



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2022 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Karakterisering av Fusiformicin; et nytt antimikrobielt stoff med aktivitet mot *Streptococcus pneumoniae***

Characterization of Fusiformicin; a novel  
antimicrobial molecule with activity against  
*Streptococcus pneumoniae*

Vilde Sandegren

Bioteknologi

# Forord

Denne oppgaven er utarbeidet som en del av masterprogrammet i bioteknologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) hos forskningsgruppen for Molekylær Mikrobiologi (MolMik) ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Oppgaven utgjør 60 stp av mastergraden.

De siste åtte månedene har vært en ypperlig blanding av moro og stress. Aldri har jeg lært så mye som jeg har gjort under arbeidet med denne oppgaven. Flere ganger har jeg gått fra den frustrerende følelsen som kommer av stagnerende resultater, til den fantastiske følelsen av å få til noe for første gang.

Jeg vil gjerne takke min veileder, Dr. Daniel Straume, for å dele sin kunnskap og sine erfaringer, og for tålmodigheten til å forklare igjen de gangene jeg ikke forsto. Takk til min medveileder Dr. Morten Kjos og til Zhian Salehian for all hjelp på laben og oppmuntrende ord underveis. Jeg vil også takke alle i forskningsgruppen for hyggelig selskap og god stemning på laben.

Jeg vil selvsagt takke familien min, mamma, pappa og søster, som alltid heier på meg og motiverer meg til å yte mitt beste. Til slutt vil jeg takke mine beste venner for å ta meg med ut og danse når de synes jeg hadde sittet for lenge ved tastaturet.

Jeg er én verdifull erfaring og en hel masse kunnskap rikere enn jeg var tidligere og for det er jeg takknemlig.

# Sammendrag

Antibiotikaresistens regnes som et av de største problemene som verden står ovenfor i dag i forhold til global helse, matsikkerhet og utvikling. Det arbeides med å finne nye antibiotika med aktivitet mot bakterier som bidrar til resistensproblemet. Dette inkluderer *Streptococcus pneumoniae*, en viktig humanpatogen bakterie med iboende evne til å tilegne seg gener for resistens. I 2020 ble det antimikrobielle stoffet Fusiformicin oppdaget. Fusiformicin produseres av *Lysinibacillus fusiformis* og har smalspektret aktivitet hovedsakelig mot streptokokker. Stoffets aktivitet har vist direkte sammenheng med peptidtransportsystemet Ami. I denne oppgaven ble det gjort arbeid for å karakterisere stoffet og finne innledende svar på stoffets virkningsmekanisme på *S. pneumoniae*.

Med proteinase K-behandling og *S. pneumoniae*-overlay, ble det funnet at Fusiformicin er et peptid, trolig et klasse I- eller II-bakteriosin. Ved å bekrefte uttrykk av AmiE<sup>(D184A)</sup> og AmiF<sup>(D190A)</sup> (punktmutasjon i Walker B-motivet) i *S. pneumoniae* med et immunoblott, ble det basert på tidligere resultater vist at Fusiformicin trenger aktiv form av AmiCDEF for å fungere. Med mutasjon av aminosyrer (S503 og W504) viktige for peptidbinding i AmiA ble det vist at AmiA ikke er nødvendig for Fusiformicins virkning på *S. pneumoniae*. Likevel viste ektopisk uttrykk av villtype AmiA at proteinet kan bistå i økning av Fusiformicins aktivitet. Motsigende resultater i forhold til Fusiformicins virkningsmekanisme viser til et behov for flere tester for å få svar på om stoffet virker ekstra- eller intracellulært. Dog, dersom virkningsmekanismen er intracellulær ble det tydelig at den ikke er lik virkningsmekanismen til ampicillin eller ciprofloksasin, siden celler behandlet med disse antibiotikumene hadde signifikante endringer i morfologi sammenliknet med Fusiformicin-behandlede celler. Predikasjon av AmiA 3D-struktur viste at proteinet har en peptidbindende kløft med konserverte aminosyrer viktig for peptidbinding lik det homologe proteinet OppA fra *L. lactis*. Til slutt ble det funnet at AmiACDEF virket toksisk på *E. coli*, som gjorde at det ikke var mulig å introdusere Ami i andre Gram-positive bakterier slik det var tenkt. Videre arbeid bør inkludere rensing av Fusiformicin til >95% renhet slik at aminosyresekvensen til peptidet (og tilhørende genssekvens) kan avdekkes.

# Abstract

Antibiotic resistance is considered one of the biggest problems that the world faces today related to global health, food security and development. Efforts are being made to find new antibiotics with activity against bacteria that contribute to the resistance problem. This includes *Streptococcus pneumoniae*, an important human pathogenic bacterium with an inherent ability to acquire resistance genes. In 2020, the antimicrobial compound Fusiformicin was discovered. Fusiformicin is produced by *Lysinibacillus fusiformis* and has narrow-spectrum activity mainly against streptococci. The activity of the substance has shown a direct connection with the peptide transport system Ami. In this thesis, work was done to characterize the substance and find an initial answer to the substance's mechanism of action on *S. pneumoniae*.

With proteinase K treatment and an *S. pneumoniae* overlay, it was found that Fusiformicin is a peptide, probably a class I or II bacteriocin. By confirming expression of AmiE<sup>(D184A)</sup> and AmiF<sup>(D190A)</sup> (point mutation in the Walker B motif) in *S. pneumoniae* with an immunoblot, it was shown based on previous results that Fusiformicin requires the active form of AmiCDEF to have antimicrobial activity. With mutation of amino acids (S503 and W504) important for peptide binding in AmiA, it was shown that AmiA is not necessary for the action of Fusiformicin on *S. pneumoniae*. Nevertheless, ectopic expression of wild-type AmiA showed that the protein may assist in increasing the activity of Fusiformicin. Due to contradictory results in relation to the mechanism of action of Fusiformicin, several tests must be performed to obtain an answer as to whether the substance acts extra- or intracellularly. However, if the mechanism of action is intracellular, it became clear that it is not similar to the mechanism of action of ampicillin or ciprofloxacin, since cells treated with these antibiotics showed significant different morphological changes compared with Fusiformicin treated cells. Prediction of AmiA 3D structure showed that the protein has a peptide binding cleft with conserved amino acids important for peptide binding similar to the homologous protein OppA from *L. lactis*. Finally, AmiACDEF was found to be toxic to *E. coli*, making it difficult to introduce Ami into other Gram-positive bacteria as intended. Further work should include purification of Fusiformicin to >95% purity so that the amino acid sequence of the peptide (and associated gene sequence) can be detected.

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning.....</b>	<b>1</b>
1.1	Antibiotika.....	1
1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
1.3	Ny antibiotika.....	7
1.4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> .....	8
1.4.1	Fusiformicin.....	9
1.5	Bakteriosiner.....	10
1.6	Ami-systemet i <i>S. pneumoniae</i> .....	13
1.7	Mål med oppgaven.....	14
<b>2</b>	<b>Materialer.....</b>	<b>15</b>
2.1	Stammer.....	15
2.2	Primere.....	16
2.3	Enzymer, peptider, nukleotider, fargestoffer, antistoffer og størrelsesstandarder.....	17
2.4	Antibiotika.....	18
2.5	Plasmider.....	18
2.6	Kits.....	18
2.7	Utstyr.....	19
2.8	Oppskrifter på vekstmedium og buffere.....	19
2.8.1	C-medium.....	19
2.8.2	Todd Hewitt (TH) medium.....	21
2.8.3	Luria Bertani (LB) medium.....	22
2.8.4	Løsninger og buffere til agarose gelelektroforese.....	22
2.8.5	Løsninger til mikroskopering.....	23
2.8.6	Løsninger til SDS-PAGE og blotting.....	23
<b>3</b>	<b>Metoder.....</b>	<b>25</b>
3.1	Rensing og karakterisering av Fusiformicin.....	25
3.1.1	Produksjon av Fusiformicin.....	25
3.1.2	Anrikning av Fusiformicin med Amberlite® XAD16N hydrofobe kuler.....	25
3.1.3	Soft-agar overlay-analyse.....	26
3.1.4	antiISMASH- og BAGEL4-analyse.....	26
3.1.5	Tester for karakterisering av Fusiformicin.....	27
3.2	Prediksjon av 3D-strukturen til AmiA.....	28
3.3	Mutasjon av AmiA i <i>S. pneumoniae</i> .....	28
3.3.1	Transformasjon av <i>S. pneumoniae</i> .....	29
3.3.2	Polymerase Chain Reaction.....	29
3.4	Proteindeteksjon.....	37
3.4.1	SDS-PAGE.....	37
3.4.2	Western blot.....	37
3.4.3	Immunodeteksjon.....	38

3.5	<i>Minimum Inhibitory Concentration (MIC)</i> .....	39
3.6	<i>Mikroskopi</i> .....	39
3.6.2	<i>Sytox-analyse</i> .....	40
3.6.3	<i>Subkloning i E. coli</i> .....	41
<b>4</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>45</b>
4.1	<i>Anriktet Fusiformicin viste hemmende aktivitet mot S. pneumoniae</i> .....	45
4.2	<i>Fusiformicin er et peptid eller varmestabilt protein</i> .....	46
4.3	<i>L. fusiformis-genomet koder ikke for kjente antimikrobielle stoffer</i> .....	50
4.4	<i>Punktmutert AmiEF er stabile in vivo</i> .....	51
4.5	<i>Predikasjon av AmiA proteinstruktur</i> .....	52
4.6	<i>Oppregulering i ekspresjon av amiA gir økt sensitivitet for Fusiformicin i S. pneumoniae</i> .....	54
4.7	<i>Forsøk på å sensibilisere andre Gram-positive bakterier for Fusiformicin</i> .....	57
4.8	<i>Bestemmelse av relativ MIC for Fusiformicin</i> .....	58
4.9	<i>Fusiformicin interferer ikke med integriteten til cellemembranen hos S. pneumoniae</i> .....	59
4.10	<i>Morfologi til S. pneumoniae behandlet med Fusiformicin og antibiotika med kjent virkningsmekanisme</i> .....	61
<b>5</b>	<b>Diskusjon</b> .....	<b>64</b>
5.1	<i>Fusiformicin – klasse I- eller II-bakteriosin?</i> .....	64
5.2	<i>Transporteres Fusiformicin inn i cellen eller ikke?</i> .....	66
5.2.1	<i>Poredannelse kan ikke utelukkes som virkningsmekanisme</i> .....	67
5.2.2	<i>Fusiformicins virkningsmekanisme kan være i cytoplasma</i> .....	68
5.2.3	<i>Deteksjon av Flag-tagget AmiA og AmiA<sup>S503A, W504A</sup></i> .....	68
5.2.4	<i>Fusiformicin inhiberer ikke cellevegg- eller DNA-syntese</i> .....	69
5.3	<i>amiACDEF er toksisk for E. coli</i> .....	71
5.4	<i>Predikert 3D-struktur for AmiA</i> .....	73
<b>6</b>	<b>Konklusjoner og videre arbeid</b> .....	<b>74</b>
6.1	<i>Konklusjoner</i> .....	74
6.2	<i>Videre arbeid</i> .....	74
<b>7</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Appendiks 1 – Nukleotid- og aminosyresekvens for AmiA</b> .....	<b>82</b>
8.1	<i>amiA nukleotidsekvens</i> .....	82
8.2	<i>AmiA aminosyresekvens</i> .....	82
8.3	<i>Aminosyresekvens brukt for strukturpredikasjon av AmiA (uten signalsekvensen)</i> .....	83
8.4	<i>amiA nukleotidsekvens med punktmutasjoner</i> .....	83
8.5	<i>AmiA aminosyresekvens med punktmutasjoner</i> .....	84

# 1 Innledning

## 1.1 Antibiotika

Antibiotika er organiske molekyler som kan både drepe og hemme mikroorganismer ved lave konsentrasjoner. Oppdagelsen av antibiotika har revolusjonert det medisinske feltet. Tidligere dødelige bakterielle infeksjoner kan nå enkelt behandles med antibiotika. Dette har ført til at forventet levealder har gått opp og barnedødelighet har gått ned. Antibiotika er i tillegg absolutt nødvendig for kirurgiske operasjoner og behandlinger som for eksempel cellegift (Blair et al., 2015). Penicillin var det første antibiotikumet som ble oppdaget da Alexander Fleming ved en tilfeldighet kom over muggsoppen *Penicillium Rubens* i 1929. Fleming mottok en Nobelpris i 1945 for oppdagelsen til tross for at muggsoppen hadde entret laboratoriet hans ved en tilfeldighet. «Noen ganger finner man det man ikke leter etter» sa Fleming (Fleming, 1980; Houbraken et al., 2011; Sand, 2019). Stoffet ble først tatt i bruk under andre verdenskrig, en tid hvor man trengte medisinen sårt (Lobanovska & Pilla, 2017). I årene etter fulgte oppdagelsen av flere antibiotika, og man gikk inn i det man kan kalle antibiotikas gyldne tidsalder (1940-årene til midten av 1960-årene). Det var i denne perioden man oppdaget dagens viktigste antibiotika som i hovedsak har aktivitet mot bakterier, og deres virkningsmekanismer (Wencewicz, 2016).

Et av grunnprinsippene til et antibiotikum er at det skal hemme en essensiell prosess hos mikroorganismen, men samtidig ha lav toksisitet for individet som behandles (mennesker og dyr). Dagens antibiotika har ofte en av følgende virkningsmekanismer: inhibering av enten (i) celleveggsyntese, (ii) proteinsyntese eller (iii) DNA/RNA-syntese (Blair et al., 2015). De fleste antibiotika er enten naturlige produkter fra mikroorganismer, semi-syntetiske stoffer laget ved modifisering av naturlige produkter eller syntetiske produkter basert på strukturen til naturlige produkter. **Tabell 1** viser en oversikt over et utvalg antibiotikatyper, deres mål for angrep og hvilken essensiell prosess de inhiberer. De viktigste mikrobielle antibiotika i klinisk bruk inkluderer  $\beta$ -laktamer, kloramfenikol (fenikol), makrolider, aminoglycosider, glykopeptider og tetrasykliner. Tetrasykliner er en antibiotikaklasse som spilte en viktig rolle i antibiotikas gyldne tidsalder tatt i betraktning at klortetrasyklin og oksytetrasyklin (tetrasykliner) ble de første kjente bredspektrede antibiotikaene, oppdaget i henholdsvis 1948 og 1950 (Demain, 2014). Likevel til tross for antibiotikas bidrag til den medisinske revolusjonen, står verden nå ansikt til ansikt med et stort bakterielt problem; flere og flere sykdomsfremkallende bakterier blir resistente mot eksisterende antibiotika.

**Tabell 1:** Oversikt over ulike klasser av antibiotika og deres virkningsmekanismer (Blair et al., 2015).

Type antibiotika	Inhiberer	Angrepsmål
Rifamyciner	RNA-syntese	DNA-avhengig RNA polymerase
Fluorokinoloner	DNA-syntese	Topoisomerase II og IV
Trimetoprim-sulfametoksazol	DNA-syntese	Tetrahydrofolsyresynteseinhibitor
$\beta$ -laktamer	Celleveggsyntese	Penicillin-bindene proteiner
Glykopeptider og glykolipopeptider	Celleveggsyntese	Peptidoglykan-enheter
Lipopeptider	Celleveggsyntese	Cellemembranen
Tetrasykliner	Proteinsyntese	30S ribosom
Aminoglykosider	Proteinsyntese	30S ribosom
Makrolider	Proteinsyntese	50S ribosom
Streptograminer	Proteinsyntese	50S ribosom
Fenikoler	Proteinsyntese	50S ribosom

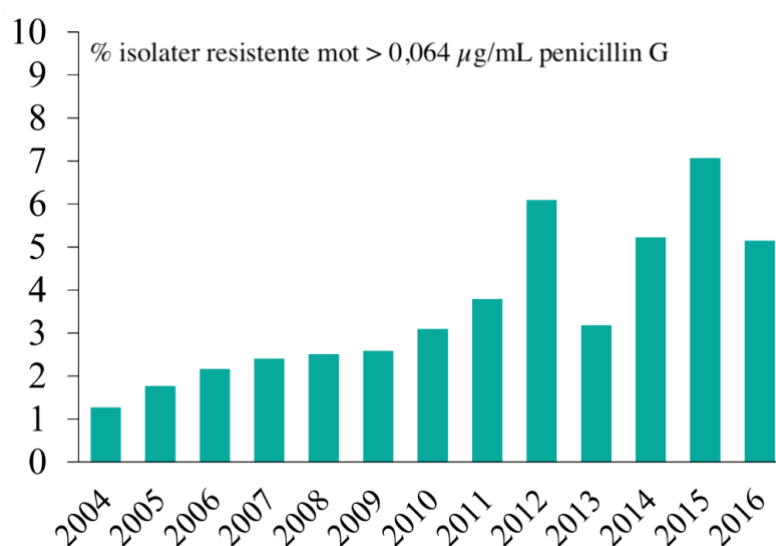
I 2009 erklærte Verdens helseorganisasjon (World Health Organization, WHO) antibiotikaresistens en av de tre største truslene for menneskers helse (Piddock, 2012). I 2015 er det estimert at ca. 25 000 mennesker dør hvert år i Europa som et resultat av multiresistente bakterielle infeksjoner (Blair et al., 2015). Noen av bakteriene som er vanskeligst å behandle inkluderer MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) og ESBL (Extended  $\beta$ -lactamase-produserende bakterier). Bakteriene har lenge skapt store utfordringer i sykehus over hele verden. I tillegg forekommer de hyppigere nå enn før i samfunnspopulasjoner. Disse bakteriene er blant annet resistente mot  $\beta$ -laktamer, en av de viktigste typene antibiotika vi har (Kolendi, 2009; Palmeira, 2020). Resistens oppnås ved at bakteriene på ulike måter klarer å unngå antibiotikas ødeleggende effekt.

Det finnes tre hovedmekanismer for antibiotikaresistens. Den første mekanismen går ut på å hindre antibiotikaen fra å nå målet sitt ved at bakterien driver redusert opptak, eller økt utpumping av antibiotikaen. Den andre mekanismen er å modifisere målet til antibiotikaen slik at antibiotikaen ikke kan binde seg like effektivt. Modifikasjonen må være liten nok til at målet fortsatt beholder sin biologiske funksjonalitet. Dette kan enten gjøres direkte genetisk eller ved modifisering av målet uten å endre målets genetiske kode, for eksempel ved metylering (Blair et al., 2015). Dette er mekanismen MRSA bruker. MRSA uttrykker alternative versjoner av de proteinene som  $\beta$ -laktamer normalt hemmer, og blir på den måten resistente (Kolendi, 2009). Den tredje mekanismen virker direkte mot antibiotikaen, enten ved å ødelegge via enzymatisk hydrolyse, eller ved å modifisere antibiotikaen slik at den mister sin funksjon (Blair et al., 2015). ESBL-bakterier produserer  $\beta$ -lactamase – et enzym som



bryter ned et bredt spekter av ulike  $\beta$ -laktamer (Palmeira, 2020). Dette er et eksempel på en mekanisme som virker direkte mot antibiotikumet. De tre resistensmekanismane kan være iboende i bakterien, eller de kan tilegnes gjennom seleksjonspress (Blair et al., 2015).

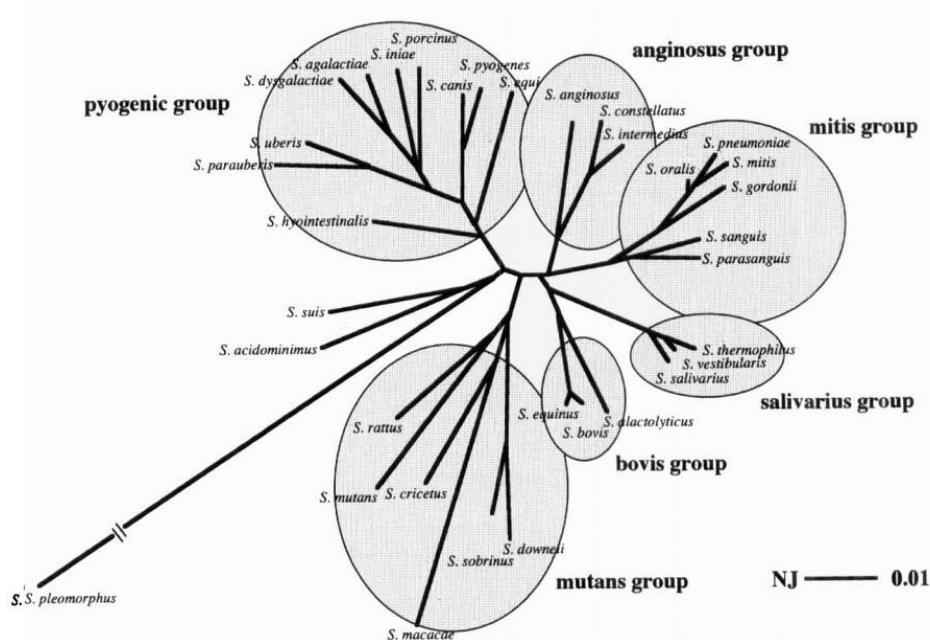
Utfordringen vi står ovenfor i dag er et resultat av bakterienes evne til å tilpasse seg forholdene rundt seg. Behandling av infeksjoner med antibiotika og bruk av antibiotika i landbruket utsetter bakteriene for et ekstremt seleksjonspress der de må endre genomet sitt for å overleve. Slike endringer kan skje spontant, eller resistensgener kan tas opp av bakterien via horisontal genoverføring. Sistnevnte kan skje enten ved hjelp av konjugasjon via pili, transduksjon via bakteriofager eller transformasjon der nakent DNA tas opp direkte fra omgivelsene. Noen bakterier har også evnen til å utføre naturlig transformasjon. Disse bakteriene defineres som naturlig kompetente og kan tilegne seg antibiotikaresistens-gener ved å ta opp DNA fra omgivelsene eller fra andre bakterier som har resistensgener i seg. En av de viktigste humanpatogene bakteriene, *Streptococcus pneumoniae* (også kalt pneumokokker), kan bli naturlig kompetent. Den har spesialisert seg på nettopp å ta opp gener fra andre allerede resistente bakterier for selv å oppnå resistens. I tillegg gjør naturlig kompetanse at resistensgener effektivt spres mellom ulike pneumokokkstammer. Antall penicillinresistente pneumokokkisolater har vært økende i mange deler av verden i mange år, mens i Norge har det vært lav forekomst av resistens frem til ca. år 2000. Siden da har det også i Norge vært en økende trend av resistente pneumokokker (**Figur 1**) (Straume et al., 2015; Wencewicz, 2016).



**Figur 1:** Utbredelse av penicillin non-susceptible (PNS) pneumokokkisolater i Norge fra 2004-2016. Figuren er basert på tall fra FHI (2022).

## 1.2 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* er en Gram-positiv bakterie som hører til i genuset *Streptococcus* som er inndelt i seks undergrupper; mitis, anginosus, salivarius, mutans, pyogenic og bovis (**Figur 2**). *S. pneumoniae* er medlem av mitis-gruppen (Kawamura et al., 1995). Denne bakterien er fakultativ anaerob, elipseformet og vokser best på 37 °C. Bakterien vokser i kjeder, men finnes ofte også som diplokokker (Hardie & Whiley, 1997). *S. pneumoniae* er en av de viktigste humanpatogene bakteriene og har av den grunn vært mye studert og blitt en modellorganisme innen bakteriologisk og molekylærbiologisk forskning. Forskning på *S. pneumoniae* ledet til oppdagelsen av at DNA er arvestoffet, som bestemmer egenskapene til en organisme. Viktig kunnskap om peptidoglykansyntese og celledeling i bakterier har også kommet fra forskning på denne bakterien. Den har ført til utviklingen av polysakkaridvaksiner og en forståelse for antibiotikaresistens. Til tross for pneumokokkens bidrag til vitenskapen er dens patogene natur en byrde for samfunnet. Denne bakterien forårsaker mer sykdom og dødelighet på verdensbasis enn noen annen infeksjon (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). Særlig barn, eldre og personer med svekket immunforsvar er utsatte grupper, og bakterien forårsaker store belastninger på helsevesenet over hele verden (Brissac et al., 2021).



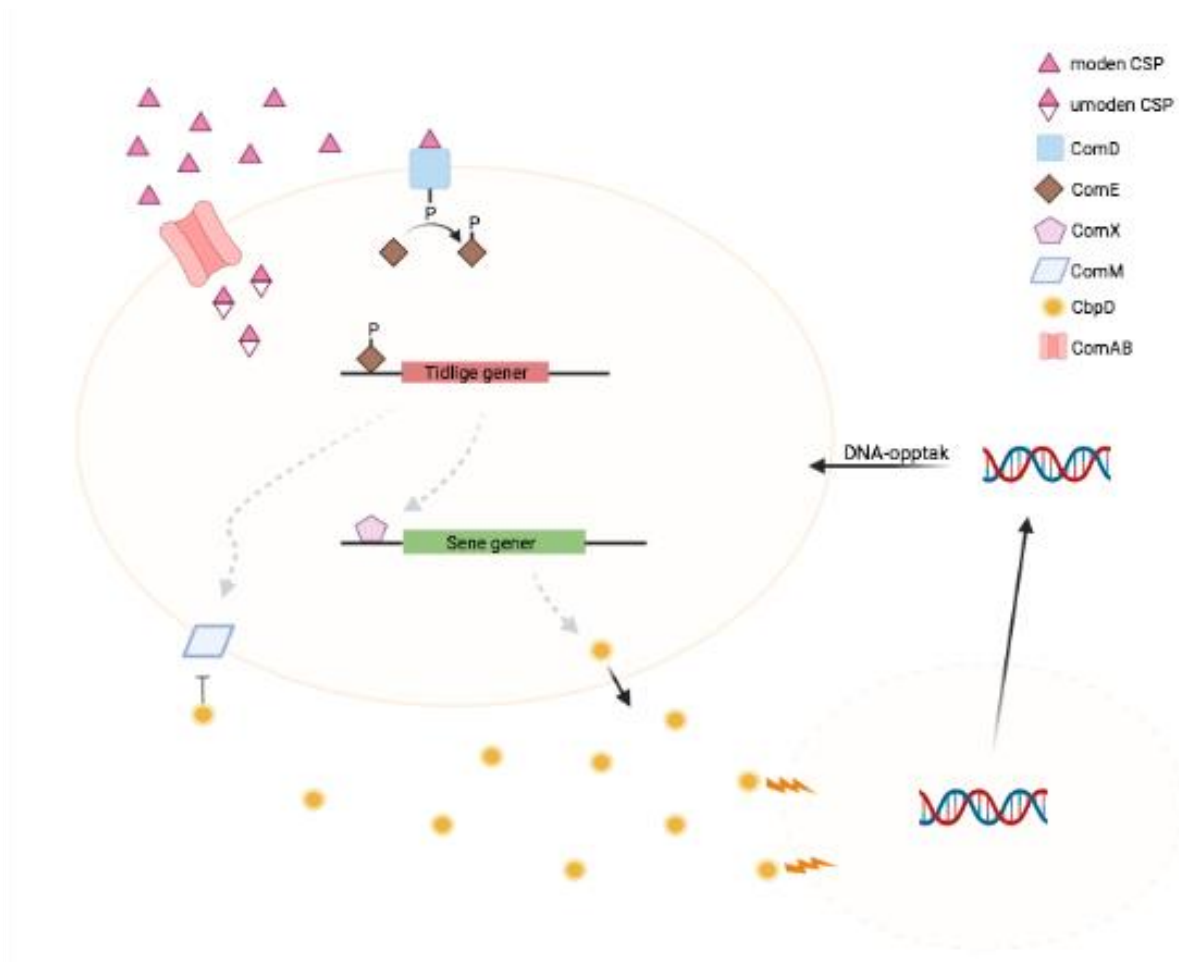
**Figur 2:** Fylogenetisk tre som viser de seks hovedgruppene i genuset *Streptococcus*. Figuren er hentet fra Kawamura et al. (1995).

*S. pneumoniae* koloniserer øvre luftveier hos mennesker, hvor den under rette betingelser kan føre til lungebetennelse, mellomørebetennelse, bihulebetennelse og i verste fall sepsis eller hjernehinnebetennelse (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013; Jacobs, 2004). Blant barn under fem

år er det estimert at pneumokokker hvert år forårsaker 15 millioner alvorlige sykdomstilfeller i verden hvor 1-2 millioner av disse fører til dødsfall (Bogaert et al., 2004; Kadioglu et al., 2008; Klein, 1999). Det totale antall infeksjoner hos mennesker er dog langt høyere. Sykdom forårsaket av pneumokokker kan være invasiv eller ikke-invasiv. Med invasiv sykdom menes det sykdom som følger av at pneumokokken har entret blodstrømmen eller et annet ellers sterilt område (Drijkoningen & Rohde, 2014). Dødelighet assosiert med invasiv sykdom ligger på 5-35% avhengig av alder og infeksjonssted (Martens et al., 2004). Forskjeller i polysakkaridkapselen som omslutter bakterien utgjør ulike serotyper. Kapselen hjelper pneumokokken med å unngå fagocytose av de hvite blodcellene ved hjelp av sterisk hindring, noe som gjør kapselen til en av bakteriens viktigste virulensfaktorer (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). Det finnes 100 ulike serotyper av pneumokokker, men mer enn 90% av invasive tilfeller er forårsaket av 25-30 ulike serotyper (Brissac et al., 2021; Martens et al., 2004). Kapselen er det som fungerer som mål for antigener både naturlig og ved vaksiner (Jacobs, 2004). Bakterien har evnen til å tilegne seg fordelaktige endringer i kapselen, i tillegg til andre gunstige modifikasjoner, som bidrar enormt til pneumokokkens virulens og evne til å unngå vaksiner.

Som tidligere nevnt er *S. pneumoniae* naturlig kompetent for genetisk transformasjon, noe som gir den evnen til å ta opp DNA fra sine omgivelser og integrere det i sitt genom dersom DNAet er tilstrekkelig homologt. Faktisk var det i *S. pneumoniae* at naturlig kompetanse først ble oppdaget (Griffith, 1928; Johnston et al., 2014). I *S. pneumoniae* reguleres kompetanse hovedsakelig av fem proteiner, ComABCDE, hvor ComCDE fungerer som et quorum-sensing-basert to-komponentsystem (**Figur 3**). ComC er et umodent signalmolekyl som sekreteres av ABC-transporteren ComAB. Under transporten fjerner ComA en dobbel-GG-ledersekvens fra ComC slik at det modne signalmolekylet kalt competence stimulating peptide (CSP) dannes. Når akkumuleringen av ekstracellulært CSP når en kritisk konsentrasjon induseres kompetanse i cellen. Det er membranproteinet ComD som overvåker nivået av CSP utenfor cellen. Ved binding av CSP til ComD autofosforyleres det cytoplasmiske kinasedomenet til ComD. Denne fosforylgruppen overføres til responsregulatoren ComE, og ComE aktiveres og binder til spesifikke DNA sekvenser som finnes i promotorene til såkalte tidlige kompetansegener. Fosforylert ComE bundet til promotorene rekrutterer så RNA-polymerasen som vil initiere transkripsjon av de tidlige kompetansegenene, inkludert *comABCDE*, *comM* og *comX*. ComX er en alternativ sigmafaktor som aktiverer transkripsjonen av flere såkalte sene kompetansegener. Dette er gener involvert i fratricid, DNA-opptak og homolog rekombinasjon. Fratricid er en mekanisme der den kompetente cellen lyserer ikke-kompetente, nært beslektede celler ved å sekretere en mureinhydrolase kalt CbpD (kodet av et sent kompetansegen). ComM er et protein som beskytter

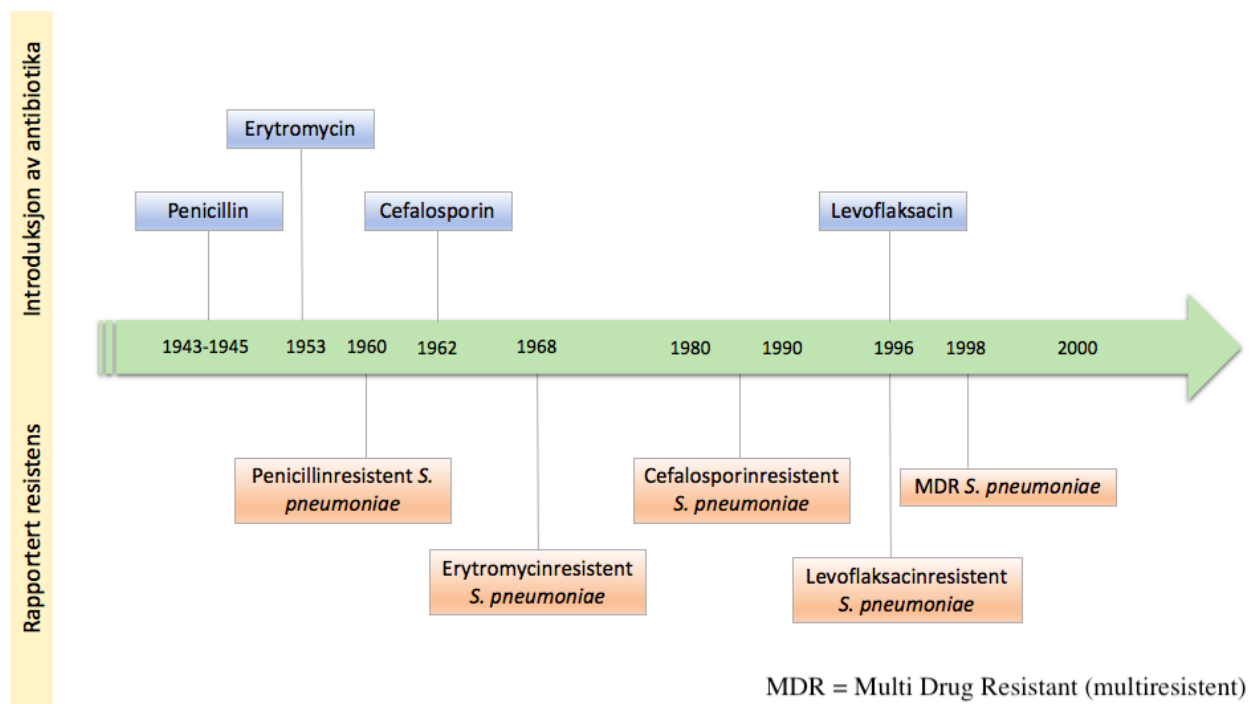
den kompetente cellen mot sitt eget CbpD. Ved å ødelegge andre celler i nær slekt kan pneumokokken ta opp frigjort homologt DNA og inkorporere det i sitt eget genom. Denne mekanismen gjør det enkelt for pneumokokken å tilegne seg nye gener eller genalleler, inkludert gener for antibiotikaresistens (Straume et al., 2015).



**Figur 3:** Enkel fremstilling av signalveien (ComABCDE) som induserer kompetanse og fratricidmekanismen i *S. pneumoniae*. Konsentrasjonen av ekstracellulært CSP monitoreres av ComD. Interaksjon mellom CSP og ComD fører til autofosforylering av ComD. Fosforylgruppen overføres til ComE som aktiveres og induserer transkripsjon av tidlige kompetansegener. Akkumulering av ekstracellulært CSP vil føre til mer fosforylert ComE som igjen resulterer i en autokatalytisk loop som raskt øker uttrykk av tidlige kompetansegener. Det tidlige kompetanseproteinet ComX vil videre skru på alle gener som er nødvendig for at bakterien skal bli naturlig kompetent. Figuren er laget i BioRender.com.

Mot slutten av 60-tallet ble penicillinresistens i pneumokokken først oppdaget, og omtrent ti år senere fant man pneumokokker med høy grad av resistens (Straume et al., 2015). Siden den tid har isolater med andre typer antibiotikaresistens dukket opp med jevne mellomrom (**Figur 4**). Det ble så funnet en

enda større trussel enn  $\beta$ -laktam-resistente pneumokokker, som er multiresistente pneumokokker. Multiresistens i pneumokokker defineres som resistens mot tre eller flere klasser av antibiotika, og innebærer som regel redusert følsomhet for  $\beta$ -laktamer, makrolider, tetrasykliner og sulfonamider. Utbredelsen av multiresistente pneumokokker er estimert til å være høy, fra 36% i Asia og 15% i Europa (Fong et al., 2018). Multiresistente stammer har også blitt funnet i land med lav resistensrate, for eksempel i Sverige (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). Dersom trenden fortsetter i årene fremover, er det helt nødvendig med nye løsninger for å bekjempe bakterielle infeksjoner.



**Figur 4:** Tidslinje for introduksjon av ulike antibiotika og første rapporterte respektive resistens i pneumokokker (Fong et al., 2018).

### 1.3 Ny antibiotika

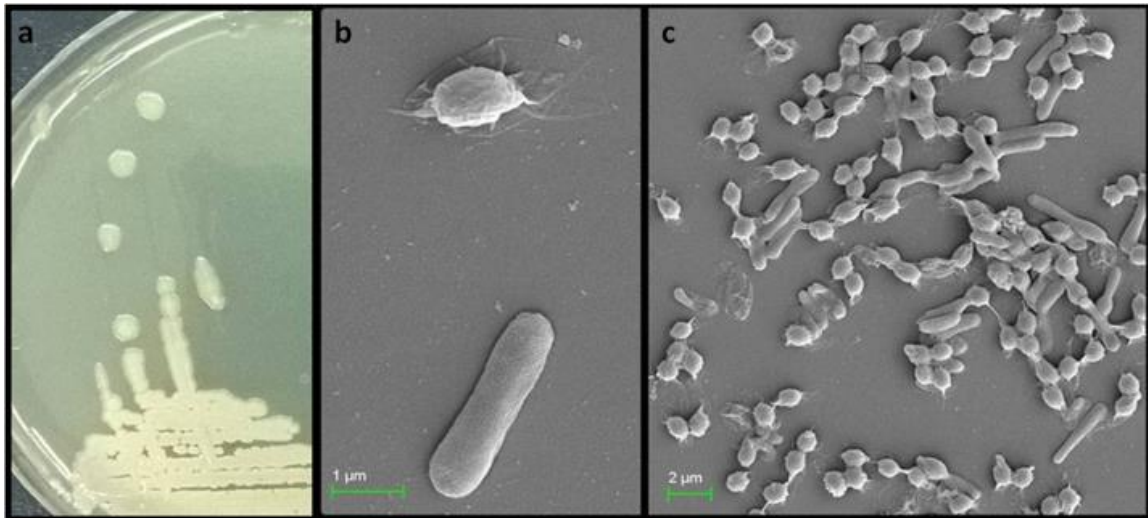
Utvikling av vaksiner og antibiotika har reddet millioner av mennesker fra dødelige bakterielle infeksjoner, men det observeres stadig tilfeller der pneumokokker infiserer vaksinerte personer. Pneumokokkene har evne til å endre sammensetningen av sin ytre polysakkaridkapsel ved naturlig transformasjon for å unngå vaksinerne. Sammen med økt grad av resistens mot antibiotika, skaper vaksineunnvikelse store utfordringer for helsevesenet, som også resulterer i en betydelig økonomisk kostnad for samfunnet. En optimal løsning vil være å utvikle en effektiv vaksine, som pneumokokker

ikke kan unnvike ved mutasjon (Henriques-Normark & Tuomanen, 2013). I mellomtiden trenger vi nye antibiotika.

I antibiotikas gylne tidsalder var veien til oppdagelse av nye antibiotika dominert av Waksman-plattformen. Dette gikk ut på å dyrke bakterier og sopp funnet i naturen under laboratoriske forhold for produksjon av metabolitter som så kunne testes for deres antimikrobielle aktivitet. Naturlige produkter har gjennom evolusjon tilegnet seg fordeler som for eksempel høy affinitet til- og evnen til å nå biologiske mål. I nærmere 75 år har Waksman-liknende metoder ført til oppdagelsen av ~20 000 mikrobielle metabolitter. Flestparten av disse ble isolert fra bakterier og sopp fra jord. Dette peker mot et stort potensial for nye oppdagelser i utforskede miljøer, for eksempel i det marine miljøet. Det er estimert at mindre enn 1% av alle mikrober fra miljøet på jorden har blitt kultivert i laboratorier. Grovt sett støtter dette muligheten for at mer enn 99% av verdens antibiotika står uoppdaget. Av de ~20 000 kjente naturlige metabolittene med antimikrobiell aktivitet har kun en liten andel blitt testet med hensikt om å utvikle nye medisiner (Wencewicz, 2016). I et tidligere arbeid utført i forskningsgruppen Molekylær Mikrobiologi har bakterielle prøver fra Oslofjorden blitt dyrket i laboratoriet, og deretter blitt screenet for produksjon av antimikrobielle stoffer som hemmer *S. pneumoniae* ((Hauge, 2020)). Det ble funnet flere bakterier med hemmende effekt mot *S. pneumoniae*, men særlig et isolat utmerket seg. Sekvensering av 16S rRNA genet identifiserte bakterien *Lysinibacillus fusiformis*.

## 1.4 *Lysinibacillus fusiformis*

*L. fusiformis* er en Gram-positiv, mesofil, stavformet jordbakterie (Ahmed et al., 2007; Pudova et al., 2018). Bakterien er mobil, aerob og den danner inaktive sporer som er motstandsdyktige mot høye temperaturer, UV lys og skadelige kjemikalier (Passera et al., 2021). Bakterien var tidligere medlem av genuset *Bacillus* før den i 2007 ble reklassifisert i det nye genuset *Lysinibacillus*. Det var på grunn av celleveggenes innhold av spesifikke aminosyrer som alanin, lysin, glutaminsyre og asparbinsyre (Ahmed et al., 2007; Khadka et al., 2020).



**Figur 5:** *L. fusiformis* MG morfologi av kolonier (a), celler (b (nederst) og c) og sporer (b (øverst) og c). Figuren er hentet fra Pudova et al. (2018).

I løpet av den siste tiden har *L. fusiformis* fått oppmerksomhet for dens bioteknologiske potensiale. Bakterien produserer enzymer som peptidaser, esteraser og proteaser, som er ettertraktede enzymer for industriell bruk. Bakterien er også aktuell innen bioremidiering på grunn av dens høye toleranse og detoksifiserende evne mot flere miljøgifter, som tungmetaller og petroleum, og for dens antagonistiske effekt mot plantepatogener (Passera et al., 2021). Som nevnt over ble det funnet at *L. fusiformis* har antimikrobiell effekt mot *S. pneumoniae*. Det antimikrobielle stoffet fikk navnet Fusiformicin (Hauge, 2020).

### 1.4.1 Fusiformicin

Fusiformicin er et antimikrobielt stoff med smalspektret aktivitet mot streptokokker og et fåtall andre Gram-positive bakterier (*Bacillus subtilis* og *Mycobacterium smegmatis*). Stoffet ble funnet i *L. fusiformis* under en screeningprosess der målet var å identifisere nye antimikrobielle stoffer fra naturen. Prøver til screening ble hentet fra marine miljøer på Hvidsten, Moss.

Preliminære resultater tyder på at stoffet er peptidbasert, men flere studier er nødvendig for å identifisere hva slags molekyl Fusiformicin er. Med gelfiltrering har det blitt funnet at Fusiformicin har en masse på ~1000 kDa. Det har også blitt observert at proteinkomplekset Ami er relevant i Fusiformicins virkning mot pneumokokker. Resistens mot Fusiformicin oppstår spontant i pneumokokker ved at bakterien lager mutasjoner i Ami, en plasmamembranassosiert ABC-transporter med oppgave å importere peptider inn til cytosol. Sekvensering av disse pneumokokkene viste mutasjoner i *amiCEF*. I tillegg har det blitt vist at inaktivering av Ami har ført til resistens mot

Fusiformicin i *S. pneumoniae*. Dette ble vist med introduksjon av punktmutasjoner i de ATP-hydrolyserende Walker B-motivene i AmiEF.

Produksjon av antimikrobielle stoffer er svært vanlig hos nære slektninger av *L. fusiformis*, inkludert bakterier i genuset *Bacillus* som *L. fusiformis* var identifisert som frem til 2007 (Ahmed et al., 2007). Flere *Bacillus*-arter er kjent for å produsere både antimikrobielle lipopeptider og peptider. Sistnevnte kaller vi for bakteriosiner (Abriouel et al., 2011).

## 1.5 Bakteriosiner

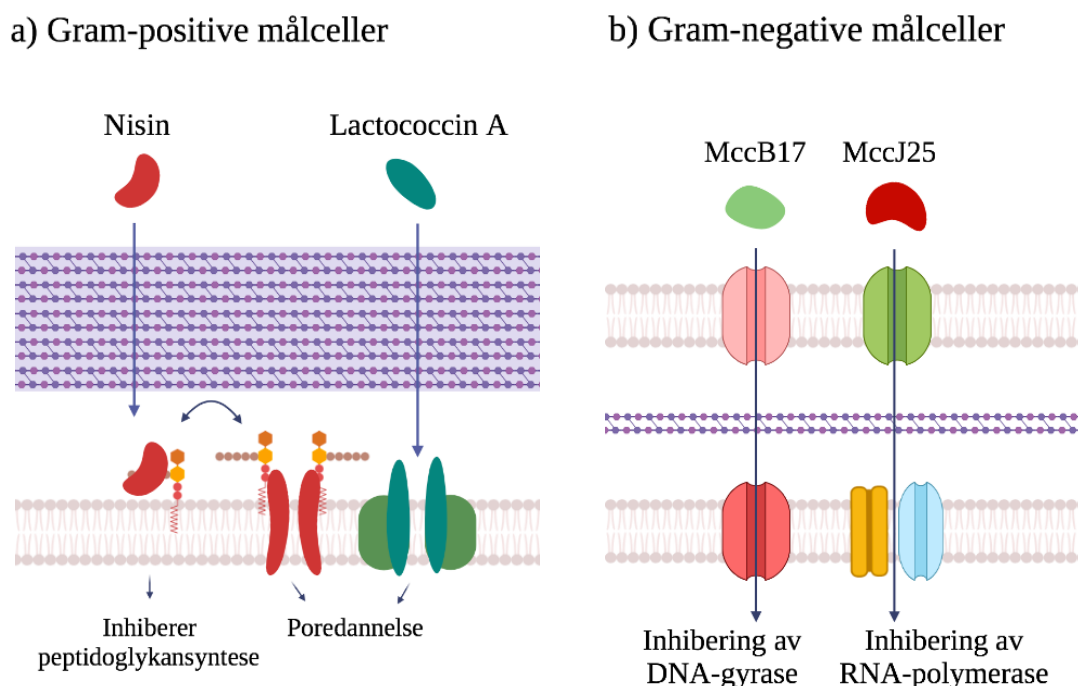
Bakteriosiner er ribosomalt syntetiserte antimikrobielle polypeptider, produsert av diverse Gram-positive og Gram-negative bakterier, og archaea. Bakteriosiner sekreteres ut av bakteriecellen og de kan ha både smalt og bredt inhiberingsspekter. Lik antibiotika, er produksjon av bakteriosiner en angrepsmekanisme bakterien har for å konkurrere med andre mikroorganismer om felles ressurser i samme miljø. Bakteriosiner fra Gram-positive bakterier er mest studert, særlig bakteriosiner produsert av melkesyrebakterier (Lactic Acid Bacteria, LAB). Den siste klassifikasjonen av Gram-positive bakteriosiner ble gjort av Alvarez-Sieiro et al. i 2016 for LAB-bakteriosiner. Denne klassifiseringen gjelder også bakteriosiner produsert av andre Gram-positive mikroorganismer. I klassifiseringen finnes små, post-translasjonelt modifiserte peptider i klasse I (Schofs et al., 2020). Disse inkluderer lantibiotika, en type bakteriosin som produseres av mange bakterier i genuset *Bacillus* (Abriouel et al., 2011). I klasse II finnes de umodifiserte bakteriosinene med molekylærvækt mindre enn 10 kDa, og i klasse III finner man de store bakteriosinene med molekylærvækt på mer enn 10 kDa. De ulike klassene av bakteriosiner har forskjellige mekanismer for angrep som går ut på å svekke ulike essensielle funksjoner i målcellen (Schofs et al., 2020).

Et bakteriosin kan angripe målcellen ekstracellulært, eller intracellulært dersom den kan transporteres inn i cellen. Dersom et bakteriosin angriper bakteriecellen ekstracellulært virker det hovedsakelig i assosiasjon med cellekonvolutten. Her kan det påvirke cellens cellevegg syntese, eller det kan danne porer i cellens plasmamembran og forstyrrer cellens protongradient. Dette er de vanligste angrepsmekanismene for bakteriosiner som virker på Gram-positive bakterier. Lactococcin A fra klasse II, er et smalspektret bakteriosin som binder til mannose fosfotransferase-systemet i cellemembranen for poredannelse. Nisin er et klasse I-bakteriosin produsert av *Lactococcus lactis* som har lipid II som mål. Lipid II er en viktig intermediat i den essensielle peptidoglykansyntesen.



Bakteriosinet bruker lipid II som et docking-molekyl for å danne porer i cellemembranen. Siden lipid II er konservert hos de fleste bakterier, er nisin et bredspektret bakteriosin, og det benyttes som matkonserverende tilsetningsstoff (E 234). Nisin er blant de bakteriosinene som har to virkningsmekanismer. Ved å binde til lipid II kan nisin også inhibere biosyntese av peptidoglykan for celleveggsyntese. Antibiotikumet vankomycin har i likhet med nisin lipid II som mål, men bindingssetene på lipid II for bakteriosinet og for vankomycin er ikke de samme. Dette resulterer i at bakterier som er resistente mot vankomycin fortsatt er sensitive for nisin.

Fra innsiden av cellen kan bakteriosiner forstyrre ulike prosesser som transkripsjon, translasjon eller DNA-replikasjon. Disse bakteriosinene produseres av og virker ofte mot Gram-negative bakterier og må transporteres over cellemembranen. Mange slike bakteriosiner har ribosomet som mål. Et eksempel er thiopeptider som binder seg til 23s RNAet på den ribosomale subenheten 50S og hindrer translasjon. En annen måte å påvirke proteinsyntesen på er som MccJ25 gjør ved å blokkere den sekundære kanalen på RNA-polymerasen, og dermed blokkere for transkripsjon. Et bakteriosin som hindrer DNA-replikasjon er MccB17, som inhiberer enzymet DNA-gyrase som er involvert i DNA-superkveiling (**Figur 6**). Det finnes mange varianter av bakteriosiners virkningsmekanismer, men ikke ulikt fra antibiotika har bakterier tilegnet seg mekanismer for å unngå bakteriosiner sin ødeleggende effekt (Cotter et al., 2013).



**Figur 6:** Virkningsmekanismen til nisin og lactococcin A i Gram-positive celler, og Mcc-B17 og MccJ25 i Gram-negative celler. Figuren er laget i BioRender.

For Gram-positive bakteriosiner utvikler bakterier resistens relativt raskt (nisin er et unntak). Dette utfordrer deres potensial for klinisk bruk. Systemisk behandling med bakteriosiner møter utfordringer med hensyn på lav vevsgjennomtrengelighet og at immunforsvaret vil utvikle antistoffer mot peptidene. Kunnskapen som finnes så langt er hovedsakelig funnet med laboratoriebasert forskning ettersom bruken av bakteriosiner i klinisk sammenheng er begrenset. Hittil har tre former for resistensutvikling blitt observert: (i) mutasjon av bakteriosinets mål, (ii) etterlikning av immunitet og (iii) direkte proteolytisk spalting av bakteriosiner. Et eksempel på førstnevnte er hvordan bakterieceller kan bli resistente mot MccJ25 ved å mutere den sekundære kanalen på RNA polymerasen og dermed hindre binding av bakteriosiner. Et annet eksempel er hvordan resistens mot MccB17 kan oppnås med punktmutasjoner i genet for DNA-gyrase. «Immunitetshemming» er resistens i stammer som ikke produserer det aktuelle bakteriosinet, men som har gener for immunitet, eller immunitet som resultat av produksjon av et liknende bakteriosin. Den siste typen resistens, proteolyse av bakteriosiner, har blitt observert i *L. lactis* som er resistente mot nisin. Det er også observert i bakterie med gen for MccC7-C51-selvimmunitetsprotein, eller gen for ortologen serin-peptidase, som fører til at bakterien er resistent mot bakteriosinet MccC7-C51 (Cotter et al., 2013). Selv om bakteriosin-resistens kan bli et problem, kan kunnskapen og teknologien vi har tilegnet oss med tiden hjelpe oss å bruke peptidene på en fornuftig måte. Det ligger stort potensiale i bakteriosiner for klinisk bruk.

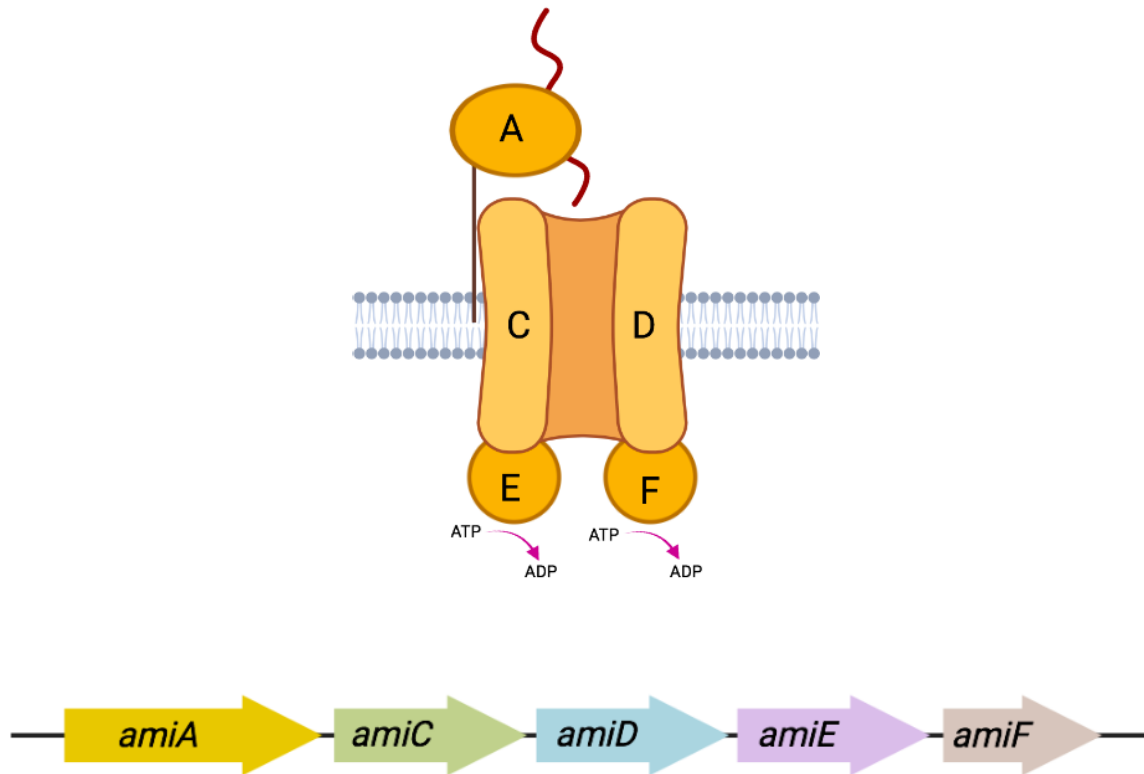
Det forskes mye på å benytte bakteriosiner for å hindre og/eller behandle infeksjoner i tarmkanalen og for hud og sårinfeksjoner. I den forbindelse blir også idéen om å bruke bakteriosiner i kombinasjon med eksisterende antibiotika testet (Kranjec et al., 2021; Ovchinnikov et al., 2020). Bakteriosiners kliniske potensiale er mye på grunn av deres høye effektivitet og lave toksisitet. I tillegg er bakteriosiner relativt enkle å produsere og modifisere, og de kan være både bred- og smalspektrede (Cotter et al., 2013). I dag brukes bakteriosiner i dyrehelse og som konserveringsmiddel i mat (nisin), men de har ikke i tilstrekkelig grad kommet til nytte innen human medisin (Cotter et al., 2013; Shin et al., 2016). Økt grad av resistens mot konvensjonelle antibiotika har rettet søkelys mot å oppdage og utvikle nye antimikrobielle stoff og alternative behandlingsstrategier. Bakteriosiner er en klasse antimikrobielle stoff som derfor sees nærmere på for å utvikles med hensikt til menneskelig medisinsk bruk. Forskning og forståelse for bakteriosiners virkningsmekanismer og hvordan vi kan unngå resistensutvikling er nødvendig for å gjøre det mulig å utnytte deres kliniske potensiale (Cotter et al., 2013).

## 1.6 Ami-systemet i *S. pneumoniae*

Som tidligere nevnt har Fusiformicin-resistens i pneumokokker en direkte sammenheng med mutasjoner i Ami. Ami-systemet er et proteinkompleks som transporterer peptider inn i *S. pneumoniae*, og er viktig for opptak av aminosyrer som bakterien trenger for å livsnære seg. Denne permeasen var den første ABC-transporteren til å bli identifisert i en Gram-positiv bakterie. Systemet kodes for av genene *amiACDEF* (**Figur 7**). Genene sitter etter hverandre på et operon som gjør at de er regulert av samme promotor på den negative DNA-tråden (Alloing et al., 1990).

Ami-transporteren består av fem proteiner: AmiACDEF. AmiA er et lipoprotein som er forankret til et fosfolipid på utsiden av cellemembranen via et cystein i N-terminal ende (UniProtKB - P18791). Translokasjonsveien sitter på tvers av cellemembranen og består av proteinene AmiC og AmiD. ATPasene AmiE og AmiF sitter intracellulært. Disse frigjør energi ved hydrolyse av ATP, som i sin tur fører til endring av konformasjon i AmiCD. Konformasjonsendringen lar oligopeptidene passere gjennom kanalen inn til cytosol (Claverys et al., 2000). Punktmutasjoner i de ATP-hydrolyserende Walker B-motivene i AmiEF inaktiverer transportsystemet og det har som tidligere nevnt blitt vist at en slik mutasjon fører til resistens mot Fusiformicin (Hauge, 2020). AmiA er ansvarlig for å oppkonsentrere oligopeptider og sende dem inn i translokasjonsveien. I tillegg til AmiA finnes det to oligopeptid-bindende proteiner kalt AliA og AliB. Disse er paraloger av AmiA, og alle tre har overlappende spesifisitet for oligopeptider (Alloing et al., 1994; Claverys et al., 2000). Dette er et næringsmessig viktig system i *S. pneumoniae* som det finnes liknende av i andre bakterier, som for eksempel OppABCDF i *L. lactis* (Berntsson et al., 2011).

Hos AmiA-homologen OppA i *L. lactis* har 3D-strukturen avslørt at OppA har et stort «hulrom» ( $\sim 4900 \text{ \AA}^3$ ) med plass til store peptider. Inni hulrommet finnes det en hydrofob lomme der sidekjeden til den mest hydrofobe aminosyren sentralt på et peptid plasserer seg, og OppA binder på den måten fast peptidet. Proteinet har affinitet til peptider med stor variasjon i lengde (4-35 aminosyrer), og har ingen tydelig preferanse for sekvens. Promiskuiteten kommer av at proteinet danner hydrogenbindinger til ryggraden på peptidet, og ikke til peptidets sidekjerder (Berntsson et al., 2009; Berntsson et al., 2011). Homologien mellom OppA og AmiA legger store deler av grunnlaget for forskningen på AmiA i denne oppgaven.



**Figur 7:** Enkel fremstilling av Ami-systemet (over) og rekkefølgen til genene i *ami*-operonet (under).

## 1.7 Mål med oppgaven

Med antibiotikaresistens som en av verdens mest alvorlige kriser er man nødt til å finne nye løsninger for å bekjempe bakterielle infeksjoner. Fusiformicin er et nyopptaget antimikrobielt stoff som hemmer *S. pneumoniae*. For å avdekke om stoffet har potensiale for klinisk bruk må vi vite stoffets struktur og virkningsmekanisme. Det vil legge til rette for hvordan stoffet kan brukes og om det kan lages derivater av stoffet med økt/bredere inhiberingsspektrum samt grad av toksisitet. Det er derfor ønskelig å finne ut av mer om hva stoffet er og hvordan det fungerer. Hensikten med denne oppgaven er å karakterisere Fusiformicin og få innledende kunnskap om hva slags virkningsmekanisme stoffet har mot Gram-positive bakterier som *S. pneumoniae*.

## 2 Materialer

### 2.1 Stammer

**Tabell 2:** Bakteriearter og stammer brukt i denne oppgaven.

Stamme	Art	Modifikasjon	Referanse
ds857	<i>L. fusiformis</i>		Daniel Straume
RH425	<i>S. pneumoniae</i>	RpsL <sup>+</sup>	(Johnsborg & Havarstein, 2009)
RH426	<i>S. pneumoniae</i>		Daniel Straume
GS515	<i>S. pneumoniae</i>	$\Delta$ spr0324::janus	Gro Stamsås
IHH23	<i>S. pneumoniae</i>	<i>amiE</i> D184A	Ingvild Hauge
aw495	<i>S. pneumoniae</i>	<i>amiF</i> D190A	Anja R. Winther
IHH22	<i>S. pneumoniae</i>	$\Delta$ <i>amiEF</i> ::janus	Ingvild Hauge
aw494	<i>S. pneumoniae</i>	$\Delta$ <i>amiF</i> ::janus	Anja R. Winther
DH5- $\alpha$	<i>E. coli</i>		Daniel Straume
IMO8B	<i>E. coli</i>	Metyleringssystemet er knokket ut	Zhian Salehian
GeneHogs <sup>®</sup>	<i>E. coli</i>		Invitrogen

**Tabell 3:** Relevante *S. pneumoniae*-stammer konstruert til denne oppgaven.

Navn	Stamme	Referanse
VS4c	RH425, men $\Delta$ <i>amiA</i> <sub>wt</sub> ::janus	Denne oppgaven
VS8	GS515, men $\Delta$ janus::P3- <i>amiA</i>	Denne oppgaven
VS9	GS515, men $\Delta$ janus::P3- <i>amiA</i> $\Delta$ <i>amiA</i> <sub>wt</sub> ::janus	Denne oppgaven
VS10	GS515, men $\Delta$ janus::P3- <i>amiA</i> *	Denne oppgaven
VS11 <sup>1</sup>	GeneHogs <sup>®</sup> , m/ png36e-plasmid m/ <i>ami</i> -operon	Denne oppgaven
VS12	GS515, men $\Delta$ janus::P3- <i>amiA</i> * $\Delta$ <i>amiA</i> <sub>wt</sub> ::janus	Denne oppgaven
VS14	IHH22, men $\Delta$ janus:: <i>amiEF</i>	Denne oppgaven
VS15	IHH22, men $\Delta$ janus:: <i>amiE</i> *F	Denne oppgaven
VS16	aw494, men $\Delta$ janus::EF	Denne oppgaven
VS17	aw494, men $\Delta$ janus::EF*	Denne oppgaven

<sup>1</sup> *E. coli*-stamme.

\* Mutert gen

## 2.2 Primere

**Tabell 4:** Primere med kort beskrivelse av hvilken gensekvens som amplifiseres fra *S. pneumoniae*.

Navn	Sekvens 5'-3'	Beskrivelse
Janus	GTTTGATTTTAAATGGATAATGTG	Fwd janus (RH426)
F		
Janus	CTTTCCTTATGCTTTTGGAC	Rev janus (RH426)
R		
vs1	CTTTATATTGATACGATTCTGAG	Fwd oppstrøms for <i>amiA</i> (RH425)
vs2	CACATTATCCATTAATAATCAAACCTTCTACTCCTCTGTTTATGTG	Rev oppstrøms for <i>amiA</i> + komp. til fwd Janus (RH425)
vs3	GTCCAAAAGCATAAAGGAAAGATAATTTCTAATAGAACTTTCTCTC	Fwd nedstrøms for <i>amiA</i> + komp. til rev Janus (RH425)
vs4	GTGTTCTTGAAACGAGCCATG	Rev nedstrøms for <i>amiA</i> (RH425)
vs5	AGCAGCAACTCCTCCTGATACATCCC	Rev <i>amiA</i> S503A, W504A (RH425)
vs6	GGGATGTATCAGGAGGAGTTGCTGCTGGGCCAGACTATCAAGACC	Fwd <i>amiA</i> S503A, W504A (RH425)
vs7	tacgCTCGAGTCACTGTAGTCTTTGACACTTC	Fwd <i>amiA</i> Xho1 (RH425)
vs8	tacgGTCTGACTTAGTTTAGTCCTTTTGATAACG	Rev <i>amiF</i> Sal1 (RH425)
vs9	GAGCTTCAGATGTACGATTATCTTGCCTGTCCCCCTGGTATAATAA CTATACATGCAAGATCTAAATCAGAGGAGTAGAAAATGAAAAAAA	Fwd P3- <i>amiA</i> komp. til khb51 (GS515)
vs11	CTAGCGTTTCGTAGTTTACCAATTATTTATCATCATCATCTTTATAA TCCTTCACATGACTTGCCAATTC	Rev <i>amiA</i> Flag komp. til khb52 (GS515)
vs12	TACGAAGCTTTCCTGACTGTAGTCTTTGACACTTC	Fwd <i>amiA</i> HindIII (RH425)
vs13	TACGCTCGAGTTGCACTGTCCCCCTGGTATAATAAC	Forward P3- <i>amiA</i> Xho1 (VS9)
vs14	GTCGACTTATTTATCATCATCATCTTTATAATC	Reverse P3- <i>amiA</i> m/flag Sal1 (VS9)
vs15	GATTATAAAGATGATGATGATAAATAGGAGGAAGGAAATGTCTGAA AAATTAG	Fwd nedstrøms for <i>amiE</i> (RH425)
vs16	CTATTTATCATCATCATCTTTATAATCGTCAGCCAGATGGGCAAATCC	Rev <i>amiE</i> Flag (RH425)
vs17	GATTATAAAGATGATGATGATAAATAATAATGGTTTTATAATTTCCA TGTC	Fwd nedstrøms for <i>amiF</i> komp. til vs18 (RH425)
vs18	TTATTTATCATCATCATCTTTATAATCGTTTAGTCCTTTTGATAACGT GC	Rev <i>amiF</i> Flag komp. til vs17 (RH425)
vs19	CACATTATCCATTAATAATCAAACCTACGCTCTAGCGACTCCTG	Rev inni <i>amiA</i> + komp. til fwd Janus (RH425)
vs20	GTCCAAAAGCATAAAGGAAAGCAATGGTAAAGATGGAGCAGC	Fwd inni <i>amiA</i> + komp. til rev Janus (RH425)
IHH20	GATTTCAATGATGTCAGCAAGG	Fwd <i>ami</i> -locus
IHH24	GCTCATACAACAGGATAGTCG	Rev <i>ami</i> -locus

khb50	CCGATGCAGAAATGGTTGAG	Fwd oppstrøms for janus (GS515)
khb51	GATAATCGTACATCTGAAGCTC	Rev oppstrøms for janus (GS515)
khb52	TTGGTAAACTACGAACCGCTAG	Fwd nedstrøms for janus (GS515)
khb53	TCATTGTAAGCGCCCAATAAC	Rev nedstrøms for janus (GS515)
khb56	GCTCATACAACAGGATAGTCG	Sekvensering av amiA: fwd primer
khb71	TTTAAACTCCTATGATTTTTTA	Sekvensering av amiA: rev primer

## 2.3 Enzymer, peptider, nukleotider, fargestoffer, antistoffer og størrelsesstandarder

**Tabell 5:** Enzymer, peptider, nukleotider, fargestoffer, antistoffer og størrelsesstandarder brukt i denne oppgaven.

Navn	Stock løsning	Leverandør
Phusion® High-Fidelity DNA polymerase	2 U/μL	New England BioLabs
Proteinase K	20 mg/mL	Bioline
Polymyxin acylase (fra Pseudomonas sp.)	1 mg/mL	Sigma Life Science
CSP-1	500 μg/mL	New England BioLabs
SalI-HF	20 000 U/mL	New England BioLabs
XhoI	20 000 U/mL	New England BioLabs
NcoI-HF	20 000 U/mL	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	400,000 U/mL	New England BioLabs
1kB DNA ladder	50 μg/mL	New England BioLabs
Color Protein Standard Broad Range		New EnglandBioLabs
Sytox™ Green nucleic acid stain	5 mM	Invitrogen by ThermoFisher Scientific
DAPI	0,005 mg/mL	Sigma Life Science
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	100 mM	TaKaRa
Red Taq DNA polymerase Master Mix (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	1 mg/mL	VWR
Quick CIP	5000 U/mL	New England BioLabs

PeqGREEN		PeqLab
ANTI-FLAG® antibody produced in rabbit	0,8 mg/mL	MERCK
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary antibody, HRP	0,8 mg/mL	Invitrogen by ThermoFisher Scientific

## 2.4 Antibiotika

**Tabell 6:** Antibiotika brukt i denne oppgaven.

Antibiotikum	Stock-løsning	Leverandør
Kanamycin	100 mg/mL	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin	10 mg/mL	Sigma-Aldrich
Ampocillin	100 mg/mL	Sigma-Aldrich
Erytromycin	100 mg/mL	Sigma-Aldrich
Spectinomycin	100 mg/mL	Sigma-Aldrich
Streptomycin	100 mg/mL	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	12,5 mg/mL	Sigma-Aldrich

## 2.5 Plasmider

**Tabell 7:** Plasmider brukt i denne oppgaven.

Navn	Opprinnelse	Resistens	Referanse
pFD116	<i>E. coli</i>	Spectinomycin	(Depardieu & Bikard, 2020)
pMG36e	<i>E. coli</i>	Erytromycin	(van de Guchte et al., 1989)
pMG36e-amiACDEF <sup>a</sup>		Erytromycin	Denne oppgaven
pFD116-amiACDEF <sup>a</sup>		Spectinomycin	Denne oppgaven
pFD116-amiA <sup>a</sup>		Spectinomycin	Denne oppgaven

<sup>a</sup> *E. coli* ville ikke ta opp disse konstruktene.

## 2.6 Kits

**Tabell 8:** Kits brukt i denne oppgaven.

Navn	Leverandør	Bruksområde
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	Rensing av PCR-produkt
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit	Invitrogen	Live/dead-farging



E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I	Omega bio-tek	Rensing av plasmid
SuperSignal <sup>™</sup> West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	Substrat til immunoblotting

## 2.7 Utstyr

**Tabell 9:** Utstyr brukt i denne oppgaven. Standard laborieutstyr ble brukt, men er ikke oppført i denne tabellen.

Utstyr	Modell	Leverandør
PCR maskin	ProFlex PCR System	Applied biosystems
Gel kamera	Gel Doc XR+	BioRad
Autoklav	CertoClav EL	LGA
Plateleser	FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech
Proteinoverføringsapparat	Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad
Mikroskop	LSM 700	Zeiss
Western blot gel kamera	Azure C400	Azur Biosystems
Spektrofotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific

## 2.8 Oppskrifter på vekstmedium og buffere

### 2.8.1 C-medium

Tilsettes 150 mL pre-C-medium:

150 µL MnCl<sub>2</sub> 0,4 mM

1,5 mL glukose 20%

3,75 mL ADAMS III

110 µL glutamin 3%

2,25 mL Na pyruvat 2%

95 µL sukrose 1,5 M

1,5 mL uridin adenosin 2 mg/mL

1,5 mL albumin/ BSA 8%

3,75 mL gjærekstrakt

Løsningen ble sterilfiltrert og oppbevart på 4°C. C-medium ble laget ferskt den dagen det skulle brukes.

#### 2.8.1.1 Pre-C-medium

22,5 mg L-cystein HCl

4 g natrium acetat

10 g casitone

12 mg L-tryptofan

17 g di-kalsiumfosfat

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til et endelig volum på 2L, sterilfiltrert og lagret i romtemperatur.

#### 2.8.1.2 Gjærekstrakt

40 g gjærekstrakt

360 mL dH<sub>2</sub>O

37 % HCl

16 g aktivt kull

Løsningen ble blandet i 10 min og inkubert på 4 °C i to timer. Deretter ble den filtrert over natt gjennom en kolonne med celitt og glasskull. Høymolaritets NaOH ble brukt til å justere løsningens pH til 7,4, og volumet ble justert med dH<sub>2</sub>O til et endelig volum på 400 mL. Løsningen ble sterilfiltrert og lagret på -80 °C.

#### 2.8.1.3 ADAMS I

150 µL 0,5 mg/ml biotin

75 mg nikotinsyre

87,5 mg pyrodoxin hydroklorid (4 °C)

80 mg tiamin hydroklorid

35 mg riboflavin

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til endelig volum på 0,5 L og pH 7,0. Videre ble den sterilfiltrert og lagret på 4 °C.

#### 2.8.1.4 ADAMS II

500 mg jern(II)sulfat heptahydrat

500 mg kobbersulfat pentahydrat

500 mg sinksulfat heptahydrat

500 mg mangan(II)klorid tetrahydrat

10 mL konsentrert HCL

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til et endelig volum på 100 mL før den ble sterilfiltrert og lagret på 4 °C.

#### 2.8.1.5 ADAMS III

128 mL ADAMS I

3,2 mL ADAMS II

1,6 g aspargin monohydrat

0,4 g kalsium klorin anhydrin

16 g magnesium klorin hexahydrat

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til endelig volum på 800 mL og pH justert til 7,6. Løsningen ble så sterilfiltrert og lagret på 4 °C.

### 2.8.2 Todd Hewitt (TH) medium

30 g TH pulver ble løst i 1 L dH<sub>2</sub>O. Løsningen ble så autoklavert og oppbevart i romtemperatur.

#### 2.8.2.1 TH agar

15 g TH pulver og 7,5 g agar (1,5% w/v) ble løst i 0,5 L dH<sub>2</sub>O. Agaren ble så autoklavert og fordelt i ca. 10 petriskåler.

### 2.8.2.2 TH soft-agar

7,5 g TH pulver og 1,875 g agar (0,75% w/v) ble løst i 0,25 L dH<sub>2</sub>O. Soft-agaren ble så sterilisert ved autoklaving og oppbevart i romtemperatur.

### 2.8.3 Luria Bertani (LB) medium

10 g NaCl

5 g gjærekstrakt

10 g trypton

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til endelig volum på 1 L før den ble sterilisert ved autoklaving og oppbevart i romtemperatur.

### 2.8.4 Løsninger og buffere til agarose gelelektroforese

#### 2.8.4.1 6x loading buffer

60 mM Tris-HCl pH 8.0

6mM EDTA

40% sukrose

0,01% bromfenol blå

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til endelig volum på 5 mL og lagret i romtemperatur.

#### 2.8.4.2 1% agarosegel

0,5 g agarose

50 mL 1x TAE buffer

1 µL peqGREEN

Løsningen ble varmet i mikrobølgeovn til agarosen var fullstendig løst før peqGREEN ble tilsatt.

Løsningen ble tilført en støpeskål og sto til nedkjøling på romtemperatur (eller i kjøleskap) i omtrent 30 min før gelen kunne brukes.

### 2.8.4.3 1x tris-acetat-EDTA (TAE)

424 g tris base

57,1 mL acetat

100 mL 0,5 M EDTA pH 8

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til et endelig volum på 1 L.

## 2.8.5 Løsninger til mikroskopering

### 2.8.5.1 1x PBS buffer pH 7,4

4 g NaCl

0,1 g KCl

0,905 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til endelig volum på 0,5 L, og pH ble justert til 7,4 med høykonsentrert HCl. Deretter ble løsningen sterilisert ved autoklaving.

### 2.8.5.2 1,2% agarose- og PBS-fikseringsgel

0,24 g agarose

20 mL PBS buffer pH 7,4

Løsningen ble varmet i mikrobølgeovn til all agarosen var løst, og oppbevart på 55 °C vannbad til den skulle brukes.

## 2.8.6 Løsninger til SDS-PAGE og blotting

### 2.8.6.1 2x SDS sample buffer

100mM Tris-HCl, pH 6,8

4% SDS

20% glyserol

200 mM  $\beta$ -merkaptoetanol

Noen få korn med bromfenolblå

#### 2.8.6.2 Tris-buffered saline with Tween (TBS-T)

20 mM Tris-HCl, pH 7,4

150 mM

0,05%

Løsningen ble justert med dH<sub>2</sub>O til et endelig volum på 1L.

#### 2.8.6.3 12% separasjonsgel

4,3 mL dH<sub>2</sub>O

2,5 mL 1,5M Tris-HCl, pH 8,8

0,1 mL 10% SDS

3 mL 40% akrylamid+0,8% bis-akrylamid

0,005 mL 10% APS

0,01 mL TEMED

#### 2.8.6.4 4% Stacking gel

3,15 mL dH<sub>2</sub>O

1,25 mL 0,5M Tris-HCl, pH 6,8

0,05 mL 10% SDS

0,5 mL 40% akrylamid+0,8% bis-akrylamid

0,05 mL 10% APS

0,005 mL TEMED

50  $\mu$ L bromfenolblå

#### 2.8.6.5 Blocking-løsning

1,5 g skim milk powder

30 mL TBS-T

## 3 Metoder

Oppgaven er gjort i samarbeid med forskningsgruppen Molekylær Mikrobiologi (MolMik). Noen utvalgte eksperimenter spesielt relevant for oppgaven ble utført av Dr. Daniel Straume og Zhian Salehian, og deres resultater er nevnt og diskutert under «Resultater» og «Diskusjon». Kun metoder utført av undertegnende er oppført under «Metoder».

### 3.1 Rensing og karakterisering av Fusiformicin

#### 3.1.1 Produksjon av Fusiformicin

Fusiformicin produseres av en *L. fusiformis* isolert fra Oslofjorden (Hauge, 2020). Den er en aerob bakterie, og ble dyrket uten risting ved romtemperatur i 0,5 L Todd Hewitt (TH) medium over tre dager i en 3 L PRODUSENT-kolbe med «pustende» kork. Maksimal dybde på det flytende vekstmediet var 1 cm for god oksygentilførsel. Etter sentrifugering ved 7000x g høstes supernatanten (med Fusiformicin).

#### 3.1.2 Anrikning av Fusiformicin med Amberlite® XAD16N hydrofobe kuler

Amberlite® XAD16N kuler er polystyrenkuler som er konjugert med divinylbenzen. De har store porer med hydrofob overflate som gir mulighet til å isolere store hydrofobe molekyler via hydrofobe interaksjoner (MERCK, 2022). For å konsentrere Fusiformicin ble Amberlite® XAD16N benyttet. 0,5 L *L. fusiformis*-kultur ble sentrifugert ved 7000x g i fem min ved 4 °C. Supernatanten ble høstet og tre gram hydrofobe kuler ble tilsatt. Løsningen med kulene sto på risting i en time ved romtemperatur for binding av Fusiformicin til divinylbenzen på eller inni porene til kulene. Kulene ble vasket med 35 mL vann tre ganger og én gang med 35 mL 20 % etanol. I dette steget vaskes hydrofile stoffer vekk. Fusiformicinen ble eluert med 3x5 mL 100% etanol, tørket med vakuumsentrifugering og løst i 1,5 ml sterilt vann. Denne metoden er ikke spesifikk til Fusiformicin, dermed vil flere andre hydrofobe stoffer følge med eluatet. Av denne grunn kan man ikke si noe om renheten på det oppkonsentrerte Fusiformicinet.

### 3.1.3 Soft-agar overlay-analyse

Soft-agar overlay-analyser kan brukes til å screene etter mikrober med antimikrobiell aktivitet, eller til å teste et stoff for antimikrobiell aktivitet (Hockett & Baltrus, 2017). I denne oppgaven har metoden blitt brukt til sistnevnte for å teste aktiviteten til Fusiformicin. Dette har blitt gjort ved å blande *S. pneumoniae* RH425-kultur i TH-soft-agar (0,75% w/v agar) som støpes i en petriskål med TH-agar. I 5 mL soft-agar med temperatur på 46 °C, tilsettes 100 µL bakteriekultur i eksponentiell vekstfase ( $OD_{550} \approx 0,3$ ) for å sikre god vekst på overlay-skålen. Fusiformicin som har blitt behandlet på ulike måter (se 3.1.5) spottes (3 µL) på skålen med soft-agar og skålen inkuberes anaerobt ved 37 °C over natt. Hemmesoner, eller fravær av hemmesoner, rundt spotting-områdene avslører om det behandlede Fusiformicinet har hatt hemmende effekt på bakterieveksten eller ikke, og dermed om den bestemte behandlingen har hatt en effekt på Fusiformicinets antimikrobielle aktivitet.

Soft-agar overlay-analyse ble også brukt for å teste  $\Delta amiA$ -mutanter (VS4c og VS13) og *amiA* med punktmutasjoner (VS12) sin sensitivitet for Fusiformicin. Mutantene (og kontroll-kulturer: RH425 og VS9) ble blandet i soft-agar, platet ut og spottet med Fusiformicin på samme måte som beskrevet over. Tilstedeværelse, fravær eller størrelse på hemmesone indikerte om mutasjonen/knockout av *amiA* hadde en effekt på *S. pneumoniae*s Fusiformicin-sensitivitet.

### 3.1.4 antiSMASH- og BAGEL4-analyse

antiSMASH er et verktøy som predikerer og analyserer genklynger for syntese av sekundærmolekylar i bakterielle genomer (Medema et al., 2011). BAGEL4 identifiserer og visualiserer genklynger i prokaryotisk DNA som er involvert i biosyntese av ribosomalt syntetisert- og post-translasjonelt modifiserte peptider (RiPPER) og umodifiserte bakteriosiner (van Heel et al., 2018). Begge programvarene gir en rask predikasjon på om en organisme produserer kjente antimikrobielle stoffer basert på genomsekvens.

I denne oppgaven ble genomsekvensen til *L. fusiformis* analysert i antiSMASH og BAGEL4 for å undersøke om det fantes en genklynge i bakteriens genom som kunne gi oss en indikasjon på hva slags antimikrobielt stoff Fusiformicin er.



### 3.1.5 Tester for karakterisering av Fusiformicin

#### 3.1.5.1 Proteinase K

Proteinase K er et bredspektret enzym som degraderer peptider ved å bryte peptidbindingene mellom aminosyrene. Enzymet har optimal aktivitet ved 37 °C. Det er vanlig å bruke proteinase K for å fjerne uønsket protein under arbeid med nukleinsyrer (Qamar et al., 2017). Ved høy nok konsentrasjon og med lang nok inkuberingstid blir peptidet fullstendig degradert. Ved å behandle Fusiformicin med proteinase K over natt i 37 °C, for så å teste for aktivitet med overlay-analyse, kan det vise om stoffet er et peptid dersom stoffet mister aktivitet etter behandling.

I denne oppgaven ble 20 µL Fusiformicin tilsatt proteinase K slik at enzymkonsentrasjonen ble 50 µg/mL, og inkubert på 37 °C over natt. Videre ble det Fusiformicinets aktivitet testet på et overlay.

#### 3.1.5.2 Dithiotheitrol (DTT) og iodacetamid

DTT reduserer og bryter disulfidbindinger som dannes mellom to cysteiner hos proteiner. Iodacetamid alkylterer eventuelle tiolgrupper (-SH) frigjort av DTT (Suttapitugsakul et al., 2017). Ved å tilsette DTT og iodacetamid til Fusiformicin kan det undersøkes om stoffet har cysteiner som er viktige for dets aktivitet. I tillegg kan testen indikere om Fusiformicin er et lantibiotikum.

I denne oppgaven ble 20 µL Fusiformicin tilsatt DTT og iodacetamid slik at konsentrasjonene ble henholdsvis 20 mM og 150 mM. Fusiformicinet ble inkubert i mørket i 15 min, før det ble lagret på -20 °C. Videre ble Fusiformicinets aktivitet testet på et overlay.

#### 3.1.5.3 Varmetest

Høy temperatur fører til denaturering av proteiners tertiærstruktur ved å bryte hydrogenbindingene mellom sekundærstrukturene (Singh & Tripathi, 2020). Ved å utsette Fusiformicin for høy temperatur og deretter teste for antimikrobiell aktivitet kan man observere om stoffet har en tertiærstruktur som er viktig for stoffets aktivitet, noe som oftest er tilfellet for foldede proteiner.

I denne oppgaven ble Fusiformicin utsatt for 95 °C i 30 minutter før den antimikrobielle aktiviteten ble testet på et overlay.

#### 3.1.5.4 Polymyxin acylase

Polymyxin acylase er et enzym som bryter acylbindingen mellom lipid og peptid i et lipopeptid (Guo et al., 2012). For å teste om Fusiformicin er et lipopeptid ble 20 µL Fusiformicin tilsatt polymyxin acylase til en sluttkonsentrasjon på 50 µg/mL, og inkubert på 37 °C over natt. Videre ble Fusiformicinets aktivitet testet på et overlay.

### 3.2 Prediksjon av 3D-strukturen til AmiA

RoseTTAFold er et programvareverktøy for predikasjon av proteinstruktur. Når programvaren predikerer proteinstruktur blir tre faktorer tatt i betraktning på samme tid: mønstre i proteinsekvenser, proteiners mulige tredimensjonale strukturer og interaksjoner mellom proteiners aminosyrer. Gjennom en kontinuerlig kommunikasjon mellom disse tre faktorene resonnerer programvaren om forholdet mellom proteinets kjemiske sammensetning og dets foldede struktur (Baek et al., 2021). Resultatet blir en predikasjon av den foldede proteinstrukturen som videre kan fremstilles i et molekylmodelleringsprogram som PyMol eller Jmol.

I denne oppgaven ble AmiA sin tredimensjonale struktur predikert ut ifra sin aminosyresekvens (se 8.2) i RoseTTAFold. Signalsekvensen (aminosyre 1-22) ble ekskludert. Strukturen ble modellert i PyMol.

### 3.3 Mutasjon av AmiA i *S. pneumoniae*

En DNA-kassett med navn «Janus», konstruert av Sung et al. (2001) er en 1300 basepar (bp) lang DNA-sekvens som gjør det mulig med negativ seleksjon hos streptomycinresistente *S. pneumoniae*. I Janus sitter det gen for kanamycin-resistens, og allel for streptomycinsensitivitet som er dominant over recessivt allel for streptomycinresistens. Kassetten gir resistens for kanamycin, og sensitivitet for streptomycin i stammer med streptomycin-resistens. (Sung et al., 2001). I denne oppgaven ble Janus brukt til knockout av gener med introduksjon av en seleksjonsmarkør.

### 3.3.1 Transformasjon av *S. pneumoniae*

Transformasjon er prosessen der en naturlig kompetent bakterie tar opp nakent DNA fra sine omgivelser (se 1.2) (Straume et al., 2015). For å transformere fortynnes en kultur med *S. pneumoniae* slik at den er i tidlig vekstfase, og DNA og CSP tilsettes. CSP vil inducere kompetent tilstand og aktivere opptak av DNAet. Cellene vil inkorporere DNAet i sitt eget genom ved homolog rekombinasjon dersom sekvensen har flankerende områder komplementære med cellens genomsekvens. Kulturen står på 37 °C i ca. to timer. Transformantene selekteres for ved å plate ut 30 µL cellekultur på vekstmedium med egnet antibiotika som kun transformantene kan vokse på (Berg et al., 2013).

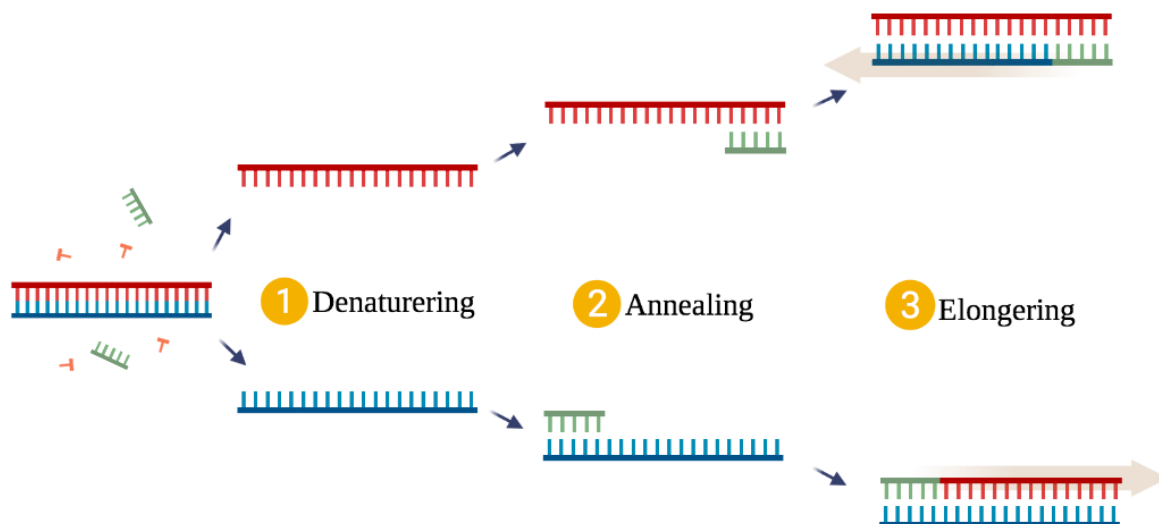
I denne oppgaven ble *S. pneumoniae* transformert med Janus og *amiA* (mutert og ikke-mutert) for å konstruere en mutant med punktmutasjoner i *amiA* (VS12) og en *amiA*-knockout-mutant (VS4c). Knockout gjøres ved å transformere bakterien med en sekvens med flankerende områder komplementære med områder på hver side av sekvensen som skal knockes ut. Janus ble introdusert i *S. pneumoniae* RH425, og P3-*amiA*-flag (mutert og ikke-mutert) ble introdusert i *S. pneumoniae* GS515 for knockout av Janus. Janus ble så introdusert i *S. pneumoniae* GS515  $\Delta$ Janus::*amiA* for knockout av nativt *amiA*. Janus-transformanter ble selektert for på TH-agar med kanamycin (400 µg/mL), og P3-*amiA*-transformanter ble selektert for på TH-agar med streptomycin (200 µg/mL).

### 3.3.2 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en metode der nukleotidprimere brukes for å lage mange kopier av en bestemt DNA-sekvens. Prinsippet for metoden ble først beskrevet av Kjell Kleppe på 60-tallet, men den ville først flere år senere (80-tallet) virkelig revolusjonere molekylærbiologiens verden da en varmestabil Taq DNA polymerase ble benyttet av Kary Mullis. Den termostabile DNA polymerasen kunne brukes igjen og igjen, og gjorde det mulig å automatisere PCR. I 1993 vant Mullis Nobelprisen i Kjemi for sin oppdagelse (McPherson, 2000).

En PCR-reaksjon inkluderer primere, templat, deoksynukleotider (dNTP), buffer og DNA polymerase. Templat er DNA som inneholder DNA-sekvensen man ønsker å amplifisere. Templat kan være genomisk DNA, plasmid eller cDNA. Primere er DNA-sekvenser på omtrent 18-30 bp komplementære til 5'(forward) eller 3'(reverse) endene til målsekvensen (McPherson, 2000);

ThermoFisherScientific, 2022c). En forward primer vil binde til 5'-enden til sekvensen på enkeltrådet DNA, og DNA polymerasen bruker dNTPer til å elongere primerne fra deres 3'-OH-ende. Man har både reverse og forward primer for å kopiere begge DNA-trådene. De elongerte primerene fungerer som templat i neste steg (**Figur 8**) (McPherson, 2000).



**Figur 8:** Stegene involvert i PCR-amplifisering: denaturering, annealing og elongering. Syklusen starter med dobbeltrådet DNA som templat, primere og dNTPer. Ved 94-98 °C denatureres DNAet til enkeltrådet DNA. Ved 50-65 °C annealer primerne til 3'-enden på enkeltrådet DNA, og ved 72 °C elongerer DNA polymerase primeren til en DNA-tråd komplementær til templatet ved å sette på dNTPer i 3'ende av primeren. I teorien dobles antall kopier dobbeltrådet DNA med hver syklus. Figuren er laget i BioRender.

En PCR starter normalt med et steg med temperatur på over 90 °C for å sørge for at alt templat er denaturert. Videre følger det tre steg som gjentas syklisk 20-40 ganger. I første steg i syklusen (94-98 °C) denatureres templat-DNAet slik at primerne får mulighet til å anneale til de enkeltrådede templatene i steg nummer to (50-65 °C). I det tredje og siste steget (72 °C) i syklusen elongeres primeren av DNA polymerase før syklusen gjentas. Antallet på hvert DNA-molekyl som kopieres øker med  $2^n$  for hver syklus der n er antall sykluser (**Figur 8**). Etter syklusene er det vanlig å inkludere et ekstra elongeringssteg for å sikre at all elongering er fullstendig (McPherson, 2000). PCR-programmet som ble brukt i denne oppgaven er presentert i **Tabell 10**.

**Tabell 10:** standard PCR-program.

Steg	Temperatur	Tid	Repetisjoner
Innledende denaturering	98 °C	5-10 min <sup>a)</sup>	1x
Denaturering	98 °C	30 sek	} 25x
Annealing	58 °C	30 sek	
Elongering	72 °C	X sek <sup>b)</sup>	
Utleddende elongering	72 °C	5 min	1x
Lagring	4 °C		

<sup>a)</sup> Da templat var tilsatt som bakterieceller, varte innledende denaturering i 10 min for å lysere cellene. Da templat var rensed DNA var dette steget satt til 5 min, og prøvene ble ikke satt på maskinen før temperaturen hadde nådd 98 °C (hot start).

<sup>b)</sup> Elongeringstiden ble tilpasset lengden på DNA-sekvensen som skulle amplifiseres. For elongering med Phusion® High-Fidelity DNA polymerase ble det lagt til 30 sek for hvert 1000bp. For elongering med Taq DNA polymerase ble det lagt til et minutt for hvert 1000bp.

### 3.3.2.1 PCR-amplifisering

PCR brukes ofte når man vil isolere en spesifikk DNA-sekvens fra et genom eller et plasmid, eller når man vil bekrefte tilstedeværelsen av en bestemt sekvens (screening). Med PCR amplifiseres den bestemte DNA-sekvensen i så stor kvantitet at annet DNA i prøven relativt til PCR-produktet ikke er merkbart (McPherson, 2000).

I denne oppgaven ble PCR hovedsakelig brukt til å amplifisere DNA-sekvenser for sekvensering, PCR-screening og for overlapp-PCR. Til PCR-amplifisering og overlapp-PCR ble Phusion® High-Fidelity DNA polymerase brukt (**Tabell 11**). Til PCR-screening ble

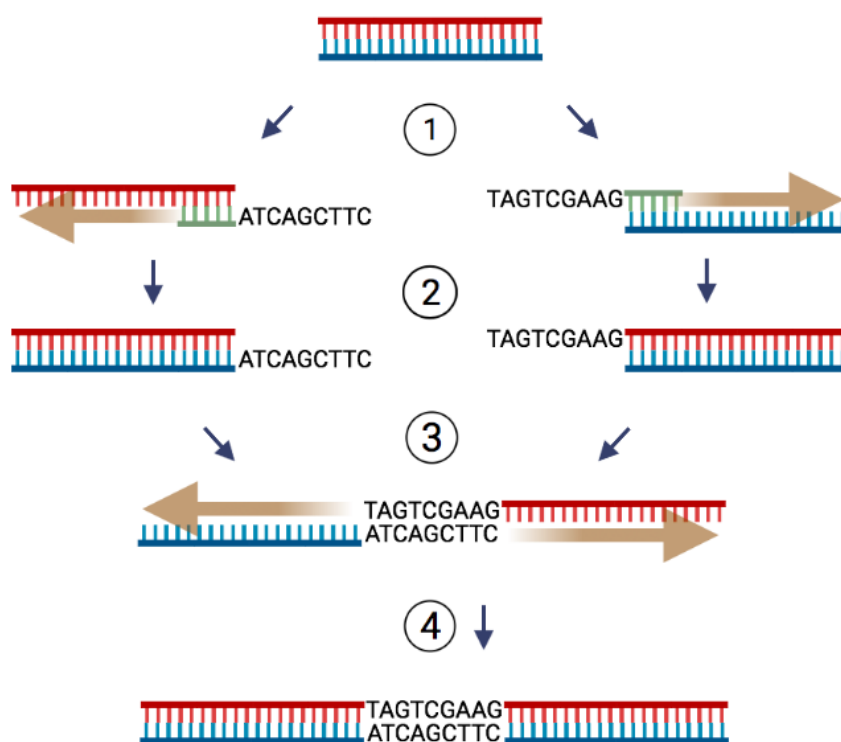
**Tabell 11:** PCR-reaksjonsmiks med Phusion® High-Fidelity DNA polymerase for én PCR-reaksjon.

Reagens	Volum (µL)	Sluttkonsentrasjon
dH <sub>2</sub> O	32,5	
5x Phusion® HF Reaction Buffer	10	1x
10 µM forward primer	2,5	0,5 µM
10 µM reverse primer	2,5	0,5 mM
10 mM dNTP	1	0,2 mM
Templat (celler)	1	~20-100 ng

Phusion® HF DNA polymerase	0,5	0,02 U/μL
<b>Endelig volum: 50 μL</b>		

### 3.3.2.2 Overlapp-PCR

Overlapp PCR er en enkel metode for å introdusere punktmutasjoner til en gensekvens, eller for å deletere eller fusjonere DNA-sekvenser. Denne metoden er basert på fusjonering av PCR-produkter med overlappende sekvenser. To PCR-produkter amplifiseres der 18-30 baser i 3' ende av PCR-produkt 1 er komplementære til 5' ende til PCR-produkt 2. I overlapp-PCR brukes de to PCR-produktene som templat. Templatene annealer til hverandre i de komplementære endene og DNA polymerase elongerer templatene. Det nå sammenhengende templatet amplifiseres ved forlenging av primere som annealer til hver sin ende av det fusjonerte templatet som i en vanlig PCR-reaksjon (**Figur 9**) (Heckman & Pease, 2007).

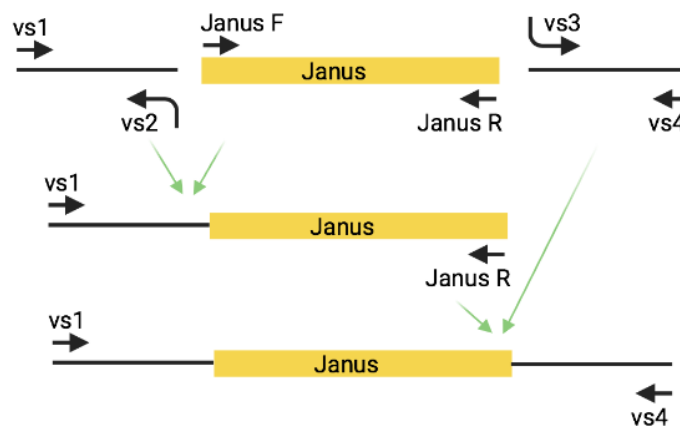


**Figur 9:** Overlapp-PCR. 1) DNA-templat denatureres og primere med overheng i 5' ende annealer. 2) Primerne elongeres, og første PCR-syklus er fullført. 3) Dobbeltrådet PCR-produkt med overheng denatureres og de homologe overhengene annealer med hverandre. 4) De sammensatte DNA-trådene elongeres, og en ny dobbeltrådet DNA-sekvens blir til. Dette DNAet fungerer som templat for de resterende syklusene.

I denne oppgaven ble overlapp-PCR brukt for å introdusere punktmutasjon i *amiA*, og for å konstruere genkassetter for knockout av *amiA*-genet.

Aminosyrer ansett som viktige for peptidbinding i AmiA ble mutert (S503A og W504A) ved hjelp av overlapp-PCR. *amiA* ble først amplifisert i to deler der hver del ble amplifisert med ca. 1000bp oppstrøms eller nedstrøms for genet med vanlig PCR og primerne vs1 og vs5, og vs6 og vs4. Primerne vs5 og vs6 var plassert på hver side av de to kodonene som skulle endres, og de nye mutant-kodonene var plassert i primernes overheng. Overhengene på vs5 og vs6 var i tillegg komplementære med hverandre for homolog rekombinasjon. Genomisk DNA fra *S. pneumoniae* RH425 ble brukt som templat. De to delene ble videre satt sammen i overlapp-PCR med primerne vs1 og vs4.

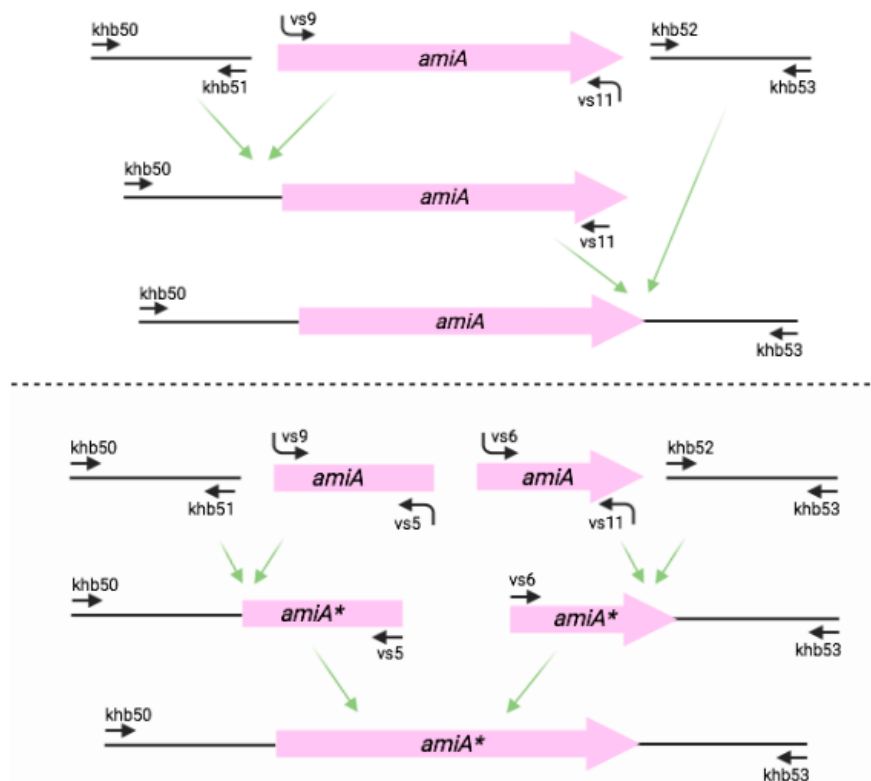
For knockout av *amiA* i *S. pneumoniae* RH425 ble en Janus-kassetten konstruert med PCR og satt sammen med overlapp-PCR. For å lage Janus-kassetten ble tre DNA-sekvenser amplifisert med vanlig PCR: 1) ca. 1000 bp oppstrøms for *amiA*, med primerne vs1 og vs2, der vs2 hadde overheng komplementær med Janus forward primer. 2) ca. 1000 bp nedstrøms for *amiA*, med primer vs3 og primer vs4, der primer vs3 hadde overheng komplementær med Janus revers primer. 3) Janus-sekvens med Janus forward- og revers-primer. I første overlapp-PCR reaksjon ble sekvens 1) og sekvens 3) fusjonert. I en ny overlapp-PCR reaksjon ble overlapp-PCR-produktet fusjonert med sekvens 2) (**Figur 10**).



**Figur 10:** Sekvensene som ble konstruert med PCR-amplifisering og overlapp-PCR for knockout av nativt *amiA* med Janus-kassetten. Figuren er laget i BioRender.

Genkassetten med *amiA* og mutert *amiA* (med konstitutiv promotor (P3) og C-terminal flag-sekvens) som ble transformert inn i *S. pneumoniae* GS515 ble laget på samme måte som Janus-kassetten, med

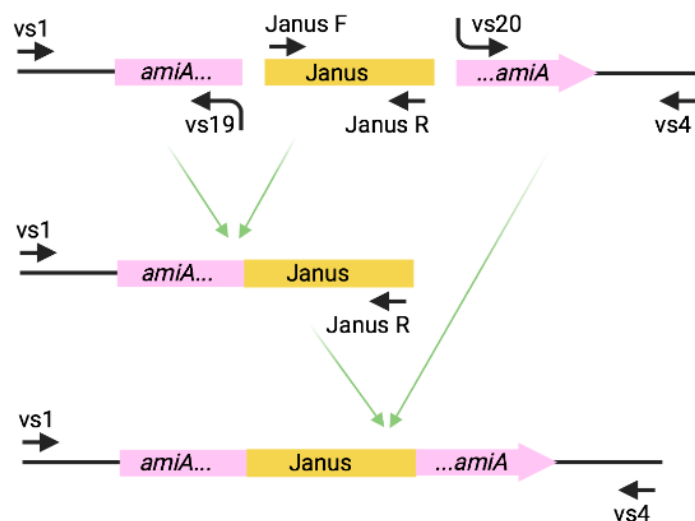
primere og oppstrøms- og nedstrømssekvenser relevante for genet som skulle settes inn (*amiA*: vs9 og vs11. Mutert *amiA*: vs9, vs5, vs6 og vs11) og for lokus som skulle knockes ut (khb50, khb51, khb52 og khb53). Det ble til sammen to overlapp-PCR reaksjoner for *amiA*-kassetten og tre for den muterte *amiA*-kassetten. Genomisk DNA fra *S. pneumoniae* RH425 ble brukt som templat for alle DNA-sekvensene bortsett fra sekvensene amplifisert opp med primere 50 og 51, og med 52 og 53. Til disse sekvensene ble genomisk DNA fra *S. pneumoniae* GS515 brukt som templat. Promotoren P3 er en sterk konstitutiv promotor som ble introdusert via primerhalen til vs9 (Sorg et al., 2015). Flag-sekvensen ble introdusert via primerhalen til vs11 (**Figur 11**).



**Figur 11:** Sekvensene som ble konstruert med PCR-amplifisering og overlapp-PCR for å introdusere mutert og ikke-mutert P3-*amiA* med flag-sekvens i *S. pneumoniae* GS515. Symbolet \* indikerer punktmutasjon. Figuren er laget i BioRender.

For å knocke ut kun en liten del av *amiA* ~200 bp ble overlapp PCR brukt for å sette sammen tre PCR-produkter i to PCR-reaksjoner. Primere i) vs1 og vs19, ii) Janus F og Janus R, og iii) vs20 og vs4 ble brukt til å amplifisere sekvensene i) ~1000 bp oppstrøms for *amiA* og en del av *amiA*, ii) Janus og iii) en del av *amiA* og ~1000 bp nedstrøms for *amiA* (**Figur 12**).





**Figur 12:** Sekvensene som ble konstruert med PCR-amplifisering og overlapp-PCR for å knocke ut ~200 bp i *amiA*. Figuren er laget i BioRender.

### 3.3.2.3 Agarose-gelelektroforese

I denne oppgaven brukes agarose-gelelektroforese til å rense og separere PCR-produkter etter størrelse og til å bekrefte at PCR og rensing av PCR-produkt var vellykket. DNA-prøver ble separert i en 1% (w/v) agarosegel ved hjelp av elektroforese ved 1,2 V/cm<sup>2</sup>. 1% agarosegel separerer effektivt DNA molekyler fra 500-5000 bp. Jo kortere DNA-fragmenter som skal separeres, jo høyere prosentandel agarose tilsettes gelen. Gelen tilsettes PeqGREEN som eksiteres av UV-lys og fluorescerer kun når det er bundet til dobbeltrådet DNA. Når strømmen aktiveres, vil de negativt ladde nukleinsyrene bevege seg gjennom porene i gelen mot den positive polen. Etter en viss tid har de lengste fragmentene migrert kortest, og de korteste fragmentene har migrert lengst gjennom gelen (Lee et al., 2012). For å isolere PCR-produkt visualiseres nukleinsyre-båndene med UV-lys og kuttet ut av gelen.

### 3.3.2.4 Rensing av PCR produkt

Etter en agarose-gelelektroforese kan PCR-produkt skjæres ut fra agarosegelen for å ekstrahere ut PCR-produktet. I denne oppgaven ble NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up fra Macherey-Nagel brukt til å rense PCR-produkter. Gelbiten løses først i ca. 500 µL bindingsbuffer i et eppendorfrør. Røret settes på 55 °C i ca. 10 min for å sikre at all gelen har blitt fullstendig løst. Løsningen overføres til en kolonne og sentrifugeres i 30 sek. Alle sentrifugeringsstegene i rensprosessen foregår på 11 000 rpm i en bordsentrifuge. Væsken som passerer gjennom kolonnen («flow-through») kastes. PCR-produktet

er bundet til silicafilteret i kolonnen. Filteret skal vaskes en eller to ganger med 700  $\mu\text{L}$  vaskebuffer tilsatt etanol. Røret sentrifugeres i 30 min, vaskeløsningen kastes, og røret sentrifugeres i ett minutt for å tørke filteret tilstrekkelig. Det siste steget er elueringssteget. Kolonnen overføres til et rent eppendorfrør og 30-40  $\mu\text{L}$  elueringsbuffer tilsettes filteret. La stå i ett minutt med lokket igjen for å la løsningen trekke godt inn i filteret for å la vannet i bufferen løse DNAet fra silicamaterialet. Videre sentrifugeres røret i ett minutt før filteret kan kastes. PCR-produktet befinner seg i eluatet i eppendorfrøret (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit protocol).

### 3.3.2.5 PCR-screening

PCR kan brukes til å screene etter spesifikke DNA-sekvenser i et templat. Ved å benytte primere som er designet for å amplifisere en spesifikk målsekvens, kan man bruke PCR til å screene bakterier for tilstedeværelsen av denne sekvensen i sitt kromosom eller plasmid (McPherson, 2000).

I denne oppgaven ble PCR brukt for å bekrefte at transformanter hadde tatt opp ønsket målsekvens. Red Taq Master Mix ble brukt i PCR-reaksjonen (**Tabell 12**). Red Taq Master Mix inneholder Taq polymerase, dNTPer, reaksjonsbuffer,  $\text{MgCl}_2$ , og rødt fargestoff og stabilisator som gjør det mulig å applisere PCR-produkt på agarosegel uten tilsetning av loading buffer. Lokus-spesifikke primere ble brukt for å se om DNA-sekvensen ble satt inn i ønsket lokus etter transformasjonen.

**Tabell 12:** Reaksjonsmiks for PCR-screening med Red Taq Master Mix. Templat er ikke inkludert i tabellen, men celler fra koloni på skål ble tilsatt med tannpirker i PCR-røret. Volumet gjelder for én reaksjon.

Reagens	Volum ( $\mu\text{L}$ )	Sluttkonsentrasjon
2x Red Taq Master Mix	5	1x
10 $\mu\text{M}$ forward primer	1	1 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ reverse primer	1	1 $\mu\text{M}$
dH <sub>2</sub> O	3	
<b>Endelig volum: 10 <math>\mu\text{L}</math></b>		

## 3.4 Proteindeteksjon

### 3.4.1 SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) er en gelelektroforese som separerer proteiner etter størrelse ved hjelp av SDS (en anion-detergent). SDS denaturerer proteinene og legger seg rundt de denaturerte proteinene som en negativt ladd kappe. SDS-kappen gir en konstant ladning-til-masse-ratio. Gelen består av en øvre «stacking»-gel (4%) og en nedre separasjonsgel (10-15%). De SDS-behandlede proteinene migrerer først gjennom stacking gelen som samler og konsentrerer opp proteinene langs en linje slik at alle proteinene fra én prøve starter separeringen fra samme startpunkt. Under stacking gelen ligger separasjonsgelen. Det er i denne gelen at proteinene separeres etter størrelse. Proteinene beveger seg mot den positive polen. Størrelsen på porene i gelen gjør at de mindre proteinene beveger seg raskere gjennom gelen enn de større proteinene (Sonboli et al., 2021).

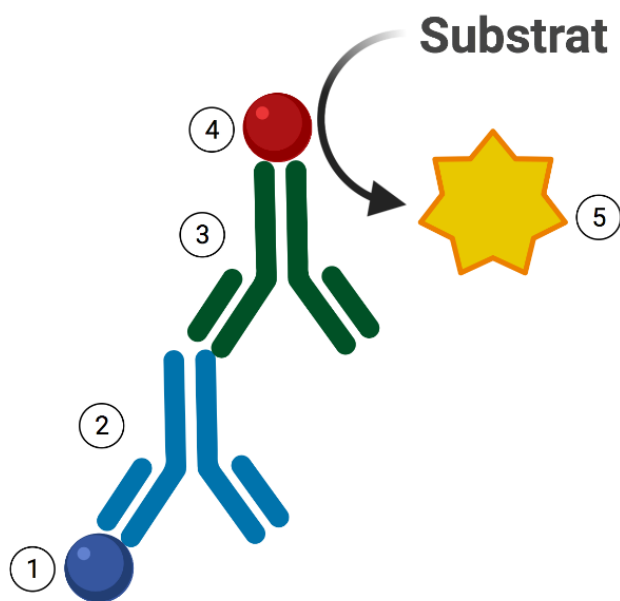
I denne oppgaven ble proteinlysat fra *S. pneumoniae* RH425, VS9, VS12, VS14, VS15, VS16 og VS17 analysert med SDS-PAGE. Celler ble høstet fra 10 mL kultur på  $OD_{550} \approx 0,2$  med sentrifugering (4000x g i fem minutter). Cellene ble resuspendert i 200  $\mu$ L 1x SDS-sample buffer og varmebehandlet på 95 °C i ti minutter. Lysatet ble sentrifugert på 13 000 rpm i et minutt, og 15  $\mu$ L av supernatant ble satt på SDS-PAGE. Color Protein Standard Broad Range ble brukt som størrelsesmarkør (5  $\mu$ L). Strømmen var satt på 120 V til prøvene nådde separasjonsgelen, deretter på 200 V.

### 3.4.2 Western blot

Western blotting er en metode der proteiner blir overført fra en gel til en membran for deteksjon av proteinene på membranen. Proteiner blir separert med SDS-PAGE før de elektroblottes over på en membran. I dette oppgaven ble en polyvinylidene difluoride (PVDF)-membran benyttet. I blotteapparatet plasseres gelen med proteinene nærmest katoden (negativ pol) oppå membranen mellom to filtre. Proteinene som er dekket med negativt ladd SDS trekkes mot den positive ladningen på bunnen av blotting-maskinen og ned på membranen. Membranen er hydrofob og har små nok porer til at proteinene ikke kommer gjennom, men binder til membranen ved hjelp av hydrofobe interaksjoner. Filtrene er vætet med en «transfer buffer» som inneholder metanol. Metanolen fjerner SDS fra proteinene på membranen (Kurien, 2021).

### 3.4.3 Immunodeteksjon

Neste steg er å detektere målproteiner på membranen. Før dette kan gjøres må ledige bindingssteder på PVDF-membranen blokkeres med proteiner som ikke vil gjenkjennes av antistoff. Dette gjøres ofte med melkeproteiner. Etter blokkering tilsettes primært antistoff og deretter sekundært antistoff. Det primære antistoffet festes til epitopen på proteinet, og det sekundære antistoffet festes til det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er konjugert til et enzym, alkalisk fosfatase eller en peroksidase. Et substrat tilsettes hvorav enzymet katalyserer en reaksjon med substratet som frigir lys (**Figur 13**). Det kjemiluminescerende signalet fotograferes og visualiseres som et farget bånd på membranen. Det finnes også andre typer sekundære antistoffer som gir kolorimetrisk eller fluorescerende signal (Kurien, 2021).



**Figur 13:** Immunodeteksjon med 2) primært antistoff som festes til 1) protein epitop. Til primært antistoff festes 3) sekundært antistoff med 4) peroksidase. Peroksidasen katalyserer reaksjonen der substratet gjøres om til 5) signal i form av lys. Figuren er laget i BioRender.

I denne oppgaven ble SDS-PAGE, Westerblotting og immunoblotting brukt for å observere om en punktmutert versjon av et protein har lik stabilitet som villtypeversjonen. Ved å fusjonere en Flag-tag-kodende sekvens til genene for de respektive proteinene kunne de detekteres med immunoblotting ved å bruke det primære antistoffet ANTI-FLAG<sup>®</sup> som var produsert i kanin. Det sekundære antistoffet (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary antibody, HRP) gjenkjente sekvensen spesifikk for kanin-antistoff på det primære antistoffet, og var bundet til pepperrotperoksidase. Begge antistoffene ble

tilsatt i en TBS-Tween-løsning i forholdet 1:4000, og membranen lå på vipping i løsningen i en time. Membranen ble vasket tre ganger i ti minutter mellom tilsetning av det primære og det sekundære antistoffet. Molekylvekten til de aktuelle proteinene (AmiA-Flag, AmiE-Flag og AmiF-Flag) ble kalkulert på <https://web.expasy.org/protparam/>. Ved hjelp av en ladder (Color Protein Standard Broad Range) ble de ulike båndene identifisert utfra masse. SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate kit ble brukt som substrat for pepperrotperoksidase. Western blot gel kamera (Azure C400, AH Diagnostics) ble brukt for å ta bilde av signalet på membranen.

### 3.5 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

I denne oppgaven er konsentrasjonen av Fusiformicin ukjent. MIC-verdien til Fusiformicin blir derfor en relativ verdi oppgitt i  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , kun aktuell for Fusiformicin-konsentratet opparbeidet i denne oppgaven.

En mikrotiterplateleser ble brukt for å finne den relative MIC-verdien til Fusiformicin på *S. pneumoniae*. Det ble laget to-fold fortynningsrekker av Fusiformicinet i en mikrotiterplate (96 brønner) som ble tilsatt bakteriekultur som var tidlig i vekstfasen ( $\text{OD}_{550} \approx 0,05$ ). Første brønn i fortynningsrekken inneholdt  $10 \mu\text{L}$  Fusiformicin og  $290 \mu\text{L}$  *S. pneumoniae* kultur. Én brønn (A1) inneholdt kun vekstmedium som referansepunkt. Før hver måling ble platen ristet i fem sekunder for å sikre homogen løsning i brønnene. Plateleseren målte optisk tetthet i brønnene hvert femte minutt (200 sykluser), som resulterte i én vekstkurve per brønn. Vekstkurvene viser bakterievekst i hver brønn over tid og avslører hvilken brønn som hemmet veksten med 100% på lavest mulig konsentrasjon av Fusiformicin, altså MIC.

Den samme metoden ble brukt for å finne  $\text{MIC}_{100}$ -verdiene til nisin, ampicillin, tetrasyklin og ciprofloksasin på *S. pneumoniae*.

### 3.6 Mikroskopi

I denne oppgaven ble Zeiss LSM 700-mikroskop med 100x objektiv brukt for å analysere morfologiske endringer av *S. pneumoniae*. Cellene ble immobilisert ved å presse dem ned på en film av 1,2% agarose på et objektglass. Fasekontrast- og fluorescens-bilder ble visualisert i ImageJ og statistisk analysert i MicrobeJ.

### 3.6.1.1 Live/dead-farging

Live/dead-farging er en metode som brukes for å teste viabiliteten til bakterieceller, spesielt med tanke på om cellemembranen er intakt. Dette gjøres med to fargestoffer, SYTO 9 green og Propidium iodid, som begge binder DNA, men der kun SYTO 9 green kan krysse cellemembranen. SYTO 9 green fluorescerer grønt, men Propidium iodid fluorescerer rødt og er dominat over det grønne. Ved mikroskopering observeres det om cellene har en grønn eller rød farge. Dersom cellene er grønne, betyr det at membranen er intakt. Dersom cellene er røde betyr det at membranen ikke er intakt, og at det kan være porer som slipper inn det røde fargestoffet (ThermoFisherScientific, 2022a).

I denne oppgaven ble det utført Live/dead-farging på Fusiformicin-behandlede celler for å se om Fusiformicinen har ført til poreformasjoner i bakterienes cellemembran. Live/dead-miks (1:1) fra LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> Bacterial Viability Kit ble tilsatt Fusiformicin-behandlet kultur i en konsentrasjon på tre  $\mu\text{L}/\text{mL}$  og inkuberte ca. 15 min i mørket før mikroskopering. SYTO 9 ble eksitert ved 495 nm, og propidium iodid ble eksitert ved 592 nm.

### 3.6.1.2 DAPI-farging

DAPI, eller 4',6-diamidino-2-fenylindol, er et blått fluorescerende fargestoff hvis fluorescens øker ~20 ganger når det bindes til dobbeltrådet DNA. Stoffet kan farge DNAet i levende celler ettersom det kan krysse en intakt cellemembran ved høye konsentrasjoner, men det brukes oftest på fikserte celler. DAPI eksiteres og fluorescerer når det belyses med ultrafiolett lys (ThermoFisherScientific, 2022b).

I denne oppgaven ble DAPI tilsatt bakteriekulturene i en konsentrasjon på 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  og kulturene inkuberte så i ca. 5 min før mikroskopering. DAPI ble eksitert ved 353 nm.

## 3.6.2 Sytox-analyse

Sytox Green er et fluorescerende fargestoff som binder til DNA, men som ikke kan krysse en intakt cellemembran. Når fargestoffet eksiteres med 450-490 nm bølgelengde emitteres en bølgelengde på 523 nm. Stoffet får >500-fold økning i fluorescensen ved binding til DNA. Disse egenskapene gjør at Sytox Green ofte brukes som en indikator på døde celler i en kultur (ThermoFisherScientific, 2021a).

I denne oppgaven ble Sytox Green brukt som en indikator på om Fusiformicin danner porer eller ødelegger cellemembranen i *S. pneumoniae*. Sytox Green og cellekultur ble tilsatt brønnene (12 stk) i tre rader på en plate med 96 brønner. Det ble gjort avlesninger for OD<sub>550</sub> og for Sytox-fluorescens (523 nm) i en plateleser. Før måling ble platen ristet i fem sekunder for å sikre homogen løsning i brønnene. Det ble gjort avlesning med fem minutters intervaller (totalt 181 sykluser). En to-fold-fortynningsrekke med Fusiformicin ble tilsatt da kulturen hadde nådd en OD<sub>550</sub> på ca. 0,2. En sluttkonsentrasjon på 1% triton X-100 ble tilsatt som positiv kontroll for fluorescenssignal ved total membranoppløsning.

### 3.6.3 Subkloning i *E. coli*

#### 3.6.3.1 Lage kompetente celler

Noen bakteriearter, som *S. pneumoniae*, er naturlig kompetente, som betyr at de naturlig tar opp nakent DNA fra omgivelsene. Dog, de fleste bakterier har ikke denne evnen til å tilegne seg nytt arvestoff fra omgivelsene (Johnston et al., 2014). I laboratoriet kan bakterier gjøres kompetente, og noen lar seg manipulere enklere enn andre. Fordi *E. coli* er lett å dyrke og lett tar til seg DNA, blir den ofte brukt som vert når man gjør subkloning i plasmider (Blount, 2015).

*E. coli* kan gjøres kunstig kjemisk kompetente med en metode som innebærer kalsiumklorid og et varmesjokk. Ved å suspendere cellene i en iskald løsning med høy konsentrasjon av kalsium gjøres de kompetente for opptak av DNA. Det er ikke helt klart hva mekanismen bak kompetansen er, men det antas at de toverdige Ca<sup>2+</sup>-kationene binder både til lipopolysakkarider på cellens overflate og DNAet, som begge har negativ ladning, og dermed bringer DNAet nærmere cellen (Asif et al., 2017; Panja et al., 2006). Det er også antatt at CaCl<sub>2</sub>-behandlingen gjør cellemembranen mer gjennomtrengelig (Rahimzadeh et al., 2016). Ved å plutselig utsette de kalde kalsium-behandlede cellene for varme gjøres penetrasjonen av DNAet over cellemembranen inn til cytosol mulig (Asif et al., 2017).

I denne oppgaven ble *E. coli* brukt med hensikt å produsere mange kopier av plasmidene pFD116-amiA, pFD116-amiACDEF og pMG36e-amiACDEF (**Tabell 7**). Plasmidene pFD116 og pMG36e ble benyttet for subkloning. pFD116 har en spectinomycinresistenskasset, mens pMG36e gir erytromycinresistens. Begge plasmidene kan replikeres av *E. coli* og i streptokokker. *E. coli* DH5-alfa ble gjort kjemisk kompetente med CaCl<sub>2</sub>. En kultur i tidlig log fase (OD<sub>600</sub> ≈ 0,1) ble dyrket til OD<sub>600</sub> ≈ 0,4 og satt på is i 30-60 min. Kulturen ble holdt kald i alle stegene videre. Cellene ble høstet med

sentrifugering (4000x g i fem min på 4 °C) og resuspendert i halvparten av kultur-volumet med 0,1 M steril iskald CaCl<sub>2</sub>, og ble inkubert på is i to timer. Cellene ble så høstet og resuspendert i et volum tilsvarende 1/10 av kulturvolumet med 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Glycerol ble tilsatt til sluttkonsentrasjon på 15%. Kulturen ble alikvotert til 50 µL i hvert eppendorfrør og oppbevart på is i 30 min før cellene kunne lagres på -80 °C.

### 3.6.3.2 Restriksjonskutting

Restriksjonskutting er kutting i dobbeltrådet DNA ved hjelp av restriksjonsenzymmer. Disse enzymene finnes hos ulike bakterier og er en viktig forsvarsmekanisme mot for eksempel bakteriofager. Siden restriksjonsenzymmer kjenner igjen og kutter spesifikke sekvenser på DNAet, såkalte restriksjonssekvenser, har de blitt et essensielt genteknologisk verktøy. Ulike enzymer gjenkjenner ulike sekvenser, og disse er ofte palindromsekvenser. Restriksjonsenzymmer etterlater seg enten butte ender eller klebrige ender (Choi et al., 2019). **Figur 14** viser et eksempel på klebrige ender.



**Figur 14:** XhoI restriksjonssekvens (øverst) og klebrige ender etter kutting (nederst). Pilene indikerer hvor enzymet kutter i restriksjonssekvensen (ThermoFisherScientific, 2021b).

For å lage plasmidene pMG36e-amiACDEF, pFD116-amiA og pFD116-amiACDEF ble PCR produkter av *amiA* og *ami*-lokuset ligert inn i pMG36e og pFD116. Primerne for å amplifisere *amiA* og *ami*-lokuset ble designet slik at enten kuttasetene SalI-HF og HindIII-HF (brukt for pMG36e) eller XhoI og SalI-HF (brukt for pFD116) ble innført på henholdsvis 5' og 3' ende. PCR-produktene ble deretter kuttet med respektive restriksjonsenzymmer og ligert inn i pMG36e eller pFD116. CutSmart-buffer ble brukt for begge enzymene i én reaksjon.



I pFD116 var størrelsene på genet som skulle kuttes ut og resten av plasmidet for like til at fragmentene kunne separeres på gel. Derfor ble et tredje enzym, NcoI-HF, med restriksjonssete midt i genet brukt for å øke forskjellen på størrelsen på DNA-molekylene.

For å unngå religering av plasmidets ender ble plasmidet behandlet med alkalisk fosfatase (Quick CIP) etter restriksjonskutting. Enzymet fjerner fosfatgruppen på 5' ende. Uten denne fosfatgruppen vil ikke ligasen ligere 5' til 3' (-OH). *ami*-operonet/*amiA* ble ikke behandlet med alkalisk fosfatase. Slik vil kun 5'-enden på *ami*-operonet/*amiA* ligere til 3'-endene på plasmidet. Fordi to ulike enzymer ble brukt til å kutte i plasmidet, ble denne metoden brukt som et ekstra sikkerhetstiltak. De to endene skal i teorien ikke religeres, men ligasen kan i noen tilfeller forsøke å «reparere» og re-ligere sekvensene selv om de ikke er komplementære med hverandre.

Reaksjonsmiks for restriksjonskutting av plasmid og insert er beskrevet i **Tabell 13** (pFD116, *amiA* og *ami*-operon) og **Tabell 14** (pMG36e og *amiA*). Reaksjonsmiksen inkuberte på 37 °C vannbad i en time.

**Tabell 13:** Reaksjonsmiks for restriksjonskutting av pFD116, *ami*-operonet/*amiA* ment for ligering med hverandre.

Reagens	Volum (µL) – pFD116	Volum (µL) – <i>ami</i> -operon/ <i>amiA</i>
10x CutSmart® Buffer	3 µL	3 µL
XhoI	1 µL	1 µL
SalI-HF	1 µL	1 µL
NcoI-HF	1 µL	
Plasmid	24 µL (~1 µg)	
PCR-produkt		25 µL (~500 ng)
CiP	1 µL*	
<b>Totalvolum</b>	<b>30 µL</b>	<b>30 µL</b>

\* Tilsettes etter 30 min inkubering på 37 °C, og løsningen inkuberes i ytterligere 30 min på 37 °C.

**Tabell 14:** Reaksjonsmiks for restriksjonskutting av pMG36e og *ami*-operon ment for ligering med hverandre.

Reagens	Volum ( $\mu\text{L}$ ) – pMG36e	Volum ( $\mu\text{L}$ ) – <i>ami</i> -operon
10x CutSmart®	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
Buffer		
SalI-HF	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
HindIII-HF	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Plasmid	24 $\mu\text{L}$ (~1 ng)	
PCR-produkt		25 $\mu\text{L}$ (~500 ng)
CiP	1 $\mu\text{L}$ *	
<b>Totalvolum</b>	<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>

\* Tilsettes etter 30 min inkubering på 37 °C, og løsningen inkuberes i ytterligere 30 min på 37 °C.

### 3.6.3.3 Ligering

For ligering av de restriksjonskuttete fragmentene ble konsentrasjonen av restriksjonskuttet plasmid og PCR-produkt først målt med et NanoDrop spektrofotometer. Plasmid og DNA-fragment ble blandet i et 1:10 forhold (10x mer insert enn plasmid i ng) før T4 Ligase og T4 Ligase buffer med ATP ble tilsatt (**Tabell 15**). T4 Ligase har optimal aktivitet på 16 °C (BioLabs, 2022). Ligeringsreaksjonen ble inkubert ved 16 °C over natt. Kontroll-løsning uten tilsatt insert ble også laget.

**Tabell 15:** Oppsett for ligeringsreaksjoner.

Reagens	Ligeringsmiks	Kontrollmiks
Plasmid	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
T4 Ligase buffer	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$
T4 Ligase	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Vann		15 $\mu\text{L}$
Insert	15 $\mu\text{L}$	
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

### 3.6.3.4 Transformering av *E. coli*

Kjemisk kompetente *E. coli* (se del 3.6.3.1) ble transformert med ligert plasmid ved hjelp av varmesjokk. 50  $\mu\text{L}$  kultur ble tilsatt 10  $\mu\text{L}$  ligeringsreaksjon og deretter inkubert i ca. 30 min på is før

de ble overført til 42 °C i 30 sek, og så tilbake på is i ett min. SOC-medium ble tilsatt for å restituere cellene etter temperatursjokket, og kulturen ble satt på 37 °C med risting i en time. Videre ble hele kulturen sådd ut på skåler (LB-agar med 150 µg/mL erytromycin for pMG26e og 60 mg/mL spectinomycin for pFD116) som inkuberte over natt.

### 3.6.3.5 Screening av transformant

*E. coli*-transformanter som viste resistens mot erytromycin ble screenet for pMG36e-amiACDEF. Plasmid ble rensset med E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid DNA Mini Kit I før konsentrasjonen av rensset plasmid ble målt med spektrofotometer. 200 ng plasmid ble kuttet med restriksjonsenzymene HindIII-HF og SallI-HF i én reaksjon på 37 °C vannbad i en time (**Tabell 16**). Kuttet plasmid ble kjørt på 1% agarosegel og visualisert med gel kamera.

**Tabell 16:** Reaksjonsmiks for kutting av plasmid for screening av *E. coli* transformant.

Reagens	Volum (µL)
Plasmid	10
CutSmart buffer	3
HindIII-HF	1
SallI-HF	1
dH <sub>2</sub> O	15
<b>Totalt</b>	<b>30</b>

## 4 Resultater

### 4.1 Anriket Fusiformicin viste hemmende aktivitet mot *S.*

#### *pneumoniae*

Preliminære data fra en tidligere studie på Fusiformicin i Molekylær Mikrobiologi-gruppen indikerte at Fusiformicin er et peptidbasert molekyl. For å styrke disse dataene ble det i dette arbeidet utført flere biofysikalske tester på stoffet. For å utføre testene var det nødvendig å ha stoffet i konsentrert og aktiv form. Fusiformicin ble anriket fra *L. fusiformis*-kultur med Amberlite<sup>®</sup> XAD16N hydrofobe kuler.

Dette viste at stoffet har hydrofobe egenskaper. Det anrikede Fusiformicinet viste antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae* (**Figur 15**).



**Figur 15:** Testing av Fusiformicins antimikrobielle aktivitet mot *S. pneumoniae*.

## 4.2 Fusiformicin er et peptid eller varmestabilt protein

Mange bakterier i genuset *Bacillus* produserer en rekke lipopeptider og peptider med antimikrobiell aktivitet (Meena & Kanwar, 2015; Saggese et al., 2022). Fordi *L. fusiformis* er fylogenetisk nær *Bacillus* er det ikke usannsynlig at den også driver produksjon av antimikrobielle lipopeptider eller peptider (Ahmed et al., 2007). For å bestemme om Fusiformicin hadde karakteristikk lik proteiner/peptider (inkludert lantibiotika) eller lipopeptider, ble ulike biofysiske tester utført på stoffet. Amberlite® XAD16N-anrikt Fusiformicin ble testet med hensyn på varmestabilitet, sensitivitet for proteolytisk hydrolyse, for potensielle disulfid-bindinger og for sensitivitet for acylaseaktivitet.

Behandling med polymyxin acylase ble benyttet for å avsløre om et antimikrobielt stoff er et lipopeptid. Acylasen kløyver acylbindingen mellom peptid og lipid i lipopeptider, som fører til tap av eventuell aktivitet. Ved å behandle Fusiformicin med polymyxin acylase over natt på optimal temperatur (37 °C), og deretter teste det for antimikrobiell aktivitet, ble det testet om Fusiformicin er et lipopeptid.

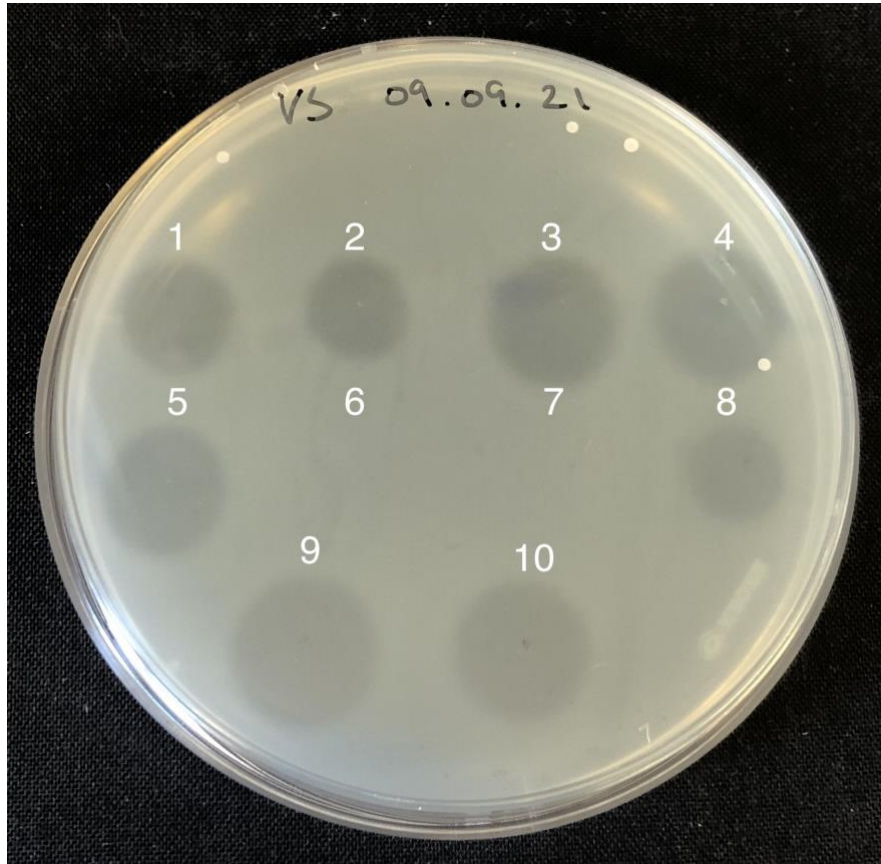
Videre ble det testet for om Fusiformicin er et lantibiotikum. Bakterier nært beslektet med *L. fusiformis* (*Bacillus*) produserer bakteriosiner, hvorav mange av dem hører til gruppen lantibiotika, et klasse I-bakteriosin med flere disulfidbroer. Brudd av disse bindingene fører til tap av antimikrobiell aktivitet (Abriouel et al., 2011; Ahmed et al., 2007; McAuliffe et al., 2001). Det anrikede

Fusiformicinet ble behandlet med DTT- og iodacetamid. DTT bryter disulfidbroer mellom cystein-residuer i peptider, og iodacetamid binder seg til frigjorte sulfhydrylgrupper. Dersom DTT- og iodacetamid-behandlet Fusiformicin hadde redusert aktivitet, ville det si noe om innholdet og viktigheten av cysteiner. Det ville også ha pekt mot at Fusiformicin er et lantibiotikum.

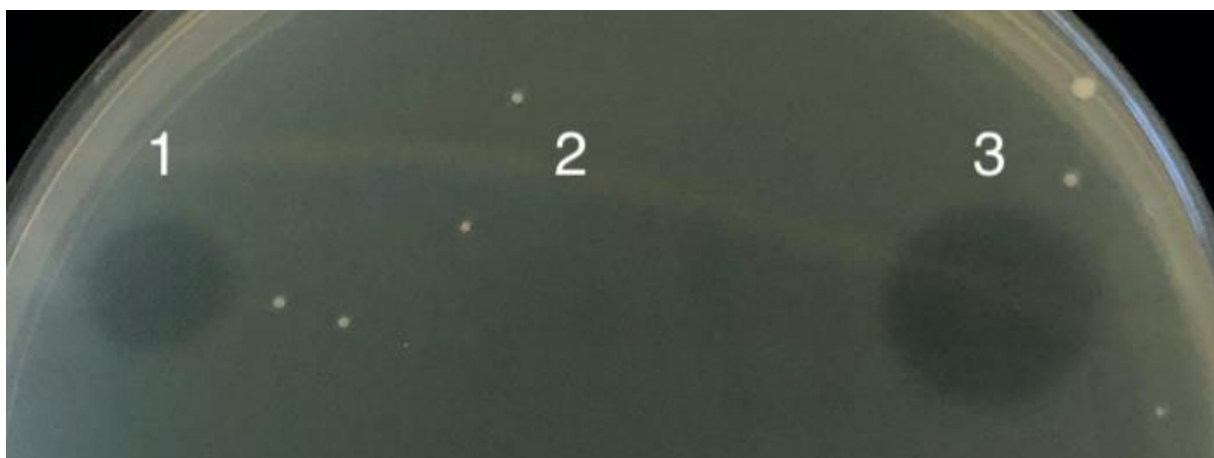
For å undersøke om Fusiformicin er et protein med en tredimensjonal struktur ble det anrikede Fusiformicinet behandlet med høy temperatur (95 °C). Varmebehandlingen ville denaturert en eventuell tertiærstruktur og avslørt om stoffet er et foldet protein.

Preliminære resultater har pekt mot at Fusiformicin er et peptid, og derfor ble det anrikede stoffet i tillegg behandlet med proteinase K, et enzym som bryter peptid-bindinger mellom aminosyrer i et peptid eller protein. Reduksjon av aktivitet etter proteinase K-behandling ville styrke hypotesen om at Fusiformicin er et peptid eller protein.

Resultatene viste at behandling verken med varme, polymyxin acylase eller DTT og iodacetamid hadde noen signifikant reduserende effekt på Fusiformicins antimikrobielle aktivitet. Derimot viste Fusiformicin behandlet med proteinase K (50 µg/mL) redusert aktivitet, og Fusiformicin behandlet med 10x høyere konsentrasjon proteinase K (0,5 mg/mL) ingen aktivitet. (**Figur 16** og **Figur 17**) Dette indikerte at Fusiformicin er et peptid eller et varmemestabilt protein.

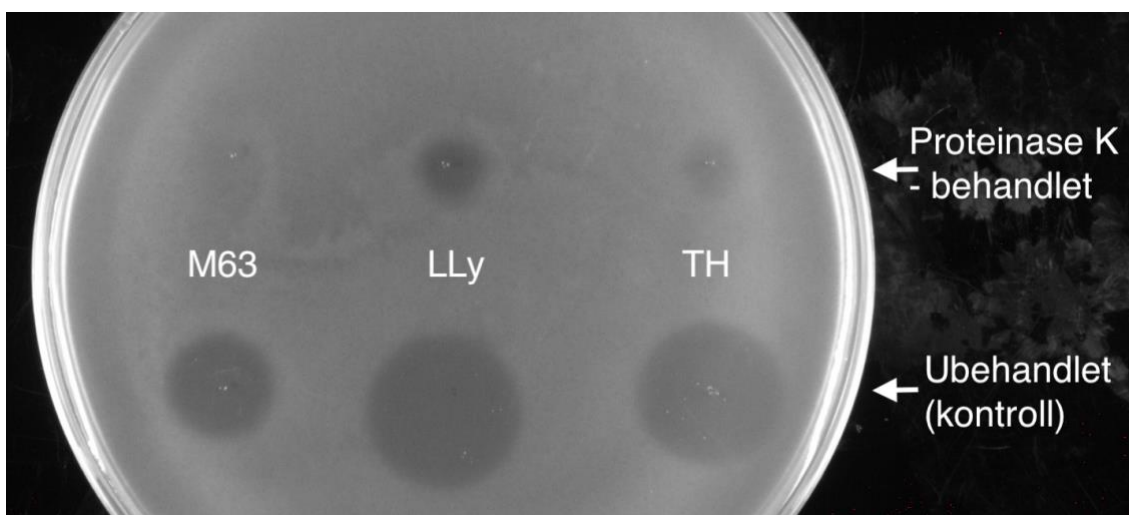


**Figur 16:** Aktivitetstest av Fusiformicin behandlet med 1) varme (95 °C), 2) proteinase K (50 µg/mL), 3) polymyxin acylase (50 µg/mL) og 4) DTT/iodacetamid (20/150 mM). Kontrollløsningene er 5) ubehandlet Fusiformicin, 6) proteinase K (50 µg/mL), 7) polymyxin acylase (50 µg/mL), 8) DTT/iodacetamid (20/150 mM), 9) ubehandlet Fusiformicin inkubert på 37 °C over natt og 10) ubehandlet fortynnet Fusiformicin (0,75 ganger fortynning). Kontroll 9) kontrollerer om inkubering på 37 °C over natt påvirker Fusiformicinets aktivitet, og kontroll 10) kontrollerer om Fusiformicinets aktivitet i 4) var påvirket av 0,75x fortynning som kom av tilsetning av 6,8 µL DTT og iodacetamid til anriket Fusiformicin. De andre behandlingene påvirker ikke konsentrasjonen av Fusiformicin i betydelig grad.



**Figur 17:** Aktivitetstest av Fusiformicin behandlet med 1) proteinase K (50 µg/mL), 2) proteinase K (0,5 mg/mL) og 3) polymyxin acylase (50 µg/mL).

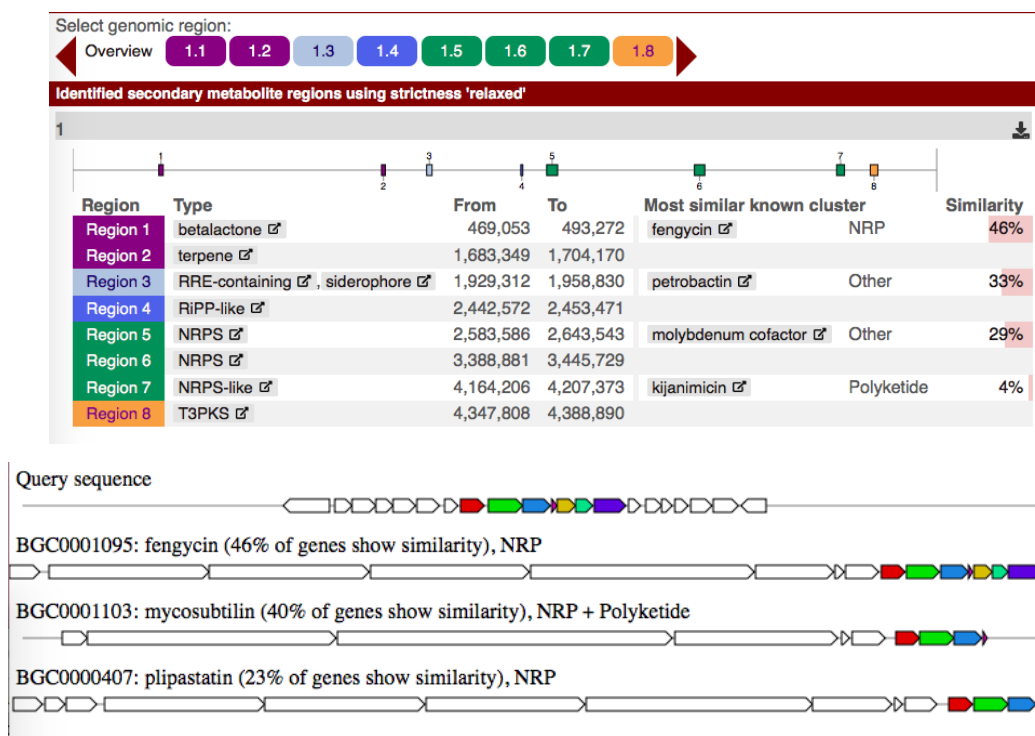
Massespektrofotometri av HPLC-renset Fusiformicin utført av Dr. Daniel Straume ga en masse på 1248 Da. Søk med denne massen mot teoretiske peptider kodet av gener i *L. fusiformis*-genomet ga ingen treff, men ved å utvide søket ble det funnet et treff mot et peptid fra beta-kasein (H2N-MHQP HQPLPPT-COOH). Det ble derfor spekulert i om Fusiformicin ikke blir produsert av *L. fusiformis*, men at det er et stoff som oppstod som et metabolsk produkt av bakteriens nedbrytning av beta-kasein i vekstmediet (TH-medium). Det er kjent at peptider fra nedbrytning av kasein kan ha antimikrobiell effekt (Fialho et al., 2018; Shimizu et al., 2014). For å bekrefte eller utelukke denne muligheten, dyrket Dr. Straume *L. fusiformis* i minimalt M63-medium, et medium som ikke inneholder noen proteiner. Det vil si at alle proteiner/peptider fra denne kulturen var produsert av bakterien selv. I tillegg ble *L. fusiformis* dyrket i Lab-Lemco tilsatt gjærekstrakt (LLY uten beta-kasein). Fusiformicin ble renset fra både M63 og LLY-kulturene på samme måte som tidligere beskrevet, og anriket materiale ble testet med hensyn på aktivitet og sensitivitet for proteolytisk inaktivering. Et overlay med *S. pneumoniae* ble utført med spotting av ubehandlet anriket stoff, og anriket stoff behandlet med proteinase K (50 µg/mL) (**Figur 18**). Det ubehandlede stoffet viste antimikrobiell aktivitet, som tydet på at det var anriket Fusiformicin. Behandling med proteinase K hemmet aktiviteten til stoffet. Med dette står hypotesen om at Fusiformicin er et peptid eller varmestabilt protein produsert av *L. fusiformis*, og ikke et peptid fra nedbrytning av beta-kasein. Sistnevnte har mest sannsynligvis vært et peptid som har fulgt med Fusiformicin-molekylet gjennom HPLC-rensingen.



**Figur 18:** Aktivitetstest av proteinase K (50 µg/mL)-behandlet- og ubehandlet Fusiformicin produsert av *L. fusiformis* dyrket på M63-, LLY- og TH-medium.

### 4.3 *L. fusiformis*-genomet koder ikke for kjente antimikrobielle stoffer

Med en endelig bekreftelse på at Fusiformicin produseres av *L. fusiformis* ble BAGEL4- og antiSMASH-analyser gjennomført for å predikere produksjon av kjente antimikrobielle stoffer, og for få en pekepinn på hva slags type stoff Fusiformicin er. Tidligere har genomet til *L. fusiformis*-isolatet i dette arbeidet blitt sekvensert og lukket ved å kombinere Illumina- og Nanopore-sekvensering. Genomet ble analysert i BAGEL4, men ga ingen områder av interesse (areas of interest). antiSMASH-analysen predikerte genklynge med 46% likhet til genklyngen for produksjon av fengycin, en type sirkulært lipopeptid produsert av *Bacillus*, med antimikrobiell aktivitet hovedsakelig mot fungi (Medeot et al., 2020). Identitetsprosenten var lav, men indikerte at det ville være hensiktsmessig å teste om Fusiformicin er et lipopeptid. En slik test ble utført i denne oppgaven (se 3.1.5.4), og resultatet viste at Fusiformicin ikke er et lipopeptid. Analysen predikerte i tillegg genklynger for produksjon av andre ikke-ribosomale peptider og post-translasjonelt modifiserte peptider (bakteriosin klasse I). Prediksjonene var mindre enn 33% identiske med kjente genklynger (Figur 19). Identitetsprosenten var lav og ble ikke regnet som signifikant. Fordi antiSMASH baserer seg på en database med gener for kjente antimikrobielle stoffer, viste resultatet at Fusiformicin er et ukjent antimikrobielt stoff.



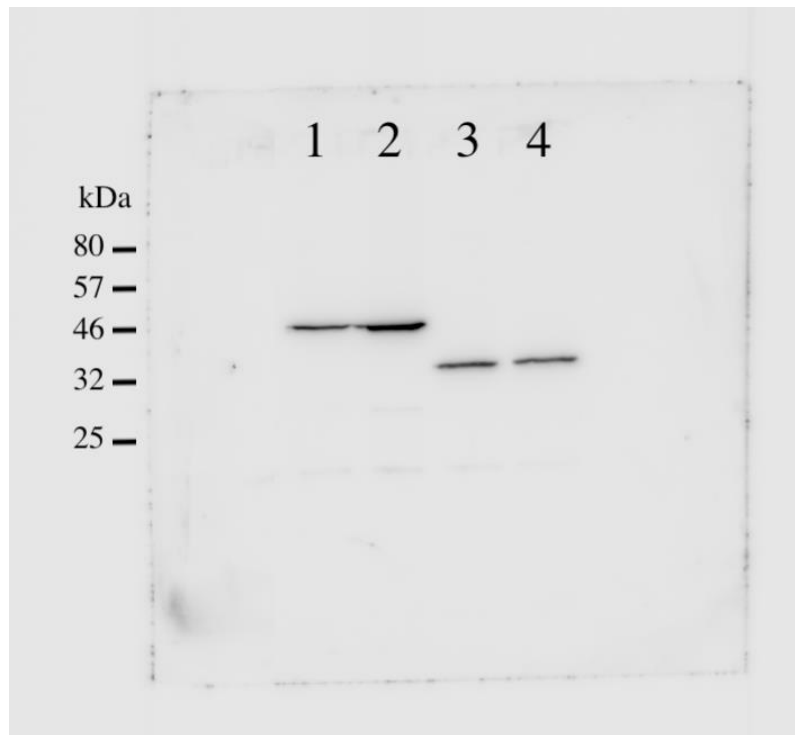
**Figur 19:** Resultat fra antiSMASH-analyse av *L. fusiformis* sitt genom (øverst), og region 1 i resultatet (nederst). De fargede genene viser likhet med genomet til *L. fusiformis*.



## 4.4 Punktmutert AmiEF er stabile *in vivo*

Som tidligere nevnt i seksjon 1.4.1 har studier på Fusiformicin identifisert at å uttrykke et intakt, men inaktivt Ami-opptakssystem (punktmuterte Walker B-motiver i AmiE og AmiF), gjør *S. pneumoniae* resistent mot Fusiformicin (Hauge, 2020). Fordi Fusiformicin sannsynligvis er et peptid, indikerte dette at stoffet tas opp via Ami-systemet og virker intracellulært, eller at Ami-systemet fungerer som en reseptor for Fusiformicin slik at stoffet kan danne en pore i membranen. Hvis sistnevnte er den riktige mekanismen, betyr det at Fusiformicin spesifikt gjenkjenner den aktive konformasjonen av Ami, og ikke den inaktive konformasjonen. Det kan også tenkes at resistensen hos mutantene med inaktivt Ami-kompleks skyldes at punktmutasjonene som ble innført for å inaktivere funksjonen fører til destabilisering av proteinet (Houry, 2014). Immuniteten skyldes altså ikke inaktivt Ami, men at deler av komplekset er borte slik at Fusiformicin ikke lenger kan importeres eller benytte Ami som reseptor for poredannelse. For å utelukke at sistnevnte var tilfelle, ble AmiE og AmiF fusjonert til en Flag-sekvens for immunodeteksjon. Tilsvarende AmiE og AmiF med mutasjoner i det ATP-hydrolyserende Walker B-motivet ble Flag-tagget, og alle fire fusjonsproteiner ble plassert i sine respektive native lokus.

Resultatene viste at mutert AmiE og AmiF er stabile. Dette utelukker at Fusiformicin-resistensen som følge av mutasjoner i AmiEF kommer av at proteinene blir degradert. Molekylvekten til (i) AmiE-Flag og (ii) AmiF-Flag ble kalkulert til (i) ~40,5 kDa og (ii) ~35,7 kDa.



**Figur 20:** Immunoblott av 1) AmiE, 2) Walker B-mutert AmiE<sup>(D184A)</sup>, 3) AmiF og 4) Walker B-mutert AmiF<sup>(D190A)</sup>.

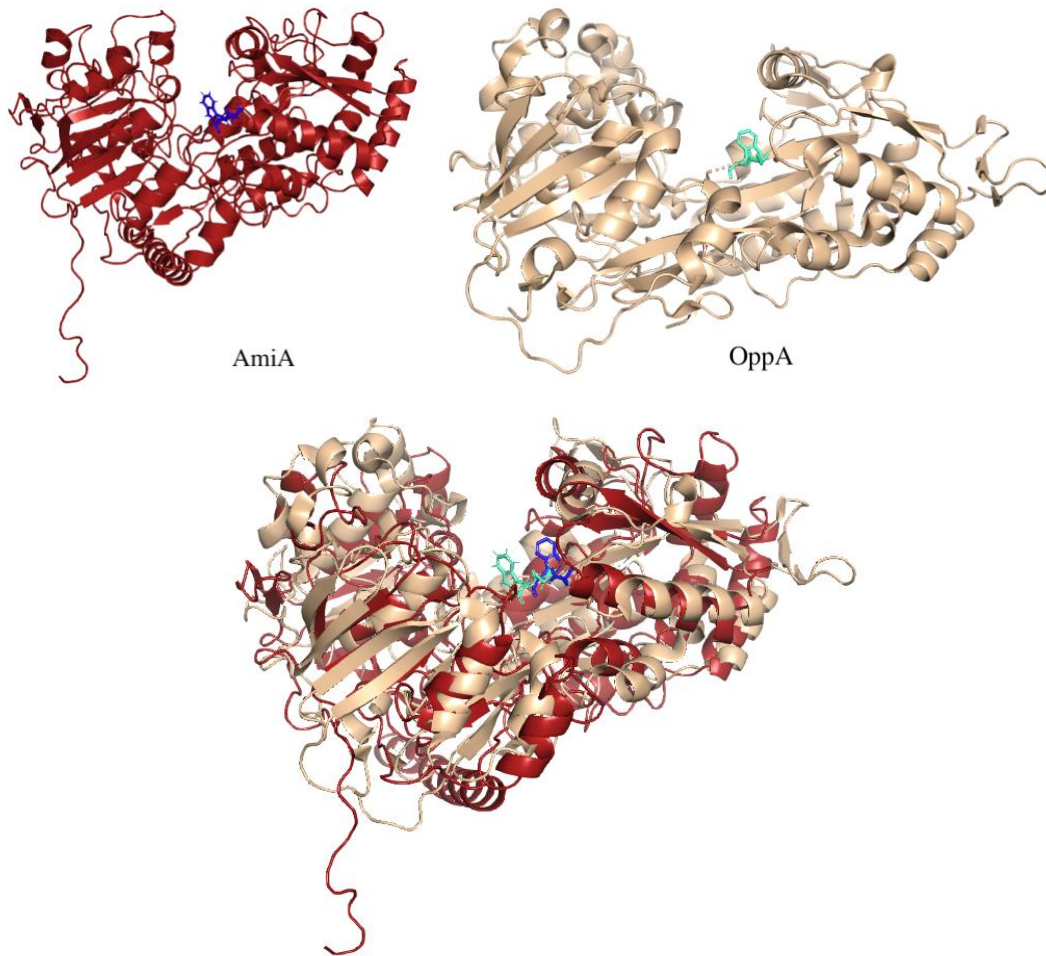
## 4.5 Predikasjon av AmiA proteinstruktur

Siden immunitet mot Fusiformicin enten skyldes fravær av opptak gjennom Ami-systemet, eller at kun den aktive formen av Ami fungerer som en reseptor for poredannelse, var det ønskelig å konstruere et intakt Ami-system med aktive AmiEF proteiner, men som likevel ikke kan transportere peptider.

Intensjonen ble å punktmutere AmiA slik at det ikke lenger kunne binde peptider. I Protein Data Bank (PDB) ble aminosyresekvensen til AmiA ble brukt for å søke etter et protein med høy homologi til AmiA og med kjent 3D-struktur. Proteinene med størst homologi var OppA i *L. lactis* (3DRH/3RYA). I strukturen til OppA har det blitt vist at en serin og en tryptofan (SW) i proteinets peptidbindende kløft er viktige for dets evne til å binde peptider (Berntsson et al., 2009; Berntsson et al., 2011). Ved sammenstilling av AmiA- og OppA-aminosyresekvens ble det funnet at SW-aminosyrene er konserverte hos AmiA (**Figur 21**). RoseTTAFold-predikasjon av AmiA 3D-struktur, og sammenstilling av denne med kjent OppA-struktur, viste at de konserverte aminosyrene SW ligger i en liknende kløft i AmiA som i OppA (**Figur 22**). Derfor er det sannsynlig at disse aminosyrene er viktig for peptidbinding også i AmiA, og disse aminosyrene ble valgt som mål for punktmutasjon for å hemme proteinets peptidbindende funksjon.

AmiA	MKKNRVFATAGLVLLAAGVLAACSSSSKSSDSSAPKAYG----YVYTA-----	43
OppA	MNKLKVTLLASSVLAATLLSACGSNQSSSTTKKLLKAGNFDVAYQNPDKAIKGGNLKVA	60
	*:* :* *.*:*** :*:**.*:***:*: * . . *	
AmiA	----DPETLDYLI SRKNSTTV----VTSNGIDGLFTNDNYGNLAPAVAEDWEVSKDGLTY	95
OppA	YQSDSPMKAQWLSGLSNDATFATMSGPGGGQDGLFFFTDSGFKFIKGAADVALDKESKTA	120
	. * . ::* . .*:.* . . * ** * . * . : . * * :.*: * *	
AmiA	TYKIRKGVKWFSTSDGEEYAEVTAKDFVNGLKHAADK--KSEAMYLAENSVKGLADYLSGT	153
OppA	TITLRKDLKWS DGS----EVTAKDYEFYETIANPAYGSDRWTDLANIVGLSDYHTGK	175
	* .:***:*** .. *****: : * : * : : : **:*: *:	
AmiA	STDFSTVGVKAVDD---YTLQYTLNQPE-----PFWNSKLTYSIFWPLNEEFETSKGS	203
OppA	AKTISGITFPDGENGVKVIKQVFKEMKPGMTQSGNGYFLETVAPYQYLK-----DVAPKD	229
	:: :* . . : : .:*. : * * : : * . : : : : .	
AmiA	DFAKPTDPTSLLYNPGFLLKGLTAKSSVEFVKNEQYWDKENVHLDITINLAYYDGSQESL	263
OppA	LASSPKTTKPLVTGPFKPEENVAGESIKYVNPYPYWGKPKL-NSITYE VVST--AKS-	285
	::.* . * . * ** * : : . * . : : * * : : : : * . . : *	
AmiA	ERNFTSGAYSARLYPTSSNYSKVA-----EYKDNIIYTTQSGSGIAGLGVNID	312
OppA	VAALSSSKYDIINGM-VSSQYKQVKNLKGKYLQQAAMYISLMYINLGH-----YDA	336
	:*: * . . . **:*: * * * * * . : ** . .	
AmiA	RQSYNYTSKTTDSEKVVATKALLNKDFRQALNFALDRSAYSQAINGKDGAAALAVRNLFVK	372
OppA	KNSIN-----VQDRKTPLODQNVVQAIGYARNVAEVDNKF--NGLS-TPANSLIP	384
	::* * * . * * : : . ** * : : * : : . : : . : * : : *	
AmiA	PDFV---SAGEKTFG--DLVAAQLPAYGDEWKGVNLDAGDGLFNADKAKAEFAKAKKAL	427
OppA	PIFKQFTSSSVKGYEKQDLKANKLLEDDGWKLN-----KSTGYR	424
	* * * : . * : ** * : * * * * * : *	
AmiA	EADGVQFPIHLDVPV----DQASKNYISRIQSFQSVETVLGVENVVVDIQQMTSDEFL	482
OppA	EKDGKELSLVYAARVGDANAETIAQNYIQQWKI-----GVKVSLYNGKLMEFNSWV	476
	* ** : : : . * : : : ** * : : : * : : : * : : :	
AmiA	NITYYAAANASSEDWDVSGGVGPDYQDPSTYLDILKTTSETTKTYLGFDPNPSVSVVQ	542
OppA	--DHMTTPPGANDWDITDG-SWLSASEPSQ--QDLFSAAA---PYNFGHFNS---EIT	524
	: : : . : ** * : : * * . : . * : : : : : : * : : :	
AmiA	VGLKEYDKLVDEAAKETS DLNVRYEKYAAAQAWLTDSSLFIPAMASSGAAPVLSRIVPFT	602
OppA	KDLNDIDSAKSENPTYRKA AFVKYQEDMNKK-----AYVIPTNFMLNYTPVNKRIVGMT	578
	.*: : * . . * . . * : : : : : : * : : * . : ** . * : * *	
AmiA	GASAQTGSKGSDVYFKYLKLDKAVTKEEYEKAREKWLKEKAESNEKAQKELASHVK	659
OppA	LDY---G-----AMNTWSEIGVSSAKLATK-----	600
	* * : : * : . * : * *	

**Figur 21:** Sammenstilling av aminosyresekvensene til AmiA og OppA. De konserverte aminosyrene (SW) i den hydrofobe lommen er markert med grønt.



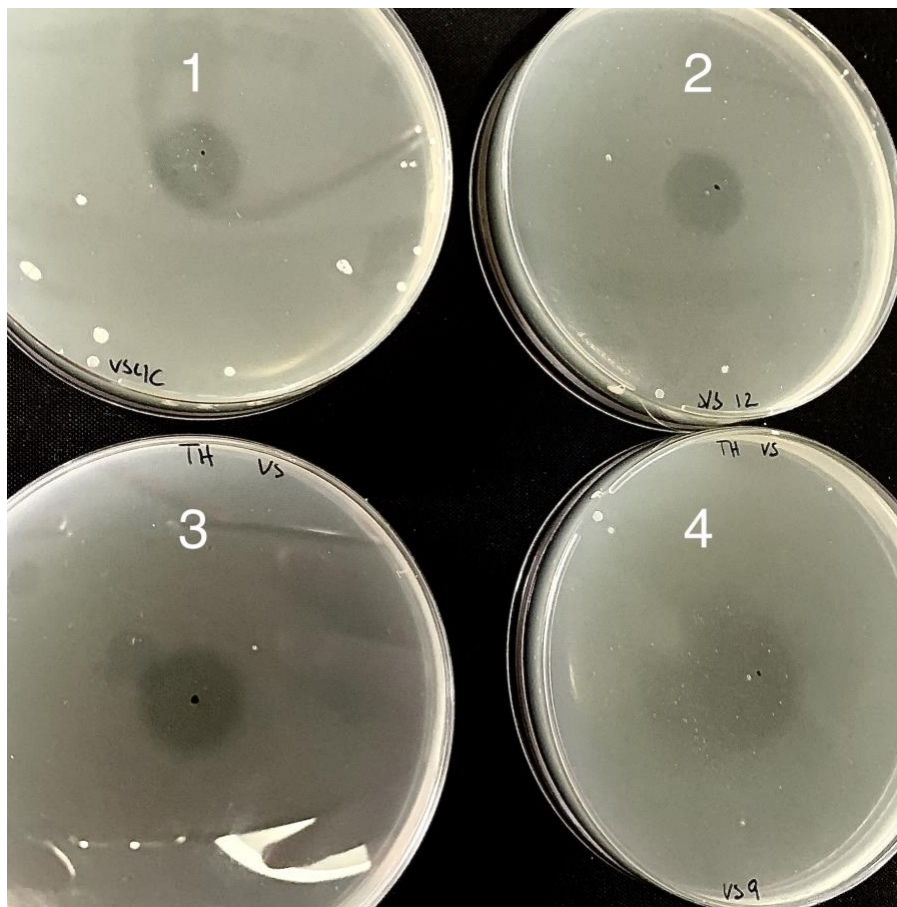
**Figur 22:** Topp: predikert struktur av AmiA (venstre), og OppA (3DRH i PDB) sin bestemte struktur (høyre). Bunn: strukturell sammenstilling av de to proteinene. De konserverte aminosyrene (SW) i den hydrofobe lommen er markert med pinne-struktur i begge proteinene, med blå farge i AmiA og turkis farge i OppA. Strukturene og sammenstillingen ble fremstilt i PyMol.

## 4.6 Oppregulering i ekspresjon av *amiA* gir økt sensitivitet for Fusiformicin i *S. pneumoniae*

Tidligere har det blitt vist at mutasjoner i Walker B motivet i AmiEF fører til Fusiformicin-resistens hos *S. pneumoniae* (Hauge, 2020). Dette gir en sterk indikasjon på at Ami-systemet er nødvendig for *S. pneumoniae*s opptak av Fusiformicin. For å få en indikasjon på om AmiA er viktig for opptak av Fusiformicin, ble det gjort punktmutasjoner i AmiA (S503A og W504A). Aminosyrene S503 og W504 i AmiA ble valgt for punktmutering på grunnlag av kunnskap om konserverte aminosyrer i den hydrofobe «kløften» i det homologe proteinet OppA i *L. lactis* (se 4.5). Disse aminosyrene antas å ha tilsvarende viktighet for peptidbinding i AmiA som i OppA.

Janus ble brukt til å innføre mutert versjon av *amiA* i *S. pneumoniae*, og det ble forsøkt på to måter. Først ble det gjort en knockout av *amiA* i *S. pneumoniae* RH425. Videre var hensikten å erstatte innsatt Janus med mutert *amiA*, men *S. pneumoniae* aksepterte ikke de punktmuterte versjonene av *amiA* i nativt lokus. *S. pneumoniae* GS515 (med Janus plassert bak *spr0323* i kapsellokuset) ble derfor transformert med P3-*amiA*, både mutert og ikke mutert, og det native *amiA* ble så knokket ut med Janus. P3 er en konstitutiv promotor med gensekvens:

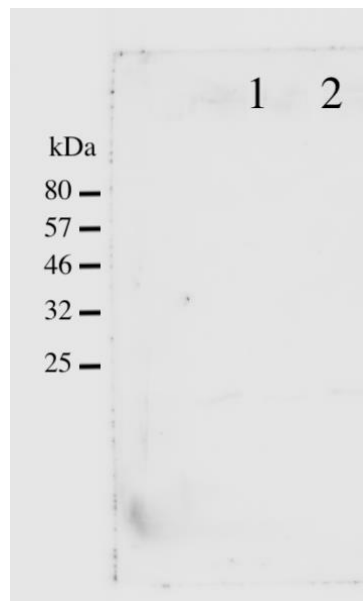
«TTGCACTGTCCCCCTGGTATAATACTATAACATGCAAGATCTAAATCAGAGGAGTAGAA A». Resultatet var *S. pneumoniae*-stammer med konstitutivt uttrykt AmiA og AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup>.



**Figur 23:** Sensitivitetstest for Fusiformicin på *S. pneumoniae* 1)  $\Delta amiA$  (VS4c), 2) P3-*amiA*<sup>(S503A, W504A)</sup> (VS12), 3) RH425 (kontroll) og 4) P3-*amiA* (VS9).

Soft-agar overlay med Fusiformicin-spotting viste at P3-*amiA* uten mutasjon (overekspresjon av *amiA*) gjorde bakterien mer sensitiv for Fusiformicin enn kontrollstammen (RH425). Bakterie med P3-*amiA* med punktmutasjoner var like sensitiv som kontrollstammen (RH425). Utrykk av AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup> førte altså ikke til at bakteriene ble mer tolerante mot Fusiformicin sammenliknet med villtypeceller (**Figur 23**). Dette var et uventet resultat fordi det ble antatt at Fusiformicin må tas opp i cellene for å

virke, og at en Ami-transporter med et suboptimalt AmiA-protein ville være en mindre effektiv transporter enn villtype-Ami-systemet. Fordi mutert P3-*amiA* likevel ga lavere sensitivitet enn ikke-mutert P3-*amiA*, ble immunoblotting utført for å se på stabiliteten av den punktmuterte AmiA-versjonen. Det ble mistenkt at det muterte proteinet fortsatt kunne binde peptider, men at mutasjonen hadde påvirket proteinets stabilitet. Molekylvekten til AmiA-Flag ble kalkulert til ~73,5 kDa. Verken mutert eller ikke-mutert protein ga signal på blottet (**Figur 24**).



**Figur 24:** Immunoblott av 1) AmiA og 2) AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup>.

Det ble så mistenkt at AmiA ikke var viktig for sensitivitet mot Fusiformicin. For å teste dette ble flere ulike delesjons-knockout-stammer av *amiA*-genet laget: (i) en hvor hele *amiA* ble knokket ut med Janus (VS4c), (ii) en der 200 bp sentralt i *amiA*-genet ble deletert (VS13) og (iii) en mutant der hele *amiA* ble deletert med en spektinomycin-resistens-kassett. Grunnen til konstruksjon av flere ulike knockout-mutanter var at det ble observert problemer med å benytte Janus i *amiA*-lokuset. Mutantene hadde resistens mot både kanamycin og streptomycin da Janus satt inne i *amiA*-lokuset, og vi mistenkte at *amiA*-genet kunne ha «hoppet» til et annet sted i genomet (har blitt observert for andre gen som for eksempel celledelingsproteinet *cozE*). PCR screening avkreftet derimot dette (data ikke vist). Overlay-analyse av de tre knockout-stammene viste at knockout av *amiA* ikke hadde noen effekt på sensitivitet for Fusiformicin i *S. pneumoniae* (**Figur 23** og **Figur 25**) (data for delesjons-knockout (iii) ikke vist).



**Figur 25:** Sensitivitetstest for Fusiformicin på *S. pneumoniae*  $\Delta$ *amiA* (VS13).

Under arbeidet ble det funnet at *S. pneumoniae* har to oligopeptid-bindende homologer av AmiA: AliA og AliB. Dr. Daniel Straume og Zhian Salehian lagde en  $\Delta$ *amiA* $\Delta$ *aliA*- og en  $\Delta$ *amiA* $\Delta$ *aliA* $\Delta$ *aliB*-knockoutstamme som også viste sensitivitet for Fusiformicin. Det viste at AliA og AliB i likhet med AmiA ikke er nødvendig for at Fusiformicin skal virke mot *S. pneumoniae*s (data ikke vist).

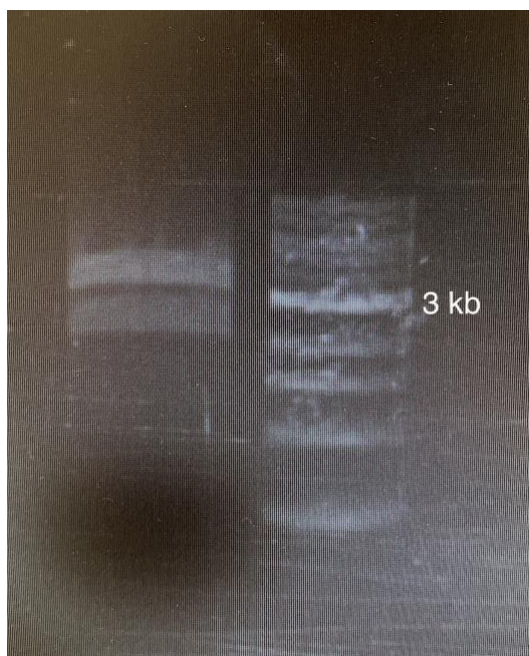
Resultatene i denne delen av oppgaven viste at fravær av AmiA ikke gir resistens mot Fusiformicin i *S. pneumoniae*, men at overekspressjon av *amiA* kan øke bakteriens Fusiformicin-sensitivitet.

## 4.7 Forsøk på å sensibilisere andre Gram-positive bakterier for Fusiformicin

Det ble forsøkt å produsere kvantiteter av plasmider i *E. coli* med intensjon om å rense plasmidet for å transformere det inn i Fusiformicin-resistente arter som *L. lactis* og *S. aureus*. Ved å klonere AmiA og AmiCDEF separat kunne det blitt observert om bakteriene ble sensitive med eller uten AmiA til stede. Dette ville fortalt oss mer i forhold til om Ami-systemet tar opp Fusiformicin (vha. binding til AmiA), eller om AmiCDEF (i aktiv form) utnyttes av Fusiformicin i forbindelse med poredannelse. Forutsatt at Fusiformicin tas opp av målcellen kunne man ved å introdusere Ami-systemet i de Gram-positive bakteriene *L. lactis* og *S. aureus* også sett på om intracellulært mål er konservert blant Gram-positive bakterier. Det ble altså forsøkt å transformere *E. coli* med pFD116-*amiACDEF*, pFD116-*amiA* og pMG36e-*amiACDEF*.



Transformasjonskultur med pFD116-amiACDEF ga kolonier på spektinomycin-skåler. Restriksjonskutting og gelelektroforese av plasmid rensset fra transformantkoloni indikerte at det var blitt gjort delelesjoner i operonet under transformasjonen (**Figur 26**). Det var altså ikke mulig å transformere *E. coli* med pFD116-amiACDEF.



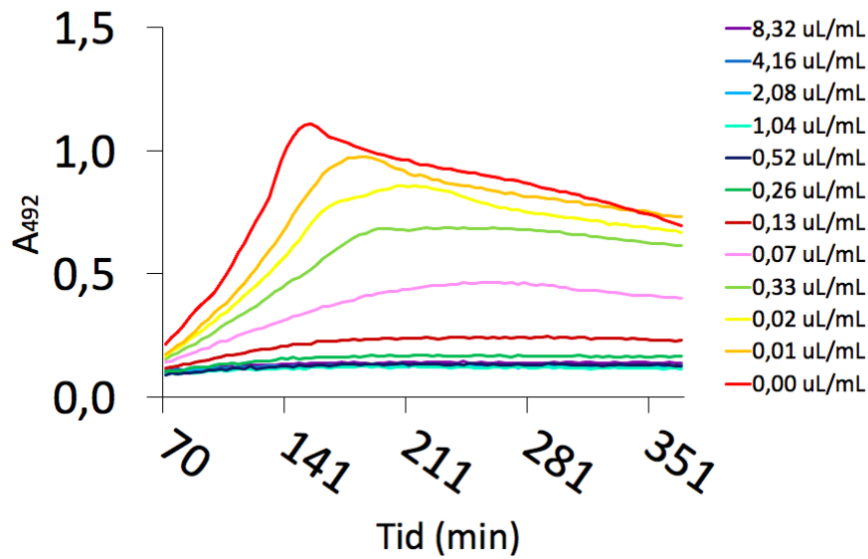
**Figur 26:** Gelelektroforese av plasmid transformert inn i *E. coli*. Det øverste båndet er på størrelse med plasmidet uten insert (ca 3400 bp), men det nederste båndet er ikke på størrelse med *ami*-operonet (ca. 6000 bp).

*E. coli* lot seg heller ikke transformere med pFD116-amiA eller pMG36e-amiACDEF. Zhian Salehian forsøkte også uten suksess å transformere *E. coli* med pMG36e-amiDEF, pMG36e-amiEF, pFD116-amiAC og pFD116-amiCD.

## 4.8 Bestemmelse av relativ MIC for Fusiformicin

For å bestemme relativ MIC for Fusiformicin-konsentratet brukt i dette arbeidet, ble en to-folds fortynningsrekke av stoffet tilsatt *S. pneumoniae* RH425-celler. Siden mengde stoff i konsentratet er ukjent, ble relativ MIC bestemt som  $\mu\text{l}$  stoff per ml cellekultur. Fortynningsrekken gikk fra 8,32 til 0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . MIC-analysen viste at 0,26  $\mu\text{L}/\text{mL}$  Fusiformicin er den minste mengden stoff som fullstendig hemmer bakterieveksten (**Figur 27**). Denne mengden anriket Fusiformicin ble derfor definert som MIC.

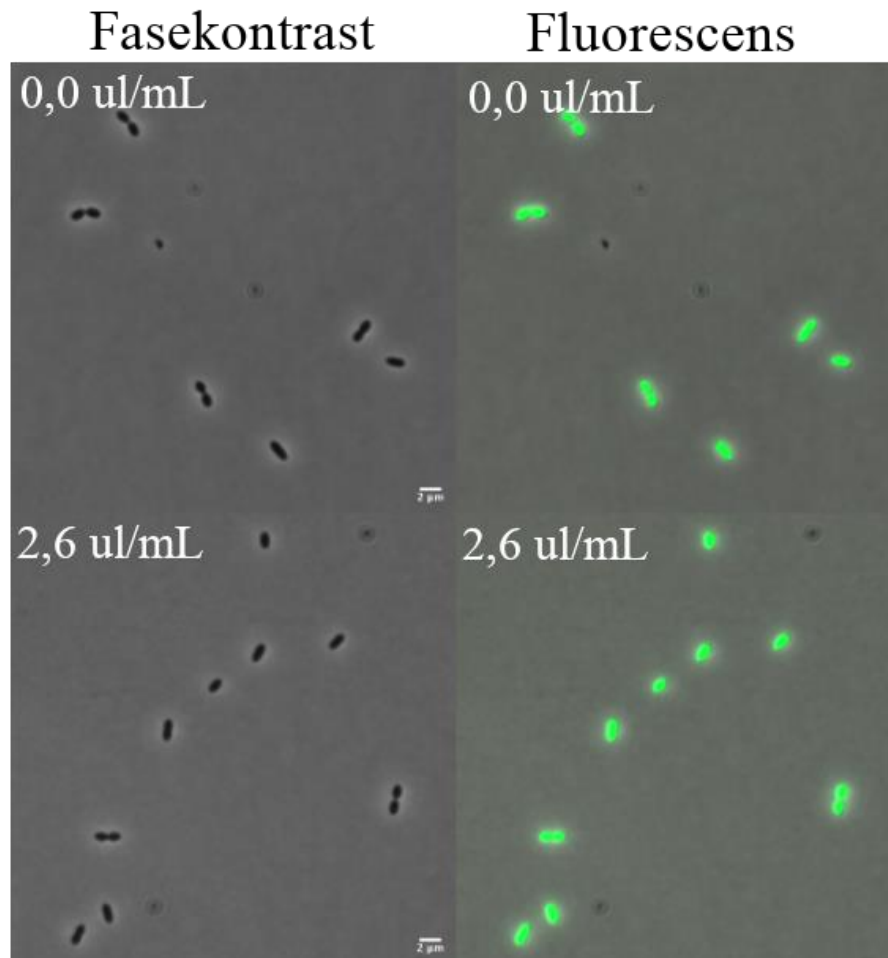




**Figur 27:** Platelesing/absorbansmåling ( $A_{492}$ ) av *S. pneumoniae* behandlet med to-fold-fortynningsrekke med Fusiformicin.

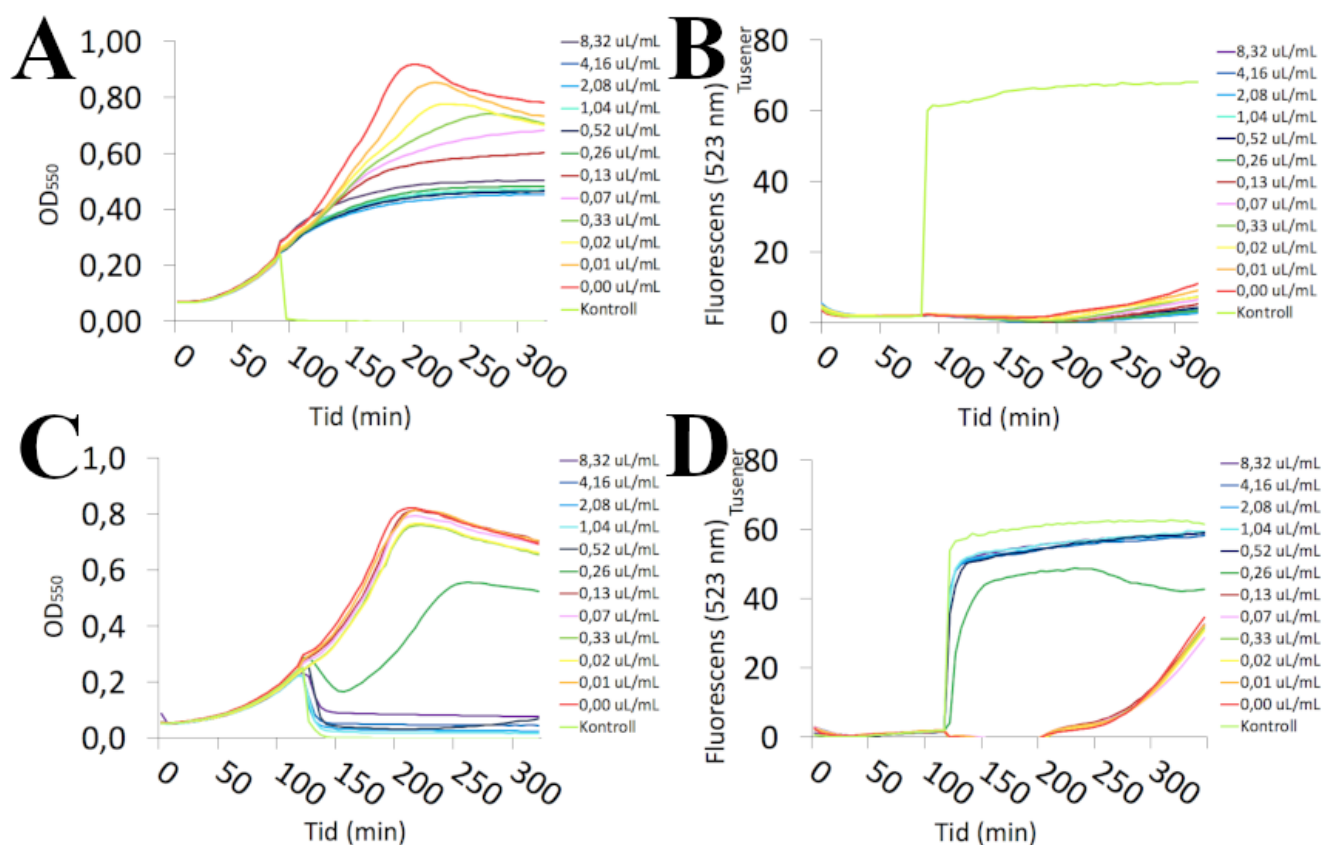
#### 4.9 Fusiformicin interferer ikke med integriteten til cellemembranen hos *S. pneumoniae*

Det ble gjort en Live/dead-analyse for å undersøke om virkningsmekanismen til Fusiformicin er å danne porer i cellemembranen til målcellene, slik den er hos de fleste Gram-positive bakteriosiner. Fluorescensmikroskopi ble gjort på ubehandlede celler (kontroll) og celler behandlet med 10x MIC (2,6  $\mu\text{L/mL}$ ) av Fusiformicin i 15 min. Cellene behandlet med Fusiformicin var farget med grønn fluorescens (**Figur 28**). Det betyr at cellemembranen er intakt etter Fusiformicin-behandling.



**Figur 28:** Live/dead-analyse av *S. pneumoniae*. Ubehandlede celler og celler behandlet med 10x MIC Fusiformicin (2,6  $\mu$ l/mL).

En ytterligere undersøkelse av om Fusiformicin danner porer i cellemembranen ble gjennomført i form av en Sytox-analyse av *S. pneumoniae* behandlet med en to-fold-fortynningsrekke med Fusiformicin (**Figur 29**). Analysen viste at cellemembranen er intakt selv med behandling av høy konsentrasjon med Fusiformicin (8,32  $\mu$ L/mL). Sytox-analysen gjort på nisin-behandlede celler ble utført som en kontroll for Sytox-signal fra celler behandler med et bakteriosin som man vet driver poredannelse i målcellens cellemembran (C og D i **Figur 29**). Økning i fluorescenssignal stemte overens med reduksjon i OD<sub>550</sub>-verdiene.



**Figur 29:** Sytox-analyse av *S. pneumoniae* RH425 behandlet med to-fold-fortynningsrekke med Fusiformicin (A og B) og nisin (C og D, positiv kontroll). OD<sub>550</sub> økte i takt med synkende bakteriosinkonsentrasjon (A og C). Fusiformicin-behandlede celler ga ingen indikasjon på at cellemembranen i *S. pneumoniae* ble ødelagt av Fusiformicin (B), slik nisin-behandlede celler gjorde (D).

Både Live/dead-analysen og Sytox analysen viste at høye konsentrasjoner av Fusiformicin ikke påvirket cellemembranens integritet. Dette pekte mot at Fusiformicin har en virkningsmekanisme som ikke påvirker integriteten til cellemembranen.

#### 4.10 Morfologi til *S. pneumoniae* behandlet med Fusiformicin og antibiotika med kjent virkningsmekanisme

I denne oppgaven har *S. pneumoniae* RH425 blitt behandlet med ciprofloksasin, tetrasyklin, ampicillin og Fusiformicin for observasjon av antibiotikumets/Fusiformicinets virkning på cellens morfologi og DNA i mikroskop. Hensikten var å sammenlikne Fusiformicinets effekt med antibiotikaenes kjente effekt på cellene. Dersom det observeres likheter i morfologi mellom celler behandlet med Fusiformicin og celler med kjent hemmet funksjon kan det peke oss i riktig retning for å forstå hvordan Fusiformicin hemmer bakterievekst. Det kan for eksempel være fornuftig å anta at en celle

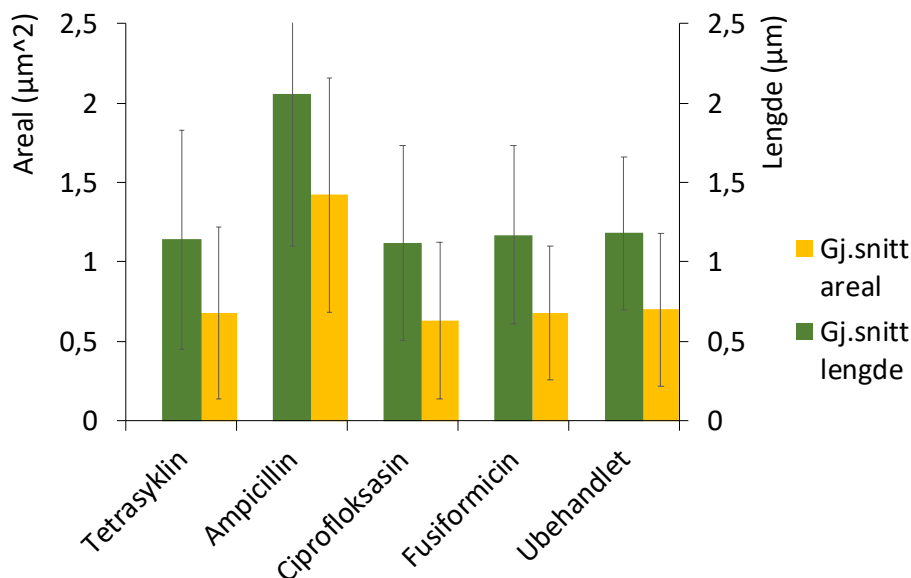
behandlet med Fusiformicin som likner morfologisk på en celle med hemmet celleveggssyntese, også har hemmet celleveggssyntese.

Før *S. pneumoniae* ble behandlet med Fusiformicin, nisin, ciprofloksasin, ampicillin og tetrasyklin ble MIC bestemt (**Tabell 17**). Disse MIC-verdiene gjelder for *S. pneumoniae* RH425. *S. pneumoniae* ble behandlet med antibiotika og Fusiformicin i to timer med tre konsentrasjoner: lavere enn MIC, MIC og høyere enn MIC (**Tabell 17**). Morfologiske endringer (fasekontrast) og DNA-segresjon (fluorescens fra DAPI) ble så observert med mikroskop (**Figur 31**). Bildene ble analysert i MicrobeJ med hensyn til cellenes areal og lengde, og DNAets lokasjon i cellene (**Figur 30** og **Figur 32**).

**Tabell 17:** Antibiotika-konsentrasjoner for behandling av *S. pneumoniae* før mikroskopering.

Antibiotikum	Lavere enn MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Høyere enn MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ampicillin	0,060	0,125	0,500
Tetrasyklin	0,060	0,125	0,250
Ciprofloksasin	0,313	0,625	1,250
Fusiformicin	0,130 <sup>a</sup>	0,260 <sup>a</sup>	1,040 <sup>a</sup>

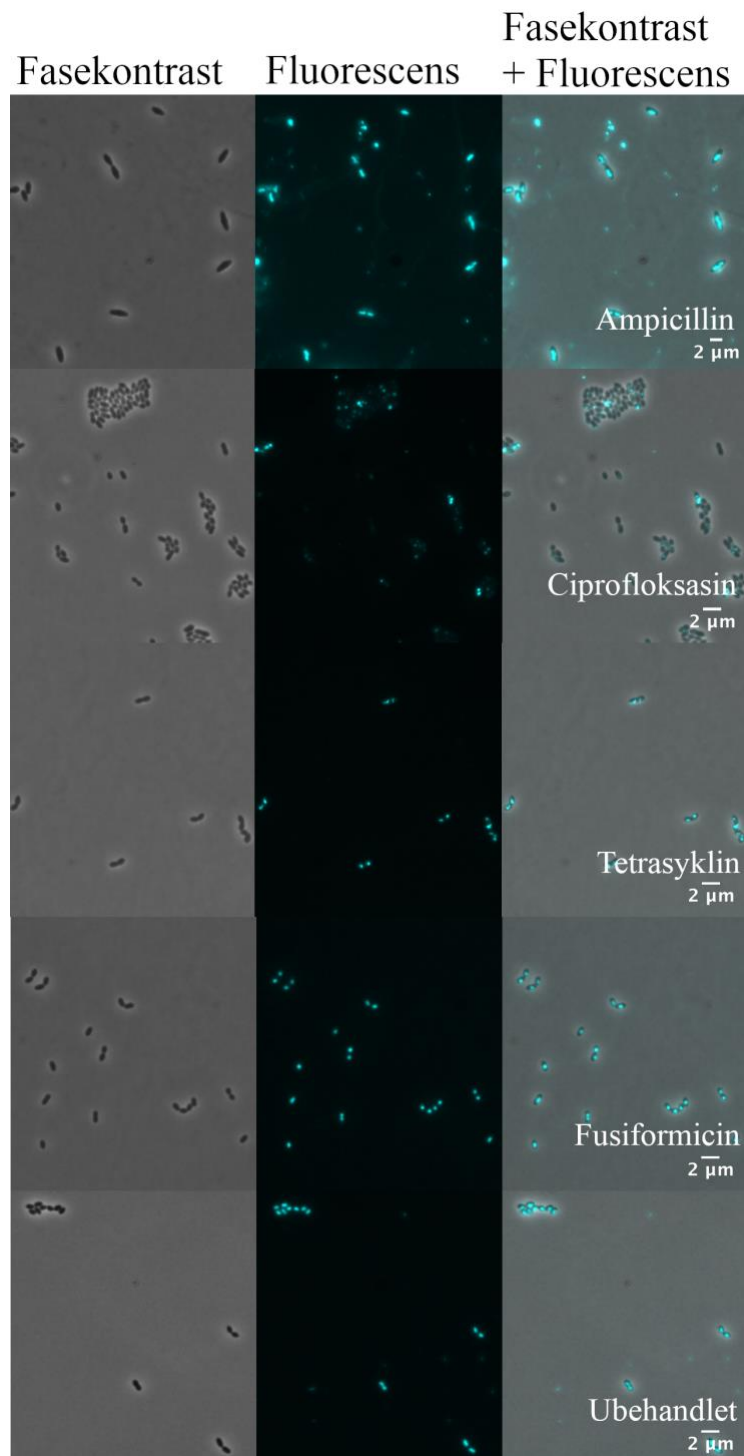
<sup>a</sup> oppgitt i  $\mu\text{L/mL}$ .



**Figur 30:** Grafisk fremstilling av gjennomsnittlig areal og lengde for *S. pneumoniae*-celler behandlet med antibiotika/Fusiformicin, og ubehandlede celler.

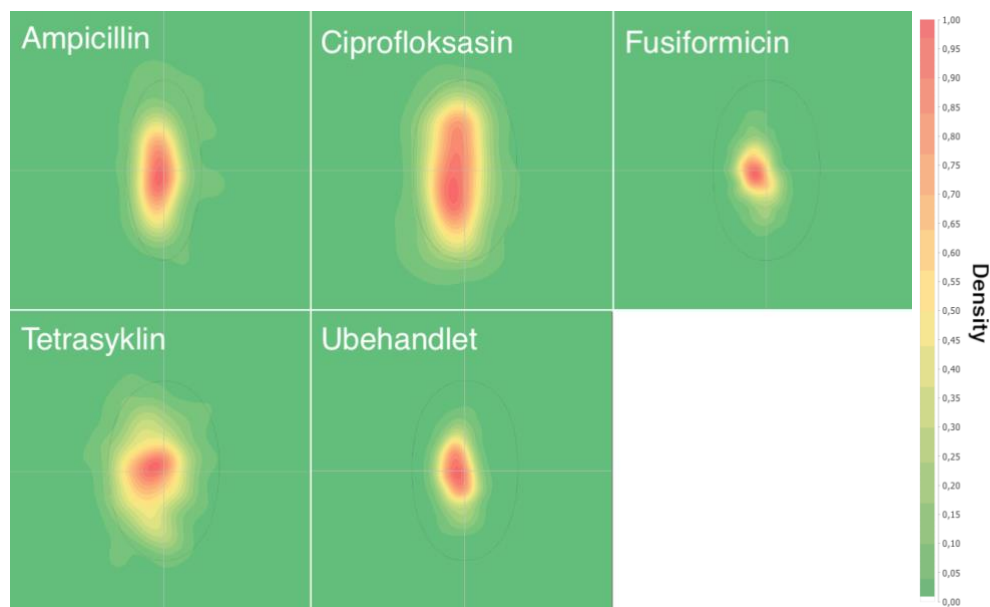
Ampicillin-behandlede celler var generelt større (areal) og lengre enn de ubehandlede cellene, og cellene behandlet med andre hemmende stoffer, inkludert Fusiformicin (**Figur 30**). Det vil si at

ampicillin virker på en måte som påvirker *S. pneumoniae* sin morfologi i forhold til lengde og areal på en måte som Fusiformicin ikke gjør, og at Fusiformicin har en annen virkningsmekanisme enn ampicillin.



**Figur 31:** DAPI-analyse av celler behandlet med tetrasyklin, ampicillin, ciprofloksasin og Fusiformicin, og ubehandlede celler.

For å finne ut om det var statistisk signifikante forskjeller i DNA-lokalisering hos Fusiformicin-behandlede celler, ble det laget varmekart over hvor det ble funnet sterkest signal for DNA i *S. pneumoniae*-celler med ulike behandlinger (**Figur 32**). Fusiformicin-behandlede celler liknet mest på ubehandlede celler på DNA-varmekartet, men det kan se ut som at de behandlet med Fusiformicin har DNAet sitt generelt mer sentrert i cellen.



**Figur 32:** Varmekart over sterkest DNA-signal i *S. pneumoniae* behandlet med antibiotika/Fusiformicin og i ubehandlede celler.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Fusiformicin – klasse I- eller II-bakteriosin?

Med påvisning av antimikrobiell aktivitet mot *S. pneumoniae* var rensingen av Fusiformicin en suksess. Rensingen var grov og ikke effektiv nok til å utføre massespektrometri på, men god nok til å arbeide med og utføre biofysiske tester på.

Det ble gjort tester på Fusiformicinet som viste at det er et peptid eller et varmestabilt protein. Det ble tatt som utgangspunkt at dersom stoffet var et lipopeptid eller et foldet protein ville lipid-gruppen eller proteinets tertiærstruktur ha en betydning for stoffets aktivitet. Varmebehandlingen hadde ingen effekt på Fusiformicinet antimikrobielle aktivitet, men stoffet mistet aktivitet etter behandling med proteinase K. Dette betyr at enzymet degraderte Fusiformicinet ved å bryte peptidbindinger i stoffet,

og at Fusiformicin enten er et peptid uten en bestemt struktur, eller at det er et protein med struktur som beholder sin stabilitet under høye temperaturer.

Varmestabile proteiner er hovedsakelig forbundet med termofile organismer. Disse proteinene beholder sin struktur og funksjon under høye temperaturer (Sawle & Ghosh, 2011). Med produksjon av sporer som i «sovende» tilstand kan vente med å vokse og dele seg til utilfredsstillende forhold er mer optimale, kan *L. fusiformis* overleve ekstreme temperaturer. «Våkne» celler er derimot ikke resistente mot høye temperaturer. *L. fusiformis* regnes derfor ikke som termofil, men som mesofil (Ahmed et al., 2007; Passera et al., 2021). Fordi *L. fusiformis* er en mesofil bakterie som ikke overlever temperaturer høyere enn ca. 45 °C kan det virke logisk å anta at Fusiformicin ikke er et varmemestabilt protein (Ahmed et al., 2007). Interessant nok er det likevel predikert at ca. 30% av proteinene i en organisme er proteiner uten en definert tredimensjonal foldet struktur. Disse proteinene foreligger heller i ulike konformasjoner og utfører sin funksjon i en ustrukturert tilstand. Mangelen på tertiærstruktur indikerer toleranse mot høye temperaturer (Babu, 2016; Leuenberger et al., 2017). Med dette kan man ikke utelukke at Fusiformicin er et varmemestabilt protein, selv om de fleste resultatene peker mot at stoffet er et peptid. Peptider med antimikrobiell aktivitet i bakterier finnes for øvrig ofte i form av bakteriosiner eller ikke-ribosomalt syntetiserte peptider.

I denne oppgaven ble det avkreftet at Fusiformicin er et ikke-ribosomalt peptid av typen lipopeptid ved hjelp av polymyxin acylase, men det ble ikke testet for noen annen type ikke-ribosomalt peptid. Produksjon av ikke-ribosomale lipopeptider med antimikrobiell aktivitet er et vanlig fenomen i *Bacillus*, men underskrivende fant ingen litteratur på produksjon av noen andre typer ikke-ribosomale peptider i samme genus (Abriouel et al., 2011; Zhao et al., 2017). Basert på litteraturen ble det vurdert at sannsynligheten for at Fusiformicin er et bakteriosin er høy, og det ble funnet lite hensiktsmessig å teste for andre mindre vanlige ikke-ribosomale peptider. Det var derimot hensiktsmessig å teste for, lantibiotika, en vanlig type bakteriosin produsert i bakterier nært beslektet til *L. fusiformis*.

Sannsynligheten for at *L. fusiformis* har produksjon av bakteriosiner er høy på grunn av dens nære slektskap med genuset *Bacillus* hvor bakteriosin-produksjon er vanlig (Abriouel et al., 2011). I Hauge (2020) ble det funnet ved hjelp av gelfiltrering at Fusiformicin har en masse på ~1000 Da, og Fusiformicin er derfor ikke et klasse III-bakteriosin. antiSMASH-analysen foreslo at det finnes en genklynge for et klasse I-bakteriosin i *L. fusiformis*, men treffprosenten (<33%) var lav (**Figur 19**). Likevel ble det testet for om Fusiformicin er et lantibiotikum, men dette var fordi de vanligste bakteriosinene produsert av Gram-positive bakterier hører til i klasse I og II, hvor lantibiotika er et

klasse I-bakteriosin (Schofs et al., 2020; Schwarzer et al., 2003). Resultatet viste at Fusiformicin ikke er et lantibiotikum, men det utelukker ikke at Fusiformicin er en annen type bakteriosin i klasse I. Det er altså sannsynlig at Fusiformicin er et bakteriosin som kan klassifiseres til klasse I eller II.

## 5.2 Transporteres Fusiformicin inn i cellen eller ikke?

Det har tidligere blitt vist at mutasjoner i Walker B motivet i AmiEF gjør *S. pneumoniae* resistent mot Fusiformicin, men det var usikkert om resistensen kom av inaktivering av proteinet eller av degradering av proteinet grunnet destabilisering av proteinets struktur (Hauge, 2020). Immunoblotting ble utført for å bekrefte at mengden AmiE<sup>(D184A)</sup> og AmiF<sup>(D190A)</sup> (Walker B-mutanter) var relativt lik som mengden ikke-mutert AmiEF. Resultatet viste at Walker B-muterte AmiEF var stabile og at ATP-hydrolyse utført av AmiEF er nødvendig for Fusiformicins virkning på *S. pneumoniae*. Med denne informasjonen ble det antatt at Fusiformicin mest sannsynlig må transporteres inn i cellen for å virke.

Ami-systemet er avhengig av AmiA for å transportere peptider inn i cellen. Hypotesen om transport av Fusiformicin over membranen ble testet ved å lage et Ami-system der AmiA hadde redusert evne til å binde peptider. Dersom hypotesen var riktig, ville en slik mutant vært mer tolerant for Fusiformicin. Hos AmiA-homologen OppA fra *L. lactis* er det kjent hvilke aminosyrer som er viktig for peptidbinding (en serin og en tryptofan). Ved å kombinere 3D-struktur modellering og aminosyre-sammenstilling, ble de samme aminosyrene funnet å være konserverte i en predikert peptidbindende kløft hos AmiA (se 4.5). Med dette som utgangspunkt ble AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup> konstruert og forsøkt uttrykt i *S. pneumoniae*. Av ukjente årsaker aksepterte ikke *S. pneumoniae* det punktmuterte *amiA*-genet i sitt native lokus, og både villtype og punktmutert AmiA ble i stedet uttrykt ektopisk i en  $\Delta$ *amiA*<sub>wt</sub>-bakgrunn. Basert på hypotesen om at Fusiformicin tas opp gjennom Ami-systemet, var det forventet at celler med AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup> skulle vise mer resistens enn celler med ektopisk villtype AmiA. I stedet viste bakterier med ektopisk uttrykk av *amiA* økt sensitivitet for Fusiformicin, mens bakterier med ektopisk uttrykk av AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup> viste lik grad av sensitivitet som villtype *S. pneumoniae*.

Et resultat som kompliserte saken ytterligere var da en  $\Delta$ *amiA*-mutant viste like sensitivitet for Fusiformicin som villtypebakterien. Substitusjon for AmiA av de homologe proteinene AliA og AliB som finnes i *S. pneumoniae* ble sett på som en mulig forklaring. En  $\Delta$ *amiA* $\Delta$ *aliA* $\Delta$ *aliB*-mutant viste dog lik sensitivitet som villtypebakterien (data ikke vist). I sum kan dette tyde på at Fusiformicin



benytter AmiCDEF-komplekset (uten at AmiA er viktig) som reseptor og for å virke på cellemembranen. Det kan også bety at stoffet kan passere Ami-transporteren uten å spesifikt bli gjenkjent av AmiA, men det er ikke kjent om ABC-transportere kan ta opp peptider uten at et AmiA-liknende oligopeptid-bindende protein er assosiert med komplekset.

Betraktningene gjort i denne oppgaven er altså motsigende i forhold til om Fusiformicin transporteres inn i cellen eller ikke. Fusiformicin danner tilsynelatende ikke porer i plasmamembranen, og cellene blir mer sensitive ved økt uttrykk av AmiA. Dette peker mot opptak av Fusiformicin gjennom Ami. Men knockout/punktmutering av AmiA fører ikke til resistens, og dette peker mot at Fusiformicin *ikke* tas opp av Ami. Det kan tenkes at selv om AmiA ikke er nødvendig for opptak av Fusiformicin, kan proteinet likevel hjelpe i en opptaksprosess. Det kan legges til at fordi overekspressjon av AmiA fører til økt sensitivitet, styrkes hypotesen om at Fusiformicin er et peptid (fordi AmiA er et peptid-bindende protein).

### 5.2.1 Poredannelse kan ikke utelukkes som virkningsmekanisme

De fleste bakteriosiner med aktivitet mot Gram-positive celler har dannelse av ødeleggende porer i bakteriens cellemembran som angrepsmekanisme (Cotter et al., 2013). Denne mekanismen er den som er mest forsket på og som vi vet mest om til nå (Schäfer & Wenzel, 2020). Resultater fra Sytox- og L/D-analyser tilsa at *S. pneumoniae* har cellemembranen intakt etter behandling med 10x MIC Fusiformicin. At inaktivering av AmiEF førte til Fusiformicin-resistens pekte mot at opptak via Ami-transportssystemet er nødvendig for Fusiformicin å virke, men fordi *amiA/aliA/aliB*-knockout ikke førte til resistens mot Fusiformicin i *S. pneumoniae*, kan vi fortsatt ikke fullstendig utelukke at Fusiformicin danner porer i plasmamembranen. Det er en mulighet for at Fusiformicin bruker AmiCD i sin aktive form som et docking-molekyl for poredannelse. Sytox og L/D-analyser av nisin-behandlede pneumokokker viste tydelig at cellemembranen ble permeabel, men hvorfor eventuelle porer av Fusiformicin ikke ga utslag på disse to eksperimentene er uvisst. Flere tester bør gjøres for å finne ut om Fusiformicin danner porer eller ikke. For eksempel kan det testes for ATP-lekkasje fra Fusiformicin-behandlede celler. ATP-lekkasje vil peke mot poredannelse som virkningsmekanisme fordi ATP slipper ut gjennom porene laget av Fusiformicin. Alternativt, kunne man testet for poredannelse ved å måle reduksjon i intracellulær pH. Et system kalt pHluorin uttrykker et pH-sensitivt GFP-protein som endrer eksitasjonsbølgelengde avhengig av intracellulær pH (Crauwels et al., 2018). Reduksjon i GFP-eksitering ville indikert at Fusiformicin danner porer i cellemembranen. En annen test vil være å uttrykke Fusiformicin intracellulært og observere om Fusiformicin har

ødeleggende virkning eller ikke. Dette forutsetter dog at man finner peptidsekvensen til Fusiformicinet, og at peptidet ikke er et modifisert klasse I-bakteriosin.

## 5.2.2 Fusiformicins virkningsmekanisme kan være i cytoplasma

Selv om poredannelse ikke kan utelukkes som virkningsmekanisme, kan man heller ikke utelukke opptak av Fusiformicin gjennom Ami. Overekspressjon av AmiA førte til økt Fusiformicin-sensitivitet i *S. pneumoniae*. Hvis opptak er tilfellet kan cellen ta opp Fusiformicin uten AmiA (og AliA og AliB), men AmiA kan hjelpe til å øke opptaket. For å få en bedre indikasjon på om Fusiformicin tas opp gjennom Ami eller ikke kan MIC for *S. pneumoniae* villtype og MIC for *amiA*-knockoutstamme (VS4c eller VS13) sammenliknes. Dersom MIC i *amiA*-knockoutmutanten er høyere enn i villtypen styrkes hypotesen om opptak av Fusiformicin gjennom Ami-systemet. Opptaket er da mulig uten det oligopeptid-bindende proteinet AmiA, som er en uvanlig karakteristikk for ABC-transportere som Ami-proteinkomplekset.

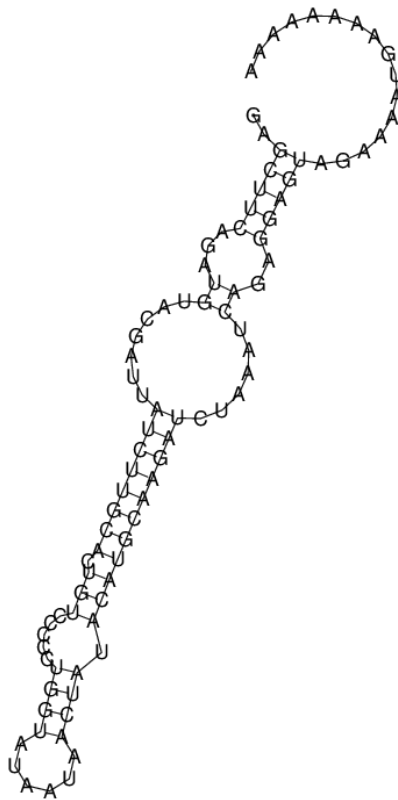
## 5.2.3 Deteksjon av Flag-tagget AmiA og AmiA<sup>S503A, W504A</sup>

Overekspressjon av AmiA førte til økt sensitivitet for Fusiformicin i *S. pneumoniae*, mens overekspressjon av AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup> resulterte i lik sensitivitet som villtypen og en  $\Delta$ *amiA* mutant. Dette tyder på at mutasjonene S503A og W504A reduserer funksjonen til AmiA, og styrker prediksjonen om at S503 og W504 har samme rolle i AmiA som hos OppA i å binde peptider. For å utelukke at forskjellen mellom AmiA og AmiA<sup>(S503A, W504A)</sup> skyldtes ulik stabilitet av proteinene, ble en Flag-tag fusjonert til C-terminus av begge proteinene. Immunoblottet viste ingen bånd for AmiA-Flag der ekspressjonen var kontrollert av den konstitutive P3-promotoren. Det er sannsynlig at degradering av AmiA ikke var årsaken til manglende bånd på blottet. Degradert protein ville kommet frem som bakgrunnsstøy og/eller et bånd langt nede på membranen.

Det manglende antistoffsignalet for AmiA kunne peke mot at proteinet ikke ble uttrykt, men resultatet fra overlay med celler med økt uttrykk av AmiA der Fusiformicin-sensitivitet økte, tilsa at dette ikke var tilfellet. Siden *amiA*-genet ble plassert ektopisk, får genet en annen 5' UTR (untranslated region) som potensielt kan påvirke transkripsjonen. Hårnåler er en form for struktur som mRNA danner med seg selv. mRNA kan danne hårnåler imens transkripsjonen pågår, og noen hårnål-strukturer kan forårsake ribosomblokkering eller tidlig terminering av transkripsjon (Gupta, 2021). Det ble predikert

hårnål-struktur for sekvensen

«GAGCUUCAGAUGUACGAUUAUCUUGCACUGUCCCCUGGUAUAAUAACUAUACAUGC  
AAGAUCUAAAUCAGAGGAGUAGAAAAUGAAAAAAAA» (**Figur 33**). Hårnål-formasjon og  
derav forhindring av translasjon eller tidlig terminering av transkripsjon kan være en årsak til at AmiA  
ikke kom frem på immunoblottet. For å undersøke dette kan det forsøkes å bruke en annen promotor  
enn P3 for uttrykk av AmiA eller plassere P3-*amiA* i et annet lokus hvor sekvensen ikke vil danne en  
transkripsjons-terminerende hårnål med starten av *amiA*-genet.



**Figur 33:** Predikert hårnål-struktur for N-terminal ende av P3-*amiA*.

#### 5.2.4 Fusiformicin inhiberer ikke cellevegg- eller DNA-syntese

For å få en indikasjon på virkningsmekanismen til Fusiformicin ble morfologiske endringer hos Fusiformicin-behandlede celler sammenliknet med celler behandlet med antibiotika med kjente virkningsmekanismer. Celler ble sammenliknet med hensyn til morfologi og fluorescerende DAPI-signal.

Mikroskopibilder av cellene ble analysert i MicrobeJ, og det kan argumenteres for at antallet tetrasyklin- og ampicillin-behandlede celler brukt i MicrobeJ-analysen er lavt for en analyse av kvalitet (**Tabell 18**). Et lite datasett gir lavere statistisk sikkerhet og kan føre til at signifikansen av funn virker større enn de er (Konietschke et al., 2021). Det vil være fordelaktig å gjenta forsøket med flere celler. Til da blir den statistiske usikkerheten tatt i betraktning under diskusjon av analysen i denne oppgaven. Mikroskopering og MicrobeJ-analyse ble gjort for å sammenlikne morfologi og DNA-lokasjon hos celler behandlet med Fusiformicin, ubehandlede celler og celler behandlet med tetrasyklin (inhiberer proteinsyntesen), ciprofloksasin (inhiberer DNA-syntesen) og ampicillin (inhiberer celleveggsyntesen).

**Tabell 18:** Antall celler analysert i MicrobeJ.

Behandling	Antall celler
Tetrasyklin	286
Ampicillin	183
Ciprofloksasin	949
Fusiformicin	1522
Ubehandlet	315

Celler behandlet med ampicillin var større og lengere enn cellene med andre behandlinger (**Figur 30**) og DNAet befant seg både på innsiden og utsiden av cellene. Dette er et resultat av antibiotikumets effekt på celleveggsyntesen, der den tilegner seg en uvanlig form før den til slutt sprekker. I flertallet av de ciprofloksasin-behandlede cellene var det ikke tilstrekkelig med DNA for å gi fluorescerende DAPI-signal (**Figur 31**). Det DNA-signalet som ble fanget opp av Maxima befinner seg ikke på noen spesiell lokasjon i cellen, ettersom det sterkeste DNA-signalet dekker store deler av cellen på varmekartet (**Figur 32**). Dette kommer av at ciprofloksasin påvirker enzymet Topoisomerase II som er viktig for vellykket kromosomsegregering under celledeling (Cuvier & Hirano 2003). Varmekartet for disse cellene kan dog være feilaktig på grunn av lavere antall celler med signal (mindre datasett) og dermed lavere statistisk sikkerhet. Cellene hadde ellers ingen signifikant forskjell i areal eller lengde i forhold til ubehandlede celler. Tetrasyklin-behandlede celler hadde heller ingen betydelig endring i størrelse (**Figur 30**). DNAet i disse cellene befinner seg i hovedsak sentrert i cellen, men ikke eksklusivt. Dette synes på varmekartet der det røde befinner seg i en rund form på midten av cellen, og gul farge dekker større deler av cellen (**Figur 32**). Selv om tetrasyklin sin hovedmekanisme mot cellevekst er hemming av proteinsyntesen, er det kjent at antibiotikumet i tillegg forårsaker brudd på

DNA-tråder (Khan, 2003). Dette kan være en grunn til at DNA blir observert på andre steder enn midt i cellen der signalet er sterkest. Det minnes om at den statistiske sikkerheten til analysen av tetrasyklin-behandlede celler er lav på grunn av lite datasett. Ut ifra mikroskopibildene ser DNAet i tetrasyklin-behandlede celler ut til å være mer kondensert enn i ubehandlede celler, der fluorescensen dekker større deler av cellen enn i tetrasyklin-behandlede celler. Dette er et fenomen ofte observert i celler med inhibert ribosomal aktivitet (Chai et al., 2014; Sorg & Veening, 2015).

Fusiformicin-behandlede celler hadde ingen signifikant endring i størrelse eller lengde (**Figur 30**). Ingen celler manglet fluorescens-signal og alt DNA befant seg inni- og sentralt i cellen (**Figur 31** og **Figur 32**). Disse resultatene tyder på at Fusiformicin har ulik virkningsmekanisme fra både ampicillin og ciprofloksasin. Derimot hadde de Fusiformicin-behandlede cellene likheter med ubehandlede celler og tetrasyklin-behandlede celler. Det kan se ut som at Fusiformicin hadde mer kondensert DNA enn både ubehandlede celler og tetrasyklin-behandlede celler ut ifra varmekartene. Kondensert DNA i Fusiformicin-behandlede celler synes spesielt på mikroskopibildene og kan bety at DNAet er tettere pakket fordi det er mindre tilgjengelig for transkripsjon eller translasjon. Resultatene ga ingen tydelige svar på hva den eventuelle indre virkningsmekanismen til Fusiformicin er, men man kan ikke utelukke at den er lik eller liknende virkningsmekanismen til tetrasyklin, altså inhibering av proteinsyntese. Det er også mulig at Fusiformicin har en annen virkningsmekanisme enn de tre antibiotikaene som ble testet for. Det kan utføres flere tester for å finne ut mer om dette, og det vil i tillegg være hensiktsmessig å utføre forsøket igjen med et høyere antall celler behandlet med tetrasyklin for analyse i MicrobeJ. Det kan også være interessant å behandle *S. pneumoniae* med flere antibiotika med ulike virkningsmekanismer, som for eksempel rifampicin som påvirker RNA-polymerase sin aktivitet. Dette vil igjen være med hensikt for å se etter signifikante likheter og forskjeller fra Fusiformicin-behandlede celler. Disse testene vil vel og merke være relevant først dersom flere tester peker mot en annen virkningsmekanisme enn poredannelse.

### 5.3 *amiACDEF* er toksisk for *E. coli*

Det ble forsøkt å klonе ulike gener i *ami*-operonet inn i ulike plasmider ved å bruke *E. coli* som mellomvert. Hensikt var å produsere mange plasmider for videre transformasjon inn i Fusiformicin-resistente bakterier. Forsøket hadde som større hensikt å teste om Fusiformicin-resistente bakterier ville bli sensitive for Fusiformicin dersom de hadde Ami-transporteren uttrykt. Med utgangspunkt i hypotesen om at Fusiformicin tas opp av Ami for å ha veksthemmende effekt, ville et resultat der

normalt resistente celler ble sensitive ved uttrykking av Ami-systemet, fortelle oss at det intracellulære målet for Fusiformicin er konservert.

Det ble brukt lav-kopi-plasmider (pFD116 og pMG36e) til kloningene i håp om at *E. coli* ville kunne takle *ami*-sekvensene dersom de fantes i lave antall. Et lav-kopi-plasmid har en replikasjonsorigo som opprettholder et lavt kopi-nivå på ca. 5-20 kopier per celle (Vu et al., 2009). Dette ble gjort fordi det er en generell overbevisning at over-ekspressjon av membranproteiner er toksisk for *E. coli* (James et al., 2021). På grunn av dette ble *amiACDEF* kjørt i PanDaTox for å predikere om kloning i *E. coli* ville være mulig.

*S. pneumoniae* fantes ikke i PanDaTox-databasen, men *amiA* nukleotidsekvens var ~70% identisk (E-verdi = 0,0) med et gen i *Streptococcus thermophilus* LMD-9. Kloningsevnen til gensekvensen i *S. thermophilus* var «normal», og p-verdi for at sekvensen ikke er kloningsbar var 0,8. Resultatet indikerte at kloning av *amiA* i *E. coli* ville være mulig. Resultater for kjøring av *amiCDEF* viste også at kloningsevnen for alle de liknende (E-verdi = 0,0) genene i *S. thermophilus* var «normal» (**Figur 34**).

**Blast results for 1 query against the allProteins collection, using blastp**

Display raw blast report

Query: userSeq1  
500 hits were found

Replicon accession	Locus tag	Product	% identity	Alignment on query	Alignment on homolog	Length	Bit score	E-value	Organism	Kingdom	Gene plasmid clonability	Plasmid unclonability p-value	Gene fosmid clonability
NC_008532	STER_1411	ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component	66.82			657 aa	920	0.0	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	Bacteria	normal	0.645276	n/a
NC_008532	STER_1409	ABC-type oligopeptide transport system, periplasmic component	64.49			655 aa	901	0.0	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	Bacteria	normal	0.205235	n/a
NC_010001	Cphy_3108	extracellular solute-binding protein	27.07			615 aa	181	2e-47	<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	Bacteria	normal	1	n/a
NC_013517	Sterm_3842	extracellular solute-binding protein family 5	27.30			535 aa	164	5e-42	<i>Sebalidella termitidis</i> ATCC 33386	Bacteria	normal	0.298652	n/a

**Figur 34:** PanDaTox-resultat for AmiA aminosyresekvens.

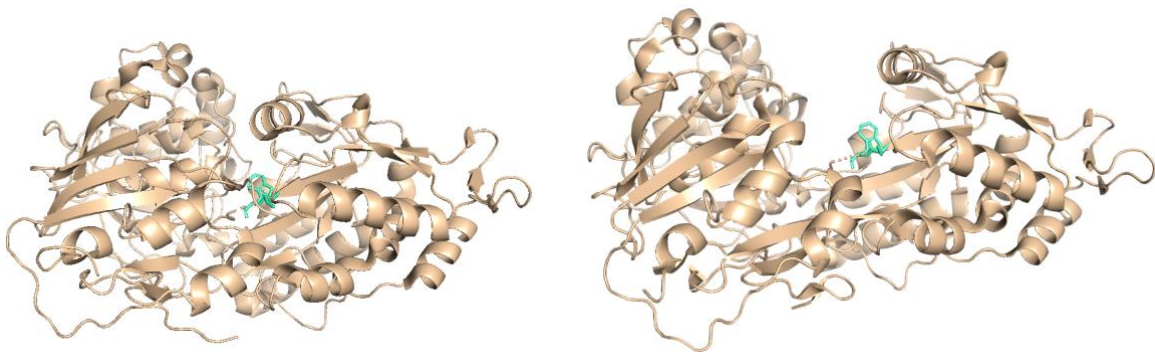
Til tross for PanDaTox-predikasjonen, feilet forsøk på å transformere *E. coli* med *ami*-operonet. Da transformasjon med pFD116-*amiA* først ikke gikk ble det forsøkt igjen med et annet plasmid, pMG36e, i tilfelle det var noe i plasmidet pFD116 som gjorde det inkompatibelt for replikasjon i *E. coli* når *ami*-gener var klonet i det. Screening viste at pMG36e-plasmidet var intakt i en transformant, men at det hadde blitt gjort delesjon(er) i *ami*-operonet. Sannsynligvis var det deler av operonet *E. coli*

ikke godt nok og derfor klippet vekk. Det var heller ikke mulig å transformere *E. coli* med *amiAC*, *amiCD*, *amiDEF* eller *amiEF*. Det er sannsynlig at genene på *ami*-operonet virker toksisk på *E. coli*.

En mulighet for å omgå dette problemet kan være å teste transformasjon av overnevnte plasmid inn i en *E. coli*-stamme som har høyere toleranse for proteiner som oppleves som toksiske for *E. coli*, for eksempel *E. coli* C43 (MERCK).

## 5.4 Predikert 3D-struktur for AmiA

Strukturen til AmiA har i skrivende stund (2022) ikke blitt bestemt og den ligger derfor ikke i PDB. Derfor ble strukturen predikert med RoseTTAFold i denne oppgaven (**Figur 22**). For prediksjon ble signalsekvensen på N-terminal ende av AmiA ekskludert for å finne strukturen til proteinet i sin modne form. Sammenlikning av predikert AmiA-struktur og strukturen til OppA, peker mot at den predikerte strukturen er AmiA i sin åpne ikke-oligopeptid-bundne konformasjon. Den lukkede og åpne konformasjonen til OppA er presentert i **Figur 35**. For å sammenlikne den predikerte AmiA-strukturen med den kjente strukturen til homologen OppA (åpen konformasjon) fra *L. lactis* ble strukturene sammenstilt i PyMol. Sammenstillingen ble gjort med funksjonen «cealign» som brukes til sammenstilling av proteiner med store strukturelle likheter. Proteinene AmiA og OppA har altså høy likhet i struktur, som også kommer frem visuelt i sammenstillingen i **Figur 22**.



**Figur 35:** OppA i lukket (3RYA) (venstre) og åpen (3DRH) (høyre) konformasjon. De konserverte aminosyrene (SW) er vist i turkis farge og pinne-struktur, og befinner seg nederst i den peptid-bindende kløften som synes best i den åpne konformasjonen i form av tomrom.

De konserverte aminosyrene (SW) befinner seg tilsynelatende på omtrent samme sted i begge proteinene, inni den peptid-bindende kløften. Dette virker bekreftende for at disse aminosyrene er et fornuftig mål for å hemme proteinets funksjon med punktmutasjoner.

## 6 Konklusjoner og videre arbeid

### 6.1 Konklusjoner

Basert på resultatene i denne oppgaven slås det fast at Fusiformicin er et peptid eller et varmestabilt protein. Det kan være fornuftig å anta at Fusiformicin er et klasse I- eller II-bakteriosin. Konklusjonen baseres på at de vanligste antimikrobielle stoffene i genuset *Bacillus* er lipopeptider og bakteriosiner, fordi det i denne oppgaven ble vist at Fusiformicin ikke er et lipopeptid, og på grunn av Fusiformicins masse (~1000 Da).

I oppgaven ble det også vist at AmiA, og de homologe proteinene AliA og AliB, ikke er nødvendig i *S. pneumoniae* for Fusiformicin å opprettholde sin antimikrobielle effekt på bakterien. Likevel er aktiv form av Ami-systemet nødvendig for Fusiformicins virkning. Det ble også funnet at *S. pneumoniae* får økt sensitivitet for Fusiformicin dersom det blir uttrykt mer AmiA. Det forblir uklart om Fusiformicin virker i cytoplasma eller på overflaten av cellens plasmamembran, men det ble tydelig at dersom Fusiformicin virker intracellulært så er virkningsmekanismen ikke lik antibiotikumene ciprofloksasin og ampicillin (henholdsvis DNA-syntese og celleveggsyntese).

I tillegg ble AmiA sin tredimensjonale struktur predikert. Predikasjonen viste peptidbindende kløft med konserverte aminosyrer assosiert med hydrofob lomme inni kløften. Predikasjonen viste også strukturell homologi med OppA fra *L. lactis*. Resultater i denne oppgaven indikerer at S503 og W504 i AmiA er konserverte aminosyrer som er viktige for AmiA sin funksjon som peptid-bindende protein.

### 6.2 Videre arbeid

For videre arbeid med karakterisering av Fusiformicin vil det først og fremst være hensiktsmessig å rense peptidet til >95% renhet slik at aminosyresekvensen kan avsløres med massespektrometer. Ved å finne ut av stoffets sammensetning vil det blant annet være mulig klassifisere stoffet, og søke etter gen(er) for produksjon. For å teste om Fusiformicin virker i cytoplasma kan man teste og uttrykke peptidet intracellulært med en induserbar promotor.



Når det gjelder å finne Fusiformicins virkningsmekanisme vil det være fornuftig å utføre flere tester på om stoffet danner porer i plasmamembranen eller om peptidet virker intracellulært. Dersom det viser seg at virkningsmekanismen er intracellulær bør det forskes videre på hva slags indre mekanisme stoffet har. Er det et ribosomalt syntetisert peptid, vil det være interessant å teste om *S. pneumoniae* som uttrykker Fusiformicin vil produsere resistente supressormutanter. Helgenomsekvensering av disse vil potensielt avsløre virkningsmekanismen.

## 7 Referanser

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev*, 35(1), 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117-1125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>
- Alloing, G., de Philip, P., & Claverys, J. P. (1994). Three Highly Homologous Membrane-bound Lipoproteins Participate in Oligopeptide Transport by the Ami System of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology*, 241(1), 44-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1472>
- Alloing, G., Trombe, M. C., & J.P., C. (1990). The ami locus of the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of Gram-negative bacteria. *Molecular Biology*, 4(4), 633-644. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00632.x>
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Front Microbiol*, 8, 2169-2169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>
- Babu, M. M. (2016). The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1185-1200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1042/BST20160172>
- Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C. R., DeGiovanni, A., Pereira, J. H., Rodrigues, A. V., van Dijk, A. A., Ebrecht, A. C., . . . Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373(6557), 871-876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
- Berg, K. H., Stamsås, G. A., Straume, D., & Håvarstein, L. S. (2013). Effects of Low PBP2b Levels on Cell Morphology and Peptidoglycan Composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol*, 195(19), 4342-4354. <https://doi.org/10.1128/JB.00184-13>
- Berntsson, P. A., Doeven, M. K., Fusetti, F., Durkens, R. H., Sengupta, D., Marrink, S.-J., Thunnissen, A.-M. W. H., Poolman, B., & Slotboom, D.-J. (2009). The structural basis for peptide selection by the transport receptor OppA. *The EMBO Journal*, 28(9), 1332-1340. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.65>
- Berntsson, R. P. A., Thunnissen, A.-M. W. H., Poolman, B., & Slotboom, D.-J. (2011). Importance of a Hydrophobic Pocket for Peptide Binding in Lactococcal OppA. *J Bacteriol*, 193(16), 4254-4256. <https://doi.org/10.1128/JB.00447-11> (Notes)
- BioLabs, N. E. (2022). T4 DNA Ligase. *international.neb.com*. [https://international.neb.com/products/m0202-t4-dna-ligase#Product%20Information Properties%20&%20Usage](https://international.neb.com/products/m0202-t4-dna-ligase#Product%20Information%20Properties%20&%20Usage)
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>

- Bogaert, D., de Groot, R., & Hermans, P. W. M. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4(3), 144-154. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7)
- Brissac, T., Martínez, E., Kruckow, K. L., Riegler, A. N., Ganaie, F., Im, H., Bakshi, S., Arroyo-Diaz, N. M., Spencer, B. L., Saad, J. S., Nahm, M. H., & Orihuela, C. J. (2021). Capsule Promotes Intracellular Survival and Vascular Endothelial Cell Translocation during Invasive Pneumococcal Disease. *mBio*, 12(5), e0251621-e0251621. <https://doi.org/10.1128/mBio.02516-21>
- Chai, Q., Singh, B., Peisker, K., Metzendorf, N., Ge, X., Dasgupta, S., & Sanyal, S. (2014). Organization of ribosomes and nucleoids in *Escherichia coli* cells during growth and in quiescence. *The Journal of biological chemistry*, 289(16), 11342-11352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557348>
- Choi, S.-Y., Ro, H., & Yi, H. (2019). DNA Cloning: A Hands-on Approach (1st 2019. ed.). *Springer Netherlands: Imprint: Springer*.
- Claverys, J.-P., Grossiord, B., & Alloing, G. (2000). Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? *Res Microbiol*, 151(6), 457-463. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00169-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00169-8)
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*, 11(2), 95-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Crauwels, P., Schäfer, L., Weixler, D., Bar, N. S., Diep, D. B., Riedel, C. U., & Seibold, G. M. (2018). Intracellular pHluorin as Sensor for Easy Assessment of Bacteriocin-Induced Membrane-Damage in *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol*, 9, 3038-3038. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03038>
- Cuvier, O., & Hirano, T. (2003). A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *Journal of Cell Biology*, 160(5), 645-655. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209023>
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(2), 185-201. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1325-z>
- Depardieu, F., & Bikard, D. (2020). Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels. *Methods*, 172, 61-75. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.024>
- Drijkoningen, J. J. C., & Rohde, G. G. U. (2014). Pneumococcal infection in adults: burden of disease. *Clin Microbiol Infect*, 20(s5), 45-51. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12461>
- Fialho, T. L., Carrijo, L. C., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Piccoli, R. H., & de Abreu, L. R. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Res Int*, 107, 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.009>
- Fleming, A. (1980). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Reviews of infectious diseases*, 2(1), 129-139.
- Fong, I. W., Shlaes, D., & Drlica, K. (2018). Antimicrobial Resistance in the 21st Century (2nd ed. 2018. ed.). *Springer International Publishing: Imprint: Springer*.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg*, 27(2), 113-159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- Guo, Y., Huang, E., Yuan, C., Zhang, L., & Yousef, A. E. (2012). Isolation of a *Paenibacillus* sp. Strain and Structural Elucidation of Its Broad-Spectrum Lipopeptide Antibiotic. *Appl Environ Microbiol*, 78(9), 3156-3165. <https://doi.org/10.1128/AEM.07782-11>
- Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Appl Microbiol*, 83(S1), 1S-11S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x>
- Hauge, I. H. (2020). Karakterisering og rensing av fusiformicin, et nytt bakteriosin med aktivitet mot *S. pneumoniae*. In: *Norwegian University of Life Sciences, Ås*.

- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocol*(2), 924-932. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
- Henriques-Normark, B., & Tuomanen, E. I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010215>
- Hockett, K. L., & Baltrus, D. A. (2017). Use of the Soft-agar Overlay Technique to Screen for Bacterially Produced Inhibitory Compounds. *J Vis Exp*(119). <https://doi.org/10.3791/55064>
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*, 2(1), 87-92. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.12>
- Houry, W. A. (2014). The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation (1st 2014. ed., Vol. 1). *Springer New York: Imprint: Springer*.
- Jacobs, M. R. (2004). *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med*, 117, 3-15.
- James, J., Yarnall, B., Koranteng, A., Gibson, J., Rahman, T., & Doyle, D. A. (2021). Protein over-expression in *Escherichia coli* triggers adaptation analogous to antimicrobial resistance. *Microb Cell Fact*, 20(1), 13-11. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01462-6>
- Johnsborg, O., & Havarstein, L. S. (2009). Pneumococcal LytR, a Protein from the LytR-CpsA-Psr Family, Is Essential for Normal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 191(18), 5859-5864. <https://doi.org/10.1128/JB.00724-09>
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol*, 12(3), 181-196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C., & Andrew, P. W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*, 6(4), 288-301. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1871>
- Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H., & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 406-408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-406>
- Khadka, S., Adhikari, S., Thapa, A., Panday, R., Adhikari, M., Sapkota, S., Regmi, R. S., Adhikari, N. P., Proshad, R., & Koirala, N. (2020). Screening and Optimization of Newly Isolated Thermotolerant *Lysinibacillus fusiformis* Strain SK for Protease and Antifungal Activity. *Curr Microbiol*, 77(8), 1558-1568. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01976-7>
- Klein, D. L. (1999). Pneumococcal Disease and the Role of Conjugate Vaccines. *Microbial Drug Resistance*, 5(2), 147-157. <https://doi.org/http://doi.org/10.1089/mdr.1999.5.147>
- Kolendi, C. L. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA): Etiology, at-risk Populations and Treatment. *Hauppauge: Nova Science Publishers, Incorporated*.
- Konietschke, F., Schwab, K., & Pauly, M. (2021). Small sample sizes: A big data problem in high-dimensional data analysis. *Stat Methods Med Res*, 30(3), 687-701. <https://doi.org/10.1177/0962280220970228>
- Kranjec, C., Morales Angeles, D., Torrissen Mårli, M., Fernández, L., García, P., Kjos, M., & Diep, D. B. (2021). Staphylococcal Biofilms: Challenges and Novel Therapeutic Perspectives. *Antibiotics (Basel)*, 10(2), 131. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020131>
- Kurien, B. T. (2021). Western Blotting for the Non-Expert. *Springer International Publishing AG*.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*(62). <https://doi.org/10.3791/3923>

- Leuenerger, P., Gansch, S., Kahraman, A., Cappelletti, V., Boersema, P. J., Mering, C. v., Claassen, M., & Picotti, P. (2017). Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science*, 355(6327), eaai7825. <https://doi.org/doi:10.1126/science.aai7825>
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *The Yale journal of biology and medicine*, 90(1), 135-145. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28356901>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5369031/>
- Martens, P., Worm, S. W., Lundgren, B., Konradsen, H. B., & Benfield, T. (2004). Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect Dis*, 4(1), 21-21. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-21>
- McAuliffe, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*, 25(3), 285-308. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00065-6)
- McPherson, M. (2000). PCR (First edition. ed.). *Taylor & Francis*.
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., Jager, V. C. L. d., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*, 39(suppl\_2), W339-346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Medeot, D. B., Fernandez, M., Morales, G. M., & Jofré, E. (2020). Fengycins From *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 Exhibit Antibacterial Activity by Producing Alterations on the Cell Surface of the Pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Frontiers in microbiology*, 10, 3107-3107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03107>
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *Biomed Res Int*, 2015, 473050-473059. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
- MERCK. OverExpress™ C43(DE3) Chemically Competent Cells. *sigmaaldrich.com*. <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/cmc0019>
- MERCK. (2022). Amberlite® XAD16N. *sigmaaldrich.com*. [https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/xad16?gclid=Cj0KCQiar5iQBhCsARIsAPcwROOng0nFAurUkWFJcXtdVHIYupe8eM3VdQe-fDqU9xNUwK1W81bmSIEaAj-TEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/xad16?gclid=Cj0KCQiar5iQBhCsARIsAPcwROOng0nFAurUkWFJcXtdVHIYupe8eM3VdQe-fDqU9xNUwK1W81bmSIEaAj-TEALw_wcB)
- Ovchinnikov, K. V., Kranjec, C., Thorstensen, T., Carlsen, H., & Diep, D. B. (2020). Successful Development of Bacteriocins into Therapeutic Formulation for Treatment of MRSA Skin Infection in a Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother*, 64(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.00829-20>
- Palmeira, D. F., K; Neto, H.M. (2020). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production – a threat around the world. *Heliyon*, 6(1), e03206-e03206. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03206>
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J Biotechnol*, 127(1), 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.008>
- Passera, A., Rossato, M., Oliver, J. S., Battelli, G., Shahzad, G.-I. R., Cosentino, E., Sage, J. M., Toffolatti, S. L., Lopatriello, G., Davis, J. R., Kaiser, M. D., Delledonne, M., & Casati, P. (2021). Characterization of *Lysinibacillus fusiformis* strain S4C11: In vitro, in planta, and in silico analyses reveal a plant-beneficial microbe. *Microbiol Res*, 244, 126665-126665. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126665>
- Piddock, L. J. V. P. (2012). The crisis of no new antibiotics—what is the way forward? *Lancet Infect Dis*, 12(3), 249-253. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70316-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70316-4)
- Pudova, D. S., Lutfullin, M. T., Shagimardanova, E. I., Hadiyeva, G. F., Shigapova, L., Toymentseva, A. A., Kabanov, D. A., Mardanov, A. M., Vologin, S. G., & Sharipova, M. R. (2018). Draft



- genome sequence data of *Lysinibacillus fusiformis* strain GM, isolated from potato phyllosphere as a potential probiotic. *Data Brief*, 21, 2504-2509. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.11.107>
- Qamar, W., Khan, M. R., & Arafah, A. (2017). Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci*, 24(7), 1465-1469. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.016>
- Rahimzadeh, M. M., Sadeghizadeh, M. M., Najafi, F. F., Arab, S. S., & Mobasheri, H. H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular biology research communications*, 5(4), 257-261.
- Saggese, A., De Luca, Y., Baccigalupi, L., & Ricca, E. (2022). An antimicrobial peptide specifically active against *Listeria monocytogenes* is secreted by *Bacillus pumilus* SF214. *BMC Microbiol*, 22(1), 3-3. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02422-9>
- Sand, M. (2019). Did Alexander Fleming deserve the Nobel Prize? *Sci Eng Ethics*, 26(2), 899-919. <https://doi.org/10.1007/s11948-019-00149-5>
- Sawle, L., & Ghosh, K. (2011). How do thermophilic proteins and proteomes withstand high temperature? *Biophysical journal*, 101(1), 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.059>
- Schofs, L., Sparo, M. D., & Sánchez Bruni, S. F. (2020). Gram-positive bacteriocins: usage as antimicrobial agents in veterinary medicine. *Vet Res Commun*, 44(3-4), 89-100. <https://doi.org/10.1007/s11259-020-09776-x>
- Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products [10.1039/B111145K]. *Natural Product Reports*, 20(3), 275-287. <https://doi.org/10.1039/B111145K>
- Schäfer, A.-B., & Wenzel, M. (2020). A How-To Guide for Mode of Action Analysis of Antimicrobial Peptides [Review]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.540898>
- Shimizu, T., Ganzorig, K., Miyamoto, A., Ishii, T., Urashima, T., & Fukuda, K. (2014). A naturally occurring  $\alpha(s1)$ -casein-derived peptide in bovine milk inhibits apoptosis of granulosa cells induced by serum-free conditions. *J Pept Sci*, 20(3), 229-234. <https://doi.org/10.1002/psc.2609>
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*, 120(6), 1449-1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>
- Singh, D. B., & Tripathi, T. (2020). *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics* (1st 2020. ed.). *Springer Singapore: Imprint: Springer*.
- Sonboli, R., Najafi, Z., Zarezadeh, N., Yazdani, M., & Behrouz, H. (2021). Improving SDS-PAGE method for monoclonal antibodies: The advantages of Tris-Acetate over Tris-Glycine SDS-PAGE system and comparison with CE-SDS method. *Protein Expr Purif*, 182, 105845-105845. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105845>
- Sorg, R. A., Kuipers, O. P., & Veening, J.-W. (2015). Gene Expression Platform for Synthetic Biology in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Synth. Biol*, 4(3), 228-239. <https://doi.org/10.1021/sb500229s>
- Sorg, R. A., & Veening, J.-W. (2015). Microscale insights into pneumococcal antibiotic mutant selection windows. *Nature Communications*, 6(1), 8773. <https://doi.org/10.1038/ncomms9773>
- Straume, D., Stamsås, G. A., & Håvarstein, L. S. (2015). Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Genet Evol*, 33, 371-380. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.020>
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P., & Morrison, D. A. (2001). An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*, 67(11), 5190-5196. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5190-5196.2001>
- Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smeekens, J., & Wu, R. (2017). Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based

- proteomics [10.1039/C7MB00393E]. *Molecular BioSystems*, 13(12), 2574-2582. <https://doi.org/10.1039/C7MB00393E>
- ThermoFisherScientific. (2021a). SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain - 5 mM Solution in DMSO. *ThermoFisher.com*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7020>
- ThermoFisherScientific. (2021b). XhoI (10 U/μL). *Thermofisher.com*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0692#/ER0692>
- ThermoFisherScientific. (2022a). Bacterial Viability and Vitality Assays for Flow Cytometry. *ThermoFisher.com*. Retrieved 11.02.22 from [https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-assays-reagents/flow-cytometry-microbiology-assays/flow-cytometry-bacteria-viability-vitality-assays.html?s\\_kwcid=AL!3652!3!358452931117!p!!g!!baclight&ef\\_id=Cj0KCQiAr5iQBhCsARIsAPcwROMVJbrRPj-XKQ2OuxJyphZJWCJs18BcP4IXdJt392773e8dG7sLBPwaAodyEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!358452931117!p!!g!!baclight&cid=bid\\_pca\\_frg\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid0000\\_0\\_0se\\_gaw\\_bt\\_pur\\_con&gclid=Cj0KCQiAr5iQBhCsARIsAPcwROMVJbrRPj-XKQ2OuxJyphZJWCJs18BcP4IXdJt392773e8dG7sLBPwaAodyEALw\\_wcB](https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-assays-reagents/flow-cytometry-microbiology-assays/flow-cytometry-bacteria-viability-vitality-assays.html?s_kwcid=AL!3652!3!358452931117!p!!g!!baclight&ef_id=Cj0KCQiAr5iQBhCsARIsAPcwROMVJbrRPj-XKQ2OuxJyphZJWCJs18BcP4IXdJt392773e8dG7sLBPwaAodyEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!358452931117!p!!g!!baclight&cid=bid_pca_frg_r01_co_cp1359_pjt0000_bid0000_0_0se_gaw_bt_pur_con&gclid=Cj0KCQiAr5iQBhCsARIsAPcwROMVJbrRPj-XKQ2OuxJyphZJWCJs18BcP4IXdJt392773e8dG7sLBPwaAodyEALw_wcB)
- ThermoFisherScientific. (2022b). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). *ThermoFisher.com*. <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
- ThermoFisherScientific. (2022c, 09.25.2019). PCR Primer Design Tips. *ThermoFisher.com*. <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
- van de Guchte, M., van der Vossen, J. M. B. M., Kok, J., & Venema, G. (1989). Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 55(1), 224-228. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.1.224-228.1989>
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W278-W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>
- Vu, K., Bautos, J., Hong, M.-P., & Gelli, A. (2009). The functional expression of toxic genes: lessons learned from molecular cloning of CCH1, a high-affinity Ca<sup>2+</sup> channel. *Anal Biochem*, 393(2), 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.039>
- Wencewicz, T. A. (2016). New antibiotics from Nature's chemical inventory. *Bioorg Med Chem*, 24(24), 6227-6252. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.014>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(15), 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>

## 8 Appendiks 1 – Nukleotid- og aminosyresekvens for AmiA

### 8.1 *amiA* nukleotidsekvens

ATGAAAAAAAAATCGTGTATTTGCTACAGCAGGTCTTGTTTTATTAGCAGCAGGTGTACTTG  
CAGCATGCAGTTCTTCAAATCATCTGATTCATCAGCCCCTAAAGCTTATGGCTATGTTTA  
TACAGCAGACCCAGAAACCTTGGACTACCTGATTTACGTAAAAATAGTACAACAGTAGT  
GACTTCAAATGGGATTGATGGTTTATTTACTAACGATAATTACGGTAATCTTGCTCCTGCA  
GTTGCAGAGGATTGGGAAGTCTCTAAGGATGGTTTGACCTACACTTATAAGATTCGTAAA  
GGGGTTAAATGGTTTACCTCTGATGGAGAAGAATATGCAGAGGTGACGGCTAAAGATTTT  
GTGAACGGTTTAAACACGCAGCAGATAAAAAATCAGAAGCTATGTATTTAGCTGAAAAT  
TCGGTTAAAGGCTTGGCAGATTATCTATCAGGAACCTCAACAGATTTTTCAACAGTTGGTG  
TCAAGGCGGTTGATGATTATACGTTACAATACACTTTGAACCAGCCTGAACCGTTCTGGA  
ACTCTAAGTTGACCTATTCTATTTTCTGGCCTCTGAATGAAGAATTCGAAACATCAAAGG  
AAGCGATTTTGTAAACCAACAGATCCGACATCCTTGCTTTATAATGGTCCATTCTTGTTG  
AAAGGTTGACTGCAAATCTTCTGTAGAGTTTGTAAAAAATGAGCAATATTGGGATAAA  
GAAAATGTCCACCTAGATACTATCAATCTAGCTTACTATGATGGATCAGATCAGGAGTCG  
CTAGAGCGTAACTTCACTAGTGGAGCTTATAGTTATGCCCGTCTTTACCCTACCAGCTCCA  
ACTATTCTAAGGTTGCAGAAGAATACAAGGACAATATCTATTACACACAATCAGGCTCTG  
GGATTGCTGGTCTGGGTGTGAATATTGATCGCCAAAGTTACAACATACTTCTAAAACACTAC  
AGATTCAGAGAAAGTAGCTACTAAGAAGGCATTGCTTAACAAAGATTTCCGTCAAGCCTT  
GAATTTTGTCTTGTATCGCTCAGCTTACTCAGCTCAAATCAATGGTAAAGATGGAGCAGCT  
TTAGCAGTTCGTAATTTATTTGTAAAACCAGACTTTGTTTCAGCTGGTGAGAAGACCTTTG  
GTGATTTAGTCGCTGCTCAACTTCCTGCTTATGGTGATGAGTGGAAAGGTGTGAATTTAGC  
TGATGGGCAGGATGGTTTATTCAATGCTGACAAGGCCAAGGCAGAGTTTGCAGAAAGCTAA  
GAAAGCTTTAGAAGCAGACGGCGTTCAGTTTCTATTCTGACGTTCCAGTAGACCA  
AGCATCAAAAAACTACATATCTCGTATTCAGTCCTTTAAACAATCTGTAGAAACAGTTCTT  
GGTGTGAAAATGTCGTTGTTGATATTCAACAAATGACAAGTGATGAATTCCTTAATATTA  
CTTACTATGCTGCCAATGCTTCATCTGAGGATTGGGATGTATCAGGAGGAGTTTCATGGG  
GGCCAGACTATCAAGACCCATCTACTTACCTGGATATTTTAAAAACAACACTAGCAGTGAAA  
CTACAAAACATATTTAGGATTTGATAATCCAAATAGCCCTTCAGTAGTTCAAGTTGGTTT  
GAAAGAATACGATAAATTAGTTGATGAAGCTGCCAAAGAGACAAGCGACTTGAATGTCC  
GTTATGAAAATATGCAGCGGCTCAAGCATGGTTGACAGATAGTTCACTCTTTATTCCTGC  
TATGGCTTCTTCTGGTGCAGCACCAGTGCTTTCACGAATTGTTCCATTTACTGGAGCTTCT  
GCGCAAACAGGCTCTAAGGGGTGAGATGTTTACTTCAAATATTTGAAATTACAAGATAAA  
GCGGTGACTAAGGAAGAGTATGAAAAGCTCGTGAAAAATGGTTGAAAGAAAAGCTGA  
ATCAAATGAGAAAGCTCAAAAAGAATTGGCAAGTCATGTGAAGTAA

### 8.2 *AmiA* aminosyresekvens

MKKNRVFATAGLVLLAAGVLAACSSSKSSDSSAPKAYGYVYTADPETLDYLISRKNSTTV  
VTSNGIDGLFTNDNYGNLAPAVAEDWEVSKDGLTYTYKIRKGVKWFSDGEEYAEVTAKD  
FVNGLKHAADKKSEAMYLAENSVKGLADYLSGTSTDFSTVGVKAVDDYTLQYTLNQPEPF  
WNSKLTYSIFWPLNEEFETSKGSDFAKPTDPTSLLYNGPFLKGLTAKSSVEFVKNEQYW  
DKENVHLD TINLAYDGS DQESLERNFTSGAYS YARLYPTSSNYSKVAEEYKDNIYYTQS  
GSGIAGLVNIDRQSYNYTSKTTDSEKVATKKALLNKDFRQALNFALDRSAYS AQINGKD  
GAALAVRNLFVKPDFV SAGEKTFGDLVAAQLPAYGDEWKGVN LADGQDGLFNADKAKAEF  
AKAKKALEADGVQFPIHLDVPVDQASKNYISRIQSFKQSVETVLGVENVVVDIQQMTSDE  
FLNITYYAANASSEDWDVSGGVS WGPDYQDPSTYLDILKTT SSETTKTYLGFDPNPSV



VQVGLKEYDKLVDEAAKETS DLNVRYEKYAAAQAWLTDSSLFIPAMASSGAAPVLSRIVP  
FTGASAQTGSKGSDVYFKYLKLQDKAVTKEEYKAREKWLKEKAESNEKAQKELASHVK

### 8.3 Aminosyresekvens brukt for strukturprediksjon av AmiA (uten signalsekvensen)

CSSSKSSDSSAPKAYGYVYTADPETLDYLISRKNSTTVVTSNGIDGLFTNDNYGNLAPAVAED  
WEVSKDGLTYTYKIRKGVKWFTSDGEEYAEVTAKDFVNLKHAADKKSEAMYLAENSVKG  
LADYLSGTSTDFSTVGVKAVDDYTLQYTLNQPEPFWNSKLTYSIFWPLNEEFETSKGSDFAKP  
TDPTSLLYNGPFLLKGLTAKSSVEFVKNEQYWDKENVHLD TINLAYYDGS DQESLERNFTSG  
AYS YARLYPTSSNYSKVAEEYKDNIIYYTQSGSGIAGLGVNIDRQSYNYTSKTTDSEKVATKKA  
LLNKDFRQALNFALDRSAYSAQINGKDGAALAVRNLFVKPDFV SAGEKTFGDLVAAQLPAY  
GDEWKGVNLADGQDGLFNADKAKAEFAKAKKALEADGVQFPIHLDV PVDQASKNYISRIQS  
FKQSVETVLGVENVVVDIQQMTSDEFLNITYYAANASSEDWDVSGGVS WGPDYQDPSTYLDI  
LKTTSSSETTKTYLGFDPNPNSPSVVQVGLKEYDKLVDEAAKETS DLNVRYEKYAAAQAWLTD  
SSLFIPAMASSGAAPVLSRIVPFTGASAQTGSKGSDVYFKYLKLQDKAVTKEEYKAREKWLK  
EKAESNEKAQKELASHVK

### 8.4 *amiA* nukleotidsekvens med punktmutasjoner

Punktmutasjonene er markert i turkis farge.

ATGAAAAAAAAATCGTGTATTTGCTACAGCAGGTCTTGTTTTATTAGCAGCAGGTGTACTTG  
CAGCATGCAGTTCTTCAAATCATCTGATTCATCAGCCCCTAAAGCTTATGGCTATGTTTA  
TACAGCAGACCCAGAAACCTTGGACTACCTGATTCACGTAAAAATAGTACAACAGTAGT  
GACTTCAAATGGGATTGATGGTTTATTTACTAACGATAATTACGGTAATCTTGCTCCTGCA  
GTTGCAGAGGATTGGGAAGTCTCTAAGGATGGTTTGACCTACACTTATAAGATTCGTAAA  
GGGGTTAAATGGTTTACCTCTGATGGAGAAGAATATGCAGAGGTGACGGCTAAAGATTTG  
GTGAACGGTTTAAACACGCAGCAGATAAAAAATCAGAAGCTATGTATTTAGCTGAAAAT  
TCGGTTAAAGGCTTGGCAGATTATCTATCAGGAACTTCAACAGATTTTTCAACAGTTGGTG  
TCAAGGCGTTGATGATTATACGTTACAATACACTTTGAACCGCTGAACCGTTCTGGA  
ACTCTAAGTTGACCTATTCTATTTCTGGCCTCTGAATGAAGAATTCGAAACATCAAAGG  
AAGCGATTTTGCTAAACCAACAGATCCGACATCCTTGCTTTATAATGGTCCATTCTTGTTG  
AAAGGGTTGACTGCAAATCTTCTGTAGAGTTTGTA AAAAATGAGCAATATTGGGATAAA  
GAAAATGTCCACCTAGATACTATCAATCTAGCTTACTATGATGGATCAGATCAGGAGTCG  
CTAGAGCGTAACTTCACTAGTGGAGCTTATAGTTATGCCCGTCTTTACCCTACCAGCTCCA  
ACTATTCTAAGGTTGCAGAAGAATACAAGGACAATATCTATTACACACAATCAGGCTCTG  
GGATTGCTGGTCTGGGTGTGAATATTGATCGCCAAAGTTACA ACTATACTTCTAAA ACTAC  
AGATTCAGAGAAAGTAGCTACTAAGAAGGCATTGCTTAACAAAGATTTCCGTCAAGCCTT  
GAATTTTGCTCTTGATCGCTCAGCTTACTCAGCTCAAATCAATGGTAAAGATGGAGCAGCT  
TTAGCAGTTCGTAATTTATTTGTAAAACCAGACTTTGTTTCAGCTGGTGAGAAGACCTTTG  
GTGATTTAGTCGCTGCTCAACTTCTGCTTATGGTGATGAGTGGAAAGGTGTGAATTTAGC  
TGATGGGCAGGATGGTTTATTCAATGCTGACAAGGCCAAGGCAGAGTTTGCGAAAGCTAA  
GAAAGCTTTAGAAGCAGACGGCGTTCAGTTTCCTATTCATCTGGACGTTCCAGTAGACCA  
AGCATCAAAAACTACATATCTCGTATTCAGTCCTTTAAACAATCTGTAGAAACAGTTCTT  
GGTGTGAAAATGTCGTTGTTGATATTCAACAAATGACAAGTGATGAATTCCTTAATATTA  
CTTACTATGCTGCCAATGCTTCATCTGAGGATTGGGATGTATCAGGAGGAGTT **GCTGCTGG**  
GCCAGACTATCAAGACCCATCTACTTACCTGGATATTTTAAAAACA ACTAGCAGTGAAAC

TACAAAAACATATTTAGGATTTGATAATCCAAATAGCCCTTCAGTAGTTCAAGTTGGTTTG  
AAAGAATACGATAAATTAGTTGATGAAGCTGCCAAAGAGACAAGCGACTTGAATGTCCG  
TTATGAAAAATATGCAGCGGCTCAAGCATGGTTGACAGATAGTTCACTCTTTATTCCTGCT  
ATGGCTTCTTCTGGTGCAGCACCAGTGCTTTCACGAATTGTTCCATTTACTGGAGCTTCTG  
CGCAAACAGGCTCTAAGGGGTCAGATGTTTACTTCAAATATTTGAAATTACAAGATAAAG  
CGGTGACTAAGGAAGAGTATGAAAAAGCTCGTGAAAAATGGTTGAAAGAAAAAGCTGAA  
TCAAATGAGAAAGCTCAAAAAGAATTGGCAAGTCATGTGAAGTAA

## 8.5 AmiA aminosyresekvens med punkmutasjoner

Punkmutasjoner er markert i turkis farge.

MKKNRVFATAGLVLLAAGVLAACSSSKSSDSSAPKAYGYVYTADPETLDYLISRKNSTTVVT  
SNGIDGLFTNDNYGNLAPA VAEDWEVSKDGLTYTYKIRKGVKWFTSDGEEYAEVTAKDFVN  
GLKHAADKKSEAMYLAENSVKGLADYLSGTSTDFSTVGVKAVDDYTLQYTLNQPEPFWNSK  
LTYSIFWPLNEEFETSKGSDFAKPTDPTSLLYNGPFLKGLTAKSSVEFVKNEQYWDKENVHL  
DTINLAYYDGSQESLERNFTSGAYSARLYPTSSNYSKVAEEYKDNIYYTQSGSGIAGLVN  
IDRQSYNYTSKTTDSEKVATKKALLNKDFRQALNFALDRSAYS AQINGKDGAALAVRNLFVK  
PDFVSAGEKTFGDLVAAQLPAYGDEWKGVNLADGQDGLFNADKAKAEFAKAKKALEADGV  
QFPIHLDVPVDQASKNYISRIQSFKQSVETVLGVENVVVDIQQMTSDEFLNITYYAANASSED  
WDVSGGVAA<sup>AA</sup>GPDYQDPSTYLDILKTTSETTKTYLGFDPNPNSPSVVQVGLKEYDKLVDEAAK  
ETSDLNVRYEKYAAAQAWLTDSSLFIPAMASSGAAPVLSRVPFTGASAQTGSKGSDVYFKYL  
KLQDKAVTKEEYEKAREKWLKEKAESNEKAQKELASHVK



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway