstå turgor. Derfor skal det mindre penicillin til for å drepe en $\Delta murM$ mutant. En annen studie utførte det samme eksperimentet og observert det samme resultatet, men merket kun PBPer i cellelysatsat og ikke i intakte celler som i denne studien (88).

Ved å merke PBPer i intakte celler med og uten MurM fanges også effekten av tilstedeværelsen av indirekte krysslinkinger opp, sammenlignet med merking av PBPer i cellelysatsat hvor celleveggen er brutt ned. Det ble heller ikke observert en endring i affiniteten mellom penicillin og PBPene, mellom celler med og uten indirekte krysslinkinger (Figur 4.5-2a). Dette sammen med resultater fra cellevegganalysene, indikerer at det ikke nødvendigvis er forgreinede stempeptider som utkonkurrerer penicillin i binding med PBPene som er medvirkende til opprettholdelsen av penicillinresistens. Likevel, skal det med forsiktighet sammenlignes

Diskusjon

prøvene av cellelysat og av intakte celler, siden de har gjennomgått ulike behandlinger som kan påvirke resultatene, blant annet mengden celler og derav mengden PBPer i prøven.

Det er derimot svakheter med denne metoden som gjør tolkningen av resultatene mer tvilsomme. Blant annet var ikke denne metoden sensitiv nok. Ettersom det ble undersøkt lavaffinitets-PBPer, som også har lavere affinitet til bocillin FL, ble båndene svake og derfor utfordrende å både visualisere og måle intensitet. Særlig PBP2b hadde såpass lav affinitet slik at den omtrent ikke kunne visualiseres på gelbildene. Årsaken til forskjellen mellom prøvene kan også være på grunn av ulik mengde prøvemateriale overført til SDS-PAGE-gelen. Ved tolkning av resultatene ble båndet for PBP2a benyttet som tilsetningskontroll siden PBP2a i teorien skal binde like mye bocillin uavhengig av prøve. Likevel, har PBP2a transpeptidase-domene og kan derfor binde penicillin, og derav mutere slik at den får lavere affinitet til penicillin. I retrospekt hadde det vært mer ideelt å benytte PBP3 eller en ekstern tilsetningskontroll. PBP3 har ikke transpeptidase-domene og bidrar derfor ikke til penicillinresistens. Uansett binder PBP3 bocillin og penicillin, tross manglende transpeptidase-domene (95). Ved å benytte PBP3 som tilsetningskontroll ville det gått på bekostning av separasjonen av klasse A og B PBPer, som i denne studien var av mer interesse å studere enn PBP3. For å unngå dette, har det også vært mulig å benytte et protein av kjent størrelse som binder bocillin og som tilsettes i like konsentrasjoner til hver prøve før behandling av prøven. Alternativt, kunne det også blitt utført western blot og brukt et primært antistoff som detekterte et protein som er likt uttrykt i alle prøver. Uansett valg av tilsetningskontroll, burde det trolig ha vist en større forskjell i affiniteten mellom penicillin og PBPer, mellom utgangstammen med *murM* og $\Delta murM$ -mutanten om mengden indirekte kryssløyper og tilstedeværelsen av MurM påvirker affiniteten.

Uavhengig om MurM trolig ikke opprettholder motstandsdyktigheten mot penicillin ved å endre affiniteten mellom PBPer og penicillin, så er cellen mindre levedyktig uten MurM ved tilstedeværelse av penicillin. Det er vist at cellen krevde høyere ekspresjon av PBP2b for å opprettholde vekst i $\Delta murM$ -mutanter, sammenlignet med stammer med funksjonell MurM (53). Det kan derfor spekuleres i om $\Delta murM$ -mutanter ikke kan motstå penicillin siden færre PBP2b proteiner må hemmes for å stoppe veksten i en $\Delta murM$ -mutant. Videre kan det da spekuleres i om resistente pneumokokker krever et høyere nivå av lavaffinitets-PBPer enn sensitive pneumokokker krever av høyaffinitets-PBPer, siden de er mindre effektive enzymer. Dette kan utforskes nærmere ved hjelp av western blotting, og kan indikere om mengden PBPer i resistente stammer er viktig for å opprettholde resistensen.

Diskusjon

I dette arbeidet har MurM blitt bekreftet som en essensiell bidragsyter for penicillinresistens hos pneumokokker. Dette arbeidet har også vist at et normalt allel av MurM har denne effekten på resistens. Det er derfor et stort potensial å utforske MurM nærmere som et ytterlige angrepsmål i tillegg til PBPene ved behandling med penicillin av infeksjoner av resistente pneumokokker. Det er i midlertidig viktig å forstå mer om mekanismene for hvordan MurM opprettholder resistensnivået, slik at det ikke oppstår andre mutasjoner naturlig ved klinisk bruk av et antibakterielt middel i tillegg til penicillin. Det kan muligens forverre behandlingen av infeksjoner av resistente pneumokokker.

6. Konklusjon og videre arbeid

Denne studiens hensikt var å undersøke determinanter for penicillinresistens i pneumokokker ved bruk av et gendeplesjonssystem i et penicillinresistent klinisk isolat. Gendeplesjonssystemet ComRS-systemet, samt Janus-systemet ble etablert i det kliniske isolatet som viste høyest MIC₉₀-verdi og transformasjonsevne (Figur 4.1-1). Via deplesjon av *pbp2b*^{LA} ble det vist at ComRS-systemet var funksjonelt i isolatet (Figur 4.3.2-1), slik at ekspresjonen av eksempelvis lavaffinitets-PBPer kan ektopisk reguleres. Etableringen av disse to genetiske verktøyene i et resistent klinisk isolat kan være svært nyttig for å utforske resistensdeterminanter i pneumokokker i fremtidige studier.

Det ble forsøkt å substituere lavaffinitets-PBP2_x, -PBP2b og -PBP1a i isolatet med respektive høyaffinitets-PBPer fra penicillinsensitiv laboriestamme (RH425), men med tidsbegrensingen og noen eksperimentelle utfordringer ble ikke eksperimentet fullført. Ved innsetting av høyaffinitets-PBP2b indikerte det at cellen trolig ikke aksepterer to ulike alleler av samme PBP på samme tid, men ved bruk av andre metoder for innsetting av høyaffinitets-PBPer ved hjelp av ComRS-systemet kan muligens eksperimentet fullføres. Ettersom substitusjon av høyaffinitets-PBPer til lavaffinitets-PBPer er utført tidligere, er det trolig mulig å fullføre dette eksperimentet. Ved substitusjon av alle de tre sistnevnte PBPer, kan det undersøkes om det er resterende penicillinresistens i isolatet, og dermed avsløre potensielle ytterligere penicillindeterminanter i pneumokokker

Lavaffinitets-PBPer kan utføre transpeptidering, altså binde substratet D-Ala-D-Ala. Likevel har PBPer lavere affinitet til penicillin, som etterlikner substratet for transpeptidering (35,41,42). En hypotese er at lav-affinitets-PBPer har økt affinitet for forgreinede stempeptider og på den måten utkonkurreres penicillin i binding med PBPer av forgreinede lipid II-molekyler. PBPer kan derfor utføre transpeptidering og likevel ha lavere affinitet til penicillin (35,50,54). Stempeptidkomposisjonen i det kliniske isolatet ble analysert og sammenlignet med laboriestamme, og indikerte at ved høyere uttrykk av lavaffinitets-PBP2b var andelen indirekte krysslinkinger mot direkte krysslinkinger på nivå med den sensitive stammen (RH425). Dette kan muligens motbevise hypotesen, men ytterligere undersøkelser av stempeptidkomposisjonen av celler ved normaluttrykk og deplesjon av PBP2b er nødvendig. Andelen indirekte krysskoblinger i peptidoglykanet i isolatet kan muligens forklares ved en ikke-mutert *murM*, lignende som *murM* i den sensitive stammen. En mutert *murM* har i en penicillinresistent laboriestamme ført til høyere andel indirekte krysslinkinger og økt

Konklusjon og videre arbeid

resistens, samt delesjon av genet førte til betydelig reduksjon av resistensnivå (49). Denne reduksjonen ble også observert ved delesjon av ikke-mutert *murM* i isolatet, og kan derfor tyde på at det er tilstedeværelsen av MurM og indirekte krysslinkinger som er viktig for å opprettholde resistensen og ikke nødvendigvis en mutert *murM*. Videre ble det undersøkt om MurM påvirker affiniteten mellom penicillin og klasse A og B PBPer, men dette var trolig ikke tilfellet.

