

**Isolering, kloning og ekspresjon av  
*groESL<sub>2</sub>*-operonet fra den termofile bakterien  
*Chloroflexus aurantiacus***

**av**

**Ingun Benestad**

**Hovedfagsoppgave i generell mikrobiologi for graden Candidata scientiarum ved  
Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo**

**2005**

## FORORD

Det praktiske arbeidet ble utført ved Institutt for molekylær biovitenskap, Universitetet i Oslo, i perioden våren 2003 til høsten 2004.

Jeg vil takke min veileder professor Reidun Sirevåg for god veiledning og hjelp med både praktiske og teoretiske spørsmål under arbeidet med hovedoppgaven og for rettingen av hovedoppgaven. Videre ønsker jeg å takke tidligere stipendiat Aleksandra Bjørk for gode råd på laboratoriet og avdelingsingeniør Dimitrios Manzilas for utføring av RP-HPLC. Takk rettes selvfølgelig også til medstudenter og ansatte ved avdelingen for en hyggelig studietid.

Oslo, mars 2005

Ingun Benestad

## SAMMENDRAG

Chaperoninene GroEL og GroES er en gruppe molekyllære chaperoner som hittil er funnet i alle bakterier. Genene som koder for chaperoniner er vanligvis organisert i operoner på genomet. Den moderat termofile grønne glidende bakterien *Chloroflexus aurantiacus* har to *groESL*-operoner, *groESL<sub>1</sub>* og *groESL<sub>2</sub>*, der *groESL<sub>1</sub>* trolig uttrykkes ved temperaturer nær bakteriens maksimumstemperatur. Målet i denne oppgaven var å isolere *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>*-genene fra *C. aurantiacus* og få dem uttrykt fra ekspresjonsvektorer, samt å undersøke om andre former for stress enn varme inducerer chaperoninekspresjon i *C. aurantiacus*.

Genene *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>* ble isolert ved hjelp av PCR og satt inn hver for seg i pET101/D-TOPO vektorer og forsøkt uttrykt med pET 101 Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kit, men bare ekspresjon av *groEL<sub>2</sub>* lyktes. Det ble funnet to kodoner i 5' enden av *groES<sub>2</sub>* som er svært sjeldne i *E. coli*, og da det kunne være en årsak til lav eller ingen ekspresjon, ble *groES<sub>2</sub>* amplifisert med PCR der foroverprimeren var en mutasjonsprimer som muterte de sjeldne kodonene til mer vanlige kodoner. Det muterte *groES<sub>2</sub>*-genet ble heller ikke uttrykt. Som en positiv kontroll ble *groES*-genet fra *E. coli* forsøkt uttrykt på samme måte som *groES<sub>2</sub>*, og det lyktes. Genet *groES<sub>2</sub>* ble forsøkt uttrykt på en rekke forskjellige måter som muligens kunne øke ekspresjonsnivået fra pET101/D-TOPO vektoren: ulike konsentrasjoner av induksjonsfaktoren og antibiotika, lavere temperaturer, 1 % glukose i vekstmediet og mer næringsrikt vekstmedium. Ingen av metodene ga ekspresjon. Genet *groES<sub>2</sub>* lot seg tilslutt uttrykke fra pET 102/D-TOPO vektoren med Champion<sup>™</sup> pET 102 Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kit, som et fusjonsprotein til tioredoksin.

Cellefrie ekstrakter av celler fra *C. aurantiacus* dyrket ved ulike former for stress ble analysert med SDS-PAGE. På gelene ble det sett etter økning i ekspresjon av proteiner rundt 60 kDa, som er molekylvekten til GroEL-proteinet. Stressfaktorene *C. aurantiacus* ble utsatt for var: sterkt lys, lav og høy pH, etanol, natriumklorid og hydrogenperoksid. Bare eksponering for hydrogenperoksid viste en sterk økning i ekspresjonen av proteiner rundt 60 kDa. Det ble bestemt at et av disse proteinbåndene, som var rundt 60-70 kDa, skulle N-terminal aminosyresekvenseres. Først ble proteinet forsøkt renset med RP-HPLC, men da dette var vanskelig ble proteinet elektroblottet fra gelen til en PVDF-membran. Det ønskede båndet ble kuttet ut fra membranen og påfølgende N-terminal aminosyresekvensering viste at sekvensen verken tilhørte chaperoninene GroEL<sub>1</sub>, GroEL<sub>2</sub> eller chaperonet DnaK. Den sekvenserte N-terminale aminosyresekvensen var imidlertid for kort til å kunne bestemme hvilket protein den tilhørte.

## FORKORTELSER

APS	ammoniumpersulfat
ATP	adenosintrifosfat
ATR	"acid tolerance response"
bp	basepar
BSA	bovin serum albumin
cAMP	syklisk 3',5'-adenosin monofosfat
CAPS	n-sykloheksyl-3-aminopropansulfonsyre
CIRCE	"controlling inverted repeat of chaperone expression"
CRP	syklisk AMP reseptorprotein
DH <sub>2</sub> O	destillert vann
DNA	deoksyribonukleinsyre
dNTP	deoksyribonukleosid 5'-trifosfatnukleotid
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etylen-diamin-tetra-eddiksyre
HrcA	"heat regulation at CIRCE"
HSP	heat shock protein = varmesjokk-protein
IPTG	isopropyltio-β-D-galaktosid
kb	kilobasepar
kDa	kilodalton
L	liter
LB	Luria Bertani
MDH	malat dehydrogenase
min	minutter
ml	milliliter
mM	millimolar
mtMDH	mitokondriell MDH
μl	mikroliter
μg	mikrogram
μM	mikromolar
mRNA	budbringer-RNA
M <sub>w</sub>	molekylvekt
ng	nanogram
NMR	kjernemagnetiskresonans
OD	optical density = optisk tetthet

---

O-mix	"orange-mix"
onk	overnattkultur
PCR	polymerase kjedereaksjon
PITC	fenyliisotiocyanat
PVDF	polyvinylidendifluorid
RNA	ribonukleinsyre
RP-HPLC	"reverse phase high performance liquid chromatography"
rpm	rotors pr. minute = omdreiningar pr. minutt
SDS	natrium dodecyl sulfat
SDS-PAGE	"sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis"
SSP	stressjokk-proteiner
TAE-buffer	Tri-eddiksyre-EDTA-buffer
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
TEMED	N',N',N',N',-tetrametyletylendiamin
T <sub>m</sub>	smeltetemperatur
T <sub>opt</sub>	optimumstemperatur
tRNA	transport-RNA
U	enzymenhet
uv	ultrafiolett
V	volt
v/v	vekt/volum

---

**INNHOLDSFORTEGNELSE**


---

<b>FORORD</b>	<b>i</b>
<b>SAMMENDRAG</b>	<b>ii</b>
<b>FORKORTELSER</b>	<b>iii</b>
<b>1. INNLEDNING</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Bakgrunn for oppgaven</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Molekylære chaperoner</b>	<b>1</b>
1.2.1 Chaperoniner	2
1.2.2 Regulering av chaperoninekspressjonen	7
1.2.3 Chaperoninenes ulike roller i cellen	10
1.2.4 Ulike stressfaktorer induserer ekspressjon av chaperoner som GroEL, GroES og DnaK	11
<b>1.3 <i>Chloroflexus aurantiacus</i>, en moderat termofil grønn glidende bakterie</b>	<b>12</b>
1.3.1 Fototrofe bakterier	12
1.3.2 Termofile bakterier	13
1.3.3 <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	13
<b>1.4 Oksidativt stress i bakterier</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIALER</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Kjemikalier</b>	<b>17</b>
2.1.1 Uorganiske kjemikalier	17
2.1.2 Organiske kjemikalier	17
<b>2.2 Oligonukleotid-primere</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Enzymer</b>	<b>19</b>
2.3.1 Polymeraser til PCR	19
2.3.2 Andre enzymer	19
<b>2.4 Bakteriestammer</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Dyrkingsmedier</b>	<b>19</b>
2.5.1 Dyrkingsmedium for <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	19
2.5.2 Dyrkingsmedier for <i>Escherichia coli</i>	20
<b>2.6 Buffere og løsninger</b>	<b>21</b>
2.6.1 Løsninger for isolering av DNA	21
2.6.2 Buffer for oppbevaring av DNA	22
2.6.3 20 mM Kalium-fosfatbuffer pH 7.5	22
2.6.4 Buffere til vekstmedium for <i>C. aurantiacus</i>	22
2.6.5 Buffere og løsninger for agarosegel og elektroforese	23
2.6.6 Buffere og løsninger for SDS-PAGE	23
2.6.7 Buffere og løsninger for tricin-SDS-PAGE	25

---

2.6.8	Buffere og løsninger for elektroblotting	26
<b>2.7</b>	<b>Membraner</b>	<b>26</b>
<b>2.8</b>	<b>Standarder</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Ferdigkjøpte "kits"</b>	<b>27</b>
<b>2.10</b>	<b>Utstyr</b>	<b>27</b>
<b>3. METODER</b>		<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Sterilteknikk</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Dyrking av celler</b>	<b>28</b>
3.2.1	Dyrking, høsting og karakterisering av <i>C. aurantiacus</i>	28
3.2.1.1	Dyrking og høsting av <i>C. aurantiacus</i> for DNA-isolering	28
3.2.1.2	Dyrking av <i>C. aurantiacus</i> under ulike stressforhold	28
3.2.1.3	Karakterisering av <i>C. aurantiacus</i> : Katalasetest	29
3.2.2	Dyrking av <i>Escherichia coli</i>	30
<b>3.3</b>	<b>Generelle metoder for arbeid med DNA</b>	<b>30</b>
3.3.1	Isolering av DNA fra agarosegel med S.N.A.P Gel Purification Kit	30
3.3.2	Isolering av plasmid-DNA med Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit	30
3.3.3	Isolering av plasmid-DNA med Wizard Plus SV Midipreps DNA Purification System Kit	31
3.3.4	Tillaging av kompetente celler	31
3.3.5	Agarose-gelelektroforese	31
<b>3.4</b>	<b>Generelle metoder for arbeid med proteiner</b>	<b>32</b>
3.4.1	Tillaging av cellefritt ekstrakt ved sonikering	32
3.4.2	SDS-PAGE	33
3.4.3	Måling av proteinmengde	34
3.4.4	N-terminal aminosyresekvensering	35
3.4.4.1	Redusering og alkylering av proteiner for N-terminal aminosyresekvensering	35
3.4.5	Elektroblotting	35
3.4.5.1	Optimalisering av elektroblotting for N-terminal aminosyresekvensering	36
<b>3.5</b>	<b>Isolering av DNA fra hele celler</b>	<b>37</b>
3.5.1	Isolering av DNA fra <i>C. aurantiacus</i>	37
3.5.2	Spektrofotometrisk måling av konsentrasjon og renhet til DNA	38
<b>3.6</b>	<b>PCR</b>	<b>38</b>
3.6.1	PCR med Vent polymerase	40
3.6.2	PCR med DyNAzyme EXT DNA-polymerase	40
3.6.3	Isolering av <i>groES</i> <sub>2</sub> og <i>groEL</i> <sub>2</sub> fra genomisk DNA med PCR	41

---

<b>3.7 Ekspresjon med pET/D-TOPO vektorer</b>	<b>44</b>
3.7.1 T7-regulert ekspresjon	45
3.7.2 Prinsipp for retningsbestemt TOPO-kloning	47
3.7.3 Retningsbestemt TOPO-kloning og transformering	48
3.7.4 Analyse av transformanter	48
3.7.5 Ekspresjon av <i>groESL</i> -genene	49
3.7.6 Ekspresjon med tioredoksin som fusjonsprotein	50
<b>3.8 DNA-sekvensering og sekvensanalyse</b>	<b>51</b>
<b>4. RESULTATER</b>	<b>52</b>
<b>4.1 Isolering av gener fra genomisk DNA</b>	<b>52</b>
4.1.1 Isolering av kromosomalt DNA fra <i>C. aurantiacus</i>	52
4.1.2 Isolering av <i>groES<sub>2</sub></i>	53
4.1.3 Isolering av <i>groEL<sub>2</sub></i>	56
<b>4.2 Ekspresjon av <i>groESL</i>-genene</b>	<b>58</b>
4.2.1 Analyse av transformanter	58
4.2.2 Ekspresjon av <i>groES<sub>2</sub></i>	59
4.2.3 Ekspresjon av <i>groEL<sub>2</sub>-6xhis</i>	61
<b>4.3 Analyse av cellefrie ekstrakter fra <i>C. aurantiacus</i> dyrket under ulike former for stress</b>	<b>61</b>
4.3.1 Saltstress	61
4.3.2 Lysstress	61
4.3.3 pH-stress	62
4.3.4 Etanolstress	63
4.3.5 Oksidativt stress	63
4.3.6 Hydrogenperoksid-stress	63
<b>5. DISKUSJON</b>	<b>68</b>
<b>5.1 Isolering av <i>groESL</i>-genene</b>	<b>68</b>
<b>5.2 Ekspresjon av <i>groESL</i>-genene</b>	<b>71</b>
<b>5.3 Dyrking av <i>C. aurantiacus</i> under ulike former for stress</b>	<b>75</b>
<b>5.4 Forslag til videre arbeid</b>	<b>78</b>
<b>REFERANSER</b>	<b>80</b>
<b>APPENDIKS 1</b>	<b>87</b>
<b>APPENDIKS 2</b>	<b>88</b>
<b>APPENDIKS 3</b>	<b>90</b>



# 1. INNLEDNING

## 1.1 Bakgrunn for oppgaven

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt som går ut på å forklare det molekylære grunnlaget for termofili hos grønne fototrofe bakterier. En del av prosjektet går ut på å undersøke strukturen til de homologe malat dehydrogenasene (MDH) fra den termofile grønne glidende bakterien *Chloroflexus aurantiacus*, den moderat termofile grønne svovelbakterien *Chlorobium tepidum* og den mesofile grønne svovelbakterien *Chlorobium vibrioforme*. En annen del av prosjektet er å undersøke hvilken rolle chaperoner spiller i denne sammenhengen. For å undersøke funksjonen til chaperoner i *C. aurantiacus*, ble denne organismen dyrket ved ulike temperaturer fra 45 °C-70 °C. Ved 65 °C, som er nær maksimumstemperaturen, ble det observert økt ekspresjon av blant annet Hsp60 chaperonin GroEL (Tooming, 1998, Hovedoppgave UiO). Det ble videre funnet ut at *C. aurantiacus* inneholder to *groESL*-operoner, *groESL<sub>1</sub>* og *groESL<sub>2</sub>*, der *groESL<sub>1</sub>* trolig uttrykkes ved temperaturer nær organismens maksimumstemperatur. Sekvensanalyse av promoterområder har vist at de to operonene kan være under ulik regulering (Vanberg, 2001, Hovedoppgave UiO).

## 1.2 Molekylære chaperoner

Stabiliteten til et protein er avhengig av proteinets evne til å beholde sin tredimensjonale struktur selv om det er variasjoner i fysiske forhold, som for eksempel temperatur, pH eller saltkonsentrasjon. Små endringer i de fysiske forholdene kan lett denaturere et protein og dermed inaktivere det. Selv om mange proteiner fra termofile *Bacteria* og *Archaea* er svært varmestabile, er proteiner generelt sett bare marginalt stabile.

Det er ikke én faktor alene som bestemmer stabiliteten til et protein. Funksjonelt aktive proteiner holdes sammen av en fin balanse av blant annet disulfidbroer, saltbroer, Van der Waals bindinger, og hydrogenbindinger.

For å bli funksjonelt aktiv må et nysyntetisert polypeptid folde til sin helt spesielle tertiære struktur. Hvordan et protein folder ble først undersøkt *in vitro* ved bruk av rensede, kjemisk denturerte polypeptider, og Anfinsen og medarbeidere viste ved hjelp av *in vitro* studier at den native konformasjonen til et protein er bestemt av aminosyresekvensen (Epstein *et al.*, 1963).

Å forutsi den tertiære strukturen til et protein ut fra primærsekvensen er foreløpig ikke mulig, og det er usikkert hvordan primærstrukturen dirigerer foldingen av proteinet slik at det får sin bestemte tertiære struktur. Det som driver proteinfoldingen er trolig de samme kreftene som er ansvarlige for proteinstabilitet.

Store proteiner som består av flere domener, folder seg ofte ufullstendig slik at vi får delvis foldede intermediater som har lett for å aggregere med hverandre. Hydrofobe krefter og hydrogenbindinger fra hydrofobe aminosyresidier, som normalt sett ligger begravet i proteinet, driver denne aggregeringen. Slike aggregater er antakeligvis skadelige for cellen i tillegg til at de senker hastigheten av proteinsyntesen. Fordi ufoldede polypeptider raskt degraderes av proteaser i cellen, er det behov for et system i cellen som beskytter proteiner mot aggregering og proteolyse.

Levende celler har utviklet et system for å beskytte proteiner fra aggregering og proteolyse. Dette systemet utføres av molekylære chaperoner som hindrer upassende inter- og intra-molekulære interaksjoner, ved å binde seg til hydrofobe deler av ikke-native proteiner og dermed påvirke hvordan de folder seg. Chaperonene inngår ikke i den endelige strukturen av de foldede proteinene, men frigjøres etter at foldingen er korrekt. Dermed blir chaperonene frie til å binde nye ikke-native proteiner.

Det har vist seg at chaperoner spiller en viktig rolle i cellemetabolismen både under normale forhold og i stressituasjoner ved å hjelpe til med folding og translokering av nysyntetiserte proteiner, utfolding av ikke-native proteiner og kontroll av den biologiske aktiviteten av visse regulatoriske proteiner.

De molekylære chaperonene er gruppert i familier på bakgrunn av konserverte områder og etter deres omtrentlige molekylvekt. For eksempel er et 60 kDa varmesjokk-protein et chaperon kalt Hsp60 (Hsp = Heat shock protein). De mest kjente chaperonene i bakterier er: Hsp100, Hsp 90, Hsp70 og Hsp60, som fungerer på følgende måte:

Hsp100: Hjelper til med å bryte ned ustabile proteiner.

Hsp90: Forhindrer aggregering og hjelper til med refolding av misfoldede proteiner.

Hsp70: (DnaK i *E. coli*) binder seg til voksende polypeptider på ribosomene og forhindrer for tidlig folding, misfolding eller aggregering. Hsp70 er regulert av ko-chaperonet Hsp40 (DnaJ i *E. coli*). Hsp70 antas også å ha en rolle i å organisere eksporten av proteiner over cytoplasmamembranen.

Hsp60: (GroEL i *E. coli*) er kjent som chaperoniner som binder seg til delvis foldede protein-intermediater. Hsp60 reguleres av ko-chaperoninnet, Hsp10 (GroES i *E. coli*). Hsp60 er fritt i cytoplasma og samarbeider ikke med ribosomer slik som Hsp70. Hsp70-systemet forårsaker ikke nødvendigvis fullstendig folding av proteinet til dets native struktur, men hindrer det i å aggregere. Hsp60-systemet derimot, har hovedsakelig i oppgave å folde proteinene til deres native struktur. Mange proteiner er avhengige av først å interagere med Hsp70-systemet og deretter med Hsp60-systemet for korrekt folding.

### 1. 2. 1 Chaperoniner

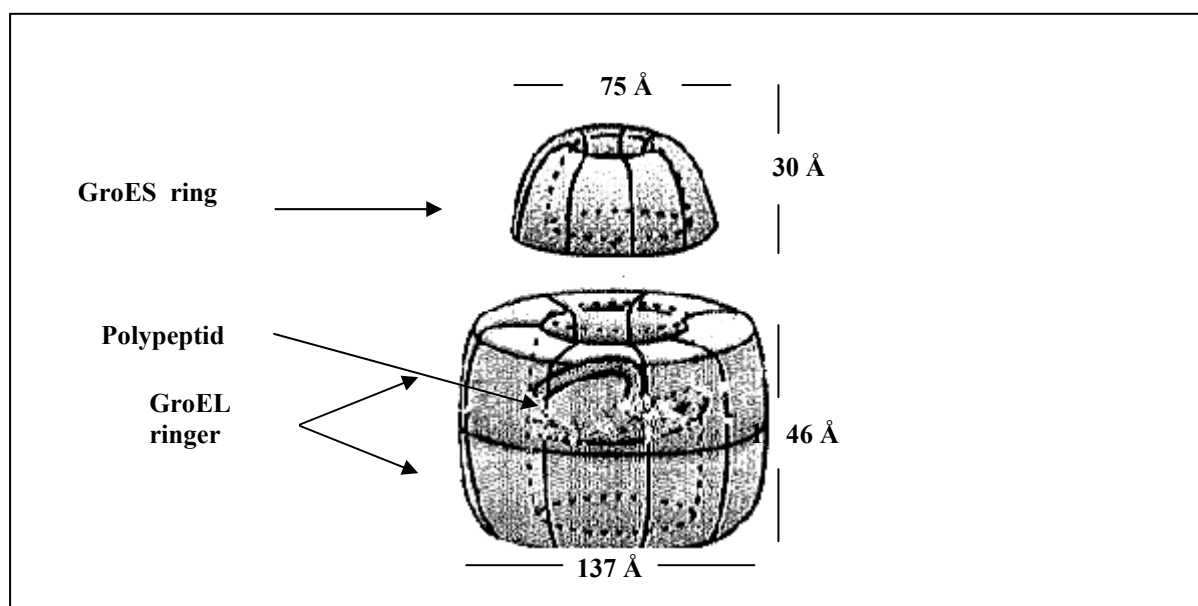
Chaperoniner er en fellesbetegnelse på en bestemt gruppe molekylære chaperoner. Chaperoninene deles inn i to undergrupper: Gruppe 1. chaperoniner, også kjent som Hsp60, er funnet i alle bakterier, mitokondrier og kloroplast. De er nylig også funnet i *Archaea* i slekten *Methanosarcina*

(Klunker *et al.*, 2003). Gruppe 1. chaperoninene samarbeider med ko-chaperoninene, Hsp10. Gruppe 2. chaperoniner finnes i *Archaea* og *Eukarya*.

Det molekylære chaperonet som er best undersøkt er antakelig GroEL og krystallstrukturene til både GroEL og GroES er kjent (Braig *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 1996).

GroELs kvartære struktur ligner en tønne som er åpen i begge ender (Braig *et al.*, 1994). Strukturen består av fjorten subenheter som er samlet i to ringer med syv subenheter i hver ring. De to ringene omslutter et sentralt hulrom. Dette hulrommet har hydrofobe residier som kan binde ikke-native og/eller misfoldede proteinintermediater som eksponerer hydrofobe overflaterregioner. Frigjøring av polypeptider i det sentrale hulrommet tillater folding i beskyttede omgivelser. Polypeptider som binder seg til GroEL er ofte intermediater med en nativ-liknende sekundærstruktur, men som fremdeles ikke har oppnådd den tettpakkede tertiære strukturen. Disse intermediatene kalles for "molten globules". Chaperoniner kan binde med veldig høy affinitet til hydrofobe regioner av "molten globule" former (Martin *et al.*, 1991; Hayer-Hartl *et al.*, 1994).

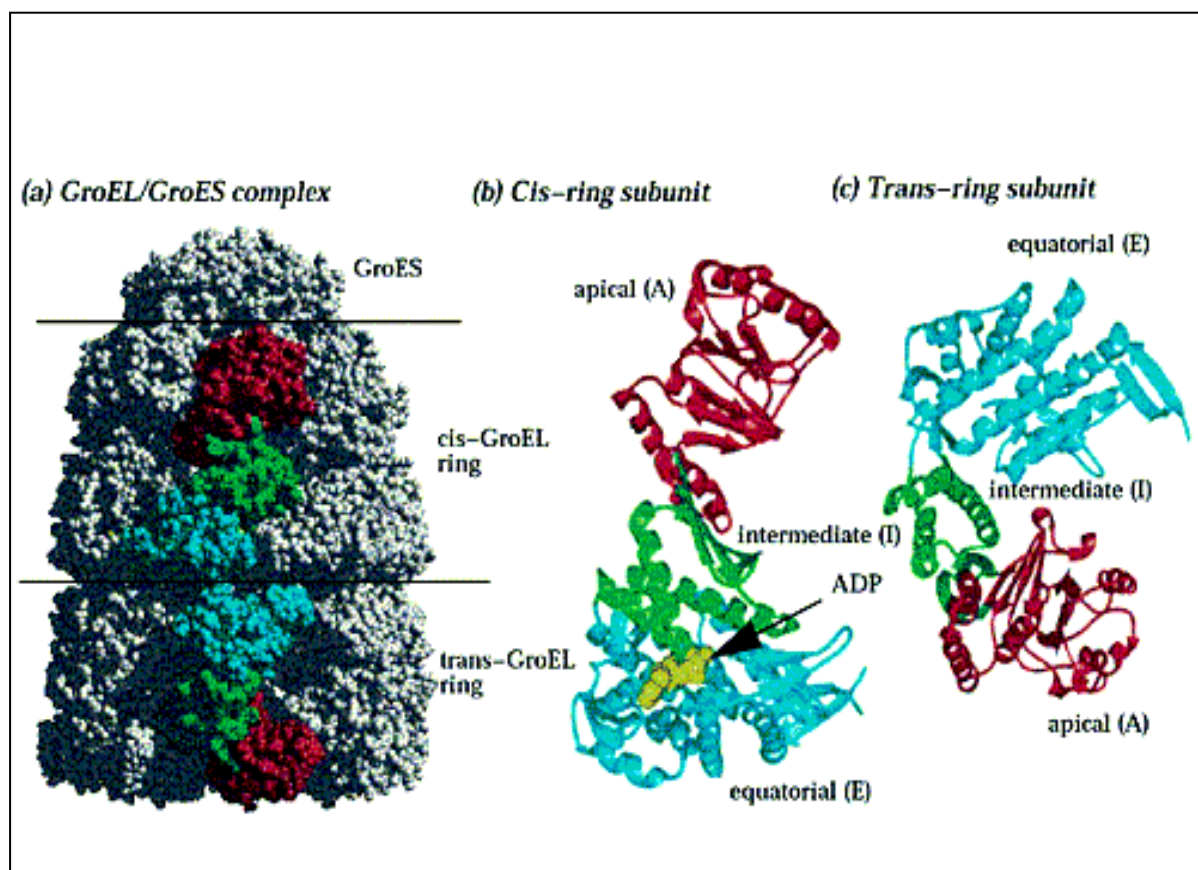
Den kvartære strukturen til GroES er en kuppelformet ring som også består av syv subenheter som kan binde seg til GroEL-ringene og dermed danne et lokk over det sentrale hulrommet. GroEL-GroES-ringkomplekset er vist skjematisk i figur 1.1.



**Figur 1.1: Skjematisk fremstilling av GroEL-GroES-ringkomplekset.** Se teksten for detaljer. GroEL-komplekset er 137 Å i diameter og 146 Å i høyde. GroES-komplekset er 75 Å i diameter og 30 Å i høyde.

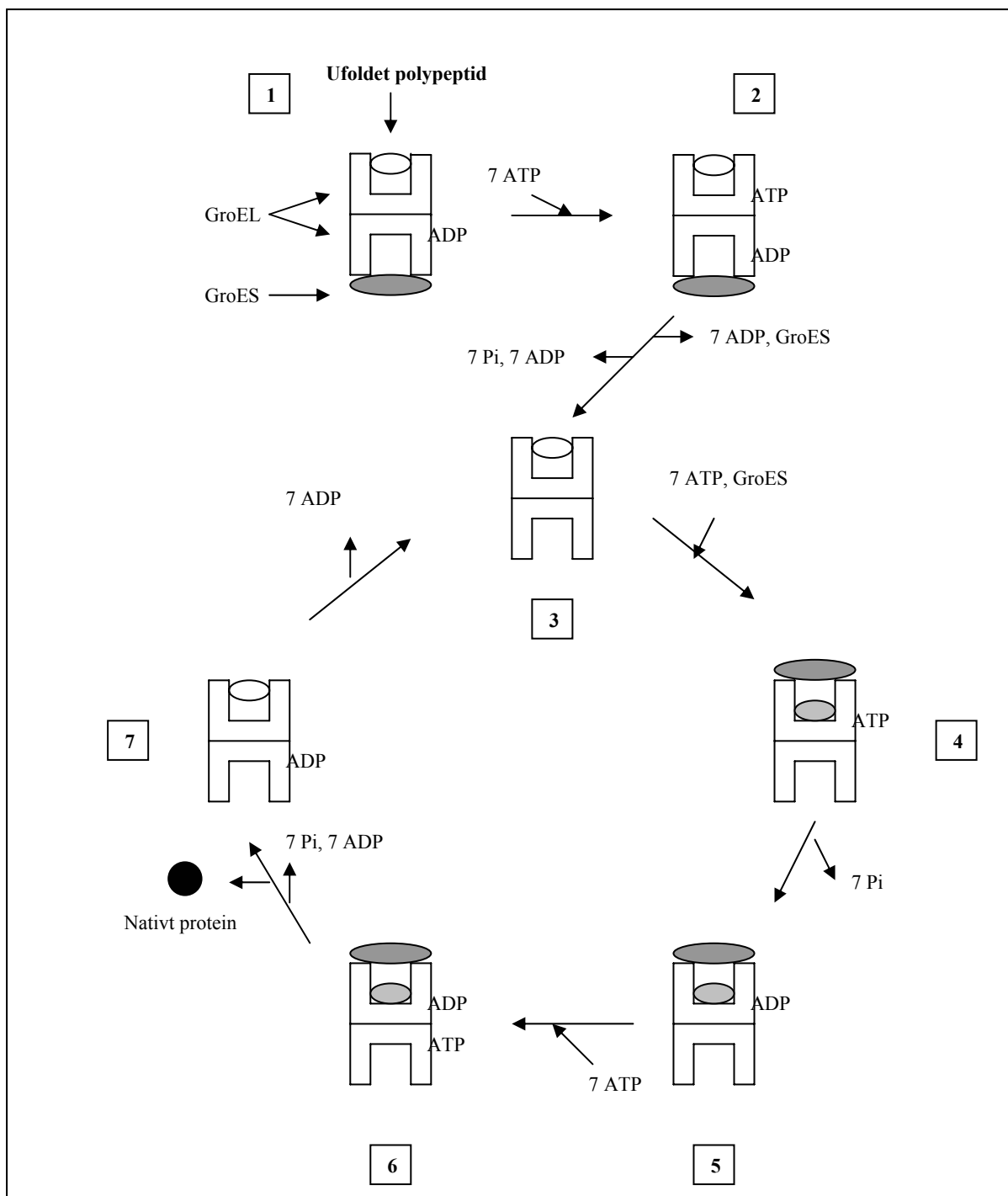
De syv subenhetene i GroEL består hver av tre domener: et apikalt, et intermediat og et ekvatorialt. Det apikale domenet har hydrofobe bindingssteder som gjenkjenner polypeptider som skal frigjøres i det sentrale hulrommet, og har fleksible løkker som binder seg til GroES. Det ekvatoriale domenet binder og hydrolyserer ATP og sørger dessuten for kontakt mellom de to GroEL-ringene og mellom de enkelte subenhetene. Det intermediate domenet virker som en funksjonell bro mellom det

apikale og ekvatoriale domenet (Kawata *et al.*, 1999). En viktig egenskap ved subenhetene i GroES er den mobile løkken. Hver av de syv GroES-subenhetene har nemlig en kjede på seksten residier som forårsaker bindingen til de apikale domenene i GroEL-subenhetene. Bindingen av GroES skjer på endene av GroEL og er avhengig av at nukleotidene ADP eller ATP er bundet til det ekvatoriale domenet på GroEL-ringen den binder til. Hovedfunksjonen ved ATP-hydrolyse er antakeligvis å optimalisere hastigheten av binding og frigjøring av GroES, og dermed koordinere åpning og lukking av GroEL-hulrommet. GroES fungerer ikke bare som et lokk over GroEL-hulrommet for å forhindre for tidlig frigjøring av polypeptidet. Binding av GroES forårsaker også massive konformasjonsendringer i domenene til GroEL-ringen som den er bundet til, og fungerer på den måten som en molekylær bryter som endrer chaperoninet fra en bindende form til en foldende form. GroEL-ringen som er bundet til GroES og ADP kalles for *cis*-ringen, mens den GroES- og ADP-frie GroEL-ringen kalles for *trans*-ringen. Figur 1.2 viser GroEL-GroES ringstrukturen og subenhetene i *cis*- og *trans*-ringene.



**Figur 1.2: Strukturen til GroEL-GroES-komplekset.** a) en modell basert på krystallstrukturen av GroEL-ADP<sub>7</sub>-GroES komplekset (Xu *et al.*, 1997). b) og c) viser strukturene til subenhetene til henholdsvis GroEL *cis*- og *trans*-ringene. Et ADP-molekyl er bundet til det ekvatoriale domenet i *cis*-ringen. Se teksten for detaljer. Figuren er noe modifisert og er hentet fra Keskin *et al.*, 2002.

GroES-subenhetene har som nevnt en mobil løkke som kommer i kontakt med det substratbindende området i det apikale domenet til GroEL-subenhetene. Ved kontakt med de mobile løkkene beveger de apikale domener seg oppover samtidig som de roterer omtrent  $90^\circ$  utover. De hydrofobe bindingssetene i de apikale domener som omgav hulrommet blir reorientert, slik at hulrommet blir hydrofilt og det bundede polypeptidet kan slippes fri inni hulrommet og folde seg. Volumet i hulrommet øker dessuten fra omkring  $85\,000\text{ \AA}^3$  til omkring  $175\,000\text{ \AA}^3$ , slik at det blir god plass for innkapslede proteiner opp til omtrent 60 kDa å folde fritt.



**Figur 1.3:** Skjematiske fremstilling av foldingszyklusen til GroEL/GroES. Foldingszyklusen er forklart i teksten nedenfor.

Chaperonin-foldingssyklusen er vist skjematisk på figur 1.3. Komplekset som dannes med et polypeptid i cellen er mest sannsynlig et GroEL/GroES/ADP-kompleks. Først binder polypeptidet seg til et asymmetrisk GroEL/GroES-kompleks i *trans*-ringen (trinn 1). Dette, sammen med bindingen og hydrolyseringen av ATP i *trans*-ringen, forårsaker dissosiering av GroES og ADP (trinn 2-3). Den nukleotidfri formen av GroEL med polypeptid (trinn 3), er bare en kortlivet form. GroES og ATP binder seg på ny med like stor sannsynlighet til begge GroEL-ringene, men bare binding til ringen der polypeptidet er fører til produktiv folding (trinn 4). Så snart GroES har bundet til riktig GroEL-ring, lukkes polypeptidet inne i GroEL-hulrommet der det kan folde i 15-30 sekunder før ATP-hydrolyseres i *cis*-ringen (trinn 4-5). Energien fra de syv ATP-molekylene som hydrolyses i *cis*-ringen blir sannsynligvis overført til polypeptidet og brukt til å overvinne energibarrierene for å kunne folde korrekt. GroEL-GroES-komplekset er meget stabilt i nærvær av ATP og kan ikke dissosiere før ATP-molekylene som er bundet i *cis*-ringen har blitt hydrolysert. Hydrolyse svekker interaksjonene mellom GroES-subenhetene og apikal domene i GroEL-subenhetene i *cis*-ringen. Hydrolysen av de syv ATP-molekylene i *cis*-ringen induserer dessuten konformasjonsforandringer i GroEL slik at affiniteten for ATP i *trans*-ringen (trinn 5-6) øker. Påfølgende hydrolyse av ATP-molekylene i *trans*-ringen driver frigjøringen av GroES og polypeptidet (trinn 6-7).

Native proteiner forlater hulrommet raskt ved diffusjon når rommet åpnes, mens nye polypeptider kan gå inn. Polypeptider som ikke er foldet ferdig kan gå enda en runde i foldingssyklusen (trinn 7-3). De fleste GroEL-polypeptidene krever sannsynligvis mer enn en reaksjonssyklus for å oppnå fullstendig nativ konformasjon (Martin *et al.*, 1991). Effektiviteten av foldingen er avhengig av hvert spesifikke polypeptid.

GroEL-GroES-systemet har en "innebygget" mekanisme som gjør at permanent ødelagte proteiner, som ikke kan oppnå en stabil konformasjon, kan forlate chaperoninet for å bli behandlet videre av cellens degraderende maskineri. Forsøk med denaturerte celleekstrakter har vist at omtrent 40 % av proteinene i *E. coli* har evnen til å reagere med GroEL (Viitanen *et al.*, 1992), men det er usannsynlig at dette skjer *in vivo*, da den cellulære konsentrasjonen av GroEL er for lav (Lorimer, 1996). I *E. coli* er det antatt at 5-10 % av de nysyntetiserte proteinene benytter seg av GroEL-GroES-systemet (Ellis og Hartl, 1996).

Små proteiner trenger GroEL-assistans i mindre grad enn store på grunn av raskere foldingskinetikk og lavere affinitet for chaperoninet. GroEL/GroES-systemet øker hastigheten av individuelle trinn i proteinfoldingsveien og systemet har også en utfoldingsaktivitet, slik at proteiner som har foldet feil kan bli foldet ut for deretter å folde riktig. Selv om mange proteiner ikke trenger dette systemet for å folde riktig, skjer foldingen mye raskere på denne måten. Bindingsstedet for polypeptider på GroEL har høy plastisitet og kan gå igjennom subtile strukturelle forandringer som dermed sørger for en optimal bindingsoverflate for individuelle polypeptider. Dette forklarer hvorfor GroEL har evnen til å binde en rekke polypeptider.

Den foldingsmekanismen som er beskrevet til nå kalles for *cis* fordi polypeptidet bindes til *cis*-GroEL-ringen. Hydrolyse av ATP frigjør så polypeptidet inne i *cis*- hulrommet der det kan folde fritt. Det har vist seg at store proteiner, som for eksempel akonitase (82 kDa), som på grunn av størrelsen ikke lar seg innkapsle av GroES i det sentrale GroEL-hulrommet, fortsatt er avhengig av både GroEL og GroES *in vivo* og *in vitro* for å kunne folde riktig (Chaudhuri *et al.*, 2001). Foldingsmekanismen som benyttes i dette tilfellet kalles for *trans*. Foldingen skjer i et antatt *trans*-kompleks der GroES er kovalent bundet til en av de to GroEL-ringene på en slik måte at polypeptidet er sterisk hindret fra å gå inn i den bundede *cis*-ringen, og kan dermed bare binde til *trans*-ringen. Antakeligvis bindes bare en liten del av polypeptidet i det sentrale hulrommet av *trans*-ringen, mens resten må ligge utenfor. Binding av ATP til GroES gjør at polypeptidet frigjøres fra *trans*-ringen (Chaudhuri *et al.*, 2001) og foldingen skjer så ute i cytosolen. Slik som med *cis*-mekanismen kreves det også i *trans*-mekanismen flere runder med binding og frigjøring før proteinene er fullstendig foldet. *Trans*-mekanismen fungerer ikke bare for polypeptider som er for store til å bli foldet i *cis*, men også for mindre GroEL-GroES-avhengige polypeptider med asymmetrisk geometri, og som av den grunn heller ikke kan bli innkapslet i *cis*-hulrommet.

Flere *in vitro* studier har vist at GroEL kan hjelpe til med foldingen av noen polypeptider uten hjelp av GroES (Badcoe *et al.*, 1991; Viitanen *et al.*, 1991; Mizobata *et al.*, 1992; Kubo *et al.*, 1993; Coyle *et al.*, 1999; Melkani *et al.*, 2002).

### 1. 2. 2 Regulering av chaperoninekspresjonen

Varmesjokk-responsen er et fenomen som er funnet i alle levende celler. Den karakteriseres ved at syntesen av mange proteiner induseres som en respons på temperaturforandringer. Gruppen proteiner som er involvert i varmesjokk-responsen kalles varmesjokk-proteiner og inkluderer en del chaperoner, proteaser og regulatoriske faktorer.

I *E. coli* er ekspressjonen av mange varmesjokk-gener under kontroll av den alternative sigmafaktoren  $\sigma^{32}$ , også kalt RpoH (Yura *et al.*, 1993). Varmeinduksjon av  $\sigma^{32}$  skjer på det post-transkripsjonelle nivået; under normale forhold er nivået av *rpoH*-transkriptet høyt, men translasjonen er dårlig fordi en utvidet sekundær struktur i *rpoH*-transkriptet blokkerer translasjonen (Morita *et al.*, 1999). Varmesjokk gjør at denne strukturen smelter slik at ribosomene får tilgang og translasjonen kan dermed starte. Under normale vekstforhold i *E. coli* er  $\sigma^{32}$  et svært ustabil protein, med en halveringstid på 60 sekunder (Grossman *et al.*, 1987; Straus *et al.*, 1987). Etter et varmesjokk øker halveringstiden til 8 minutter (Straus, *et al.*, 1987; Tilly *et al.*, 1989). Flere proteaser er involvert i degraderingen av  $\sigma^{32}$  og under normale betingelser presenteres  $\sigma^{32}$  for proteaser av DnaK for nedbrytning. Under varmesjokk derimot, blir DnaK opptatt med å folde denaturerte proteiner og  $\sigma^{32}$  kan binde seg til RNA-polymerase. Transkripsjonen av varmesjokk-genene kan dermed initieres.

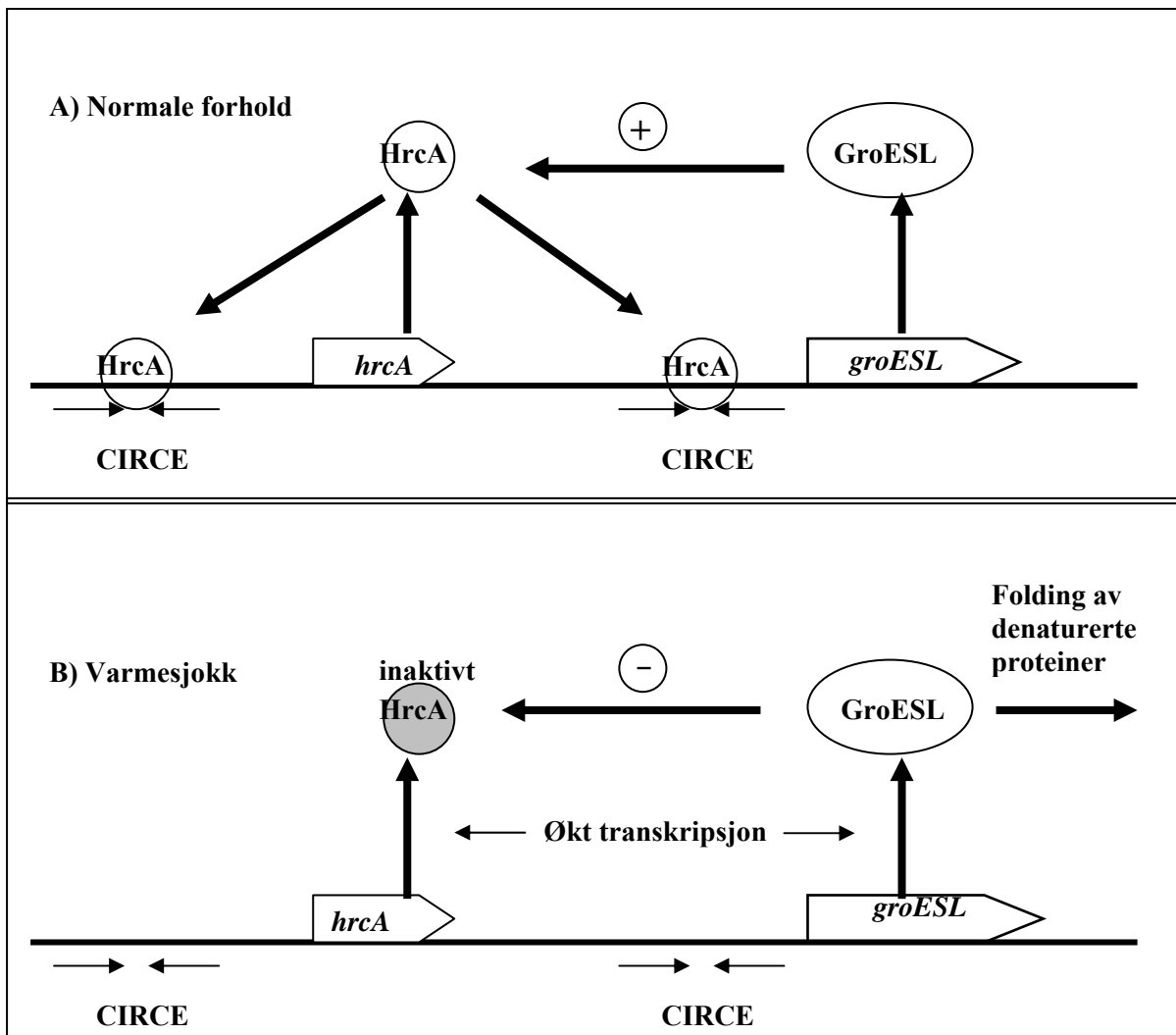
Opphoping av  $\sigma^{32}$  skjer bare i startfasen av varmesjokk-responsen. Ettersom chaperonene folder, refolder eller sender misfoldede proteiner til degradering, blir stadig flere chaperoner igjen tilgjengelige for  $\sigma^{32}$ , som i sin tur sendes til proteasene for nedbryting.

Reguleringsmekanismen som er beskrevet ovenfor er positiv; i cellen finnes det en alternativ sigmafaktor hvis funksjon er å få RNA-polymerase til å feste seg til varmesjokk-promoteren. Andre bakterier har en negativ reguleringsmekanisme som er repressoravhengig; ved varmesjokk initieres transkripsjonen av varmesjokk-genene fra klassiske husholdningspromotere, mens under forhold uten varmesjokk brukes *cis*-virkende DNA-elementer sammen med et repressorprotein for å begrense transkripsjonen. Det viser seg at negativ varmesjokkregulering er mer utbredt i bakterier enn positiv varmesjokkregulering med bruk av alternative sigmafaktorer.

Varmesjokkregulering ved bruk av CIRCE (Controling Inverted Repeat of Chaperone Expression) og HrcA (Heat regulation at CIRCE), henholdsvis et DNA-element og et repressorprotein, utgjør til nå den best forståtte repressormekanismen for varmeinduksjon av proteiner. CIRCE er en palindromisk DNA-sekvens som har blitt identifisert i mer enn 60 bakteriearter og som finnes i promoterregionene hos *dnaK*- og/eller *groEL*-genene eller *dnaJ/groES*-genene. Elementet har konsensussekvensen TTAGCACTC-N9-GAGTGCTAA. CIRCE ligger ofte ved promotersekvensen på en slik måte at promoteren blokkeres når HrcA er bundet til CIRCE. Følgelig kan ikke RNA-polymerasen feste seg til promoteren og starte transkripsjonen.

For å forklare virkemekanismen for GroEL og HrcA i *Bacillus subtilis* er det blitt laget en titermodell analog med DnaK og  $\sigma^{32}$  i *E. coli* (Mogk *et al.*, 1997). I *B. subtilis* er *hrcA*-genet en del av *dnaK*-operonet som har et CIRCE-element oppstrøms for seg. Dette operonet er dermed selvregulerende. Operonet *groESL* har også et CIRCE-element oppstrøms for seg og nøkkelchaperonet er i titermodellen GroEL og går ut på at HrcA, som har en tendens til å aggregere, ivaretas i en aktiv konformasjon av GroEL. I situasjoner med stress dannes ikke-native proteiner i cellen og GroEL blir engasjert i å folde disse proteinene og blir ikke lenger tilgjengelig til å aktivere HrcA, som dermed ikke kan fungere som en repressor. Denne situasjonen fører til at HrcA-repressjonen opphører og genene for chaperoner kan transkriberes. Når varmesjokket er over, blir GroEL igjen fri til å aktivere HrcA som i sin tur kan inhibere transkripsjonen av genene i de CIRCE-regulerte operonene. Denne repressjonen skjer raskt, da det vil være mye HrcA tilstede fordi *hrcA*-genet ble transkribert under stresssituasjonen. En skjematisk oversikt over negativ regulering med CIRCE, GroEL og HrcA er vist i figur 1.4.





**Figur 1.4: Skjematisk oversikt over negativ regulering med CIRCE og HrcA.** A) viser forholdene i cellen ved normale forhold. GroESL aktiverer (+) HrcA som binder seg til CIRCE-elementetene og fungerer som en repressor på transkripsjonen. B) viser forholdene i cellen ved varmesjokk. GroESL blir opptatt med å folde denaturerte proteiner og blir ikke tilgjengelig til å aktivere HrcA (-). Repressjonen med HrcA opphører og genene nedstrøms for CIRCE-elementene kan transkribes.

Det er funnet direkte bevis for rollen til CIRCE som et negativt *cis*-element (Van Asseldonk *et al.*, 1993; Zuber og Schumann, 1994; Babst *et al.*, 1996), men forsøk viser at CIRCE også har andre roller enn å være et negativt *cis*-element. Det er kjent at tilstedeværelsen av et CIRCE-element nær Shine-Dalgarno sekvensen ved 5' enden til *groESL*-mRNA destabiliserer mRNA og forkorter dermed halveringstiden. Det har vært foreslått at dette er en sekundær mekanisme som sørger for at det er passende nivåer varmesjokk-proteiner til enhver tid (Homuth *et al.*, 1999). Den røde bakterien *Rhodobacter capsulatus* har et *groESL*-operon med et oppstrøms CIRCE-element. I denne organismen er det vist at CIRCE-elementet ikke er nødvendig oppstrøms for *groESL*-operonet for å regulere transkripsjonen. HrcA repressormekanismen finnes ikke her, da organismen ikke har noe HrcA protein. Derimot danner CIRCE-elementet en sekundærstruktur i RNA, som har en stabiliserende effekt på hele *groESL*-mRNA, særlig under normale vekstforhold (Jäger *et al.*, 2004). Hos *Chlamydia trachomatis* er det vist at repressjon med HrcA ser ut til å være avhengig av den topologiske tilstanden

til promoteren, da repressjon på et supervridd promotertemplat viste seg å være større enn på et utstruktet templat (Wilson og Tan, 2002). CIRCE-elementene er konserverte i stor grad hos bakterier, mens sekvenslikheten av utledete HrcA-proteiner derimot er overraskende lav. HrcA fra *Streptomyces* har for eksempel bare 26 % likhet med HrcA fra *Bacillus subtilis*. Siden HrcA er så lite konservert blant bakterier kan det bety at HrcA-reguleringen er spesifikk for den enkelte bakteriearten.

Enkelte bakterier bruker flere strategier samtidig for å kontrollere ekspresjonen av forskjellige sett med varmesjokk-gener. Et uvanlig komplekst nettverk av både positive og negative kontrollmekanismer kontrollerer transkripsjonen av varmesjokk-gener i den nitrogenfikserende bakterien *Bradyrhizobium japonicum*. Denne organismen inneholder fem meget like *groESL*-operoner der to av operonene er under kontroll av CIRCE og ett er under kontroll av  $\sigma^{32}$  (Babst *et al.*, 1996). Et av *groESL*-operonene er regulert sammen med symbiotiske nitrogenfikserende gener som aktiveres av det regulatoriske proteinet NifA ved lave oksygen forhold (Fischer *et al.*, 1993). Bakterien *B. japonicum* har også tre ulikt regulerte *rpoH*-gener (Narberhaus *et al.*, 1997) der produktene har ulik promoterspesifisitet. I *Synechocystis* sp. PCC 6803 antas det at *groESL*-operonet både er negativt regulert av HrcA og positivt regulert ved en ukjent mekanisme (Nakamoto *et al.*, 2003).

Den grønne glidende bakterien *Chloroflexus aurantiacus* har to *groESL*-operoner, der bare et av operonene inneholder CIRCE-elementet (Vanberg, 2001, hovedoppgave UiO). Det er sannsynlig at de to operonene er under ulike regulering.

### 1. 2. 3 Chaperoninenes ulike roller i cellen

Hos *E. coli* og flere andre bakterier er *groESL*-operonene ordnet i rekkefølgen promoter-*groES*-*groEL* (Segal og Ron, 1996) og mange bakterier har flere kopier av *groESL*-operonene eller *groEL*-genene. Disse bakteriene er blant annet: *Synechocystis* sp. (Lehel *et al.*, 1993), *Synechococcus vulcanus* (Furuki *et al.*, 1996), *Rhizobium meliloti* (Rusangawa og Gupta, 1993), *Anabena* sp. (Rajaram *et al.*, 2001), *Rhodobacter sphaeroides* (Lee *et al.*, 1997), *Bradyrhizobium japonicum* (Fischer *et al.*, 1993), *Sinorhizobium meliloti* (Capela *et al.*, 2001), *Streptomyces lividans* (De Leon *et al.*, 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Kong *et al.*, 1993), *Mycobacterium leprae* (Rinkede de Wit *et al.*, 1992), og *Chloroflexus aurantiacus* (Vanberg, 2001, hovedoppgave UiO). Det finnes bare ett kjent tilfelle der *groES* finnes uten *groEL*, og det er hos *Mycobacterium bovis* (Segal og Ron, 1996).

At flere *groESL*-operoner eller *groEL*-gener er tilstede kan ha betydning ved at de gir bakteriene fleksibilitet ved varierende miljøbetingelser, men dette er foreløpig bare spekulasjoner og den fysiologiske rollen til de uttrykte chaperoninene er ikke alltid kjent. I mange tilfeller er det dessuten uvisst hvilke faktorer som fører til chaperoninekspresjon. Bakterien *Chlamydiae trachomatis* for eksempel, inneholder tre *groEL*-gener, men bare økt ekspresjon av *groEL<sub>1</sub>* er observert under varmesjokk, og det er uvisst hvilke forhold som fører til økt transkripsjon av de to andre *groEL*-genene (Karunakaran *et al.*, 2003).

GroEL er et av de mest konserverte proteinene vi kjenner til (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1992; Gupta, 1995) og chaperoninene har uten tvil mange viktige roller i cellen. Fayet *et al.*, (1989) har vist at GroEL og GroES er essensielle for vekst ved alle temperaturer. I *E. coli* har det blitt vist at GroEL kreves for de siste trinnene i biogenesen av den store ribosomenheten (El Hage *et al.*, 2001) og at GroEL fungerer som et RNA-chaperon som beskytter mRNA mot nukleaser (Georgellis *et al.*, 1995). GroEL deltar også i eksporten av enkelte proteiner, som for eksempel i translokasjonen av pre- $\beta$ -lactamase over cellemembranen i *E. coli* (Bochkareva *et al.*, 1988; Kusukawa *et al.*, 1989).

GroEL spiller trolig en direkte rolle i genregulering ved å hjelpe til med foldingen av transkripsjonsaktivatorer. Det er vist at GroEL kreves for aktiveringen av transkripsjonsaktivatorene NodD og NifA fra henholdsvis *Rhizobium meliloti* (Ogawa og Long 1995) og *Klebsiella pneumoniae* (Govezensky *et al.*, 1991). Det er også rapportert at chaperoniner deltar i biogenesen av proteiner med metall-klynger. Dannelsen av Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-klynger i apoadrenodoksin fra storfe økte *in vitro* ved tilsats av GroEL, ATP og/eller GroES (Iametti *et al.*, 2001). Hos den nitrogenfikserende bakterien *Azotobacter vinelandii* er det vist at dinitrogenase, MoFe-proteinet, krever GroEL for innsetting av jern-molybdenkofaktoren (Ribbe og Burgess 2001). Det er i dette tilfellet ikke kjent hvordan GroEL virker eller om GroES også deltar. Det er også vist at GroEL beskytter patogene bakterier i stressituasjoner som oppstår ved infeksjon og betennelse (Zugel og Kaufmann, 1999) og at GroEL fra patogene mikroorganismer fungerer som antigen (Kaufmann, 1990; Shinnick, 1991).

#### **1. 2. 4 Ulike stressfaktorer induserer ekspresjon av chaperoner som GroEL, GroES og DnaK**

Mikroorganismer i naturen utsettes hele tiden for ulike typer stress. Når slike organismer utsettes for fysiske, kjemiske eller biologiske stressfaktorer induseres ekspresjonen av et sett proteiner som vi kaller stressjokk-proteiner (SSP). Faktorene som induserer syntesen av SSP kan være temperatur, UV-lys, tungmetaller, hemmende eller toksiske organiske kjemikalier, toksiske oksygenderivater, pH, osmotiske forandringer, virusinfeksjoner eller lite næring. Den mest undersøkte og best karakteriserte stress-responsen i bakterier er varmesjokk-responsen. Ved temperaturøkninger uttrykkes GroEL og GroES i økt grad, men også under andre former for stress. Det er dermed riktige å kalle chaperoninene for stressjokk-proteiner enn varmesjokk-proteiner.

"Acid tolerance response" (ATR) er en induserbar mekanisme der bakterier tilegner seg evnen til å overleve høye, dødelige syrekonsentrasjoner dersom de på forhånd har blitt utsatt for milde syreforhold (Foster og Hall., 1990). Denne mekanismen beskytter også mot andre stressfaktorer som for eksempel UV-stråling og oksidativt stress (Quivey *et al.*, 1995). Hos *Lactococcus lactis* ble blant annet GroEL, GroES og DnaK identifisert som en del av ATR, fordi ekspresjonen av disse proteinene økte når *L. lactis* ble dyrket ved pH 4.5 istedenfor ved pH 6.8. (Frees *et al.*, 2003). Det er antatt at lav pH øker denatureringen av proteiner og at dette i sin tur induserer ekspresjon av tradisjonelle varmesjokk-proteiner. Andre bakterier som også har fått induert chaperonekspresjon av syresjokk er

blant annet *Lactobacillus acidophilus* (Lorca *et al.*, 2002), *E. coli* (Heyde og Portalier., 1990) og *Brucella abortus* (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996).

*Synechocystis* sp. PCC 6803 inneholder et *groESL*-operon og et *groEL*-gen, begge med et CIRCE-element framfor seg. Asadulghani *et al.*, (2003) viste at når *Synechocystis* sp. PCC 6803 ble utsatt for varmesjokk både i lys og mørke, ble både *groESL* og *groEL* transkribert i større grad i lys enn i mørke. Lys fungerte ikke som en av/på bryter av *groESL*-genene, da genene som ble undersøkt også ble transkribert ved varmesjokk i mørke. Lys hadde heller ingen effekt på stabiliteten av *groESL*-mRNA. Lyset økte trolig transkripsjonsaktiviteten slik at varmesjokk-responsen ble raskere og mer intens.

Økt ekspresjon av GroEL, GroES og DnaK ble observert etter at *Francisella tularensis* var blitt eksponert for hydrogenperoksid (Ericsson *et al.*, 1994). Som respons på hydrogenperoksid og etanol uttrykte *Mycobacterium smegmatis* GroEL og DnaK i større grad (Lundrigan *et al.*, 1997). Hos *L. lactis* ble GroEL, GroES og DnaK-ekspresjon induert av saltstress (Kilstrup *et al.*, 1997) og hos *Enterococcus faecalis* ble ekspresjon av GroEL og DnaK induert ved alkalisk stress (Flahaut *et al.*, 1997). Hos *Clostridium difficile* ble GroEL-ekspresjon induert ved syresjokk, saltsjokk, under jernfattige forhold og ved tilsats av ampicillin (Hennequin *et al.*, 2001). I *E. coli* indueres GroEL og DnaK også av fluoroquinoler (Mizushima *et al.*, 1997).

## 1. 3 *Chloroflexus aurantiacus*, en moderat termofil grønn glidende bakterie

### 1. 3. 1 Fototrofe bakterier

De fototrofe bakteriene er en mangfoldig samling av organismer som har den felles egenskapen at de kan bruke lys som energikilde for vekst. Tilstedeværelsen av klorofyll, reaksjonssentere og lyshøstingsproteinkomplekser skiller fototrofer fra ikke-fototrofer.

Klassifiseringen av de fototrofe bakteriene baserer seg på fysiologiske forskjeller som for eksempel hvilke pigmenter og fotosystem som er tilstede, om det produseres O<sub>2</sub> og hva som benyttes som elektronkilde for biosyntese. De fotosyntetiske organismene er fordelt på fem fylogenetiske grupper innen *Bacteria*: cyanobakterier, proteobakterier (purpur bakterier), grønne svovelbakterier, grønne glidende bakterier og gram-positive bakterier (heliobakterier). Av disse er cyanobakteriene oksisk fototrofe mens resten er anoksisk fototrofe.

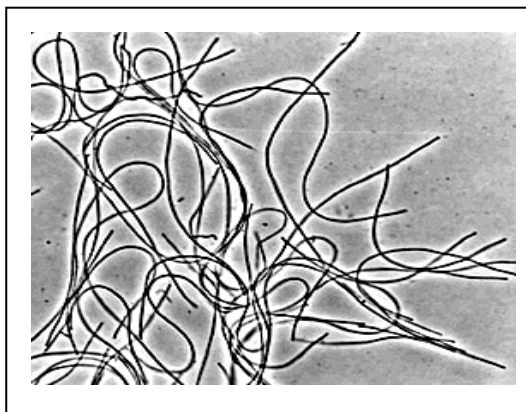
### 1. 3. 2 Termofile bakterier

Temperaturforandringer er antakeligvis den vanligste stressfaktoren som levende organismer utsettes for i naturen. Mikroorganismene kan klassifiseres inn i fire grupper etter deres optimale veksttemperaturer,  $T_{opt}$ .  $T_{opt}$  er for psychrofile ( $0 < T_{opt} < 20$  °C), mesofile ( $20 < T_{opt} < 50$  °C), termofile ( $50 < T_{opt} < 80$  °C) og hypertermofile ( $80 < T_{opt} < 120$  °C). Ved temperaturer over 65 °C overlever bare prokaryotiske organismer og ved temperaturer over 80 °C er det *Archaea* som dominerer (Fischer *et al.*, 1983).

I det fylogenetiske treet for *Bacteria* basert på 16S ribosomal sekvensanalyse (Woese *et al.*, 1990), befinner de hypertermofile bakteriene seg i de tre grenene nærmest roten: *Aquifex*, *Thermodesulfobacterium* og *Thermotoga*. De termofile bakteriene er spredt blant mange fylogenetiske grupper, men har særlig mange representanter hos grønne glidende bakterier.

Organismene med de høyeste kjente veksttemperaturene er medlemmer av domenet *Archaea*; innenfor slektene *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* og *Methanopyrus*. Arten *Pyrolobus fumarii* kan vokse ved 113 °C, som er den høyeste veksttemperaturen som hittil er blitt observert hos noen organisme (Blöchl *et al.*, 1997). Innen *Bacteria* vokser *Thermotoga maritima* og *Aquifex pyrophilus* ved de høyeste temeraturene på henholdsvis 90 °C og 95 °C (Herbert og Sharp, 1992). Faktorer som termostabiliteten til membraner, nukleinsyrer, proteiner og livsviktige forbindelser som ATP og NAD er svært viktige for å kunne overleve ved høye temperaturer.

### 1. 3. 3 *Chloroflexus aurantiacus*



Figur 1.5: *Chloroflexus aurantiacus* sett i fasekontrastmikroskop.

*C. aurantiacus* er en grønn, glidende og moderat termofil bakterie (figur 1.5) som danner flere millimeter tykke oransje til rødoransje matter i nøytrale til svakt alkaliske varme kilder. Bakterien ble isolert første gang i alkaliske kilder i Japan (Pierson og Castenholz, 1974) og har siden blitt isolert fra varme kilder over hele verden, som for eksempel i New Zealand, USA og på Island.

*C. aurantiacus* er næringsmessig svært allsidig og kan leve fotoheterotroft, kjemoheterotroft og fotoautotroft. Fototrof vekst er anoksisk. I varme, alkaliske kilder uten sulfid blir det dannet matter av mikroorganismer, hvor vi finner et overflatelag av cyanobakterien *Synechococcus*, mens *C. aurantiacus* vil vokse i det nedre anoksiske laget der lysintensiteten er lav. *C. aurantiacus* inneholder klorosomer. Klorosomer er separate strukturer som er festet på innsiden av cellemembranen og som fungerer som et gigantisk antennesystem og gjør bakteriene i stand til å utnytte svært svakt lys.

*C. aurantiacus* lever primært som fotoheterotrof og utnytter trolig de organiske produktene de autotrofe cyanobakteriene skiller ut (Bauld og Brock 1973). Dersom sulfid er til stede vil veksten av cyanobakterier bli hemmet over 57 °C (Castenholz og Pierson, 1995) og *C. aurantiacus* vil da leve fotoautotroft. Under slike forhold kan H<sub>2</sub>S (Madigan og Brock, 1975) eller H<sub>2</sub> (Holo og Sirevåg, 1986) benyttes som elektrondonor. Om natten beveger *C. aurantiacus* seg til det øverste laget der cyanobakteriene er, og legger seg på toppen (Doemel og Brock, 1974). På dette oksygenrike området kan de vokse kjemoheterotroft i mørket ved aerob respirasjon.

*C. aurantiacus* fikserer CO<sub>2</sub> gjennom 3-hydroksypropionat syklusen (Holo og Grace, 1987; Holo, 1989; Strauss og Fuchs, 1993; Eisenreich *et al.*, 1993). Her reduseres to molekyler CO<sub>2</sub> til glyoksylat, som så omsettes videre. Mekanismen for glyoksylat omsetting er foreløpig ukjent. 3-Hydroksypropionat syklusen er unik for *Chloroflexus*, selv om en liknende reaksjonsvei er funnet i autotrofe medlemmer av *Archaea* i slekten *Sulfolobaceae* (Herter *et al.*, 2002).

Nedbrytning av organiske forbindelser foregår ved hjelp av reaksjonene i TCA syklusen og den benyttes både under aerobe og anaerobe forhold (Sirevåg og Castenholz, 1979). Når acetat er eneste karbonkilde, blir glyoksylyatsyklusen brukt (Løken og Sirevåg, 1982).

Filamentene til *C. aurantiacus* er uforgrenete og uten flageller. De er 0.5-1.0 µm brede og er 30 til 300 µm lange. *C. aurantiacus* kan vokse i overraskende høye nivåer av UV-stråling (Pierson *et al.*, 1993) og har trolig en UV-beskyttende mekanisme. Grunnlaget for denne UV-beskyttende eller reparerende mekanismen er foreløpig ukjent. *C. aurantiacus* er funnet ved høyere temperaturer enn noen annen anoksisk fototrof. Hos holotypen, J-10, er veksten raskest når den dyrkes som fotoheterotrof ved 55 °C. Maksimumstemperaturen er ved 65 °C-70 °C og minimumstemperaturen er ved 30 °C-35 °C. Optimal pH for vekst ligger rundt 8.

*C. aurantiacus* var den første termofile anoksygene fototrofe bakterien som ble isolert og beskrevet (1974). Senere har flere *Chloroflexus*-liknende bakterier blitt identifisert, blant annet *Chloroflexus aggregans* (Hanada *et al.*, 1995), *Heliothrix oregonensis* (Pierson *et al.*, 1985) og *Oscillochloris trichoides* (Keppen *et al.*, 1994). Det har blitt observert organismer som ligner *Chloroflexus* i stromatolitter, der tilsvarende moderne matter inneholder flere *Chloroflexus* slektninger (Nübel *et al.*, 2001).

## 1. 4 Oksidativt stress i bakterier

Mikroorganismer kan deles inn i ulike grupper når det gjelder forholdet til oksygen:

**Aerobe.** Obligate aerobe: kan bare vokse ved atmosfæriske nivåer av O<sub>2</sub> (21 %).

Fakultative aerobe: krever ikke O<sub>2</sub>, men vokser best når O<sub>2</sub> er tilstede.

Mikroaerofile: kan bare vokse ved O<sub>2</sub>-nivåer lavere enn i luft.

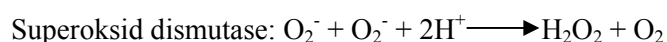
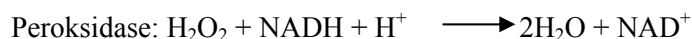
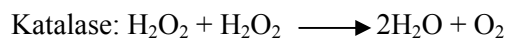
**Anaerobe.** Aerotolerante: vokser uavhengig om O<sub>2</sub> er tilstede eller ikke.

Obligate anaerobe: kan bare vokse ved fravær av O<sub>2</sub>.

Mange mikroorganismer har lav tålegrense for oksygen. Dette viser seg tydeligst hos obligat anaerobe og mikroaerofile organismer som ikke kan vokse i medier som er mettet med luft, men også aerobe organismer kan ha problemer med å vokse når O<sub>2</sub>-nivået blir høyere enn det er i luft.

Se review artikkelen fra Imlay (2003) for referanser til de neste avsnittene.

Fordi molekylært oksygen bare kan motta ett elektron av gangen fra potensielle donorer, og de fleste organiske molekyler er obligate to-elektron donorer, er ikke oksygen i stand til spontant å oksidere aminosyrer og nukleinsyrer. Derivater av oksygen derimot, er toksiske ved at de kan ødelegge molekyler som DNA, proteiner og lipider. Toksiske former for oksygen inkluderer superoksid anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen- peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og hydroksyl radikal (OH<sup>·</sup>). Derfor har mange organismer utviklet enzymsystemer som uskadeliggjør de toksiske oksygenderivatene. De vanligste enzymene er superoksid dismutase, katalase og peroksidase:



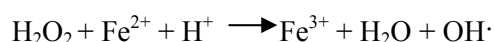
Det er særlig hos aerobe organismer at vi finner disse enzymene, men det finnes også obligat anaerobe organismer som har superoksid dismutase og/eller katalase. Det er derfor ikke nødvendigvis O<sub>2</sub><sup>-</sup> og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> som hindrer disse organismene i å vokse i luft.

Derivatene O<sub>2</sub><sup>-</sup> og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dannes i cellen ved uhell når molekylært oksygen oksiderer redoksenzymer. Redoksenzymene donerer bare ett elektron av gangen og finnes i respirasjonskjeden. Det er funnet ut fra *in vitro* systemer at O<sub>2</sub><sup>-</sup> og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dannes primært ved autoksideringen av dehydrogenaser (autoksidering er en reaksjon mellom en forbindelse og atmosfærisk O<sub>2</sub> slik at det dannes peroksid). Vanligvis bruker disse enzymene flavin-kofaktorer til å motta hydrid anioner (H<sup>-</sup>) fra organiske substrater. De reduserte flavinene overfører så et elektron av gangen til andre forbindelser som jern-svovel-klynger eller quinoner. Flavinenzymene overfører elektroner til enhver

god akseptor de kommer i nær nok kontakt med, og fordi molekylært oksygen er så lite kommer det lett i kontakt med flavinenzymene.

Selv om nesten all  $O_2^-$  straks omdannes til  $H_2O_2$  av superoxid dismutase, dersom dette enzymet finnes i organismen, kan  $O_2^-$  ødelegge jern-svovel-klynger i mange proteiner, for eksempel jern-svovel dehydrataser.  $H_2O_2$  kan oksidere protein cysteinyresidier, metioninresidier og jern-svovel-klynger.

Det eneste oksygenderivatet som kan oksidere de fleste biomolekyler direkte er  $OH\cdot$ . Dette hydroksyl radikalet reduseres da selv til  $H_2O$ . Hovedkilden til  $OH\cdot$  er ioniserende stråling, noe de fleste bakterier ikke utsettes for. Små mengder  $OH\cdot$  kan også dannes når  $Fe^{2+}$  overfører et elektron til  $H_2O_2$ , ved Fenton-reaksjonen:



Jernet som katalyserer Fenton-reaksjonen er "fritt jern", det vil si at det ikke er innsatt i enzymer men er festet til overflater av biomolekyler. Det "frie jernet" finnes oftest i redusert form ( $Fe^{2+}$ ) i cellen. Hydrogenperoksid akkumulerer vanligvis ikke i cellen, slik at det er lite  $OH\cdot$  som dannes. Nukleinsyrer binder jern-ioner godt og fordi  $OH\cdot$  er en ikke-selektiv og kraftig oksidant, diffunderer den ikke langt bort fra sitt opphavssted. DNA er derfor et lett bytte for  $OH\cdot$ -ødeleggelse.



## 2. MATERIALER

### 2. 1 Kjemikalier

#### 2. 1. 1 Uorganiske kjemikalier

Alle kjemikaliene som ble benyttet var av *pro-analysis* kvalitet.

<u>Forbindelse</u>	<u>Produsent</u>
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
Cu SO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	Merck
HCl, konsentrert	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NMD
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	NMD
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck
MnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck
NaCl	AnalaR
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (APS)	Bio-Rad
NaMoO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	J.T Baker
NaOH	Merck
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck

#### 2. 1. 2 Organiske kjemikalier

<u>Forbindelse</u>	<u>Produsent</u>
Agarose I "biotechnology grade"	Amresco
Ampicillin	Sigma
Akrylamid, "ready mix"	Saveen
Aquafenol	Appligene oncor
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bromfenolblått	Sigma
BSA	Difco
Casaminyrer	Difco
CAPS	Sigma
Coomassie Blue R-250	Applichem
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma
DTT	Sigma
Eddiksyre, konsentrert	Merck
Etanol, 96 %	Arcus produkter AS
Etidiumbromid	Merck
EDTA	Applichem

Fenol	Appligene oncor
Ficoll	Pharmacia
Glycin	Applichem
Glyserol	Merck
Gjærekstrakt	Oxoid
Imidazol	Sigma
IPTG	Calbiochem
Kloroform	Merck
Lauroyl sarkosin	Sigma
$\beta$ -merkaptoetanol	Roth
Metanol	Merck
Natrium acetat	Merck
Na <sub>3</sub> -citrat	Merck
Nitriloeddiksyre	Genzyme
N-Z-Amin	Sigma
Orange G	Merck
Sukrose	NMD
SDS	Merck
TEMED	Promega
Tricin	BDH
Tris-base	Angus
Triton-X	Bio-Rad
4-vinylpyridin	Sigma

## 2. 2 Oligonukleotid-primere

Tabell 2.1: Sekvenser til primere som ble benyttet

Primer	Sekvens	T <sub>m</sub> , °C
FPET10	5'-CAC-CAT-GGC-GGA-TTT-CCG-3'	58
RPET10	5'-GCT-ACT-TGC-GCG-ACG-TTG-TTA-3'	64
FPET60	5'-CAC-CAT-GCC-AAA-GCA-GCT-TTA-3'	62
RPET60	5'-CGC-TGG-AAC-CTT-AGA-AGT-CCA-TC-3'	70
ESP2	5'-CAC-CAT-GGC-GGA-TTT-CCG-CAT-CCG- <u>TCC-GCT</u> -TGG-CGA-CCG-TGT-GG-3'	81.6
RP10-V5his	5'-TCC-CTG-AAA-ATA-CAG-GTT-TTC-CTC-CTG-AAC-GAT-ACC-CAG-AAT-3'	71
RP60-6xhis	5'-TCA-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-ATG-GAA-GTC-CAT-CCC-GCC-ACC-GG-3'	>75
Eco1	5'-CAC-CAT-GAA-TAT-TCG-TCC-ATT-GCA-TGA-T-3'	62
Eco2	5'-AAG-AAA-AAC-CCC-CAG-ACA-TTT-CT-3'	57
Eco3	5'-TCA-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-ATG-CGC-TTC-AAC-AAT-TGC-CAG-AAT-GTC-3'	73
Sek.primær	5'- TGA-TCA-CCG-TTG-AAG-AGT-CG -3'	60
T7	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'	58
T7 reverse	5'-TAG-TTA-TTG-CTC-AGC-GGT-GG-3'	57.3

Eventuelle overheng/haler på primerene er skrevet med uthevet skrift. Substitusjonsmutasjonene i ESP2 er understreket. Primerene FPET10, RPET10, FPET60, RPET60 ble konstruert av stipendiat ved UiO, Marc B. Anglès d'Auriac og produsert av Eurogentec. Alle de andre primerene ble produsert av MWG. T<sub>m</sub> for primerene ble oppgitt av produsentene.

## 2.3 Enzymer

### 2.3.1 Polymeraser til PCR

<u>Enzym</u>	<u>Produsent</u>
DyNAzyme™ EXT DNA-polymerase	Finnzymes Oy
Vent polymerase	New England BioLabs

### 2.3.2 Andre enzymer

<u>Enzym</u>	<u>Produsent</u>
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
Restriksjonsenzymer	New England BioLabs
RNase A	Sigma

## 2.4 Bakteriestammer

*Chloroflexus aurantiacus* J-10

*Escherichia coli* stammer:

One Shot® TOP10

BL21 Star™ (DE3)

*E. coli* B

## 2.5 Dyrkingsmedier

### 2.5.1 Dyrkingsmedium for *Chloroflexus aurantiacus*

Rikt medium, 1 l:

Gjærekstrakt	1.0 g
Casaminosyrer	2.0 g
D-stock*	50 ml
1 M Tris-HCl, pH 8.0	10 ml

Destillert vann til 1 liter. pH ble justert til 8.2 med 1 M NaOH før autoklaving.

\*D-stock, 1 l:

Sporelementløsning**	20 ml
Nitriloeddiksyre	2.0 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2.0 g
NaCl	0.16 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.35 g

Destillert vann til 1 liter.

\*\*Sporelementløsning, 1 l:

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 ml
MnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1.14 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
NaMoO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.025 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0.025 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.045 g

Destillert vann til 1 liter.

**2. 5. 2 Dyrkingsmedier for *Escherichia coli***LB-medium, 1 l:

Trypton (Bacto)	10.0 g
Gjærekstrakt	5.0 g
NaCl	10.0 g

Destillert vann til 1 liter. pH ble justert til 7.5 med 1 M NaOH før autoklaving. For LB-medier som inneholdt antibiotika ble antibiotika tilsatt etter autoklaving.

LB agar:

LB-medium	
Agar (Bacto)	1.5 % (v/v)

Løsningen ble autoklavert, avkjølt til ca. 55 °C og deretter helt ut i sterile petriskåler. Skålene ble så avkjølt, satt opp-ned og lagret ved 4 °C i mørket. For LB-agar som inneholdt antibiotika ble antibiotika tilsatt etter autoklaving.

S.O.C.-medium:

Gjærekstrakt	0.5 %
Trypton (Bacto)	2.0 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
Glukose	20 mM

Trypton, gjærekstrakt, NaCl, og KCl ble satt til destillert vann. pH ble justert til 7.0 før autoklaving. Etter avkjøling ble sterilfiltrert glukose, MgCl<sub>2</sub> og MgSO<sub>4</sub> tilsatt.

NZCYM-medium, 100 ml:

NZ-amin	1.0 g
NaCl	0.5 g
Gjærekstrakt	0.5 g
Casaminosyrer	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.2 g

Destillert vann til 100 ml. pH ble justert til 7.5 med 1M NaOH før autoklaving. Antibiotika ble tilsatt etter autoklaving.

**2. 6 Buffere og løsninger****2. 6. 1 Løsninger for isolering av DNA**Løsning 1:

EDTA	20 mM
Sukrose	10 % (v/v)
Tris-HCl pH 8.0	50 mM

Løsning 2, 500 ml:

EDTA	93.0 g
Tris-base	0.605 g
NaOH pelleter	ca. 10-12 g (nok til å få pH over 8.0 og for å få løst opp EDTA)
n-Lauroyl Sarkosin	5.0 g

pH justeres til 9.5 med konsentert NaOH. Destillert vann ble tilsatt til et endelig volum på 500 ml. Løsningen ble sterilfiltrert før bruk.

20 X SSC:

NaCl	3.0 M
Na <sub>3</sub> -citrat	0.3 M

Autoklaveres.

1 X SSC, 100 ml:

20 x SSC	5 ml
----------	------

Destillert vann til 100 ml.

**2. 6. 2 Buffer for oppbevaring av DNA**TE-buffer:

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

**2. 6. 3 20 mM Kalium-fosfatbuffer pH 7.5**

1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30 ml
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml

Destillert vann til 2 liter. pH justeres med 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> og 20 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> før autoklaving.

**2. 6. 4 Buffere til vekstmedium for *C. aurantiacus***1M Tris-HCl pH 8.0 og 9.0:

Tris-base	12.1 g
DH <sub>2</sub> O	50 ml

pH justeres til 8.0 eller 9.0 med konsentrert HCl. Løsningen avkjøles til romtemperatur før pH måles.

Destillert vann til 100 ml tilsettes.

1 M kalium-fosfatbuffere, 10 ml:

Stamløsninger:

A: 1 M KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>

B: 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH	A	B
6.0	8.77 ml	1.23 ml
6.5	6.85 ml	3.15 ml
7.0	3.90 ml	6.10 ml
7.5	1.60 ml	8.40 ml

1M Acetatbuffer, pH 5.0, 5 ml:

Stamløsninger:

1 M Eddiksyre	1.48 ml
1 M Natrium acetat	3.52 ml

**2. 6. 5 Buffere og løsninger for agarosegel og elektroforese**50 x TAE, 1 l:

Tris-base	242 g
Konsentrert eddiksyre	57.1 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml
Destillert vann til 1 liter.	

Appliseringsbuffer (O-mix):

Ficoll	20 %
Orange G	0.25 %
EDTA	20 mM

Etidiumbromid:

Ferdiglaget løsning fra Merck ble brukt (10 mg/ml).

**2. 6. 6 Buffere og løsninger for SDS-PAGE**2M Tris-HCl (pH 8.8), 100 ml:

Tris-base	24.2 g
DH <sub>2</sub> O	50 ml

pH justeres til 8.8 med konsentrert HCl (ca. 4ml). Løsningen avkjøles til romtemperatur før pH måles.

Destillert vann til 100 ml tilsettes.

1M Tris-HCl (pH 6.8), 100 ml:

Tris-base	12.1 g
-----------	--------

DH<sub>2</sub>O 50 ml

pH justeres til 6.8 med konsentrert HCl (ca. 8 ml). Løsningen avkjøles til romtemperatur før pH måles. Destillert vann til 100 ml tilsettes.

Løsning A, akrylamid stamløsning:

40 % "ready mix" fra Saveen ble benyttet.

Løsning B, 4x separeringsbuffer, 100 ml:

2M Tris-HCl (pH 8.8) 75 ml

10 % SDS 4 ml

DH<sub>2</sub>O 21 ml

Kan lagres i kjøleskap i flere måneder.

Løsning C, 4x stacking-gelbuffer, 100 ml:

1 M Tris-HCl (pH 6.8) 50 ml

10 % SDS 4 ml

DH<sub>2</sub>O 46 ml

Kan lagres i kjøleskap i flere måneder.

Elektroforesebuffer, 1 l:

Tris-base 3.0 g

Glycin 14.4 g

SDS 1.0 g

Destillert vann til 1 liter. Lagres ved romtemperatur.

5x prøvebuffer, 10 ml:

1M Tris-HCl (pH 6.8) 0.6 ml

50 % Glyserol 5.0 ml

10 % SDS 2.0 ml

β-merkaptoetanol 0.5 ml

1 % Bromfenolblått 1.0 ml

DH<sub>2</sub>O 0.9 ml

Kan lagres i flere uker i kjøleskap eller i flere måneder i fryser.



Coomassie gelfarge, 1 l:

Coomassie Blue R-250	1 g
Metanol	450 ml
DH <sub>2</sub> O	450 ml
Konsentrert eddiksyre	100 ml

Coomassie gelavfarge, 1 l:

Metanol	100 ml
DH <sub>2</sub> O	800 ml
Konsentrert eddiksyre	100 ml

**2. 6. 7 Buffere og løsninger for tricin-SDS-PAGE**Gelbuffer, 250 ml:

Tris-base	90.8 g
SDS	0.75 g

Tris-base og SDS løses i 150 ml destillert vann. pH justeres til 8.45 med konsentrert HCl og destillert vann tilsettes til 250 ml. Løsningen kan oppbevares ved 4 °C opp til flere måneder.

1 x Anodebuffer (nedre kammer), 500 ml:

Tris-base	12.11 g
-----------	---------

Tris-base løses i 200 ml destillert vann. pH justeres til 8.9 med 1 M HCl. Destillert vann tilsettes så til et volum på 500 ml. Lagres ved 4 °C.

1 x Katodebuffer (øvre kammer), 500 ml:

Tris-base	6.055 g
Tricin	8.96 g
SDS	0.5 g

Destillert vann til 500 ml tilsettes Det er ikke nødvendig å justere pH som skal ligge på 8.25. Lagres ved 4 °C.

## 2. 6. 8 Buffere og løsninger for elektroblotting

### Prøvebuffer, 5 x stamløsning:

Sukrose	0.5 M
SDS	15 %
Tris-base	312.5 mM
EDTA	10 mM

pH justeres til 6.9 med 1M HCl. Lagres i kjøleskap. Før bruk tilsettes 100 µl β-merkaptoetanol og 100 µl bromfenolblått (1 %) til 2 ml av 5 x stamløsningen.

### 10 x CAPS, 1 l:

CAPS	22.13 g
Destillert vann	900 ml

pH justeres til 11.0 med 2 M NaOH (ca. 20 ml) og destillert vann til 1000 ml tilsettes. Lagres ved 4 °C.

### Blottebuffer, 2 l:

10 x CAPS	200 ml
Metanol	200 ml
Destillert vann	1600 ml

Lagres ved 4 °C.

### PVDF-membranfarge:

Coomassie Blue R-250	0.025 %
Metanol	40 %

### PVDF-avfargingsløsning:

Metanol	50 %
---------	------

## 2. 7 Membraner

### Membran

Sequi-Blot™ PVDF membrane

### Produsent

Bio-Rad

## 2. 8 Standarder

### Standard

Gene Ruler™100bp DNA ladder Plus  
 Gene Ruler™100bp DNA ladder  
 Lambda DNA-*Bst*E II Digest  
 Lambda DNA-*Hind* III Digest  
 Precision Plus Protein™ Standards Unstained

### Produsent

MBI Fermentas  
 MBI Fermentas  
 New England BioLabs  
 New England BioLabs  
 Bio-Rad

## 2. 9 Ferdigkjøpte "kits"

### Kit

pET 101 Directional TOPO® Expression Kit  
 Champion™ pET 102 Directional TOPO® Expression Kit  
 S.N.A.P.™ Gel Purification Kit  
 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit  
 Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System Kit

### Produsent

Invitrogen  
 Invitrogen  
 Invitrogen  
 Promega  
 Promega

## 2. 10 Utstyr

Standard laboratorieutstyr ble brukt

PCR-maskin: Techne Unit Genius Thermocycler (Techne).

## 3. METODER

### 3.1 Sterilteknikk

Standard sterilteknikk for alt mikrobiologisk og molekylærbiologisk arbeid på laboratoriet ble benyttet. Alle løsninger og utstyr ble sterilisert ved autoklaving før bruk. Løsninger som ikke kunne autoklaveres ble sterilfiltrert.

### 3.2 Dyrking av celler

#### 3.2.1 Dyrking, høsting og karakterisering av *C. aurantiacus*

Stamkulturer av *C. aurantiacus* J-10 ble dyrket i 60 ml glassflasker med skrukork i rikt medium (punkt 2.5.1). Flaskene var fylt helt opp for å få anaerobe forhold og kulturene ble inkubert i varmeskap ved 55 °C, omtrent 20 cm. fra to lyspærer på 25-40 W. Hver tredje uke ble rundt 10 % av innholdet i flaskene overført til nytt medium.

##### 3.2.1.1 Dyrking og høsting av *C. aurantiacus* for DNA-isolering

Celler av *C. aurantiacus* som ble brukt til DNA-isolering ble dyrket i 500 ml glassflasker med skrukork ved 55 °C i varmeskap. Som lyskilde ble det benyttet to lyspærer på henholdsvis. 25 og 40 W. Flaskene ble varmet opp til 55 °C før inokulering og inokulum var rundt 10 %.

Cellene ble høstet når OD<sub>600</sub> var på rundt 1.0. Cellene ble høstet ved sentrifugering (15 min/6000 rpm/4 °C) og vasket tre ganger med 20 mM kalium-fosfatbuffer pH 7.5 (punkt 2.6.3). Pelletene ble oppbevart i fryser ved -20 °C.

##### 3.2.1.2 Dyrking av *C. aurantiacus* under ulike stressforhold

I alle dyrkingsforsøkene ble *C. aurantiacus* dyrket i rikt medium på vannbad ved 55 °C og med unntak av forsøk b nedenfor ble cellene dyrket i runde 300 ml flasker der lyskilden var en 60 W lyspære omkring 30 cm. fra vannbadet. I forsøkene a, d, e og f nedenfor ble celler av *C. aurantiacus* dyrket til OD<sub>600</sub> var omkring 1.0 før de ble utsatt for ulike stressfaktorer.

Cellene ble høstet ved sentrifugering (15 min/6000 rpm/4 °C) og vasket to ganger med 20 mM kalium-fosfatbuffer pH 7.5. Cellene ble oppbevart ved -20 °C i 20 mM kalium-fosfatbuffer pH 7.5 med 1 mM DTT i forholdet 1 gram celler våtvekt per 1 ml buffer. Det ble alltid dyrket kontroller, dvs. celler som ble dyrket på nøyaktig samme måte bortsett fra at de ikke ble utsatt for stressfaktoren.

a) Saltstress: Cellekulturene ble tilsatt 30 % (v/v) NaCl til sluttprosenten på 2.5, 5.0, 7.5 og 10.0. Etter 5 timer ble cellene høstet.

b) Lysstress: Cellene ble dyrket i 100 ml flasker som var flate slik at så mange celler som mulig skulle bli utsatt for lys. Når OD<sub>600</sub> var omtrent 0.6, ble cellene utsatt for sterk, svak eller middels lysstyrke. Celler som ble dyrket ved sterkt lys ble utsatt for fire 60 W glødepærer og fire 18 W fluorescente pærer (sparepærer), som var satt så tett inntil vannbadet som mulig. Celler som ble dyrket ved middels lysstyrke ble utsatt for en 60 W glødepære omtrent 30 cm. fra vannbadet, mens celler som ble dyrket ved svakt lys sto bak en svart plate slik at minimalt med lys slapp til. Cellene ble høstet da OD<sub>600</sub> var rundt 1.0.

c) pH-stress: Cellene ble dyrket i vanlig rikt medium bortsett fra at det ble tilsatt ulike buffere (punkt 2.6.4) istedenfor 1 M Tris-HCl pH 8.0 før inokulering, for å gi vekstmediet ulike pH-verdier. De ulike pH-verdiene i mediene var: 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.2 (kontroll), 9.0, 10.0 og 11.0. For å få pH-verdiene 9.0-11.0 i mediene ble det tilsatt 1M Tris-HCl pH 9.0 før pH ble justert til ønsket verdi med 1 M NaOH. Til mediet med pH 5.0 ble det tilsatt 1 M acetatbuffer pH 5.0 til en sluttkonsentrasjon på 40 mM. Til mediene med pH-verdiene på 6.0-7.5 ble det tilsatt 1 M kaliumfosfatbuffer med pH-verdier på 6.0, 6.5, 7.0 og 7.5 til sluttkonsentrasjoner på 20 mM. For å kontrollere at pH-verdiene holdt seg konstant under forsøket, ble pH i cellekulturene målt med jevne mellomrom.

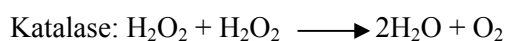
d) Etanolstress: Cellekulturene ble tilsatt 25 M etanol til sluttkonsentrasjoner på 1.5 M og 2.5 M. Etter 5 timer ble cellene høstet.

e) Oksidativt stress: Halvfulle 300 ml flasker fylt med medium ble inokulert og det resterende tomrommet i flaskene ble fylt med N<sub>2</sub>-gass for å få anaerobe forhold. Når OD<sub>600</sub> var omkring 1.0 ble N<sub>2</sub>-gassen erstattet med luft. Etter 3, 5 og 6 dager ble cellene høstet. I kontrollflaskene ble N<sub>2</sub>-gassen beholdt under hele forsøket.

f) Hydrogenperoksid-stress: Cellekulturene ble tilsatt 500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til sluttkonsentrasjoner på 2.5, 5.0, 10.0 og 20.0 mM. Cellene ble høstet etter 4 timer. I tillegg ble cellekulturer med tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til en sluttkonsentrasjon på 20 mM høstet etter 5 og 30 minutter og 1, 2 og 5 timer.

### 3. 2. 1. 3 Karakterisering av *C. aurantiacus*: Katalasetest

Prinsipp: Katalase er et enzym som spalter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et toksisk oksygenderivat som dannes når O<sub>2</sub> oksiderer redokszymer (beskrevet i punkt 1.4) på følgende måte:



Prosedyre: Prøver ble tilsatt 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og undersøkt under lupe for å påvise eventuell O<sub>2</sub> gass i form av bobler.

### 3. 2. 2 Dyrking av *Escherichia coli*

Overnattkulturer av *E. coli* ble laget ved å plukke en enkelt koloni fra en petriskål med en steril tannpirker som så ble overført til LB-medium (punkt 2.5.2). Volumet av kolbene/rørene som ble brukt til overnattkulturene var alltid 5x så stort som volumet av mediet. Det ble for eksempel brukt 50 ml rør til 10 ml LB-medium. For å sikre tilstrekkelig tilgang på oksygen ble det stukket små hull i lokket på kolbene/rørene med en sprøytespiss. Kulturene ble inkubert på ristemaskin (12-18 timer/200 rpm/37 °C). Plasmidbærende celler ble dyrket i medium med ampicillin (50-100 µg/ml avhengig av forsøket).

For oppbevaring av stamceller ble 850 µl av en overnattkultur blandet med 150 µl steril glyserol og overført til et eppendorfrør, som ble lagret ved -80 °C.

## 3. 3 Generelle metoder for arbeid med DNA

### 3. 3. 1 Isolering av DNA fra agarosegel med S.N.A.P.<sup>TM</sup> Gel Purification Kit

Det ble isolert DNA fra agarosegeler ved bruk av S.N.A.P.<sup>TM</sup> Gel Purification Kit (Invitrogen) og tilhørende protokoll ble fulgt. Prinsippet for isoleringen er at DNA binder seg til en filterkolonne mens "alt annet" renner gjennom. DNA vaskes med etanolholdig vaskebuffer før TE-buffer eller vann tilsettes og rehydrerer DNA slik at det elueres fra kolonnen.

For å redusere nukleaseinnholdet ble det benyttet autoklavert TAE-buffer til agarosegelelektroforesen. Elektroforesekaret ble rensert med autoklavert vann og ellers ble rent utstyr benyttet. Ønsket DNA ble skåret ut av agarosegelen under UV-lys med en steril skalpell. Dette trinnet ble utført så raskt som mulig, da UV-lys kan forårsake mutasjoner på DNA.

### 3. 3. 2 Isolering av plasmid-DNA med Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit

Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega) ble benyttet for å isolere plasmid-DNA og tilhørende protokoll ble fulgt. Metoden er effektiv for å isolere plasmid-DNA og går ut på å åpne cellene med NaOH og SDS. Kromosomalt DNA og proteiner danner uløselige aggregater, mens plasmid-DNA er igjen i supernatanten. Plasmid-DNA denaturerer, men tilsats av nøytraliseringsløsningen renaturerer plasmid-DNA, men ikke det kromosomale DNA. Plasmid-DNA i supernatanten kan spinnes ned i kolonnematrixen i en spinnkolonne og isoleres ved at frigjort DNA vil binde seg til silika spinnfilteret i spinnkolonnen. DNA kan så elueres fra kolonnen.

### 3. 3. 3 Isolering av plasmid-DNA med Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System Kit

Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System Kit (Promega) ble benyttet for å isolere større mengder plasmid-DNA enn det som var mulig med Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (punkt 3.3.2), og ble benyttet for oppbevaring eller for sekvensering av plasmider. Protokollen til kittet ble fulgt. Prinsippet for plasmidisoleringen er det samme som for Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit.

### 3. 3. 4 Tillaging av kompetente celler

Prinsipp: En celle som kan ta opp DNA og bli transformert er kompetent. I naturen er bare visse stammer kompetente og de finnes både innen *Bacteria* (G+ og G-) og *Archaea*. Denne evnen er trolig genetisk bestemt og spesielle proteiner tar del i opptaket og bearbeidelsen av DNA.

Celler kan gjøres kompetente *in vitro* ved behandling av ulike kjemikalier. Bakterien *E. coli* for eksempel, kan ta opp fremmed DNA, vanligvis isolerte plasmider, ved at cellene behandles med CaCl<sub>2</sub> og lav temperatur. Nøyaktig hva kompetansen skyldes er uklart, men cellene kommer trolig i en fysiologisk tilstand der celleveggen og cellemembranen forandrer egenskaper. Når de CaCl<sub>2</sub>-behandlede cellene utsettes for varmesjokk sammen med plasmid-DNA, blir plasmidet tatt opp.

CaCl<sub>2</sub>-transformasjon har begrenset effektivitet. Ikke mer enn ca. 1 % av cellene tar opp plasmid-DNA.

Prosedyre: Det ble laget kompetente celler av *E. coli* stammene One Shot® TOP10 og BL21 Star™ (DE3).

Celler ble strøket ut på LB-skåler og satt til inkubering i varmeskap ved 37 °C overnatt. En enkelt koloni ble plukket, overført til 10 ml LB-medium og dyrket i risteinkubator (overnatt/200 rpm/37 °C). 1 ml av overnattkulturen ble overført til 100 ml LB-medium og satt i risteinkubator ved 37 °C i omtrent 3 timer til OD<sub>600</sub> var omkring 0.4. Cellene ble overført til sterile sentrifugerør og inkubert på is i 20 minutter før de ble sentrifugert (10 min/2500 rpm/4 °C), supernatanten ble kastet og pelleten ble resuspendert i 6 ml iskald 0.1 M CaCl<sub>2</sub> og inkubert på is i 30 minutter. Cellesuspensjonen ble så sentrifugert igjen (10 min/2500 rpm/4 °C). Supernatanten ble kastet og pelleten ble resuspendert ved pippering i 1.6 ml iskald 0.1 M CaCl<sub>2</sub> med 15 % glyserol. Porsjoner på 50 µl ble fordelt på kalde epperdorfrør og oppbevart i fryser ved -80 °C.

### 3. 3. 5 Agarose-gelelektroforese

(Fra Sambroock *et al.*, 1989) For buffere og løsninger se punkt 2.6.5.

Prinsipp: Elektroforese av DNA i agarosegel er en effektiv måte å separere, påvise, isolere og bestemme mengde av DNA i en prøve. DNA er negativt ladet på grunn av fosfatgruppens egenskaper

og vil dermed vandre gjennom en agarosegel i et spenningsfelt. Det er mulig å synliggjøre DNA-fragmenter i en gel ved å tilsette etidiumbromid til gelen. Etidiumbromid er fluoriserende under UV-lys og inneholder en plan gruppe som vil binde seg mellom to basepar i DNA-molekylet, slik at DNA-molekylet strekkes ut. Den fikserte posisjonen til den interkalerende gruppen i etidiumbromid gjør at etidiumbromidbundet DNA fluoriserer mer enn ubundet etidiumbromid, og DNA helt ned til 1 ng kan påvises på en agarosegel i UV-lys. Før elektroforesen tilsettes prøvebuffer til DNA-prøvene slik at tettheten øker og DNA lettere synker ned i brønnene. Ved å tilsette en størrelsesmarkør, som inneholder DNA-fragmenter av kjent størrelse og mengde, kan en finne størrelsen og mengden til ukjente DNA-fragmenter. DNA-molekylens vandringshastighet gjennom agarosegelen avhenger hovedsakelig av følgende: 1. DNA-molekylets størrelse: Små DNA-molekyler vandrer raskere gjennom gelen enn store DNA-molekyler. 2. Agarosekonsentrasjonen: Gelens separasjonsegenskaper avhenger av agarosekonsentrasjonen. Høy konsentrasjon av agarose gir bedre separasjon av små molekyler mens lav agarosekonsentrasjon gir bedre separasjon av store molekyler. Bruk av geler med agarosekonsentrasjoner mellom 0.3-2.0 %, gjør det mulig å separere lineære DNA-molekyler i størrelsesområdet 60-0.1 kb. Ved å bruke "spesialagarose" er det også mulig å lage 3-5 % geler som gir optimal separasjon av lineære DNA-molekyler fra 1-0.02 kb. 3. DNA-molekylets konformasjon: Sirkulære supervridde plasmider vandrer for eksempel under vanlige forhold raskere enn lineære molekyler av samme størrelse. 4. Spenningsfeltet: Ved lav spenning vil vandringshastigheten av lineært DNA være proporsjonal med spenningen. Dersom spenningen derimot er høy, vil mobiliteten av store DNA-molekyler øke, slik at separasjonsegenskapene til agarosegelen synker.

Prosedyre: Ønsket mengde agarose ble løst opp i 50 ml 1 x TAE-buffer ved koking. Etter avkjøling av løsningen til ca. 50 °C ble etidiumbromid tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0.5 µg/ml før løsningen ble helt ut i støpeform. Prøvene ble tilsatt 0.2-0.3x volum prøvebuffer (O-mix) og lastet i brønnene på gelen. Elektroforesen ble utført ved 80 V i horisontale kamre med 1 x TAE-buffer. Gene Ruler™100bp DNA ladder Plus, Gene Ruler™100bp DNA ladder, Lambda DNA-*BstE* II Digest og Lambda DNA-*Hind* III Digest ble brukt som størrelsesmarkører.

### **3. 4 Generelle metoder for arbeid med proteiner**

#### **3. 4. 1 Tillaging av cellefritt ekstrakt ved sonikering**

For å lage cellefritt ekstrakt av *E. coli* og *C. aurantiacus* ble det brukt sonikering med Soniprep 150.



Prinsipp: Sonikatoren ødelegger celleveggen ved å lage vibrasjoner som forårsaker mekanisk brist i celleveggen. Sonikeringen utføres ofte i flere omganger for at prøven skal kunne avkjøles på is for å unngå for mye varmeutskillelse.

Prosedyre: Cellepelleter ble løst i 20 mM kalium-fosfatbuffer pH 7.5 (punkt 2.6.3) i forholdet 1 ml buffer per gram celler. Rørene ble satt på is og utsatt for ultralyd i 3 x 5 sekunder med 1 minutt pause mellom hver gang. For å skille cellerester og uløselige proteiner fra de løselige proteinene, ble rørene sentrifugert (30 min/13000 rpm/4 °C). Supernatantene, med løselig protein, ble overført til et nye eppendorfrør og satt på is for videre analyse eller de ble lagret ved -20 °C.

### 3. 4. 2 SDS-PAGE

For buffere og løsninger se punktene 2.6.6. og 2.6.7.

Prinsipp: SDS-PAGE baserer seg på separasjon av proteiner avhengig av proteinets størrelse og brukes blant annet til å kvantifisere, sammenligne og karakterisere proteiner. Prøver som skal kjøres med SDS-PAGE kokes først i prøvebuffer som inneholder  $\beta$ -merkaptoetanol og SDS.  $\beta$ -merkaptoetanol reduserer disulfidbroene som holder den tertiære proteinstrukturen sammen. SDS er en anionisk detergent og binder sterkt til hydrofobe deler av proteinene og denaturer dem. Hvert protein i blandingen er dermed fullstendig denaturert og åpnet til en stavformet struktur med en serie av negativt ladede SDS-molekyler langs polypeptidkjeden. Ladningen blir proporsjonal med kjedelengden og molekylene vil vandre i en polyakrylamidgel med relativ mobilitet, bare avhengig av størrelsen på molekylet. I spenningsfeltet vil de små molekylene bevege seg lettere gjennom porene i polyakrylamidgelen, slik at molekylene skilles etter størrelse. De ukjente proteinene sammenlignes med en molekylvektstandard. Glycerol i prøvebufferen gjør at proteinprøvene får en viskositet som er ideell når prøvene skal pipetteres i brønnene på polyakrylamidgelen. Prøvebufferen inneholder også fargestoffet bromfenolblått som synliggjør vandringen til proteinene.

Polymeriseringen av polyakrylamidgelen gjennomføres ved en kjemisk metode der APS og TEMED brukes som henholdsvis initiator og katalysator.

SDS-PAGE utføres i et diskontinuerlig buffersystem med en todelt gel. Den øverste delen av gelen er en konsentrerende gel med en lav akrylamidkonsentrasjon (5 %), lav ionisk styrke og omtrent nøytral pH (pH 6.8). Her konsentreres prøven før den når frem til den andre delen av gelen, den separerende gelen. Denne gelen har høyere akrylamidkonsentrasjon (7.5-18 %), høyere ionisk styrke og høy pH (pH 8.3). Bufferen som benyttes i øverste og nederste reservoar inneholder Tris-glycin (pH 8.3). I denne oppgaven ble det brukt en konsentrerende gel på 5 % og separerende homogene geler på 7.5-18 % og gelene ble laget som beskrevet av Bollag *et al.* (1996).

SDS-PAGE er en svært vanlig metode for å separere proteiner i størrelsesområdet 200-15 kDa. Bruk av geler med akrylamidkonsentrasjoner mellom 5-15 %, gjør det mulig å separere proteiner i størrelsesområdet 15-212 kDa:

<u>Akrylamid %</u>	<u>Separeringsområdet for proteiner</u>
15 %	15-45 kDa
12,5 %	15-60 kDa
10 %	18-75 kDa
7.5 %	30-120 kDa
5 %	60-212 kDa

### **Tricin-SDS-PAGE:**

SDS-PAGE med glycin i elektroforesebufferen har dårlig oppløsning av proteiner under 15 kDa. Ved å benytte tricin i elektroforesebufferen blir oppløsningen av små proteiner ved lavere akrylamidkonsentrasjoner bedre enn i glycin-SDS-PAGE-systemer. En metode, basert på tricin-SDS-PAGE som beskrevet av Shägger og von Jagow (1987), ble benyttet for separering av små proteiner under 20 kDa. Anodebufferen inneholder Tris-HCl (pH 8.9) mens katodebufferen inneholder tricin og har en pH på 8.25. Det ble brukt en konsentrerende gel på 4 % og en separerende gel på 16.5 %.

Prosedyre: Både i "vanlig" SDS-PAGE og tricin-SDS-PAGE ble prøvene tilsatt prøvebuffer, kokt i fem minutter på vannbad og avkjølt før de ble pipettert i brønnene. Til hver brønn ble det satt på 20-100 µg protein avhengig av forsøket. Gelene ble kjørt i ca. 1 time ved 120 V. Etter elektroforesen ble gelene farget med rundt 20 ml Coomassie Blue i 5-10 minutter på ristemaskin. Coomassie Blue fargen ble så fjernet og gelen ble rensset med litt vann før rundt 50 ml Coomassie avfargingsløsning ble tilsatt. Gelen ble satt til risting med Coomassie avfargingsløsning i ca. 1 time for å påvise sterke bånd, eller overnatt for å oppdage eventuelle svake bånd. Størrelsen på gelene som ble brukt var 10 cm x 7.5 cm x 0.75 mm. Precision Plus Protein™ Standards Unstained fra Bio-Rad ble brukt som størrelsesmarkør.

### **PhastSystem:**

Det ble også utført SDS-PAGE med PhastSystem™ fra Pharmacia. Phast-systemet er et automatisert elektroforesesystem bestående av en separasjonskontrollenhet for systemkontroll og elektroforese, og en utviklingsenhet for gelfarging. Til phast-systemet benyttes egne "phast-geler" og bufferstrips. Bufferstripsene består av agarose med buffer. Homogene 20 % phast-geler som separer proteiner i størrelsesområdet 2-150 kDa ble brukt og PhastSystem™ Owners Manual ble fulgt.

### **3. 4. 3 Måling av proteinmengde**

Bestemmelse av proteinmengde ble gjort med Bradford-metoden. Det ble brukt Bio-Rad Protein Microassay fra Bio-Rad og den tilhørende manualen ble fulgt. Prinsippet for målingene er at absorpsjonsmaksimumet i en sur Coomassie Brilliant Blue G-250 løsning skifter fra 465 nm til 595 nm når den binder seg til protein. Coomassie Blue-fargen binder seg primært til basiske og aromatiske

aminosyrer, særlig den basiske aminosyren arginin. Metoden er sensitiv for 1-20 µg/ml proteinløsninger. Som standardprotein ble BSA benyttet og absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 595 nm mot blindprøve.

### 3. 4. 4 N-terminal aminosyresekvensering

N-terminal aminosyresekvensering ble utført av avdelingsingeniør Sissel Kjærås og professor Knut Sletten ved Bioteknologisenteret i Oslo. Automatisk Edman-degradering ble benyttet for å sekvensere proteiners N-terminale ende.

#### 3. 4. 4. 1 Redusering og alkylering av proteiner før N-terminal aminosyresekvensering

Prinsipp: For at cystein skal kunne identifiseres ved aminosyresekvensering må cysteinresidene i proteinene reduseres og alkyleres. Reduskjon av proteiner bryter disulfidbroer mellom cysteinresidene i proteinet og fører til at polypeptikjeder separeres. Alkylering modifierer cysteinresidene og hindrer dermed gjendannele av disulfider.

Prosedyre: Proteiner i cellefritt ekstrakt ble for reduksjon tilsatt 10x molart overskudd av DTT og satt til inkubering overnatt ved 37 °C. Som en tommelfingerregel ble det brukt at et typisk protein kan inneholde opptil 1000 pmol disulfidbindinger per µg protein. For alkylering ble det tilsatt 8.8 M (95 %) 4-vinylpyridin til en sluttkonsentrasjon på 1 M. Dette ble inkubert i mørke i 1-2 timer ved 37 °C før prøvene ble brukt til videre forsøk, eller de ble fryst ned ved -20 °C.

### 3. 4. 5 Elektroblotting

For buffere og løsninger se punkt 2.6.8.

Separasjon av DNA, RNA eller protein ved SDS-PAGE etterfulgt av elektroforetisk overføring til en membran kalles for elektroblotting.

Elektroblotting av proteiner som skal sekvenseres består av følgende trinn: Proteinene separeres først med SDS-PAGE. En PVDF-membran "aktiveres" ved å dyppes i metanol et par sekunder før den overføres til et kar med blottebuffer for ekvilibrerings i 2-3 minutter. Gelen fjernes fra elektroforesekassetten, den konsentrerende gelen kuttet bort og resten av gelen bades i blottebufferen i 5 minutter. Fibrøse skumplater og filterpapir fuktes også i blottebufferen før "blotte-sandwichen" settes sammen. Elektroblottingen foregår ved 100 V i 1-2 timer ved 4 °C. Etter blottingen vaskes PVDF-membranen 3 x 5 minutter med destillert vann. For deteksjon av proteinbånd farges membranen i 5 minutter med PVDF-Coomassie Blue R-250 membranfarge og avfarges i 10-15 minutter, til bakgrunnen blir lyseblå, med PVDF-avfargingsløsning. Det ønskede båndet kuttet ut fra membranen med en skalpell og lagres i et eppendorfrør ved -20 °C før det eventuelt sendes til sekvensering.

For elektroblottingen ble det benyttet "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell" fra Bio-Rad og den tilhørende manualen ble fulgt for oppsett av "blotte-sandwichen".

### 3. 4. 5. 1 Optimalisering av elektroblotting for N-terminal aminosyresekvensering

Forventet utbytte av en elektroblotting med PVDF-membran er 40-80 % og et vanlig problem ved N-terminal aminosyresekvensering av PVDF-membraner er derfor at det er for lite protein på membranen. Det er dermed viktig å maksimere utbyttet av elektroblottingen:

Proteinprøvene, som var cellefritt ekstrakt, var blitt redusert og alkylert (punkt 3.4.4.1) og ble lagret så kort som mulig før bruk. Det ble satt mye protein på gelen, 100-300 µg. Innholdet av SDS i gelen under blottingen er viktig. Selv om SDS får proteinet til å forlate gelen, vil for mye SDS føre til at proteinet "forsvinner" i blottebufferen. For lite SDS vil redusere utbyttet av blottingen og la mye protein være igjen i gelen. Istedenfor 0.1 % SDS i elektroforesebufferen som ble brukt til "vanlig" SDS-PAGE, ble det brukt 0.2 % SDS. Metanol forårsaker at SDS dissosierer fra proteinet og hjelper proteinet med å binde seg til membranen. Metanolinnholdet i overføringsbufferen var på 10 %.

Ved vanlig blotting overføres proteiner over på nitrocellulose eller nylonfiltre, men dersom proteinet skal sekvenseres må det overføres til en membran som tåler kjemikaliene som brukes i sekvenseringen. PVDF-membranen er resistent mot sure og organiske løsningsmidler som ellers ville ha løst opp nitrocellulose- eller nylonfiltrene. En annen forskjell fra vanlig blotting er at det istedenfor glycinholdig blottebufferr benyttes CAPS-buffert, da den glycinholdige blottebufferen vil forårsake glycinforurensing i de første sekvenseringssyklusene under sekvenseringen.

**N-terminal blokkering:** Dersom proteinet som skal N-terminal aminosyresekvenseres ikke er naturlig blokkert, må det vises stor forsiktighet for å forhindre modifikasjoner av den N-terminale enden under SDS-PAGE og elektroblottingen. Edman-degradering, den vanligste metoden for sekvensering av polypeptidens N-terminale ende, degraderer proteinet aminosyre for aminosyre fra den N-terminale enden. Første trinn i degraderingen er koplingen av proteinets frie N-terminale ende med Edmans-reagent (PITC). Dersom den N-terminale enden er blokkert, hindres den i å kople med PITC, og sekvenseringen kan ikke utføres.

For å forhindre N-terminal blokkering ble det gjort følgende: Akrylamidmonomerer kan reagere med de frie N-terminale endene i proteiner og det ble benyttet geler med lav akrylamid %, 7.5, for å ha så lite akrylamid i gelen som mulig. Polyakrylamidgelene til SDS-PAGE ble laget 24 timer før bruk og oppbevart ved romtemperatur slik at gelene skulle få polymerisere skikkelig. Alle gelløsningene var nylagde og ble filtrert før bruk og lagret ved 4 °C. Det ble anbefalt å inkubere prøvene som skulle elektroblottes med en prøvebuffer med sukrose (oppskrift beskrevet i punkt 2.6.8) ved 37 °C i 10 minutter. Det viste seg at båndet som skulle isoleres, som var rundt 70 kDa, ikke var synlig på gelen etter SDS-PAGE når denne inkubasjonsmetoden av prøvene ble benyttet. Proteinprøvene ble derfor varmet i 40 sekunder ved 90 °C i nylaget "vanlig" prøvebuffer før de ble satt på gelen. For å fjerne frie radikaler ble det anbefalt å utføre SDS-PAGE med 0.1 mM tioglykolat i

øvre bufferkammer i 30 minutter ved 50 V før prøvene ble satt på gelen. Dette ble forsøkt, men det viste seg at båndene på gelen ble så smørjete at det var vanskelig å skille båndene fra hverandre. Tioglykolatmetoden ble derfor ikke benyttet.

Ved farging av membranen etter blotting ble det benyttet farge og avfargingsløsninger uten eddiksyre, da eddiksyre kan forårsake blokkering av N-terminalene på proteiner.

### 3. 5 Isolering av DNA fra hele celler

#### 3. 5. 1 Isolering av DNA fra *C. aurantiacus*

Metoden er modifisert etter en metode fra William Davies. For buffere og løsninger se punktene 2.6.1 og 2.6.2

Prinsipp: Standardmetoden for DNA-isolering fra hele celler er ved fenol/kloroform ekstraksjon som foregår i tre hovedtrinn:

1. Lysing av celler: Lysozym bryter ned bakteriecellevegg-komponentene og svekker dermed celleveggen slik at cellene lettere kan åpnes ved osmotisk sjokk. SDS løser opp lipidmembranen.

2. Denaturering og fjerning av proteiner og celleavfall med fenol/kloroform: For å skille proteiner og lipider fra DNA-molekyler ekstraheres de lyserte cellene med fenol/kloroform. Fenol denaturerer proteinene uten å påvirke DNA. Vannfasen vil inneholde negativt ladet DNA, interfasen vil inneholde proteiner, mens den nedre fasen vil inneholde celleavfall.

3. Felling av DNA med salt og etanol: Etanolen fjerner polare vannmolekyler som omgir DNA-molekylene. Dermed vil positive ioner kunne binde seg til ladede fosfatgrupper på DNA slik at det felles ut.

RNase A og Proteinase K tilsettes for å degradere enzymatisk henholdsvis RNA og proteiner. DNA-molekylene er tett pakket i kompleks med mange proteiner og for at DNA skal kunne renses, må det først frigjøres fra proteinene. Proteinase inaktiverer dessuten eventuelle aktive DNaser i lysatet og forhindrer dermed videre nedbrytning av DNA. Renset DNA lagres i TE-buffer, bestående av Tris-HCl og EDTA, som har en svært god bufferkapasitet i pH-området 7-9. EDTA binder divalente kationer ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) og hemmer dermed aktiviteten av enzymer.

Prosedyre: Det ble tilsatt 10 ml løsning 1 per gram våtvekt med celler og det hele ble overført til et plastrør. Lysozym ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 5 mg/ml før røret ble inkubert i varmeskap ved 37 °C i 75 minutter. Etter inkubering ble 10 ml løsning 2 tilsatt, og for å få en homogen løsning ble røret satt på vendemaskin ved romtemperatur i 1 time. Løsningen ble så ekstrahert to ganger med et like stort volum fenol/kloroform (Det ble benyttet fenol som på forhånd

hadde blitt justert til pH 7.9 +/- 0.2 med "pH maker" som fulgte med fenolen. Tilhørende bruksanvisning ble fulgt. Det er viktig at fenolens pH er rundt 8.0, da fenol med pH-verdi under 7.6 vil løse opp DNA). Løsningen ble sentrifugert (3 min/4000 rpm/4 °C) for å få ordentlig separasjon av fasene. Interfasen og den nedre fasen ble kastet mens den øverste fasen, vannfasen med DNA, ble overført til et nytt rør og ekstrahert to ganger med et like stort volum kloroform. Også denne gangen ble løsningen sentrifugert (3 min/4000 rpm/4 °C) for å få ordentlig separasjon av fasene. For felling av DNA ble 2.5 volum 96 % etanol tilsatt før røret ble satt i fryser i 1 time ved -20 °C. Det hvite bunnfallet ble sentrifugert (3 min/4000 rpm/4 °C) og deretter løst i 4 ml 1 x SSC og så tilsatt RNase A til en sluttkonsentrasjon på 100 µl/ml. Etter inkubering ved romtemperatur i 30 minutter ble Proteinase K tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 100 µl/ml før blandingen ble inkubert ved 55 °C overnatt. Løsningen ble ekstrahert to ganger med et like stort volum fenol/kloroform og to ganger med et like stort volum kloroform. Løsningen ble alltid sentrifugert (3 min/4000 rpm/4 °C) for å få ordentlig separasjon av fasene. DNA ble tilslutt felt med 2.5 volum 96 % etanol i -20 °C i 1 time og sentrifugert (15 min/6000 rpm/4 °C) før bunnfallet ble løst i 200 µl TE-buffer. For å unngå gjentatt opptining og nedfrysning ble DNA-løsningen fordelt på flere eppendorfrør med omkring 20 µl i hvert rør og oppbevart ved -20 °C.

### 3. 5. 2 Spektrofotometrisk måling av konsentrasjon og renhet til DNA

Konsentrasjonen til isolert kromosomalt DNA ble bestemt spektrofotometrisk.

Målingene for DNA ble utført med fortynnet prøve i en 1000 µl kvartskvett. Først ble  $A_{260}$  målt. Fordi dobbeltrådet DNA med en konsentrasjon på 50 µg/ml gir en  $A_{260}$  på rundt 1.0, kunne konsentrasjonen i prøven beregnes fra følgende formel:

$$\mu\text{g/ml DNA} = 50 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{fortynningsfaktoren}$$

Bestemmelse av renhet ble gitt ved forholdet  $A_{260}/A_{280}$ . Et forhold i absorbansen av  $A_{260}/A_{280}$  gir et mål på renheten til løsningen. Rent DNA vil gi verdier rundt 1.8. Proteiner, som har maksimal absorbans ved 280 nm, eller fenol vil gjøre at forholdet blir betydelig lavere enn denne verdien og dermed føre til unøyaktig bestemmelse av DNA-konsentrasjonen.

Renheten til det kromosomale DNA ble også undersøkt ved agarose-gelelektroforese.

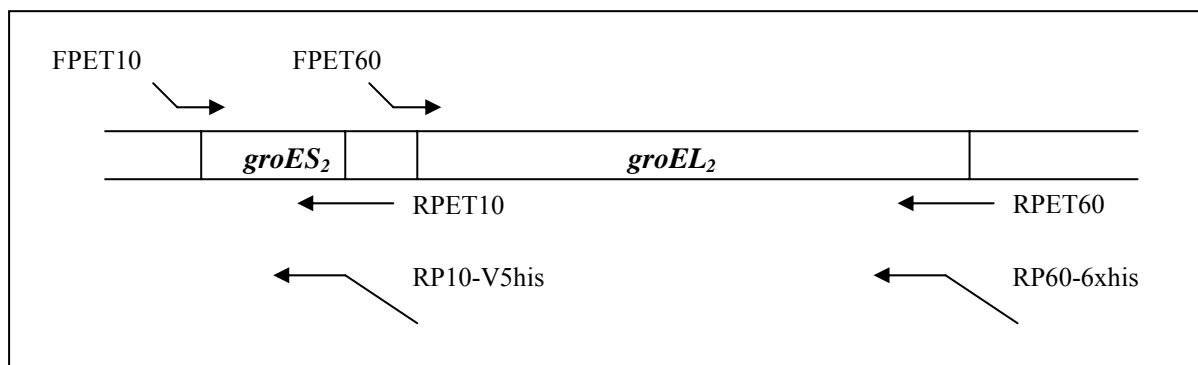
### 3. 6 PCR

PCR er en *in vitro* teknikk for å amplifisere en bestemt DNA-sekvens. PCR ble tatt i bruk som teknikk fra midten av 1980-tallet (Mullis, 1990), da Mullis beskrev teknikken ved bruk av en termostabil polymerase.

Det benyttes to primere som hybridiserer på motsatte DNA-tråder. Spesifisiteten til det området man er interessert i å amplifisere bestemmes av primersekvensene. En varmestabil DNA-polymerase benyttes for å elongere primerene.

Amplifiseringsdelen i standard PCR gjennomføres i tre trinn som utgjør en syklus. Først denatureres det dobbeltrådet DNA-templatet ved oppvarming i nærvær av et molekylært overskudd av to primere og de fire dNTPene. Deretter avkjøles reaksjonsblandingen til en temperatur som tillater primerene å feste seg til områdene de hybridiserer til. Temperaturen heves så til optimumstemperaturen for den varmestabile polymerasen slik at den kan polymerisere nye DNA-tråder fra primerene. Syklusen gjentas 20-30 ganger. Produktene som produseres i en syklus vil fungere som templat i neste syklus og dette fører til en eksponentiell økning i antall DNA-tråder. Hovedproduktet til PCR-reaksjonen er et dobbeltrådet DNA-fragment der endene til fragmentet er definert av 5' enden til primerene. Et første denatureringstrinn utføres før syklusene starter for å være helt sikker på at alt DNA-templatet er denaturert. Et siste elongeringstrinn utføres helt til slutt for at PCR-produktene fra siste syklus skal bli fullstendig elongert.

PCR brukes til mange formål, blant annet til å isolere gener ved at det benyttes genspesifikke primere. I denne oppgaven ble det utført PCR nettopp for å isolere gener. Det ble laget genspesifikke primere som hybridiserer spesifikt til det ønskede genets flankerende områder. En del av primerene ble laget med overheng/haler i 5' enden som ikke hybridiserer med målsekvensen, men som innfører nye basepar til det endelige PCR-produktet. Figur 3.1 viser hvor de genspesifikke primerene for *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>* befinner seg i forhold til hverandre på genomet til *C. aurantiacus*.



**Figur 3.1:** Skisse som viser hvor de genspesifikke primerene for *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>* befinner seg i forhold til hverandre på *groESL<sub>2</sub>*-operonet i *C. aurantiacus*.

### 3. 6. 1 PCR med Vent polymerase

Anbefalingene og instruksjonene fra enzymets produsent ble fulgt. Det ble alltid brukt en negativ kontroll, dvs. en reaksjon identisk med de andre bortsett fra at det ikke var tilsatt templat DNA. Sekvensene til alle primerene som ble benyttet er vist i tabell 2.1.

Reagens	Konsentrasjon	Sluttkons.	Volum
Templat DNA	x ng/ $\mu$ l	x ng/ $\mu$ l	x $\mu$ l
PCR-buffer	10 x	1 x	10 $\mu$ l
dNTP-mix	10mM	200 $\mu$ M	2 $\mu$ l
Foroverprimer	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	4 $\mu$ l
Reversprimer	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	4 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	100 mM	4 mM	4 $\mu$ l
Vent polymerase	2 U/ $\mu$ l	0.02 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
DH <sub>2</sub> O til 100 $\mu$ l			x $\mu$ l
Totalt			100 $\mu$ l

95 °C	x min	denaturering	} 25 sykler
95 °C	1 min	denaturering	
x °C	1 min	annealing	
72 °C	1 min	extension	
72 °C	x min	final extension	
4 °C	$\infty$		

( x: varierer fra reaksjon til reaksjon)

10  $\mu$ l av PCR-produktene ble analysert på 1 % agarosegeler.

### 3. 6. 2 PCR med DyNAzyme EXT DNA-polymerase

Anbefalingene og instruksjonene fra enzymets produsent ble fulgt. Det ble alltid satt opp en negativ kontroll, dvs. en reaksjon identisk med de andre bortsett fra at det ikke var tilsatt templat DNA. Sekvensene til alle primerene som ble benyttet er vist i tabell 2.1.



Reagens	Konsentrasjon	Sluttkons.	Volum
Templat DNA	x ng/μl	x ng/μl	x μl
Polymerase-buffer	10 x	1 x	5 μl
dNTP-mix	10 mM	200 μM	1 μl
Foroverprimer	10 μM	0.4 μM	2 μl
Reversprimer	10 μM	0.4 μM	2 μl
Dynazyme EXT DNA-pol. 2 U/μl		0.04 U/μl	1 μl
DH <sub>2</sub> O til 50 μl			x μl
Totalt			50 μl

95 °C	x min	denaturering	25 sykler
95 °C	1 min	denaturering	
x °C	1 min	annealing	
72 °C	1 min	extension	
72 °C	x min	final extension	
4 °C	∞		

( x:varierer fra reaksjon til reaksjon)

10 μl av PCR-produktene ble analysert på 1 % agarosegeler.

### 3. 6. 3 Isolering av *groES*<sub>2</sub> og *groEL*<sub>2</sub> fra genomisk DNA med PCR

**Isolering av *groES*<sub>2</sub>:** Genet *groES*<sub>2</sub> ble isolert med PCR fra genomisk DNA fra *C. aurantiacus*. Vent polymerase ble benyttet (punkt 3.6.1). Primerene FPET10 og RPET10 ble benyttet som henholdsvis forover og reversprimer. Primeren FPET10 innfører et CACC-overheng i 5' enden av *groES*<sub>2</sub> og RPET10 primeren fester seg på slutten av *groES*<sub>2</sub> og tar med genets native stoppkodon.

Som templat ble 1 μl genomisk DNA (~250 ng/μl) benyttet. Første denatureringstrinn var på 5 minutter og siste elongeringstrinn var på 1 minutt. Flere forskjellige annealingtemperaturer ble prøvd: 48, 51, 54, 57, 59, 60, 63 og 65 °C.

På grunn av resultatene med PCR ble en annen fremgangsmåte forsøkt for å isolerte *groES*<sub>2</sub>: Primerene FPET10 og RPET60 ble benyttet som henholdsvis forover og reversprimer i et forsøk på å få opp hele *groESL*<sub>2</sub>-operonet i ett PCR-produkt. Primeren RPET60 fester på slutten av *groEL*<sub>2</sub> og tar med genets native stoppkodon. Vent polymerase ble benyttet. Som templat ble det benyttet 1 μl genomisk DNA fra *C. aurantiacus* (~250 ng/μl). Første denatureringstrinn var på 1 minutt, annealingtemperaturen var på 57 °C og siste elongeringstrinn var på 3 minutter. Nok en PCR med primerene FPET10 og RPET10 ble så utført på 1 μl av PCR-produktet (100-200 ng/μl). Det ble utført reaksjoner med både Vent og DyNAzyme EXT DNA-polymerase (punktene 3.6.1. og 3.6.2). For

reaksjonene med både Vent og DyNAzyme EXT DNA-polymerase var første denatureringstrinn 5 minutter, annealingtemperaturen på 60 °C og siste elongeringstrinn var på 1 minutt. PCR-produktet ble isolert fra gelen (punkt 3.3.1) og sekvensert (punkt 3.8). PCR-produktet ble kalt for *groES*<sub>2</sub>.

*In vitro* mutagenese innebærer introduksjon av spesifikke forandringer i gitte posisjoner i et DNA molekyl hvor sekvensen er kjent.

I PCR-basert *in vitro* mutagenese introduseres mutasjonene ved hjelp av primere. Primerene er konstruert slik at de binder seg til villtypegenet, bortsett fra i det området som skal muteres. På den måten vil det DNAet som er syntetisert med primeren som utgangspunkt, inneholde mutasjonen.

PCR-produkter som skulle liggeres i pET101/D-TOPO og pET102/D-TOPO vektorene og uttrykkes med pET-systemet (punkt 3.7) ble amplifisert med primere som var konstruert slik at PCR-produktet kunne settes inn i en bestemt retning i vektorene. Foroverprimerene hadde i disse tilfellene det ønskede genets startkodon rett etter et 5' CACC-overheng. Reversprimerene varierte ettersom de skulle tilføre en hale til den C-terminale enden eller ikke.

To kodoner som er svært sjeldne i *E. coli* ble funnet i 5' enden av *groES*<sub>2</sub>. Disse kodonene ble forandret til mindre sjeldne kodoner ved hjelp av PCR der foroverprimeren inneholdt mutasjonene. Primerene ESP2 og RPET10 ble benyttet som henholdsvis forover og reversprimer. Primeren ESP2 innfører et CACC-overheng i 5' enden av *groES*<sub>2</sub> og forandrer de sjeldne kodonene CGA (arginin) og CCC (prolin) til de mindre sjeldne kodonene CGT (arginin) og CCG (prolin). Gelrenset *groES*<sub>2</sub> (~15 ng/μl) ble benyttet som templat. Første denatureringstrinn var på 1 minutt, annealingtemperaturen var på 60 °C og siste elongeringstrinn var på 1 minutt. Vent polymerase ble benyttet. PCR-produktet ble kalt for *mutgroES*<sub>2</sub>.

Vektoren pET 101/D-TOPO koder for en V5-epitop og en histidinhale som kan uttrykkes i 3' enden av det heterologe genet (figur 3.3). Genet *mutgroES*<sub>2</sub> ble amplifisert med primerene FPET10 og RP10-V5his som henholdsvis forover og reversprimer. Primeren RP10-V5his er konstruert slik at den henter opp 3' enden av *groES*<sub>2</sub> uten at det native stoppkodonet blir med. På denne måten kan sekvensen som koder for V5-epitopen og histidinhalen fra pET 101/D-TOPO vektoren bli transkribert sammen med *groES*<sub>2</sub> etter at PCR-produktet er ligert inn i vektoren. Primeren RP10-V5his innfører også en sekvens som koder for et kuttesete for TEV-proteasen. Som templat ble det benyttet 1 μl PCR-produkt med *mutgroES*<sub>2</sub> (100-200 ng/μl) og Vent polymerase ble benyttet. Første denatureringstrinn var på 1 minutt, annealingtemperaturen var på 60 °C og siste elongeringstrinn var på 1 minutt. PCR-produktet ble kalt for *mutgroES*<sub>2</sub>V5his.

**Isolering av *groEL*<sub>2</sub>:** Genet *groEL*<sub>2</sub> ble isolert med PCR fra genomisk DNA fra *C. aurantiacus*. Vent polymerase ble benyttet. Primerene FPET60 og RPET60 ble benyttet som henholdsvis forover og reversprimer. Primeren FPET60 innfører et CACC-overheng i 5' enden av *groEL*<sub>2</sub>. Primeren RPET60 fester seg på slutten av *groEL*<sub>2</sub> og tar med genets native stoppkodon. Som templat ble det benyttet 1 μl genomisk DNA (~250 ng/μl). Første denatureringstrinn var på 5 minutter,

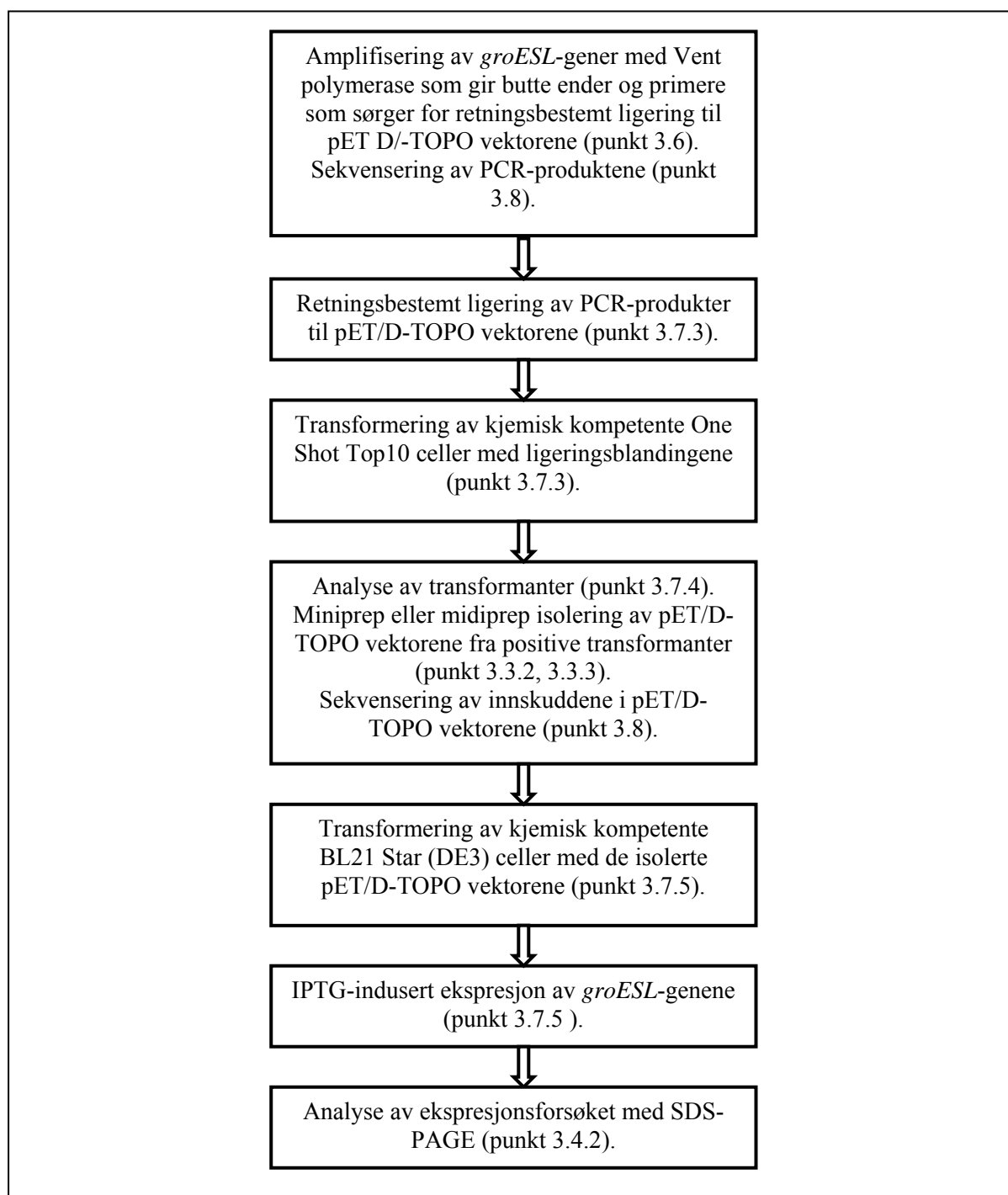
annealingtemperaturen var på 52 °C og siste elongeringstrinn var på 3 minutter. PCR-produktet ble kalt *groEL<sub>2</sub>*.

Genet *groEL<sub>2</sub>* ble også amplifisert med primerene FPET60 og RP60-6xhis som henholdsvis forover og reversprimer. Primeren RP60-6xhis innfører en sekvens til genet i 3' enden som koder for en histidinhale. Primeren tar ikke med genets native stoppkodon, men tilfører et stoppkodon på slutten av sekvensen som koder for histidinhalen. Som templat ble det benyttet 1 µl PCR-produkt *groEL<sub>2</sub>* (100-200 ng/µl). Første denatureringstrinn var på 1 minutt, annealingtemperaturen var på 60 °C og siste elongeringstrinn var på 2 minutter. Vent polymerase ble benyttet. PCR-produktet ble kalt *groEL<sub>2</sub>-6xhis*.

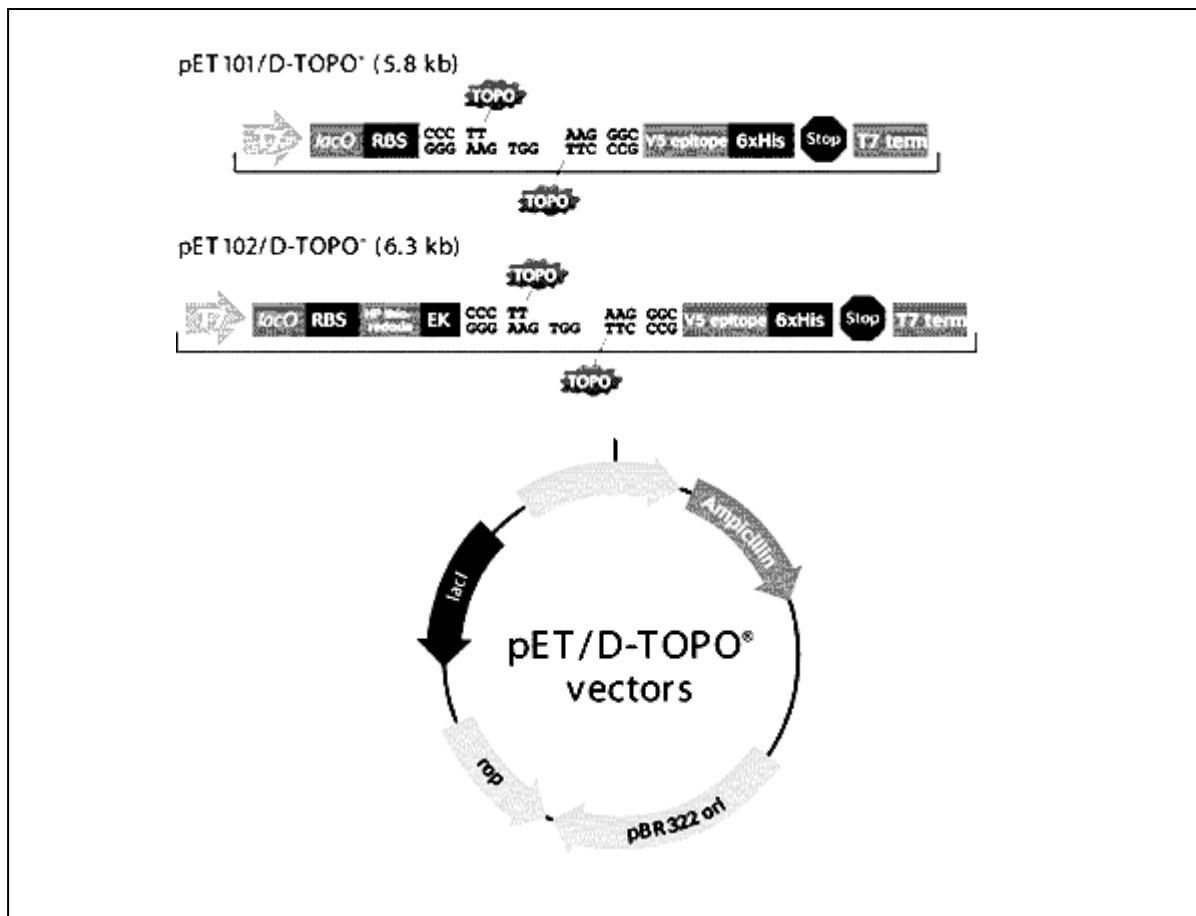
### 3. 7 Ekspresjon med pET/D-TOPO vektorer

pET 101 Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kit og pET 102 Champion Expression Kit (Invitrogen) ble brukt for ekspresjon av *groESL*-genene. Tilhørende protokoller ble brukt.

Prosedyren som ble brukt for å uttrykke *groESL*-genene er vist i figur 3.2. Skisse av pET/D-TOPO vektorene som ble benyttet i oppgaven er vist i figur 3.3.



Figur 3.2: Flytskjema som viser trinnene i ekspresjonen av *groESL*-genene med pET/D-TOPO<sup>®</sup> ekspresjonskittene.



Figur 3.3: Skisse av pET plasmid-vektorene pET 101/D-TOPO og pET 102/D-TOPO. Figuren er hentet fra protokollen til kittene (Invitrogen) og er noe modifisert.

### 3. 7. 1 T7-regulert ekspresjon

pET (plasmid for Expression by T7 polymerase) ekspresjonssystemer bruker elementer fra bakteriofag T7 for kontroll av heterologe gener i *E. coli*. Plasmid-vektorene pET/D-TOPO inneholder en sterk fagbasert promoter, T7-promoter, spesifikk for T7 RNA-polymerase som transkriberer det heterologe genet. T7-promoteren er modifisert slik at den inneholder en operatorsekvens der en LacI-repressor (kodet for av *lacI*-genet på plasmid-vektoren) kan binde seg.

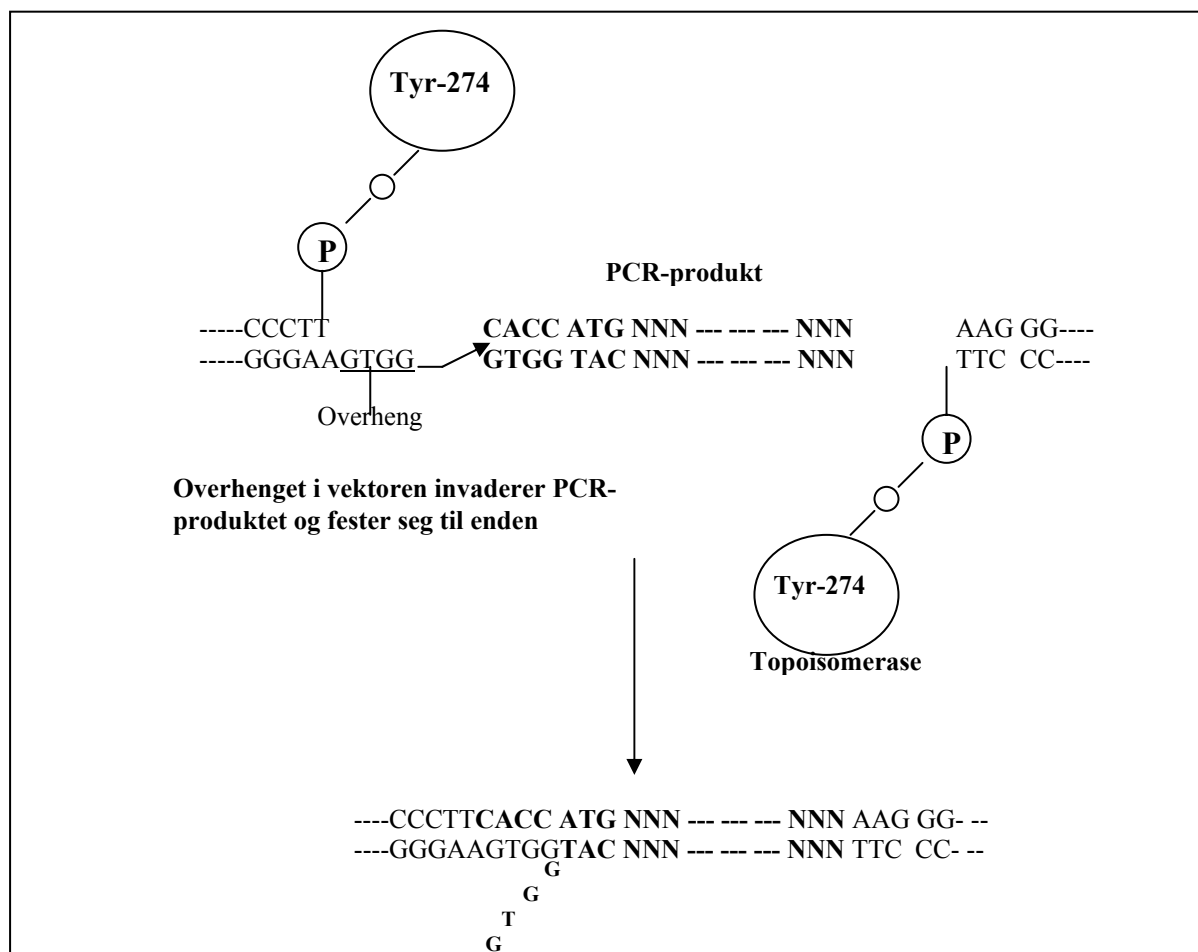
Vertstammen for ekspresjon, BL21(DE3), bærer i kromosomet en DE3 bakteriofag  $\lambda$  lysogen som inneholder T7 RNA-polymerasegenet som er under kontroll av *lacUV5*-promoter. Dette konstruktet er satt inn i *int*-genet slik at dette er inaktivert (avbryting av *int*-genet hindrer eksisjon av fagen og forhindrer dermed lysis). I tillegg finnes *lacI*-genet på plasmid-vektoren og på vertstammens kromosom. LacI-repressoren uttrykkes konstitutivt og hindrer ekspresjon av både T7 RNA-polymerase i vertskromosomet og ekspresjon av det heterologe genet i pET vektoren, ved at den binder seg til operatorsekvensene i *lacUV5*-promoter og T7-promoter. Ekspresjonssystemet er vist i figur 3.4.



### 3. 7. 2 Prinsipp for retningsbestemt TOPO-kloning

pET/D-TOPO ekspresjonskittene benytter seg av "TOPO-kloning strategien" for retningsbestemt ligering av PCR-produkter med butte ender til pET/D-TOPO vektorene. Strategien baserer seg på følgende reaksjon: Topoisomerase I fra *Vaccinia* virus binder seg til dobbeltrådet DNA på spesifikke steder og spalter fosfodiester-ryggraden etter 5' CCCTT i en tråd (Shuman, 1991). Energien fra den spaltede fosfodiester-ryggraden bevares ved at det dannes en kovalent binding mellom 3' fosfaten i den spaltede tråden og tyrosylresidien (Tyr-274) i enzymet. Reaksjonen kan senere reverseres ved at 5' hydroksyl-enden på den spaltede DNA-tråden invaderer fosfotyrosylbindingen mellom DNA og enzymet og frigjør topoisomerasen (Shuman, 1994).

pET/D-TOPO vektorene er lineariserte og har topoisomerase I bundet til seg i hver ende. Et enkeltrådet overheng på fire baser, GTGG, er satt til 5' enden på vektoren. Et 3' overheng, som er identisk med 5' enden av den TOPO-ladete kloningsvektoren, adderes til PCR-produktet ved å sette til de fire basene CACC i foroverprimeren. Overhengen i kloningsvektoren, GTGG, vil så invadere og feste seg til 5' enden av PCR-produktet. Topoisomerasen katalyserer ligeringen av innskuddet til vektoren. TOPO-kloningsreaksjonen er vist i figur 3.5. Ifølge protokollen tilhørende pET D/TOPO kittene skal innskuddene bli ligert inn i vektorene i riktig orientering med en effektivitet på 90 % med denne metoden.



Figur 3.5: Skisse som viser hvordan retningsbestemt TOPO-kloning fungerer. Skissen er forklart i teksten.

### 3. 7. 3 Retningsbestemt TOPO-kloning og transformering

De ulike PCR-produktene av *groEL*<sub>2</sub> og *groES*<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus* fra punkt 3.6.3 ble ligert inn i vektorene pET 101/D-TOPO og pET 102/D-TOPO.

Molare forhold mellom innskudd og vektor på 2:1 til 5:1 ble benyttet i ligeringsreaksjonene for pET 101/D-TOPO vektoren, mens det for pET 102/D-TOPO vektoren ble benyttet molare forhold på 0.5:1 til 2:1. Formelen som ble benyttet for å finne ut hvor mye PCR-produkt (innskudd) som skulle tilsettes ligeringsblandingen var:

$$\frac{\text{ng vektor} \times \text{str. innskudd (bp)} \times \text{molart forhold (innskudd/vektor)}}{\text{str. vektor (bp)}} = \text{ng innskudd}$$

Ligeringsblandingen ble brukt til å transformere kjemisk kompetente celler fra *E. coli* stammen One Shot<sup>®</sup> TOP10. På en petriskål med selektivt medium (100 µg/ml ampisillin) ble det strøket ut 100 og 200 µl av en transformasjonsblanding og inkubert overnatt ved 37 °C i varmeskap.

### 3. 7. 4 Analyse av transformanter

One Shot<sup>®</sup> TOP10 cellene som hadde blitt transformert med pET/D-TOPO vektorene ble analysert for å sjekke at det heterologe genet var blitt riktig innsatt i vektoren.

**PCR direkte på koloniene:** For å undersøke hvilke transformerte One Shot<sup>®</sup> TOP10 celler som hadde vektor med innskudd ble det utført PCR direkte på koloniene med primerene T7 og T7 revers. De to primerene, T7 og T7 revers, fester seg henholdsvis oppstrøms og nedstrøms for kloningssetet i pET/D-TOPO vektorene. DyNAzyme EXT DNA-polymerase ble benyttet (punkt 3.6.2). Første denatureringstrinn var på 5 minutter, annealingtemperaturen var på 57 °C og siste elongeringstrinn var på 2 minutter.

En koloni ble plukket med en steril tannpirker og resuspendert i PCR-blandingen. Kolonien som ved PCR-analyse viste seg å inneholde vektor med innskudd ble overført til sterilt LB-medium og dyrket overnatten. Vektor-plasmidene ble isolert ved hjelp av miniprep (punkt 3.3.2).

**PCR på isolerte plasmider:** Det ble utført PCR på isolerte pET/D-TOPO plasmider for å være helt sikker på at de inneholdt innskudd. DyNAzyme EXT DNA-polymerase ble benyttet (punkt 3.6.2). Første denatureringstrinn var på 3 minutter, annealingtemperaturen var på 57 °C og siste elongeringstrinn var på 2 minutter. DNA-templatet var 1 µl (~10 ng/µl) isolert plasmid. PCR-produktene ble sendt til sekvensering (punkt 3.8) for å finne ut om innskuddene var de riktige og om de var ligert inn i vektoren i riktig retning og i riktig leseramme.



**Kutting med restriksjonsenzym:**

Prinsipp: Prokaryoter har ulike restriksjonsendonukleaser som gjenkjenner spesifikke DNA-sekvenser, restriksjonssteder, i fremmed DNA, og som ødelegger DNA-molekylene ved å kutte det dobbeltrådede DNAet på restriksjonsstedene. Denne mekanismen har prokaryotene utviklet for å ødelegge fremmed DNA, som for eksempel virus. Det finnes flere typer restriksjonsenzymmer og de mest brukte restriksjonsenzymene er av type II, som lager kutt i gjenkjennelsessekvenser som er palindrome og består av 4 eller 6 basepar. Slike enzymer er mye brukt i genteknikk.

Prosedyre: Det ble satt opp kuttereaksjoner for å undersøke om innskuddene var satt inn i pET 101/D-TOPO vektoren. Restriksjonsenzymene, *XbaI* og *SacI*, kutter henholdsvis oppstrøms og nedstrøms for kloningsstedet i vektoren. Følgende kuttereaksjon ble satt opp:

Isolert pET 101/D-TOPO vektor (~10 ng/μl)	14 μl
10 x NEB buffer 4	2 μl
10 x BSA	2 μl
<i>XbaI</i> , NEB(20 U/μl)	1 μl
<u><i>SacI</i>, NEB (20 U/μl)</u>	<u>1 μl</u>
Totalt	20 μl

I kuttereaksjonsforsøkene ble det også utført en kontrollreaksjon uten restriksjonsenzym. Kuttereaksjonene ble satt på vannbad ved 37 °C og etter omtrent 1 time ble reaksjonene stoppet ved å tilsette 4 μl loadingbuffer og hele kuttereaksjonen ble analysert på en 1 % agarosegel.

**3. 7. 5 Ekspresjon av *groESL*-genene**

Kjemisk kompetente celler fra *E. coli* stammen BL21 Star™(DE3) ble transformert med isolerte pET/D-TOPO vektorer med innskudd.

De ulike *groESL*-genene i pET/D-TOPO vektorene ble uttrykt i BL21 Star™(DE 3) cellene i henhold til protokollen. Konsentrasjonen av IPTG var 0.5 mM. For å være sikker på at IPTG-induksjonen fungerte som den skulle, ble det alltid uttrykt et kontrollprotein, LacZ, fra kontrollvektorene pET 101/D/lacZ-TOPO og pET 102/D/lacZ-TOPO. Ekspresjon av *groES<sub>2</sub>*, *mutgroES<sub>2</sub>* og *mutgroES<sub>2</sub>V5his* fra punkt 3.6.3 ble også forsøkt med ulike IPTG-konsentrasjoner i området 0.05-1.0 mM, og istedenfor LB-medium ble det også benyttet det mer næringsrike mediet, NZCYM.

Mange heterologe proteiner er toksiske for vertcellen ved høye doser, og ekspresjonen må derfor ofte reguleres. Ekspresjonen av *groES<sub>2</sub>*, *mutgroES<sub>2</sub>* og *mutgroES<sub>2</sub>V5his<sub>2</sub>* fra pET 101/D-TOPO vektorer ble forsøkt regulert ved å senke veksthastigheten til BL21(DE3) cellene. Dette ble gjort ved å

utføre ekspresjonsforsøkene ved romtemperatur i 48 timer istedenfor ved 37 °C i 6-8 timer. Det ble også tilsatt 1 % glukose i mediet under disse forsøkene for å hindre for rask ekspresjon av det heterologe genet.

Plasmidet, pET, har et gen for ampicillinresistens som koder for  $\beta$ -laktamase.  $\beta$ -laktamase skilles rett ut i mediet der det hydrolyserer ampicillin slik at antibiotikumet inaktiveres. Ampicillin er i tillegg utsatt for hydrolyse når pH-verdien i mediet synker som en følge av bakteriell gjæring.  $\beta$ -laktamase ødelegger ampicillin som dermed blir raskt fjernet fra mediet slik at ikke-selektive forhold oppstår. Dette vil medføre at celler som mangler pET/D-TOPO vektoren, lett vil kunne dominere i kulturen, noe som kan resultere i at ekspresjon av det heterologe genet ikke oppdages. For å forsøke å øke utbyttet av ekspresjonen av *groESL*-genene fra pET 101/D-TOPO vektorene ble ampicillinseleksjonen under ekspresjonsforsøket økt. Ekspresjonsforsøket ble utført på samme måte som tidligere, med noen forandringer: Konsentrasjonen av ampicillin var på 50  $\mu\text{g/ml}$  istedenfor 100  $\mu\text{g/ml}$ , da en høyere ampicillinkonsentrasjon i mediet gjør at mer  $\beta$ -laktamase blir produsert. Overnattekulturene sto i 10 timer istedenfor 14-18 timer, da lang inkubasjonstid øker sjansen for at ampicillin brytes ned og at ikke-selektive forhold dannes. Før IPTG ble tilsatt ble cellene spunnet ned (10 min/4600 rpm/4 °C) og resuspendert i ferskt LB-medium med ampicillin. Etter 2 timer med induksjon ble cellen spunnet ned på nytt og pelletene resuspendert i nytt LB-medium med ampicillin og IPTG, før de ble inkubert videre.

### 3. 7. 6 Ekspresjon med tioredoksin som fusjonsprotein

ThioFusion-ekspresjonssystemet (Invitrogen), konstruert av La Vallie *et al.*, (1993), bruker *E. coli* tioredoksin, kodet for av genet *trxA*, som fusjonspartner. Det ble bestemt at *mutgroES<sub>2</sub>* (fra punkt 3.6.3) skulle bli forsøkt uttrykt som fusjonsprotein med tioredoksin med pET 102/D-TOPO vektoren. Det 11.7 kDa store tioredoksinproteinet som uttrykkes fra pET102/D-TOPO vektoren er mutert slik at det inneholder et metallbindende domene og kalles dermed for "his-patch" tioredoksin. For å danne det metallbindende domenet er glutamatresidene i posisjon 32 og glutaminresidien i posisjon 64 mutert til histidinresidier. Når "his-patch" tioredoksin foldes vil histidinresidene ved posisjon 32 og 64 reagere med den native histidinresidien ved posisjon 8 og danne et histidinområde som gjør at proteinet lar seg rense på for eksempel på en nikkelsøyle. Et gjenkjennelsessted for enterokinase mellom tioredoksin og det heterologe proteinet gjør det mulig å fjerne "his-patch" tioredoksin fra det heterologe proteinet etter rensing ved å bruke proteasen enterokinase. Hele tioredoksinfusjonen med enterokinase-gjenkjennelsesstedet øker størrelsen til det heterologe proteinet med 13 kDa.

PCR-produktet *mutgroES<sub>2</sub>* (fra punkt 3.6.3) ble ligert i pET 102/D-TOPO vektoren og uttrykt på samme måte som de andre genene.

### 3. 8 DNA-sekvensering og sekvensanalyse

Sekvensering av PCR-produkter og plasmider ble gjort automatisk ved "primer walking" på MegaBACE 2000 instrumentet ved UiO av avdelingsingeniørene Bård Mathisen og Kenneth Weierud eller med det tyske sekvenseringsfirmaet GATC Biotech AG (<http://www.gatc-biotech.com>).

MegaBACE 2000-instrumentet kan sekvensere opptil 900 baser og med korte templatere var ikke dette noe problem. For lengre templatere derimot, som for eksempel PCR-produktet med *groEL*<sub>2</sub>, måtte det lages en sekvenseringsprimer for at området i midten av genet skulle bli sekvensert. Denne sekvenseringsprimeren fester seg ved base 515 i *groEL*<sub>2</sub>-genet. Sekvensen til primeren er vist i tabell 2.1.

For at gelrensede PCR-produkter skulle kunne sekvenseres måtte de amplifiseres for at konsentrasjonen skulle bli høy nok. Det ble derfor utført PCR på de gelrensede PCR-produktene. PCR ble utført som beskrevet i punkt 3.6.2 og det ble benyttet med 1 µl gelrenset PCR-produkt (10-100 ng) som templat. For å kunne sekvensere pET/D-TOPO vektorene med innskudd måtte konsentrasjonen være omtrent 45 ng/µl. Da pET/D-TOPO vektorene som ble benyttet er lavkopi-plasmider, måtte vektorene isoleres med Wizard<sup>®</sup> Plus SV Midipreps DNA Purification System kit (punkt 3.3.3) istedenfor Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System kit, for å få høy nok konsentrasjon av vektorplasmidene.

Nukleotid- og aminosyresekvenser ble analysert ved bruk av ulike bioinformatiske programmer på Internett. BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), et sekvensanalyseprogram som kan lastes gratis ned fra Internett, ble brukt for å studere og korrigere kromatogrammene fra de sekvenserte DNA-prøvene. Nukleotidsekvenser ble oversatt til protein i alle seks mulige leserammer ved bruk av programmet TRANSEQ (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>). Sammenligninger av nukleotid- og aminosyresekvenser med sekvenser i databasene til NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ble utført med programmer i BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) Sekvenser ble også sammenliknet med sekvensene i *C. aurantiacus* databasen. Selv om hele genomet til *C. aurantiacus* ble ferdigsekvensert høsten 2004, er ikke genomet satt sammen enda, men foreligger som "shotgun-sekvenser".

Programmet MultAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) ble benyttet for flersammenstilling av sekvenser.

Programmet PRETTYSEQ (<http://cbl.labri.fr/outils/Pise/prettyseq.html>) ble brukt til å sette opp nukleotidsekvenser og de tilsvarende aminosyresekvensene. NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ble brukt til å lage kart over restriksjonssteder i nukleotidsekvenser. Molekylvekt og isoelektronisk punkt ( $M_w$  og pI) for proteiner ble regnet ut med programmet PeptideMass (<http://au.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

## 4 RESULTATER

### 4.1 Isolering av gener fra genomisk DNA

#### 4.1.1 Isolering av kromosomalt DNA fra *C. aurantiacus*

Kromosomalt DNA fra *C. aurantiacus* ble isolert som beskrevet i punkt 3.5.1. Måling av konsentrasjon og renhet til det kromosomale DNA ble gjort spektrofotometrisk som beskrevet i punkt 3.5.2. Tabell 4.1 viser spektrofotometriske data og utregningen av konsentrasjonen til isolert kromosomalt DNA. Forholdet mellom  $A_{260}$  og  $A_{280}$  er noe lavt og tyder på fenol- eller proteinforurensing. Utbyttet av DNA-isoleringen var en del lavere enn forventet.

**Tabell 4.1: Spektrofotometriske data og beregninger**

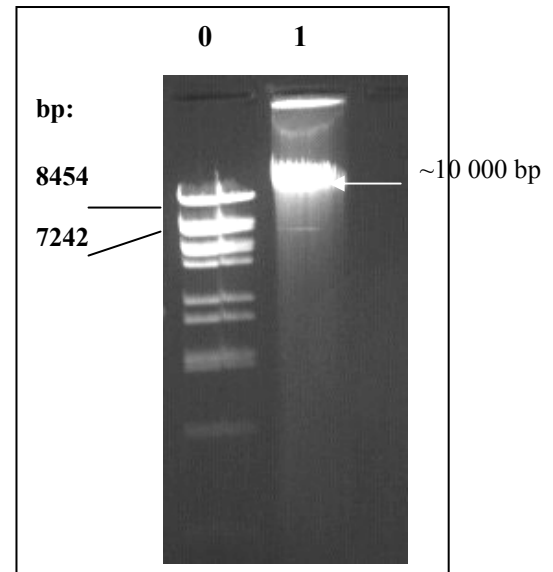
Utgangsmateriale:	1.2 g celler våtvekt
$A_{260}/A_{280}$ :	$0.358/0.208 = 1.721$
Konsentrasjon $\mu\text{g/ml}$ :	$50 \times 0.358 \times 14 = 251$
Utbytte i mg DNA:	0.25
% utbytte:	2.6-3.5 (basert på forholdet våtvekt/tørrvekt = 5:1 og % DNA i tørrvekt = 3-4)

Agarose-gelelektroforese av isolert kromosomalt DNA er vist i figur 4.1. Kromosomalt DNA kan sees som to tydelige bånd: ett i brønnen og ett rundt 10 000 bp. Dette tyder på at store deler av det kromosomale DNAet var blitt degraderte av DNaser eller kuttet opp mekanisk under isoleringen.

Degradering av DNA under en isoleringsprosess er ikke uvanlig, da aktive DNaser fra bakterien kan få tid til å virke når celleveggen ødelegges. Det er også en mulighet at det er selve lyseringen av cellene som ødelegger DNA.

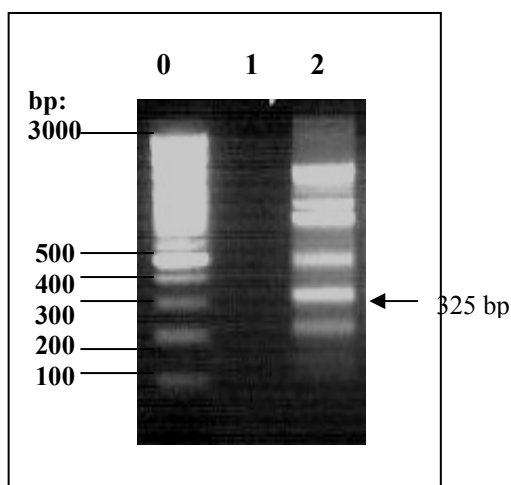
Selv om store deler av det kromosomale DNAet var kuttet opp, forhindrete ikke det videre arbeid med DNAet.

**Figur 4.1: Isolert kromosomalt DNA fra *C. aurantiacus*.** 5 µl ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard Lambda-*Bst*E II kuttet. Spor 1: isolert kromosomalt DNA.



#### 4. 1. 2 Isolering av *groES*<sub>2</sub>

Det ble forsøkt å isolere *groES*<sub>2</sub> ved hjelp av PCR på isolert kromosomalt DNA fra *C. aurantiacus* med genspesifikke primere for *groES*<sub>2</sub> som beskrevet punkt 3.6.3. Bare annealingtemperaturer på 59, 60 og 63 °C ga resultat i form av rundt 8 bånd på gelen hvorav et av båndene var av riktig størrelse, 325 bp. Figur 4.2 viser resultatet fra en reaksjon der annealingtemperaturen var 63 °C. Det ble også utført PCR med ulik mengde kromosomalt DNA, rundt 100-500 ng, og annealingtemperatur på 60 °C. Reaksjonene ga alle 6-8 bånd på gelen.

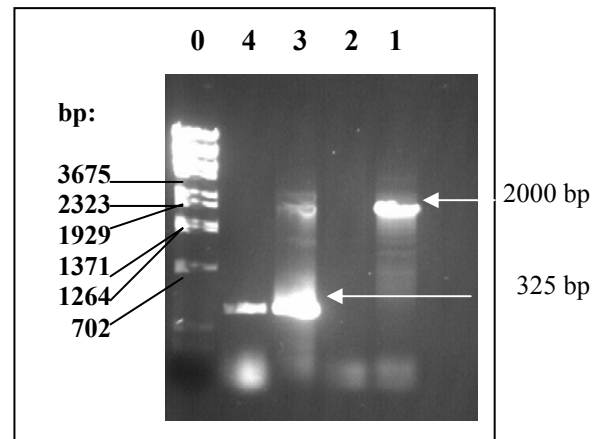


**Figur 4.2: Forsøk på å isolere *groES*<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus* med PCR.** 10 µl av PCR-produktene ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard 100 bp DNA Ladder Plus. Spor 1: negativ kontroll. Spor 2: PCR-produktene, rundt 8 bånd, hvorav et var av forventet størrelse, 325 bp.

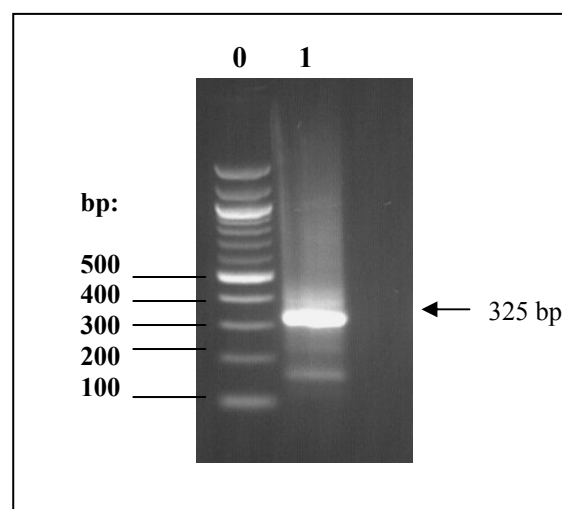
Fordi reaksjonene ga flere bånd på gelen, ble det forøkt å isolere *groES*<sub>2</sub> på ny ved å først å isolere hele *groESL*<sub>2</sub>-operonet med PCR, for så å utføre nok en PCR med *groESL*<sub>2</sub>-operonet som templat og med genspesifikke primere for *groES*<sub>2</sub>. Figur 4.3 viser resultatene fra reaksjonene, som alle ga bånd av forventet størrelse. PCR med genspesifikke primere for *groESL*<sub>2</sub>-operonet ga et bånd av

forventet størrelse på 2000 bp, og PCR med genspesifikke primere for *groES<sub>2</sub>*, med *groESL<sub>2</sub>* som templat, ga et bånd av forventet størrelse på 325 bp. Båndet fra spor 3 ble isolert fra gelen (punkt 3.3.1) og sekvensering av dette produktet (punkt 3.8) viste at det var *groES<sub>2</sub>*-genet som hadde blitt isolert. Kromatogrammet fra sekvenseringen av *groES<sub>2</sub>* er vist i appendiks 1. PCR-produktet, som ble kalt for *groES<sub>2</sub>*, ble ligert inn i pET 101/D-TOPO vektoren (punkt 3.7.3) og sekvensering av PCR-produktet fra det isolerte plasmidet viste at genet hadde blitt satt inn riktig i vektoren.

**Figur 4.3: Isolering av *groESL<sub>2</sub>* og *groES<sub>2</sub>* fra *C. aurantiacus* med PCR.** 10 µl av PCR-produktene ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard Lambda DNA-*BstE* II kuttet. Spor 1: PCR på isolert kromosomalt DNA fra *C. aurantiacus* for isolering av *groESL<sub>2</sub>*-operonet. Et bånd av forventet størrelse, 2000 bp. Spor 2: negativ kontroll for reaksjonen i spor 1. Spor 3 og 4: PCR på PCR-produktet fra spor 1 med genspesifikke primere for *groES<sub>2</sub>* med hhv. Vent polymerase og DyNAzyme EXT DNA-polymerase. Begge reaksjonene ga bånd av forventet størrelse, 325 bp. I spor 3 er det i tillegg en del "smear".

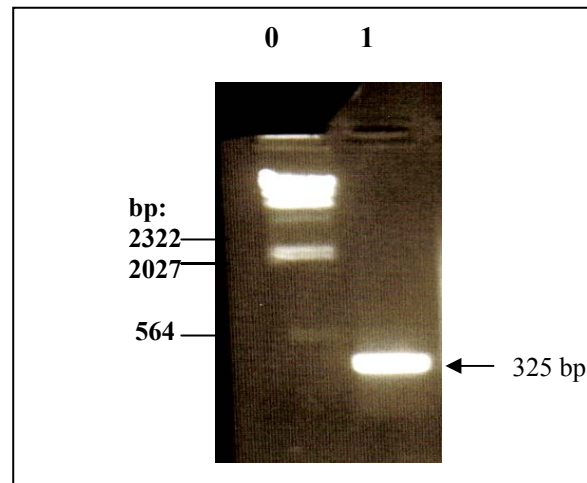


Det ble funnet to kodoner i 5' enden av *groES<sub>2</sub>* fra *C. aurantiacus* som er svært sjeldne i *E. coli*, og de to kodonene ble derfor forandret til mer vanlige kodoner ved hjelp av PCR, der foroverprimeren inneholdt mutasjonene. Reaksjonen ga et bånd av forventet størrelse, 325 bp og en del "smear". Resultatet er vist i figur 4.4. PCR-produktet ble rensert fra gelen og sekvensert. Sekvenseringsresultatene viste at de ønskede mutasjonene var blitt introdusert. PCR-produktet med de forandrede kodonene ble kalt for *mutgroES<sub>2</sub>*.



**Figur 4.4: Isolering av *mutgroES<sub>2</sub>* med PCR.** 10 µl av PCR-produktet ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard 100 bp ladder. Spor 1: et tydelig bånd av forventet str., 325 bp, og en del "smear".

Det var ønskelig å få uttrykt *mutgroES<sub>2</sub>* med en V5-epitop og en histidinhale for å øke størrelsen til proteinet med ~3 kDa, noe som ville gjøre det lettere å oppdage en eventuell ekspresjon av genet på en polyakrylamidgel. Genet *mutgroES<sub>2</sub>* ble amplifisert på ny med en reversprimer som gjorde at *mutgroES<sub>2</sub>* ville bli uttrykt i pET 101/D-TOPO vektoren med en V5-epitop og en histidinhale i proteinets C-terminale ende. Reaksjonen ga et bånd av forventet størrelse på 325 bp og resultatet er vist i figur 4.5. PCR-produktet ble kalt *mutgroES<sub>2</sub>V5his* og ligert inn i pET 101/D-TOPO vektoren. Sekvensering av PCR-produktet fra det isolerte plasmidet viste at *mutgroES<sub>2</sub>V5his* var blitt satt riktig inn i vektoren.

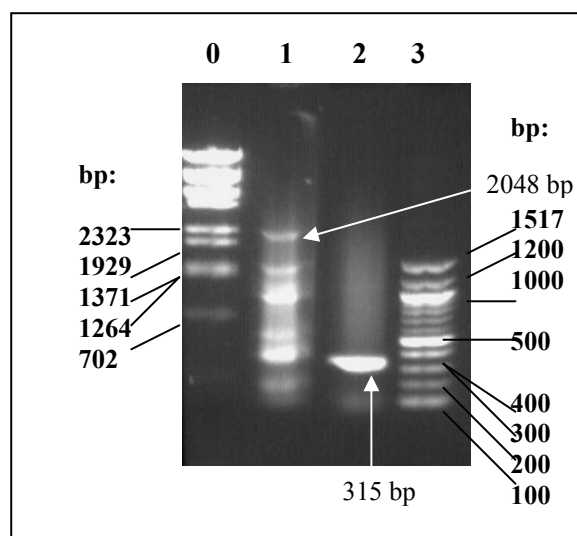


**Figur 4. 5: Isolering av *mutgroES<sub>2</sub>V5his* med PCR.** 10 µl av PCR-produktene ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard Lambda DNA/*Hind*III Marker 2. Spor 1: PCR-produktet: et bånd av forventet størrelse, 325 bp.

**Isolering av *groES* fra *E. coli*:** Genene *groES<sub>2</sub>*, *mutgroES<sub>2</sub>* og *mutgroES<sub>2</sub>V5his* fra *C. aurantiacus* ble ligert inn i pET 101/D-TOPO vektorer og forsøkt uttrykt som beskrevet i punktene 3.7.3 og 3.7.5, men det ble ikke observert ekspresjon i noen av tilfellene. Proteinene GroES og GroES<sub>2</sub> fra henholdsvis *E. coli* og *C. aurantiacus* er nokså like og *groES* fra *E. coli* ble isolert med PCR for å bli brukt som ekspresjonskontroll. I *E. coli* finnes det bare et *groESL*-operon som er ordnet slik at rekkefølgen er promoter-*groES*-*groEL*. På bakgrunn av gensekvensen for *groESL*-operonet, som ble funnet i EcoCyc databasen (<http://www.ecocyc.org/>), ble det laget genspesifikke primere for *groESL*-operonet: Foroverprimeren Eco1 innfører et CACC-overheng i 5' enden av *groES*. Reversprimeren Eco2 er laget slik at den fester seg litt nedstrøms for *groEL*-genet. Reversprimeren Eco3 er laget slik at den henter opp slutten av *groES*-genet, men tar ikke med stoppkodonet, men setter i stedet på en sekvens som koder for en histidinhale. Et stoppkodon var satt på etter sekvensen som koder for histidinhalen.

Det ble først utført PCR direkte på *E. coli* B kolonier for å få tak i hele *groESL*-operonet. DyNAzyme EXT DNA-polymerase ble benyttet (punkt 3.6.2). Primerene Eco1 og Eco2 ble benyttet som henholdsvis forover og reversprimer. Som DNA-templat ble det tilsatt litt av en koloni med en

steril tannpirker. Første denatureringstrinn var på 5 minutter, annealingtemperaturen var på 54 °C og siste elongeringstrinn var på 2 minutter. Resultatet er vist i figur 4.6. Reaksjonen ga omkring 5 bånd på gelen, der det største båndet var av forventet størrelse, 2048 bp. Båndet av riktig størrelse ble isolert fra gelen og 10 µl ble brukt som templat (~1 ng/µl) for nok en PCR med primerene Eco1 og Eco3 som henholdsvis forover og reversprimer for å isolere *groES*-genet. Vent polymerase ble benyttet. Første denatureringstrinn var på 1 minutt, annealingtemperaturen var på 61 °C og siste elongeringstrinn var på 1 minutt. Reaksjonen ga ett bånd av forventet størrelse, 315 bp, og resultatet er vist i figur 3.6. Båndet på 315 bp ble isolert fra gelen og sekvensert. PCR-produktet ble kalt *E. coli groES-6xhis*. Sekvenseringsresultatet viste at det var *groES* som var blitt isolert.

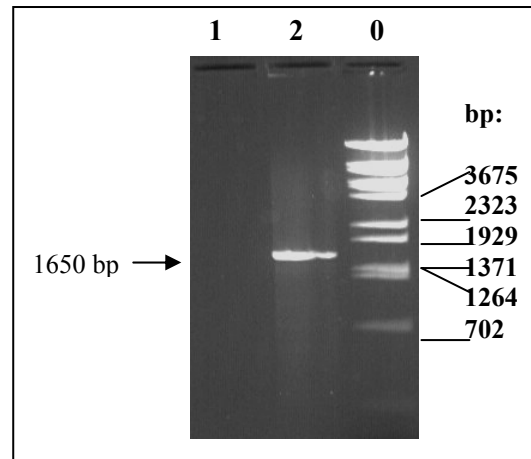


**Figur 4.6: Isolering av *groESL* og *groES* fra *E. coli* med PCR.** 10 µl av PCR-produktene ble analysert på en 1 % agarosegel. spor 0: størrelsesstandard Lambda DNA-*BstE* II kuttet. Spor 1: PCR for isolering av *groESL*-operonet med genspesifikke primere for *groESL*-operonet. Båndet på 2048 bp var av forventet størrelse. Spor 2: PCR for isolering av *groES*: et bånd av forventet størrelse, 315 bp. Spor 3: størrelsesstandard 100 bp DNA Ladder.

#### 4. 1. 3 Isolering av *groEL*<sub>2</sub>

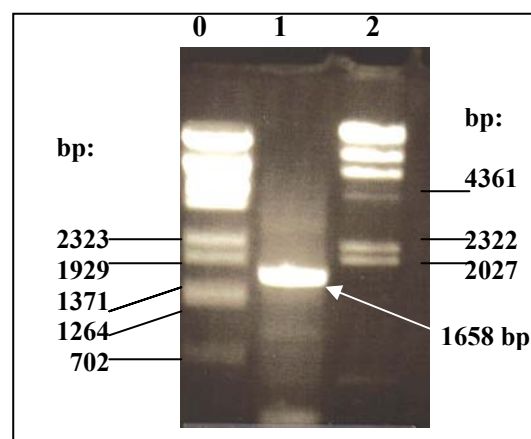
Det ble forsøkt å isolere *groEL*<sub>2</sub> ved hjelp av PCR på kromosomalt DNA fra *C. aurantiacus* ved bruk av genspesifikke primere for *groEL*<sub>2</sub>, som beskrevet i punkt 3.6.3. Resultatet er vist i figur 4.7 og ga et bånd av forventet størrelse på 1650 bp. Sekvensering av PCR-produktet bekreftet at det var *groEL*<sub>2</sub>-genet som var blitt isolert. PCR-produktet ble kalt *groEL*<sub>2</sub>.





**Figur 4.7: Isolering av *groEL<sub>2</sub>* fra *C. aurantiacus* med PCR.** 10 µl av PCR-produktene ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard Lambda DNA-*BstE* II kuttet. Spor 1: negativ kontroll. Spor 2: PCR-produktet med genspesifikke primere for *groEL<sub>2</sub>*: et bånd av forventet størrelse, 1650 bp.

For at *groEL<sub>2</sub>* skulle kunne uttrykkes fra pET/D-TOPO vektoren som et protein som lar seg rense på for eksempel en nikkelsøyle, ble genet amplifisert på ny med en reversprimer som ville føre til at den C-terminale enden på proteinet får en histidinhale. Reaksjonen ga et bånd av forventet størrelse, 1658 bp, og en del "smear". Resultatet er vist i figur 4.8. PCR-produktet ble kalt *groEL<sub>2</sub>-6xhis* og ligert inn i pET 101/D-TOPO vektoren. Sekvensering av PCR-produktet fra det isolerte plasmidet (PCR på plasmid-vektorer er beskrevet i punkt 3.7.4) viste at de ønskede kodonene for histidin var satt riktig på.



**Figur 4.8: Isolering av *groEL<sub>2</sub>-6xhis* med PCR.** 10 µl av PCR-produktene ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard Lambda DNA-*HindIII* Marker 2. Spor 1: PCR-produktet: et bånd av forventet størrelse, 1658 bp. Spor 2: størrelsesstandard Lambda DNA-*HindIII* Marker 2.

## 4. 2 Ekspresjon av *groESL*-genene

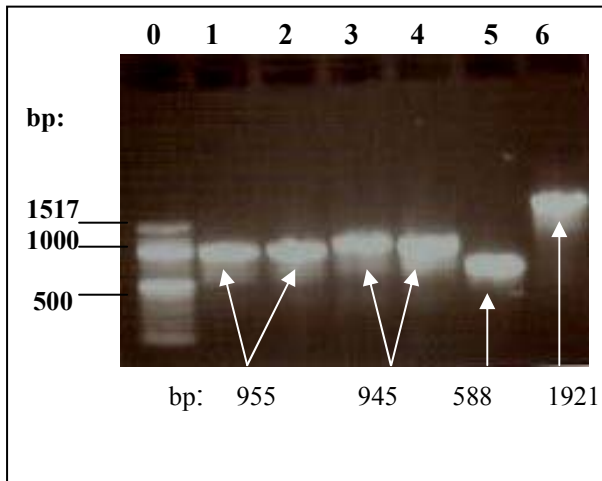
Ekspresjon av *groESL*-genene ble forsøkt på ulike måter for å optimalisere ekspresjonsnivåene, som beskrevet i punkt 3.7.5. Konsentrasjonen av IPTG og ampicillin under forsøket hadde lite å si for hvor vellykket ekspresjonen ble. Det samme var tilfellet når forsøkene ble gjort over lang tid i romtemperatur istedenfor 6-8 timer ved 37 °C. Genene *groEL<sub>2</sub>-6xhis* og *E. coli groES-6xhis* ble uttrykt uansett konsentrasjon av IPTG og ampicillin eller temperatur. Tilsats av 1 % glukose i mediet under ekspresjonen derimot, hemmet ekspresjonen av de heterologe genene.

### 4. 2. 1 Analyse av transformanter

**PCR på kolonier og isolerte plasmider:** Primerene T7 og T7 revers fester seg henholdsvis 93 bp oppstrøms og 170 bp nedstrøms for kloningssetet i pET 101/D-TOPO vektoren, slik at når PCR ble utført på dette plasmidet var resultatet produkter som var 263 bp lenger enn de heterologe genene i plasmid-vektorene. I pET 102/D-TOPO vektoren fester T7 og T7 primerene seg henholdsvis 466 bp oppstrøms og 164 bp nedstrøms for kloningssetet, slik at når PCR ble utført på dette plasmidet var resultatet produkter som var 630 bp lenger enn de heterologe genene i plasmid-vektorene. Resultatene fra PCR på isolerte pET 101/D-TOPO vektorer med *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>-6xhis* og isolerte pET 102 /D-TOPO vektorer med *mutgroES<sub>2</sub>* og *E. coli groES-6xhis* er vist i figur 4.9. Når PCR ble utført på pET 101/D-TOPO vektorene var produktene av forventet størrelse, dvs. 588 bp for *mutgroES<sub>2</sub>* (*mutgroES<sub>2</sub>* er på 325 bp + litt av vektoren, 263 bp = 588 bp) og 1921 bp for *groEL<sub>2</sub>-6xhis* (*groEL<sub>2</sub>-6xhis* er på 1658 bp + litt av vektoren, 263 bp = 1921 bp). Kromatogrammet fra sekvenseringen av *groEL<sub>2</sub>-6xhis*-innskuddet i pET 101/D-TOPO vektoren er vist i appendiks 2.

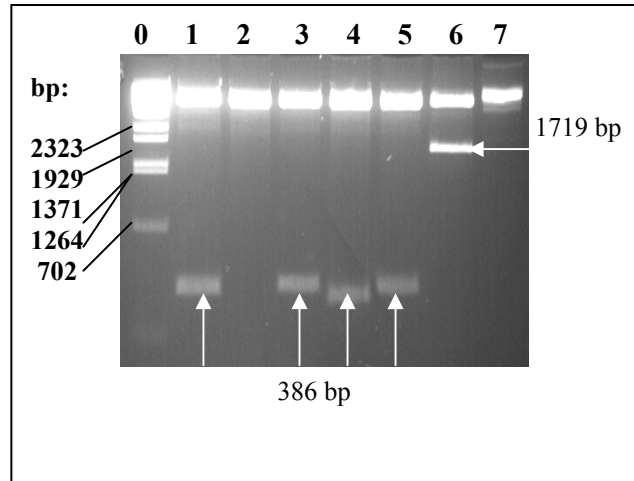
Tilsvarende ga PCR på pET 102/D-TOPO vektorene også produkter av forventet størrelse, dvs. 955 bp for *mutgroES<sub>2</sub>* (*mutgroES<sub>2</sub>* er på 325 bp + litt av vektoren, 630 bp = 955 bp) og 945 bp for *E. coli groES-6xhis* (*E. coli groES-6xhis* er på 315 bp + litt av vektoren, 630 bp = 945 bp).

**Kutting med restriksjonsenzym:** Figur 4.10 viser resultatene når restriksjonsenzymene *XbaI* og *SacI* ble brukt til å kutte pET 101/D-TOPO vektorene med *groES<sub>2</sub>*- og *groEL<sub>2</sub>-6xhis*-innskudd. Restriksjonsenzymene *XbaI* og *SacI* kutter henholdsvis 50 bp oppstrøms og 11 bp nedstrøms for kloningssetet i vektoren, og kutting med disse restriksjonsenzymene resulterte derfor i utkuttete fragmenter som var 61 bp lenger enn de heterologe genene i plasmid-vektorene. Kuttreaksjone ga bånd av forventet størrelse, 1719 bp for *groEL<sub>2</sub>-6xhis* (*groEL<sub>2</sub>-6xhis* er på 1658 bp + litt av vektoren, 61 bp = 1719 bp) og 386 bp for *groES<sub>2</sub>* (*groES<sub>2</sub>* er på 325 bp + litt av vektoren 61 bp = 386 bp).



**Figur 4.9: PCR på isolerte plasmider.**

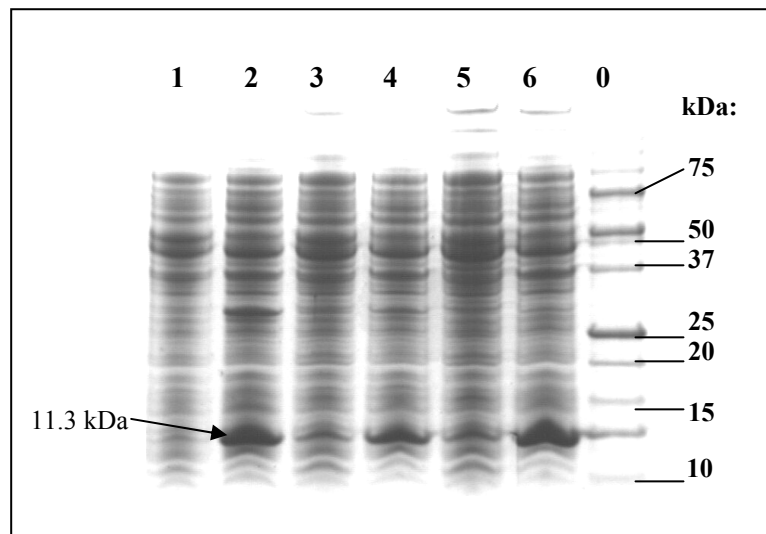
10  $\mu$ l ble analysert på en 1 % agarosegel. Spor 0: størrelsesstandard 100 bp DNA Ladder. Spor 1 og 2: PCR på pET 102/D-TOPO vektor med *mutgroES<sub>2</sub>*. Et bånd av forventet str. på 955 bp. Spor 3 og 4: PCR på pET 102/D-TOPO vektor med *E. coli groES-6xhis*. Et bånd av forventet str. på 945 bp. Spor 5: PCR på pET 101/D-TOPO vektor med *mutgroES<sub>2</sub>*: et bånd av forventet str. på 588 bp. Spor 6: PCR på pET101/D-TOPO vektor med *groEL<sub>2</sub>-6xhis*: et bånd av forventet str. på 1921 bp.



**Figur 4.10: Kuttereksjon på pET 101/D-TOPO vektoren med *SacI* og *XbaI*.** Spor 0: størrelsesstandard Lambda DNA-*BstE* II kuttet. Spor 1-5: kuttereksjon med *groES<sub>2</sub>*. I spor 2 ble ikke innskuddet kuttet ut. Ellers ga alle de andre reaksjonene bånd av forventet str. på 386 bp. Spor 6: kuttereksjon med *groEL<sub>2</sub>-6xhis*. Et bånd av forventet str. på 1719 bp. Spor 7: ukuttet kontrollplasmid.

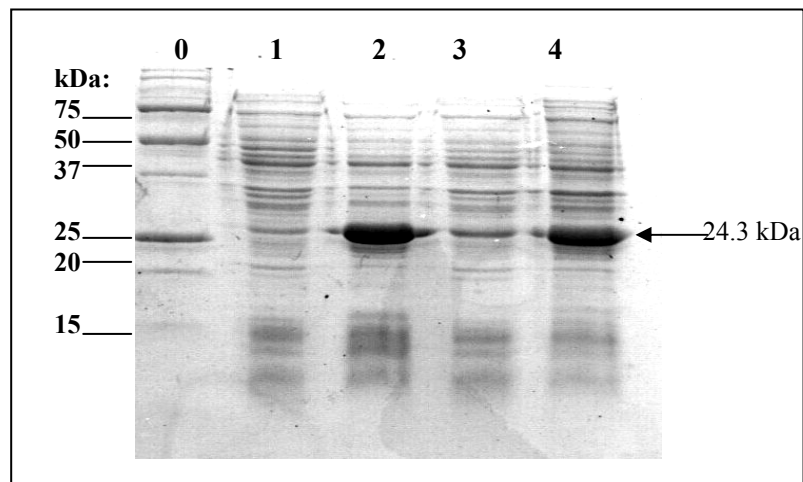
#### 4. 2. 2 Ekspresjon av *groES<sub>2</sub>*

Det ble ikke observert ekspresjonsprodukter verken fra *groES<sub>2</sub>*, *mutgroES<sub>2</sub>* eller *mutgroES<sub>2</sub>V5his* fra pET 101/D TOPO vektoren. Det ble spekulert i om årsaken til dette kunne være elektroforesesystemet som ble benyttet til å analysere ekspresjonsforsøkene. "Vanlig" SDS-PAGE gir ikke god oppløsning av proteiner under 15 kDa og da den forventede størrelsen til ekspresjonsproduktene av *groES<sub>2</sub>* og *mutgroES<sub>2</sub>* var på 11.3 kDa og ekspresjonsproduktet av *mutgroES<sub>2</sub>V5his* hadde en forventet størrelse på 14.3 kDa, ble ekspresjonsforsøkene analysert med tricin-SDS-PAGE og med phast-systemet (punkt 3.4.2). Disse elektroforesesystemene gir bedre oppløsning av proteiner under 15 kDa. Det ble imidlertid ikke observert noen ekspresjon med disse systemene. Som en kontroll på at tricin-SDS-PAGE og phast-systemet fungerte som de skulle og virkelig ga god oppløsning av proteiner under 15 kDa, ble *E. coli groES-6xhis* uttrykt med pET 101/D-TOPO vektoren. Resultatet er vist i figur 4.11. Ekspresjon av et protein av forventet størrelse, 11.3 kDa ble observert på en 16.5 % tricin-polyakrylamidgel.



**Figur 4.11: Ekspresjon av *groES-6xhis* fra *E. coli*.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1, 3 og 5: uinduserte prøver etter hhv. 2, 4 og 6 timer. Spor 2, 4 og 6: induserte prøver etter hhv. 2, 4 og 6 timer. Et bånd av forventet størrelse, 11.3 kDa, er merket av med pil.

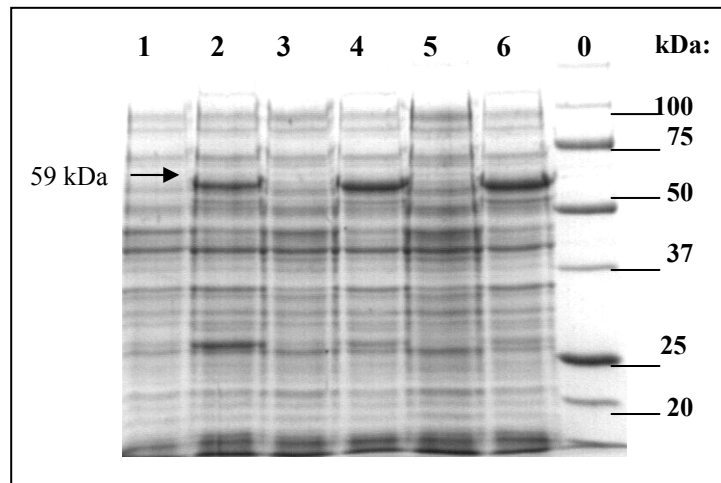
Det viste seg at *mutgroES<sub>2</sub>* lot seg uttrykke som fusjonsprotein når det var fusert med tioredoksin. Resultatet er vist i figur 4.12. Ekspresjonen av et protein av forventet størrelse, 24.3 kDa (molekylvektene til GroES<sub>2</sub> og tioredoksinfusjonen er henholdsvis 11.3 og 13 kDa), ble observert på en 18 % polyakrylamidgel.



**Figur 4.12: Ekspresjon av *mutgroES<sub>2</sub>* som fusjonsprotein til tioredoksin.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1 og 3: uinduserte prøver etter hhv. 2 og 3 timer. Spor 2 og 4: induserte prøver etter hhv. 2 og 3 timer. Et bånd av forventet størrelse, 24.3 kDa, er merket av med pil.

### 4. 2. 3. Ekspresjon av *groEL*<sub>2</sub>-6xhis

Ekspresjon av *groEL*<sub>2</sub>-6xhis ble utført som beskrevet i punkt 3.7.5. med pET 101/D-TOPO vektoren. Resultatet er vist i figur 4.13. Ekspresjon av et protein av forventet størrelse, 59 kDa ble observert på en 10 % polyakrylamidgel.



**Figur 4.13: Ekspresjon av *groEL*<sub>2</sub>-6xhis.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1, 3 og 5: uinduserte prøver etter hhv. 2, 4 og 6 timer. Spor 2, 4 og 6: induserte prøver etter hhv. 2, 4 og 6 timer. Båndet av forventet størrelse, 59 kDa, er merket av med pil.

## 4. 3 Analyse av cellefrie ekstrakter fra *C. aurantiacus* dyrket under ulike former for stress

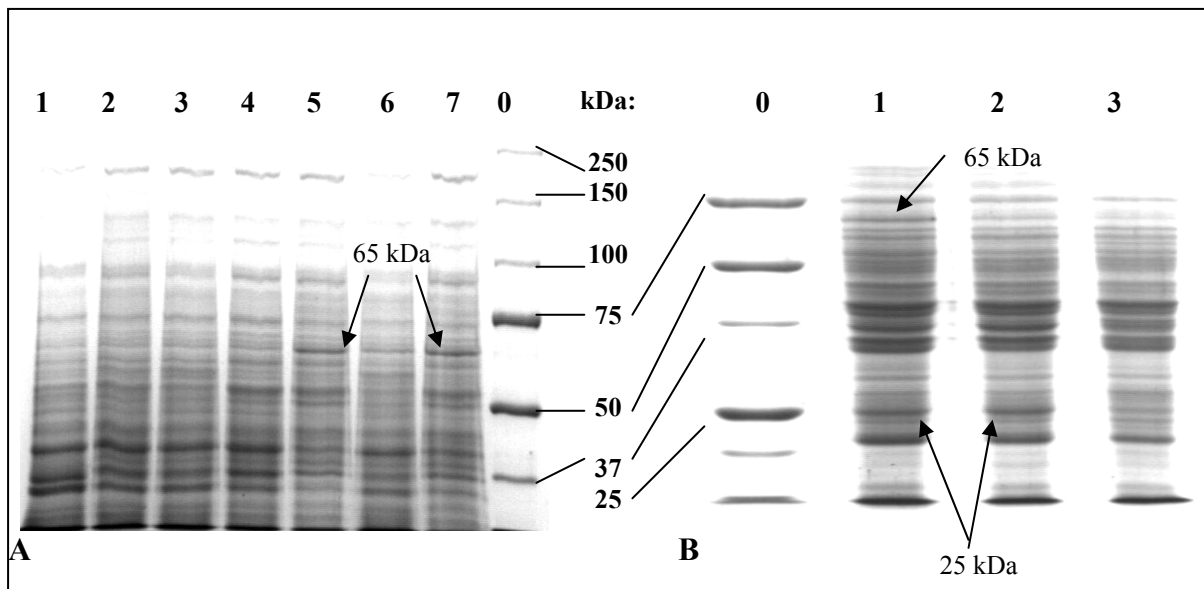
### 4. 3. 1 Saltstress

Celler av *C. aurantiacus* ble dyrket ved saltstress som beskrevet i punkt 3.2.1.2 a, og cellefritt ekstrakt ble analysert på en 10 % polyakrylamidgel. Resultatet er vist i figur 4.14 A. Her går det frem at cellefritt ekstrakt fra celler som var dyrket med 7.5 og 10 % NaCl i mediet viste økning i ekspresjon av et protein på rundt 65 kDa.

### 4. 3. 2 Lysstress

Celler av *C. aurantiacus* ble dyrket under lysstress ved å øke lysintensiteten, som beskrevet i punkt 3.2.1.2 b. Tiden for å nå OD<sub>600</sub> på 1.0 varierte med lysintensiteten: Cellene vokste raskest ved middels eller sterk lysstyrke. Fargen på cellekulturene varierte også med intensiteten på lyset: Cellekulturene fra forhold med sterkt lys, middels sterkt og svakt lys ble henholdsvis rødoransje, oransje og grønne. Forskjellen i farge på cellekulturene er mest sannsynlig et resultat av ulike

pigmentproduksjon. Cellefritt ekstrakt ble analysert på en 10 % polyakrylamidgel og resultatene er vist i figur 4.14 B. Cellefritt ekstrakt fra celler som var dyrket i sterkt lys viste en økning i ekspresjon av et protein på rundt 65 kDa og et på rundt 25 kDa. Cellefritt ekstrakt fra celler dyrket ved middels sterkt lys viste også økning i ekspresjonen av et protein på rundt 25 kDa. Cellefritt ekstrakt fra celler dyrket ved svakt lys viste ingen forskjell i proteinkspresjon sammenlignet med kontrollen (resultatet er ikke vist i figur 4.14 B).

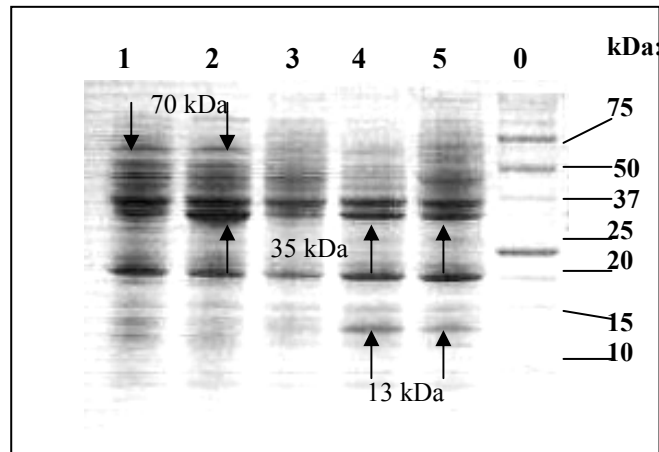


**Figur 4.14: Cellefritt ekstrakt fra *C. aurantiacus* dyrket under saltstress og lysstress. Bilde A: Saltstress.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1, 3 og 6: kontroll dyrket under normale forhold. Spor 2, 4, 5 og 7: prøver fra NaCl i mediet på hhv. 2.5, 5.0, 7.5 og 10 %. Båndene på ~65 kDa er merket av med pil. **Bilde B: Lysstress.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1: prøve fra sterkt lys. Båndene på ~65 kDa og ~25 kDa er merket av med pil. Spor 2: prøve fra middels sterkt lys. Båndet på ~25 kDa er merket av med pil. Spor 3: kontroll dyrket under normale forhold.

### 4. 3. 3 pH-stress

Celler av *C. aurantiacus* ble dyrket ved pH-stress som beskrevet i punkt 3.2.1.2 c. Veksten var best rundt pH 8.0 og ved pH lavere enn 7.0 var veksten tydelig langsommere enn kontrollen. Høy pH påvirket ikke veksten i like stor grad som lav pH, og ved høy pH vokste cellene nesten like raskt som kontrollen.

Cellefritt ekstrakt fra celler som hadde vært dyrket ved pH 6.5, 10.0 og 11.0 og deretter analysert på en 16.5 % tricin-polyakrylamidgel, viste økt ekspresjon av et protein på rundt 35 kDa, slik det går frem av figur 4.15. I tillegg var det økning i ekspresjon av et protein på rundt 70 kDa i celler som hadde vært dyrket ved pH 5.0 og 6.5. Cellefritt ekstrakt fra celler som hadde vært dyrket ved pH 10.0 og 11.0 viste også økning i ekspresjon av et protein på omkring 13 kDa.



**Figur 4.15: Cellefritt ekstrakt fra *C. aurantiacus* dyrket under pH-stress.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1, 2, 4 og 5: prøvene fra bakteriekulturene med pH-verdier på hhv. 5.0, 6.5, 10.0 og 11.0. Båndene på ~35 kDa, ~70 kDa og ~13 kDa er merket av med pil. Spor 3: kontroll dyrket under normale forhold.

#### 4. 3. 4 Etanolstress

Celler av *C. aurantiacus* ble dyrket ved etanolstress som beskrevet i punkt 3.2.1.2 d, og cellefritt ekstrakt ble analysert på en 10 % polyakrylamidgel. Det ble ikke observert noen forandringer i proteinekspressjonen i forhold til kontrollen. Resultatet er ikke vist.

#### 4. 3. 5 Oksidativt stress

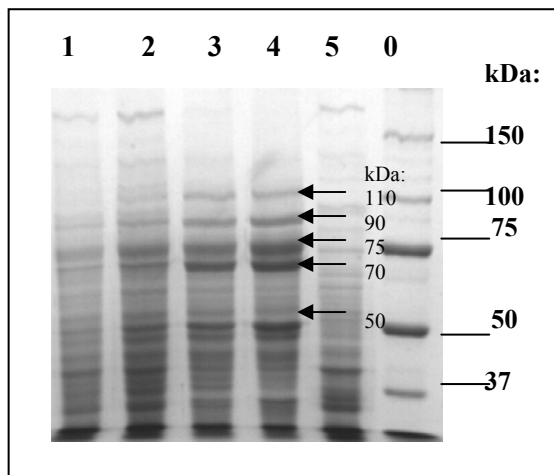
Celler av *C. aurantiacus* ble dyrket ved oksidativt stress ved tilsats av luft i flaskene som beskrevet i punkt 3.2.1.2 e. Cellekulturene sluttet å vokse da de fikk erstattet N<sub>2</sub> gass med luft og etter noen dager hadde OD<sub>600</sub> gått fra omkring 1.0 til omkring 0.6. Cellefritt ekstrakt ble analysert på en 10 % polyakrylamidgel. Det ble ikke observert noen forandringer i proteinekspressjonen i forhold til kontrollen. Resultatet er ikke vist.

#### 4. 3. 6 Hydrogenperoksid-stress

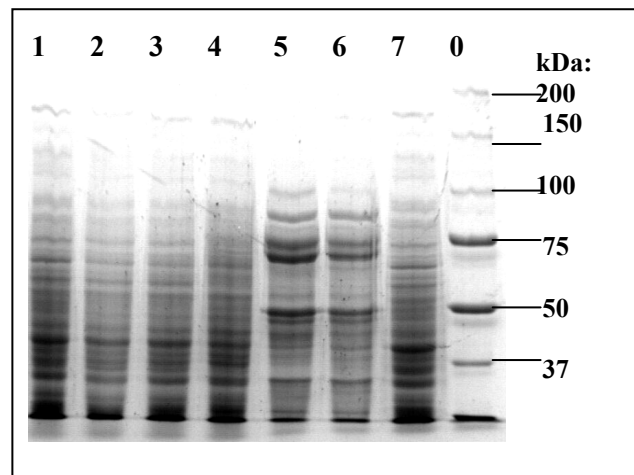
Celler av *C. aurantiacus* ble dyrket i nærvær av ulike konsentrasjoner av hydrogenperoksid som beskrevet i punkt 3.2.1.2 f. Dersom cellene inneholder katalase vil det bli frigjort O<sub>2</sub> når H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tilsettes, og man kan på denne måten lage oksidativt stress. Cellefritt ekstrakt ble analysert på 10 % polyakrylamidgeler. Figur 4.16 viser cellefritt ekstrakt fra celler dyrket ved økende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjoner og viser en økning i ekspresjon av rundt 5 proteiner på omkring 50, 70, 75, 90 og 110 kDa når H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-konsentrasjonen i mediet var på 10 og 20 mM. En konsentrasjon på 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ga sterkere ekspresjon av proteinene enn 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cellefritt ekstrakt ble også analysert på en 16.5 % tricin-polyakrylamidgel for å se etter økning i ekspresjon av små proteiner, men det ble ikke observert noen forandringer i forhold til kontrollen (resultatet er ikke vist). Figur 4.17 viser cellefritt ekstrakt fra

celler utsatt for 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsperioder. 4 timer med eksponering for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ga sterkest ekspressjon av proteinene.

**Katalasetesten:** Katalasetesten ble utført på celler av *C. aurantiacus* som beskrevet i punkt 3.2.1.3. Dersom katalase er tilstede dannes O<sub>2</sub>-gass som i mikroskopet kan sees som bobler, men det ble ikke observert O<sub>2</sub>-dannelse.



**Figur 4.16: Cellefritt ekstrakt fra *C. aurantiacus* dyrket med ulike konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1, 2, 3 og 4: prøver fra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasjoner på hhv. 2.5, 5.0, 10.0 og 20.0 mM. Båndene på ~50, 70, 75, 90 og 110 kDa er merket av med pil. Spor 5: kontroll

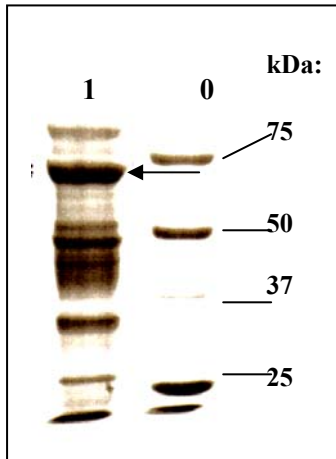


**Figur 4.17: Cellefritt ekstrakt fra *C. aurantiacus* utsatt for 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ulike tidsperioder.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1, 2, 3, 4, 5 og 6: 20 mM hydrogenperoksid i hhv. 5 minutter, 30 minutter, 1 time, 2 timer, 4 timer og 5 timer. Spor 7: kontroll.

**Isolering av 70 kDa protein:** Det ble bestemt at proteinet på omkring 70 kDa, som økte i ekspressjon ved hydrogenperoksid-stress skulle isoleres og N-terminal aminosyresekvenseres.

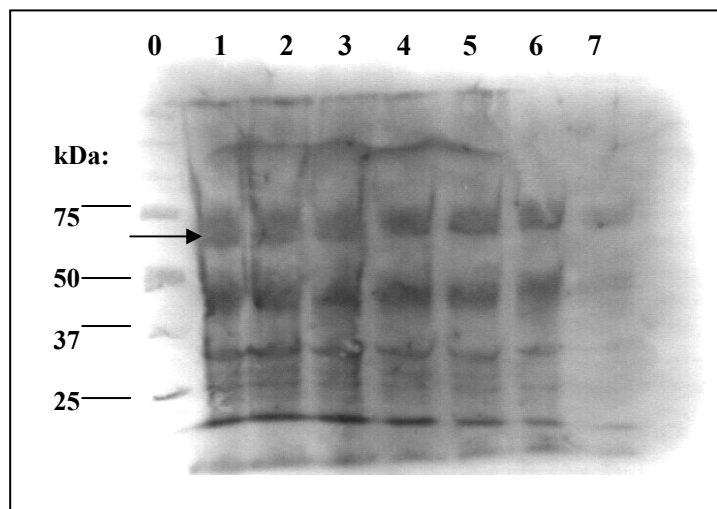
Det ble først forsøkt å isolere ~70 kDa proteinet med RP-HPLC. Dette ble utført av avdelingsingeniør Dimitrios Manzilas. Prøvene ble redusert og alkylert som beskrevet i punkt 3.4.4.1 før de ble satt på RP-HPLC. Frysetørkede proteinprøver fra RP-HPLC ble analysert med SDS-PAGE for å undersøke om isoleringen hadde vært vellykket. Resultatet er vist i figur 4.18. Selv om ~70 kDa proteinet ble noe mer renset (sammenlignet med spor 4 i figur 4.16), var det fortsatt ikke rent nok til å N-terminal aminosyresekvenseres. Det ble derfor bestemt at proteinet i stedet skulle isoleres ved hjelp av elektroblotting.





**Figur 4.18: Rensing av ~70 kDa protein med RP-HPLC.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1: prøven fra RP-HPLC. ~70 kDa proteinet er merket av med pil.

Elektroblotting ble utført som beskrevet i punkt 3.4.5. Resultatet av elektroblottingen er vist i figur 4.19. Båndene på ~70 kDa ble kuttet ut fra membranen og sendt til N-terminal aminosyresekvensering (punkt 3.4.4).



**Figur 4.19: Bilde av PVDF-membran som viser resultatet av elektroblottingen.** Spor 0: Precision Plus Protein™ Standards Unstained. Spor 1-7: cellefritt ekstrakt fra celler av *C. aurantiacus* dyrket i 4 timer med 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i mediet. Båndet på ~70 kDa er merket av med pil.

Tabellen fra den N-terminale aminosyresekvenseringen er vist i appendiks 3 og viser hvor mye det var av hver aminosyre i hvert sekvenseringstrinn. Utfra denne tabellen bestemte professor Knut Sletten at den N-terminale enden av det isolerte proteinet fra PVDF-membranen var: G-A-S-G-X-V-X-G-X-A-X-X-V, der X er en ukjent aminosyre. Denne sekvenserte N-terminale enden ble sammenlignet med aminosyresekvensene til GroEL<sub>2</sub>, GroEL<sub>1</sub> (utledet proteinsekvens fra genet


Chlo02000504 i *C. aurantiacus* databasen) og DnaK (utledet proteinsekvens fra genet Chlo02003974, som er et antatt *dnaK*-gen, i *C. aurantiacus* databasen), men det var ingen likhet mellom disse.

De fleste katalaser finnes som tetramerer med subenheter på 55-65 kDa, og den sekvenserte N-terminale enden ble også sammenlignet med konsensussekvensen for katalase. Konsensussekvensen for katalase ble funnet med programmet i BLAST: "Search the conserved domain database" (rpsblast), der det ble det satt opp en flersekvenssammenstilling av aminosyresekvensene for katalase fra 20 ulike bakterier. Utfra flersekvenssammenstillingen ble det laget en konsensussekvens for katalase (konsensussekvensen til katalase ble benyttet fordi det ikke ble funnet noe gen for katalase i *Chloroflexus aurantiacus* databasen). Det var ingen likhet mellom den sekvenserte N-terminale enden fra PVDF-membranen og katalase-konsensussekvensen.

Det ble også gjort BLASTP-søk (blastp = proteinsøkersekvens mot proteindatabase) med den sekvenserte N-terminale enden med programmet "search for short, nearly exact matches", som er optimalisert for å få treff med korte søkersekvenser, mot alle databasene for *Bacteria*. Søkersekvensen som ble benyttet var i dette tilfellet: M-G-A-S-G-X-V-X-G-X-A-X-X-V (en metionin ble satt på i den N-terminale enden fordi den N-terminale metioninen trolig var blitt fjernet posttranslasjonelt hos det isolerte proteinet fra PVDF-membranen). To av de beste treffene fra BLASTP-søket er vist i figur 4.20. De beste treffene hadde lavest "Expect-verdi". "Expect-verdien" sier noe om hvor stor sannsynlighet det er å få et tilfeldig treff til en ikke-homolog sekvens i databasen. Jo lavere "Expect-verdi", jo bedre er treffet.

For videre å undersøke om disse treffene var aktuelle, ble konsensussekvensene fra de to treffene brukt til enda et BLASTP-søk (konsensussekvensene for proteinene ble funnet på samme måte som konsensussekvensen for katalase, beskrevet ovenfor), denne gangen mot sekvensene i *Chloroflexus aurantiacus* databasen, men ingen av resultatene ga noe fornuftig svar: Konsensussekvensen fra det antatte propionyl-CoA karboksyl transferaseproteinene fra figur 4.20 ga for eksemplet treff på en acetyl-CoA karboksylase hos *C. aurantiacus*. Dette proteinet inneholder ikke noen M-G-A-S-G-X-V-X-G-X-A-X-X-V-sekvens i den N-terminale enden, dessuten har proteinet en utregnet molekylvekt på 57 kDa, og ikke 70 kDa slik det isolerte proteinet fra PVDF-membranen har.

Enda en N-terminal sekvensering ble utført på membranbitene fra nok en elektroblotting (resultatet av blottingen er ikke vist), men sekvenseringen ga ikke mer informasjon om proteinets N-terminale ende enn det som ble kjent etter den første sekvenseringen.

[gi|31620056|emb|CAD95400.1](#)  PROBABLE PROPIONYL-COA CARBOXYLASE BETA CHAIN 5 ACCD5 (PCCASE) (PROPANOYL-COA: CARBON DIOXIDE LIGASE) [*Mycobacterium bovis* AF2122/97]

Length = 548

Score = 19.7 bits (39), Expect = 3224

Identities = 6/7 (85%), Positives = 6/7 (85%)

Query: 1 MGASGXV 7

MGASG V

Sbjct: 460 MGASGAV 466

[gi|46201281|ref|ZP\\_00055391.2](#) COG1452: Organic solvent tolerance protein OstA [*Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1]

Length = 819

Score = 19.7 bits (39), Expect = 3254

Identities = 6/7 (85%), Positives = 6/7 (85%)

Query: 1 MGASGXV 7

MGASG V

Sbjct: 163 MGASGNV 169

**Figur 4.20: Resultater av BLASP-søk med den sekvenserte N-terminale aminosyresekvensen.**

## 5 DISKUSJON

### 5.1 Isolering av *groESL*-genene

Det finnes som nevnt i innledningen to *groESL*-operoner i *C. aurantiacus*, *groESL<sub>1</sub>* og *groESL<sub>2</sub>*, der *groESL<sub>1</sub>* uttrykkes i økt grad ved bakteriens maksimumstemperatur. Et sentralt spørsmål i denne sammenhengen er hvorfor *C. aurantiacus* har to *groESL*-operoner. Tilstedeværelsen av flere *groESL*-operoner kan ha betydning ved at de gir bakterien fleksibilitet ved varierende miljøbetingelser og fysiologiske krav. Genduplikering kan ha fordeler slik som for eksempel økt ekspresjon av det gjeldende proteinet avhengig av hva slags forhold bakterien befinner seg i, og dessuten gir det en forsikring mot mutasjoner. De to *groESL*-operonene i *C. aurantiacus* er ganske like, men det er bare *groESL<sub>2</sub>*-operonet som har et CIRCE-element, og ekspresjon av dette operonet har enda ikke blitt påvist *in vivo*. Figur 5.1 viser DNA-sekvensen til *groESL<sub>2</sub>* med utledete proteinsekvenser.

```

-35                -10                CIRCE
1  TTGACAAACCGACCGTTCTTGTGTACTATTACCAACGGATTAGCACTCTCGACGTGACAG 60

                                                S/D
61  TGCTAATTCATGGAACCTTCGCACATTGGAAGAAACCTAATACCAAACGGAGGATAGCAG 120

121 CTatggcggatttcgcatccgacccttggcgaccgtgtggtggtcaagccggtagagc 180
1   M A D F R I R P L G D R V V V K P V E R 20

181 gtgaagagaagaccaagaccggcatttacctgcctgatacggccagcaaagagcgcccaa 240
21  E E K T K T G I Y L P D T A S K E R P M 40

241 tgaaggcacggtgctggcagttggtgagggctgcctgatgacaatggcaagctgatcc 300
41  E G T V L A V G E G R R D D N G K L I P 60

301 cgatgaacgtcaaagttggcgaccgctgatccttcgccaagtacagcggcaccgaattca 360
61  M N V K V G D R V I F A K Y S G T E F K 80

361 agctcgatgatgtcgagtacctgatcctgtcggagaaggacattctgggtatcgttcagg 420
81  L D D V E Y L I L S E K D I L G I V Q E 100
                                     S/D
421 agtaaCAACGTCGCGCAAGTAGCGCTATTCTCAAGGGAGGATTATAGATCCTatgccaaa 480
1   *                                     M P K 3

481 gcagctttattttcaacgaagaggcacgccgtgcctgaagcgtggtgtagacctggttgc 540
4   Q L Y F N E E A R R A L K R G V D L V A 23

541 tgatgcggtaaagaccacgctcgcccgcgcggtcgcaatgtggcaattgacaagaagtt 600
24  D A V K T T L G P R G R N V A I D K K F 43

601 tggttcgccgacggttaaccacgacggtgtgacggtcggaaggagatcgagctgaagga 660
44  G S P T V T H D G V T V A K E I E L K D 63

661 tcccttcgagaacatgggtgcgcaactgctcaaggaggctgcgaccaagaccaacgatgt 720
64  P F E N M G A Q L L K E A A T K T N D V 83

721 ggccggtgacggtaccaccacggcgacggtgctggtcaggccatcgtcaccgaggtct 780
84  A G D G T T T A T V L A Q A I V T E G L 103

781 gaaggtagtagccgcccggcgccaacgccatgctgctcaagcgtggtcttgatcgcggtgc 840
104 K V V A A G A N A M L L K R G L D R G A 123

841 cgaggccctggtagccgctatcaaggcgagtgccgtaccggttcgcgaccgcgccgacat 900
124 E A L V A A I K A S A V P V R D R A D I 143

901 tgcccacggttgccaccaactcggcggtgacagcgaaattggtgagctgatcgccgaagt 960
144 A H V A T N S A A D S E I G E L I A E V 163

```

```

961 gatggagaaggttgccaaggacgggtgtgatcaccggtgaagagtcgaagggcggttacctt 1020
164 M E K V G K D G V I T V E E S K G V T F 183

1021 cgagaaggaatacacccaaggtatgcagttcgaccggggctacatttcggggttacatggt 1080
184 E K E Y T E G M Q F D R G Y I S G Y M V 203

1081 caccaacgtcgaacgccaggaagccgagcttgatgaaccgtacatcctgattactgacaa 1140
204 T N V E R Q E A E L D E P Y I L I T D K 223

1141 gaagattagcagcattcaggaatcctgccgggtgctcgagaaggtggtgaggtgacgaa 1200
224 K I S S I Q E I L P V L E K V L Q V T K 243

1201 gaacttcgtcatcatcgctgaagacggttgatggcgaagcgctggcgaagcggtggtcaa 1260
244 N F V I I A E D V D G E A L A T L V V N 263

1261 caagctgctggcagcatcaatgccctggccgctcaaggcgccctggcttcgggtgatcgccg 1320
264 K L R G T I N A L A V K A P G F G D R R 283

1321 caaggccatgctgcaggacattgctatttctcaccgggtggcaccgctcatcagcgaggagat 1380
284 K A M L Q D I A I L T G G T V I S E E I 303

1381 tggccgcaagctcgatagcgccactatcgaggacctgggcccgcgcgcaaggtgattgc 1440
304 G R K L D S A T I E D L G R A R K V I A 323

1441 aaccaaggatgacacgcagcattatcgagggccgctggcgatgagggcgcgatccgcgcccg 1500
324 T K D D T T I I E G R G D E A A I R A R 343

1501 catcgagcagatccgcgcccagattgcaaccaccaccagtgactttgatcgcgagaagct 1560
344 I E Q I R A Q I A T T T S D F D R E K L 363

1561 gcaagagcgggtggccaagctggccgggtggtggtggtggtgatcaaggtcggtgctgcgac 1620
364 Q E R L A K L A G G V A V I K V G A A T 383

1621 cgagcctgagctgaaggagaagaagcaccgcgctgaggacgcctgagtgcaaccctgctgc 1680
384 E P E L K E K K H R V E D A L S A T R A 403

1681 tgccggtgaagagggatcgtgcccgggtggtggtggtgctcgcgctgatcaacgctattccggc 1740
404 A V E E G I V P G G G V A L I N A I P A 423

1741 gctcgacaacgtgcaggttgctcacgaagacgagaaggttggtctccagattctgcgccg 1800
424 L D N V Q V A H E D E K V G L Q I L R R 443

1801 tgcgctcgaggagccgctgctgcatcctggcccgcgaacgcccgggtgaggacgggttcgggtgat 1860
444 A L E E P L R I L A R N A G E D G S V I 463

1861 tatcgccaatgtccgccgcctgcaagaggagaaggggtgacaagaccatcggttacaacgt 1920
464 I A N V R R L Q E E K G D K T I G Y N V 483

1921 gctgaccgggtcagatggcagcatgatcgagcagggcatcatcgaccgggtgaaggtcac 1980
484 L T G Q Y G S M I E Q G I I D P V K V T 503

1981 ccgcagcgtgtacagaacgcggtttcgattgccgggtatgatcctgaccaccgagggcgct 2040
504 R S A V Q N A V S I A G M I L T T E A L 523

2041 gattaccgacattcctgaggacaagccggcggaactccggggcggcggtggcggggatgga 2100
524 I T D I P E D K P A A T P G A G G G M D 543

2101 cttctaa 2107
544 F * 544

```

**Figur 5.1: DNA-sekvensen til *groESL<sub>2</sub>*-operonet med utledete proteinsekvenser.** Operonet *groESL<sub>2</sub>* i *C. aurantiacus* er på 1986 bp og består av det 303 bp lange *groES<sub>2</sub>*-genet og det 1636 bp lange *groEL<sub>2</sub>*-genet. Geneene er separert av en 47 bp ikke-kodende sekvens. Nukleotidesekvensen oppstrøms for *groES<sub>2</sub>* bærer CIRCE-sekvensmotivet og antatte husholdningspromotere -35 og -10. Shine-Dalgarno sekvenser finnes oppstrøms både for *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>*. CIRCE-elementet ligger nedstrøms for de antatte -35 og -10 promoterelementene og omtrent 50 bp oppstrøms for startkodonet til *groES<sub>2</sub>*. Antatte promoterelementer (-35 og -10), CIRCE-sekvensmotivet og Shine-Dalgarno sekvenser (S/D) er understreket og uthevet.

Genet *groES<sub>2</sub>* ble først forsøkt isolert med spesifikke primere for genet, FPET10 og RPET10. Dette ga, som figur 4.2 viser, 6-8 bånd på gelen, noe som antakeligvis betyr at de genspesifikke primerene ikke var spesifikke nok. Det kan også bety at polymerasen som ble benyttet, Vent polymerase, ikke fungerte optimalt. Vent DNA-polymerase har 3'-5' korrekturlesende eksonukleaseaktivitet og fordi over 95 % av PCR-produktene har butte ender, var polymerasen anbefalt av pET/D-TOPO-kittene. Det lyktes å isolere *groES<sub>2</sub>* med FPET10 og RPET10 primerene med *groESL<sub>2</sub>*-operonet som DNA-templat. Det ble imidlertid oppdaget at polymerasene Vent og DyNAzyme EXT DNA-polymerase ga ulike resultater med PCR. Slik figur 4.3 viser ga Vent polymerasen flere uspesifikke bånd, mens DyNAzyme EXT DNA-polymerase ga ett band av forventet størrelse. Det er ikke ukjent at noen polymeraser brukt i PCR virker bedre enn andre. Noen korrekturlesende polymeraser stopper elongeringen når feil nukleotide settes inn, og dette kan igjen gi opphav til flere korte PCR-produkter. DyNAzyme EXT DNA-polymerasen er et rekombinant enzym laget av DyNAzyme II DNA-polymerase og et korrekturlesende enzym. Polymerasen er laget for å tåle et bredt spekter av pH-verdier og Mg<sup>2+</sup>- og dNTP-konsentrasjoner.

Genet *groES<sub>2</sub>* ble også amplifisert med en primer som forandret sjeldne kodoner til kodoner som er mer vanlige i *E. coli*. For å undersøke at mutasjonene var korrekt innsatt ble PCR-produktet sekvensert. Dette er nødvendig fordi korrekturlesende polymeraser har en tendens til å degradere enkeltrådet-DNA (primere) en base av gangen fra 3' enden under PCR-reaksjonen. Lange primere degraderes raskere enn korte primere. Sekvenseringsresultatene viste at mutasjonene ble korrekt innført i *mutgroES<sub>2</sub>*.

Flere av *groESL*-genene ble amplifisert og isolert med reversprimere som gjør at genproduktene vil ha en histidinhale i proteinets C-terminale ende. Vektoren pET 101/D-TOPO er laget slik at heterologe gener kan uttrykkes med en V5-epitop og en histidinhale. Vektoren har imidlertid ikke noe kuttesete for en protease som kan fjerne V5-epitopen fra histidinhalen på proteinet. Det var derfor ønskelig å sette på histidinhalen direkte på de heterologe proteinenes C-terminale ende slik at de eventuelt kan renses og brukes til senere forsøk uten at V5-epitopen henger på.

Histidinhalen består av 6 histidinresidier som gjør at proteinene lettere kan renses på for eksempel en nikkelsøyle, da histidin binder til metall-ioner som nikkell, sink og kobolt.

Noen kodoner brukes sjeldent i *E. coli* og det finnes derfor få tRNA-molekyler som gjenkjenner disse kodonene. Sjeldne kodoner på rad i et heterologt gen kan føre til et høyt nivå av skift i leseramme (Rosenberg *et al.*, 1993), noe som fører til avbrutte proteinprodukter, særlig fra store proteiner. Dette resulterer i peptider som mangler histidinhalen og disse vil ikke bli rensset. Det ble valgt å legge histidinhalen i den C-terminale enden, fordi da vil bare proteinene med full lengde bli rensset.

## 5. 2 Ekspresjon av *groESL*-genene

Det ble ikke observert ekspresjon av *groES<sub>2</sub>* alene, bare som fusjonsprotein med tioredoksin. Det er mange grunner til at et heterologt gen ikke lar seg uttrykke fra pET vektorer. Mulige årsaker til lav eller ingen ekspresjon er forklart nedenfor.

**Sjeldne kodoner.** Ikke alle de 61 kodonene brukes i like stor grad hos alle organismer. Hovedkodonene er de som forekommer i høyt uttrykkede gener, mens de sjeldne kodonene befinner seg i gener som uttrykkes i mindre grad (Zhang *et al.*, 1991). Hvilke kodoner som er sjeldne varierer fra organisme til organisme. Kodoner som uttrykkes sjeldent har få tilhørende tRNA-molekyler (Ikemura, 1981), så når kodonbruken i det heterologe genet er svært ulik kodonbruken i ekspresjonsverten, i dette tilfellet *E. coli*, kan det oppstå problemer under ekspresjonen fordi det ikke er nok tRNA tilstede. Problemer som kan oppstå er: lavere mRNA-stabilitet (fordi translasjonen går langsommere), for tidlig terminering av transkripsjonen og/eller translasjonen, noe som fører til proteinprodukter av ulike lengder. Det kan dessuten oppstå rammebytte og delesjoner, feilinkorporering av aminosyrer og inhibering av proteinsyntese og cellevekst. Som en følge av dette blir det ofte observert lav eller ingen ekspresjon av det heterologe genet. Ekspresjon av det heterologe genet blir spesielt påvirket når de sjeldne kodonene er i klynger og ligger i den N-terminale enden av den kodende sekvensen.

I *E. coli* er det særlig noen av kodonene for arginin (Arg), glycin (Gly), isoleucin (Ile) og prolin (Pro) som har få tilhørende tRNA-molekyler. Kodoner som er assosiert med ekspresjonsproblemer av heterologe gener er uthevet i tabell 5.1.

Når DNA-sekvensene til *groES<sub>2</sub>* og *groEL<sub>2</sub>* ble undersøkt for faktorer som kunne hindre ekspresjonen, viste det seg at *groES<sub>2</sub>* inneholder to sjeldne kodoner, CGA (arginin) og CCC (prolin), samt et litt mindre sjeldent kodon, CUU (leucin), rett etter hverandre i 5' enden. Genet *groEL<sub>2</sub>* inneholder totalt fire svært sjeldne kodoner: to CGG (arginin) og to CCC (prolin). Fordi de to sjeldne kodonene ligger så nær 5' enden av *groES<sub>2</sub>*, var det mulig å lage en foroverprimer som inneholdt både 5' CACC-overhenget, som var nødvendig for å kunne ligere PCR-produktet retningsbestemt til pET/D-TOPO vektoren, og to punktmutasjoner som forandret de to sjeldne kodonene til vanligere kodoner. En A ble erstattet med U slik at det sjeldne CGA-kodonet for arginin ble gjort om til CGU, som er et vanligere argininkodon i *E. coli*. En G som erstattet C gjorde det sjeldne CCC-kodonet for prolin om til CCG som er et vanligere prolinkodon i *E. coli*.

Karunakaran *et al.* (2003) fikk ikke uttrykt et *groEL*-gen fra *Chlamydiae trachomatis* i *E. coli* BL21(DE3) fordi genet inneholder fire svært sjeldne kodoner for AGG (arginin) og syv svært sjeldne kodoner for AUA (isoleucin). Ekspresjonen lyktes imidlertid ved bruk av *E. coli* stammen BL21 CodonPlus(DE3)-RIL, der cellene inneholder et plasmid med tRNA-kodende gener for de sjeldne arginin- og isoleucinkodonene.

Tabell 5.1: Oversikt over kodonbruk i *E. coli*

Arg, Gly, Ile, Leu og Pro kodonbruk i <i>E. coli</i>			
amino-syre	kodon	andel i alle gener	andel i klasseII
<b>Arg</b>	<b>AGG</b>	<b>0.022</b>	<b>0.003</b>
<b>Arg</b>	<b>AGA</b>	<b>0.039</b>	<b>0.006</b>
<b>Arg</b>	<b>CGG</b>	<b>0.098</b>	<b>0.008</b>
<b>Arg</b>	<b>CGA</b>	<b>0.065</b>	<b>0.011</b>
Arg	CGU	0.378	0.643
Arg	CGC	0.398	0.330
Gly	GGG	0.151	0.044
<b>Gly</b>	<b>GGA</b>	<b>0.109</b>	<b>0.020</b>
Gly	GGU	0.337	0.508
Gly	GGC	0.403	0.428
<b>Ile</b>	<b>AUA</b>	<b>0.073</b>	<b>0.006</b>
Ile	AUU	0.507	0.335
Ile	AUC	0.420	0.659
Leu	UUG	0.129	0.034
Leu	UUA	0.131	0.055
Leu	CUG	0.496	0.767
<b>Leu</b>	<b>CUA</b>	<b>0.037</b>	<b>0.008</b>
Leu	CUU	0.104	0.056
Leu	CUC	0.104	0.080
Pro	CCG	0.525	0.719
Pro	CCA	0.191	0.153
Pro	CCU	0.159	0.112
<b>Pro</b>	<b>CCC</b>	<b>0.124</b>	<b>0.016</b>

Kodonbruken uttrykkes som andelen av alle mulige kodoner for en gitt aminosyre. "Alle gener" er andelen representert i samtlige av *E. colis* 4.290 gener. "Klasse II" er andelen representert i 195 gener som uttrykkes i stor grad og kontinuerlig under eksponentiell vekst. Sjeldne kodoner som er assosiert med ekspresjonsproblemer av heterologe gener er uthevet.

Genet *mutgroES<sub>2</sub>*, som er *groES<sub>2</sub>*-genet der de sjeldne kodonene er forandret til mer vanlige kodoner, lot seg heller ikke uttrykke fra pET 101/D-TOPO vektoren. Sjeldne kodoner var dermed trolig ikke årsaken til at det ikke ble observert ekspresjon av *groES<sub>2</sub>*.

I endogene *E. coli* proteiner har det blitt rapportert om halveringstider for proteiner på under 2 minutter når følgende aminosyrer ligger etter den N-terminale formylmetioninen: Arginin, lysin, phenylalanin, leucin, tryptofan og tyrosin. Ingen av disse aminosyrene ble funnet i starten av verken GroEL<sub>2</sub> eller GroES<sub>2</sub>.



**DNA og mRNA.** Halveringstiden for mRNA i *E. coli* er mellom 30 sekunder og 20 minutter, og disse molekylene er dermed relativt ustabile. *E. coli* stammen BL21 Star(DE3) har et mutert Rnase E enzym som mangler evnen til å degradere mRNA, noe som resulterer i økt mRNA-stabilitet.

Tilstedeværelsen av inverterte palindromer i DNA kan resultere i dannelsen av hårnålstrukturer i mRNA ved transkripsjon. Slike hårnålstrukturer i det heterologe genet kan bidra til at det blir mindre kontakt mellom DNA og mRNA, som igjen kan føre til at T7 RNA-polymerasen dissosierer fra DNA-templatet slik at transkripsjonen opphører. Sekundærstrukturer i mRNA kan dessuten interagere med AUG-startkodonet og/eller ribosombindingssetet. Det ble ikke undersøkt om det var inverterte palindromiske sekvenser i DNA- eller mRNA-sekvensen til *groES<sub>2</sub>*.

Det er vist hos *Rhodobacter sphaeroides* at CIRCE-elementet danner en stabil RNA-sekundærstruktur som har en stabiliserende effekt på *groESL*-mRNA, særlig under normale vekstforhold (Jäger *et al.*, 2004). I *C. aurantiacus* har *groES<sub>2</sub>* et CIRCE-element plassert oppstrøms for seg. Det er mulig at *groES<sub>2</sub>* ikke lot seg uttrykke i *E. coli* fordi *groES<sub>2</sub>*-genet i pET-systemet mangler CIRCE-elementet til å stabilisere transkriptet.

**Proteolytisk degradering.** Heterologe gener som uttrykkes i *E. coli* kan bli nedbrutt av proteaser i vertcellen. Stammen BL21 Star(DE3) mangler nøkkelproteasen Lon og har en mutasjon i proteasen i ytre membran, noe som reduserer degraderingen av de heterologe proteinene som uttrykkes. Til tross for dette kan en årsak til lav eller ingen ekspresjon være at proteinet raskt degraderes av andre proteaser i cytoplasma. Dersom proteinet er lite (<10 kDa) anbefales det at proteinet uttrykkes med et N-terminalt fusjonsprotein. Protein GroES<sub>2</sub> er 11.3 kDa og en mulig årsak til at det ikke ble observert noe ekspresjon kan være at proteinet ble degradert av proteaser. Det ble imidlertid heller ikke observert ekspresjon når *mutgroES<sub>2</sub>* ble forsøkt uttrykt med V5-epitop og histidinhale, som skulle øke proteinets størrelse til 14.3 kDa.

**Inclusion bodies.** Promoteren T7 er en sterk promoter som raskt produserer store mengder protein. En ulempe ved dette kan være at for rask ekspresjon og dermed for store mengder protein fører til "inclusion bodies". Dette er store mengder aggregerte proteiner som ofte er ukorrekt foldet og dermed inaktive. Dannelse av "inclusion bodies" er ganske vanlig når heterologe gener overuttrykkes i bakterier. Den nøyaktige sammensetningen av "inclusion bodies" er ikke kjent, men i tillegg til det uttrykte proteinet inneholder de ofte chaperoner og enkelte komponenter fra cellemembranen. Ved hvert ekspresjonsforsøk ble alltid bunnfallet etter sentrifugeringen, som inneholdt uløselig protein, undersøkt for eventuelle inclusion bodies, med det ble aldri oppdaget noe.

**Toksisk protein.** Genprodukter som påvirker vertcellens vekst ved lave konsentrasjoner anses som toksiske. Toksisitet fører ofte til tap av plasmid eller langsom vekst i forhold til kontrollen.

Det ble forsøkt å regulere ekspresjonen av *groES*<sub>2</sub> i tilfelle toksisitet av GroES<sub>2</sub> var årsaken til lav eller ingen ekspresjon. Tilsats av glukose i mediet under ekspresjonsforsøket undertrykker ekspresjonen av T7 RNA-polymerase, noe som i sin tur vil føre til at mindre av det heterologe genet uttrykkes (se figur 3.4 for hvordan pET-systemet virker). Lite glukose i cellen stimulerer produksjon av cAMP, som binder seg til proteinet CRP. Sammen stimulerer cAMP-CRP RNA-polymerase til å binde til *lacUV5*-promoteren slik at genet som koder for T7 RNA-polymerase transkriberes. Når glukose er tilstede i cellen derimot, vil ikke cAMP bli laget. Tilsats av 1 % glukose i mediet hadde ingen ting å si for ekspresjonen av *groES*<sub>2</sub>, og da IPTG-induserte cellekulturer ikke vokste noe særlig dårligere enn den uinduserte kontrollen, er det lite sannsynlig at toksisitet var årsaken til at det ikke ble observert ekspresjon av *groES*<sub>2</sub>.

**Isoelektronisk punkt.** Proteinets isoelektroniske punkt (pI) er den pH-verdien der proteinets nettoladning er null. Hos *Rhodobacter sphaeroides* ble det blant annet på bakgrunn av et høyt isoelektronisk punkt (pI: 11.6), utregnet fra den utledete aminosyresekvensen for *groES*, konkludert med at genet var et pseudogen (Lee *et al.*, 1997). Proteinets GroES<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus* har et isoelektrisk punkt på 5.3 som er omtrent likt som det isoelektroniske punktet til GroEL<sub>2</sub> og *E. coli* GroES-6xhis som er på henholdsvis 5.1 og 6.1.

Det ble valgt å uttrykke *groES* fra *E. coli* samtidig som *groES*<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus* som en positiv kontroll. Chaperoninene i *E. coli* og *C. aurantiacus* er ganske like; aminosyresekvensene til GroES fra *E. coli* og GroES<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus* har en likhet på 50 %. Proteinets LacZ, som ble uttrykt fra pET 101/D/lacZ-TOPO og pET 102/D/LacZ-TOPO vektorene, ble først benyttet som positiv kontroll, men fordi dette proteinet er på 120 kDa og såpass mye større enn GroES<sub>2</sub> var det ønskelig å ha en positiv kontroll som var likest mulig GroES<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus*, blant annet for å undersøke om tricin-SDS-PAGE og phast-systemet virkelig ga oppløsning av proteiner i 10 kDa-området. Genet *groES-6xhis* fra *E. coli* lot seg uttrykke og ble observert på gelen (figur 4.11) noe som betyr at tricin-SDS-PAGE og phast-systemet fungerte som de skulle.

En vanlig strategi for å unngå noen av problemene som er forbundet med heterolog genekspresjon i *E. coli* er å ligere det aktuelle genet til et annet gen, som man vet blir uttrykt i stor grad i *E. coli*. Genet *mutgroES*<sub>2</sub> lot seg uttrykke som fusjonsprotein til tioredoksin. Tioeredoksiner er en stor familie redoksproteiner som finnes i alle slags organismer. Hovedfunksjonen til disse enzymene er redokskatalyse. Tioeredoksin uttrykkes i stor grad i *E. coli*, og ved å plassere *mutgroES*<sub>2</sub> i den C-terminalene enden av tioredoksin kan dette ha gitt en effektiv start på translasjonen av *groES*<sub>2</sub>.

Disulfidbindinger kan være viktige stabiliserende strukturer for proteiner, men det reduserende miljøet i *E. coli* cytoplasma gjør det vanskelig med dannelse av stabile disulfidbindinger. Det er en mulighet at overekspresjonen av tioredoksin eller tioredoksinfusjoner forandrer redoksmiljøet i *E. coli* cytoplasma, eller at tioredoksin virker direkte på det heterologe proteinet som

en protein-disulfidoksidoreduktase og hjelper det i å folde ved å gi riktig dannelse av disulfidbindinger. Det kan derfor være tilfelle at tioredoksin har en stabiliserende effekt ved å hjelpe GroES<sub>2</sub> med å beholde sin native konformasjon. Tioredoksin translokteres dessuten til periplasma og akkumulerer i høye konsentrasjoner, en egenskap som gjør at nedbrytingen av endogene proteaser forhindres.

Forventet størrelse av tioredoksin-GroES<sub>2</sub> fusjonen var 24.3 kDa. Ut fra bildet i figur 4.12, som viser ekspresjonen av tioredoksin-GroES<sub>2</sub>, kan det se ut som det uttrykte fusjonsproteinet er noe større enn 24.3 kDa. For å være helt sikker på at det virkelig er tioredoksin-GroES<sub>2</sub> som uttrykkes, kan man utføre en immunoblott med ANTI-GroES som antistoff. Dersom antistoffet binder seg til det antatte tioredoksin-GroEL<sub>2</sub>-båndet kan man være temmelig sikker på at GroES<sub>2</sub> har blitt uttrykt. Dette har enda ikke blitt utført.

### 5.3 Dyrking av *C. aurantiacus* under ulike former for stress

Det ble valgt å utsette celler av *C. aurantiacus* hovedsakelig for stressfaktorer som organismen utsettes for i naturen. For *C. aurantiacus* omfatter dette blant annet varme (analyse av cellefritt ekstrakt fra *C. aurantiacus* dyrket ved høye temperaturer har vært utført tidligere og ble derfor ikke utført her), oksidativt stress, sterkt lys, samt lav og høy pH. Det ble også valgt å utsette cellene for saltstress og etanolstress, da disse faktorene også kan føre til denaturerte proteiner som igjen kan føre til økt ekspresjon av chaperoniner.

I forsøk 3.2.1.2 f, ble det tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i cellekulturen. Hensikten med å tilsette H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> var å få laget oksidativt stress i form av O<sub>2</sub>, fordi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vil bli omdannet til O<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O dersom cellene inneholder enzymet katalase. Katalasetesten ble utført på *C. aurantiacus* uten at det ble påvist katalase. En mulig forklaring på det kan være at det bare produseres katalase dersom cellene utsettes for oksidativt stress. En annen mulighet kan være at *C. aurantiacus* kulturene har vært dyrket anaerobt i en årrekke på laboratoriet slik at evnen til å produsere katalase har gått tapt, ettersom cellene ikke har blitt utsatt for oksidativt stress.

Det ble søkt etter katalasegenet i det ikke helt sammensatte *C. aurantiacus* genomet, men det ble ikke funnet noe.

Ved Arizona State University, USA, arbeider en gruppe, ledet av Robert Blankenship, med superoksid dismutase fra *C. aurantiacus*. Etter e-post utvekslinger med denne gruppen ble det kjent at de har prøvd å isolere katalasegenet fra *C. aurantiacus* uten å lykkes. De har utført ulike katalasetester på *C. aurantiacus*, men ikke registrert noe aktivitet. De har heller ikke klart å finne genet for noen kjent katalase i *C. aurantiacus* genomet, men de har funnet et antatt gen som koder for glutathion peroksidase. Glutathion peroksidase er et viktig antioksidantenzym som katalyserer reduksjonen av

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til H<sub>2</sub>O ved at glutation oksideres. Det er mulig at *C. aurantiacus* ikke har katalase, men bruker peroksidaser for å fjerne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i cellen.

Den beregnede intracellulære konsentrasjonen av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i voksende *E. coli* er bare 20 nM (Seaver og Imlay, 2001), men fordi små mengder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> omdannes så raskt i bakteriekulturer, er det vanlig å tilsette millimolare mengder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i mediet for å få oksidativt stress. I denne oppgaven ble det brukt konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inntil 20 mM. Det er mulig at slike mengder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan ha skapt skader i cellene som er sjeldne ved fysiologiske nivåer.

I forsøk 3.2.1.2 e, der celler av *C. aurantiacus* ble utsatt for oksidativt stress ved tilsatt av luft til flaskene, var det ingen forskjell i proteinekspresjon i forhold til kontrollen. Hvor mye O<sub>2</sub> som løste seg opp i mediet og dermed ga oksidativt stress er uvisst.

I forsøk 3.2.1.2 c, der celler fra *C. aurantiacus* ble dyrket ved pH-verdier fra 5.0 til 11.0, måtte det benyttes ulike buffere i mediet som virker optimalt ved de ulike pH-verdiene. I bakteriekulturer kan pH-verdien lett stige eller synke som resultat av metabolske reaksjoner som frigjør eller tar opp protoner fra mediet. Hovedfunksjonen til buffere i dyrkingsmedier er å holde pH-verdien omtrent konstant. Buffere virker bare over et visst pH-område slik at ulike buffere må benyttes ved ulike pH-verdier. Tris-HCl for eksempel er en dårlig buffer under pH 8.0 og ble bare benyttet i mediene med pH 8.0-11.0. Kalium-fosfatbuffer er ikke så effektiv over pH 7.5 og ble benyttet i mediene med pH 6.0-7.5. Acetatbuffer er mest effektiv ved pH 4.8 og ble benyttet i mediet med pH 5.0. Det var uproblematisk å holde pH-verdiene konstant i cellekulturene med pH 8.0-11.0. I cellekulturene med pH under 7.5 derimot, var det problematisk å holde pH-verdien lav nok. Det ble derfor tilsatt buffer til mediene til sluttkonsentrasjoner på 20 mM og 40 mM av henholdsvis kalium-fosfatbufferen acetatbufferen. Dette er ganske høye konsentrasjoner sammenlignet med Tris-HCl, som ble benyttet i mediene med pH 8.0-11.0, med en sluttkonsentrasjon på 10 mM.

Det er kjent at buffere med uorganiske forbindelser, for eksempel fosfat, kan reagere med enzymer eller deres substrater og påvirke aktiviteten. Det er mulig at de høye konsentrasjonene av kaliumfosfat- og acetatbufferene kan ha virket hemmende på veksten av *C. aurantiacus* og til og med påvirket proteinekspresjonen.

Det ble ikke observert ekspresjon av verken *groESL<sub>1</sub>* eller *groESL<sub>2</sub>* ved de valgte stressfaktorene *C. aurantiacus* ble utsatt for i denne oppgaven. Det er godt mulig at GroEL ikke uttrykkes i økt grad under de valgte stressfaktorene, eller at syntesen av GroEL hadde gått litt tilbake på det tidspunktet cellene ble høstet. Det er nemlig kjent at varmesjokk-proteiner slik som GroEL og DnaK akkumulerer raskest under de tidlige fasene av stressjokk-responsen. Hos *Streptococcus mutans* ble det observert en sterk økning i DnaK- og GroEL-syntese når celler ble utsatt for syresjokk. Etter en kort stund ble det imidlertid registrert en sterk nedgang i GroEL, mens DnaK holdt seg på et høyt nivå (Lemos *et al.*, 2001).

En annen mulig årsak til at det ikke ble oppdaget chaperoninekspresjon kan være at metoden for å analysere resultatene ikke var optimal. Polyakrylamidgelene ble farget med Coomassie Blue etter

SDS-PAGE. Selv om de fleste proteiner blir farget, er det ikke alle som tar opp fargen med like stor affinitet, slik at små forandringer i ekspresjon er vanskelig å oppdage på gelen etter farging. Mer sensitive og informative studier på chaperoninekspresjon som respons på stress har vært utført ved å måle stress-responsen ved å radiomerke proteinene med  $^{35}\text{S}$  metionin (denne radiomerkede aminosyren settes til bakteriekulturene umiddelbart etter at stressfaktoren har blitt introdusert). Prøver tas deretter med intervaller og separeres på todimensjonal (2-D) SDS-PAGE. Radiomerking av proteinene gjør det mulig å se hvilke proteiner som syntetiseres til hvilken tid. 2-D SDS-PAGE tar lang tid å utføre, krever mye eksperimentering for å optimalisere, og det er vanskelig å rense proteinene fra gelen. Det er dessuten tidkrevende å arbeide med radioaktivitet. Forsøk av denne typen ble derfor ikke utført i denne oppgaven.

Figurene 4.14 A og B og figur 4.15 viser at et protein på omtrent 65 kDa ble uttrykt når *C. aurantiacus* ble utsatt for saltstress, sterkt lys og lav pH. Disse båndene kan være chaperonet DnaK. Molekylvekten til DnaK (utledet proteinsekvens fra et antatt *dnaK*-gen, Chlo02003974, i *C. aurantiacus* databasen) er nemlig 66.6 kDa. Det ble aldri vurdert å isolere proteinet på omkring 65 kDa, da ekspresjonsnivåene av dette proteinet var såpass lavt at isolering ville blitt svært vanskelig.

Figur 5.15 viser økt ekspresjon av et protein på omkring 35 kDa ved pH-stress. Dette proteinet kan muligens være DnaJ eller GrpE, som begge er ko-chaperoner til DnaK og som har en molekulvekt på omkring 40 kDa. Økt ekspresjon av GrpE ble observert hos *Lactococcus lactis* ved lav pH (Frees *et al.*, 2003). Figurene 4.14-4.16 viser dessuten at salt, lys, pH og  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stress induserer ekspresjon av flere andre andre proteiner. Hvilke proteiner dette kan være er ukjent, men det er en mulighet for at det er Clp- eller Lon-proteaser, da mange av disse proteasene er vanlige stressjokk-proteiner. Hos *L. lactis* har det for eksempel blitt observert økt ekspresjon av proteasen ClpE ved lav pH (Frees *et al.*, 2003).

Det er sannsynlig at proteiner som glutation peroksidase og katalase uttrykkes i økt grad ved  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stress. De to genene Chlo02002913 og Chlo02001611 fra *C. aurantiacus* databasen koder for antatte glutation peroksidaser med molekulvekter på henholdsvis 19 kDa og 17.8 kDa, men det ble ikke observert økt ekspresjon av proteiner i dette størrelsesområdet på gelen ved  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stress. Den sekvenserte N-terminale enden til det isolerte proteinet på omkring 70 kDa lignet ikke på konsensussekvensen for katalase, men det kan det hende at noen av de andre proteinene som økte i ekspresjon ved  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stress er katalase.

Aminosyresekvensen til den N-terminale enden av dette isolerte proteinet på PVDF-membranen inneholdt ikke noe N-terminalt metionin, noe som betyr at den N-terminale formylmetioninen må ha blitt fjernet posttranslasjonelt. Alle nysyntetiserte proteiner i *Bacteria* starter med N-formylmetionin, men formylgruppen fjernes alltid under translasjonen. I omtrent halvparten av proteinene fjernes dessuten den N-terminale metioninen også under translasjonen. Proteinprøven som ble sekvensert var ren og ikke degradert, men den inneholdt antakeligvis for lite protein eller var

blokkert i den N-terminale enden slik at bare 8 aminosyrer lot seg sekvensere. Den sekvenserte N-terminale enden var for kort til å bestemme hvilket protein den tilhørte.

## 5. 4 Forslag til videre arbeid

Tooming, 1998, påviste økt ekspresjon av GroEL<sub>1</sub> ved varmessress ved å analysere cellefritt ekstrakt med SDS-PAGE, og det hadde vært interessant å finne ut hvilke forhold som induserer ekspresjon av *groESL*<sub>2</sub>. Det har blitt utført foreløpige ekspresjonsstudier på *groESL*<sub>1</sub> og *groESL*<sub>2</sub> fra *C. aurantiacus* med real time RT-PCR (Patje, 2004, Semesteroppgave UiO) og det kunne blitt gjort et videre studium i ekspresjonen av disse genene, samt andre gener som koder for proteiner involvert i generelle stress-responser. Dette kan for eksempel gjøres med real time RT-PCR eller DNA-microarray. Et eksempel på et slikt studium kan være å se på forskjeller i genekspresjon ved to ulike betingelser, som for eksempel stress versus ikke stress. Genekspresjonen kan også studeres ved ulike tidspunkt etter eksponering for en stressfaktor. DNA-microarray er mindre sensitiv og mindre nøyaktig enn real time RT-PCR, men til gjengjeld kan tusenvis av gener studeres samtidig. Med real time RT-PCR må man plukke ut et par gener man ønsker å studere.

På bakgrunn av sekvensanalyse har et antatt *hrcA*-gen blitt funnet oppstrøms for *dnaK*-operonet i *C. aurantiacus*, og i likhet med *B. subtilis* befinner det seg et CIRCE-elementet oppstrøms for *hrcA*-genet (Patje, 2004, Semesteroppgave UiO). Det antatte *hrcA*-genet kan isoleres med PCR, overuttrykkes fra en ekspresjonsvektor og renses. For videre å sjekke om HrcA er et DNA-bindende protein og en negativ regulator på transkripsjonen, kan effekten av tilsatt HrcA måles på *in vitro* transkripsjonen av gener fra ekspresjonsvektorer med utvalgte promotere fra *C. aurantiacus* oppstrøms for seg. Repressjon av genene med et CIRCE-elementet oppstrøms for seg vil forventes. En annen fremgangsmåte for å se om HrcA/CIRCE systemet fungerer i *C. aurantiacus* er å inaktivere *hrcA*-genet og se om ekspresjonen av CIRCE-inneholdende gener øker under normale forhold. Liknende forsøk har blant annet blitt gjort med cyanobakterier (Nakamoto *et al.*, 2003).

Ifølge titrermodellen som er beskrevet for *B. subtilis* i punkt 1.2.2 er HrcA avhengig av GroEL for å kunne fungere som et DNA-bindende repressorprotein. For å undersøke om HrcA i *C. aurantiacus* er avhengig av GroEL for å være aktiv, kan man inkubere nativt HrcA ved høy temperatur med eller uten GroEL og så undersøke om tilstedeværelsen av GroEL påvirker den DNA-bindende repressoraktiviteten til HrcA. Dersom dette er tilfelle, styrkes teorien om at titrermodellen også virker i *C. aurantiacus*. Liknende forsøk har vært gjort med blant annet *Streptococcus thermophilus* (Martirani *et al.*, 2001) og *Bacillus stearothermophilus* (Mogk *et al.*, 1997).

Malat dehydrogenase (MDH) katalyserer den NAD(P)H avhengige reversible oksidasjonen av malat til oxaloacetat og er et av nøkkelenzymene i TCA syklus. Det har blitt utført termostabilitetsforsøk med MDH fra *C. aurantiacus* og mutanter av MDH har vært laget for å studere

det molekylære grunnlaget for termofili. Tidligere *in vitro* forsøk med GroEL og GroES (fra *E. coli*) og mtMDH (fra gris) har blant annet vist at GroEL og GroES hindrer termisk inaktivering av mtMDH med ATP tilstede (Hartman *et al.*, 1993) og at GroEL, GroES og ATP øker hastigheten av refoldingen til denaturert mtMDH (Ben-Zvi *et al.*, 1998). Et tilsvarende *in vitro* system kunne vært laget med GroES<sub>2</sub>, GroEL<sub>2</sub> og MDH fra *C. aurantiacus*. Dersom *groES*<sub>1</sub> og *groEL*<sub>1</sub> fra *C. aurantiacus* blir isolert kunne man uttrykt og renset GroES<sub>1</sub> og GroEL<sub>1</sub> og sammenlignet effekten av GroES<sub>2</sub> og GroEL<sub>2</sub> med GroES<sub>1</sub> og GroEL<sub>1</sub> på termostabiliteten til MDH. Aktiviteten til MDH kan måles spektrofotometrisk ved å følge oksidasjonen av NADH til NAD<sup>+</sup> ved 340 nm, da det bare er den reduserte formen som absorberer ved 340 nm.

Det har tidligere blitt utført komplementeringsforsøk der man har brukt *E. coli* mutanter uten varmetoleranse og så satt inn *groESL*-gener fra andre bakterier. Når operonet *groESL* fra *Vibrio cholerae* for eksempel ble satt inn i en varmeintolerant *E. coli* mutant, viste det at seg at man fikk komplementering av varmetoleranse når genene ble uttrykt i mutanten (Mizunoe *et al.*, 1999). Liknende studier kan utføres med *groESL*-operonene fra *C. aurantiacus*.

## REFERANSER

- Asadulghani, Suzuki, Y., Nakamoto, H. 2003. Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306: 872-879.
- Babst, M., Hennecke, H., Fischer, H.M. 1996. Two different mechanisms are involved in the heat shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.*, 19: 827-839.
- Badcoe, I.G., Smith, C.J., Wood, S., Halsall, D.J., Holbrook, J.J., Lund, P., Clarke, A.R. 1991. Binding of a chaperonin to the folding intermediates of lactate dehydrogenase. *Biochemistry*, 30: 9195-9200.
- Bauld, J., Brock, T.D. 1973. Ecological studies of *Chloroflexis*, a gliding photosynthetic bacterium. *Arch. Microbiol.*, 92: 267-284.
- Ben-Zvi, A.P., Chatellier J., Fersht, A.R., Goloubinoff, P. 1998. Minimal and optimal mechanisms for GroE-mediated protein folding. *Biochemistry*, 95: 15275-15280.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H.W., Stetter, K.O. 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* 1: 14-21.
- Bochkareva, E.S., Lissin, N.M., Girshovich, A.S. 1988. Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein. *Nature*, 336: 254-257.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. 1996. *Protein methods*. 2nd Edition. Wiley-Liss Inc.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., Sigler, P.B. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, 371: 578-586.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Puhler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thebault, P., Vandenbol M., Weidner, S., Galibert, F. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9877-9882.
- Castenholz, R.W., Pierson, B.K. 1995. Ecology of thermophilic anoxygenic phototrophs. In Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Bauer, C.E (ed.), *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Chaudhuri, T.K., Farr, G.W., Fenton, W.A., Rospert, S., Horwich, A.L. 2001. GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated. *Cell*, 107: 235-246.
- Coyle, J.E., Texter, F.L., Ashcroft, A.E., Masselos, D., Robinson, C.V., Radford, S.E. 1999. GroEL accelerates the refolding of hen lysozyme without changing its folding mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, 6: 683-690.
- De Leon, P., Marco, S., Isiegas, C., Marina, A., Carrascosa, J.L., Mellado, R.P. 1997. *Streptomyces lividans* *groES*, *groEL1*, and *groEL2*-genes. *Microbiology*, 143: 3563-3571.
- Doemel, W.N., Brock, T.B. 1974. Bacterial stromatolites: origin of laminations. *Science*, 184: 1083-1085.
- Eisenreich, W., Strauss, G., Werz, U., Fuchs, G., Bacher, A. 1993. Retrobiosynthetic analysis of carbon fixation in the phototrophic eubacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Eur. J. Biochem.*, 215: 619-632.
- El Hage, E., Sbai, A., Alix, J.H. 2001. The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 264: 796-808.
- Ellis, R.J., Hartl, F.U. 1996. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J.*, 10: 20-26.



- Epstein, C.J., Goldberger, R.F., Anfinsen, C.B. 1963. The genetic control of tertiary protein structure: studies with model systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 28: 439-449.
- Ericsson, M., Tärnvik, A., Kuoppa, K., Sandström, G., Sjöstedt, A. 1994. Increased synthesis of DnaK, GroEL, and GroES homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogen peroxide. *Infect immun.*, 62: 178-183.
- Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C. 1989. The *groES* and *groEL* heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.*, 171: 1379-1385.
- Fischer, H.M., Babst, M., Kaspar, T., Acuna, G., Arigoni, F., Hennecke, H. 1993. One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *EMBO J.*, 12: 2901-2912.
- Fischer, F., Zillig, W., Stetter, K.O., Schreiber, G. 1983. Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria. *Nature*, 301: 511-513.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y. 1997. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 812-814.
- Foster, J.W., Hall, H.K. 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 172: 771-778.
- Frees D, Vogensen F.K, Ingmer H. 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 293-300.
- Furuki, M., Tanaka, N., Hiyama, T., Nakamoto, H. 1996. Cloning, characterization and functional analysis of *groEL*-like gene from thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*, which does not form an operon with *groES*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1294: 106-110.
- Georgellis, D., Sohlberg, B., Hartl, F. U., von Gabain, A. 1995. Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 16: 1259-1268.
- Govezensky, D, Greener, T., Segal, G., Zamir, A. 1991. Involvement of GroEL in *nif* gene regulation and nitrogenase assembly. *J. Bacteriol.*, 173: 6339-6346.
- Grossman, A.D., Straus, D.B., Walter, W.A., Gross, C.A. 1987. Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes Dev.*, 1: 179-184.
- Gupta, R.S. 1995 Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-I) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.*, 15: 1-11.
- Hanada, S., Hiraishi, A., Shimada, K., Matura, K. 1995. *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 45: 676-681.
- Hartman, D.J., Surin, B.P., Dixon, N.E., Hoogenraad, N.J., Hoj, P.B. 1993. Substoichiometric amounts of the molecular chaperones GroEL and GroES prevent thermal denaturation and aggregation of mammalian mitochondrial malate dehydrogenase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2276-2280.
- Hayer-Hartl, M.K., Ewbank, J.J., Creighton, T.E., Hartl, F.U. 1994. Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin. *EMBO J.*, 13: 3192-3202.
- Hennequin, C., Collignon, A., Karjalainen, T. 2001. Analysis of expression of GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* in response to stress. *Microb. Pathog.*, 31: 255-260.
- Herbert, R., Sharp, R. 1992. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*. Chapman and Hall, NY.
- Herter, S., Busch, A., Fuchs, G. 2002. L-Malyl-coenzyme A lyase/beta-methylmalyl-coenzyme A lyase from *Chloroflexus aurantiacus*, a bifunctional enzyme involved in autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *J. Bacteriol.*,

- 184: 5999-6006.
- Heyde, M., Portalier R. 1990. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., 57: 19-26.
- Holo, H., Grace, D. 1987. Polyglucose synthesis studied by <sup>13</sup>C-NMR. Evidence for acetate metabolism by a new metabolic pathway in autotrophically grown cells. Arch. Microbiol., 148: 292-297.
- Holo, H. 1989. *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionat, a possible intermediate in the assimilation of CO<sub>2</sub> and acetate. Arch. Microbiol., 151: 252-256.
- Holo, H., Sirevåg, R. 1986. Autotrophic growth and CO<sub>2</sub> fixation of *Chloroflexus aurantiacus*. Arch. Microbiol., 145: 173-180.
- Homuth, G., Mogk, A., Schumann, W. 1999. Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis dnaK* operon. Mol. Microbiol., 32: 1183-1197.
- Hunt, J.F., Weaver, A.J., Landry, S.J., Gierasch, L., Deisenhofer, J. 1996. The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution. Nature, 379: 37-45.
- Iametti, S., Bera, A.K., Becchio, G., Grinberg, A., Bernhardt, R., Bonomi, F. 2001. GroEL-assisted refolding of adrenodoxin during chemical cluster insertion. Eur. J. Biochem., 268: 2421-2429.
- Ikemura, T. 1981. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. J. Mol. Biol., 146: 1-21.
- Imlay, J. A. 2003. Pathways of oxidative Damage. Annu. Rev. Microbiol., 57: 395-418.
- Jäger, S., Jäger, A., Klug, G. 2004. CIRCE is not involved in heat-dependent transcription of *groESL* but in stabilization of the mRNA 5'end in *Rhodobacter capsulatus*. Nucleic Acids Res., 32: 386-396.
- Karunakaran, K.P., Noguchi, Y., Read, T.D., Cherkasov, J.K., Shen, C., Nelson, C.C., Brunham, R.C. 2003. Molecular analysis of the multiple GroEL proteins of Chlamydiae. J. Bacteriol., 185: 1958-1966.
- Kaufmann, S.H. 1990. Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today, 11: 129-136.
- Kawata, Y., Kawagoe, M., Hongo, K., Miyazaki, T., Higurashi, T., Mizobata, T., Nagai, J. 1999. Functional communications between the apical and equatorial domains of GroEL through the intermediate domain. Biochemistry, 38: 15731-15740.
- Keppen, O.I., Baulina, O.I., Kondratieva, E N. 1994. *Oscillochloris trichoides* neotype strain DG-6. Photo. Res., 41: 29-33.
- Keskin, O., Bahar, I., Flatow, D., Covell, D.G., Jernigan, R.L. 2002. Molecular mechanisms of chaperonin GroEL-GroES function. Biochemistry, 41: 491-501.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., Vogensen, F.K. 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 63: 1826-1837.
- Klunker, D., Haas, B., Hirtreiter, A., Figueiredo, L., Naylor, D.J., Pfeifer, G., Muller, V., Deppenmeier, U., Gottschalk, G., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. 2003. Coexistence of group I and group II chaperonins in the archaeon *Methanosarcina mazei*. J. Biol. Chem., 278: 33256-33267.
- Kong, T.H., Coates, A.R.M, Butcher, P.D., Hickman, C.J., Shinnick, T.M. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 2608-2612.
- Kubo, T., Mizobata, T., Kawata, Y. 1993. Refolding of yeast enolase in the presence of the chaperonin GroE. The nucleotide specificity of GroE and the role of GroES. J. Biol. Chem., 268: 19346-19351.
- Kusukawa, N., Yura, T., Ueguchi, C., Akiyama, Y., Ito, K. 1989. Effects of mutations in heat-shock genes *groES* and *groEL* on protein export in *Escherichia coli*. EMBO J., 8: 3517-3521.

- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., McCoy, J.M. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology*, 11: 187-193.
- Lee, W.T., Terlesky, K.C., Tabiata, F.R. 1997. Cloning and characterization of two *groESL*-operons of *Rhodobacter sphaeroides*: transcriptional regulation of the heat-induced *groESL*-operon. *J. Bacteriol.*, 179: 487-495.
- Lehel, C., Los, D., Wada, H., Gyogyeyi, J., Horvath, I., Kovacs, E., Murata, N., Vigh, L. 1993. A second *groEL*-like gene, organized in a *groESL*-operon is present in the genome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, 268: 1799-1804.
- Lemos, J.A.C., Chen, Y-Y.M., Burne, R.A. 2001. Genetic and Physiologic Analysis of the *groE* Operon and Role of the HrcA Repressor in Stress Gene Regulation and Acid Tolerance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, 183: 6074-6084.
- Lorca, G.L., Font de Valdez, G., Ljungh, A. 2002. Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Mol. Microbial Biotechnol.*, 4: 525-532.
- Lorimer, G.H. 1996. A quantitative assessment of the role of chaperonin proteins in protein folding *in vivo*. *FASEB J.*, 10: 5-9.
- Lundrigan, M.D., Arceneaux, J.E., Zhu, W., Byers, B.R. 1997. Enhanced hydrogen peroxide sensitivity and altered stress protein expression in iron-starved *Mycobacterium smegmatis*. *Biometals*, 10: 215-225.
- Løken, Ø., Sirevåg, R. 1982. Evidence for the presence of the glyoxylate cycle in *Chloroflexus*. *Arch. Microbiol.*, 132: 276-279.
- Madigan, M.T., Brock, T.D. 1975. Photosynthetic sulfide oxidation by *Chloroflexus aurantiacus*, a filamentous photosynthetic gliding bacterium. *J. Bacteriol.*, 122: 782-784.
- Martin, J., Langer, T., Boteva, R., Schramel, A., Horwich, A.L., Hartl, F.U. 1991. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of GroEL through a 'molten globule'-like intermediate. *Nature*, 352: 36-42.
- Martirani, L., Raniello, R., Naclerio, G., Ricca, E., De Felice, M. 2001. Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 198: 177-182.
- Melkani, G.C., Zardeneta, G., Mendoza, J.A. 2002. GroEL interacts transiently with oxidatively inactivated rhodanese facilitating its reactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294: 893-899.
- Mierendorf, R., Yaeger, K., Novy, R. 1994. The pET System: Your Choice for Expression. *InNovations* 1: 1-3.
- Mizobata, T., Akiyama, Y., Ito, K., Yumoto, N., Kawata, Y. 1992. Effects of the chaperonin GroE on the refolding of tryptophanase from *Escherichia coli*. Refolding is enhanced in the presence of ADP. *J. Biol. Chem.*, 267: 17773-17779.
- Mizunoe, Y., Wai, S.N., Umene, K., Kokubo, T., Kawabata, S., Yoshida, S. 1999. Cloning, sequencing, and functional expression in *Escherichia coli* of chaperonin (*groESL*) genes from *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol.*, 43: 513-520.
- Mizushima, T., Matsuo, M., Sekimizu, K. 1997. Induction of DnaK and GroEL heat shock proteins by fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 193-195.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F.X., Schumann, W. 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.*, 16: 4579-4590.
- Morita, M.T., Kanemori, M., Yanagi, H., Yura, T. 1999. Heat-induced synthesis of  $\sigma^{32}$  in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J. Bacteriol.*, 181: 401-410.

- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, 262: 56-65.
- Nakamoto H, Suzuki M, Kojima K. 2003. Targeted inactivation of the *hrcA* repressor gene in cyanobacteria. *FEBS Lett.*, 549: 57-62.
- Narberhaus, F., Krummenacher, P., Fischer, H.M., Hennecke, H. 1997. Three disparately regulated genes for sigma32-like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.*, 24: 93-104.
- Nübel, U., Bateson, M. M., Madigan, M. T., Kühl, M., Ward, D.M. 2001. Diversity and Distribution in Hypersaline Microbial Mats of Bacteria Related to *Chloroflexus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4365-4371.
- Ogawa, J., Long, S.R. 1995. The *Rhizobium meliloti groELc* locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.*, 9: 714-729.
- Patje, W. 2004. The chaperonin regulation in *Chloroflexus aurantiacus*. Semesteroppgave i generell mikrobiologi ved Institutt for Molekylær Biovitenskap, Universitetet i Oslo.
- Pierson, B.K., Castenholz, R.W. 1974. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 100: 5-24.
- Pierson, B.K., Giovannoni, S. J., Stahl, D.A., Castenholz, R.W. 1985. *Heliothrix oregonensis*, gen. nov., sp. nov., a phototrophic filamentous gliding bacterium containing bacteriochlorophyll a. *Arch. Microbiol.*, 142: 164-167.
- Pierson, B.K., Mitchell, H.K., Ruff-Roberts, A.L. 1993. *Chloroflexus aurantiacus* and ultraviolet radiation: Implications for Archean shallow-water stromatolites. *Orig.Life Evol. Biosphere*, 23: 243-260.
- Quivey, R.G.Jr., Faustoferri, R.C., Clancy, K.A., Marquis, R.E. 1995. Acid adaptation in *Streptococcus mutans* UA 159 alleviates sensitization to environmental stress due to RecA deficiency. *FEMS Microbiol. Lett.*, 126: 257-261.
- Rafie-Kolpin, M., Essenberg, R. C., Wyckoff, III, J. H. 1996. Identification and comparison of macrophage -induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*. *Infect. Immun.*, 64: 5274-5283.
- Rajaram, H., Ballal, A.D., Apte, S.K., Wiegert, T., Schumann, W. 2001. Cloning and characterization of the major *groESL*-operon from nitrogen-fixing cyanobacterial *Anabena* sp. Strain L-31. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1519: 143-146.
- Ribbe, M.W., Burgess, B.K. 2001. The chaperone GroEL is required for the final assembly of the molybdenum-iron protein of nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98: 5521-5525.
- Rinke de Wit, T.F., Bekelie, S., Osland, A., Miko, T.L., Hermans, P.W., van Soolingen, D., Drijfhout, J.W., Schoningh, R., Janson, A.A., Thole, J.E. 1992. Mycobacteria contain two *groEL*-genes: the second *Mycobacterium leprae groEL*-gene is arranged in an operon with *groES*. *Mol. Microbiol.*, 6: 1995-2007.
- Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W., Zubay, G. 1993. Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli* demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bacteriol.*, 175: 716-722.
- Rusanganwa, E., Gupta, R. S. 1993. Cloning and characterization of multiple *groEL* chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene.*, 126: 67-75.
- Sambroock, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, NY.

- Schägger, H., von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379.
- Seaver, L.C., Imlay, J.A. 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside the growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 183: 7182-7189.
- Segal, G., Ron, E.Z. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operon in Eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 138: 1-10.
- Shinnick, T.M. 1991. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 167: 145-160.
- Shuman, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Biol. Chem.*, 269: 32678-32684.
- Shuman, S. 1991. Recombination mediated by vaccinia virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10104-10108.
- Sirevåg, R., Castenholz, R.W. 1979. Aspects on carbon metabolism in *Chloroflexus*. *Arch. Microbiol.*, 120: 151-153.
- Straus, D.B., Walter, W.A., Gross, C.A. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma_{32}$ . *Nature*, 329: 348-351.
- Strauss, G., Fuchs, G. 1993. Enzymes of a novel autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionat cycle. *Eur. J. Biochem.*, 25: 633-643.
- Tilly, K., Spence, J., Georgopoulos, C. 1989. Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor sigma. *J. Bacteriol.*, 171: 1585-1589.
- Tooming, A. 1998. Undersøkelse av termostabilitet hos malat dehydrogenase fra den termofile bakterien *Chloroflexus aurantiacus*. Hovedfagsoppgave i generell mikrobiologi ved avdeling for molekylær biologi, Biologisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Van Asseldonk, M., Simons, A., Visser, H., De Vos, W.M., Simons G. 1993. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Lactococcus lactis dnaJ* gene. *J. Bacteriol.*, 175: 1637-1644.
- Vanberg, C. 2001. Isolering og karakterisering av genene for chaperoniner fra den termofile bakterien *Chloroflexus aurantiacus*. Hovedfagsoppgave i generell mikrobiologi ved avdeling for molekylær biologi, Biologisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Viitanen, P.V., Gatenby, A.A., Lorimer, G.H. 1992. Purified chaperonin 60 (groEL) interacts with the nonnative states of a multitude of *Escherichia coli* proteins. *Protein Sci.*, 1: 363-369.
- Viitanen, P.V., Donaldson, G.K., Lorimer, G.H., Lubben, T.H., Gatenby, A.A. 1991. Complex interactions between the chaperonin 60 molecular chaperone and dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, 30: 9716-9723.
- Wilson, A.C., Tan, M. 2002. Functional analysis of the heat shock regulator HrcA of *Chlamydia trachomatis*. *J. Bacteriol.*, 184: 6566-6571.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. 1990. Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4576-4579.
- Xu, Z., Horwich, A.L., Sigler, P.B. 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature*, 388: 741-750.
- Yura, T., Nagai, H., Mori H. 1993. Regulation of the heat-shock response in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47: 321-350.

- Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. and Georgopoulos, C. 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45: 301-325.
- Zhang, S.P., Zubay G., Goldman, E. 1991. Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 105: 61-72.
- Zuber, U., Schumann, W. 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 176: 1359-1363.
- Zugel, U., Kaufmann, S.H. 1999. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 19-39.

Kromatogram fra sekvenseringen av *groES<sub>2</sub>*-genet



Den genspesifikke primeren til *groES<sub>2</sub>*, reversprimeren RPET10, ble brukt som sekvenseringsprimer. Kromatogrammet må leses "revers komplement", dvs. at sekvensen som er revers komplement til kromatogrammet er den kodende tråden til *groES<sub>2</sub>*-genet. Starten av genet er ved base 294 i kromatogrammet og kromatogrammet gir en sikker sekvens uten for mye bakgrunnstøy på omkring 270 baser.

**Sekvensen til *groES<sub>2</sub>*-genet som er revers komplement til den sikre delen av kromatogrammet:**

CACCATGGCGGATTTCCGCATCCGACCCCTTGCGACCGTGT  
 GGTGGTCAAGCCGGTAGAGCGTGAAGAGANAGACCAAGACCGGCATTTAC  
 CTGCNTGATACGGCCAGCAAAGAGCGCCCAAATGGAAGGCACGGTGCTGG  
 CAGCTTGGTGAGGGTCGCCGTGATGACAAGTGCAAGCTGATCCCGATGA  
 ACGTCAAAGTTGGCGACCGCGTGATCTTCGCCAAGTACAGCGGCACCGAA  
 TTCAAGCTCGATGATGTCGAGTACC







**Tabellen fra den N-terminale sekvenseringen av proteinet fra PVDF-membranen**

Verdiene er gitt i pmol  
 Aminosyrene står horisontalt  
 Syklusnr. står vertikalt

	<b>A</b> ala	<b>R</b> arg	<b>N</b> asn	<b>D</b> asp	<b>C</b> cys	<b>E</b> glu	<b>Q</b> gln	<b>G</b> gly	<b>H</b> his	<b>I</b> ile	<b>L</b> leu	<b>K</b> lys	<b>M</b> met	<b>F</b> phe	<b>P</b> pro	<b>S</b> ser	<b>T</b> thr	<b>W</b> trp	<b>Y</b> tyr	<b>V</b> val
<b>1</b>	4.5	0.1	0.6	6.2	0.0	0.6	8.2	35.7	0.4	1.2	1.0	3.4	1.2	1.0	1.6	1.7	1.3	26.3	0.5	1.7
<b>2</b>	60.7	0.1	0.1	21.6	0.0	1.2	4.0	7.3	0.2	1.8	1.8	0.3	0.3	1.4	2.7	1.0	1.3	26.5	0.6	2.5
<b>3</b>	12.0	0.1	0.7	10.9	0.0	1.4	2.5	4.6	0.2	2.5	3.9	0.0	0.3	2.7	4.7	17.9	1.4	17.3	1.4	3.2
<b>4</b>	11.2	0.1	1.5	5.8	0.0	1.6	3.7	21.6	0.1	3.3	4.7	0.0	0.4	3.6	6.7	3.6	1.6	12.5	1.4	1.9
<b>5</b>	13.3	0.2	2.6	5.4	0.0	2.8	4.7	8.0	0.0	1.2	6.2	0.0	0.7	4.8	8.4	2.9	1.6	10.6	2.1	5.8
<b>6</b>	15.0	0.1	3.0	4.4	0.0	3.1	5.4	6.1	0.1	6.0	7.4	0.1	0.7	6.3	8.0	2.5	1.9	9.4	2.4	26.8
<b>7</b>	15.9	0.2	3.3	3.0	0.0	3.7	6.8	5.9	0.4	5.0	8.2	0.1	0.8	7.0	10.0	2.4	1.8	9.5	2.6	12.3
<b>8</b>	18.4	0.2	3.7	3.4	0.0	5.4	20.2	6.4	0.4	6.9	10.4	0.1	0.9	7.9	10.9	2.8	1.8	8.4	3.2	10.2
<b>9</b>	17.7	0.3	3.4	3.5	0.0	9.0	13.2	6.5	0.2	6.6	10.4	0.0	1.0	7.6	10.3	2.9	2.2	7.8	3.0	8.1
<b>10</b>	35.1	0.5	4.4	4.2	0.0	8.1	11.8	7.7	0.2	6.8	12.8	0.1	1.3	9.5	12.4	3.3	2.9	7.7	3.5	9.2
<b>11</b>	33.9	0.5	5.4	7.6	0.0	12.0	11.3	9.2	0.1	9.6	14.3	0.1	1.6	10.2	14.0	3.9	3.8	9.0	4.2	11.3
<b>12</b>	26.7	1.0	4.9	7.8	0.0	9.3	9.4	8.6	0.1	8.4	13.0	0.1	1.6	9.4	13.4	3.0	3.7	9.1	4.0	9.8
<b>13</b>	23.4	0.3	4.7	6.2	0.0	6.1	8.1	8.7	0.1	8.6	13.0	0.1	1.5	9.4	12.8	3.5	3.3	11.2	3.7	18.5
<b>14</b>	28.3	0.4	5.6	9.5	0.0	6.0	10.0	10.2	0.1	10.9	16.6	0.3	1.8	11.2	15.2	7.0	4.2	9.4	5.1	16.9