Uansett peker resultatene mot at inhibering av MurM i penicillinresistente pneumokokker fører til et tilnærmet tap av resistens mot penicillin. Dette gir håp for at MurM kan benyttes som et ytterligere angrepsmål ved behandling med penicillin mot infeksjoner forårsaket av penicillinresistente pneumokokker. Altså, å benytte et stoff som hemmer MurM i kombinasjon med eksisterende penicillinbehandling. Det er likevel viktig å forstå mekanismene for hvordan MurM opprettholder resistensen for klinisk bruk av inhibitorisk komponent. Blant annet for å unngå fremtidig naturlige mutasjoner som kan komplisere behandlingen av pneumokokkinfeksjoner, men også for å bedre forstå om MurM direkte bidrar til penicillinresistensen eller kompenserer for tilegnelsen av lavaffinitets-PBPer. For å undersøke mekanismene bak MurM kan den muterte *murM* substituere den ikke-muterte *murM* i isolatet for å undersøke om resistensnivå og andelen indirekte krysslinkinger øker. I tillegg kan det utføres en kvantitativ undersøkelse av flere kliniske isolater av MurM og hvordan den påvirker penicillinresistensen. Videre ved utvikling av en inhibitorisk komponent mot MurM kan celler behandlet med denne komponenten stresstestes for å undersøke om det oppstår mutasjoner. For eksempel å undersøke om en $\Delta murM$ -mutant utvikler resistens mot penicillin ved å dyrke mutanten med sub-letale konsentrasjoner av penicillin. I molekylær mikrobiologi-gruppen er det forsøkt dette eksperimentet i *Streptococcus oralis* uo5, hvorav $\Delta murM$ -mutanten ikke utviklet penicillinresistens (upublisert data). Dette er lovende for klinisk bruk av inhibitorisk stoff mot MurM i tillegg til penicillin mot resistente pneumokokkinfeksjoner.

7. Referanser

1. Morehead MS, Scarbrough C. Emergence of Global Antibiotic Resistance. Vol. 45, Primary Care - Clinics in Office Practice. W.B. Saunders; 2018. p. 467–84.
2. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Vol. 33, Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology. Medknow Publications; 2017. p. 300–5.
3. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: What, why, where, when and how? Vol. 116, British Medical Bulletin. Oxford University Press; 2015. p. 105–13.
4. Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and Patterns of Resistance. Vol. 117 Suppl 3A, The American journal of medicine. 2004.
5. Davidson HC, Low CJ, Woolhouse EJ. What is antibiotic resistance and how can we measure it? Trends Microbiol. 2000;8(12):554–9.
6. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Kattula D, Burkert F. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
7. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 2022 Feb 12;399(10325):629–55.
8. Ahmad M, Khan AU. Global economic impact of antibiotic resistance: A review. Vol. 19, Journal of Global Antimicrobial Resistance. Elsevier Ltd; 2019. p. 313–6.
9. World Bank. Drug-Resistant Infections: A Treath to Our Economic Future [Internet]. Washington, DC; 2017 Mar. Available from: www.worldbank.org
10. FNs Bærekraftsmål.
11. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Vol. 11, Infection and Drug Resistance. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 1645–58.

Referanser

12. Masomian M, Ahmad Z, Gew LT, Poh CL. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. Vol. 8, Vaccines. MDPI AG; 2020.
13. Sabtu N, Enoch DA, Brown NM. Antibiotic resistance: What, why, where, when and how? Vol. 116, British Medical Bulletin. Oxford University Press; 2015. p. 105–13.
14. Norrby R, Powell M, Aronsson B, Monnet DL, Lutsar I, Bocsan IS, et al. The bacterial challenge, time to react : a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. ECDC - European Centre for Disease prevention and Control. EMEA - European Medicines Agency; 2009.
15. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018 Mar 1;18(3):318–27.
16. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention. Vol. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.
17. Kawamura Y, Hou X gang, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16s rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus Streptococcus. Vol. 45, INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 1995.
18. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. Microbiol Spectr. 2018 Sep 7;6(5).
19. Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ. *Streptococcus pneumoniae*: Description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention. Vol. 25, Pharmacotherapy. 2005. p. 1193–212.
20. Subramanian K, Henriques-Normark B, Normark S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. Vol. 21, Cellular Microbiology. Blackwell Publishing Ltd; 2019.

Referanser

21. Cools F, Delputte P, Cos P. The search for novel treatment strategies for *Streptococcus pneumoniae* infections. Vol. 45, FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press; 2021.
22. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Jul;3(7).
23. Feldman C, Anderson R. Recent advances in the epidemiology and prevention of *Streptococcus pneumoniae* infections. F1000Res. 2020;9.
24. Engholm DH, Kilian M, Goodsell DS, Andersen ES, Kjærgaard RS. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 41, FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press; 2017. p. 854–79.
25. Tsui HCT, Zheng JJ, Magallon AN, Ryan JD, Yunck R, Rued BE, et al. Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. Mol Microbiol. 2016 Jun 1;100(6):1039–65.
26. Perez AJ, Boersma MJ, Bruce KE, Lamanna MM, Shaw SL, Tsui HCT, et al. Organization of peptidoglycan synthesis in nodes and separate rings at different stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol. 2021 Jun 1;115(6):1152–69.
27. Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Vol. 83, Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. 1997.
28. Trouve J, Zapun A, Arthaud C, Durmort C, Di Guilmi AM, Söderström B, et al. Nanoscale dynamics of peptidoglycan assembly during the cell cycle of *Streptococcus pneumoniae*. Current Biology. 2021 Jul 12;31(13):2844-2856.e6.
29. Bui NK, Eberhardt A, Vollmer D, Kern T, Bougault C, Tomasz A, et al. Isolation and analysis of cell wall components from *Streptococcus pneumoniae*. Anal Biochem. 2012 Feb 15;421(2):657–66.
30. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. Vol. 5, Nature Reviews Drug Discovery. 2006. p. 321–3.

Referanser

31. Zapun A, Philippe J, Abrahams KA, Signor L, Roper DI, Breukink E, et al. In vitro reconstitution of peptidoglycan assembly from the gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*. ACS Chem Biol. 2013 Dec 20;8(12):2688–96.
32. Zheng S, Sham LT, Rubino FA, Brock KP, Robins WP, Mekalanos JJ, et al. Structure and mutagenic analysis of the lipid II flippase MurJ from *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jun 26;115(26):6709–14.
33. Ruiz N. Lipid flippases for bacterial peptidoglycan biosynthesis. Lipid Insights. 2015;2015:21–31.
34. Lloyd AJ, Gilbey AM, Blewett AM, De Pascale G, El Zoeiby A, Levesque RC, et al. Characterization of tRNA-dependent peptide bond formation by MurM in the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. Journal of Biological Chemistry. 2008 Mar 7;283(10):6402–17.
35. Gibson PS, Veening JW. Gaps in the wall: Understanding cell wall biology to tackle amoxicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 72, Current Opinion in Microbiology. Elsevier Ltd; 2023.
36. Straume D, Wiaroslawa Piechowiak K, Olsen S, Stamsås A, Berg KH, Kjos M, et al. Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. 2020; Available from: <https://www.pnas.org/lookup/suppl/>
37. Lee TK, Meng K, Shi H, Huang KC. Single-molecule imaging reveals modulation of cell wall synthesis dynamics in live bacterial cells. Nat Commun. 2016 Oct 24;7.
38. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. Vol. 30, FEMS Microbiology Reviews. 2006. p. 673–91.
39. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. Classification of beta-lactamases and Penicillin Binding Proteins using ligand-centric network models. PLoS One. 2015 Feb 17;10(2).
40. Taguchi A, Welsh MA, Marmont LS, Lee W, Sjodt M, Kruse AC, et al. FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. Nat Microbiol. 2019 Apr 1;4(4):587–94.
41. Silver LL. Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials. Vol. 6, Nature Reviews Drug Discovery. Nature Publishing Group; 2007. p. 41–55.

Referanser

42. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. Vol. 32, FEMS Microbiology Reviews. 2008. p. 361–85.
43. Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Gardès C, Keck W, De Saizieu A. Mosaic genes and mosaic chromosomes: Intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2001;69(4):2477–86.
44. Li Y, Metcalf BJ, Chochua S, Li Z, Gertz RE, Walker H, et al. Penicillin-binding protein transpeptidase signatures for tracking and predicting β -lactam resistance levels in *Streptococcus pneumoniae*. mBio. 2016;7(3).
45. Chewapreecha C, Marttinen P, Croucher NJ, Salter SJ, Harris SR, Mather AE, et al. Comprehensive Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Beta-lactam Resistance within Pneumococcal Mosaic Genes. PLoS Genet. 2014 Aug 7;10(8).
46. Tian SF, Chu YZ, Chen BY. Molecular characteristics of penicillin-binding protein 2b, 2x, and 1a sequences in penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Shenyang, China. Can J Microbiol. 2008 Jun;54(6):489–94.
47. Sauerbier J, Maurer P, Rieger M, Hakenbeck R. *Streptococcus pneumoniae* R6 interspecies transformation: Genetic analysis of penicillin resistance determinants and genome-wide recombination events. Mol Microbiol. 2012 Nov;86(3):692–706.
48. Smith AM, Klugman KP. Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(8):2393–6.
49. Filipe SR, Tomasz A. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes [Internet]. 2000. Available from: www.pnas.org
50. Filipe SR, Pinho MG, Tomasz A. Characterization of the murMN operon involved in the synthesis of branched peptidoglycan peptides in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Biological Chemistry. 2000 Sep 8;275(36):27768–74.
51. Filipe SR, Severina E, Tomasz A. Functional Analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM Reveals the Region Responsible for Its Specificity in the Synthesis of Branched Cell Wall Peptides. Journal of Biological Chemistry. 2001 Oct 26;276(43):39618–28.

Referanser

52. Cafini F, del Campo R, Alou L, Sevillano D, Morosini MI, Baquero F, et al. Alterations of the penicillin-binding proteins and murM alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 Feb;57(2):224–9.
53. Berg KH, Stamsås GA, Straume D, Håvarstein LS. Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol*. 2013;195(19):4342–54.
54. Garcia Bustos J, Tomasz A. A biological price of antibiotic resistance: Major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci [Internet]. Vol. 87, NORWEGIAN UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES UNIVERSITETSBIBLIOTEKET NMBU. 1990. Available from: <https://www.pnas.org>
55. Fall S, Mercier A, Bertolla F, Calteau A, Gueguen L, Perrière G, et al. Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a “Spandrel” of DNA repair mechanisms. *PLoS One*. 2007 Oct 24;2(10).
56. Ochman H, Lawrence² JG, Groisman³ EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation [Internet]. Vol. 405, NATURE. 2000. Available from: www.nature.com
57. Slager J, Aprianto R, Veening JW. Refining the Pneumococcal Competence Regulon by RNA Sequencing. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1128/JB>
58. Andam CP, Hanage WP. Mechanisms of genome evolution of *Streptococcus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015 Jul 1;33:334–42.
59. Straume D, Stamsås GA, Håvarstein LS. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 33, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier; 2015. p. 371–80.
60. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. Vol. 12, *Nature Reviews Microbiology*. 2014. p. 181–96.
61. Sigve Håvarstein L, Coomaraswamy G, Morrisont DA. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 92. 1995.

Referanser

62. Ween O, Gaustad P, Håvarstein LS. Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1999;33(4):817–27.
63. Piotrowski A, Luo P, Morrison DA. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: Termination of activity of the alternative sigma factor ComX is independent of proteolysis of ComX and ComW. *J Bacteriol.* 2009 May;191(10):3359–66.
64. Berg KH, Biørnstad TJ, Johnsborg O, Håvarstein LS. Properties and biological role of streptococcal fratricins. *Appl Environ Microbiol.* 2012 May;78(10):3515–22.
65. Johnsborg O, Håvarstein LS. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. In: *FEMS Microbiology Reviews.* 2009. p. 627–42.
66. Straume D, Stamsås GA, Salehian Z, Håvarstein LS. Overexpression of the fratricide immunity protein ComM leads to growth inhibition and morphological abnormalities in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology (United Kingdom).* 2017 Jan 1;163(1):9–21.
67. Berg KH, Biørnstad TJ, Straume D, Håvarstein LS. Peptide-regulated gene depletion system developed for use in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2011 Oct;193(19):5207–15.
68. Fontaine L, Boutry C, De Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, et al. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol.* 2010 Mar;192(5):1444–54.
69. Gardan R, Besset C, Gitton C, Guillot A, Fontaine L, Hols P, et al. Extracellular life cycle of ComS, the competence-stimulating peptide of *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 2013 Apr;195(8):1845–55.
70. Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V. The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J Bacteriol.* 2009 Jul;191(14):4647–55.

Referanser

71. Talagas A, Fontaine L, Ledesma-Garca L, Mignolet J, Li de la Sierra-Gallay I, Lazar N, et al. Structural Insights into Streptococcal Competence Regulation by the Cell-to-Cell Communication System ComRS. *PLoS Pathog.* 2016 Dec 1;12(12).
72. Haustenne L, Bastin G, Hols P, Fontaine L. Modeling of the ComRS signaling pathway reveals the limiting factors controlling competence in *Streptococcus thermophilus*. *Front Microbiol.* 2015;6(DEC).
73. Johnsborg O, Håvarstein LS. Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5859–64.
74. Sabelnikov AG, Greenberg B, Lacks SA. An Extended –10 Promoter Alone Directs Transcription of the DpnII Operon of *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 250, *J. Mol. Biol.* 1995.
75. Zigelboim S, Tomasz A. Penicillin-Binding Proteins of Multiply Antibiotic-Resistant South African Strains of *Streptococcus pneumoniae*. Vol. 17, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 1980. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
76. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase chain reaction: Methods, principles and application. 2010. Available from: www.ssjournals.com
77. McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol Biol Int.* 2014 Aug 17;2014:1–8.
78. Davidson RC, Blankenship JR, Kraus PR, De M, Berrios J, Hull CM, et al. A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. Vol. 148, *Microbiology*. 2002.
79. Bioanalysis n NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up PCR clean-up and Gel extraction. Available from: www.mn-net.com
80. Tipu HN, Shabbir A. Evolution of DNA sequencing. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan.* 2015;25:210–5.
81. Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(3–12):5190–6.

Referanser

82. Singh AK, Pluvinage B, Higgins MA, Dalia AB, Woodiga SA, Flynn M, et al. Unravelling the Multiple Functions of the Architecturally Intricate *Streptococcus pneumoniae* β -galactosidase, BgaA. PLoS Pathog. 2014 Sep 1;10(9).
83. Desmarais SM, De Pedro MA, Cava F, Huang KC. Peptidoglycan at its peaks: How chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. Vol. 89, Molecular Microbiology. 2013. p. 1–13.
84. Mellroth P, Daniels R, Eberhardt A, Rönnlund D, Blom H, Widengren J, et al. LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. Journal of Biological Chemistry. 2012 Mar 30;287(14):11018–29.
85. Zhao G, Meier TI, Kahl SD, Gee KR, Blaszcak LC. Bocillin FL, a Sensitive and Commercially Available Reagent for Detection of Penicillin-Binding Proteins [Internet]. Vol. 43, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. 1999. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
86. Cornett JB, Shockman GD. Cellular Lysis of *Streptococcus faecalis* Induced with Triton X-100 [Internet]. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1978. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
87. Roy S, Kumar V. A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein [Internet]. International Journal of Science and Research. 2014. Available from: www.ijsr.net
88. Filipe SR, Severina E, Tomasz A. The role of murMN operon in penicillin resistance and antibiotic tolerance of *Streptococcus pneumoniae*. Microbial Drug Resistance. 2001;7(4):303–16.
89. Heggenhougen MV, Straume D. A penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* in the making: characterizing resistance development and cell fitness after acquiring low-affinity penicillin-binding proteins and a mosaic MurM. Ås; 2019.
90. Paton JC, Trappetti C. *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide. Microbiol Spectr. 2019 Apr 12;7(2).
91. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. Infect Immun. 2007 Jan;75(1):83–90.

Referanser

92. Straume D, Stamsås GA, Berg KH, Salehian Z, Håvarstein LS. Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b). *Mol Microbiol.* 2017 Jan 1;103(1):99–116.
93. Jin H, Zhao Q, Gonzalez De Valdivia EI, Ardell DH, Stenström M, Isaksson LA. Influences on gene expression in vivo by a Shine-Dalgarno sequence. *Mol Microbiol.* 2006 Apr;60(2):480–92.
94. Stamsås GA, Straume D, Ruud Winther A, Kjos M, Frantzen CA, Håvarstein LS. Identification of EloR (Spr1851) as a regulator of cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2017 Sep 1;105(6):954–67.
95. Kocaoglu O, Tsui HCT, Winkler ME, Carlson EE. Profiling of β -lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jun 1;59(6):3548–55.
96. Hauge IH, Sandegren V, Winther AR, Bøe CA, Salehian Z, Håvarstein LS, et al. A novel proteinaceous molecule produced by *Lysinibacillus* sp. OF-1 depends on the Ami oligopeptide transporter to kill *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology (Reading).* 2023 Mar 1;169(3).

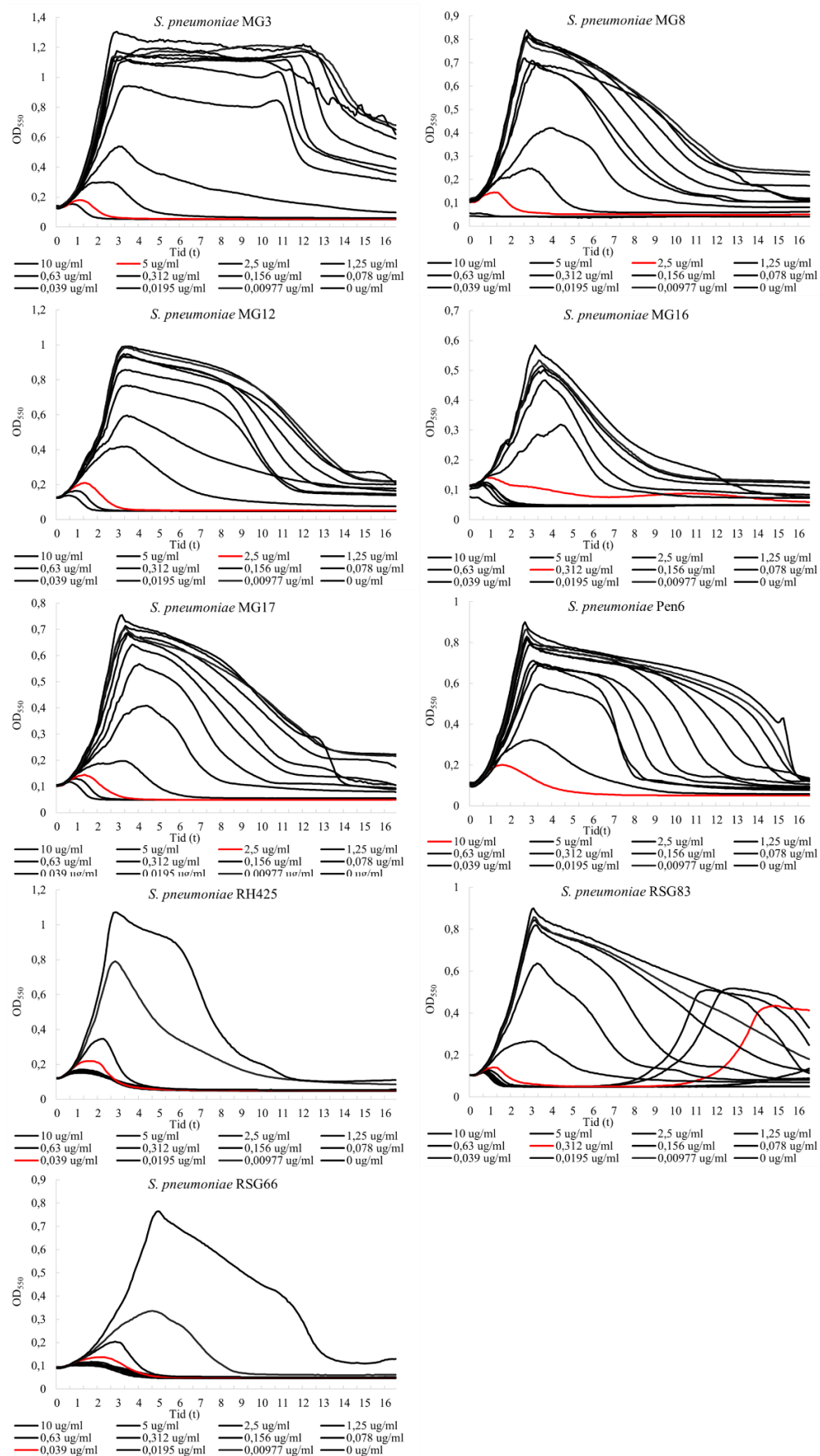
8. Vedlegg

A. Fullstendig datasett for MIC₉₀-verdier og eksempel på vekstkurve for bestemmelse av MIC₉₀

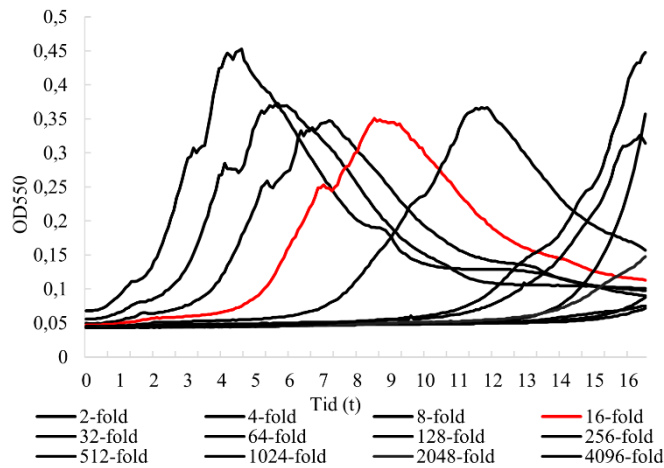
A.1 Fullstendig datasett for MIC₉₀-verdier målt i denne studien

Stamme	MIC ₉₀						Gjennomsnittlig MIC ₉₀	Standardavvik
MG3	5	5	5	10	2,5		5,50	2,449
MG8	5	5	5	2,5	2,5	5 2,5 5	4,063	1,210
MG12	5	5					5,0	0,0
MG16	0,63	0,63	0,312	0,312	0,312		0,439	0,156
MG17	5						5,0	0,0
Pen6	>10	>10					>10,0	0,0
RSG83	0,312	0,156					0,234	0,078
RH425	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,0
RSG66	0,039	0,039	0,039	0,039			0,039	0,0

A.2 Eksempel på vekstkurve for alle stammer, rød serie representerer MIC₉₀.



B. Fortynningsgrad av *pbp2b^{LA}*-depleksjonsmutant for cellevegganalyse av stamme MG22 med depleksjon av ektopisk regulert *pbp2b^{LA}*. Celler ble predyrket i C-medium med en sluttkonsentrasjon på 0,05 µM ComS-induser, og deretter fortynnet i en 2-fold-fortynningsrekke uten ComS til stede. Vekstkurve viser OD₅₅₀ på Y-aksen og tid i timer på X-aksen. 16-fold fortynning er merket med rød, og ble benyttet som fortynningsgrad for depleksjon for cellevegganalyser.



C. Sammenstilling av aminosyresekvenser av MurM fra stamme RH425 og MG3.

Nukleotidsekvensen ble oversatt til aminosyresekvens ved bruk av programvaren ExPASy, og videre sammenstilt med programvaren EMBOSS Needle med Needleman-Wunsch algoritmen. Output fra sammenstillingen er vist under, med aminosyreendring markert med rød. Sammenstillingen viser en aminosyresubstitusjon V101A.

```
# Length: 406
# Identity: 405/406 (99.8%)
# Similarity: 405/406 (99.8%)
# Gaps: 0/406 ( 0.0%)
# Score: 2085.0
#
#-----
EMBOSS_001 1 MYRYQIGIPTLEVDQFVKEHELANVLQSSAWEEVKSNWQHEKFGVYREEK 50
EMBOSS_001 1 MYRYQIGIPTLEVDQFVKEHELANVLQSSAWEEVKSNWQHEKFGVYREEK 50
EMBOSS_001 51 LLATASILIRTLPLGYKMFYIPRGPILDYGDKELLNFAIQSIKSYARSKR 100
EMBOSS_001 51 LLATASILIRTLPLGYKMFYIPRGPILDYGDKELLNFAIQSIKSYARSKR 100
EMBOSS_001 101 VVVFVTFDPSICLSQSLINQEKTEFPENLAIIDSQQMGRVNSGKTEEMGD 150
EMBOSS_001 101 AVVFVTFDPSICLSQSLINQEKTEFPENLAIIDSQQMGRVNSGKTEEMGD 150
EMBOSS_001 151 TIQPRIQAKIYKENFEEDKLSKSTKQAIRARNKGLIEIQYGGLELDSFS 200
EMBOSS_001 151 TIQPRIQAKIYKENFEEDKLSKSTKQAIRARNKGLIEIQYGGLELDSFS 200
EMBOSS_001 201 ELMKTEKRKEIHLRNEAYYKLLDNFKDKAYITLATLDVSKRSQEELEQ 250
EMBOSS_001 201 ELMKTEKRKEIHLRNEAYYKLLDNFKDKAYITLATLDVSKRSQEELEQ 250
EMBOSS_001 251 LAKNRAL EETFTSTRTSKVEAQKKEKERLLEELFLQEYIDVGQARVPL 300
EMBOSS_001 251 LAKNRAL EETFTSTRTSKVEAQKKEKERLLEELFLQEYIDVGQARVPL 300
EMBOSS_001 301 AATLSLEFGTTSVNIYAGMDDDFKRYNAPILTWYETARYAFERGHVWQNL 350
EMBOSS_001 301 AATLSLEFGTTSVNIYAGMDDDFKRYNAPILTWYETARYAFERGHVWQNL 350
EMBOSS_001 351 GGVENSLNGGLYHFKEKFNPTIEEYLGFEFTMPHPLPLLRALDFRCTL 400
EMBOSS_001 351 GGVENSLNGGLYHFKEKFNPTIEEYLGFEFTMPHPLPLLRALDFRCTL 400
EMBOSS_001 401 RKKHRK 406
EMBOSS_001 401 RKKHRK 406
```

Vedlegg

D. Areal av topper i kromatogrammer generert ved revers fase-HPLC beregnet ved software Chromeleon.

Topp	Areal
B: MG22 med 0,5 µM ComS	
1	38,2626
4	163,2991
5	77,0382
3	37,1969
C: MG22 med 2 µM ComS	
1	23,0298
5	74,018
4	146,6552
D: RH425	
4	74,8135
5	47,9523

E. Rådata av intensiteten av fluorescens for PBPer merket med bocillin FL og målt ved bruk av programvare Azurespot.

PBP	MG8	MG16	RH425	RSG66	Pen6	RSG183
Merking av PBPer i intakte celler						
PBP1b	9367	10121,63				
PBP1a	16608,85	28684,63				
PBP1a/1b			78170,61	74453	22580,9	28176,66
PBP2x	8426,06	18130,22	40740,98 ^a	30593,54 ^a	24488,73	25176,02
PBP2a	34298,11	48915,83	28423,16 ^a	31827,85 ^a	23802,82	29951,39
PBP2b			46219,84 ^a	51135,24 ^a		
Merking av PBPer i cellelysat						
PBP1a/1b	910633	834155	4567625,45	5594061,33	454711	446784,53
PBP2x	595880,97	643659,89	2229536,4	2343420,34	306192 ^b	721495,39 ^b
PBP2a	2145023	1199170	2709555	2574421,76	2026622,82	2232500,42
PBP2b			2939264,6	2788905,63		

^a Båndene 2x, 2b, 2a var vanskelig å skille, så verdier var ikke nødvendigvis riktige

^b Verdien for intensiteten av fluorescens for PBP2x ble beregnet ved å måle intensiteten av PBP2x og PBP2a, minus intensiteten av fluorescens for PBP2a.

F. Materialer

F1. Primere brukt for dette prosjektet. Tabellen viser alle primere brukt for dette forsøket med beskrivelse av lokasjon i genomet for hvert eksperiment forsøk. I tillegg er sekvensen i 5' til 3'-retning og kilde for primeren beskrevet.

Navn	Beskrivelse	Sekvens (5'→3')	Kilde
JanusR	R Janus-kassett	CTTTCCTTATGCTTTTGGAC	Dr. Daniel Straume
JanusF	F Janus-kassett	GTTTGATTTTTAATGGATAATGTG	Dr. Daniel Straume
Primere for delesjon av kapselgener			
MG1	F 1000 bp opp kps	TGCCCAAACCTCTCACACAAG	Dette arbeidet
MG2	R opp kps hale ds620	GTATTTTCTAGTATTATAGCACATTTAAGA TTAACACCTATACCTTGAAC	Dette arbeidet
MG3	F ned kps hale ds121	CTATTTAAATAACAGATTAATAAAAAATTAT AAGTGAGATAAGTAGTAGAATGATTTTC	Dette arbeidet
MG4	R 1000 bp ned kps	TGATTTAATGGCGCGTTCAGC	Dette arbeidet
Ds620	F <i>aad9</i>	TTAAATGTGCTATAATACTAGAAAATAC	(96)
Ds121	R <i>aad9</i>	TTATAATTTTTTTAATCTGTTATTTAAATA G	(96)
Primere for delesjon av <i>murM</i>			
VE47	F Δ <i>murM::Janus</i>	ACCAGTAGTCATGGAAGCAAA	(53)
MVH44	R Δ <i>murM::Janus</i>	GCCAGCGCATGTCTCTCC	Maria Victoria Heggenhougen
Primere for etablering av ComRS-systemet			
Ds827	F <i>rpsL</i> 1000 bp opp	CATCTAGGTAATAGCCGTAGTC	Dr. Daniel Straume
Ds828	R <i>rpsL</i> 1000 bp ned	GGCATCGACGTGAGCCATG	Dr. Daniel Straume
MG5	F 1000 bp opp <i>aliA</i>	GCTAAGACTCAGGAGATTATTAC	Dette arbeidet
MG24	F 1000 bp opp <i>aliA</i>	GGGACAAGCTGTGGATGC	Dette arbeidet
MG7	R Δ <i>aliA::P_{comX}::Janus</i> opp hale til MG6	GCGAGATAGAGTCAAAACCAGAGACCAG CACCAACAACAAG	Dette arbeidet
MG8	F Δ <i>aliA::P_{comX}::Janus</i> ned hale til JanusR	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGGCCGATTTT TCAATATACTTCG	Dette arbeidet
MG9	R 1000 bp ned <i>aliA</i>	CTTCTCAAGCTCTGCGAAAC	Dette arbeidet
Ds810	F 1000 bp opp <i>amiF/treR</i> <i>amiF</i>	CGGTGAAGGAAGTAAGAAGTTT	(73)
Ds811	R 1000 bp ned <i>amiF/treR</i> <i>AmiR</i>	TCAAACCTTATCAAGCGCAATGC	(67)
MG10	R Δ <i>bgaA::Janus</i> opp hale til JanusF	CACATTATCCATTAATAAATCAAACCTCGCC TTGCCGTAGATATG	Dette arbeidet
MG11	F 1000 bp opp <i>bgaA</i>	GACTTTGATGCTGCTAAATTG	Dette arbeidet

Vedlegg

MG12	F $\Delta bgaA::Janus$ ned hale til JanusR	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGCAAAGCTGG AATCGTAGTAATC	Dette arbeidet
MG13	R 1000 bp ned <i>bgaA</i>	CATTGAGATAGTCAACGCGG	Dette arbeidet
MG14	F $P_{1::P_{comR}:comR}$	GGATAATCAAGATTTATCTTATAA	Dette arbeidet
MG15	R $\Delta Janus::P_{1::P_{comR}:comR}$ opp hale til MG14	TTATAAGATAAATCTTGATTATCCTCGCCT TGCCGTAGATATG	Dette arbeidet
MG16	R $P_{1::P_{comR}:comR}$	CTATAAACCATCTGCCAATTTTC	Dette arbeidet
MG17	F $\Delta Janus::P_{1::P_{comR}:comR}$ ned hale til MG16	GAAAATTGGCAGATGGTTTATAGCAAAGT GGAATCGTAGTAATC	Dette arbeidet
MG6	F P_{comX}	GGTTTTGACTCTATCTCGC	Dette arbeidet
MG35	R $\Delta ISpn11::P_{comX}$ opp hale til MG6	GCGAGATAGAGTCAAACCATTATTTGTC TAACTTTTGGGG	Dette arbeidet
MG36	F 1000 bp opp <i>ISpn11</i>	CTTGCTCACTATTAAGATGAAG	Dette arbeidet
MG37	F $\Delta ISpn11::P_{comX}$ ned hale til JanusR	GTCCAAAAGCATAAGGAAAGAATAAAAA CACCCCAAAGTTAG	Dette arbeidet
MG38	R 1000 bp ned <i>ISpn11</i>	CAGTGATTTTATACGACTCTTG	Dette arbeidet
MG39	F 150 bp opp P_{comX}	GAAAATCTCTTGCTCGGTGG	Dette arbeidet
KHB111	F 200bp opp.sekvensering	CAAGAGGTCAATGAACTATTAC	Dr. Kari Helene Berg
Primere for transformasjoner av lavaffinitets- til høyaffinitets- <i>pbp2x</i> , <i>-pbp2b</i> og delesjon av <i>pbp1a</i>			
KBH36	R P_{comX}	TGAACCTCCAATAATAATATAAAT	(67)
MG41	F <i>pbp2x^{LA}</i> hale til KHB36	ATTTATATTTATTATTGGAGGTTCAATGAA GTGGACAAAAAGAGTAAT	Dette arbeidet
MG42	F 1000 bp ned $P_{comX}::pbp2xLA$	AATAAAAACACCCCAAAGTTAG	Dette arbeidet
MG43	R <i>pbp2x^{LA}</i> hale til MG42	CTAACTTTTGGGGTGTTTTTATTTTAGTCT CCTAAAGTTAATTTAATT	Dette arbeidet
MG25	F 1000 bp opp native <i>pbp2x^{LA}</i>	GACAACCTCCGTCATTTACAG	Dette arbeidet
MG26	R opp native <i>pbp2x^{LA}</i>	ATCTTACTCCGCTATTTCGAATA	Dette arbeidet
MG27	F <i>Janus</i> hale til MG26	TATTTCGAATAGCGGAGTAAGATGTTTGAT TTTTAATGGATAATGTG	Dette arbeidet
MG28	F ned native <i>pbp2x^{LA}</i>	TATGTTTATTTCTATCAGTGCTG	Dette arbeidet
MG29	R <i>Janus</i> hale til MG29	CAGCACTGATAGAAATAAACATACTTTCC TTATGCTTTTGGACG	Dette arbeidet
MG30	R 1000 bp ned native <i>pbp2x^{LA}</i>	GGACAAATCGATCAGGACAG	Dette arbeidet
MG31	F <i>pbp2x^{HA}</i> hale til MG26	TATTTCGAATAGCGGAGTAAGATATGAAGT GGACAAAAAGAGTAATC	Dette arbeidet
MG32	R <i>pbp2x^{HA}</i> hale til MG28	CAGCACTGATAGAAATAAACATATTAGTC TCCTAAAGTTAATGTAAT	Dette arbeidet

Vedlegg

MG44	F <i>pbp2b^{LA}</i> hale til KHB36	ATTTATATTTATTATTGGAGGTTCAATGAG AAAATTTAACAGCCATTC	Dette arbeidet
MG45	R <i>pbp2b^{LA}</i> hale til MG42	CTAACTTTTGGGGTGTTTTTATTCTAGTTC ATTGGATGGTATTTTT	Dette arbeidet
KHB129	F 1000 bp opp native <i>pbp2b^{LA}</i>	CGATAAAGAAGAGCATAGGAAG	(53)
MG47	R opp native <i>pbp2b^{LA}</i>	ACAAATCAGTCTCATTCTAACT	Dette arbeidet
MG48	F <i>Janus</i> hale til MG47	AGTTAGAAATGAGACTGATTTGTGTTTGA TTTTTAATGGATAATGTG	Dette arbeidet
MG49	F ned native <i>pbp2b^{LA}</i>	AAAGGAAATTATGCTTTATCCAAC	Dette arbeidet
MG50	R <i>Janus</i> hale til MG49	GTTGGATAAAGCATAATTTCTTTCTTTCC TTATGCTTTTGGACG	Dette arbeidet
KHB132	R 1000 bp ned native <i>pbp2b^{LA}</i>	TCCAATCAATGGTTTCATTGG	(53)
MG52	F <i>pbp2b^{HA}</i> hale til MG47	AGTTAGAAATGAGACTGATTTGTATGAGA CTGATTTGTATGAGAAA	Dette arbeidet
MG53	R <i>pbp2b^{HA}</i> hale til MG49	GTTGGATAAAGCATAATTTCTTTCTAATT CATTGGATGGTATTTTTG	Dette arbeidet
MVH9	F Δ <i>pbp1a^{LA}::Janus</i>	CTTCCTGTAAACACAAGCCAAG	Maria Victoria Heggenhougen
MVH14	R Δ <i>pbp1a^{LA}::Janus</i>	TGTAGGCAAGCCTGCAACC	Maria Victoria Heggenhougen
MG57	R <i>pbp1a^{LA}</i>	CTTGTTTTACCACCTAATAAATG	Dette arbeidet
MG62	F Δ <i>Janus::pbp1a^{HA}</i> hale til MG57	CATTTATTAGGTGGTAAAACAAGATGAAC AAACCAACGATTCTGC	Dette arbeidet
MG63	R Δ <i>Janus::pbp1a^{HA}</i> hale til MG58	CAGAAAAATCTGGGTGATAAATGTTATGG TTGTGCTGGTTGAGG	Dette arbeidet
MG58	F <i>pbp1a^{LA}</i>	CATTTATCACCCAGATTTTTCTG	Dette arbeidet

^{LA} vil si lavaffinitets, som betyr *pbp*-gen i penicillinresistent klinisk isolat av *S. pneumoniae* (MG3)

^{HA} vil si høyaffinitets, som betyr *pbp*-gen fra penicillinsensitiv *S. pneumoniae* RH425

F2. Peptider brukt i denne studien. Tabellen viser peptider som var benyttet i arbeidet med beskrivelse av funksjonen, samt aminosyresekvensen og leverandør.

Peptid	Beskrivelse	Aminosyresekvens	Leverandør
ComS	Induserer promoteren P _{comX} i comRS-systemet	N-LPYFAGCL-C	Research Genetics Inc
CSP-1	Induserer kompetanse hos <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	N-EMRLSKFFRDFILQRKK-C	Research Genetics Inc

Vedlegg

F3. Antibiotika, enzymer, kjemikalier og ferdiglagde buffere benyttet i denne studien. Tabellen viser navn på komponenten og eventuell kjemisk formel, produktnummer og leverandør.

Navn	Produktnummer	Leverandør
1 kb DNA ladder	N0468	New England Biolabs
5x Phusion High Fidelity Buffer	B0518S	New England Biolabs
Aceton	1.00014.2500	Merck
Acetonitril (ACN) - HC ₃ CN	271004	Sigma-Aldrich
Adenosin - C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	A9251	Sigma-Aldrich
Agar pulver	20767.298	VWR
Agarose	15510-027	Invitrogen
Akrylamid - C ₃ H ₅ NO	BIAC41	Saveen Wener
Aktivt kull - C	1.020184.1000	Merck
Albumin/ BSA	A7906	Sigma-Aldrich
Ammonium persulfat (APS) - (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	A3678	Sigma-Aldrich
Bacto™ Todd Hewitt	249240	BD Diagnostic
Benzylpenicillin (Penicillin G) - C ₁₆ H ₁₇ N ₂ NaO ₄ S	13752	Sigma-Aldrich
Biotin - C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	19606	Sigma-Aldrich
Bis-akrylamid	0172	VWR
Bocillin™ FL penicillin - C ₃₀ H ₃₁ BF ₂ N ₅ NaO ₆ S	B13233	Invitrogen
Bromfenol blå - C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Sna	B-5525	Sigma-Aldrich
Casitone		
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	4026/4027/2028/4029	TaKaRa
Dikaliumfosfat - K ₂ HPO ₄	1.05099.1000	Merck
Dinatriumhydrogenfosfat - Na ₂ HPO ₄	1.06580.1000	Merck
DL-Dithiothreitol (DTT) - HSCH ₂ CH(OH)CH(OH)CH ₂ SH	D0632	Sigma-Aldrich
DNase	DN25	Sigma-Aldrich
Eddiksyre - CH ₃ COOH	1.00063.1011	Merck
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) - C ₁₀ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	20 296.360	VWR
Fosforsyre - H ₃ PO ₄	749K02794373	Merck
Gjærekstrakt	1.04086.0250	Merck
Glassull	1.04086.0250	Merck
Glukose 20 % - C ₆ H ₁₂ O ₆	10117gK	10117gK
Glutamin		
Glyserol 85 % - C ₃ H ₈ O ₃	1.04094.1000	Merck
Glysin - C ₂ H ₅ NO ₂	1.0421.1000	Merck
Hydrogenklorid - HCl	30721	Riedel-De Haën
Jern(II)sulfat - FeO ₄ S·7H ₂ O	44970	Fluka
Kaliumdihydrogenfosfat - KH ₂ PO ₄	1.05104.1000	Merck

Vedlegg

Kaliumklorid - KCl	1.04936.1000	Merck
Kalsiumklorid anhydrat - CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.02381.0500	Merck
Kalsiumpantotenat, HOCH ₂ C(CH ₃) ₂ CH(OH)CONHCH ₂ CH ₂ CO ₂ · 1/2Ca	P5155	Sigma-Aldrich
Kanamycin - C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ ·H ₂ O ₄ S	K4000	Sigma-Aldrich
Kobbersulfat - CuSO ₄ ·5H ₂ O	61240	Fluka
Kolinklorid - C ₆ H ₁₄ NO·Cl	C1879	Sigma-Aldrich
L-Asparagin monohydrat - C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ ·H ₂ O	A4284	Sigma-Aldrich
L-cystein hydroklorid monohydrat - C ₃ H ₇ NO ₂ S·HCl·H ₂ O	30130	Fluka
Litiumklorid - LiCl	203637	Sigma-Aldrich
L-Tryptofan - C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	T0254	Sigma-Aldrich
LytA	Isolert av Dr. Daniel Straume	
Magnesiumklorid heksahydrat – CIMg·6H ₂ O	63072	Fluka
Magnesiumsulfat - MgSO ₄	M2643	Sigma-Aldrich
Mangan(II)klorid terahydrat - MnCl ₂ ·4H ₂ O	31422	Riedel-de Haën
Mononatriumhydrogenfosfat – NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.06580.1000	Merck
N,N,N,N-tetrametyl etylene diamin (TEMED) - C ₆ H ₁₆ N ₂	T9281	Sigma-Aldrich
Natriumacetat - C ₂ H ₃ O ₂ Na	S3272	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS) - NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	05030	Fluka
Natriumhydroksid - NaOH	1.06469.1000	Merck
Natriumklorid - NaCl	S9625	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat - C ₃ H ₃ NaO ₃	P8574	Sigma-Aldrich
Nikotinsyre - C ₆ H ₅ NO ₂	72309	Fluka
peqGreen	PEQL37-501	Saveen Werner
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	M0530	New England BioLabs
Pyrodoksin hydroklorid - C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	95180	Fluka
Red Taq 2X Master Mix	5200300-1250	VWR
Riboflavin - C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	R7649	Sigma-Aldrich
RNase	R5503	Sigma-Aldrich
Sinksulfat - ZnSO ₄ ·7H ₂ O	96500	Fluka
Spectinomycin - C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇ ·2HCl·5H ₂ O	S9007	Sigma-Aldrich
Streptomycin - C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂ ·1.5H ₂ SO ₄	S6501	Sigma-Aldrich
Sukrose - C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	84100	Sigma-Aldrich
Tiaminhydroklorid - C ₁₂ H ₁₇ C ₁ N ₄ OS·HCl	T4625	Sigma-Aldrich
Trifluoroeddiksyre (TFA) - C ₂ HF ₃ O ₂	302031	Sigma-Aldrich
Triton® X-100 - C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n (n = 9-10)	X-100	Sigma-Aldrich
Trizma® Base	T1503	Sigma-Aldrich
Trypsin	93615	BioChemica
Uridin - C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	U6381	Sigma-Aldrich

Vedlegg

F4. Kit og utstyr brukt i dette arbeidet. Tabellen viser kit og utstyr brukt for dette arbeidet med beskrivelse av funksjon og bruk, modellnavn, samt produktnummer og leverandør.

Hva	Modellnavn	Leverandør/ produktnr.
Kit		
Ekstraksjon av DNA etter PCR eller gelelektroforese	NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel/ 74060.250
Utstyr		
Bildetaker for Bocillin FL	Azure Biosystem c400	Azure Biosystem
Bildetaker for gelelektroforese	Gel Doc™ XR+	BIO RAD
CO2-poser	AnaeroGen™ 3.5L Atmosphere Generation Systems	Thermo Scientific
FastPrep	FastPrep FP120	MP Biomedicals
Frysetørker og vakuumpumpe	Gel pump GP100	Savant
Gelelektroforese	Power PAC 200	BIO RAD
Gelelektroforese for SDS-PAGE	Power PAC 300	BIO RAD
Gelkammer for SDS-PAGE		BIO RAD
HPLC kolonne	Vydac 218TP C18	Grace Davison Discovery Sciences
HPLC maskin	Dionex UltiMate 3000	Thermo-Fisher Scientific
Mikroplateleser	Synergy H1 Hybrid Reader	BioNordika
Mikroplateleser	Hidex	Okolab
Mikroskop	Axio Observer Z1/LSM700	Zeiss
Mikrotiterplater	96-well polystyrene microtiter plates	Thermo Fischer Scientific/ 82.1581.001
PCR-maskin	ProFlex PCR system	Applied Biosystems by Life Technologies
PCR-maskin	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Sentrifuge	Avanti® J-26 XP	Beckman Coulter®
Sentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf
Sentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus
Spektrofotometer	Novaspec® II	Pharmacia Biotech
Spektrofotometer	Genesys 30 visible spectrophotometer	Thermo Scientific
Spektrofotometer	NanoDrop 2000 spectrophotometer	Thermo Scientific
Sterilskap	BioWizard SilverLINE	Kojair BlueSeries Technology
Syrevasket glasskuler (150-212 mesh)	G4649	Sigma-Aldrich
Vannbad	T100	GRANT
Varmeblokk	Ori-Block® OB-3	Techne

Vedlegg

F5. Tabell over programvarer benyttet for dette arbeidet. Tabellen viser navn på programvare og hvilket formål og bruk programvaren ble benyttet for i dette arbeidet.

Database/ programvare	Formål og bruk
Benchling	Primerdesign, sekvensalignment, visualisering og konstruksjon av DNA-sekvenser.
Fiji ImageJ	Redigering av mikroskopibilder
Geneious	Visualisering av genom fra helgenomsekvensering, prediksjon av gener.
Hidex Sense Plate Reader software sw v.1.3	Software for Hidex mikroplateleser
Gen5	Software for Synergy mikroplateleser
Image Lab™ 6.0 software	Software for Gel Doc™ XR+
cSeries Capture Software	Software for Azure Biosystem c400
BioRender	Program for tillaging av figurer
Microsoft Excel	Software for tillaging av MIC- og vekstkurver

F6. Oppskrifter på vekstmedier, buffere og diverse

F6.1. Løsninger for vekstmedier

F6.1.1. C- medium

ADAMS I

0,15 ml 0,5 mg/ml biotin

75 mg niktotinsyre

87,5 mg pyrodoxin hydroklorid

300 mg Kalsiumpantotenat

80 mg tiaminhydroklorid

35 mg riboflavin

Kjemikaliene listet over ble løst opp i dH₂O opptil 500 ml, og pH-justert til pH 7,0 ved bruk av enten NaOH eller HCl. Løsningen ble sterilfiltrert, og lagret ved 4 °C.

10 X ADAMS II

500 mg jern(II)sulfat

500 mg kobbersulfat

300 mg sinksulfat

200 mg Mangan(II)klorid terahydrat

10 ml konsentrert HCl

Kjemikaliene listet over ble løst opp i dH₂O opptil 100 ml. Løsningen ble sterilfiltrert, og lagret ved 4 °C.

ADAMS III

128 ml ADAMS I

3,2 ml 10 X ADAMS II

1,6 g L-asparagin monohydrat

160 mg kolinklorid

0,4 g kalsiumklorid anhydrat

16 g magnesiumklorid heksahydrat

Vedlegg

Kjemikaliene listet over ble løst opp i dH₂O opptil totalt 800 ml, og pH-justert til pH 7,6 ved bruk av enten NaOH eller HCl. Løsningen ble sterilfiltrert, og lagret ved 4 °C.

10 % gjærekstrakt

40 g gjærekstrakt

360 ml dH₂O

37% HCl

16 g aktivt kull

Løsningen ble mikset i 10 minutter før inkubering i 2 timer på 4 °C. Deretter ble løsningen filtrert over en kolonne pakket med glassull og celitt over natt. Løsningen ble så pH-justert til pH 7,8 med NaOH og sluttvolum justert til 400 ml med dH₂O.

Løsningen ble sterilfiltrert og lagret i alikvoter på 4 ml i -80 °C.

Pre C-medium

45 mg L-cystein hydroklorid

8 g natriumacetat

20 g casitone

24 mg L-tryptofan

34 mg dikaliumfosfat

Kjemikalene over ble løst opp i dH₂O opptil totalt volum på 4 liter. Løsningen ble autoklavert og lagret i romtemperatur.

C-medium

150 ml pre C-medium

1,5 ml 20% glukose

3,75 ml ADAMS III

110 µl 3% glutamin

2,25 ml 2% natriumpyruvat

95 µl 1,5 M sukrose

1,5 ml 2 mg/ml uridin adenosin

1,5 ml 8% albumin/ BSA

3,75 ml 10 % gjærekstrakt

Løsningen ble sterilfiltrert før bruk. Den ble lagret på 4 °C, og brukt innen et døgn.

F6.1.2. Todd Hewitt (TH)-plater

TH-medium ble laget ved at 30 g/L TH-medium og 12 g/L agar ble løst opp i dH₂O. Løsningen ble autoklavert og avkjølt på 55 °C vannbad, og eventuelt antibiotikum ble tilsatt. Deretter ble omtrent 20 ml TH-medium tilsatt per petriskål og størknet. TH-platene ble lagret ved 4 °C. Holdbarheten på TH-platene var omtrent 3-4 måneder med antibiotika, mens uten antibiotika var 6 måneder.

F6.2. Løsninger for merking av PBPer med Bocillin FL

1 M Tris-HCl buffer

15,15 g Tris base ble løst opp i 100 ml dH₂O, og pH-justert til pH 6,8 ved bruk av enten NaOH eller HCl til ønsket pH.

2 X SDS sample buffer

0,125 M Tris-HCl pH 6,8

4 % SDS

0,2 M DTT

Vedlegg

20 % glyserol

0,01 % bromfenol blå

Natriumfosfatbuffer med Triton X-100

20 mM natriumfosfatbuffer ble laget ved å løse opp 0,0033 g/ml natriumfosfat i dH₂O, og pH-justert til pH 7,2 ved bruk av enten NaOH eller HCl. Deretter ble 0,2 % Triton X-100 blandet ved pipettering med 20 mM natriumfosfatbuffer.

Fosfatbufret saltvann (PBS)

8 g natriumklorid

0,2 g kaliumklorid

1,44 g dinatriumhydrogenfosfat

0,24 g kaliumdihydrogenfosfat

800 ml dH₂O

Løsningen ble pH-justert til pH 7,4 ved bruk av enten NaOH eller HCl, før totalvolum ble justert til 1000 ml med dH₂O.

F6.3. Oppskrifter for SDS-PAGE og støpning av SDS-PAGE-gel

10 X Tris-glyserin running buffer

30 g 0,25 M Tris base

144 g 1,92 M glysin

50 ml 20 % SDS

Løsningen ble justert med dH₂O til et sluttvolum på 1 liter.

10 % separasjonsgel

6,42 ml 30% akrylamid (lagret ved 4 °C)

3,5 ml 2% bisakrylamid (lagret ved 4 °C)

5 ml 0,5 M Tris-HCl buffer pH 8,8

4,25 ml dH₂O

Avgasset med bruk av vakuumpumpe for å redusere mengden luft.

200 µl 10 % SDS

10 µl TEMED

200 µl 10 % APS (laget dagsfersk)

4 % stacking gel

1 ml 30 % akrylamid (lagret ved 4 °C)

550 µl 2 % bisakrylamid (lagret ved 4 °C)

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl buffer pH 6,8

5,7 ml dH₂O

Avgasset med bruk av vakuumpumpe for å redusere mengden luft.

50 µl bromfenol blå

200 µl 10 % SDS

5 µl TEMED

50 µl 10 % APS (laget dagsfersk)

Støpning av SDS-PAGE-gelen

SDS-PAGE-gelen brukt for dette eksperimentet er en diskontinuerlig gel, og består av en 10 % separasjonsgel og en 4 % stackinggel. Stackinggelen sørger for at alle proteinene er på samme nivå før separasjon, mens separasjonsgelen gir en god separasjon av proteinene med hensyn på størrelse for bedre visualisering. Gelen ble støpt i et støpekammer og består av to glassplater i et støpestativ. Først ble 10 % separasjonsgelen laget som beskrevet over, hvorav APS og TEMED ble tilsatt like før støpning siden de initierer polymerisering av gelen. Omtrentlig 3,2 ml av 10 % separasjonsgel ble applisert mellom glassplatene, og dH₂O ble applisert oppå gelen for å sørge for at overflaten på gelen var i vater. Etter 15-20 minutter var gelen polymerisert, og vannet fjernet. Dermed ble 4 % stackinggel støpt oppå 10 % separasjonsgelen. Løsningen for stackinggelen ble laget som beskrevet over, hvorav APS og TEMED tilsatt like før applisering i støpekammeret. Omtrent 1 ml 4 % stackinggel eller til det ble fylt opp mellom glassplatene ble applisert til støpekammeret, og kam med 10 brønner ble plassert mellom platene. Etter omtrent 20 minutter var gelen polymerisert, og kammene ble fjernet forsiktig. SDS-PAGE-gelen plassert mellom glassplatene ble tatt ut av støpestativet og plassert i kammer for gelelektroforese med 10 X Tris-glycin running buffer, og var da klar for bruk.

F6.4. Løsninger for celleveggisolering og

HPLC

0,1 M fosfatbuffer pH 7,0

57,7 ml 1 M Na₂HPO₄ og 42,3 ml 1 M NaH₂PO₄ til et sluttvolum på 100 ml.

Løsning A: 0,05 % TFA

250 µl TFA ble løst i dH₂O til et sluttvolum på 0,5 L.

Løsning B: 15 % ACN i 0,05 % TFA

250 µl TFA og 75 µl ACN ble løst i dH₂O til et sluttvolum på 0,5 L.

100 % metanol

Til lagring av kolonne for å forhindre uttørking.

F6.5. Diverse

6 X DNA loading buffer

60 mM Tris-HCl pH 8,1

6 mM EDTA

40 % sukrose

0,025 % bromfenol blå

dH₂O til ønsket sluttvolum

1 kb DNA ladder (50 mg/ml)

50 µl 1 kb DNA ladder

200 µl 10 X loading buffer

750 µl dH₂O

Vedlegg

50 X TAE-buffer

424 g Tris base

57,1 ml eddiksyre

100 ml 0,5 M EDTA

Komponentene over ble løst i 1 L dH₂O,
og pH-justert til pH 8,0 ved bruk av enten
NaOH eller HCl.

1 % agarosegel

4 g agarose ble løst i 400 ml TAE-buffer,
og varmet til all agarose var fullstendig løst
opp. Flytende agarosegel ble lagret på 50
°C. 50 ml agarose tilsatt 2 µl peqGREEN
overføres til gelkammer med kammer for
støpning av gelen.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway