

Molekylære studier av BC1060 - et putativt adhesjonsprotein
involvert i biofilmdannelse i *Bacillus cereus* - gruppen

Masteroppgave for graden

Master i Farmasi

Elena Haugen

Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap

Høst 2012



Forord

Denne oppgaven ble utført i *Bacillus cereus*-forskningsgruppe ved Avdeling for Farmasøytisk Biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, i perioden 13. februar 2012 – 15. august 2012. Jeg vil gjerne takke min veilder Ole Andreas Løchen Økstad for god veiledning og hjelp gjennom hele masteroppgaven.

Dette året har vært lærerikt, og mange personer har delt av sin kunnskap med meg, slik at denne oppgaven har kunnet bli gjennomført. Jeg vil takke spesielt Ewa Jaroszewicz, som var til stor hjelp i mitt praktiske labarbeid.

15. oktober 2012

Elena Haugen

Forkortelser

ATCC	American Type Culture Collection
bp	basepar
dATP	Deoksyadenosintrifosfat
dCTP	Deoksyctidintrifosfat
dGTP	Deoksyguanidintrifosfat
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleosidtrifosfat (nukleotid)
dTTP	Deoksytymidintrifosfat
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EtBr	Etidiumbromid
g	gram
l	liter
LB	Luria–Bertani
M	molar
mg	milligram
ml	milliliter
MQ	Milli–Q
ng	nanogram
OD	optisk tetthet
ON	over natt

PCR	polymerase kjedereaksjon
RNA	ribonukleinsyre
rRNA	ribosomalt RNA
rpm	omdreininger per minutt
SDS	Sodium dodecyl sulfat (natrium lauryl sulfat)
TAE	Tris–acetat–EDTA
TBE	Tris–borat–EDTA
TEMED	N,N,N',N'–tetrametyletylendiamin
Tris	Tris[hydroksymetyl]aminometan
μg	mikrogram
μl	mikroliter
μM	mikromolar
UV	ultrafiolett
V	volt
X–gal	5–brom–4–klor–3–indolyl–β–D–galaktopyranosid

Sammendrag

Bacillus cereus-gruppen er en undergruppe av *Bacillus* slekten, og består av seks arter: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* og *B. weihenstephanensis*. *B. anthracis* forårsaker den dødelige sykdommen miltbrann, og er et potensielt biologisk våpen. *B. thuringiensis* produserer intracellulære krystaller og brukes kommersielt som biopesticid. *B. cereus* er en jordbakterie og opportunistisk patogen som er en vanlig årsak til to former for matforgiftningssyndromer: diaré-syndrom og emetisk syndrom.

Enkelte bakteriestammer i *B. cereus* gruppen kan danne biofilm. Biofilm kan defineres som samfunn av mikroorganismer festet til overflater som mineraler eller i grensen mellom luft/væske samt levende materialer som dyr og mennesker, og kan bestå av en eller flere arter av mikrober. Bakterier i biofilmer er beskyttet mot mekaniske påkjenninger, antimikrobielle forbindelser og det humane immunsystemet ved hjelp av en ekstracellulær matriks som omgir bakteriene og danner tredimensjonal arkitektur. Den ekstracellulære matriksen kan inneholde polysakkarider, proteiner, nukleinsyrer og fosfolipider. Biofilmrelaterte problemer kan for eksempel oppstå i medisin og i matindustrien.

Biofilmdannelse reguleres ved hjelp av mange faktorer, slik som intercellulær kommunikasjon gjennom «quorum sensing», samt intracellulære faktorer slik som «second messenger» system, eller reguleringsystemer på transkripsjonsnivå. Til de ekstracellulære faktorene hører blant annet tilgang på næring, og forskjellige fysiske og mekaniske signaler.

Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) er et «second messenger» molekyl og spiller en viktig rolle i overgangen mellom bakteriens motile singel-cellulære tilstand og biofilmassosiert livsstil. c-di-GMP har vist seg å stimulere biofilmdannelse, redusere motilitet og påvirke ekspresjon av enkelte virulensgener. Høye c-di-GMP nivåer kan stimulere forskjellige biofilm-assosierte funksjoner: utviklingen av fimbrier, andre adhesiner og eksopolysakkarider. I tillegg kan c-di-GMP påvirke celle-syklus-progresjon.

c-di-GMP dannes fra to guanosine trifosfat-molekyler, ved hjelp av enzymer kalt diguanylat cyclaser som inneholder GGDEF domener. Klyvning av c-di-GMP katalyseres av to typer fosfodiesteraser, enzymer som inneholder EAL domener eller HD-GYP domener. Cdg135 fra

B. thuringiensis 407 inneholder både et GGDEF og et EAL domene, har c-di-GMP-metaboliserende aktivitet, og biofilmdannelse er hemmet i en *cdg135* delesjonsmutant.

BC1060 er et annotert adhesjonsmolekyl i *B. cereus* genomer, og har en domenestruktur som er typisk for såkalte MSCRAMM-familie proteiner, som kan være involvert i celle-celle interaksjoner og/eller binding til ekstracellulære matriks komponenter i humant vev, som for eksempel kollagen. BC1060-proteinet er vist å være involvert i biofilm-dannelse, ved at en BC1060-delesjonsmutant viser kraftig nedsatt evne til å danne biofilm i et mikrotiterplate assay. En tidligere analyse av promoter-regionen til BC1060 ortologen i *B. thuringiensis* 407 viste dessuten at den inneholder en perfekt match til klasse I c-di-GMP responsive riboswitchen som tidligere ble identifisert i BC1060 oppstrøms-regionen i *B. cereus* ATCC 14579. Denne riboswitchen er vist å respondere på økt nivå av c-di-GMP ved å slå på transkripsjon av nedstrømsliggende gen BC1060 i *B. cereus* ATCC 14579.

I denne oppgaven ble genekspresjon på RNA-nivå analysert ved qPCR, og det ble vist at ekspresjon av BC1060 var 3 ganger høyere i *B. thuringiensis* 407 villtype sammenliknet med en *cdg135* delesjonsmutant, i overenstemmelse med at BC1060 kan reguleres av c-di-GMP produsert av Cdg135, via BC1060-genets oppstrøms riboswitch. Ved bioinformatikk-analyse ble BC1060 allikevel vist ikke å være essensiell for biofilmdannelse i *B. cereus*-gruppen, da stammen *B. cereus* ATCC 10987, som er en effektiv biofilm-danner, ikke har genet. Med mål om å rense N1-N2 subdomener av BC1060, ble denne delen av proteinet klonet i *E. coli*. Klonen viste imidlertid ingen produksjon av N1-N2-subdomenene ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese, og betingelser for ekspresjon må optimaliseres før en eventuell ligand for subdomenene kan identifiseres.

Innholdsfortegnelse

FORORD.....	2
FORKORTELSER.....	3
SAMMENDRAG	5
1. INNLEDNING	11
1.1 Slekten <i>Bacillus</i>	11
1.2 <i>Bacillus cereus</i> gruppen	11
1.2.1 <i>Bacillus anthracis</i>	11
1.2.2 <i>Bacillus cereus</i>	12
1.2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.3 Biofilm.....	14
1.3.1 Utbredelse av biofilm–relatedrte problemer	14
1.3.2 Biofilmutvikling	15
1.3.3 Regulering av biofilmdannelse i <i>Bacillus subtilis</i>	18
1.3.4 Regulering av biofilmdannelse i <i>Bacillus cereus</i> gruppen.....	19
1.4 c–di–GMP	20
1.5 MSCRAMM proteiner og BC1060 i <i>Bacillus cereus</i> gruppen.....	23
1.6 Identifikasjon av c–di–GMP responsive riboswitcher	26
1.7 Genet <i>cdg135</i> i <i>Bacillus cereus</i> gruppen	26
1.8 Problemstilling / Mål med studien.....	27
2. MATERIALER	28
2.1 Bakteriestammer	28
2.2 Primere.....	28
2.3 Enzymer	29
2.4 DNA størrelsesmarkører	30
2.5 Protein molekylærvekt standarder	30
2.6 Dyrkningsmedier.....	30
2.7 Kit.....	31
2.8 Buffere, reagenser og kjemikalier.....	32

2.9 Løsninger	35
2.10 Annet	38
3. METODER	40
3.1 Dyrkning av bakterier	40
3.1.1 <i>Bacillus-cereus</i> gruppe stammekolleksjon	40
3.1.2 Vekstkurver	40
3.2 Analyse av bakterietetthet ved måling av optisk tetthet	41
3.3 Mikroskopi.....	42
3.4 Isolering av RNA.....	42
3.5 Bestemmelse av RNA og DNA konsentrasjon ved måling av absorbans	45
3.6 Agarose gel elektroforese.....	46
3.6.1 Separasjon av DNA	47
3.6.2 Separasjon av RNA.....	49
3.7 cDNA syntese.....	50
3.8 Amplifisering av DNA ved hjelp av polymerase kjede reaksjon (PCR).....	52
3.8.1 Ikke kvantitativ PCR.....	52
3.8.2 Kvantitativ real-time RT PCR.....	54
3.9 Kloning av PCR produkter i pCR®II–TOPO®.....	57
3.10 Transformasjon av rekombinant vektor i kjemisk kompetente <i>E.coli</i> celler.....	59
3.10.1 Transformasjon av rekombinant vektor i One Shot ®TOP 10 kjemisk kompetente <i>E. coli</i> celler	60
3.10.2 Preparasjon av kompetente celler AH 1498 <i>E. coli</i> BL21 DE3, AH 802 <i>E.coli</i> BL21 DE3 og transformasjon av rekombinant vektor	60
3.10.2.1 Frysekultur av transformanter	62
3.10.2.2 Sekvensering av rekombinant plasmid	62
3.11 Isolering av plasmid DNA	62
3.12 Kutting av DNA med restriksjonsenzym	63
3.13 Proteinekspresjon i <i>E. coli</i>.....	64
3.13.1 Induksjon av proteinekspresjon	64
3.13.2 Proteinisolering.....	65
3.14 Analyse av proteinekspresjon ved polyakrylamid gelelektroforese.....	66
3.15 Bioinformatikk	70
4. RESULTATER.....	71
4.1 Valg av bakteriestammer	71
4.2 Vekstkurver og mikroskopi.....	71

4.3 Isolering av RNA og separasjon ved hjelp av agarose gel elektroforese	74
4.4 Ekspresjonsanalyse av BC1060.....	75
4.4.1 cDNA syntese	75
4.4.2 Negativ kontroll	76
4.4.3 Valg av referanse gener	76
4.4.4 Transkripsjons analyse av target gen BC1060	76
4.4.4.1 Analyse av relativ genekspressjon for BC1060 i <i>B. thuringiensis</i> 407 og <i>B. thuringiensis</i> 407 <i>Acdg135</i> i tre biologiske replikater ved hjelp av $\Delta\Delta$ Ct metode.....	77
4.4.4.2 Analyse av relativ genekspressjon for BC1060 i <i>B. thuringiensis</i> 407 og <i>B. thuringiensis</i> 407 <i>Acdg135</i> i tre biologiske replikater ved hjelp av forbestemte E.verdier	80
4.5 Kloning av BC1060 adhesjonsdomener.....	83
4.5.1 PCR–amplifisering av BC1060 adhesjonsdomener	83
4.5.2 Test av PCR produkt ved hjelp av agarose gel elektroforese.....	84
4.5.3 Kloning av PCR-produkter for His–tagget BC1060 adhesjonsdomene i Topo vektor for ekspresjon.....	85
4.5.4 Transformasjon av rekombinant vektor i One Shot® TOP 10 kjemisk kompetente <i>E.coli</i> celler	86
4.5.5 Bekreftelse på riktig størrelse og identitet av innskudd av fragment rCnaBc N1-2.....	87
4.5.6 Analyse av orientering av innskudd av fragment rCnaBc N1-2 i vektor	88
4.5.7 Preparasjon av kompetente celler av <i>E.coli</i> BL21 DE3 og <i>E.coli</i> BL21DE3 pLysS og transformasjon av rekombinant vektor	89
4.5.8 Bekreftelse på tilstedeværelse og riktig størrelse av fragment N1–N2	90
4.5.9 Sekvensering av rekombinant plasmid	91
4.6 Ekspresjon av BC1060 adhesjonsdomener i <i>E.coli</i>	92
4.6.1 Induksjon av proteinekspressjon i <i>E.coli</i> og isolering av totalt cellulært protein	92
4.7 Forekomst av genet BC1060 i <i>Bacillus cereus</i> gruppen	93
5. DISKUSJON	98
5.1 BC1060 og biofilmdannelse i <i>Bacillus thuringiensis</i> 407	98
5.1.1 Påvirkning av <i>cdg135</i> på BC1060 ekspresjon	98
5.1.2 Rolle for BC1060 i biofilmdannelse i <i>Bacillus cereus</i> gruppen.....	100
5.2 Kloning av adhesjonsdomener	100
5.3 Konklusjoner	102
5.4 Videre arbeid.....	102
6. REFERANSE LISTE.....	103
7. VEDLEGG	109
7.1 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i TOPO–vektor i <i>E.coli</i> BL21 DE3 (AH1498), biologisk replikat 2 (klon AH1498₂)	109
7.2 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i TOPO–vektor i <i>E.</i> <i>coli</i> BL21 DE3 (AH1498), biologisk replikat 3 (klon AH1498₃)	113
7.3 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i TOPO–vektor i <i>E.</i> <i>coli</i> BL21 DE3 (AH802), biologisk replikat 2 (klon AH802₂)	117

7.4 Nukleotidsekvens av klonet PCR-produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i <i>E.coli</i> BL21 DE3 (AH802), biologisk replikat 3 (klon AH802₃).....	120
7.5 Gensekvenser av forward og revers primere for referansegener og target-gen BC1060.....	124

1. Innledning

1.1 Slekten *Bacillus*

Medlemmer av slekten *Bacillus* er stavformede spore-dannende, gram-positive bakterier med lavt G+C DNA innhold, tilhørende Firmicutes [1]. Slekten er stor og omfatter mer enn 60 arter med stort genetisk mangfold, mesteparten av dem er ikke patogene. *Bacillus* arter kan deles i 5 eller 6 grupper, basert på henholdsvis 16S rRNA fylogeni eller fenotypiske egenskaper [2]. Fellestrekk for Bacilli er produksjon av endosporer – dormante strukturer som er motstandsdyktige mot kjemikalier, varme, UV-lys og uttørking – når celler opplever næringsmangel eller annet spesifikt miljøstress [3].

1.2 *Bacillus cereus* gruppen

Bacillus cereus gruppen (*Bacillus cereus sensu lato*) inkluderer 6 arter: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus (sensu stricto)*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* og *Bacillus weihenstephanensis*. De tre første medlemmer av gruppen er av stor økonomisk og medisinsk interesse. Deres egenskaper og genetikk blir derfor studert mest.

B. anthracis, *B. cereus*, og *B. thuringiensis* gir forskjellige fenotyper og patologiske effekter. *Bacillus anthracis* forårsaker den dødelige sykdommen miltbrann og er et potensielt biologisk våpen [3]. *Bacillus thuringiensis* produserer intracellulære protein krystaller og brukes kommersielt som biopestisid [4]. *Bacillus cereus* er en jord-bakterie og opportunistisk patogen som er en vanlig årsak til matforgiftning [5]. I kontrast til ulikhetene i fenotyper, har DNA-sekvens analyse vist at de tre artene er genetisk knyttet til hverandre, og kan betraktes som deler av den samme arten [6].

1.2.1 *Bacillus anthracis*

B. anthracis er årsaken til miltbrann, en sykdom som er beskrevet i eldgammel litteratur datert mer enn 2000 år tilbake. *B. anthracis* forårsaker miltbrann gjennom lokal infeksjon av hud-lesjoner (kutan anthrax), gjennom gastrointestinal vei, eller ved inhalasjon. Inhalasjons- og gastrointestinal anthrax er de mest alvorlige formene og har høyest dødelighet [7]. *B. anthracis* er monomorf, det vil si at den viser lite genetisk variasjon [8] og eksisterer i naturen som

veldig stabile dormante sporer, som kan befinne seg i jord. Likevel finnes det bevis på at bakteriene kan vokse ikke bare i en vert, men også i rizosfære og i planter [9]. Hovedkjennetegnet for *B.anthraxis* er to store plasmider, pXO1(182kb) og pXO2(95kb). pXO1 inneholder gener som koder for anthrax toksin komponenter; *pag* (protective antigen, PA), *lef* (lethal factor, LF), og *cya* (edema factor, EF), og er lokalisert innenfor Patogenisitetøy (PAI), en genomisk region som bærer gener som koder for en eller flere virulens faktorer [10]. pXO2 inneholder et fem-geners operon (*capBCADE*) for biosyntese av polyglutamat kapsel, en struktur som er viktig for evnen til å unngå vertens immunsystem, ved å beskytte bakteriecellene fra å bli drept av makrofager [11] [12].

B. anthracis har en spesifikk mutasjon i global regulator PlcR som kontrollerer transkripsjon av virulens faktorer i *Bacillus cereus*, og *Bacillus thuringiensis*, og som forårsaker mye av de fenotypiske forskjeller mellom *B.anthraxis* og dens nære slektninger [3].

1.2.2 *Bacillus cereus*

B. cereus er utbredt i naturen og kan befinne seg i jord, rhizosfære og tarmkanalen hos virvelløse dyr i jord, og kan spre seg i matvarefabrikker, hvor den kan infisere forskjellige matvarer slik som melk og melkeprodukter, samt ris og andre karbohydratrike produkter. Dette kan forårsake gastrointestinale sykdommer [1]. Tilstedeværelse av *B. cereus* i mange naturlige habitater kombinert med evnen til å overleve i næringsfattige og fiendtlige miljøer, grunnet sporedannelse, bidrar til deres rolle som forurensende organismer. *B. cereus* er et opportunistisk patogen og hvis bakteriene får tilgang til pattedyrs vev, kan de også forårsake lokale eller systemiske infeksjoner [13].

Bakteriene kan føre til to typer gastrointestinale sykdommer: diarré- og emetisk syndrom. Emetisk syndrom forårsakes av cereulide- små, varmestabile, ikke-ribosomalt synteserte dodecadepsipeptider, mens diarré syndrom forårsakes av enterotoksiner [13] [5]. Tre toksiner er kjent å være assosiert med diarré syndrom; hemolysin BL (Hbl), nonhemolytisk enterotoksin (Nhe) og cytotoxin K (CytK) [14] [15] [16]. Disse toksinene er en del av et virulensregulon og aktiveres av en felles transkripsjonsregulator, PlcR [17]. Andre potensielle virulensfaktorer inkluderer fosfolipaser, proteaser og andre nedbrytende enzymer. Disse proteinene er ekstracellulære virulensfaktorer og en rekke av disse ekspresjon er under kontroll av PlcR [18] [19]. Gener som koder for proteinholdige virulensfaktorer og enterotoksiner er lokalisert på kromosomet, mens gener som er ansvarlig for syntese av

emetisk toksin er lokalisert på stort (270kb) plasmid, pCER270 [20] [21]. Fullstendig genom sekvensering for *Bacillus cereus* ATCC 14579 ble utført Ivanova og medarbeidere i 2003 [22].

1.2.3 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis er et insektpatogen, og et kommersielt biologisk pesticid, men kan være opportunistisk patogen i mennesker og dyr, og forårsake vevsnekroser, lungeinfeksjoner og matforgiftning [23] [24]. Under sporulering kan *B. thuringiensis* produsere intracellulære proteinkrystaller som består av insekticide proteinholdige toksiner (Cry og Cyt) [4]. Gener som koder for Cry og Cyt toksiner er vanligvis lokalisert på store plasmider. Krystaldannelse under sporulering er eneste fenotypiske forskjell mellom *B. cereus* og *B. thuringiensis* og er altså som oftest en plasmidkodet egenskap. En *B. thuringiensis*-stamme som har mistet sitt toksin-kodende plasmid vil derfor karakteriseres som *B. cereus* [3].

Insekticidspekteret for *B. thuringiensis* varierer innenfor 82 forskjellige serotyper. *B. thuringiensis* sin spore-formulering er kommersialisert som biopesticid. Sporene er assosiert med store krystallprotein inneslutninger som kan utgjøre opp til 25 % tørrvekt av sporeformuleringen. Krystallene er aggregater av et stort protein (130–140kDa) som utgjør protoksin. Ved inntak av en spore, vil protoksinet løse seg opp i midt-tarmen på insektslarven, hvor det blir spaltet av en protease, hvilket produserer et aktivt toksin med størrelse på omtrent 60kDa. Toksinet binder seg til midt-tarmens epitelceller og danner porer i cellemembranen. Dette forårsaker at tarmen raskt blir immobilisert og epitelcellene vil lysere. Insektslarven slutter å innta næring og dør av letal sepsis. *B. thuringiensis* vil, når larven dør, frigjøres tilbake til jord [25].

1.3 Biofilm

1.3.1 Utbredelse av biofilm-relaterte problemer

Biofilm kan defineres som fellesskap av mikroorganismer festet til en overflate [26]. I biofilm lever bakterier i spesielle mikronisjer, hvor de forsynes av et primitivt sirkulasjonssystem og befinner seg i en stasjonær matriks-beskyttet populasjon – festet til overflaten i et strømmende system [27]. Biofilm kan bestå av en eller flere arter av mikrober omgitt av en ekstracellulær polysakkarid matriks, og separert ved væskefylte kanaler [26]. Et konfokal skanning laser (CSL) mikroskop gir oss mulighet til å undersøke levende, fullt hydrerte biofilmer, ved hjelp av kjemiske sonder eller fysiske mikrosonder som kan posisjoneres hvor som helst i biofilmen og visualiseres av CSL-mikroskopet [27].

Biofilmdannelse er et veldig viktig aspekt i mange forskjellige situasjoner, slik som bakterie-kolonisering i rør og på overflater i mat- og vann-industrien, og metallkorrosjon grunnet sulfat-reducerende bakterier i skip- og olje-industrien [28]. I medisin kan biofilm være assosiert med forskjellige bakterielle infeksjoner, slik som osteomyelitt og endokarditt (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Candida* og *Aspergillus*), og periodontitt [29]. Hos barn med kroniske otitter (Otitis Media, for eksempel forårsaket av *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* og *Moraxella catarrhalis*) kan infeksjon være biofilm-relatert [30]. *Pseudomonas aeruginosa* spiller en viktig rolle i patogenese ved cystisk fibrose [29]. Medisinsk utstyr slik som kunstige hjerteklaffer, sentral venøse katetre, urinkatetre, kontaktlinser og dentalutstyr kan lett bli kolonisert av biofilm [29].

Når det gjelder kroniske bakterielle prostatitt, og så lenge infeksjonen er i tidlig akutt fase, kan sykdom lett behandles med antibiotika terapi. Hvis disse bakteriene vedvarer, kan de danne sporadiske mikrokolonier og biofilm som fester seg til epitelceller. Organismer som blir isolert i tilfeller av kronisk bakterielle prostatitt inkluderer *E. coli*, *Klebsiella*, enterobacteria, *Proteus*, *Serratia* *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* [31], *Bacteroides* spp., *Gardnerella* spp. og *Corynebacterium* spp. [32].

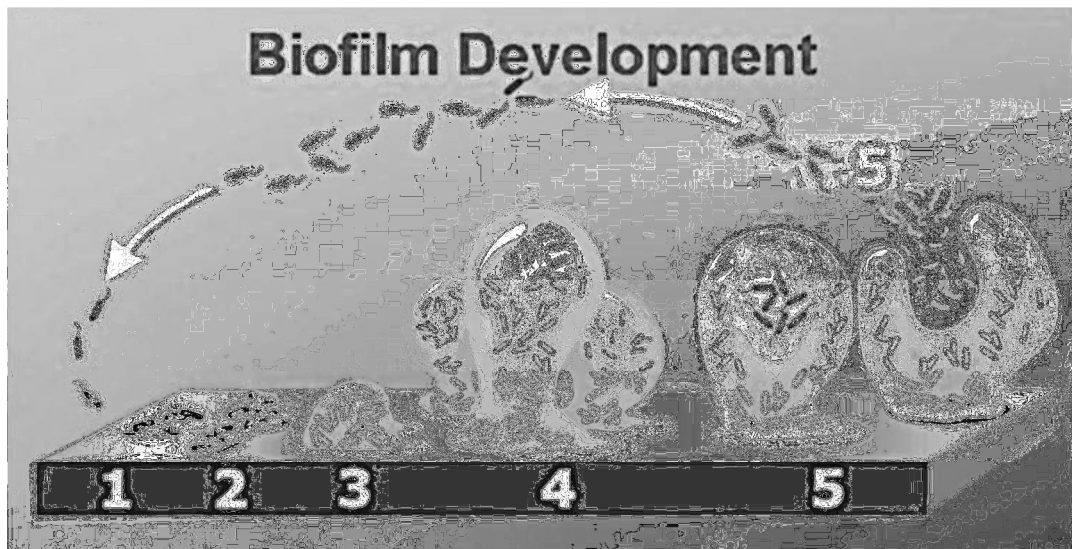
Biofilm er vanskelig å kontrollere fordi mesteparten av antibiotika er utviklet og testet for evnen til å drepe bakterier som befinner seg i planktonisk fase [28]. Noen arter voksende i biofilm kan være opp til 1000 ganger mer tolerante for antimikrobielle midler enn planktoniske celler av samme art [33]. Årsakene til høyere toleranse kan inkludere langsommere vekst, redusert penetrasjon av antimikrobiell substans gjennom ekstracellulær

matriks og annet mønster av gen ekspresjon [33]. Sauer og medarbeiderer analyserte ved hjelp av DNA mikromatriser global genekspresjon i *Bacillus subtilis* celler assosiert i biofilm, sammenliknet med celler i planktonisk fase [34]. Totalt 519 gener ble identifisert som annerledes uttrykt i løpet av tidsforløpet for biofilmdannelsen. Mesteparten av de differensierte uttrykte genene var involvert i fag-relaterte funksjoner, membranens bioenergetikk, glykolyse, og i TCA syklus. I tillegg var mange gener involvert i motilitet og kjemotaksis [34].

1.3.2 Biofilmutvikling

Miljøforhold utløser overgang fra planktonisk til biofilmassosiert livsform, og de miljømessige signalene kan variere mellom forskjellige arter. For eksempel danner *P. aeruginosa* og *P. fluorescens* biofilm under nesten alle betingelser som tillater vekst [35]. Noen stammer av *E. coli* K-12 og *V. cholerae* vil ikke danne biofilm i minimalt medium med mindre det blir supplert med aminosyrer [36] [37], i motsetning til *E. coli* O517:H7, som er rapportert å danne biofilm bare i næringsfattig medium [38]. I tillegg til næringsinnhold i mediet, er andre ekstracellulære faktorer som kan påvirke biofilmdannelse for eksempel temperatur, osmolaritet, pH, jern og oksygen [35] [36] [39] [40]. Det eksisterer også en rekke intracellulære regulatoriske faktorer, som «second messenger»-system, og regulerings-systemer på transkripsjonsnivå. En rekke gener er involvert i overgang fra planktoniske celler til biofilmassosierte celler, og i regulering av en etablert biofilm [33].

Biofilmutvikling inkluderer følgende stadier: reversibel adhesjon (fase 1, figur1), produksjon av ekstra cellulært polysakkarid og irreversibel adhesjon (fase 2, figur1), tidlig utvikling av biofilm arkitektur (fase 3, figur1), modning av biofilm, tre-dimensjonal arkitektur (fase 4, figur1) og dispersjon av enkelte celler fra biofilm (fase 5, figur1) [41].



Figur 1. Ulike faser i utvikling av en biofilm. Fase 1: reversibel adhesjon av celler til overflate. Fase 2: produksjon av ekstracellulært polysakkarid og irreversibel adhesjon. Fase 3: tidlig utvikling av biofilm–arkitektur. Fase 4: modning av biofilm, tre–dimensjonal arkitektur. Fase 5: dispersjon av enkeltceller fra biofilm. Figuren er hentet fra [41].

Reversibel adhesjon kan forekomme ved minst tre mekanismer [41]; Resultater fra O’Toole og Kolter viser at type IV pili–mediert «twitching motility» spiller en viktig rolle i overflate–aggregering for *P. aeruginosa* [35]. En annen mekanisme er ved binær deling av festede celler. Når celler deles, spres datter–celler utover og oppover fra festeflaten og danner celleklynger [41]. En tredje mekanisme er rekruttering av celler fra væske–fase til biofilmen som er under utvikling [42]. Det relative bidrag fra hver av disse mekanismene avhenger av hvilke organismer som er involvert, egenskapene til overflater som koloniseres og de fysiske/kjemiske miljøforhold. Biofilmstrukturen modner ved produksjon av en slim–lignende matriks av ekstracellulær polymer substans (EPS), som gir strukturell støtte. EPS kan inneholde polysakkarider, proteiner, nukleinsyrer og fosfolipider [41]. Noen bakterier kan produsere mer enn en type av EPS i løpet av biofilmdannelsen. For eksempel *P. aeruginosa* kan produsere minst tre: Alginat, Pel and Psl [43]. Alginat utgjør et av de mest studerte og karakteriserte EPS–kompleksene. Adhesjon kan utløse ekspresjon av gener som kontrollerer produksjon av bakterielle komponenter, og alginat i *P. aeruginosa* er nødvendig for kontinuerlig adhesjon og biofilmdannelse. Kontakt med overflate induserer forandring i gen ekspresjon. Adhesjon utløser ekspresjon av *algC* og andre gener som kontrollerer produksjon av fosfomannomutase og andre enzymer i alginat syntese «pathway» [27]. Studier utført av

Davies og medarbeidere viste at et av genene (*algC*) som kreves for syntese av EPS, var oppregulert 3–5 ganger i nylig festede celler sammenliknet med planktoniske celler [44] [45].

Slik som i mange differensieringsprosesser i andre biologiske systemer, ble differensieringsprosessen som transformerer små grupper av adherente bakterier til tykke matriks–biofilm samfunn på koloniserte overflater først oppfattet kun som serier av morfologiske forandringer. De individuelle adherente cellene som initierer biofilmdannelse på overflater er omringet av kun små mengder av EPS, og mange er i stand til uavhengig bevegelse ved hjelp av pili–mediert «twitching» og «gliding motility». Disse adherente cellene er ennå ikke «forpliktet» til differensieringsprosessen som fører til biofilmdannelse – og mange av dem kan faktisk forlate overflaten for å gjenoppta planktonisk livsform. I løpet av dette stadiet av reversibel adhesjon, viser bakteriene mange arts–spesifikke fenotyper, som kan inkludere rulling, kryping, aggregatdannelse og «ranke»–dannelse – før de begynner å utsondre eksopolysakkarider og fester seg irreversibelt [41]. Overflate–assosierte adhesiner kan assistere i bakterie–overflate interaksjoner. Et stort adhesin, LapA, fra *Pseudomonas fluorescens* er viktig i overgangen til irreversibelt stadium hvor stavformede celler blir festet til overflaten [43].

Neste fase av biofilm–utviklingen, modning, resulterer i dannelsen av komplekse arkitekturer, kanaler, porer – og redistribusjon av bakterier vekk fra overflaten [41]. Etter å ha festet seg til overflaten undergår bakteriene flere tilpasninger til livet i en biofilm. To egenskaper er ofte assosiert med overflate–festede bakterier – økt syntese av EPS og utvikling av antibiotika–resistens. Bakterier i biofilm kan også utvikle andre egenskaper – økt resistens overfor UV–lys, økt hastighet på genetisk utveksling, endrede biodegradative evner, og økt sekundær metabolitt produksjon [26].

Intercellulær kommunikasjon er nødvendig for utvikling og vedlikehold av en biofilm og kan gjennomføres ved hjelp av «quorum sensing». «Quorum sensing» er en mekanisme som bakterier bruker for å vurdere tetthet av populasjon og kontrollere fysiologiske prosesser. Bakteriene produserer spesifikke signalmolekyler kalt autoinduser. I *P. aeruginosa* for eksempel, er acyl homoserin lakton (AHL) hoved intercellulært signalmolekyl. Når laktoner akkumuleres, gir dette signal til bakteriene om at populasjonen er blitt fortettet og holder på å bli overfylt. Autoinduser trigger transkripsjon av spesifikke gener som bidrar til biofilm dannelse [33].

Det siste stadiet i biofilmutvikling er dispersjon av enkeltcelle fra biofilm. En mulig årsak til frakobling er næringsmangel. Dette har blitt forsket mindre på i detalj. Enzym alginat lyase

kan spille en rolle i frakoblingsfasen i *P. aeruginosa*; overekspressjon av alginat lyase kan øke frakoblingen fra biofilm [26]. Regulering av frakobling fra biofilm anses som et viktig forskningsområde i fremtiden.

1.3.3 Regulering av biofilmdannelse i *Bacillus subtilis*

B. subtilis er stavformede, gram-positive, spore-dannende bakterier; De ble benyttet som modell system for å studere biofilmdannelse. De transkripsjonale faktorer Spo0A og σ^H er involvert i biofilm utvikling i *B. subtilis*. Operon *epsA-O*, som er under kontroll av både Spo0A og σ^H , ble predikert å kode produkter som er involvert i EPS syntese og eksport [46]. I tillegg til EPS komponenten av matriks, ble tre proteiner som er kodet i et operon, *yqxM-sipW-tasA*, identifisert å være involvert i dannelsen av andre komponenter av den ekstracellulære matriksen [47]; *yqxM* og *tasA* gener koder for preproteiner som omdannes til sine modne former ved hjelp av *sipW*, en dedikert signal peptidase [48] [49]. Proteinet TasA er hovedkomponenten av matriksen i *B. subtilis* og lager et nettverk i matriksen ved å organisere seg i tynne, lange strukturer [50]. Proteinet TapA (tidligere kalt YqxM) fester TasA til celleveggen og er involvert i polymerisering av TasA. TapA frigjøres fra celleveggen, med TasA, ved kontakt med D-tyrosin [51]. Signal peptidasen SipW omdanner forløper proteinene TasA og TapA til deres modne former og er også vist å ha en rolle i å inducere uttrykket av operonene *epsA-O* og *tapA-sipW-tasA* [52].

Kearns D.B. og medarbeidere viste at transkripsjon av *eps*, og også *yqxM-sipW-tasA*, er under direkte negativ regulering av SinR, en repressor som binder seg til flere seter i regulatorisk region av de respektive operonene. Det er foreslått at SinR er master regulatoren som styrer overgang fra planktonisk til biofilm-assosiert tilstand [53]. SinI virker som en antagonist for SinR, og *in vitro* eksperimenter har vist at interaksjon mellom de to proteinene er direkte. SinI forhindrer SinR fra å binde seg til sin mål-sekvens, og de to proteinene danner et kompleks som kan bli immunopresipitert med antistoffer til SinI eller SinR [54].

SinR fungerer som transkripsjonal regulator av gener involvert i produksjon av ekstracellulær matriks, og SinI kan antagonisere dets handling. Engasjement fra SinR og SinI i regulering av *epsA-O* og *yqxM-sipW-tasA* forklarer indirekte effekter av Spo0A og σ^H på ekstracellulær matriks syntese [55]. YlbF og YmcA er andre faktorer som er med på å inducere biofilmdannelse i *B. subtilis*.

1.3.4 Regulering av biofilmdannelse i *Bacillus cereus* gruppen

Biofilmdannelse i *B. cereus* gruppen er ikke studert i samme grad som for andre bakterier, for eksempel *P.aeruginosa*. Men enkelte mekanismer som påvirker denne prosessen er karakterisert. Intercellulær kommunikasjon er nødvendig for utvikling av bakteriell biofilm. N-acyl homoserine lacton (AHL) er et «quorum-sensing» signalmolekyl som er nødvendig for regulering av forskjellige biologiske funksjoner under biofilmdannelse. AHL er også kjent som en autoinduser. Dong Y-H. og medarbeidere har identifisert «quorum-sensing» N-acyl homoserine lactonaser fra *Bacillus* arter; Et autoinduser inaktiveringsgen, *aiiA*, som koder for AHL laktonase, ble klonet fra *Bacillus* sp. stamme 240B1 [56]. De påviste identifikasjon av mer enn 20 bakterielle isolater som er i stand til enzymatisk inaktivering av AHL fra forskjellige kilder, og 8 isolater som viste sterk AHL-inaktiverende enzymsaktivitet ble utvalgt for taksonomisk analyse. Morfologiske fenotyper og 16S ribosomal DNA sekvensanalyse indikerte at disse isolatene var *B. thuringiensis* [56]. Enzymatisk analyse med kjente *Bacillus* stammer bekreftet at alle stammene av *B. thuringiensis* og også nært beslektede arter *B.cereus* og *B. mycoides* som ble testet, produserte AHL inaktiverende enzymer, men ikke *B.fusiformis* og *B.sphaericus* stammer. Ni gener som koder for AHL-inaktivering ble klonet fra selekterte bakterielle isolater og stammer, og sekvens-sammenlikning av gen-produkter og motivanalyse viste at genproduktene hører til samme familie av AHL-laktonaser [56].

Autoinduser er et signal-molekyl som barrieriene bruker for intercellulær kommunikasjon. Autoinduser (AI-2) påvirker biofilmdannelse i *Bacillus cereus* ATCC 10987; *in vitro* syntesert AI-2 hadde inhibitorisk effekt for biofilmdannelse og promotert frigjøring av celler fra etablert biofilm [57].

Ekspresjon av ekstracellulære virulensfaktorer er under kontroll av global pleotropisk transkripsjonell regulator [58] [19]. PlcR (pleotropic regulator) kan direkte eller indirekte redusere produksjon av biosurfaktant som kreves for biofilmdannelse. $\Delta plcR$ mutant av *Bacillus cereus* stamme ATCC14579 danner signifikant mer biofilm og produserer større mengder av biosurfaktant enn villtype [59].

Hsueh Y. H. og medarbeidere har vist at genet *codY* påvirker biofilmdannelse i *Bacillus cereus* UW101C; En delesjonsmutant *codY* dannet mindre biofilm sammenliknet med villtype [60]. Disse dataene kunne indikere at *codY* undertrykker produksjon en ukjent protease som respons til aminosyrer og intracellulære GTP nivåer, og at dette var involvert i biofilmdannelse [60].

Vilain S. og medarbeidere fant at ekstracellulært DNA (eDNA) virker inn i adhesjon og er en viktig del av biofilm–matriks. Resultater fra deres eksperimenter viser at eksponensiell – fase celler av *Bacillus cereus* ATCC 14579 er dekorert med eDNA og at biofilmdannelse krever DNA som en del av ekstracellulær polymermatriks [61].

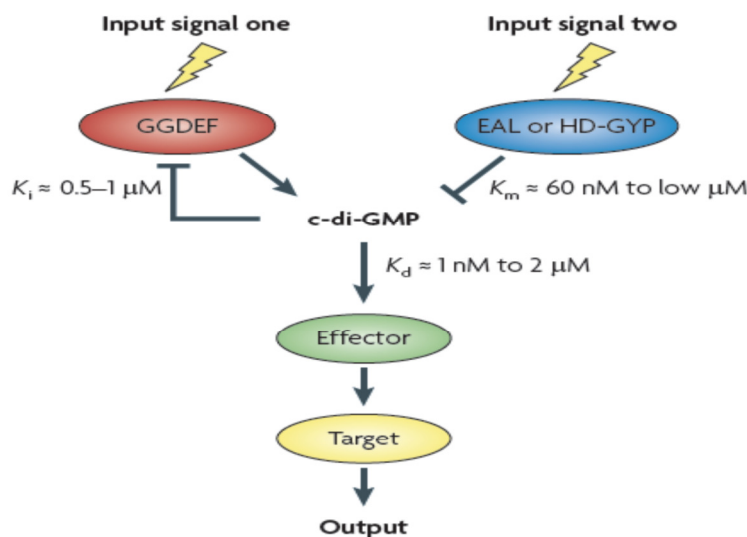
Ved INRA i Frankrike ble det oppdaget et nytt protein som er en potensiell cellevegg peptidase [62]. EntFM har et NlpC/P60 domene, karakteristisk for cellevegg peptidaser. Proteinet er involvert i motilitet, adhesjon til epitel celler, biofilmdannelse og virulens. Disse dataene gav ny informasjon om dette, til da, lite studerte toksin. Det ble foreslått at dette proteinet er en cellevegg peptidase og at navnet burde endres til CwpFM [62]. En *cwpFM* delesjonsmutant har vist redusert motilitet sammenliknet med villtype stamme. Adhesjon av *cwpFM* mutant var redusert med 10 ganger i forhold til villtype. Biofilmdannelse av mutant var over 10 ganger mindre enn villtype stamme. For å sjekke om CwpFM kan bidra til *B.cereus* virulens, ble villtype stamme kontra mutant testet for evnen til å drepe larve i insekt modell *Galleria mellonella*. Resultater har vist at bakteriell virulens ble sterkt redusert i *cwpFM* mutant[62].

1.4 c–di–GMP

Bis–(3`–5`)– cyclic dimeric guanosine monophosphate (c–di–GMP) ble oppdaget av Benziman og medarbeidere, og er et molekyl som allosterisk aktiverer membran–bundet cellulose syntese i *Gluconacetobacter xylinus* [63] [64]. c–di–GMP kontrollerer overgang mellom bakteriens motile singel–cellulære tilstand og biofilmassosiert livsstil [65]. Generelt fungerer c–di–GMP som en «second messenger» i bakterier, og overfører signaler fra miljøet bakterien eksisterer i («first messenger») til cellulære maskiner som generer en respons. c–di–GMP er i Gram–negative bakterier vist å redusere motilitet ved å nedregulere ekspresjon av flageller (for eksempel i *Pseudomonas aeruginosa*) eller ved å forstyrre flagellær motorisk funksjon (*Escherichia coli* og *Caulobacter crescentus*) [66]. Lavt c–di–GMP nivå er også vist å være påkrevet for ekspresjon av enkelte virulensgener (for eksempel i *Vibrio cholerae*) [67]. I alle bakterier som ble undersøkt stimulerte høye c–di–GMP nivåer forskjellige biofilm–assosierte funksjoner, slik som utviklingen av fimbrier, og andre adhesiner og eksopolysakkarider [68] [69]. I *C. crescentus* kan c–di–GMP dessuten kontrollere celle syklus progresjon [70].

c-di-GMP dannes fra to guanosine trifosfate (GTP) molekyler, ved hjelp av enzymer kalt diguanylat cyclaser (DGC) som inneholder GGDEF (Gy-Gly-Asp-Glu-Phe) domener. Kløyving av c-di-GMP katalyseres av to typer fosfodiesteraser (PDE), enzymer som inneholder EAL domener (Glu-Ala-Leu) eller HD-GYP domener (His-Asp, Gly-Tyr-Pro) [65].

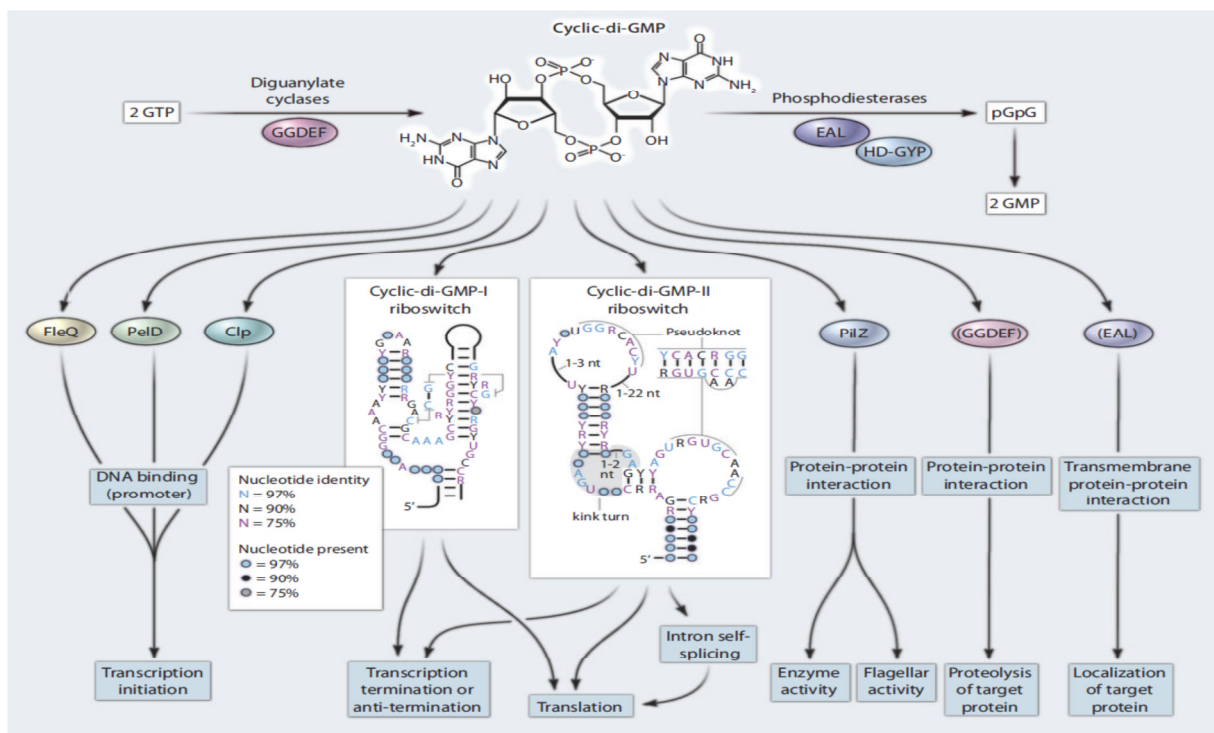
Generelle prinsipper for c-di-GMP signalering kan beskrives ved hjelp av «second messenger control modul» som inneholder fire komponenter (figur 2); To enzymer som responderer på et bestemt signal ved å produsere eller degradere «second messenger»-molekylet. Et effektor molekyl som binder og er allosterisk regulert av «second messenger»-molekylet, og en målkomponent som i respons på direkte kontakt med effektor produserer molekylær «output» [71]. Et klassisk eksempel er cAMP-signaling i *E.coli* [72]. I tilfellet med c-di-GMP er basisprinsippet det samme, men den regulatoriske responsen er mer komplisert og mangfoldig.



Figur 2. c-di-GMP signaleringsmodul [71]. c-di-GMP signaleringsmodul inneholder minst en DGC med GGDEF- domene, og en PDE med EAL- eller HD-GYP- domene. DGC og PDE responderer på forskjellige input-signaler gjennom deres amino-terminale sensoriske domener og balanserer c-di-GMP nivå ved hjelp av deres antagonistiske aktivitet. Binding av c-di-GMP til et sekundært område (I site), som finnes i de fleste DGC-er, resulterer i «feedback» produkt hemming av disse enzymene og bidrar til en fysiologisk øvre grense for cellulær akkumulering av c-di-GMP. Spesifikke effektorer, som kan være proteiner eller deler av RNA-molekylerer

(riboswitcher), kan binde c-di-GMP og deretter påvirke regulatorisk output av et direkte mål-molekyl eller struktur. Målene kan være promoter DNA (hvis effektoren er en transkripsjonsfaktor), enzymer eller komplekse cellulære strukturer (slik som strukturelle flagell komponenter), eller eksopolysakkarid syntese – og sekresjonsapparat. Figuren er hentet fra [71].

Det først identifiserte, og best karakteriserte effektordomenet, er PilZ-domene (figur 3), som er allosterisk kontrollert av c-di-GMP [73] og kan påvirke et enzyms aktivitet (slik som for eksempel cellulose syntese) [74], eller større cellulære strukturer slik som strukturelle flagellekomponenter [75]. C-di-GMP-kontrollerte transkripsjons-faktorer inkluderer (figur 3) FleQ [76] og Pel [77] som kontrollerer eksopolysakkaridsyntese i *P. aeruginosa*, og Clp i *Xanthomonas axonopodis* [78].



Figur 3. Et rikt mangfold av c-di-GMP-bindende effektorer gir mulighet for at «second messenger»-molekylet c-di-GMP kan påvirke flere cellulære prosesser. Transkripsjonen er regulert av forskjellige typer c-di-GMP-bindende faktorer (bindinger med effektordomenene FleQ, PelD og Clp). c-di-GMP kontrollerte riboswitcher regulerer transkripsjonal terminasjon / antiterminasjon eller initiering av translasjon. Aktivitet, lokalisering eller proteolyse av målproteiner eller aktivitet av større cellulær struktur er kontrollert av c-di-GMP-bindende effektor proteiner. Proteiner presentert i farget oval som indikerer forskjellige typer av c-di-GMP-bindet domener. Figuren er hentet fra [65].

RNA molekyler kan også utgjøre effektormolekyler. Sudarsan og medarbeidere oppdaget to c-di-GMP-kontrollerte riboswitcher i *B. cereus*. Riboswitcher er RNA-domener som binder en ligand og som kontrollerer genekspresjon som respons til endringer i konsentrasjonen av mål-liganden. RNA-domenet benevnt GEMM kan befinne seg oppstrøms for gener for DGC- og PDE-proteiner i visse organismer, samt oppstrøms for gener som er kontrollert av c-di-GMP [79]. GEMM-domenet kan folde seg i en kompleks sekundær og tertiær struktur eller «aptamer», som danner en tett og selektiv lomme hvor c-di-GMP kan være bundet ved base-parring så vel som ved hydrofobe interaksjoner [80] [81].

Lee og medarbeidere oppdaget og analyserte andre typer c-di-GMP-bindende riboswitcher (c-di-GMP II) i *Clostridium difficile*. Den er plassert oppstrøms for en ORF (open reading frame) og regulerer transkripsjons terminering/antiterminering eller initiering av translasjon [82].

1.5 MSCRAMM proteiner og BC1060 i *Bacillus cereus* gruppen

BC1060 er et annotert adhesjonsmolekyl i *B. cereus* genomer, som har en domenestruktur typisk for såkalte MSCRAMM-familie proteiner («Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule»). «Bone Sialoprotein-binding Protein» (Bbp) er et bakterielt overflate-protein som medierer festing av mikrober til komponenter av vertens ekstracellulære matriks. Vazquez og medarbeidere undersøkte hvilken ligand MSCRAMM proteiner i *Staphylococcus aureus* har. Data fra deres eksperimenter demonstrerer at fibrinogen er ligand for Bbp og at Bbp kan manipulere biologien til fibrinogen liganden i en vert [83].

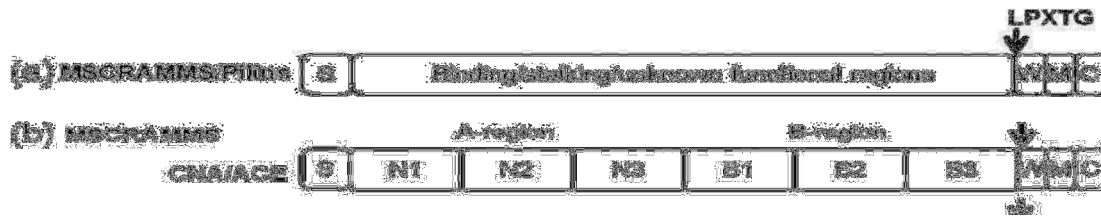
MSCRAMM er overflateproteiner som brukes av ulike bakterier til å binde en verts molekyler, for eksempel kollagen, fibronektin og/eller fibrinogen [83]. Sdr proteiner er en undergruppe av putative MSCRAMM-proteiner fra Stafylokokker, som er kovalent forankret til celleveggen og er karakterisert ved et protein-segment bestående av gjentatte serin-aspartat (SD) dipeptider [84]. Sdr proteiner har en lignende stukturell organisasjon hvor N-terminal ligand-bindende A-region videre kan være delt i tre subdomener (N1, N2 og N3), hvor N2 og N3 antar IgG-liknende strukturer [84]. A-regionen er ofte etterfulgt av en B-region som består av gjentatte β -«sandwich» domener, mens karboksyl-terminal seksjonen i proteinene inneholder serin-aspartat repetisjoner fulgt av motiver nødvendige for cellevegg forankring [84].

Studie som ble utført av Ponnuraj og medarbeidere har vist hvordan ligand bindes til MSCRAMM proteiner. En dynamisk ligand–bindende mekanisme kalles «dock, lock and latch» og ble avslørt ved biokjemiske og strukturelle studier av det fibrinogen–bindende *Staphylococcus epidermidis* MSCRAMM–protein SdrG [85]. SdrG binder seg til en lineær sekvens i N–terminus av B β –kjeden av humant fibrinogen [85] [86]. Bindingen initieres ved «docking» av ligand–peptid til fordypningen dannet mellom N2– og N3–domenene, og liganden blir «låst» ved interaksjoner med aminosyre–residier ved ekstensjonen av C–terminus i N3, som er omdirigert for å dekke bundet ligand–peptid. Deretter vil «latch» regionen i N3–domenet stabilisere ligand–MSCRAMM komplekset ved omstrukturering av N3–domenet inn i N2–domenet gjennom β –tråd komplementasjon [83] [85] [87].

Forskjellige Sdr proteiner har konservert domene– struktur. Derfor har mekanismen «dock, lock and latch» vært foreslått som generell mekanisme for ligand–binding for denne subfamilien av MSCRAMM–er [83].

Det finnes en rekke fibrinogen–bindende MSCRAMM–proteiner i *S.aureus*, hver av disse kan reagere med flere ligander. ClfA binder seg til komplement faktor I [88], ClfB binder seg til cytokeratin [89], FnbpA til elastin, og både FnbpA og FnbpB til fibronektin [90].

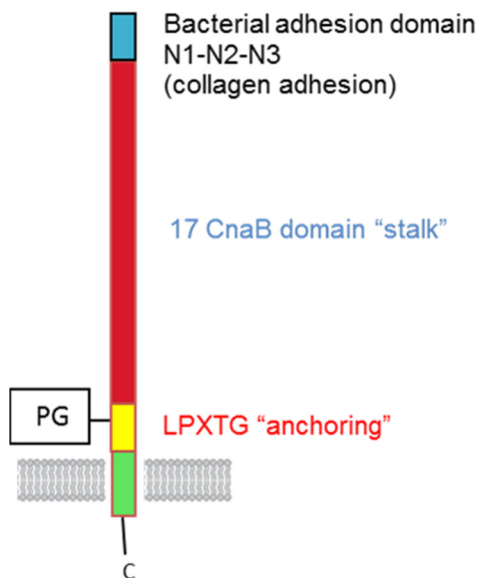
BC1060 er annotert som et kollagen adhesjonsprotein i *B. cereus* ATCC 14579. En analyse av predikert proteinsekvens viser at BC1060 har en repeterende struktur overenstemmende med bakterielle celleoverflate adhesiner (figur 4) og er en homolog til *S. aureus* CNA homolog (Fagerlund *et al.*, ikke publisert). BC1060 har en karakteristisk domenestruktur for MSCRAMM–proteiner (Fagerlund *et al.*, ikke publisert), og man har bestemt å navngi dette proteinet BspA, etter Bacillus surface protein A. I min oppgave velger jeg dog å bruke betegnelsen BC1060 gjennomgående. Figur 5 viser proteinet BC1060 i tilknytning til cellemembranen.



Figur 4. Domene struktur for Gram-positive adhesiner:

(a): Felles strukturelt motiv presentert i MSCRAMM-proteiner. En N-terminal signalsekvens (S) er etterfulgt av varierende antall av repeterende og ikke-repeterende regioner egnet for forskjellige funksjoner (ligand binding / forfølgning / ukjente funksjoner). Den C-terminale regionen inkluderer en cellevegg-sorterende region (W) inneholdende et LPXTG motiv, et membran-spennende hydrofobisk domene (M) og en cytoplasmisk positivt ladet C-terminal hale (C).

(b): Organisering av kollagen-bindende (CNA/ACE) MSCRAMM-proteinerer. CNA er et kollagen-bindende domene tilhørende MSCRAMM-proteinerer i *S. aureus*. Den ligand-bindende A-regionen er sammensatt av N1, N2 og N3 domener. B-regionen av CNA domenet har ingen rolle i kollagen-binding og har tre enheter – B1, B2 og B3. Figuren er hentet fra [91].

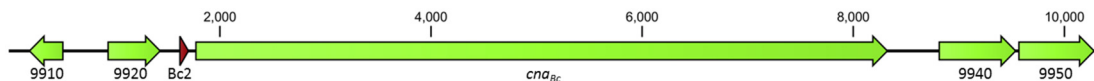


Figur 5. En modell av proteinet BC1060 i tilknytning til cellemembranen. C-terminal del (grønn) antas å gå gjennom plasmamembranen og er hydrofob. Et LPXTG domene (gult) inneholder signalsekvens for kovalent kobling til peptidoglykan. «Stilk-lignende» struktur av 17

CnaB domener etterfølges av et adhesjonsdomene (annotert som kollagen-bindende N1–N3). Figuren er hentet fra (Fagerlund *et al.*, ikke publisert).

1.6 Identifikasjon av c–di–GMP responsive riboswitcher

Analyse av promoter regionen til BC1060 ortologen i *B.thuringiensis* 407 viste at den inneholder en perfekt match til klasse I c–di–GMP responsive riboswitchen (GEMM; Bc2) som tidligere ble identifisert i BC1060 oppstrøms-regionen i *B.cereus* ATCC14579 av Sudarsan [79]. Denne riboswitchen (figur 6) er vist å respondere på økt nivå av c–di–GMP ved å slå på transkripsjon av nedstrømsliggende gen BC1060 i *B.cereus* ATCC14579 [92].



Figur 6. Gen organisering av regionen som koder BC1060. Viser c–di–GMP sensitiv riboswitch Bc2 (rød) og liggende nedstrøms gen som koder for protein BC1060. Figuren er hentet fra (Fagerlund *et al.*, ikke publisert).

1.7 Genet *cdg135* i *Bacillus cereus* gruppen

I biofilm modellstammen Bt 407, var 10 gener som koder for GGDEF og/eller EAL domener tidligere identifisert, hvorav 8 ble predikert å ha c–di–GMP enzymatisk aktivitet (Fagerlund *et al.*, ikke publisert). Protein Cdg135 ble predikert å være et c–di–GMP metaboliserende enzym, og ble påvist å ha kraftig effekt på biofilmdannelsen i Bt 407. Biofilmdannelsen ble kraftig hemmet i *cdg135* delesjonsmutant (Fagerlund *et al.*, ikke publisert).

Ved overuttrykk av *cdg135*, indikerte preliminare eksperimenter at økt mengde av Cdg135 medfører en økning av c–di–GMP nivåer i cellen ved diguanylat cyclase-aktivitet (Fagerlund *et al.*, ikke publisert). En hypotese var at c–di–GMP kunne binde seg til riboswitch oppstrøms for BC1060 og dermed slå på transkripsjon av dette genet via sin c–di–GMP «on-switch» [92], hvilket da ville antas å føre til økt produksjon av protein BC1060. Det var også kjent at en BC1060–delesjonsmutant hadde kraftig svekket evne til biofilmdannelse i Bt407 [93]. Det var derfor av interesse å undersøke om det kunne være en direkte kobling mellom c–di–GMP syntese fra Cdg135 og BC1060–transkriptnivåer i cellen.

1.8 Problemstilling / Mål med studien

Målet med denne studien var å finne ut om ekspresjon av BC1060 kunne være påvirket i en *cdg135* delesjonsmutant gjennom endrede cellulære c-di-GMP nivåer, ved hjelp av real-time PCR. Det var også ønskelig å identifisere hvilken ligand BC1060 eventuelt kan benytte for eksempel ved binding til humane matriks-molekyler.

Det praktiske arbeidet bestod her i å PCR-amplifisere A domenet (putitativt kollagen adhesjonsdomene, hhv. regionene N1-N2 og N1-N3) med C-terminal His-tag, klonere amplifisert fragment i en TOPO-plasmid-vektor, og videre å uttrykke proteinet i en egnet *E.coli* stamme (BL21DE3 eller BL21DE3 pLysS), samt rense peptidet på Ni-NTA kolonne. Et eventuelt rensset peptid kunne benyttes til å undersøke hva slags matriks proteiner BC1060 binder seg til: fibrinogen, kollagen type I-IV, elastin, laminin, fibronektin eller albumin.

2. Materialer

2.1 Bakteriestammer

Tabell 1. Bakteriestammer brukt i dette arbeidet.

Stamme	AH kode
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407	1423
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407 Δ cdg135	1711
<i>E.coli</i> BL21 DE3	1498
<i>E.coli</i> BL 21 DE3 pLysS	802

2.2 Primere

Tabell 2. Primere som ble brukt i dette arbeidet

Primer	Sekvens (5' til 3')
CnaBc_RBS_F	tgaggaggttccagttatgcaagctgctgtga
CnaBc_N1–N2_His_R1	ttattagtgatggtgatggtgatgtgcaccgctgccattctcatcaactatatttttcaat
CnaBc_N1–N3_His_R2	ttattagtgatggtgatggtgatgcatcctgcaccatctttggagcttcagg
CnaBc_F2	atccttcgattgctgattgg
S2	taacaatttcacacaggaaacagc

M13 forward	gtaaacgacggccag
M13 revers	caggaaacagctatgac
gatB_left	agctggcgtgaagacctg
gatB_right	cggcataacagcagtcac
rpsU_left	aagatcggtttctaaaactggtaca
rpsU_right	tttctgcccgttcagatt
udp_left	actagagaaactggaaatgatcg
udp_right	gacgcttaattgcacggaac
02561-BC1060-F3	atgtaacaggggacggcata
02561-BC1060-R3	tactgccccgtttctttgt

2.3 Enzymer

DNase I (Fermentas)

DyNAzyme™II DNA Polymerase (Finnzymes)

Eco RI (BioLabs)

Lysozyme (Sigma)

Pfu Ultra II Fusion HotStart DNA polymerase (Agilent)

RNase A (Fermentas)

SUPERase^o In (Ambion)

Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen)

Turbo DNase (Ambion)

2.4 DNA størrelsesmarkører

GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas)

λ DNA–BstEII Digest (BioLabs)

2.5 Protein molekylærvækt standarder

MultiMark™ Multi–Colored standard (Novex)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas)

2.6 Dyrkningsmedier

Baktopepton medium

10 g Baktopepton

5 g Gjær ekstrakt

10 g NaCl

Komponenter ble løst opp i MQ vann og volum justert til 1 L. Løsningen ble autoklavert, oppbevares ved 4°C.

LB agarplater

10 g Trypton

5 g Gjær ekstrakt

10 g NaCl

15,0 g Nr 1 Bakteriell agar

Løst i 950 ml MQ vann, pH justert til 7,0 med 5,8 M HCl, volum justert til 1 L med MQ vann. Autoklavert, oppbevares ved 4°C.

LB medium

10 g Trypton

5 g Gjær ekstrakt

10 g NaCl

Løst i 950 ml MQ vann, pH justert til 7,0 med 5,8 M HCl, volum justert til 1 L med MQ vann.
Autoklavert, oppbevares ved 4°C.

SOC medium

20 g trypton

5 g Gjær ekstrakt

0,5 g NaCl

Komponenter ble løst opp i 950 ml MQ vann. Ti ml 250 mM KCl ble tilsatt og pH justert til 7,0 med 5,8 M HCl, volum justert til 1 L med MQ vann. Løsningen ble autoklavert. Etter at løsningen ble kjølt ned, ble 5 ml steril MgCl₂ (2 M) og 20 ml steril glukose (1 M) tilsatt. Oppbevares ved -20°C.

2.7 Kit

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

RNeasy mini spin columns

Buffer RLT

Buffer RW1

Buffer RPE (etanol tilsettes før bruk)

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Omega Bio-Tek)

HiBind Miniprep columns

Solution I

Solution II

Solution III

Buffer HB

Elution Buffer

DNA Wash buffer (etanol tilsettes før bruk)

TOPO TA Cloning® (Invitrogen)

pCR®II–TOPO® (10 ng/µl plasmid DNA i: 50 % glycerol, 50 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X–100, 100 µg/ml BSA, fenol rød.)

Salt løsning (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)

pUC19 kontroll DNA (10 pg/µl i 5 mM Tris–HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8)

One Shot® TOP10 kjemisk kompetente *E. coli* celler.

2.8 Buffere, reagenser og kjemikalier

10 x Pfu Ultra II buffer (Agilent)

10 x Turbo DNase buffer (Ambion)

10 x DyNAzyme buffer (Finnzymes)

10 x Eco RI buffer (BioLabs)

5 x First–strand buffer (Invitrogen)

Agar bacteriological No1 (Oxoid)

Agarose (Sigma–Aldrich)

Ampicillin (Sigma–Aldrich)

Akrylamid 30% (BIO–RAD)

Ammonium persulfat (Chemi–Teknik)

β –merkaptoetanol (Sigma–Aldrich)

Bio–Safe TMCoomassie G 250 Stain (BIO–RAD)

Baktopepton (Becton, Dickinson and Company)

DEPC vann (Ambion)

DTT (Biosynth)

dATP (Qiagen)

dCTP (Qiagen)

dGTP (Qiagen)

dTTP (Qiagen)

Etanol (Arcus kjemi)

EtBr (Sigma–Aldrich)

EDTA (M&B laboratory chemicals)

Ficoll 400 (Calbiochem)

Gjærekstrakt (Oxoid)

Glyserol (VWR International Ltd)

Glycin (Sigma–Aldrich)

HCl (VWR)

IPTG (Fermentas)

Imidazol (Fluka)

Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche)

MgCl₂ (Sigma)

Metanol (Merck)

MgSO₄ x 7H₂O (Fluka)

Na₂HPO₄ x 2H₂O (Merck)

NaCl (Merck)

NaOH (Merck)

Orange G (BDH)

PEG 8000 (Sigma)

PMSF (Sigma–Aldrich)

Random hexamer (Applied Biosystems)

RNase away (Sigma–Aldrich)

SDS (Sigma–Aldrich)

Tris – Base (Sigma–Aldrich)

Tryptone (Oxoid)

TEMED (Sigma–Aldrich)

X–gal (Fermentas)

2.9 Løsninger

Orange Mix

20 g Ficoll

0,25 g Orange G

4 ml 0,5 M EDTA

Løst i 100 ml destillert vann, sterilfiltrert, lagres ved -20°C .

20 % SDS

200 g SDS

MQ vann til 1 L

Løses under svak varme (ikke over 68°C) til klar løsning, ikke autoklaveres, lagres ved romtemperatur.

50 x TAE (Tris/Acetat buffer)

242,0 g Tris- base

57,1 ml 17,5 M Acetat (eddik syre)

100 ml 0,5M EDTA pH 8,0

MQ vann til 1 L

Lagres ved romtemperatur.

10 x TBE (Tris/borat buffer)

108,0 g Tris – Base

55,0 g Borsyre

9,3 g EDTA

MQ vann til 1 L

Lagres ved rom temperatur

1M Tris

121,0 g Tris–base

MQ vann til 1 L, pH justeres til ønsket ved hjelp av konsentrert HCl

10% APS (Ammonium persulfat)

100 mg APS

1000 µl MQ vann

Ampicillin (100 mg/ml)

2 g ampicillin

MQ vann til 20 ml

Steriltfiltrert, alikvotert i sterile eppendorfrør, lagres ved –20°C.

dNTP mix (final konsentrasjon 10mM hver)

10 µl dATP (100 mM)

10 µl dGTP (100 mM)

10 µl dTTP (100 mM)

10 µl dCTP (100 mM)

60 µl MQ vann

Lagres ved -20°C .

TSS

1,0 g PEG 8000

0,5 ml DMSO

20–50 mM Mg^{2+}

Løses i 10 ml flytende LB, sterilfiltreres, lagres ved 4°C

TEN buffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

100 mM NaCl

i MQ vann

Lysisbuffer

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

i MQ vann

5 x Tris–glycin buffer

15,1 g Tris base

94.0 g glycin

Løses opp i 900 ml MQ vann, 50 ml 10 % SDS tilsettes, volum justeres til 1 L.

2.10 Annet

96x 0,2 plate Semi–skritet Thinwall (BIO Plastics BV)

GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)

Centrifuge Avanti™, J–25 rotor (Beckman)

Biofuge pico (Heraeus instruments)

ChemiGenius² (Syngene)

Digital Dry Bath (Labnet International Inc.)

Eppendorf Biophotometer (Eppendorf)

Eppendorf UVette™ (Eppendorf)

Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)

Light Cycler® 480 Real–Time PCR System (Roche)

Mini–PROTEAN® Tetra Cell (BIO–RAD)

Opti-Seal Optical Disposable Adhesive film (BIO Plastics BV)

P10 pipette, UVpette™ tip (Picodrop)

PCR rør (Sarstedt)

Picodrop Microlitre Spectrophotometer (Picodrop)

Precellys rør VK01 (Bertin Technologies)

Precellys™24 (Bertin Technologies)

Rotina 420R (Hettich Zentrifugen)

Vibra cell™ (Sonics & Materials Inc.)

3. Metoder

3.1 Dyrkning av bakterier

3.1.1 *Bacillus-cereus* gruppe stammekolleksjon

I forskningsgruppen finnes en samling av ulike stammer fra *Bacillus cereus*. Alle stammene som er benyttet i dette arbeidet er hentet fra denne samlingen og har sitt interne registreringsnummer (AH). Stammene ble opprinnelig tillaget ved at en enkelt koloni ble overført til egnet medium og dyrket over natt ved egnet temperatur og risting. Bakteriekultur ble reinokulert videre i egnet medium og dyrket til $OD_{600}=0,6$. Deretter ble det tilsatt 20 % glycerol og kulturen lagret ved -80°C .

3.1.2 Vekstkurver

Vekstkurver ble gjennomført for å finne beste tidspunkt i vekstsyklusen for prøvetaking for RNA isolering. En vekstkurve beskriver vekstsyklusen til en mikrobiell populasjon og inkluderer lag-fase, eksponentiell (log)-fase, stasjonær-fase og død-fase.

Når kulturen inokuleres i ferskt medium, begynner veksten bare etter en tidsperiode som kalles lag-fase. Lengde av dette intervallet kan variere og er avhengig av kulturens historie og vekstforholdene. Når celledtallet fordobler seg per konstant tidsintervall, starter eksponentiell-fasen. Hvis man plotter antall celler på aritmetiske (lineære) koordinater som funksjon av tid, får man en kurve med en kontinuerlig stigning. Hvis man plotter celledtallet på logaritmisk skala (\log_{10}) og tid plottes aritmetisk (på semilogaritmisk graf), faller punktene på en rett linje. Denne rette linjen reflekterer det fakta at celler vokser eksponentielt og at populasjonen fordobles per konstant tidsintervall. Celler i eksponentiell vekst er i sin «sunneste» fase, derfor er denne fasen mest å foretrekke for forskning. Veksthastighet i log-fase avhenger av mange faktorer, slik som temperatur, medium sammensetning og bakterienes genetikk. Når eksponentiell vekst opphører på grunn av at næringsstoffene i mediumet er brukt opp eller at avfallsproduktene fra bakteriene kommer til et vekstinhibitorisk nivå, starter stasjonær fase. Noen celler kan deles i denne fasen, men ingen netto økning av celledtall oppstår. Hvis inkubering fortsettes etter at populasjon kommer til stasjonær fase, kan cellene forbli levende, men de vil dø til slutt. Når det skjer, kommer populasjonen til død-fasen. Død-fase er også en

eksponentiell funksjon, men hastigheten på celledød er mye lavere enn hastigheten i eksponentiell vekst fase [94].

Prosedyre:

Arbeidet ble utført på P2 lab og i LAF benken (Holten Lamin Air).

Sterilteknikk ble benyttet. En liten mengde av bakteriekultur fra frysestock kolleksjon, stamme *Bacillus thuringiensis* 407 villtype (AH1423) og *Bacillus thuringiensis* 407 Δ cdg135 (AH 1711) ble strøket ut på fast LB medium og dyrket over natt ved 37°C. En enkelt koloni fra utstryk på agarskål ble overført med steril øse til 5 ml LB flytende og inkubert over natt ved 30°C og risting 200 rpm (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Neste dag ble 500 μ l fra over natt kultur reinokulert i 50 ml baktopepton (kolber 500 ml, Bellco Biotechnology) ved 30°C og risting på 200 rpm i 1 time.

3.2 Analyse av bakterietetthet ved måling av optisk tetthet

Celler har den egenskapen at de sprer lys. Metoden med å estimere cellemasse baseres på denne egenskapen – turbiditet. Et spektrofotometer generer lys av bestemte bølgelengder, sender det gjennom celle suspensjonen og måler det ikke-spredte lyset som oppstår. Desto flere celler som er til stede i suspensjonen, jo mer er lyset spredt – og desto mer turbid er suspensjonen. De mest vanlige bølgelengdene for måling av bakteriell turbiditet er 480 nm (blå), 540 nm (grønn), 600 nm (oransje) og 660 nm (rød). En enhet av turbiditet kalles optisk tetthet (optical density, OD) og gis ved en spesifisert bølgelengde, f eks OD₆₀₀ [95].

1 OD enhet = \log_{10} (intensitet av transmittert lys / intensitet av innfallende lys) [96].

Prosedyre:

Måling av optisk tetthet ble gjort ved 600 nm (Eppendorf Biophotometer). En blank prøve med 1 ml baktopepton ble benyttet for å kalibrere spektrofotometeret. Den første målingen ble foretatt 1 time etter at 500 μ l av over natt kultur ble reinokulert i 50 ml baktopepton ved 30°C og risting på 200 rpm. Etterfølgende målinger ble foretatt hver halve time i totalt 5 timer. Måling av optisk tetthet ble utført med 3 tekniske replikater for hver biologisk replikat.

Målingene utføres i området hvor OD₆₀₀ ikke overstiger 0,6 – fordi det er i dette området maskinen har sitt optimale deteksjonsvindu. Derfor ble prøvene etter en tid fortynnet med baktopepton.

3.3 Mikroskopi

For å sammenligne graden av motiletet for vill type og mutant, ble mikroskopi (Leica DMLS) utført ved hvert prøvetakningstidspunkt.

3.4 Isolering av RNA

Ved RNA isolering fra stammene *Bacillus thuringiensis* 407 villtype (AH1423), og fra *Bacillus thuringiensis* 407 Δ cdg135 (AH 1711), ble QIAGEN®RNeasy MiniKit benyttet. RNeasy prosedyre representerer en ny teknologi for RNA isolering som kombinerer selektive bindingsegenskaper av silika-basert membran med «speed of microspin» teknologi. Spesialisert salt-buffer system gir mulighet for at opp til 100 µg av RNA lengre enn 200 baser kan binde seg til RNeasy silika-membranen. Prøvene ble først lysert og homogenisert ved hjelp av guanidine-thiocyanate buffer som inaktiverer RNaser. Etanol tilsettes for å sikre passende bindingsforhold. Prøven overføres til RNeasy Mini spin kolonne hvor total RNA bindes til membranen og kontaminasjoner er vasket vekk. Høykvalitets RNA elueres i 30–100 µl vann. Med denne prosedyren kunne alle RNA molekyler lengre enn 200 nukleotider isoleres. Prosedyren gir en berikelse for mRNA siden alle RNA < 200 nukleotider (5.8rRNA, 5S rRNA og tRNA) er selektivt ekskludert [97].

RNA er ustabil og degraderes veldig raskt av RNaser. For å forhindre RNA degradering og for å redusere RNaser kontaminasjon, ble noen forsiktighetstiltak utført. Alt utstyr (pipetter, benkeoverflater, blyanter, bokser etc.) ble vasket med RNase away rutinemessig. Hansker ble byttet ofte og filterspisser (Aerosol Resistant Tips, Molecular BioProducts) ble benyttet under hele prosedyren.

Prosedyre:

Dyrkning av celler for RNA isolering: se protokoll vekstkurver (punkt 3.1.2). Optisk tetthet ble målt og prøvene ble høstet i tidlig eksponentiell fase ved $OD_{600}=0,35$ som var nådd etter 1,5–2 timer.

- 1) Hvert rør med 10 ml iskald metanol ble tilsatt 10 ml bakteriekultur. Rørene ble sentrifugert ved 5000 rpm, 4°C i 15 minutter (Beckman, Avanti™, J–25 rotor).
- 2) Supernatanten ble fjernet og pellet resuspendert i 950 µl buffer RLT med β-mercaptoetanol (konsentrasjon 10 µl/ml).
- 3) Prøvene ble overført til precellys rør (VK01) og lysert (Precellys™24, Bertin technologies) i 2 sykler på 5800 rpm i 30 sekunder med 20 sekunders pause mellom sykler.
- 4) Celleavfall ble fjernet ved sentrifugering ved rom temperatur, 13000 rpm i 1 minutt (Biofuge pico, Heraeus instruments).
- 5) Supernatant uten celleavfall ble overført til nytt ependorfrør inneholdende 700 µl 70 % etanol og mikset.
- 6) 700 µl av prøve (supernatant + etanol) ble overført til RNeasy Mini spin kolonne og spunnet ned i 20 sekunder. I alle trinn videre foregår sentrifugeringen ved romtemperatur, og 13000 rpm. Gjennomstrømning kastes og resten av prøven (700 µl) ble lastet på kolonne, og spunnet ned i 20 sekunder.
- 7) 350 µl RW1 buffer ble tilsatt til kolonne, spunnet ned i 20 sekunder.
- 8) 350 µl RW1 buffer ble tilsatt til kolonne, spunnet ned i 20 sekunder.
- 9) Kolonne plasseres i nytt ependorfrør.
- 10) 500 µl RPE buffer ble tilsatt til kolonne, spunnet ned i 20 sekunder, og gjennomstrømning ble kastet.

- 11) 500 μ l RPE buffer ble tilsatt til kolonne, spunnet ned i 20 sekunder, gjennomstrømning ble kastet, spunnet ned i 2 minutter.
- 12) Kolonne plasseres i nytt ependorfrør. 30 μ l DEPC vann ble tilsatt, spunnet ned i 20 sekunder.
- 13) 30 μ l DEPC vann ble tilsatt. Prøvene ble inkubert ved rom temperatur i 1 minutt, spunnet ned i 1 minutt, kolonne ble kastet, og gjennomstrømning (prøve med isolert RNA) ble plassert på is.
- 14) RNA konsentrasjon ble målt, se punkt 3.5.
- 15) Turbo Dnase-behandling. Hvert rør inneholder:
 - 20 μ g RNA (volum ble beregnet på grunnlag av RNA konsentrasjon) + DEPC vann til total volum 88 μ l
 - 10 μ l 10 x Turbo DNase buffer
 - 2 μ l Turbo DNasePrøvene ble inkubert i 30 minutter ved 37°C (Digital Dry Bath, Labnet International, Inc).
- 16) 350 μ l RLT buffer med β -mercaptoetanol (konsentrasjon 10 μ l/ml) ble tilsatt til 100 μ l DNase behandlet prøve.
- 17) 250 μ l 100 % etanol ble tilsatt og mikset.
- 18) Prøvene ble overført til RNeasy Mini spin kolonne, spunnet ned i 20 sekunder.
- 19) 500 μ l RPE buffer ble tilsatt, spunnet ned i 20 sekunder, gjennomstrømning kastet.
- 20) 500 μ l RPE buffer ble tilsatt, spunnet ned i 20 sekunder, gjennomstrømning ble kastet, spunnet ned i 2 minutter.

21) Kolonne overføres til nytt ependorfrør, 30 µl DEPC vann ble tilsatt, spunnet i 20 sekunder. Gjennomstrømning ble tatt ut og tilsatt igjen til kolonne, dette økte konsentrasjonen. Prøvene ble spunnet ned i 1 minutt og satt på is.

22) RNA konsentrasjon ble målt, se punkt 3.5

Prøvene benyttes i forsøk videre og kan oppbevares ved -20°C . Om det er nødvendig med lang tids oppbevaring, må de lagres ved -80°C .

3.5 Bestemmelse av RNA og DNA konsentrasjon ved måling av absorbens

DNA og RNA konsentrasjon kan måles ved hjelp av ultrafiolett (UV) absorbens spektrofotometri. Både RNA og DNA absorberer UV lys veldig effektivt og dette gir mulighet til å detektere og kvantifisere RNA- og DNA-mengder ved ganske lave konsentrasjoner. Nitrogenholdige baser i nukleotider har absorpsjon maksimum ved 260 nm.

Mengden av UV-stråling som blir absorbert av DNA er direkte proporsjonal med mengden DNA i prøven. Vanligvis blir absorbens målt ved 260 nm, der bølgelengden til absorbens (A_{260}) på 1,0 tilsvarer 50 mg av dobbelt-tråd DNA per 1 ml. Ultrafiolett absorbens kan også brukes for å sjekke renhet av DNA prøve. Ved ren DNA prøve er ratio av absorbens ved 260 nm og 280 nm (A_{260}/A_{280}) 1,8. Ratio mindre enn 1,8 indikerer at prøve er kontaminert med proteiner eller fenol [98].

Absorbans av 1 enhet ved 260 nm tilsvarer 40 µg RNA per 1 ml. Tilsvarende for enkel-tråd DNA er 33 µg/ml. Ratio A_{260}/A_{280} for RNA er 2,0.

Konsentrasjon kan beregnes på følgende måte:

DNA konsentrasjon(µg/ml)= $A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{fortynningsfaktor}$

RNA konsentrasjon(µg/ml)= $A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{fortynningsfaktor}$

Prosedyre:

Konsentrasjonsmåling for både RNA og DNA ble utført på 2 maskiner: Eppendorf Biophotometer og Picodrop Microlitre Spectrophotometer. For å få presist resultat ved arbeidet på den første maskinen, kreves det at OD ligger innenfor følgende grenser: $0,05 < OD < 0,5$. Derfor ble prøvene fortynnet fra 1:50 til 1:200 og applisert i Eppendorf UVette®.

Ved bruk av Picodrop kreves ikke noen fortynning og prøvene tas ufortynnet ved hjelp av en P10 pipette og en UVpette™. Minimum prøvevolum er 2,5 µl. Før man utfører måling kreves det for begge maskiner at man måler en blank løsning (DEPC vann) for å stille bakgrunnsabsorbansen til null.

3.6 Agarose gel elektroforese

DNA molekyler kan separeres ved gel elektroforese, hvor prøve plasseres i et elektrisk felt og DNA molekyler som har negativ elektrisk ladning på overflatene, på grunn av fosfatgruppene, vil derfor vandre mot positiv pol. Elektroforese foregår i en agarose gel. Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. Med agarosegeler brukes lav konsentrasjon til å separere store DNA fragmenter og omvendt. 2 % agarose kan separere DNA av størrelse 100–2000 bp, 1 % gel kan brukes til separere fragmenter på 500–6000 bp [99].

Vandringshastighet av DNA gjennom agarose gel er determinert av følgende faktorer [100]:

- Molekylstørrelse. Molekyler av dobbel-tråd DNA vandrer gjennom gel matrise med en hastighet som er omvendt proporsjonal til \log_{10} av antallet basepar. Store DNA molekyler vandrer sakte og kortest.
- Agarose konsentrasjon. Linært DNA fragment av en bestemt størrelse vandrer med forskjellig hastighet gjennom geler med forskjellige konsentrasjoner.
- Tilstedeværelse av EtBr i gel og elektroforese buffer. Interkalering av EtBr reduserer negativ ladning av dobbel-tråd DNA. Vandringshastighet for linær DNA-farget kompleks er forsinket med en faktor på 15 %.
- Tilført spenning. Effektivitet på separasjon i agarose gel økes med økt spenning.

– Type av agarose. De to viktigste klassene: Standard, med høy smeltetemperatur, og agarose med lav smeltetemperatur.

– Elektroforese buffer. Mobiliteten til DNA molekyler påvirkes av sammensetningen og ionisk styrke av buffer [100].

Vandringshastighet påvirkes også av DNAs konformasjon. Supervridd sirkulært DNA vandrer raskest og lengst. Lineært DNA (av samme størrelse) går saktere og åpen sirkel enda saktere [101].

3.6.1 Separasjon av DNA

Prosedyre:

Gel:

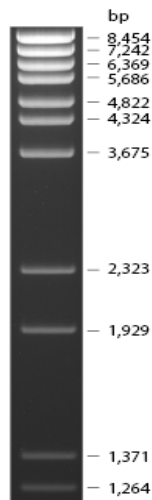
0,5 g agarose

45 ml vann

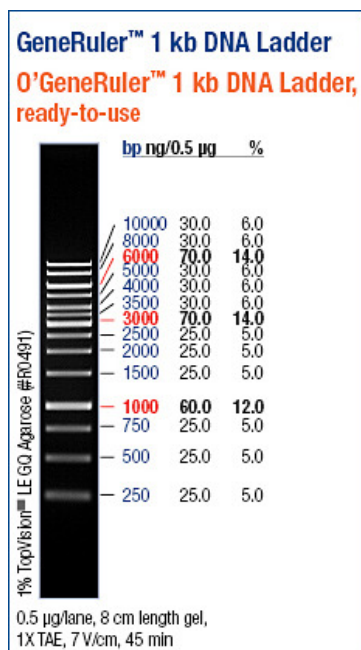
5 ml 10xTBE buffer

5 μ l EtBr

Agarosepulveret ble løst i vann og 10xTBE buffer, varmet til koking i mikrobølgeovn og deretter avkjølt i vannbad til ca. 50°C. Så ble det tilsatt 5 μ l EtBr. EtBr er mutagent, derfor foregikk arbeidet med løsningen i avtrekkskap og nitrilhansker ble brukt. Etidiumbromid interkalerer i DNA molekylet mellom to basepar. Det er et fluorescerende stoff og ved UV belysning vil DNA med EtBr være synlig [102]. DNA-bundne EtBr absorberer lyset og det emitteres ved 590 nm, som er i det rødorange området i det synlige spektret. Gel ble støpt i elektroforese apparat. Karet med stivnet gel ble fylt med 1xTBE slik at TBE dekket gel. Loading mix ble applisert i brønner. λ DNA–BstEII Digest og 1kb DNA ladder ble brukt som størrelsesmarkører. En størrelsesmarkør er en blanding av DNA med kjente størrelser. Bruk av slike markører gir mulighet til å bestemme størrelsen av ukjent DNA fragment ved å sammenlikne den med en størrelsesmarkør, (Figur 7 og 8).



Figur 7. λ DNA–BstEII Digest visualisert med EtBr i 1 % agarose gel, konsentrasjon 500 $\mu\text{g/ml}$. Figuren er hentet fra [103].



Figur 8. GeneRuler™ 1 kb DNA ladder–blanding av kromatografisk rensset DNA fragmenter 250–10000 bp, konsentrasjon 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Figuren er hentet fra [104].

Loading mixer:

– 0,7 µl λ DNA–BstEII Digest + 9,3 µl vann + 2 µl OM

– 3 µl prøve + 4 µl vann + 3 µl OM

– 2,5 µl 1 kb DNA Ladder+7,5 µl vann

Elektroforese ble kjørt ved 70 V i 1–2 timer

3.6.2 Separasjon av RNA

Prosedyre:

Gel:

0,3 g agarose

30 ml 1xTAE buffer

3 µl oransje mix

Agarose ble løst i 1xTAE buffer, varmet til koking i mikrobølgeovn og deretter avkjølt i vannbad til ca. 50°C. Etterpå ble det tilsatt 3 µl EtBr. EtBr er mutagent, derfor foregikk arbeidet med løsningen i avtrekkskap og nitrilhansker ble brukt. Gel ble støpt i elektroforese apparat. Karet med stivnet gel ble fylt med 1xTAE slik at TAE dekket gel. Loading mix ble applisert i brønner.

Loading mix:

- 500 µg RNA (volum ble beregnet på grunnlag av RNA konsentrasjon) + DEPC vann til total volum 5 µl
- 1 µl oransje mix.

Elektroforese ble kjørt ved 80 V i 45 minutter.

3.7 cDNA syntese

Denne metoden ble anvendt for å oppformere RNA sekvenser. mRNA kommer fra transkripsjonen av gener som aktivt blir uttrykt. I tilfelle hvis noen gener blir sterkt uttrykt, får vi mye mRNA. mRNA revers transkriberes til cDNA ved hjelp av enzym revers transkriptase. Enzymet revers transkriptase bruker RNA som templat til å lage komplementær DNA-tråd. Enzymet kodes av blant annet retrovirus, for eksempel RSV eller ASV (Rous eller Avian Sarcoma virus), og har blitt isolert fra celler som er infisert med sistnevnte. Første trinn i cDNA syntese benytter seg av deoksytrinukleotider (dNTP) og Random hexamer. dNTP er byggesteiner og består av deoksyadenosintrifosfat (dATP), deoksytymidintrifosfat(dTTP), deoksytymidintrifosfat(dCTP) og dioksyguanidintrifosfat (dGTP) [105].

Applied Biosystems® Random Hexamers er korte oligonukleotider av tilfeldig sekvens som hybridiseres til tilfeldige komplementære områder i RNA og tjener som primer for cDNA syntese med DNA polymerase og reverstranskriptase [106].

Reaksjonsblanding i hvert rør:

2 µg RNA + DEPC vann til 8,3 µl

0,75 µl Random Hexamer (Applied Biosystems®, 120 ng/µl)

0,75 µl dNTP mix

Total volum 9,8 µl

Prøvene ble inkubert i PCR maskin på 65°C i 5 minutter.

Etter inkubering ble PCR rørene satt direkte på is for å bryte ned sekundærstruktur i RNA. Hvis man lar det gå sakte ned i temperatur så vil sekundærstrukturen kunne dannes på nytt. En løsning med revers transkriptase (RT+) ble tilsatt til PCR rørene med 2 tekniske replikater av hver stamme (Bt407wt og Bt407Δ*cdg135*). Det ble satt to negative kontroller uten revers transkriptase (RT-), en for hver stamme, for å kontrollere mulig gDNA kontaminasjon.

RT+

3 µl 5×First–Strand Buffer

0.75 µl DTT (0.1M)

0.075 µl SUPERase•In (Ambion)

0.675 µl DEPC vann

0.75 µl SuperScript III Reverse Transcriptase

Reaksjonsvolum 5,3 µl.

RT– (negativ kontroll)

3 µl 5×First–Strand Buffer

0.75 µl DTT (0.1M)

0.075 µl SUPERase•In (Ambion)

1.425 µl DEPC vann

Reaksjonsvolum 5,3 µl.

Blandingen ble inkubert i PCR maskin med følgende program:

Total reaksjonsvolum 15,1 µl.

1) 25°C i 5 minutter

2) 50°C i 60 minutter

3) 70°C i 15 minutter, deretter 4°C

cDNA benyttes videre som templat i polymerase kjedereaksjon (PCR).

3.8 Amplifisering av DNA ved hjelp av polymerase kjede reaksjon (PCR)

Teknikken er basert på syklisk amplifisering *in vitro* av spesifikke DNA sekvenser og består av disse trinnene:

- Denaturering. DNA trådene dissosierer fra hverandre. Dobbel-tråd templat denaturer ved en temperatur som delvis er bestemt av deres Guanin+Cytosin innhold. Jo høyere innhold av G+C, jo høyere temperatur kreves for å separere de to trådene av DNA templat. Temperatur for rutine-amplifikasjon av linear DNA templat er 94–95°C [107].
- Annealing, (hybridisering), av primere til templat. Primere er syntetiske oligonukleotider som kjenner igjen target sekvens. Annealing foregår ved en temperatur på ca. 50°C, (40–70°C). Primerne, (forward og revers), hybridiseres til motsatt DNA tråd i sekvenser som de kjenner igjen, de hybridiserer til hver sin tråd, slik at deres 3'– ender peker mot mål-DNA. Primere må være komplementære til disse områdene. Temperaturen må være godt under smeltepunktet t_m for at primeren skal feste seg til templat.
- Ekstensjon, (polymerisering). Optimal temperatur er 72–78°C. I dette trinnet foregår selve DNA syntesen som er katalysert av termotabil Taq DNA polymerase. DNA syntesen foregår fra den fri 3'– OH– enden på begge primere med dNTP som byggesteiner [105].
- Antall av sykluser påkrevd for amplifikasjon avhenger av antall kopier av DNA templat som er til stede i begynnelsen av reaksjonen og effektiviteten til primer ekstensjon og amplifikasjon [107].

3.8.1 Ikke kvantitativ PCR

Metoden ble benyttet for å amplifisere to kjente DNA fragmenter som koder for hypotetiske adhesjonsdomener. Det ble brukt to par primer sett: CnaBc_RBS_F + CnaBc_N1–N2_His_R1 og CnaBc_RBS_F + CnaBc_N1–N3_His_R2.

Det ble laget en 100 µM løsning av hver primer fra original primer stock rør og i reaksjon videre ble det brukt en arbeidsløsning på 20 µM. Det ble satt en negativ kontroll for hvert primer-sett hvor genomisk DNA var erstattet med DEPC vann.

Prosedyre:

PCR reaksjon i hvert rør

40 µl DEPC vann

1 µl dNTP

1 µl forward primer (20 µM)

1 µl revers primer (20 µM)

1 µl genomisk DNA (*B. thuringiensis* 407 wt, kons. 500 ng/µl, fortynning 1:10)

PCR- reaksjonstrinn:

1) 94°C i 6 minutter. Etter 1 min. ble det tilsatt master mix 6 µl

2) Gjentatt 30 ganger:

94°C i 1 minutt, 58°C i 1 minutt, 72°C i 2 minutter

3) 72°C i 7 minutter, deretter 4°C

Master mix:

1 µl Pfu Ultra II Fusion HotStart DNA polymerase

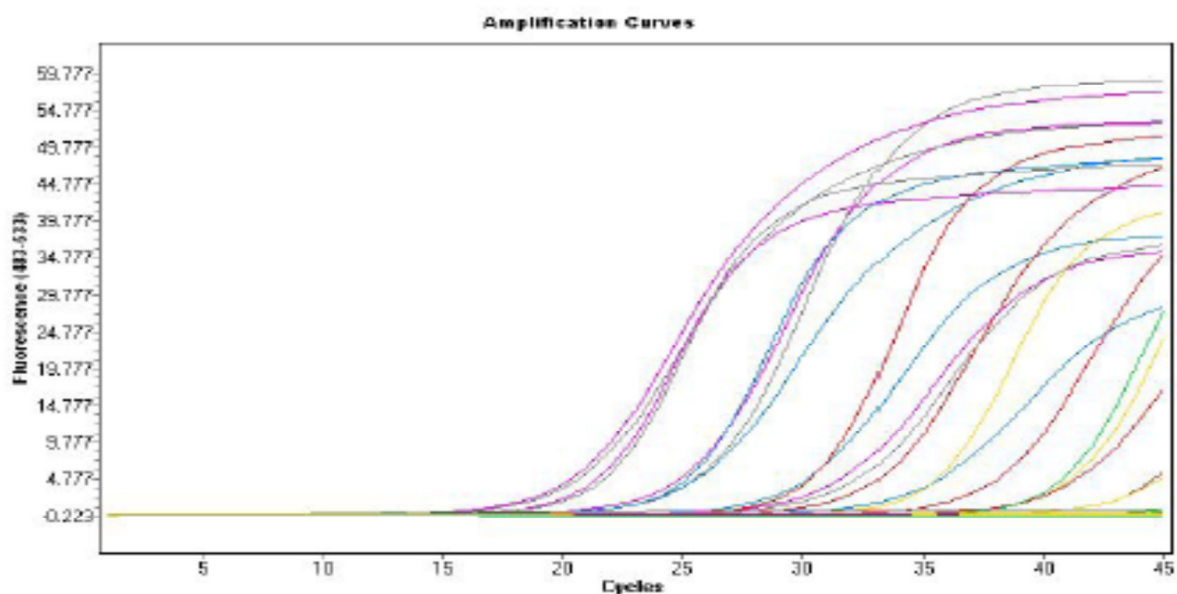
5 µl 10xPfu Ultra II buffer

Prøvene ble analysert ved 1 % gel elektroforese (punkt 3.6.1)

3.8.2 Kvantitativ real-time RT PCR

Metoden gir mulighet for å måle gentranskripsjon, og i vårt tilfelle kvantifisere og sammenlikne genuttrykt protein BC1060 for Bt 407 Δ cdg 135 stamme og Bt 407wt. Desto mer templat som var opprinnelig til stede i prøven, jo mer mRNA var til stede i cellen og desto større er dermed genuttrykket.

Ved real time PCR utføres kvantifisering når amplifiseringen er eksponentiell. Man måler syklus nummer hvor fluorescensen (det betyr cDNA) økes eksponentielt. SYBR Green I er et fargestoff som bindes til dobbel-tråd DNA. Dette resulterer i at DNA farget kompleks absorberer blått lys ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) og emitterer grønt lys ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Produktkvantifisering gjøres i hver syklus av PCR og kvantifiseringen baseres på å bestemme den syklus hvor fluorescensen og altså også produktmengden overskrider en detektbar grenseverdi.



Figur 9. Amplifiseringskurver. Bildet er hentet fra eget eksperiment 27.04.2012. Report LightCycler® 480 Software, fil: 27042012.pdf

Detektbar grenseverdi vises med horisontal oransje linje (figur 9) benevnt «threshold». Punktet hvor fluorescense overskrider denne grenseverdi heter Ct. Desto raskere «threshold» er nådd, jo mer cDNA var det i starten [108].

Prosedyre:

Real-time PCR reaksjon i hver brønn

5 µl Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)

3 µl primer mix (forward + revers)

2 µl cDNA (fortynning 1:10)

LightCycler® 480 SYBR Green I Master er reaksjonsmix for PCR, og inneholder FastStart Taq DNA Polymerase og DNA double-strand-specific SYBR Green I for produkt detektering og karakterisering [109].

Det ble brukt følgende primere for referanse gener: *gatB*, *rpsU* og *udp* og primer for target gen BC1060. Referanse gener brukes som intern standard for å korrigere mRNA nivå mellom forskjellige prøver og for nøyaktig sammenlikning av mRNAs transkripsjonsnivå. Valg av høykvalitets referanse gener er veldig viktig for tolkning av data generert av real-time qPCR.

Det er viktig å få stabilt uttrykte referanse gener. For å identifisere og evaluere referanse gener som er egnet for normalisering av genuttrykt data i *Bacillus cereus* gruppe stammer, ble mRNA nivået til elleve kandidater i referanse gener (inkl *udp*, *gatB*, *rpsU*) kvantifisert ved RT-qPCR. Programmene geNorm og Normfinder ble brukt for å estimere uttrykt stabilitet og indentifiserte genene *gatB*, *rpsU* og *udp* som de mest stabilt uttrykte referanse genene [110]. En kombinasjon av stabilt uttrykte referansegener er anbefalt.

For hver primer master mix i hvert biologiske replikat ble det satt følgende reaksjoner: to tekniske replikater for hver stamme med revers transkriptase, (cRT+ og wRT+), og en negativ kontroll for hver stamme uten revers transkriptase, (cRT- og wRT-). Negativ kontroll brukes for å kontrollere mulig gDNA kontaminasjon i prøven. Det ble også satt en reaksjon uten templat og en reaksjon med genomisk DNA for å sjekke at primerne virker som de skal. 96x0,2 ml plate Semi-skrited Thinwall, BIO plastics BV ble benyttet for å sette reaksjoner. Platen ble forseglet med Opti-Seal Optical Disposable Adhesive film. Under arbeidet ble platen holdt på is. Ved transportering av platen til PCR maskin var den dekket med aluminiumsfolie.

Tabell 3. Reksjonsrekkefølge for real time PCR.

		1	2	3	4	5	6	7	8
gatB	A	cRT+	cRT+	cRT-	wRT+	wRT+	wRT-	temp.neg	gen. DNA
rpsU	B	cRT+	cRT+	cRT-	wRT+	wRT+	wRT-	temp.neg	gen. DNA
Udp	C	cRT+	cRT+	cRT-	wRT+	wRT+	wRT-	temp.neg	gen. DNA
BC1060	D	cRT+	cRT+	cRT-	wRT+	wRT+	wRT-	temp.neg	gen. DNA

Rett før man setter platen inn i maskinen, spennes den ned i 1 minutt ved 2000 rpm, (Rotina 420R, Hettich Zentrifugen). Deretter ble det kjørt følgende PCR program:

PCR- reaksjonstrinn:

1) Preinkubering:

95°C i 5 minutter deretter

2) amplifisering, 45 sykluser:

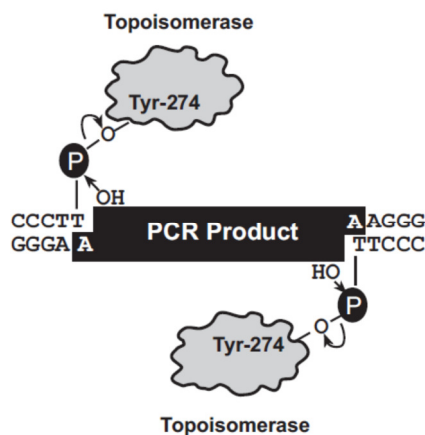
95°C i 10 sek., 58°C i 10 sek., 72°C i 8 sek, deretter

3) melting kurver analyse med kjøling til 40°C

Light Cycler® 480 Software release 1.5.0 SP4 ble brukt, og amplifiseringskurver ble analysert ved hjelp av 2nd Derivative Max algorithm.

3.9 Kloning av PCR produkter i pCR®II–TOPO®

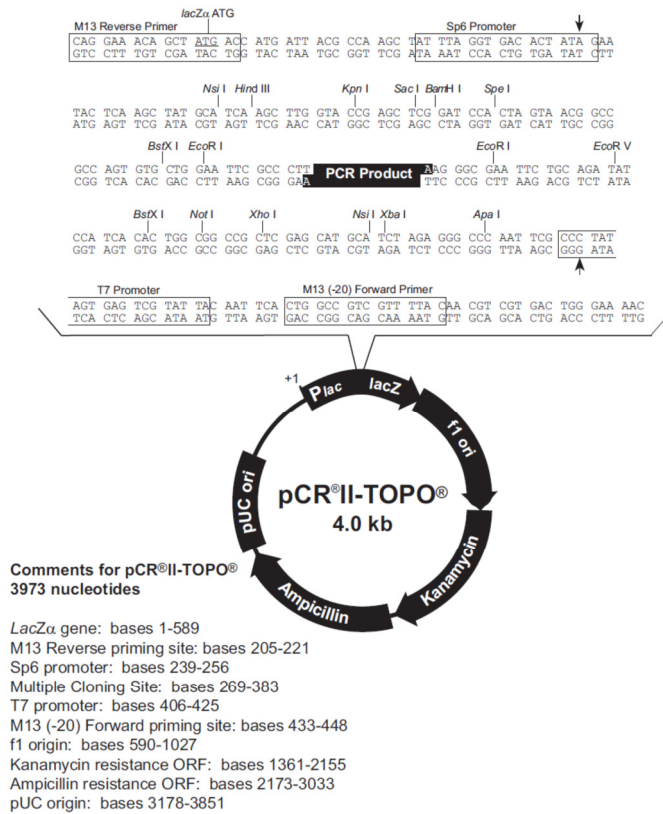
Metoden ble brukt for å ligere PCR fragmenter rCna_{Bc}_N1–2 og rCna_{Bc}_N1–3 i plasmid kloningsvektor pCR®II–TOPO®. Topoisomeraser er enzymer som både kan kutte en DNA tråd og ligere to DNA tråder. Enzymet topoisomerase I fra Vaccinavirus gjenkjenner sekvensen CCCTT. Det vil binde seg der og kutte DNA-tråden. Enzymet vil videre medvirke til at denne DNA enden blir ligert til en annen DNA-ende. Dette utnyttes i «TOPO»-kloning (Invitrogen) [111].



Figur 10. TOPO TA Cloning®, figuren er hentet fra [112].

TOPO vektor inneholder sekvensen CCCTT med enzymet topoisomerase I ferdig bundet til seg i tillegg til et vanlig MCS (et polykloningssete eller multiple cloning site) og *lacZα* genet. Vertsceller som vi bruker for kloning har en deleksjon i sitt *lacZ*-gen. De lager β -galaktosidase uten den N-terminale delen. Denne C-terminale delen kalles ω fragment og har ingen aktivitet, cellene er Lac⁻. Hvis cellene har mottatt vektor, vil de også kunne lage den N-terminale delen (α fragment), som kodes av *lacZ*. Disse to delene av enzymet slår seg sammen og gir et aktivt β -galaktosidase, de komplementerer hverandre. Cellen er blitt Lac⁺. Hvis vektor inneholder et DNA innskudd vil *lacZ'*-proteinet (α) havne som en hale til innskuddsproteinene. Dette vil ikke komplementere vertscellens enzym. Celler som mottar vektor med innskudd vil derfor fremdeles være Lac⁻. For å skille Lac⁺ celler (vektor) og Lac⁻ celler (vektor + innskudd), kan man dyrke på skåler som inneholder ampicillin og X-gal. X-gal ble spaltet av β -galaktosidase og det blir da blått. Celler som ikke har mottatt vektor vil ikke vokse i det hele tatt på grunn av ampicillin. Celler som har mottatt vektor med innskudd

vil vokse og gi hvite kolonier (Lac⁻) [113]. Slik hvit/blå screening tillater rask identifisering av transformanter.



Figur 11. Map of pCR®II-TOPO®, pCR®II-TOPO® ble benyttet som plasmid kloningsvektor til transformering av PCR fragment i kjemiske kompetente celler *E.coli*. PCR fragment ble satt inn i MCS (Multiple cloning site) mellom resriksjonssetene. Figuren er hentet fra [112].

Prosedyre:

TOPO kloning reaksjon

PCR produkt 4 μ l

Salt løsnning 1 μ l (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)

TOPO vektor 1 μ l

Inkuberes 10 min i rom temperatur, kan lagres over natt ved -20°C .

3.10 Transformasjon av rekombinant vektor i kjemisk kompetente *E.coli* celler

En celle som kan ta opp DNA kalles kompetent. Transformasjon – innføring av plasmid DNA inn i kompetente celler [114]. pCR®II –TOPO® ble benyttet som plasmid kloningsvektor for transformering av PCR fragmenter rCna_{Bc}_N1–2 og rCna_{Bc}_N1–3 i One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli*.

For at en bakterie skal kunne ta opp DNA, må den gjennomgå fysisk og/eller kjemisk behandling. Cellene som gjennomgikk slik behandling kalles kompetente. Tidlig på 1970-tallet ble det observert at *E. coli* cellene som ble behandlet med iskald saltløsning var mer effektive til å ta opp DNA enn ubehandlede celler. Løsning av kalsium klorid brukes tradisjonelt selv om andre salter, særlig rubidium klorid, også er effektive. Hvorfor slik behandling virker, er ikke helt oppklart. Det er mulig at CaCl₂ fører til at DNA bunnfeller på cellens utside, eller at saltet er ansvarlig for en eller annen slags forandring i celleveggen som forbedrer DNA bindingen. CaCl₂ påvirker bare DNA binding og tas ikke opp i celle. Når DNA er tilsatt til behandlet celle fortsetter den å være festet til celle utvendig og transporteres ikke inn i cytoplasma i dette stadium. Tidspunktet når DNA transporteres inn i kompetent celle er stimulert av en kort økning av temperatur til 42°C . Men hvorfor varmesjokk er effektivt er heller ikke helt oppklart [115].

3.10.1 Transformasjon av rekombinant vektor i One Shot ®TOP 10 kjemisk kompetente *E. coli* celler

Transformasjon prosedyre

- 1) Før transformasjon prosedyre ble startet var X-gal (40 mg/ml) spredd på plater LB agar med ampicillin (100 µg/ml). Ampicillin er selekterende agens, dvs kun vertsceller som har mottatt rekombinant vektor vil da vokse opp fordi vektor har seleksjons markører – ampicillin og kanamycin resistens gener. Plater ble varmet opp i inkubator ved 37°C i 30 minutter.
- 2) One Shot Top 10 kjemisk kompetente celler tynnes på is og 5 µl DNA tilsettes.
- 3) Blandingen inkuberes på is i 30 minutter, deretter 30 sekunder i vannbad 42°C og inkuberes på is igjen i 2 minutter.
- 4) Deretter tilsettes aseptisk 250 µl for-varmet S.O.C. medium. Blandingen inkuberes ved 37°C med risting 225 rpm i 1 time (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific).
- 5) 100 µl av transformasjonsblandingen ble spredd på forvarmet LB-agar plater med ampicillin og X-gal og inkubert over natt ved 37°C.
- 6) Enkelte hvite kolonier ble inokulert videre i 5 ml LB flytende med ampicillin (100 µg/µl) i 16 timer ved 37°C på risting 225 rpm. For å sjekke transformasjonseffektiviteten ble det benyttet pUC19 kontroll reaksjon.

3.10.2 Preparasjon av kompetente celler AH 1498 *E. coli* BL21 DE3, AH 802 *E. coli* BL21 DE3 og transformasjon av rekombinant vektor

Brukt stamme: AH 1498 *E. coli* BL21 DE3, AH 802 *E. coli* BL21 DE3. Antibiotiker ble tilsatt i alle trinn til ønskelig konsentrasjon. Kloramfenikol til konsentrasjon 25 µg/ml. Stock konsentrasjon 25 mg/ml. Ampicillin ble tilsatt til konsentrasjon 100 µg/ml. Stock konsentrasjon 50 mg/ml. Kloramfenikol ble tilsatt i AH 802 *E. coli* BL21 DE3 fordi denne stammen inneholder plasmid pLysS som er ikke kloningsvektor; den brukes i vert for å

undertrykke basal ekspresjon fra T7 promoter ved å produsere T7 lysozyme som er naturlig inhibitor av T7 RNA polymerase [116].

Prosedyre:

- 1) Cellene ble platet ut fra fryseren -80°C på LB skål og satt i inkubatoren 37°C over natt. Kloramfenikol ble spredt på skål med LB medium for AH 802. Ampicillin ble spredt på skåler for begge stammer.
- 2) En enkelt koloni ble inokulert over natt i 5 ml LB flytende med antibiotiker ved 37°C og risting 220 rpm.
- 3) 100 μl fra over natt kultur av hver stamme var reinokulert videre i 10 ml LB flytende med antibiotiker i inkubator ved 37°C og risting 220 rpm (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Cellene ble dyrket opp til $\text{OD}_{600} = 0,4$
- 4) Cellekulturen ble sentrifugert ved 5000 rpm og 4°C i 5 minutter (Beckman Centrifuge, Avanti TM J-25).
- 5) Pellet var resuspendert i 1 ml kald TSS. Cellene ble fordelt i 100 μl alikvoter i ependorfrør og frosset på tørris/etanol bad. Cellene ble lagret ved -80°C .
- 6) Neste dag ble cellene tynnet på is i 10–15 minutter. 1 μl plasmid miniprepp ble tilsatt til 100 μl alikvot og inkubert på is i 30 minutter.
- 7) Cellene ble behandlet i vannbad 42°C i 1 minutt og satt på is i 2 minutter.
- 8) Forvarmet 0,9 ml SOC medium ble tilsatt og prøvene inkubert ved 37°C og risting 225 rpm i 1 time.
- 9) Cellene ble platet på de selektive mediumene. For AH1498 ble det brukt LB med ampicillin og for AH802 ble det brukt LB med ampicillin og kloramfenikol. Skålene ble inkubert over natt ved 37°C . Agarskålene ble pakket inn i plast slik at agaren ikke

skulle tørke ut. Neste dag ble skålene undersøkt og flyttet til kjøleskap ved +4°C. For å sjekke transformasjonseffektiviteten ble det benyttet pUC19 kontroll reaksjoner.

3.10.2.1 Frysekultur av transformanter

Prosedyre:

En enkelt koloni fra hver transformasjon av *E. coli* BL21 ble inokulert over natt i 6 ml LB flytende med tilsvarende antibiotiker ved 37°C og risting på 225 rpm. Neste dag ble 100 µl over natt kultur reinokulert i 10 ml LB flytende med tilsvarende antibiotiker og dyrket i inkubatoren i 3 timer ved 37°C og risting på 225 rpm. 20 % glycerol ble tilsatt og kultur ble lagret ved –80°C.

3.10.2.2 Sekvensering av rekombinant plasmid

Sekvensering ble utført ved Biologisk Institutt, UIO, på ABI laben. 8–strips PCR rørene ble benyttet. Hensikten av sekvensering var å sjekke at riktig sekvens var amplifisert under PCR. Det ble satt separate reaksjoner med forward og revers primer. Hvert PCR rør inneholder:

1 µl plasmid miniprep

7 µl MQ vann

2 µl primer M13 (5 µM)

3.11 Isolering av plasmid DNA

E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I Spin Protocol ble fulgt. Metoden er basert på kombinasjon av alkalisk–SDS lysis og HiBind teknologi. Eksponering av bakteriell suspensjon med sterk anionisk detergent og høy pH åpner celleveggen, denaturerer kromosomal DNA og proteiner, og det frigjøres plasmid DNA til supernatant. Selv om alkaline oppløsning forstyrrer base-sammenkoblingen, kan trådene av sirkulær plasmid DNA ikke separere seg fordi de er topologisk flettet. Når pH returneres til nøytral faller de på plass. I løpet av lysis, blir proteiner, ødelagt cellevegg og denaturert kromosomal DNA viklet inn i store komplekser som er dekket med dodecyl sulfat. Disse kompleksene blir utfelt fra

løsningsen og fjernet ved sentrifugering. Plasmid DNA kan bli gjenvunnet fra supernatant [117].

Enkeltkolonien ble inokulert over natt (i 15 timer) i 5 ml LB flytende med de selektive antibiotiker ved 37°C og risting på 225 rpm. Videre ble protokollen E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I Spin fulgt uten noen forandring. I siste trinn var volum av elueringsbuffer (10mMTris-HCl, pH 8,5) på 50 µl.

3.12 Kutting av DNA med restriksjonsenzym

Det ble isolert over 2500 restriksjon endonukleaser fra forskjellige bakterier og ca. 300 er tilgjengelige for laboratoriebruk. Ved hjelp av restriksjon beskytter bakteriene seg mot fremmed DNA, f eks DNA av fag. Mekanismen er veldig komplisert og restriksjon skjer ved at enzym degraderer fag DNA før det repliseres og nye fag partikler synteseres. Bakterielt DNA er beskyttet fra ødeleggelse ved at basene i restriksjonssete er metylert og virkning av enzym er blokkert [118].

Eco RI (forkortelse for *Escherihia coli*) hører til type II restriksjon endonukleaser. Restriksjon enzymer spalter DNA ved spesielle basesekvenser (restriksjonssete) som de kjenner igjen. Noen enzymer kutter DNA tråd i midt av sekvens som resulterer i «blunt end». *Eco* RI gjenkjenner restriksjonsetet GAATTC og kutter begge ryggradene fire baser til siden for hverandre. Vi får delt DNA-tråden, og endene får fire baser overheng (sticky end) [119].

Prosedyren ble utført for å bekrefte tilstedeværelse og riktig størrelse av innskudd.

Prosedyre:

Hvert rør inneholder:

24 µl MQ vann

2 µl miniprep

3 µl 10xEcoRI buffer

1 µl *EcoRI*

Prøvene inkuberes ved 37°C i 1–2 timer.

Kuttet plasmid ble visualisert på 1 % agarosegel (punkt 3.6.1).

3.13 Proteinekspresjon i *E. coli*

3.13.1 Induksjon av proteinekspresjon

Prosedyre:

- 1) Stammen *E. coli* BL21DE3 pLysS (intern stammekollksjons-nummer AH 802) ble brukt. Litt av bakteriekolonien ble inokulert i 10 ml LB medium med tilsatt ampicillin og kloramfenikol og dyrket over natt ved 37°C og risting 225 rpm (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Ampicillin ble tilsatt til 100 µg/ml og kloramfenikol til 25 µg/ml.
- 2) Neste dag ble rør med over natt kultur sentrifugert i 5 min ved 3000 rpm (Beckman Centrifuge, Avanti™ J-25) og supernatant ble fjernet. Pellet ble resuspendert i 10 ml ferskt LB medium med ampicillin (100 µg/ml) og kloramfenikol(25 µg/ml). LB mediet var oppvarmet til 37°C i varmeskap i forveien.
- 3) Over natt kultur ble så inokulert i LB medium i forholdet 1:50, dvs. 2 ml over natt kultur tilsatt 100 ml LB medium. Det ble satt inokulert separate kulturer i 3 kolber (Bellco Biotechnology, 500 ml): en kultur ble brukt for OD måling, en kontroll prøve

hvor IPTG ikke skulle bli tilsatt, og en kolbe-prøve med IPTG for induksjon av proteinekspresjon. Bakteriekulturene ble dyrket ved 37°C og 225 rpm til OD 0,6.

- 4) Etter at OD 0,6 var oppnådd ble 1 mM IPTG tilsatt. Bakteriekulturer ble så dyrket videre i en time ved 37°C og 225 rpm.
- 5) Etter en time ble rørene sentrifugert i 20 min. ved 4000 rpm og 4°C, supernatant ble fjernet og pellet vasket i 30 ml TEN buffer.
- 6) Bakterier i TEN buffer ble overført i tykke BIO-RAD rør og sentrifugert 10 min, ved 10 000rpm, 4°C (Beckman Centrifuge, Avanti TM J-25). Supernatant ble fjernet og rørene med pellet ble fryst ned ved -80°C til videre arbeid.

3.13.2 Proteinisolering

Metoden ble benyttet for å analysere proteininnhold i cellene ved polyakrylamid gel elektroforese.

Prosedyre:

- 1) Cellepellet ble tint på is bad i 15 minutter og resuspendert forsiktig ved pipettering i 4 ml lysisbuffer tilsatt PMSF til 1 mM konsentrasjon. Det var anbefalt å tilsette 4 ml lysisbuffer per 100 ml bakteriekultur. Lysisbufferen innholdt 10 mM Imidazol som minimerer binding til kolonne- av «untagged» kontaminasjonsproteiner og øker renhet i videre vasketrinn [120]. PMSF er en hemmer av proteaser som kan bryte ned proteiner.
- 2) Deretter ble 400 µl lysozymløsning (10 mg lysozym løst i 1 ml lysisbuffer) tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 1 mg/ml lysozym, for å bryte ned cellevegg; væsken ble etter hvert viskøs.
- 3) Rørene ble inkubert på is i 30 minutter og deretter sonikert (Vibra cell TM, Sonics & materials Inc.) seks ganger i 10 sekunder med 10 sekunders pause mellom hver gang. Rørene med prøver stod på is under sonikeringen. Sonikering er en prosedyre som bruker ultralyd for å åpne cellene og bryte ned DNA til tilfeldige fragmenter.

- 4) 4,4 µl Rnase (10 mg/ml) ble tilsatt til sluttkonsentrasjon 10 µg/ml og 2,2 µl Dnase I (10 mg/ml) til sluttkonsentrasjon 5 µg/ml.
- 5) Prøvene ble inkubert på is i 10 minutter og sentrifugert i 20 minutter ved 10 000 rpm og 4°C (Beckman Centrifuge, Avanti™ J-25). Supernatant ble overført til nye rør og filtrert gjennom 0,45 µm filter. Celledetritus ble lagret ved -20°C. Filtrert supernatant ble lagret ved -20°C og brukt videre i analyse av proteinekspressjon ved polyakrylamid gelelektroforese.

3.14 Analyse av proteinekspressjon ved polyakrylamid gelelektroforese

Elektroforese av proteiner kan utføres i polyakrylamid gel under vilkår som sørger for dissosiering av proteiner til individuelle sub-enheter og minimerer aggregering. En sterk anionisk detergent, SDS, brukes i kombinasjon med reduksjonsmiddel og varme for å dissosiere proteiner før de ble ladet i gel. Denaturerte polypeptider binder SDS og ble ladet dermed negativt. Fordi mengden av bundet SDS nesten alltid er proporsjonal til den molekylære vekten på polypeptider og uavhengig av deres sekvens, migrerer et SDS-polypeptid-kompleks gjennom en polyakrylamid gel i samsvar med størrelsen av polypeptid. Ved bruk av markører med kjent molekylær vekt, er det mulig å estimere massen av polypeptid-kjeden. SDS-polyakrylamid gel elektroforese utføres med et usammenhengende buffer system hvor bufferet i reservoaret har pH og ionisk styrke forskjellig fra buffer som brukes for å støpe gel. SDS-polypeptid-komplekset i prøven som er applisert i gelen, blir trukket med av en bevegelig grense, opprettet når elektrisk strøm passerer mellom elektrodene. Etter migrering gjennom «stacking gel» med høy porøsitet blir komplekset deponert i en veldig tynn sone på overflaten av «resolving gel» [121].

Det usammenhengende buffersystemet ble funnet opp av Ornstein og Davis (1964). Prøve og «stacking gel» inneholder Tris-Cl (pH 6,8), øverste og nederste buffer reservoar inneholder Tris-glycine (pH 8,3), og «resolving gel» inneholder Tris-Cl (pH 8,8). Alle komponenter inneholdt 0,1 % SDS. Klorid-ioner i prøve og «stacking gel» danner fremkanten av den bevegelige grensen og bakkanten er dannet av glycin molekyler. Mellom fremkanten og bakkanten av den bevegelige grenselinjen er en sone av lavere konduktivitet og brattere spenningsgradient som feier polypeptider fra prøven og deponerer dem på overflaten av «resolving gel». Der vil høyre pH i «resolving gel» støtte ionisering av glycine og resulterer i

at ioner av glycin migrerer gjennom polypeptidene og går gjennom «resolving gel» rett bak klorid ionene. Frigjort fra de bevegelige grenselinjene, flytter SDS–polypeptid–komplekset seg gjennom «resolving gel» inn i sonen med jevn spenning og pH, og separeres etter størrelse ved siling/sikting [121].

Polyakrylamid består av kjeder av polymerisert akrylamid som er krysskoblet med N,N–methylene–bis–akrylamid. Effektiviteten på separasjonen avhenger av konsentrasjonen av polyakrylamid som ble brukt for å støpe gel og mengden av kryss–bindinger. Sikte/sile–egenskapene til gelen er determinert av porenes størrelse, som er funksjon av absolutt konsentrasjon av akrylamid og bisakrylamid som ble brukt for å støpe gel [121].

Prosedyre:

Forventet protein størrelse som skulle separeres var 10–20 kDa, og derfor ble 15 % polyakrylamid gel benyttet. Utstyret ble vasket med vann og rensset med etanol i forveien. Glass platene ble montert i kassetter ifølge bruksanvisning (Mini–PROTEAN® Tetra Cell, instruction manual). En kam ble plassert i gekassett og glassplate ble markert 1 cm under kamtennene. «Resolving gel» ble fylt til dette nivået. Kammen ble så fjernet.

«Resolving gel» (5 ml) ble laget i en Erlenmeyer flaske. Komponenter ble mikset i følgende rekkefølge:

– MQ vann	1,1 ml
– 30 % akrylamid blanding	2,5 ml
– 1,5 MTris (pH 8,8)	1,3 ml
– 10 % SDS	50 µl
– 10 % ammonium persulfat	50 µl
– TEMED	2 µl

Polymerisering begynte så snart TEMED var tilsatt. Løsning ble forsiktig helt i gapet mellom de to glassene. Løsningen ble umiddelbart overdekket med MQ vann. Gel ble plassert ved romtemperatur i 30 min. i vertikal posisjon. Etter at polymerisering var fullført ble

overdekningen fjernet og toppen av gelen vasket med MQ vann for å fjerne upolymerisert akrylamid. Rester av vann ble fjernet med papir.

1 ml av «stacking gel» ble laget ved å blande komponenter i følgende rekkefølge:

– MQ vann	680 µl
– 30 % akrylamid blanding	170 µl
– 1,0 MTris (pH 6,8)	130 µl
– 10 % SDS	10 µl
– 10 % ammonium persulfat	10 µl
– TEMED	1 µl

Polymerisering begynte så snart TEMED er tilsatt. Løsningen ble helt ut på overflaten av polymerisert «resolving gel». Umiddelbart etter ble kam satt inn i «stacking gel» løsningen. Mer «stacking gel» tilsettes slik at kammen dekkes fullstendig med løsning. Gel plasseres i rom temperatur i 30 min. og mens gel polymeriseres, ble prøvene forberedt for applisering.

Hvert rør inneholdt:

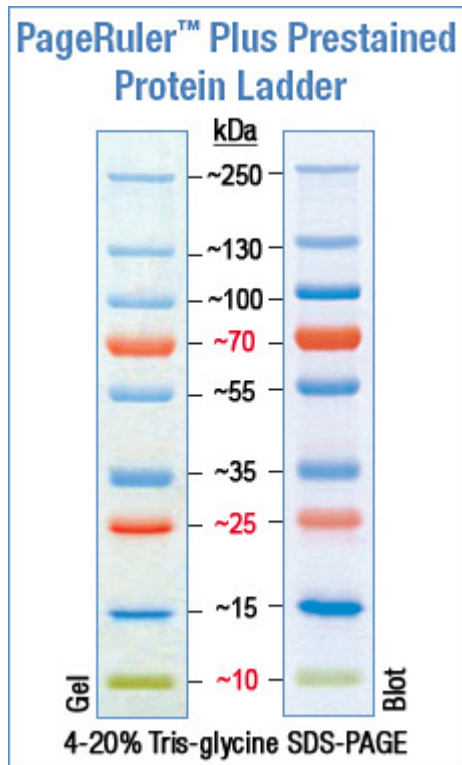
- 1) 10 µl prøve (IPTG+) + 10 µl 1x SDS loading buffer
- 2) 10 µl prøve(IPTG-) + 10 µl 1x SDS loading buffer
- 3) 15 µl prøve(IPTG+) + 15 µl 1x SDS loading buffer
- 4) 15 µl prøve(IPTG-) + 15 µl 1x SDS loading buffer

Prøvene ble inkubert i 95°C i 5 minutter for å denaturere proteiner.

Etter at polymerisering ble fullført, ble kammen fjernet, og toppen av gelen ble vasket med MQvann for å fjerne upolymerisert akrylamid. Rester av vann ble fjernet med papir.

Gelkassetter ble plassert i Mini-PROTEAN® Tetra Cell tank. Reservoaret ble fylt med Tris-

glycin elektroforese buffer. Varmebehandlede prøver ble applisert i brønner. To protein-markører med kjent molekylvekt ble benyttet. 5 µl Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus (figur 12) og 10 µl MultiMark™ Multi-Colored Standard ble applisert i brønner.



Figur 12. Markøren inneholder en blanding av ni fargede og rensede rekombinante proteiner med molekylvekt fra 10 til 250 kDa. Figuren er hentet fra [104].

Elektroforese ble kjørt ved 90 V i 15 minutter og videre ved 150 V i 60 minutter.

Etter elektroforese gjennom polyakrylamid gel ble Bio-Safe™ Coomassie G 250 Stain benyttet for å detektere proteiner. Kolloidal Bio-Safe™ Coomassie G 250 Stain er basert på modifisert Coomassie Brilliant Blue G 250 farge [122] som produserer lineær respons og tillater kvantitativ analyse. Opptak av fargestoff er ca. proporsjonalt med protein mengde. [122].

Prosedyre:

Gelen ble forsiktig tatt ut fra glass kassetter, lagt i container på en vippende plattform, og vasket 3 ganger i 5 minutter i 200 ml destillert vann per gang. Etter at alt vann ble fjernet fra

containeren, ble 50 ml Bio-Safe™ Coomassie G 250 Stain tilsatt og container ble ristet forsiktig på vippende plattform i en time. Protein-båndene ble synlige etter 20 minutter og maksimal intensitet oppnådd innen en time. Gelen ble vasket i 200 ml destillert vann i 30 minutter, pakket i plast og undersøkt i ChemiGenius² system (Syngene).

3.15 Bioinformatikk

For å undersøke og sammenlikne sekvenser mellom gener i ulike genomer, kan forskjellige databaser benyttes. De viktigste databasene er GenBank (National Center for Biotechnology Information), DDBJ (DNA Databank of Japan), og EMBL (European Molecular Biology Laboratory). BLAST (Basic Local Alignments Search Tool) er et viktig verktøy for å beregne nukleotidsekvenslikheter eller proteinsekvenslikheter [123] [124].

Ved hjelp av BLAST-søk ble det undersøkt hvor mange medlemmer av *B. cereus* har proteinsekvenser som viser likhet med proteinsekvensen til BC1060 i *B. cereus* ATCC 14579, ved bruk av BlastP ved NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), med standard («default») parametre. Proteiner ble ansett å ha signifikant sekvenslikhet dersom de viste mer enn 85 % identitet over mer enn 80 % av sekvenslengden.

4. Resultater

4.1 Valg av bakteriestammer

Stammene som det ble valgt å jobbe med er *B. thuringiensis* 407 villtype (AH1423) og *B. thuringiensis* 407 $\Delta cdg135$ (AH 1711). Villtypen ble valgt å bruke som modellstamme i *B. cereus*-gruppens studier av mikrobiell biofilm fordi den er en god biofilm-danner og er lett transformerbar. $\Delta cdg135$ ble benyttet for å studere hvordan ekspresjonsnivået av BC1060 i cellene ble påvirket av å fjerne et putativt c-di-GMP syntese-protein.

4.2 Vekstkurver og mikroskopi

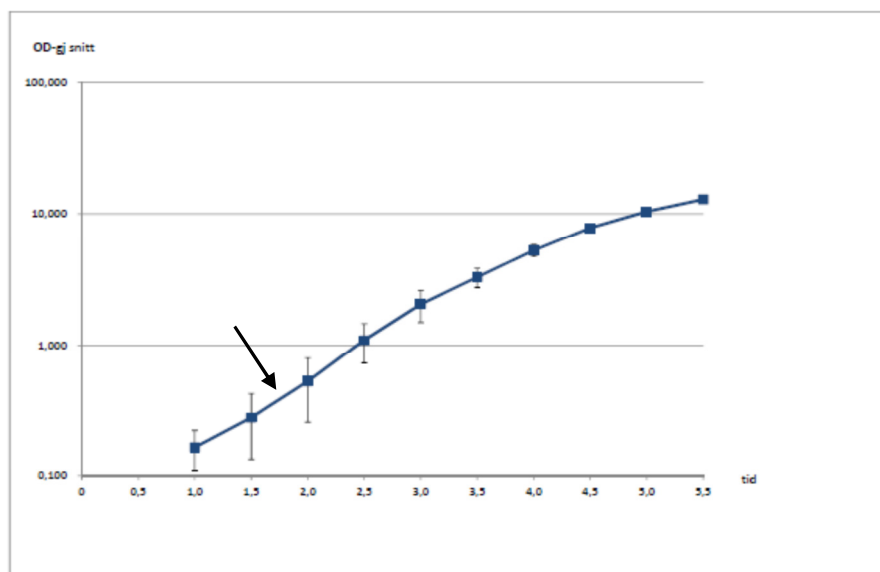
Vekstkurver for Bt407 og Bt407 Δ 135 ble gjennomført med 3 biologiske replikater for hver stamme som beskrevet i punkt 3.1.2 og kurvene var reproduserbare. Målet med det utførte eksperimentet var å finne det beste tidspunktet for RNA isolering, som er nødvendig for videre kvantitativ real time PCR-analyser. Baktopepton ble valgt som dyrkningsmedium, da dette mediet også var benyttet i tidligere biofilm screening-eksperimenter i gruppen, og kulturen ble inkubert ved 30°C og risting ved 220 rpm. OD₆₀₀ ble målt hver halve time. For å sammenlikne bevegelighet til Bt407 og Bt407 Δ 135, ble mikroskopi utført som beskrevet i punkt 3.3 ved hvert prøvetaknings punkt.

Det var kjent fra tidligere eksperimenter [93] at signifikant forskjell i motilitet ble observert i tidlig log-fase, etter 1,5 time dyrkning ved de samme betingelser. Dette kan indikere forskjellig genekspresjon av relevante gener relatert til c-di-GMP metabolisme på dette tidspunkt (Fagerlund *et al.*, ikke publisert). Derfor ble tidlig log-fase valgt som tidspunkt for høsting av kulturen for videre arbeid.

I mine eksperimenter ble tidlig eksponentiell fase oppnådd 1,5–2 timer etter oppstart av kulturen. Utført mikroskopi ved OD₆₀₀ 0,35–0,38 bekreftet at Bt407 Δ 135 var signifikant mer bevegelig enn Bt407 på dette tidspunktet. Tabell 4 og 5 viser OD₆₀₀ verdiene ved prøvetakningspunkt i 3 biologiske replikater for hver stamme, og OD-gjennomsnitt på basis av tre eksperimenter. Figur 13 og 14 viser vekstkurver basert på OD-gjennomsnitt. Standardavvik, som viser hvor mye hver enkelt måling varierer fra gjennomsnittet, var høyest i tidlig vekstfase.

Tabell 4. *B. thuringiensis* 407, OD målinger i 3 biologiske replikater, OD gjennomsnitt.

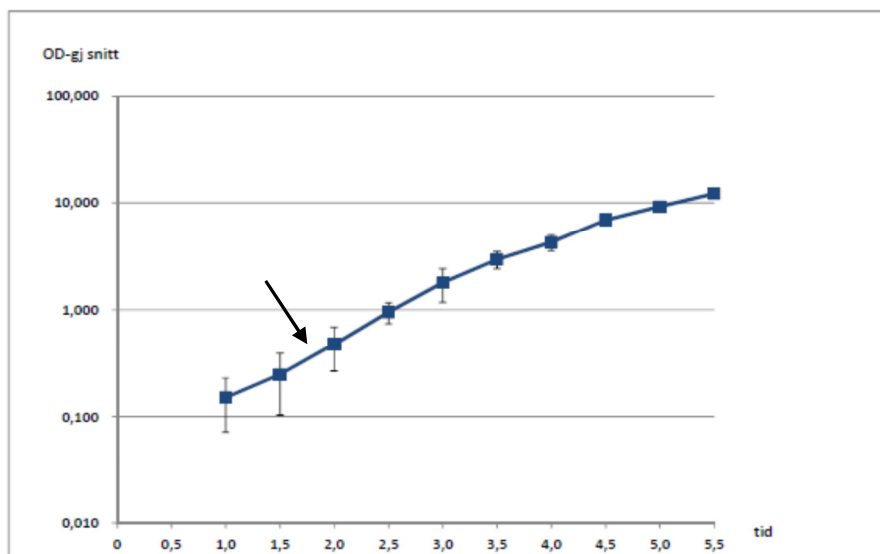
tid	OD1	OD2	OD3	OD gj-snitt	Std avvik
0					
0,5					
1,0	0,172	0,153	0,177	0,167	0,013
1,5	0,294	0,276	0,274	0,281	0,011
2,0	0,592	0,518	0,478	0,529	0,058
2,5	1,220	1,130	0,935	1,095	0,146
3,0	2,345	1,995	1,815	2,052	0,270
3,5	3,640	3,320	2,910	3,290	0,366
4,0	5,830	5,270	4,710	5,270	0,560
4,5	8,180	8,100	7,200	7,827	0,544
5,0	11,040	10,040	10,200	10,427	0,537
5,5	13,125	12,725	12,800	12,883	0,213



Figur 13. Vekstkurve for *B. thuringiensis* 407, basert på OD₆₀₀ målinger. Grafen viser gjennomsnitt av 3 biologiske replikater, og vertikale linjer angir standard avvik. Kulturene ble inkubert i baktipepton-medium ved 30°C og 220 rpm. Pilen i figuren indikerer tidspunktet når prøvene ble høstet (1,5–2 timer etter oppstart).

Tabell 5. *Bacillus thuringiensis* 407Acdg135, OD målinger i 3 biologiske replikater, OD gjennomsnitt.

tid	OD1	OD2	OD3	OD gj-snitt	Std avvik
0					
0,5					
1,0	0,169	0,133	0,148	0,150	0,018
1,5	0,292	0,228	0,220	0,247	0,039
2,0	0,564	0,454	0,412	0,477	0,078
2,5	1,085	0,970	0,800	0,952	0,143
3,0	2,000	1,770	1,580	1,783	0,210
3,5	3,160	2,770	2,830	2,920	0,210
4,0	4,930	3,920	3,810	4,220	0,617
4,5	7,340	6,980	6,300	6,873	0,528
5,0	9,980	8,700	8,840	9,173	0,702
5,5	12,400	11,980	12,000	12,127	0,237



Figur 14. Vekstkurve for *Bacillus thuringiensis* 407Acdg135, basert på OD₆₀₀ målinger. Grafen viser gjennomsnitt av 3 biologiske replikater, og vertikale linjer angir standard avvik. Kulturene ble inkubert i baktipepton-medium ved 30°C og 220 rpm. Pilen i figuren indikerer tidspunktet når prøvene ble høstet (1,5–2 timer etter oppstart).

4.3 Isolering av RNA og separasjon ved hjelp av agarose gel elektroforese

RNA-isolering fra stammene *B. thuringiensis* 407 villtype (AH1423) og *B. thuringiensis* 407 Δ cdg135 (AH 1711) ble utført ifølge protokoll beskrevet i punkt 3.1.2, og RNA konsentrasjon ble målt ved hjelp av UV spektrofotometri (punkt 3.3). Prøvene ble høstet ved $OD_{600}=0,35$ som var opnådd 1,5–2,0 timer etter inokulering av kulturene. RNA konsentrasjon ble målt før og etter DNase behandling, som ble utført for å sikre at prøvene ikke inneholdt genomisk DNA, og at det kun var cDNA som ble amplifisert videre i PCR. Ratioene for A_{260}/A_{280} viste at prøvene var rene, da ratioene var mellom 1,8 og 2,0 og (tabell 6). Noen av målingene ble utført på to maskiner: Eppendorf Biophotometer og Picodrop Microlitre Spectrophotometer. Tall gitt i parentes er målingene som ble utført med Picodrop. I tilfelle store forskjeller mellom målingene av samme prøve på forskjellige maskiner, ble det laveste tallet for konsentrasjonen benyttet i videre i beregninger.

Tabell 6. Måling av RNA konsentrasjon i fem biologiske replikater fra hver stamme etter DNase behandling.

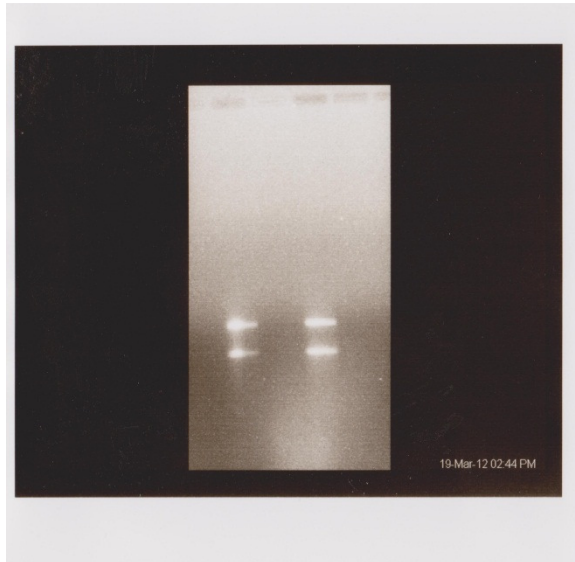
	RNA konsentrasjon Bt407 Δ 135 (μ g/ml)	A_{260}/A_{280} Bt407 Δ 135	A_{260} Bt407 Δ 135	RNA konsentrasjon Bt407 (μ g/ml)	A_{260}/A_{280} Bt407	A_{260} Bt407
1	0,2198	2,0	0,05	0,4664	1,93	0,106
2	0,2038	1,94	0,1	0,2561	1,92	0,117
3	0,4511	1,97	0,114	0,3331	1,96	0,087
4	0,5346	1,94	0,122	0,4030	1,94	0,097
5	0,8723 (0,5033)	1,99	0,2	1,1282 (0,6699)	1,85	0,28

RNA prøvene ble analysert videre ved hjelp av agarose gel elektroforese som beskrevet i punkt 3.6.2. Skarpe og veldefinerte bånd tyder på at man har høykvalitet RNA, i tillegg bør det øverste 23S rRNA-båndet være ca.1,5–2 ganger sterkere enn 16S rRNA-båndet.

Forskjellig intensitet på øverste og nederste bånd var ikke opplagt på bildene av RNA, men kan forklares av begrensninger i gjengivelser av lysintensitet på fotografiet. RNA var i alle

forsøkene tilsynelatende intakt (skarpe bånd) og kvaliteten ble ansett å være tilstrekkelig for bruk i videre arbeid.

1 2



Figur 15. Separasjon av RNA fra stammer *B. thuringiensis* 407 villtype (AH1423) og *B. thuringiensis* 407 *Acdg135* (AH 1711) ved 1 % agarose gel elektroforese, ved 80 V i 45 minutter. Spor 1: Biologisk replikat 1, teknisk replikat 1. Spor 2: Biologisk replikat 1, teknisk replikat 2.

4.4 Ekspresjonsanalyse av BC1060

Målet med dette eksperimentet var å undersøke om BC1060-ekspresjon påvirkes ved mutasjon i genet *cdg135*, som koder for et putativt c-di-GMP syntese protein.

4.4.1 cDNA syntese

Første trinn i ekspresjonsanalyse var å transkribere revers mRNA templat til enkelt-tråd cDNA (punkt 3.7). Maksimalt volum i reaksjonsblandingen av RNA og DEPC vann var 8,3 μ l. Når konsentrasjon av RNA i prøven var tilstrekkelig høyt, ble 2 μ g RNA benyttet i analysen. Laveste RNA konsentrasjon som ble brukt for cDNA syntese, grunnet at konsentrasjon av isolert RNA i noen tilfeller ikke var høy nok, var 1,03 μ g. Det ble satt totalt seks reaksjoner; To tekniske replikater for hver stamme (*B. thuringiensis* 407 villtype og *B.*

thuringiensis 407 Δ cdg135) med reverstranskriptase, og en negativ kontroll for hver stamme uten revers transkriptase. Syntetisert cDNA ble brukt videre som templat i real time PCR.

4.4.2 Negativ kontroll

Negativ kontroll er nødvendig for å kontrollere mulige kontaminasjoner med genomisk DNA. Genomisk DNA kan virke i real time PCR som potensiell templat og gi falske positive resultater. Forskjell i Ct verdiene mellom prøve og negativ kontroll kan gi en forståelse av hvor mye prøvene er kontaminert med genomisk DNA. For eksempel, i et av mine real time PCR forsøk, ble Ct for prøve Bt407+revers transkriptase 21,07 og Ct for negativ kontroll 40, en forskjell i Ct på 18,93. E-verdi for primer rpsU er 1,87 og det betyr at prøve Bt407+revers transkriptase inneholdt $1,87^{18,93} = 139\,946$ ganger mer DNA enn prøve med negativ kontroll. Dette indikerer lite genomisk DNA kontaminasjon. Alle mine prøver ble kontrollert med en negativ kontroll, og minste forskjell i Ct mellom negativ kontroll og prøve var 15. Dette indikerer at kontaminasjon av genomisk DNA var lav og at dette ikke påvirker resultater.

4.4.3 Valg av referanse gener

Kombinasjonen av stabilt uttrykte referansegener er viktig for ekspresjonanalyse. Kolstø og medarbeidere identifiserte og evaluerte referansegener som er egnet for normalisering av data i *Bacillus cereus* gruppe stammer [110]. mRNA nivå til elleve kandidatgener ble kvantifisert ved hjelp av RT-qPCR i forskjellige tidspunkter gjennom hele livssyklusen av *B. cereus* ATCC14579. Programmene geNorm og Normfinder ble brukt for å estimere stabilitet av ekspresjon og identifiserte *gatB*, *rpsU* og *udp* som de mest stabilt uttrykte referansegenene [110]. Sekvenser for forvard og revers primer til referanse-genene *gatB*, *rpsU* og *udp* og target gen BC1060, som ble benyttet i denne oppgaven er vist i tabell 20 i vedlegg 7.5.

4.4.4 Transkripsjons analyse av target gen BC1060

qPCR reaksjonene ble utført på LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche) som beskrevet i punkt 3.8.2, med tre biologiske replikater av hver prøve. Resultatene er vist i tabell 7.

Tabell 7. Ct verdiene i tre biologiske replikater fra qPCR (angitt med hhv. 1, 2, 3 i øverste rad). A1, A2; B1, B2; C1, C2; D1, D2–tekniske replikater fra *B. thuringiensis* 407 *Δcdg135* RNA. A4, A5; B4, B5; C4, C5; D4, D5–tekniske replikater fra *B. thuringiensis* 407wt RNA.

	1		2		3				
		Gj. Snitt		Gj. Snitt		Gj. Snitt			
gat B	A1	17,71	17,92	A1	15,42	15,51	A1	14,09	13,66
	A2	18,13		A2	15,59		A2	13,22	
	A4	16,03	16,00	A4	15,67	15,65	A4	13,21	13,02
	A5	15,97		A5	15,62		A5	12,82	
rpsU	B1	19,02	19,81	B1	17,72	17,80	B1	16,34	16,29
	B2	20,59		B2	17,88		B2	16,23	
	B4	18,53	18,50	B4	18,90	18,62	B4	16,05	15,84
	B5	18,46		B5	18,33		B5	15,63	
udp	C1	24,19	25,03	C1	23,02	23,27	C1	23,55	23,54
	C2	25,86		C2	23,51		C2	23,53	
	C4	24,33	24,56	C4	22,81	23,26	C4	23,76	23,52
	C5	24,78		C5	23,71		C5	23,28	
BC1060	D1	21,81	22,30	D1	21,21	21,43	D1	21,62	21,65
	D2	22,79		D2	21,65		D2	21,68	
	D4	20,67	20,48	D4	19,14	19,39	D4	19,96	19,76
	D5	20,29		D5	19,63		D5	19,55	

Ved transkripsjonsanalyse kan man bruke forskjellige kvantiteringsmetoder, hvor ulike varianter av metoden utviklet av Pfaffl er blant de vanligste [125]. En variant ($\Delta\Delta Ct$) er den enkleste, men er basert på at hver enkelt referanse gen benyttes separat for normalisering.

4.4.4.1 Analyse av relativ genekspressjon for BC1060 i *B. thuringiensis* 407 og *B. thuringiensis* 407 *Δcdg135* i tre biologiske replikater ved hjelp av $\Delta\Delta Ct$ metode

Genekspressjon for BC1060 ble analysert for hvert biologisk replikat og ved bruk av hvert referansegen separat, (tabell 8–10). Samlede resultater for alle tre biologiske replikater er vist i tabell 11. E-verdier er et mål på effektiviteten til primerparet. Hvis effektiviteten er 100 % og $E=2$, doubles antall DNA molekyler hver PCR runde. I realiteten er primere ofte mindre effektive. Dette ble det tatt hensyn til. E-verdiene som jeg brukte i beregninger i denne oppgaven ble tidligere beregnet av Fagerlund. A., og er vist i tabell 20 i vedlegg 7.5.

Tabell 8. Beregning av relativ ekspresjon av BC1060 i *B. thuringiensis* 407wt relativt til $\Delta cdg135$ mutant, basert på måleverdier fra første biologiske replikat:

	Stamme <i>B. thuringiensis</i> 407wt relativt til $\Delta cdg135$ mutant: $\Delta Ct = \Delta Ct_{BC1060} - \Delta Ct_{ref.gen}$		$\Delta \Delta Ct =$ $\Delta Ct_{kontroll} - \Delta Ct_{prøve}$ $\Delta \Delta Ct =$ $\Delta Ct(\Delta cdg135) - \Delta Ct(wt)$	Relativ ekspresjon av BC1060 i <i>B. thuringiensis</i> 407 wt relativt til $\Delta cdg135$ mutant:
Gen benyttet for normalisering	$\Delta cdg135$	wt		
gatB (E=1,93)	$\Delta Ct =$ 22,30–17,92=4,38	$\Delta Ct =$ 20,48–16,00=4,48	$\Delta \Delta Ct = 4,38 - 4,48 = -0,10$	$1,93^{-0,10} = 0,936$
rpsU (E=1,87)	$\Delta Ct =$ 22,30–19,81=2,49	$\Delta Ct =$ 20,48–18,50=1,98	$\Delta \Delta Ct = 2,49 - 1,98 = 0,51$	$1,87^{0,51} = 1,376$
udp (E=1,85)	$\Delta Ct =$ 22,30–25,03=-2,73	$\Delta Ct =$ 20,48–24,56=-4,08	$\Delta \Delta Ct =$ $-2,73 - (-4,08) = 1,35$	$1,85^{1,35} = 2,294$

Tabell 9. Beregning av relativ ekspresjon av BC1060 i *B. thuringiensis* 407wt relativt til $\Delta cdg135$ mutant, basert på måleverdier fra andre biologiske replikat:

	Stamme <i>B. thuringiensis</i> 407wt relativt til $\Delta cdg135$ mutant: $\Delta Ct = \Delta Ct_{BC1060} - \Delta Ct_{ref.gen}$		$\Delta \Delta Ct =$ $\Delta Ct_{kontroll} - \Delta Ct_{prøve}$ $\Delta \Delta Ct =$ $\Delta Ct(\Delta cdg135) - \Delta Ct(wt)$	Relativ ekspresjon av BC1060 i <i>B. thuringiensis</i> 407 wt relativt til $\Delta cdg135$ mutant:
Gen benyttet for normalisering	$\Delta cdg135$	wt		
gatB (E=1,93)	$\Delta Ct =$ 21,43–15,51=5,92	$\Delta Ct =$ 19,39–15,65=3,74	$\Delta \Delta Ct = 5,92 - 3,74 = 2,18$	$1,93^{2,18} = 4,192$
rpsU (E=1,87)	$\Delta Ct =$ 21,43–17,80=3,63	$\Delta Ct =$ 19,39–18,62=0,77	$\Delta \Delta Ct = 3,63 - 0,77 = 2,86$	$1,87^{2,86} = 5,990$
udp (E=1,85)	$\Delta Ct =$ 21,43–23,27=-1,84	$\Delta Ct =$ 19,39–23,26=-3,87	$\Delta \Delta Ct =$ $-1,84 - (-3,87) = 2,03$	$1,85^{2,03} = 3,486$

Tabell 10. Beregning av relativ ekspresjon av BC1060 i *B. thuringiensis* 407wt relativt til *Δcdg135* mutant, basert på måleverdier fra tredje biologiske replikat:

	Stamme <i>B. thuringiensis</i> 407wt relativt til <i>Δcdg135</i> mutant: $\Delta Ct = \Delta Ct_{BC1060} - \Delta Ct_{ref.gen}$		$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{kontroll} - \Delta Ct_{prøve}$ $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\Delta cdg135) - \Delta Ct(wt)$	Relativ ekspresjon av BC1060 i <i>B. thuringiensis</i> 407 wt relativt til <i>Δcdg135</i> mutant:
Gen benyttet for normalisering	<i>Δcdg135</i>	wt		
gatB (E=1,93)	$\Delta Ct = 21,65 - 13,66 = 7,99$	$\Delta Ct = 19,76 - 13,02 = 6,74$	$\Delta \Delta Ct = 7,99 - 6,74 = 1,25$	$1,93^{1,25} = 2,274$
rpsU (E=1,87)	$\Delta Ct = 21,65 - 16,29 = 5,36$	$\Delta Ct = 19,76 - 15,84 = 3,92$	$\Delta \Delta Ct = 5,36 - 3,92 = 1,44$	$1,87^{1,44} = 2,462$
udp (E=1,85)	$\Delta Ct = 21,65 - 23,54 = -1,89$	$\Delta Ct = 19,76 - 23,52 = -3,76$	$\Delta \Delta Ct = -1,89 - (-3,76) = 1,87$	$1,85^{1,87} = 3,159$

Tabell 11. Relativ ekspresjon av BC1060 i *B. thuringiensis* 407wt relativt til *Δcdg135* mutant Samlede resultater for alle tre biologiske replikater.

	Relativ ekspresjon av BC1060 i <i>B. thuringiensis</i> 407 wt relativt til <i>Δcdg135</i> mutant			
Gen benyttet for normalisering	1	2	3	gjennomsnitt
<i>gat B</i>	0,936	4,192	2,274	2,467
<i>rpsU</i>	1,376	5,990	2,462	3,276
<i>udp</i>	2,294	3,486	3,159	2,980

Resultater som ble fått ved bruk av den forenklete metoden viser at genekspresjonen av target gen BC1060 hos villtype ble funnet å være 2,5 ganger høyere enn hos mutant ved bruk av referanseggen *gatB*, 3,3 ganger høyere enn hos mutant ved bruk av referanseggen *rpsU*, og 2,9 ganger høyere ved bruk av referanse gen *udp*.

4.4.4.2 Analyse av relativ genekspresjon for BC1060 i *B. thuringiensis* 407 og *B. thuringiensis* 407 $\Delta cdg135$ i tre biologiske replikater ved hjelp av forbestemte E.verdier

Denne varianten av metoden gir en tallverdi basert på alle tre referansegener i tre biologiske replikater samtidig.

Analyse av data ble utført ved hjelp av en matematisk modell beskrevet av Pfaffl. Denne modellen brukes for å determinere relativ kvantifisering av target gen sammenlignet med referanse gen. Relativ ekspresjons ratio (R) av et target gen kalkuleres basert på E og Ct forskjell mellom ukjent prøve og kontrollprøve, og uttrykkes i sammenlinkning med referanse gen.

$$\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}} (\text{kontroll-prøve})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{t ref}} (\text{kontroll-prøve})}$$

Ligningen viser en matematisk modell av relativ ekspresjons ratio i real time PCR. Ratio av target gen er uttrykt i en prøve versus kontroll i sammenligning med referanse genet. E_{target} er real time PCR effektiviteten av target gen transkript; E_{ref} er real time PCR effektiviteten av referanse gen transkript. $\Delta C_{\text{t target}}$ er Ct avvik av kontroll-prøve av target gen transkript; $\Delta C_{\text{t ref}} = C_{\text{t}} \text{ avvik av kontroll-prøve av referanse gen transkript}$ [125].

E^{Ct} ble beregnet for de 3 referanse genene, og det geometriske gjennomsnitt (geometric mean) av disse verdiene ble beregnet innad i hvert biologisk replikat (tabell 12–14). E^{Ct} for target gen (BC1060) ble så beregnet for hver stamme og dividert med det geometriske gjennomsnittet av E^{Ct} for de tre referansegenene ($E^{\text{Ct, BC1060}} / \text{geometrisk gjennomsnitt av } E^{\text{Ct}}$ for referanse gener). Ekspresjonsratio mellom villtype og mutant kalkuleres. Resultatene fra beregningene, fra tre biologiske replikater, er vist i tabell 12–14.

Tabell 12. Analyse av BC1060 genekspressjon i første biologisk replikat.

	Eksperiment 1			Geometric mean	
		Gj. Snitt	E ^Δ Cq	ref genes cdg135	ref genes wt
gat B (E=1,93)	A1	17,71	17,92	130 974,57	535 789,46
	A2	18,13			
	A4	16,03	16,00	37 060,98	243 039,25
	A5	15,97			
rpsU (E=1,87)	B1	19,02	19,81	242 004,26	
	B2	20,59			
	B4	18,53	18,50	106 588,54	
	B5	18,46			
udp (E=1,85)	C1	24,19	25,03	4 852 577,76	
	C2	25,86			
	C4	24,33	24,56	3 634 141,15	
	C5	24,78			
BC1060 (E=1,95)	D1	21,81	22,30	2 936 106,70	
	D2	22,79			
	D4	20,67	20,48	870 780,79	
	D5	20,29			

$$E^{\Delta}Cq (BC1060\ cdg135) / \text{geom. mean ref. genes cdg 135} =$$

$$2\ 936\ 106,70 / 535\ 789,46 = 5,48$$

$$E^{\Delta}Cq (BC1060\ wt) / \text{geom. mean ref. genes wt} =$$

$$870\ 780,79 / 243\ 039,25 = 3,58$$

$$5,48 / 3,58 = 1,53$$

Genekspressjon av target gen (BC1060) hos villtype ble funnet å være 1,5 ganger høyere enn hos mutant.

Tabell 13. Analyse av BC1060 genekspressjon i andre biologisk replikat.

	Eksperiment 2			Geometric mean	
		Gj. Snitt	E ^Δ Cq	ref genes KO	ref genes wt
gat B (E=1,93)	A1	15,42	15,51	26 764,93	144 776,80
	A2	15,59			
	A4	15,67	15,65	29 345,67	176 778,73
	A5	15,62			
rpsU (E=1,87)	B1	17,72	17,80	68 989,12	
	B2	17,88			
	B4	18,90	18,62	114 903,04	
	B5	18,33			
udp (E=1,85)	C1	23,02	23,27	1 643 426,41	
	C2	23,51			
	C4	22,81	23,26	1 638 379,11	
	C5	23,71			
BC1060 (E=1,95)	D1	21,21	21,43	1 642 259,27	
	D2	21,65			
	D4	19,14	19,39	419 103,17	
	D5	19,63			

$$E^{\Delta}Cq (BC1060\ cdg135) / \text{geom. mean ref. genes cdg 135} =$$

$$1\ 642\ 259,27 / 144\ 776,80 = 11,34$$

$$E^{\Delta}Cq (BC1060\ wt) / \text{geom. mean ref. genes wt} =$$

$$419\ 103,17 / 176\ 778,73 = 2,37$$

$$11,34 / 2,37 = 4,78$$

Genekspressjon av target gen (BC1060) hos villtype ble funnet å være 4,78 ganger høyere enn hos mutant.

Tabell 14. Analyse av BC1060 genekspressjon i tredje biologisk replikat.

	Eksperiment 3		Geometric mean		Geometric mean
		Gj. Snitt	E ^Δ Cq	ref genes KO	ref genes wt
gat B (E=1,93)	A1	14,09	7 930,22	74 441,66	
	A2	13,22			
	A4	13,21	5 206,29		58 720,92
	A5	12,82			
rpsU (E=1,87)	B1	16,34	26 726,41		
	B2	16,23			
	B4	16,05	20 228,84		
	B5	15,63			
udp (E=1,85)	C1	23,55	1 946 356,93		
	C2	23,53			
	C4	23,76	1 922 556,24		
	C5	23,28			
BC1060 (E=1,95)	D1	21,62	1 902 170,04		
	D2	21,68			
	D4	19,96	536 579,09		
	D5	19,55			

$$E^{\Delta}Cq (BC1060 \text{ cdg}135) / \text{geom. mean ref. genes cdg 135} =$$

$$1\,902\,170,04 / 74\,441,66 = 25,55$$

$$E^{\Delta}Cq (BC1060 \text{ wt}) / \text{geom. mean ref. genes wt} =$$

$$536\,579,09 / 58\,720,92 = 9,14$$

$$25,55 / 9,14 = 2,80$$

Genekspressjon av target gen (BC1060) hos villtype ble funnet å være 2,8 ganger høyere enn hos mutant.

Utregning av gjennomsnittet av forskjell i ekspresjonsratio for BC1060 mellom wt og *cdg135*-delesjonsmutant, basert på alle tre biologiske replikater, er vist i tabell 15.

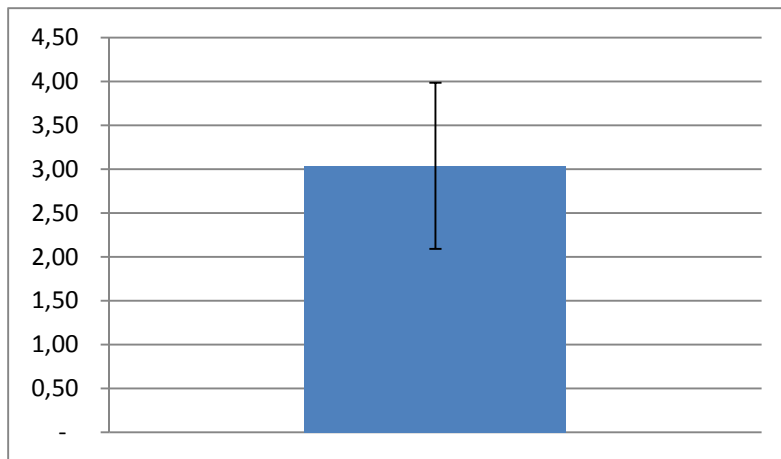
Standardavvik er et uttrykk for hvor stort avvik hver enkelt måling har fra gjennomsnittet.

Standard feil er et mål på graden av feil i målingene.

Tabell 15. Ekspresjonsratio for BC1060 mellom villtype og mutant i 3 biologiske replikater, gjennomsnitt fra 3 replikater. Standard avvik og standard feil er angitt.

Ekspresjonsratio mellom villtype og mutant					
1	2	3	gjennomsnitt	Standard avvik	Standard feil
1,53	4,78	2,80	3,04	1,64	0,95

Resultatet viser at genekspressjonen av BC1060 target gen er estimert til å være 3,04 ganger høyere i villtype enn hos *cdg135* delesjonsmutant, som vist i figur 16.



Figur 16. Genekspressjon av BC1060 er i gjennomsnitt 3,04 ganger høyere i villtype sammenliknet med *cdg135* delesjonsmutant. Standardfeil var 0,95.

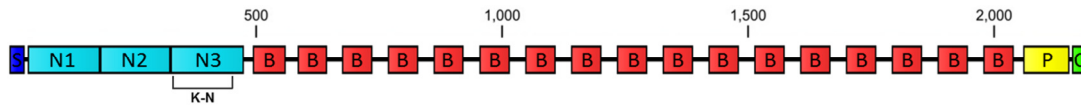
Utførte eksperimenter viste derfor at genet BC1060 var uttrykt i gjennomsnitt 3 ganger høyere i *B. thuringiensis* 407 enn i *B. thuringiensis* 407 Δ *cdg135*. qPCR forsøk bekreftet derfor tidligere data fra eksperimenter utført ved hjelp av microarray [93] og viste at ortolog til gen med locus tag BC1060 i *B. cereus* ATCC14579 er nedregulert i *cdg135* delesjonsmutant.

4.5 Kloning av BC1060 adhesjonsdomener

4.5.1 PCR–amplifisering av BC1060 adhesjonsdomener

Målet av denne delen av arbeidet var å amplifisere adhesjonsdomenet av BC1060 med C-terminal His-tag, kloner amplifisert fragment i en TOPO-plasmid-vektor, og videre å uttrykke proteinet i en egnet *E.coli* stamme, samt rense peptidet på Ni-NTA kolonne. Et eventuelt rensset peptid kunne benyttes til å undersøke hva slags matriks proteiner BC1060 binder seg til.

PCR ble benyttet for å amplifisere to DNA fragmenter tilsvarende ulike deler av det hypotetiske adhesjonsdomenet i BC1060 fra *B.thuringiensis* 407: rCnaBc_N1–2 (tilsvarende aminosyrer 32–339 i BC1060) og rCnaBc_N1–3 (tilsvarende aminosyrer 32–481 i BC1060). Adhesjonsdomener ble definert tidligere ved sammenlikning av BC1060 med CNA_{Bc} sekvens i *S.aureus* hvor krystall struktur har blitt bestemt (Fagerlund *et al.*, ikke publisert).



Figur 17. Domene struktur av BC1060, viser signal peptid sekvens(S), antatte subdomener av A-region (N1, N2, N3), som utgjør det putative adhesjonsdomenet, repeterende B-region og region inneholdende LPXTG motiv. Figuren er hentet fra (Fagerlund *et al.*, ikke publisert).

Det ble brukt 2 primer sett: CnaBc_RBS_F + CnaBc_N1–N2_His_R1 og CnaBc_RBS_F + CnaBc_N1–N3_His_R2. En av primerne til hvert sett kodet for 6 terminale Histidin-aminosyrer som skulle benyttes ved senere rensing av proteinet etter ekspresjon.

Primerne hadde følgende sekvenser:

CnaBc_RBS_F: tgaggaggttccagttatgcaagctgctgtga

CnaBc_N1–N2_His_R1: ttattagtgatggtgatggtgatgtgcaccgctgccattctcatcaactatatttttcaat

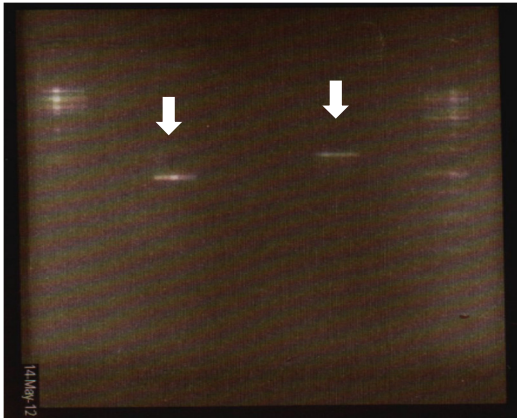
CnaBc_N1–N3_His_R2: ttattagtgatggtgatggtgatgcgatcctgcaccatcttttgagcttcagg

Det ble satt opp fire PCR reaksjoner. To reaksjoner med primersett (F + R1) for domene N1–N2, hvor en reaksjon var negativ kontroll. To reaksjoner med primer sett for domene N1–N3 (F+R2) hvor en reaksjon var negativ kontroll. I negativ kontroll ble genomisk DNA erstattet med DEPC vann. Prosedyren ble utført som beskrevet i punkt 3.8.1.

4.5.2 Test av PCR produkt ved hjelp av agarose gel elektroforese

PCR produkt ble analysert ved 1 % gel elektroforese (figur 18). Agarose gel elektroforese ble utført som beskrevet i punkt 3.6.1, og viste at amplifisering av både fragmentene N1–N2 og N1–N3 var vellykket (figur 18). Fragmenter hadde en forventet størrelse ca.1000 bp (N1–N2) og ca. 1450 bp (N1–N3), som var forventede størrelser. For å sammenlikne størrelse på båndene ble to markører med kjente størrelser applisert. Negativ kontroll ble applisert og viste ingen bånd.

1 2 3 4 5 6



Figur 18. Separasjon av amplifisert DNA fragment rCnaBc_N1-2 og rCnaBc_N1-3 og ved 1 % agarose gel elektroforese. Elektroforesen ble utført i 1xTBE buffer ved 70 V i 1,5 timer. Spor 1: λ DNA-BstEII Digest (BioLabs), spor 2: prøve med fragment N1-N2(ca. 1000 bp), spor 3, 4: negativ kontroll, spor 5: prøve med fragment N1-N3 (ca. 1450 bp), spor 6: 1kbDNA ladder(Fermentas).

Analyse av negativ kontroll ved hjelp av gelvisualisering bekreftet at prøven ikke inneholdt DNA ved at man ikke så bånd på gelen.

4.5.3 Kloning av PCR-produkter for His-tagget BC1060 adhesjonsdomene i Topo vektor for ekspresjon

Kloning av PCR-produkter for C-terminalt His-taggede adhesjonsdomener (henholdsvis N1-N2 og N1-N3) i riktig retning i pCR-II-TOPO vektor ville gi uttrykk av hhv. rCna_{Bc}_N1-2 (tilsvarende aminosyrer 32-339 i BC1060) med et start-kodon foran og med en SGASHHHHHH-hale, fra *lac* promotoren i pCR-II-TOPO, og tilsvarende av rCna_{Bc}_N1-3 (tilsvarende aminosyrer 32-481 i BC1060) med et start-kodon foran og en AGSHHHHHHH-hale, fra den samme promotoren. PCR fragmentene (N1-N2 og N1-N3) skulle settes inn i MCS (Multiple cloning site), i den ferdiglagede åpne delen av plasmidet med T-overheng plassert mellom restriksjonssetene for *EcoRI* (figur 11). Kloningsprosedyren ble utført ved hjelp av TOPO TACloning kit som beskrevet i punkt 3.9.

4.5.4 Transformasjon av rekombinant vektor i One Shot® TOP 10 kjemisk kompetente *E.coli* celler

Transformasjonsprosedyre ble utført som beskrevet i punkt 3.10.1 med ampicillin ble som selekterende agens fordi vektor har ampicillin resistensgener og blå/hvit seleksjon med X-gal. Kontrollreaksjon med ukuttet pUC19-vektor ble benyttet for å sjekke transformasjons-effektiviteten. Hele prosedyren inkludert PCR, Topo-ligering og transformasjonsprosedyren ble gjentatt noen ganger fordi første forsøk ikke var vellykket og det var ingen hvite kolonier på skåler. Sannsynligvis skjedde dette fordi PCR produktet som ble brukt for kloningsreaksjon ble oppbevart i kjøleskap over natt. PCR produktet må være ferskt, men PCR produkt med tilsatt salt løsning og vektor kan lagres over natt ved -20°C .

Etter to forsøk ble transformasjonsprosedyre for fragment N1–N2 vellykket og tallene i tabell 16 viser resultat etter utplating av transformanter på fast LB medium med tilsatt ampicillin.

Tabell 16. Kloning av fragment rCnaBc_N1–2 (tilsvarende aminosyrer 32–339 i BC1060). Antall kolonier etter utplating av transformanter på fast LB medium tilsatt ampicillin 100 µg/ml og X-gal, inkubert over natt ved 37°C.

Volum utplatet	20µl		100µl		180µl	
	Hvite	blå	Hvite	blå	Hvite	blå
pUC19 kontroll plasmid DNA, 1ng/µl	Tett med kolonier		Tett med kolonier		Tett med kolonier	
Teknisk replikat 2	2	3	4	4	4	5
Teknisk replikat 3	1	3	3	5	4	6

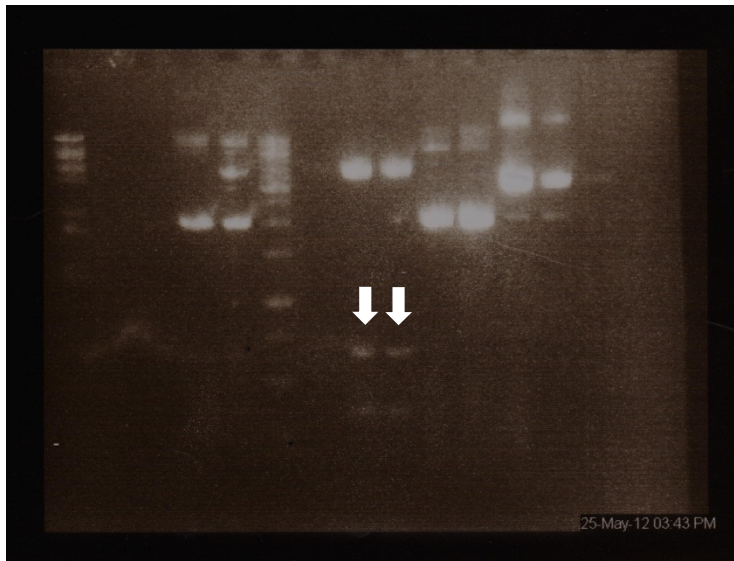
Kloning av fragmentet N1–N3 var ikke vellykket. Derfor ble det etter noen mislykkede forsøk på å klon N1–N3 bestemt å forandre kloningsprotokollen. Etter PCR, ble 1 µl DyNAzyme™II DNA Polymerase tilsatt og prøvene ble inkubert ved 72°C i 30 minutter. DyNAzyme har terminal transferase aktivitet og setter på ekstra baseoverheng på DNA molekyler. Pfu Ultra II som ble brukt i tidligere PCR lager nesten bare såkalte "blunte"

produkter, det vil si dobbeltrådede DNA molekyler uten overheng. Disse er vanskeligere å ligere inn i en vektor enn DNA-molekyler som har enkelttråd-overheng. Topo-vektoren som ble brukt i kloning er basert på at PCR-produktene som skal klones er polymerisert med et enzym med terminal transferaseaktivitet, fordi vektoren er laget med enzymet Topoisomerase festet til et enkelt T-overheng. Resultater med blå/hvit seleksjon viste allikevel at kloning og transformasjonsprosedyre mislyktes for fragment N1–N3, det ble ikke observert noen hvite kolonier på skålene.

4.5.5 Bekreftelse på riktig størrelse og identitet av innskudd av fragment rCnaBc N1-2

Fire hvite kolonier (prøve 1, 1a, 2, 3) ble plukket og inokulert over natt i LB flytende med ampicillin (100 µg/ml) ved 37°C og risting på 225 rpm. Plasmid DNA ble isolert ifølge protokollen E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I Spin som beskrevet i punkt 3.11. Isolert plasmid DNA ble kuttet med restriksjonsenzym *EcoRI* i 1,5 time ved 37°C som beskrevet i punkt 3.12. og undersøkt ved hjelp av gel elektroforese som beskrevet i punkt 3.6.1. Elektroforesen viste at kloner 2 og 3 (prøve 2 i spor 5 og prøve 3 i spor 6, figur 19) inneholdt et fragment med forventet størrelse på 612 bp. Kloner 1 og 1a (prøve 1 i spor 2 og prøve 1a i spor 3) inneholdt ikke fragment N1–N2.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Figur 19. 1 % agarose gel elektroforese av kuttet (*EcoRI*) og ukuttet plasmid DNA isolert fra One Shot TOP 10 kjemisk kompetente *E.coli* celler. Elektroforesen ble utført i 1xTBE buffer ved 70 V i 1,5 timer. Spor 1: λ DNA–BstEII Digest, spor 2: kuttet klon 1, spor 3: kuttet klon 1a, spor 4: 1kb DNA ladder, spor 5: kuttet klon 2, spor 6: kuttet klon 3, spor 7, 8, 9, 10: tilsvarende ukuttete prøver.

4.5.6 Analyse av orientering av innskudd av fragment rCnaBc N1-2 i vektor

Test-PCR ble utført for å kontrollere riktig retning av innskuddene i vektor for klonene 2 og 3. I tilfelle innskudd satt riktig vei, skulle primere S2 og CnaBc_F2 (en primer satt i innskuddet, og en i vektor) gi 612 bp produkt.

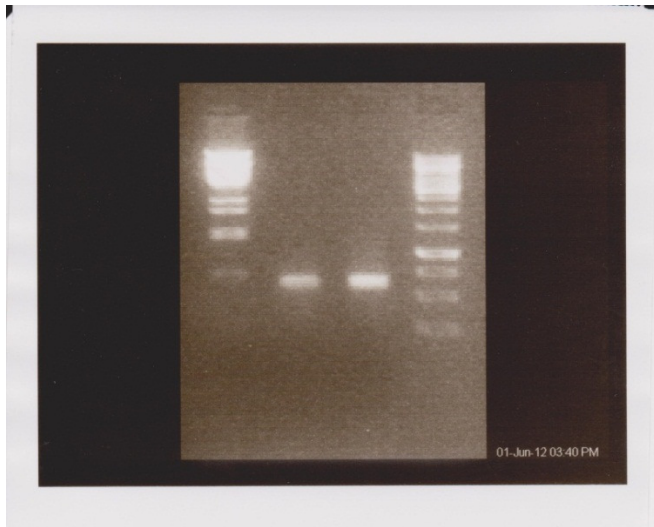
Primerne som ble benyttet hadde følgende sekvenser:

CnaBc_F2 (forward): atccttcgattgctgattgg

S2 (revers): taacaatttcacacaggaacagc

For å undersøke tilstedeværelse av fragment 612 bp, og dermed om innskuddene satt riktig vei i klonene, ble det utført 1 % gel elektroforese som beskrevet i punkt 3.6.1. For å sammenlikne størrelse på båndene ble to markører med kjente størrelser applisert. Resultatet viste to bånd på ca. 600 bp (klon 2 og 3, figur 20), dette indikerer at innskudd var satt i vektor riktig vei.

1 2 3 4



Figur 20. Separasjon av PCR–amplifisert DNA fragment ved 1 % agarose gel elektroforese. Elektroforesen ble utført i 1xTBE buffer ved 70 V i 1,5 timer. Spor 1– λ DNA–BstEII Digest (BioLabs), spor 2– PCR produkt 612 bp (klon 2), spor 3–PCR produkt 612 bp (klon 3), spor 4– 1kbDNA ladder(Fermentas).

4.5.7 Preparasjon av kompetente celler av *E.coli* BL21 DE3 og *E.coli* BL21DE3 pLysS og transformasjon av rekombinant vektor

Plasmidene ble overført til *E.coli* BL21DE3 fordi disse vertscellene er spesialisert for proteinkspresjon.

Prosedyren ble utført ifølge punkt 3.10.2, med ampicillin tilsatt kulturene til konsentrasjon 100 $\mu\text{g/ml}$ i alle trinn. Kloramfenikol ble i tillegg tilsatt *E.coli* BL21DE3pLysS til konsentrasjon 25 $\mu\text{g/ml}$. Klon 2 (spor 5 i figur 19) og klon 3 (spor 6 i figur 19) ble benyttet for transformasjonsprosedyre.

Etter varmesjokkbehandling og inkubering med SOC medium ble de transformerte cellene plattet ut på de selektive mediene med respektive antibiotiker og inkubert over natt ved 37°C (tabell 17). For å sjekke transformasjonseffektiviteten ble det benyttet pUC19 kontroll reaksjon.

Tabell 17. Antall kolonier etter retransformasjon av isolert plasmid fra klonene 2 og 3.

Volum utplatet	10 µl	100 µl
	Antall kolonier	Antall kolonier
pUC19 kontroll plasmid DNA, 1ng/µl	Tett med kolonier	Tett med kolonier
AH 802 _{klon2} <i>E.coli</i> BL21DE3pLysS	2	4
AH 802 _{klon3} <i>E.coli</i> BL21DE3pLysS	3	4
AH1498 _{klon2} <i>E.coli</i> BL21DE3	4	6
AH 1498 _{klon3} <i>E.coli</i> BL21DE3	3	5

4.5.8 Bekreftelse på tilstedeværelse og riktig størrelse av fragment N1–N2

For å bekrefte at transformasjonsforsøk av rekombinant vektor i *E. coli* BL21DE3 vertsstammer var vellykket, ble isolering av plasmid DNA med påfølgende kutting med restriksjonsenzym utført.

Etter at en enkelt koloni ble plukket fra agarस्कål, og dyrket over natt i LB-medium tilsatt ampisillin (100 µg/ml) ved 37°C og 225 rpm, ble plasmid DNA isolert ved hjelp av E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit, og kuttet med restriksjonsenzym *EcoRI* ved 37°C i 1,5 time som beskrevet i punkt 3.12. Kuttet plasmid ble visualisert på 1 % agarosegel som beskrevet i punkt 3.6.1. Elektroforese bekreftet tilstedeværelse av fragmenter med forventet størrelse 612 bp i alle 4 prøvene (figur 21). Båndene er bare klare på bilde i spor 2– AH 802_{klon2}, men det forklares at bildet er av dårlig kvalitet på grunn av kamera. Ved direkte observasjon i UV lys (UV-kasse), var et 600 bp-bånd klart synlig i alle fire klonene. AH 802_{klon2} (som viste det sterkeste båndet), ble brukt i det videre arbeidet med proteinekspresjon.

1 2 3 4 5 6



Figur 21. 1 % agarose gel elektroforese av kuttet (*EcoRI*) plasmid DNA isolert fra *E.coli* BL21DE3 og *E.coli* BL21DE3pLysS. Elektroforesen ble utført i 1xTBE buffer ved 70 V i 1,5 timer. Spor 1: λ DNA–BstEII Digest, spor 2: kuttet prøve AH 802_{klon 2}, spor 3: kuttet prøve AH 802_{klon 3}, spor 4: AH1498_{klon 2}, spor 5: kuttet prøve AH 1498_{klon3}, spor 6: 1 kb DNA ladder.

4.5.9 Sekvensering av rekombinant plasmid

Sekvensering ble utført ved Biologisk Institutt, Universitet i Oslo. Alle fire kloner (AH 802_{klon2}, AH 802_{klon3}, AH1498_{klon2}, AH 1498_{klon3}) ble sekvensert med forward og revers M13 primere for å undersøke om riktig sekvens ble amplifisert under PCR og om innskuddet i hver klon hadde korrekt orientering. Resultater fra sekvensering (vedlegg 7.1, 7.2, 7.3 og 7.4) viste at det hadde blitt amplifisert riktig sekvens under PCR, og at innskudd i alle 4 kloner var orientert riktig i forhold til *lac*-promoter i vektoren, .

4.6 Ekspresjon av BC1060 adhesjonsdomener i *E.coli*

4.6.1 Induksjon av proteinekspresjon i *E.coli* og isolering av totalt cellulært protein

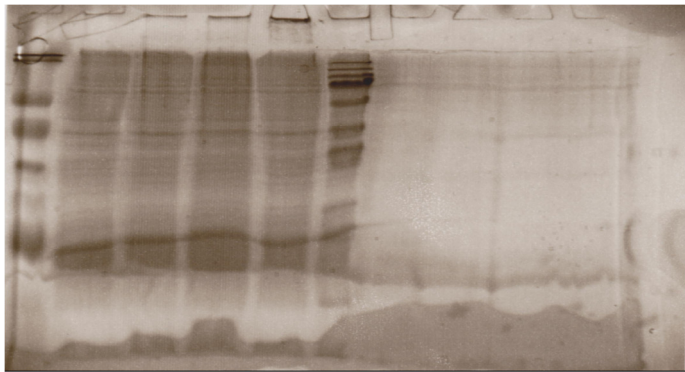
Målet med forsøket var å uttrykke adhesjonsdomene fra BC1060 i *E.coli* vertceller, isolere proteinet og rense på Ni-NTA kolonne. En bakteriekoloni av *E.coli* BL21DE3 med ligert rekombinant vektor (AH 802_{klon2}) ble dyrket over natt i flytende LB medium tilsatt ampicillin og kloramfenikol ved 37°C og risting på 225 rpm, og deretter reinokulert i nytt LB medium (1:50) og deretter dyrket ved 37°C og 225 rpm til OD₆₀₀=0,6 (punkt 3.13.1).

Proteinekspresjon ble indusert ved tilsetning av 1 mM IPTG. Det ble også dyrket en tilsvarende kontroll-kultur hvor IPTG ikke ble tilsatt. Bakteriekulturer ble dyrket videre i 1 time ved 37°C og 225 rpm, sentrifugert og resuspendert i TEN buffer og sentrifugert igjen.

Proteinisolering ble utført i følge protokoll punkt 3.13.2, og isolert protein ble analysert ved polyakrylamid gelelektroforese som i punkt 3.14. Forventet proteinstørrelse var 10–20 kDa, derfor ble 15 % akrylamid gel benyttet. For å estimere proteinstørrelsen ble to markører som inneholder blanding av proteiner med kjente størrelser brukt (Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus og MultiMark™ Multi-Colored Standard). Elektroforese ble kjørt ved 90 V i 15 minutter og videre ved 150 V i 60 minutter. For å detektere proteinet ble Bio-Safe™ Coomassie G 250 Stain benyttet.

Gelen ble undersøkt ved hjelp av ChemiGenius² system. Vi kunne ikke se ekspresjon av adhesjonsdomene fra BC1060 ved å sammenlikne protein isolert fra IPTG-indusert kultur med protein fra ikke-indusert kultur (figur 22). På grunn av manglende tid kunne ikke videre forsøk gjøres.

1 2 3 4 5 6



Figur 22. Analyse av proteinekstrakt fra IPTG-indusert kultur og ikke-indusert kultur (AH802_{klon2}). Spor1: MultiMark Multi-Colored Standard, spor 2: prøve (-IPTG, volum 20 µl), spor 3: prøve (+IPTG, volum 20 µl), spor 4: prøve (-IPTG, volum 30 µl), spor 5: prøve (+IPTG, volum 30 µl), spor 6: PageRuler Prestained Protein Ladder Plus.

4.7 Forekomst av genet BC1060 i *Bacillus cereus* gruppen

BlastP ble benyttet for å identifisere forekomsten av ortologer til BC1060 innen *B. cereus*-gruppen (standard protein Blast, standard parametre på [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/database/refseq_protein), [database:refseq_protein](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/database/refseq_protein), organisme: *Bacillus cereus* group taxid:86661). Det ble søkt med proteinsekvensen kodet for BC1060 fra *B. cereus* ATCC 14579 (NCBI reference sequence NP_830846.1), da ortologen til BC1060 feilaktig ikke er annotert i genomsekvensen til *B. thuringiensis* 407 som er tilgjengelig i de offentlige databasene (GenBank, EMBL; Fagerlund, personlig kommunikasjon). For å anses å ha tilfredsstillende likhetsgrad satte vi en cut-off for sekvensidentiteten til å være større eller lik 85 % og dekning (coverage) større eller lik 80 %. Dekning viser hvor stor andel (i %) av sekvensen vi søkte med det er, som viser identiteten som oppgis.

Vi kan se fra resultatene i tabell 18 at 20 stammer tilfredsstillende disse kravene: *B. cereus* BDRD-Cer4, *B. cereus* m1550, *B. cereus* AH1134, *B. thuringiensis* serovar kurstaki str. T03a001, *B. sp.* 7_6_55CFAA_CT2, *B. thuringiensis* IBL 200, *B. cereus* F65185, *B. thuringiensis* str. Al Hakam, og *B. cereus* 03BB108, G9842, AH676, B4264,172560W, AH603, *B. thuringiensis* serovar huazhongensis BGSC4BD1, serovar chinensis CT-43, serovar israelensis ATCC 35646, *B. thuringiensis* IBL 4222 og *B. weihenstephanensis* KBAB4.

Ut fra denne tabellen vi kan se at noen stammer (*Bacillus thuringiensis* serovar sotto str. T04001) har sekvenser som er 98 % identiske, men lengden av identiske sekvenser utgjør bare 10 % av total sekvenslengde. I andre enden viser *Bacillus thuringiensis* BMB171 veldig lav identitet, –32 %, men i 96 % av hele sekvenslengden. I slike tilfeller, hvor identitet og/eller dekning er for lav, er det sannsynligvis ikke en sann ortolog til BC1060 som er til stede, men snarere et annet liknende protein. Det er 29 isolater fra *B. cereus* gruppen som er fullt sekvensert (lukket; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>), og det finnes derfor flere medlemmer av gruppen som mangler dette genet. Et eksempel er *B. cereus* ATCC10987, som er en sterk biofilmdanner, hvor kun proteiner med lav identitet (<40 %) til BC1060 finnes i listen i tabell 18.

Tabell 18. BlastP-søk for å identifisere forekomsten av ortologer til BC1060 innen *B. cereus*-gruppen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, database: refseq_protein, organisme: *Bacillus cereus* group taxid:86661; for øvrig standard parametre).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NP_830846.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus ATCC 14579] >gii29894758 gb AAP08047.1 Collagen adhesion protein [Bacillus cereus ATCC 14579]	4742	4742	100%	0.0	100%	G
ZP_04255484.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus BDRD-Cer4]	405	2462	80%	9e-130	99%	
ZP_04130086.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar sotto str. T04001]	514	514	10%	9e-168	98%	
ZP_04277607.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus m1550]	3407	7310	98%	0.0	96%	
ZP_03229586.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus AH1134]	3352	7184	100%	0.0	93%	
ZP_04113628.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. T03a001]	1008	9552	80%	0.0	92%	
ZP_09358007.1	LPXTG-domain-containing protein cell wall anchor domain [Bacillus sp. 7_6_55CFAA_CT2]	3140	8373	100%	0.0	92%	
ZP_04070669.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis IBL 200]	3418	7290	98%	0.0	92%	
ZP_04202016.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus F65185]	3072	8237	98%	0.0	91%	
YP_893816.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis str. Al Hakam]	3121	8096	100%	0.0	91%	G
ZP_03111569.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus 03BB108]	3119	8084	100%	0.0	91%	
YP_002444526.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus G9842]	3584	5747	100%	0.0	90%	G
ZP_04190641.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus AH676]	676	6529	80%	0.0	90%	
YP_002365828.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus B4264]	3701	6187	100%	0.0	90%	G
ZP_04083248.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar huazhongensis BGSC 4BD1]	713	6193	80%	0.0	89%	
YP_005570993.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43]	3386	6994	98%	0.0	89%	G
ZP_00738911.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646]	3346	7076	100%	0.0	88%	
ZP_04063987.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis IBL 4222]	3293	7021	98%	0.0	88%	
ZP_04304969.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus 172560W]	809	7539	80%	0.0	88%	
YP_001643862.1	cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus weihenstephanensis KBAB4]	3392	5525	99%	0.0	86%	G
ZP_04196196.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus AH603]	3353	5435	99%	0.0	85%	
ZP_04260833.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus BDRD-ST196]	288	1895	63%	9e-89	79%	
ZP_03115255.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus 03BB108]	281	2000	81%	8e-79	41%	
ZP_00235863.1	reticulocyte binding protein [Bacillus cereus G9241]	282	1524	80%	2e-78	41%	
ZP_05213563.1	collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. Australia 94]	416	3334	83%	1e-125	38%	
YP_002818131.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus anthracis str. CDC 684]	429	3411	83%	1e-129	38%	G
YP_006212398.1	Collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. H9401]	428	3403	83%	2e-129	38%	G
YP_001643664.1	cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus weihenstephanensis KBAB4]	337	2669	80%	3e-95	38%	G
YP_031446.1	collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. Sterne]	445	3528	83%	1e-134	38%	G
ZP_00390296.1	COG4932: Predicted outer membrane protein [Bacillus anthracis str. A2012] >ref ZP_05151058.1 collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. CNEVA-9066] >ref ZP_05193204.1 collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. Western North America USA6153] >ref ZP_05199944.1 collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. Kruger B] >ref ZP_05207861.1 collagen adhesion protein, C-terminal [Bacillus anthracis str. Vollum]	445	3526	83%	1e-134	38%	
ZP_04315240.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus BGSC 6E1]	346	1818	80%	3e-98	37%	
NP_977284.1	cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus ATCC 10987]	389	2074	82%	3e-111	37%	G
ZP_04100753.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar berliner ATCC 10792] >ref ZP_04131646.1 LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. T01001]	285	1781	80%	2e-79	37%	
YP_005570822.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43]	284	1734	80%	5e-79	37%	G
ZP_05185801.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus anthracis str. A1055]	577	4397	83%	4e-178	37%	
ZP_00738825.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646]	459	1551	77%	4e-131	37%	
ZP_04068587.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis IBL 4222] >ref ZP_04093952.1 Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar pondicheriensis BGSC 4BA1]	458	1549	77%	7e-131	37%	
ZP_09357810.1	hypothetical protein HMPREF1014_03273 [Bacillus sp. 7_6_55CFAA_CT2]	340	1593	79%	1e-96	37%	
YP_006594880.1	cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus FRI-35]	335	1817	80%	1e-94	37%	G
YP_003663302.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis BMB171]	343	1610	80%	3e-97	37%	G
ZP_03103925.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus W]	936	3818	96%	0.0	37%	
YP_039349.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar konkukian str. 97-27]	915	5263	91%	0.0	37%	G
YP_006604843.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis HD-771]	350	1634	80%	1e-99	37%	G
ZP_04255315.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus BDRD-Cer4]	340	1274	80%	4e-96	37%	
NP_830673.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus ATCC 14579]	339	1264	80%	6e-96	37%	G
ZP_04190477.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH676]	339	1601	80%	8e-96	37%	
ZP_04063800.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis IBL 4222]	289	1702	80%	2e-80	36%	
ZP_04173150.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH1273]	394	1192	80%	7e-113	36%	
ZP_04196040.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH603]	332	2587	80%	1e-93	36%	

ZP_03228704.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH1134]	333	1581	80%	4e-94	36%	
YP_005568985.1	cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus thuringiensis serovar frinitimus YBT-020]	899	2673	91%	0.0	36%	G
ZP_04083071.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar huazhongensis BGSC 4BD1]	345	1603	80%	1e-97	36%	
ZP_04200305.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH603]	777	2352	89%	0.0	36%	
YP_002444331.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus G9842]	284	1683	80%	4e-79	36%	G
ZP_04282692.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus ATCC 4342]	392	1436	80%	4e-112	36%	
YP_002454369.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus AH820]	956	3982	96%	0.0	36%	G
YP_002752717.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus 03BB102]	900	4920	91%	0.0	36%	G
YP_897541.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis str. Al Hakam]	900	4016	91%	0.0	36%	G
YP_005121985.1	Collagen adhesion protein [Bacillus cereus F837776]	900	4020	91%	0.0	36%	G
ZP_04314723.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus BGSC 6E1]	715	4589	85%	0.0	36%	
YP_002365657.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus B4264]	327	1834	80%	6e-92	36%	G
YP_003795037.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus biovar anthracis str. C1]	974	2816	96%	0.0	36%	G
YP_086625.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus E33L]	977	1991	90%	0.0	36%	G
ZP_07055640.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus SJ1]	892	3417	90%	0.0	36%	
ZP_04270626.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus BDRD-ST26]	967	4051	85%	0.0	36%	
YP_002341425.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus AH187] >ref YP_005107819.1 collagen adhesion protein [Bacillus cereus NC7401]	971	3573	91%	0.0	36%	G
YP_002532887.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus Q1]	972	3552	91%	0.0	36%	G
ZP_03236775.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus H3081.97]	966	3550	91%	0.0	36%	
ZP_04225539.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus Rock3-42]	904	2725	90%	0.0	36%	
ZP_04297757.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH621]	815	3947	95%	0.0	35%	
NP_981779.1	cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus ATCC 10987]	868	2623	91%	0.0	35%	G
ZP_04129477.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar sotto str. T04001]	924	3376	90%	0.0	35%	
YP_006605767.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus thuringiensis HD-771]	922	3372	90%	0.0	35%	G
NP_835019.1	collagen adhesion protein [Bacillus cereus ATCC 14579]	858	2229	79%	0.0	35%	G
YP_002448895.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus G9842]	919	2577	90%	0.0	35%	G
ZP_03108296.1	LPXTG-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus NVH0597-99]	893	3335	90%	0.0	35%	
YP_005575342.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43]	900	2939	91%	0.0	35%	G
ZP_04105040.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar berliner ATCC 10792]	896	2899	90%	0.0	35%	
ZP_04135993.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar thuringiensis str. T01001] >ref ZP_04142363.1 Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis Bt407]	896	2903	90%	0.0	35%	
ZP_04281698.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus m1550]	890	3262	89%	0.0	35%	
ZP_04320554.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus ATCC 10876]	746	811	75%	0.0	35%	
ZP_03112690.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus 03BB108]	898	3333	89%	0.0	35%	
ZP_04308931.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus 172560W]	761	826	78%	0.0	35%	
YP_002370134.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain-containing protein [Bacillus cereus B4264]	889	3252	89%	0.0	35%	G
ZP_00738644.1	Collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646] >ref ZP_04067951.1 Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis IBL 4222]	890	2143	96%	0.0	35%	
ZP_04194576.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH676]	807	1352	89%	0.0	35%	
ZP_04206023.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus F65185]	759	825	78%	0.0	35%	
ZP_04242303.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus Rock1-15]	868	2056	90%	0.0	35%	
ZP_04117606.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar kurstaki str. T03a001]	751	816	78%	0.0	35%	
ZP_09358808.1	LPXTG-domain-containing protein cell wall anchor domain [Bacillus sp. 7_6_55CFAA_CT2]	757	1514	83%	0.0	35%	
ZP_03230961.1	lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus AH1134]	760	823	78%	0.0	34%	
ZP_04087380.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar huazhongensis BGSC 4BD1]	740	1528	89%	0.0	34%	
ZP_04123230.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis serovar pakistani str. T13001]	863	2049	90%	0.0	34%	
ZP_04215034.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus Rock4-2]	753	818	78%	0.0	34%	
ZP_04326144.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus m1293]	740	2446	91%	0.0	34%	
ZP_04276239.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus BDRD-ST24]	860	892	83%	0.0	34%	
ZP_04303528.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus MM3]	865	908	95%	0.0	33%	
ZP_04075002.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus thuringiensis IBL 200]	870	920	96%	0.0	33%	
ZP_04259562.1	Lpxtg-motif cell wall anchor domain protein [Bacillus cereus BDRD-Cer4]	872	922	96%	0.0	32%	
YP_003667481.1	collagen adhesion protein [Bacillus thuringiensis BMB171]	867	916	96%	0.0	32%	G

Tabell 19. Sterke biofilm dannere i *Bacillus cereus* gruppen som inneholder sekvenser for kollagen adhesjon protein BC1060. Data hentet fra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

		deknings grad	sekvensidentitet
NP 977284.1	cell wall anchor domain-containing protein (<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987)	82 %	37 %
NP 981779.1	cell wall anchor domain-containing protein (<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987)	91 %	35 %

For å si at en bakterie har genet BC1060, må deknningen være større eller lik 80 % og sekvensidentiteten lik eller over 85 %. I disse to tilfellene (tabell 19) ser vi at gen som inneholder disse stammene er lik BC1060 i ganske stor andel (80–90 %) av total sekvenslengde, men i dette området er bare 35–37 % av sekvensene identiske med BC1060. Derfor konkluderer jeg med at *B. cereus* ATCC10987 ikke inneholder genet BC1060.

5. Diskusjon

5.1 BC1060 og biofilmdannelse i *Bacillus thuringiensis* 407

Tidligere forsøk med microarrays, med *B. thuringiensis* 407-ortologen til BC1060 fra *B. cereus* ATCC14579, hadde antydnet at BC1060-ekspressjon var nedregulert i en *cdg135* delesjonsmutant sammenliknet med villtype [93]. BC1060 koder for en homolog til *S. aureus* kollagen adhesjonsproteinet CNA og genet befinner seg nedstrøms for en c-di-GMP sensitiv riboswitch (figur 4, punkt 1.6) [79]. BC1060 er et mulig adhesjonsmolekyl som har en typisk domenestruktur for et såkalt MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesjonsprotein med ligand-bindende A-region og B-region (figur 5, punkt 1.5) [83]. MSCRAMM proteinerer er typisk involvert i adhesjon til biotiske overflater, men kan også mediere adhesjon til abiotiske overflater og i tillegg mediere intercellulær adhesjon som kreves for akkumuleringsfase av biofilm når flerlagsbiofilm er dannet [126].

5.1.1 Påvirkning av *cdg135* på BC1060 ekspressjon

Medlemmer av *B. cereus* gruppen har mange gener som koder for proteiner med GGDEFog/eller EAL domener. Disse domenene er typisk involvert i metabolisme av c-di-GMP, et molekyl som kontrollerer overgang fra planktonisk tilstand til biofilmassosiert livsstil [65]. c-di-GMP dannes fra to guanosine trifosfat (GTP) molekyler ved hjelp av enzymer kalt diguanylat cyclaser (DGC), og som inneholder GGDEF domener, mens spalting av c-di-GMP katalyseres av to typer fosfodiesteraser (PDE), enzymer som inneholder EAL domener eller HD-GYP domener [65].

Ti gener som koder for GGDEF og/eller EAL domener ble tidligere identifisert i Bt407, hvorav Cdg135 er vist å påvirke biofilmdannelse, og preliminare eksperimenter indikerer at det har c-di-GMP metaboliserende aktivitet (Fagerlund *et al.*, ikke publisert)

Preliminære eksperimenter hadde tidligere indikert at GGDEF- domenet i Cdg135 koder for en aktiv diguanylat cyclase og bidrar i syntesen av c-di-GMP (Røhr Å., ikke publisert). På en slik måte kunne uttrykk av BC1060 tenkes å induseres gjennom c-di-GMP, via sin oppstrøms c-di-GMP sensitive «ON» riboswitch [92].

Analyse av promoter-regionen til BC1060 ortologen i *B. thuringiensis* 407 viste at den inneholder en struktur og sekvens som stemmer overens med den c-di-GMP sensitive riboswitchen (GEMM), navngitt Bc2 i *B. cereus* ATCC 14579 [79]. Den tilsvarende mulig riboswitchen i *B. thuringiensis* 407 synes derfor å ha potensiale for å kunne reagere på økt nivå av c-di-GMP ved å slå på transkripsjon av det nedstrømsliggende gen BC1060, på samme måte som er i *B. cereus* ATCC 14579.

Microarray eksperimenter som sammenliknet total genekspressjon i tidlig eksponentiell vekst for villtype *B. thuringiensis* 407 med gendelesjonsmutanten i *cdg135* ble utført av tidligere master-student Krogstad [93]. Microarray resultatene indikerte at BC1060 var nedregulert 2,5 ganger i delesjonsmutant.

En del av min oppgave var å bekrefte dette ved hjelp av RT-PCR (qPCR). Resultatet fra qPCR viste at ekspresjon av BC1060 i villtype var 3,0 ganger høyere enn i delesjonsmutanten. De to metodene har forskjellig sensitivitet, men resultatene viste meget god overenstemmelse. I microarray er ekspresjon av alle gener vist samtidig og resultatene er basert på intensiteten av signaler hentet fra mengden av farge-koblede cDNA bindinger til probene. Analysen gir statistisk signifikant informasjon for gener som er opp- eller nedregulert, men det relative uttrykket i flere gener kan ikke estimeres med den samme nøyaktighet som med qPCR. I qPCR benyttes spesifikke primere for hvert gen som man ønsker å eksaminere, og ved bruk av referanse gener får man kvantitativ informasjon om ekspresjon i spesielle gener. Resultatet fra dette studiet viser derfor at BC1060-ekspresjon direkte eller indirekte induseres av Cdg135, potensielt gjennom interaksjon mellom c-di-GMP, produsert av Cdg135, med riboswitchen oppstrøms for BC1060.

Det er ikke oppklart om Cdg135 er den eneste faktor som påvirker genet BC1060. I videre arbeid vil det være interessant å finne ut om andre c-di-GMP metaboliserende enzymer kan påvirke ekspresjon av BC1060. For å oppklare dette spørsmålet kunne man for eksempel etablere β -gal assay og flere RT-qPCR forsøk, og med flere tidspunkter for prøvehøsting enn etter 1,5 time, som gjort her.

5.1.2 Rolle for BC1060 i biofilmdannelse i *Bacillus cereus* gruppen

Selv om BC1060 ekspresjon er påvirket av *cdg135*, sannsynligvis via c-di-GMP, ser biofilmdannelse i *B. cereus*-gruppen ikke ut til å være avhengig av BC1060. Overekspresjon av *Cdg135* ble funnet å gjenopprette biofilmdannelse i en BC1060 delesjonsmutant til samme nivå som i villtype stamme som inneholdt tom vektor [93]. Dette indikerer at andre *Cdg135*-kontrollerte faktorer kan kompensere for fravær av BC1060 med hensyn til biofilmdannelse.

I dette studiet utførte jeg et BlastP søk i NCBI databasen etter medlemmer av *Bacillus cereus*-gruppen som har proteinsekvenser med likhet til BC1060 i *Bacillus cereus* ATCC 14579. Det ble funnet 20 stammer inneholdt putative ortologer til BC1060 (tabell 18). I annet studie utført av Auger og medarbeidere, hvor 102 stammer av *B. cereus* og *B. thuringiensis* ble undersøkt for evne til å danne biofilm, ble *B. cereus* ATCC10987 og *B. thuringiensis* 407 funnet å være sterke biofilmdannere, mens *B. cereus* NVH 391–98 dannet noe biofilm [127]. Vi ønsket å undersøke om det kunne finnes stammer som ikke har en BC1060-ortolog, men som allikevel har evne til biofilmdannelse. Av de 102 stammene som ble undersøkt av Auger og medarbeidere, var det dessverre kun 3 stammer som var fullt sekvensert, men *B. cereus* ATCC10987 ble funnet ved BlastP-analyser ikke å ha BC1060 (tabell 19), men er samtidig en sterk biofilm-danner [127]. Dette tyder på at andre faktorer enn kollagen adhesjon protein kan påvirke evnen til å danne biofilm i *Bacillus cereus*-gruppen, og viser at BC1060 ikke er essensiell for biofilm-dannelse. Det er allikevel tenkelig at et eller flere andre proteiner kompenserer for fraværet av BC1060 i *B. cereus* ATCC 10987.

5.2 Kloning av adhesjonsdomener

Målet ved dette arbeidet var å klonere PCR-amplifiserte adhesjonsdomener fra BC1060 i en vektor, og videre å uttrykke proteinet i en egnet *E.coli* stamme. A-domene av BC1060 (hypotetisk kollagen adhesjonsdomene) ble amplifisert med C-terminal His-tag ved hjelp av PCR og klonet i TOPO-vektor. På grunn av usikkerhet om hvilke deler av A-domenet som utgjør selve adhesjonsdomenet, ble det bestemt å amplifisere hele domenet (N1–N2–N3) og en del (N1–N2).

Kloningen i TOPO-vektor var vellykket bare for N1–N2-delen av domenet. N1–N3-fragmentet ble PCR-amplifisert, men kloning i TOPO vektor med videre blå/hvit screening av kolonier viste ingen resultat, hvite kolonier ble ikke observert på skålene.

Årsaken til at forsøket mislyktes kan være at Pfu Ultra II Fusion HotStart DNA polymerase som ble brukt i PCR, hovedsakelig lager såkalte «blunte» ender – dobbeltrådede DNA-molekyler uten overheng. Disse er vanskeligere å ligere inn i den originale typen TOPO vektor og derfor vanskeligere å klonere enn DNA-molekyler som har enkelttråd-overheng. TOPO vektoren som ble brukt er basert på at PCR produkter som skal kloneres er polymerisert med et enzym med terminal transferase aktivitet, fordi vektoren er laget med topoisomerasen festet til enkelt T-overheng. Under gjentatte forsøk med kloning av N1–N3 domenet, ble prosedyren forandret ved at det på slutten av PCR-reaksjonen ble tilsatt DyNAzyme II DNA Polymerase. Dette enzymet har terminal transferase aktivitet [128], og setter ekstra baseoverheng på DNA-molekyler. Allikevel lyktes det ikke å klonere fragment N1–N3. At det ble vellykket resultat og at fragment N1–N2 ble klonet ved bruk av kun bare Pfu Ultra II polymerase, som nesten utelukkende lager produkter med utte ender, kan forklares med at enkelte tilfeller av enkelttrådoverheng allikevel kan oppstå. For at kloning av fragment N1–N3 skal bli vellykket kan man foreta gjentatte forsøk, men da først rense PCR-produktene med E.Z.N.A. kit, og så inkubere produktene med DyNAzyme i reaksjonsbufferen som er spesielt laget til dette enzymet.

Forsøk med induksjon av proteinekspressjon i *E. coli* mislyktes. Klonene viste ingen produksjon av N1–N2-subdomenene ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese, og betingelser for ekspressjon må optimaliseres før protein kan renses og en eventuell ligand for subdomenene kan identifiseres. En mulig årsak til at forsøk mislyktes kan være at proteinet er ustabilt og degraderes raskt av proteaser. Et slikt problem kan overvinnes ved for eksempel å redusere dyrkningstemperaturen til 30°C. Proteinene kan også tenkes å være toksiske for vertsceller; Gen-produkter kan påvirke cellevekst, for eksempel membran proteiner eller proteiner som reagerer med DNA eller interfererer med elektron-transport [120]. Rekombinante proteiner som inneholder hydrofobe regioner kan også ha toksisk effekt på vertsceller. I noen tilfeller kan 5' enden av den innsatte DNA-sekvensen kode elementer som kan interferere med transkripsjon eller translasjon, derfor må sekvensen som settes inn sjekkes og modifiseres hvis det er nødvendig. Modifisering av vekstmedium eller bruk av en annen vektor og forandring av IPTG-konsentrasjon kan også være nødvendig for å optimalisere prosedyren [120].

5.3 Konklusjoner

Ekspresjon av BC1060 påvirkes i en *cdg135* delesjonsmutant, muligens direkte gjennom endrede cellulære c-di-GMP nivåer og via sin oppstrøms c-di-GMP-responsive riboswitch.

Resultater fra qPCR viste at ekspresjon av BC1060 ble redusert med faktor 3,0 i en *cdg135* delesjonsmutant sammenliknet med villtype i prøver høstet i tidlig log-fase.

Endringen i genekspresjon for BC1060, dokumentert henholdsvis med qPCR og microarray, viste en meget god overensstemmelse.

N1–N2 domenenene av BC1060 kan klones i TOPO-vektor, men flere eksperimenter kreves for å identifisere en eventuell ligand for det annoterte adhesjonsdomenet i BC1060. I denne oppgaven har jeg produsert en klon av det antatte adhesjonsdomenet av BC1060, som kan benyttes videre i optimaliseringsforsøk for proteinekspresjon, med mål om å rense dette via His-taggen.

BC1060 er kjent fra tidligere å påvirke biofilm-dannelsen, men er ikke et essensielt gen for biofilm-dannelse i *B. cereus* gruppen.

5.4 Videre arbeid

Det er stor interesse for å studere alle gener i *B. thuringiensis* 407 som er involvert i metabolisme av c-di-GMP og som påvirker biofilmdannelse. Hvilke andre faktorer kan påvirke ekspresjon av BC1060, og hvilke andre prosesser under kontroll av Cdg135 kan være involvert i biofilmdannelse?

En PhD student i gruppen fortsetter å arbeide med kloning av adhesjonsdomener, uttrykk av protein, samt rensing på Ni-NTA kolonne, med det endelige målet å identifisere en mulig ligand BC1060 kan benytte ved eventuell binding til humane matriks molekyler og videre karakterisere rollen til proteinet i biofilmdannelse i *B. thuringiensis* 407.

Det gjenstår mye forskning på dette området før alle faktorer omkring biofilmdannelse er avdekket. Så langt har man avdekket noen få, men viktige elementer. Langsiktige mål innenfor forskningsområdet vil være å kunne styre, eller også forhindre biofilmdannelse, for derved å gjøre visse former for pasientbehandling tryggere og medisinerer mer målrettet, eksemplvis ved humane sårinfeksjoner der biofilmdannelse kan være en virulensfaktor.

6. Referanse liste

1. Økstad, O.A. and A.B. Kolstø, *Genomics of Bacillus Species*. Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens, 2011: p. 29-53.
2. Priest, F.G., *Systematics and ecology of Bacillus subtilis*. Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria, 1993: p. 3-16.
3. Kolstø, A.B., N.J. Tourasse, and O.A. Økstad, *What sets Bacillus anthracis apart from other Bacillus species?* Annu Rev Microbiol, 2009. **63**: p. 451-476.
4. Schnepf, E., et al., *Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins*. Microbiology and molecular biology reviews, 1998. **62**(3): p. 775-806.
5. Stenfors Arnesen, L.P., A. Fagerlund, and P.E. Granum, *From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. FEMS microbiology reviews, 2008. **32**(4): p. 579-606.
6. Helgason, E., et al., *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis—one species on the basis of genetic evidence*. Applied and environmental microbiology, 2000. **66**(6): p. 2627-2630.
7. Mock, M. and A. Fouet, *Anthrax*. Annual Reviews in Microbiology, 2001. **55**(1): p. 647-671.
8. Van Ert, M.N., et al., *Global genetic population structure of Bacillus anthracis*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e461.
9. Saile, E. and T.M. Koehler, *Bacillus anthracis multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(5): p. 3168-3174.
10. Okinaka, R., et al., *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(20): p. 6509-6515.
11. Candela, T. and A. Fouet, *Poly-gamma-glutamate in bacteria*. Molecular microbiology, 2006. **60**(5): p. 1091-1098.
12. Drysdale, M., et al., *Capsule synthesis by Bacillus anthracis is required for dissemination in murine inhalation anthrax*. The EMBO journal, 2004. **24**(1): p. 221-227.
13. Drobniowski, F.A., *Bacillus cereus and related species*. Clinical microbiology reviews, 1993. **6**(4): p. 324-338.
14. Beecher, D.J. and J. Macmillan, *Characterization of the components of hemolysin BL from Bacillus cereus*. Infection and immunity, 1991. **59**(5): p. 1778-1784.
15. Lund, T. and P.E. Granum, *Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak*. FEMS microbiology letters, 1996. **141**(2-3): p. 151-156.
16. Lund, T., M.L. De Buyser, and P.E. Granum, *A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis*. Molecular microbiology, 2000. **38**(2): p. 254-261.
17. Gohar, M., et al., *The PlcR virulence regulon of Bacillus cereus*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2793.
18. Agaisse, H., et al., *PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in Bacillus thuringiensis*. Molecular microbiology, 1999. **32**(5): p. 1043-1053.
19. Økstad, O.A., et al., *Sequence analysis of three Bacillus cereus loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin*. Microbiology, 1999. **145**(11): p. 3129-3138.
20. Hoton, F.M., et al., *The cereulide genetic determinants of emetic Bacillus cereus are plasmid-borne*. Microbiology, 2005. **151**(7): p. 2121-2124.
21. Ehling-Schulz, M., et al., *Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1*. BMC microbiology, 2006. **6**(1): p. 20.
22. Ivanova, N., et al., *Genome sequence of Bacillus cereus and comparative analysis with Bacillus anthracis*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 87-91.

23. Ghelardi, E., et al., *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microbes and infection*, 2007. **9**(5): p. 591-598.
24. McIntyre, L., et al., *Identification of Bacillus cereus group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada*. *Applied and environmental microbiology*, 2008. **74**(23): p. 7451-7453.
25. Rasko, D.A., et al., *Genomics of the Bacillus cereus group of organisms*. *FEMS microbiology reviews*, 2005. **29**(2): p. 303-329.
26. O'Toole, G., H.B. Kaplan, and R. Kolter, *Biofilm formation as microbial development*. *Annu Rev Microbiol*, 2000. **54**: p. 49-79.
27. Lappin-Scott, H.M. and J.W. Costerton, *Introduction to Microbial Biofilms in Microbial biofilms*. 2003, Cambridge Univ Pr. p. 2-4.
28. Lappin-Scott, H.M. and J.W. Costerton, *Dynamics of Bacterial Biofilm Formation in Microbial biofilms*. 2003, Cambridge Univ Pr. p. 46.
29. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. *Clinical microbiology reviews*, 2002. **15**(2): p. 167-193.
30. Hall-Stoodley, L., et al., *Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media*. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 2006. **296**(2): p. 202-211.
31. Domingue Sr, G.J. and W.J.G. Hellstrom, *Prostatitis*. *Clinical microbiology reviews*, 1998. **11**(4): p. 604-613.
32. Nickel, J.C. and J.W. Costerton, *Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis*. *The Prostate*, 1993. **23**(2): p. 107-114.
33. Madigan, M.T., et al., *The Microbial Environment in Brock biology of microorganisms* 13th ed. 2012, Pearson: San Francisco. p. 702-704.
34. Sauer, K., *The genomics and proteomics of biofilm formation*. *Genome Biol*, 2003. **4**(6): p. 219.
35. O'Toole, G.A. and R. Kolter, *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. *Molecular microbiology*, 1998. **30**(2): p. 295-304.
36. Pratt, L.A. and R. Kolter, *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. *Molecular microbiology*, 1998. **30**(2): p. 285-293.
37. Watnick, P.I., K.J. Fullner, and R. Kolter, *A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by Vibrio cholerae El Tor*. *Journal of bacteriology*, 1999. **181**(11): p. 3606-3609.
38. Dewanti, R. and A.C.L. Wong, *Influence of culture conditions on biofilm formation by Escherichia coli O157: H7*. *International journal of food microbiology*, 1995. **26**(2): p. 147-164.
39. O'Toole, G.A., et al., *The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 2000. **182**(2): p. 425-431.
40. Stoodley, P., et al., *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure*. *Journal of Applied Microbiology*, 1998. **85**(S1): p. 19S-28S.
41. Stoodley, P., et al., *Biofilms as complex differentiated communities*. *Annual Reviews in Microbiology*, 2002. **56**(1): p. 187-209.
42. Tolker-Nielsen, T., et al., *Development and Dynamics of Pseudomonas Biofilms*. *Journal of bacteriology*, 2000. **182**(22): p. 6482-6489.
43. Wolfe, A.J., et al., *Cyclic Di-GMP and lifestyle choices in The Second Messenger Cyclic Di-GMP*. 2010, ASM Press Washington, DC.: p. 104.
44. Davies, D. and G. Geesey, *Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture*. *Applied and environmental microbiology*, 1995. **61**(3): p. 860-867.

45. Davies, D., A. Chakrabarty, and G. Geesey, *Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology, 1993. **59**(4): p. 1181-1186.
46. Branda, S.S., et al., *Fruiting body formation by Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(20): p. 11621.
47. Branda, S.S., et al., *Genes involved in formation of structured multicellular communities by Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology, 2004. **186**(12): p. 3970-3979.
48. Stöver, A.G. and A. Driks, *Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a Bacillus subtilis spore-associated protein*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(5): p. 1664-1672.
49. Stöver, A.G. and A. Driks, *Control of synthesis and secretion of the Bacillus subtilis protein YqxM*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(22): p. 7065-7069.
50. Branda, S.S., et al., *A major protein component of the Bacillus subtilis biofilm matrix*. Molecular microbiology, 2005. **59**(4): p. 1229-1238.
51. Romero, D., et al., *An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in B. subtilis biofilms*. Molecular microbiology, 2011. **80**(5): p. 1155-1168.
52. Terra, R., et al., *Identification of Bacillus subtilis SipW as a bifunctional signal peptidase that controls surface-adhered biofilm formation*. Journal of bacteriology, 2012. **194**(11): p. 2781-2790.
53. Kearns, D.B., et al., *A master regulator for biofilm formation by Bacillus subtilis*. Molecular microbiology, 2005. **55**(3): p. 739-749.
54. Bai, U., I. Mandic-Mulec, and I. Smith, *SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of Bacillus subtilis, by protein-protein interaction*. Genes & development, 1993. **7**(1): p. 139.
55. Lemon, K., et al., *Biofilm development with an emphasis on Bacillus subtilis*. Bacterial Biofilms, 2008: p. 1-16.
56. Dong, Y.H., et al., *Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from Bacillus species*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(4): p. 1754-1759.
57. Auger, S., et al., *Autoinducer 2 affects biofilm formation by Bacillus cereus*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(1): p. 937-941.
58. Agaisse, H., et al., *PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in Bacillus thuringiensis*. Molecular microbiology, 2002. **32**(5): p. 1043-1053.
59. Hsueh, Y.H., et al., *Biofilm formation by Bacillus cereus is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(7): p. 5089-5092.
60. Hsueh, Y.H., E.B. Somers, and A.C.L. Wong, *Characterization of the codY gene and its influence on biofilm formation in Bacillus cereus*. Archives of microbiology, 2008. **189**(6): p. 557-568.
61. Vilain, S., et al., *DNA as an adhesin: Bacillus cereus requires extracellular DNA to form biofilms*. Applied and environmental microbiology, 2009. **75**(9): p. 2861-2868.
62. Tran, S.L., et al., *CwpFM (EntFM) is a Bacillus cereus potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(10): p. 2638-2642.
63. Ross, P., et al., *Regulation of cellulose synthesis in Acetobacter xylinum by cyclic diguanylic acid*. 1987.
64. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman, *Cellulose biosynthesis and function in bacteria*. Microbiological Reviews, 1991. **55**(1): p. 35-58.
65. Hengge, R., *Cyclic-di-GMP Reaches Out into the Bacterial RNA World*. Science's STKE, 2010. **3**(149): p. pe44.
66. Wolfe, A.J. and K.L. Visick, *Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility*. Journal of bacteriology, 2008. **190**(2): p. 463-475.
67. Tamayo, R., J.T. Pratt, and A. Camilli, *Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis*. Annu Rev Microbiol, 2007. **61**: p. 131.

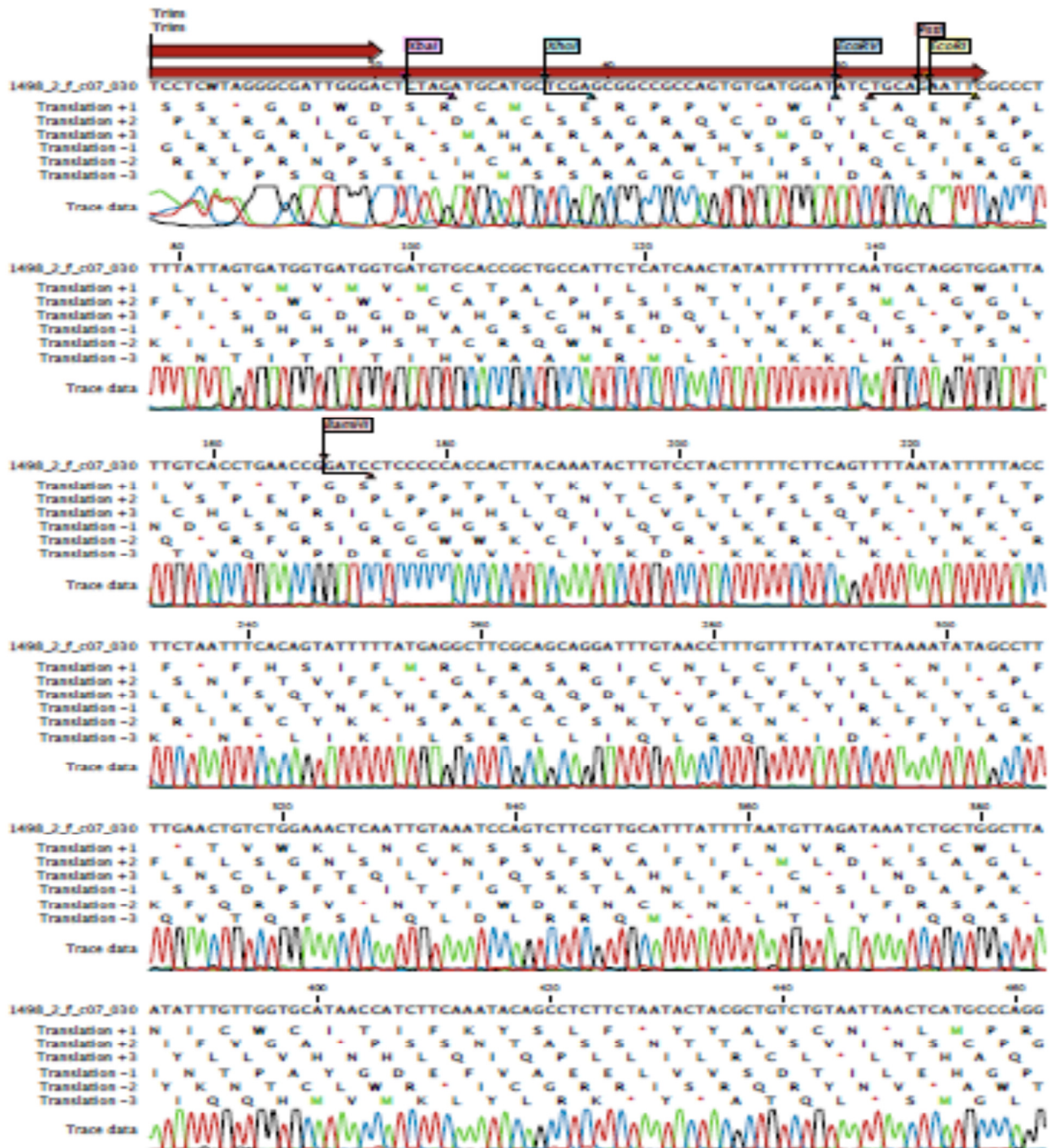
68. Jenal, U. and J. Malone, *Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria*. Annu. Rev. Genet., 2006. **40**: p. 385-407.
69. Römling, U. and D. Amikam, *Cyclic di-GMP as a second messenger*. Current opinion in microbiology, 2006. **9**(2): p. 218-228.
70. Duerig, A., et al., *Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression*. Genes & development, 2009. **23**(1): p. 93-104.
71. Hengge, R., *Principles of c-di-GMP signalling in bacteria*. Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(4): p. 263-273.
72. Botsford, J.L. and J. Harman, *Cyclic AMP in prokaryotes*. Microbiological Reviews, 1992. **56**(1): p. 100-122.
73. Benach, J., et al., *The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains*. The EMBO journal, 2007. **26**(24): p. 5153-5166.
74. Amikam, D. and M.Y. Galperin, *PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein*. Bioinformatics, 2006. **22**(1): p. 3-6.
75. Fang, X. and M. Gomelsky, *A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility*. Molecular microbiology, 2010. **76**(5): p. 1295-1305.
76. Hickman, J.W. and C.S. Harwood, *Identification of FleQ from Pseudomonas aeruginosa as ac-di-GMP-responsive transcription factor*. Molecular microbiology, 2008. **69**(2): p. 376-389.
77. Lee, V.T., et al., *A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production*. Molecular microbiology, 2007. **65**(6): p. 1474-1484.
78. Leduc, J.L. and G.P. Roberts, *Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of Xanthomonas axonopodis pv. citri*. Journal of bacteriology, 2009. **191**(22): p. 7121-7122.
79. Sudarsan, N., et al., *Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP*. Science's STKE, 2008. **321**(5887): p. 411.
80. Kulshina, N., N.J. Baird, and A.R. Ferré-D'Amaré, *Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(12): p. 1212-1217.
81. Smith, K.D., et al., *Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch*. Nature structural & molecular biology, 2009. **16**(12): p. 1218-1223.
82. Lee, E.R., et al., *An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger*. Science's STKE, 2010. **329**(5993): p. 845.
83. Vazquez, V., et al., *Fibrinogen is a ligand for the Staphylococcus aureus microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) bone sialoprotein-binding protein (Bbp)*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(34): p. 29797-29805.
84. Foster, T.J. and M. Höök, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends in microbiology, 1998. **6**(12): p. 484-488.
85. Ponnuraj, K., et al., *A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen*. Cell, 2003. **115**(2): p. 217-228.
86. Davis, S.L., et al., *SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from Staphylococcus epidermidis, targets the thrombin cleavage site in the B β chain*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(30): p. 27799-27805.
87. Bowden, M.G., et al., *Evidence for the "dock, lock, and latch" ligand binding mechanism of the staphylococcal microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) SdrG*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(1): p. 638-647.
88. Hair, P.S., et al., *Staphylococcus aureus clumping factor A binds to complement regulator factor I and increases factor I cleavage of C3b*. Journal of Infectious Diseases, 2008. **198**(1): p. 125-133.
89. Walsh, E.J., et al., *Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of Staphylococcus aureus, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(49): p. 50691-50699.

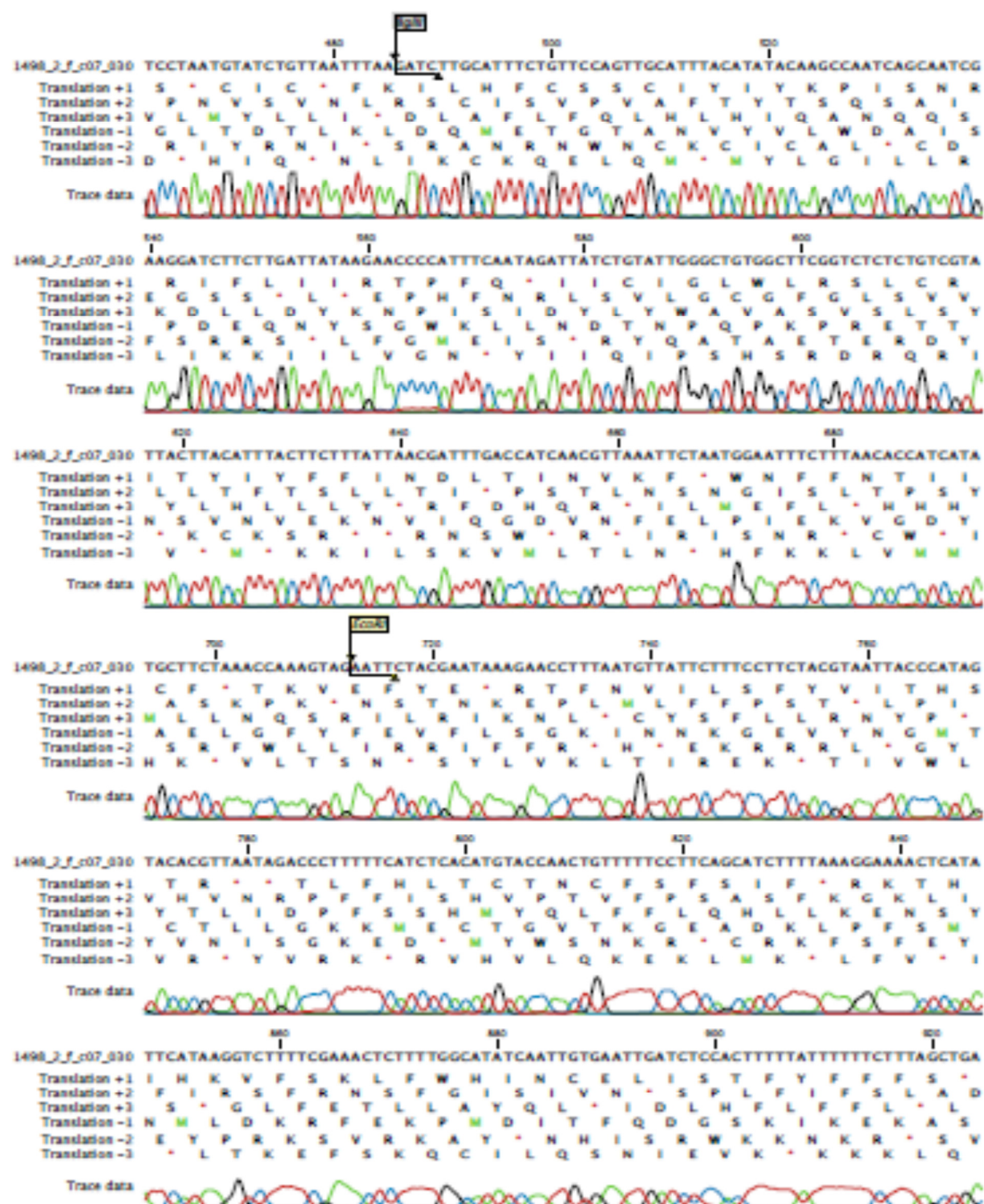
90. Wann, E.R., S. Gurusiddappa, and M. Höök, *The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus Is a Bifunctional Protein That Also Binds to Fibrinogen*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(18): p. 13863-13871.
91. Vengadesan, K. and S.V.L. Narayana, *Structural biology of gram-positive bacterial adhesins*. Protein Science, 2011.
92. Lee, E.R., et al., *Riboswitches that sense cyclic di-GMP in The Second Messenger Cyclic Di-GMP*. A.J. Wolfe and K.L. Visick, Editors. 2010, ASM Press Washington, DC: p. 215-229.
93. Krogstad, V., *Functional analysis of three putative cyclic di-GMP signaling proteins and a potential downstream effector*, in *Faculty of Mathematics and Natural Sciences 2012*, University of Oslo: Oslo.
94. Madigan, M.T., et al., *Population growth in Brock biology of microorganisms*
13th ed. 2012, Pearson: San Francisco. p. 151-154.
95. Madigan, M.T., et al., *Measuring microbial growth in Brock biology of microorganisms*
13th ed. 2012, Pearson: San Francisco. p. 159.
96. Brown, T.A., *Growing and harvesting a bacterial culture in Gene cloning and DNA analysis: an introduction*, 6th ed. 2010, Wiley-Blackwell: UK. p. 27.
97. Qiagen, *RNeasy Mini Handbook*, 2010, www.qiagen.com. p. 10.
98. Brown, T.A., *Measurement of DNA concentration in Gene cloning and DNA analysis: an introduction*, 6th ed. 2010, Wiley-Blackwell: UK. p. 32.
99. Sjøberg, N.O., *Gel elektroforese in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 174-175.
100. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Agarose Gel Electrophoresis in Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001, CSHL press. p. 5.4-5.6.
101. Sjøberg, N.O., *Gel elektroforese in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 175-176.
102. Sjøberg, N.O., *Gel elektroforese in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 175.
103. BioLabs. *Conventional Markers*. 2012; Available from: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productn3014.asp>.
104. Fermentas. *Product Information*. 2012; Available from: http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1033.
105. Sjøberg, N.O., *PCR in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 178-183.
106. Invitrogen. *Random Hexamers (50 µM)*. 2012; Available from: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/N8080127?ICID=search-product>.
107. Sambrook, J. and D.W. Russell, *In Vitro Amplification of DNA by PCR in Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001, CSHL press. p. 8.8-8.9.
108. Brown, T.A., *Real-time PCR enables the amount of starting material to be quantified in Gene cloning and DNA analysis: an introduction*, 6th ed. 2010, Wiley-Blackwell: UK. p. 158-160.
109. Roche. *Product description*. 2012; Available from: http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_5_8_1_1_2.html.
110. Reiter, L., A.-B. Kolstø, and A.P. Piehler, *Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in Bacillus cereus group strains throughout the bacterial life cycle*. *Journal of Microbiological Methods*, 2011. **86**(2): p. 210-217.
111. Sjøberg, N.O., *TOPO-kloning in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 198-199.
112. Invitrogen. *TOPO TA Cloning User Manual*. 2012; Available from: www.invitrogen.com.
113. Sjøberg, N.O., *Plasmidvektorer in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 207-209.

114. Sjøberg, N.O., *Kloning av DNA in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 196.
115. Brown, T.A., *Preparation of competent E.coli cells in Gene cloning and DNA analysis: an introduction*, 6th ed. 2010, Wiley-Blackwell: UK. p. 75.
116. Studier, F.W., *Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system*. *Journal of Molecular Biology*, 1991. **219**(1): p. 37-44.
117. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS in Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001, CSHL press. p. 1.31.
118. Brown, T.A., *Enzymes for cutting DNA-restriction endonucleases in Gene cloning and DNA analysis: an introduction*, 6th ed. 2010, Wiley-Blackwell: UK. p. 51.
119. Sjøberg, N.O., *Restriksjons-enzymmer in Molekylær genetikk, Genteknologi - humant DNA*, 4th ed. 2006, Forlaget Vett & Viten AS: Norway. p. 172-173.
120. Qiagen, *The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*, 2003, www.qiagen.com.
121. Sambrook, J. and D.W. Russell, *SDS-polyacrylamide gel elektroforesis of proteins in Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001, CSHL press. p. A8.40.
122. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Staining SDS-polyacrylamide gels in Molecular cloning: a laboratory manual*. 2001, CSHL press. p. A8.46.
123. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology*, 1990. **215**(3): p. 403-410.
124. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic acids research*, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
125. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic acids research*, 2001. **29**(9): p. e45-e45.
126. Heilmann, C., *Adhesion mechanisms of staphylococci*. *Bacterial Adhesion*, 2011: p. 105-123.
127. Auger, S., et al., *Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the Bacillus cereus group*. *Applied and environmental microbiology*, 2009. **75**(20): p. 6616-6618.
128. Fermentas. *Product description*. 2012; Available from: http://www.finnzymes.fi/pcr/dynazyme2_dna_polymerase.html.

7. Vedlegg

7.1 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i TOPO–vektor i *E.coli* BL21 DE3 (AH1498), biologisk replikat 2 (klon AH1498₂)





1498_2_f_r07_030 CCACCTTCACCTTCTACTTTTCATACCACATCTGAGGCGTTGATACGGTTTCAGATGTCGGTCCATCAGTACGGGAAATATTA

Translation +1 P L H F Y F H T I * G L I R F R C R A I S T G N I N

Translation +2 H F T S T F I P S E A * Y G S D V V P S V R E I L

Translation +3 T T S L L L S Y H L R L D T V Q M S C H Q Y R G K Y *

Translation -1 W K V E V K M G D S A Q Y P E S T T G D Y R S I N I

Translation -2 V E S R S E Y W R L S S V T * I D H W * Y P F F Y *

Translation -3 G S * K * K * V M Q P K I R N L H R A M L V P F I L

Trace data



1498_2_f_r07_030 TTTCGTCACCTGGACTTTTCATCACAGCAGCTTGCATAAAGTGAACCTCTCAAGGGGCAATTCCAGCACACTGGCCG

Translation +1 F V H W T F H H S S L H N W N X S R A N S S T L A

Translation +2 I S S T G L F I T A A C I T G T X Q G R I P A H W R

Translation +3 F R Y * W I R A R Y Q A * L E X L K G F P A T G G

Translation -1 E D V P S K M V A A Q M V P V X * P R I G A C Q R

Translation -2 N R G S S K E D C C S A Y S S X R L P S N W C V P P

Translation -3 K T W Q V K * * L L K C L Q F X E L A F E L V S A A

Trace data



1498_2_f_r07_030 CCGTACTAGTGCATCCGAGCTCGGTACCAAGCCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCATAGTGTGACCTAAATAGCTT

Translation +1 A V T S G S E L G T K L D A * L E Y S I V S P K * L

Translation +2 P L L V D P S S V P S L M H S L S I L * C H L N S L

Translation +3 R Y * W I R A R Y Q A * C I A * V F Y S V T * I A

Translation -1 G N S T S G L E T G L K I C L K L I R Y H * R F L K

Translation -2 R * * H I R A R Y W A Q H M A Q T N * L T V * I A Q

Translation -3 T V L P D S S P V L S S A Y S S Y E I T D G L Y S

Trace data



1498_2_f_r07_030 CCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTYGTGAAATGTATCCGCTCACAAATCCACACACATACGAGCGGAGCATAAA

Translation +1 A * S W S * L F P V * N V S A H N S T H I R A S I K

Translation +2 R N H G H S C F L C E M Y P L T I P H T Y E R A *

Translation +3 C V I M V I A V S C V K C I R S Q F H T H T S E H K

Translation -1 R L * P * L Q K R H S I Y G S V I G C V Y S R A Y L

Translation -2 T I M T M A T E Q T F H I R E C N W V C V L S C L

Translation -3 A Y D H D Y S N G T H F T D A * L E V C M R A L M F

Trace data



1498_2_f_r07_030 GYGTAACTGGGTCCTATGAATGACTACTCMCAATAATGGTGGCTCACTGCCGCTTTCAGYCGGAAGTGRYCTGC

Translation +1 C K L G A Y E * A T X I M R A L T A A S X G T X L

Translation +2 S V S W V P M N E L L X * C V R S L P L Q X E L X C

Translation +3 V * A G C L * M S Y S H N A C A H C R F S R N X X A

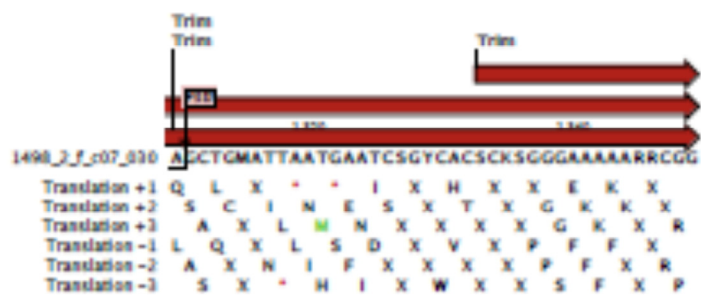
Translation -1 T L Q T G I F S S S X Y H T R E S G S * X S S X X Q

Translation -2 T Y A P H R H I L * E X L A H A * Q R K L R F Q X A

Translation -3 H L S P A * S H A V G M I R A S V A A E X P V X R C

Trace data

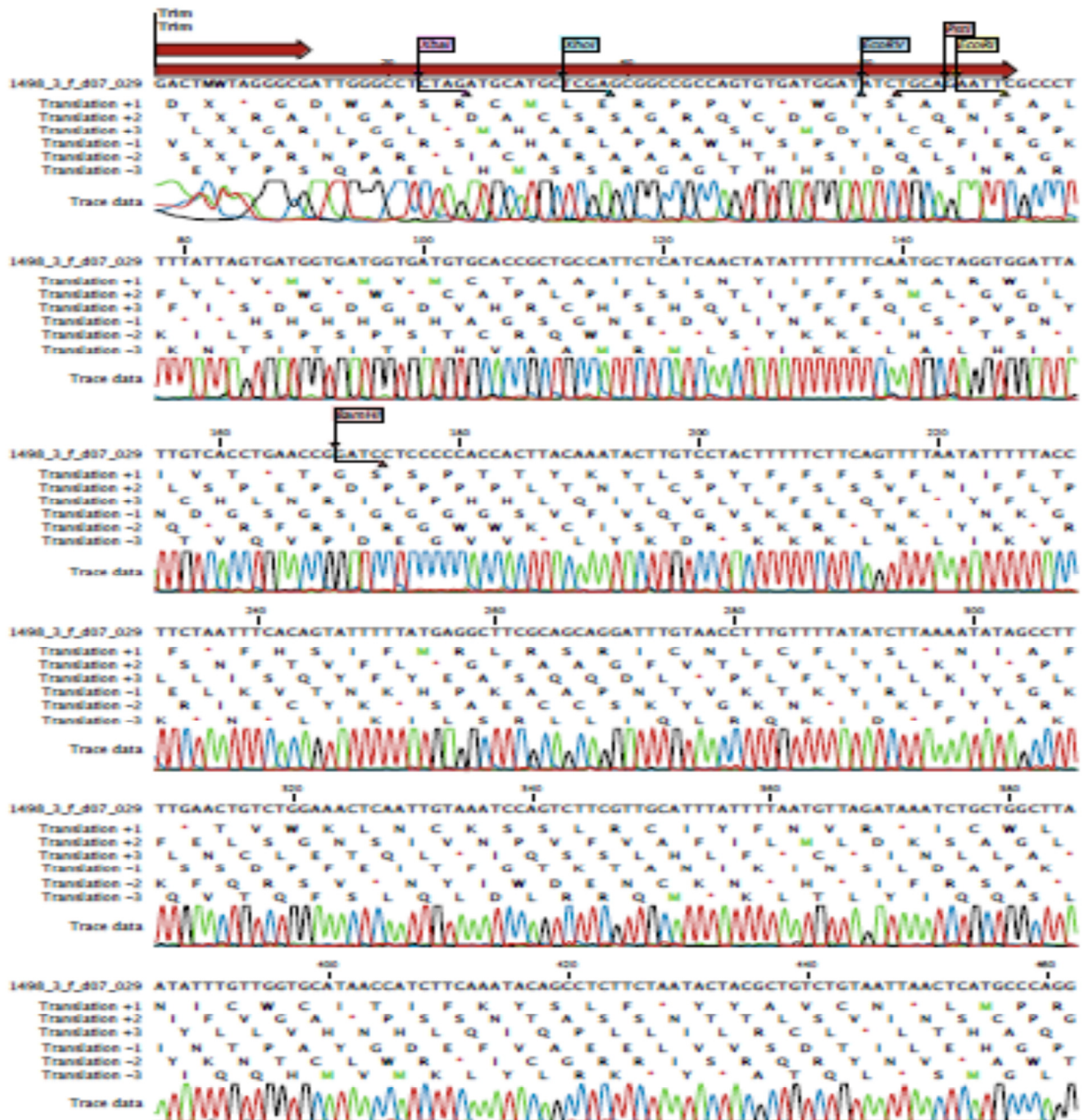


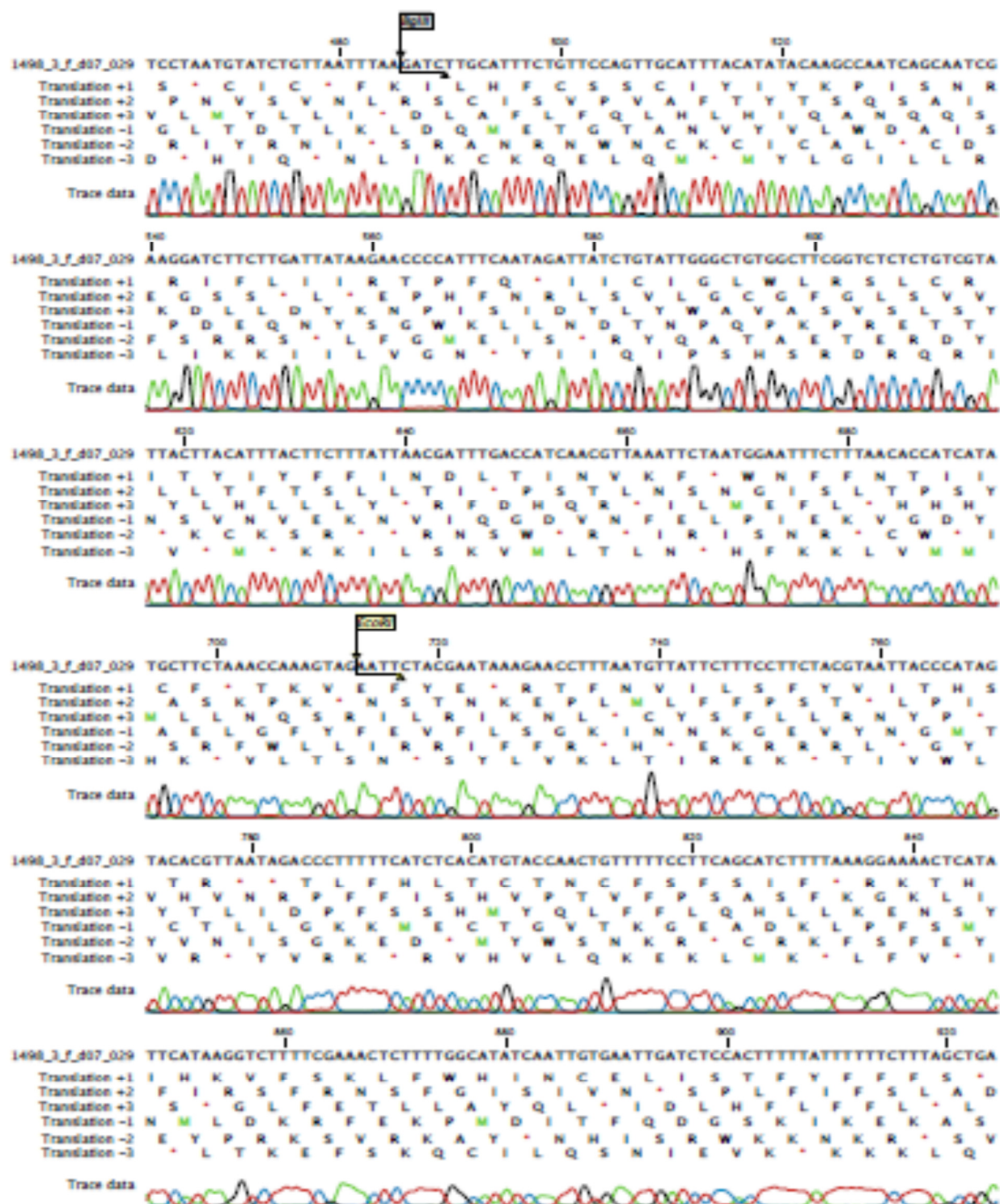


Trace data



7.2 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i TOPO–vektor i *E. coli* BL21 DE3 (AH1498), biologisk replikat 3 (klon AH1498₃)





1498_3_f_d07_029 CCACTTCACTTCTACTTTTCATACCATCTGACGCTTGATACGGTTGAGATGTCGGTCCCATCAGTACGGGAAATATTA

Translation +1 P L H F Y F H T I * R L I R F R C R A I S T G N I N

Translation +2 H F T S T F I P S D A * Y G S D V V P S V R E I L

Translation +3 T T S L L L S Y H L T L D T V Q M S C H Q Y G K Y *

Translation -1 W K V E V K W G D S A Q Y P E S T T G D T R S I N I

Translation -2 V E S R S E Y W R V S S V T * I D H W * Y P F Y *

Translation -3 G S * K * K * V M Q R K I R N L H R A M L V P F I L

Trace data



1498_3_f_d07_029 TTTGGTCCACTGGACTTTTCATCACAGCAGCTTGCATAACTGGAACTCCTCAAGGGCGAATCCAGGCACACTGGCG

Translation +1 F V H W T F H H S S L H N W N L L K G E F Q H T G

Translation +2 I S S T G L F I T A A C I T G T S S R A N S S T L A

Translation +3 F R P L D F S S Q Q L A * L E P P Q G R I P A H W R

Translation -1 E D V P S K W V A A Q W Y P V E E L A F E L V S A

Translation -2 N R G S S K E D C C S A Q Y S S G G * P R I G A C Q R

Translation -3 K T W Q V K * * L L K C L Q F R R L P S N W C V P P

Trace data



1498_3_f_d07_029 GCCGTTACTAGTGCATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCTTAATAGCT

Translation +1 G R Y * W I R A R Y Q A * C I A * V F Y S V X * I A

Translation +2 A V T S G S E L G T K L D A * L E Y S I V S L K * L

Translation +3 P L L V D P S S V P S L M H S L S I L * C X L N S

Translation -1 A T V L P D S S P V L S S A Y S S Y E I T D X L Y S

Translation -2 G N S T S G L E T G L K I C L K L I R Y H G K F L K

Translation -3 R * * H I R A R Y W A Q H M A Q T N * L T X * I A

Trace data



1498_3_f_d07_029 TGGTAATCATCTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAATGTTATCCGCTCACAATCCACACACATACGAGCGGAGCATAAA

Translation +1 C V I I S * L F P V * I V I R S Q S T H I R A S I K

Translation +2 A * S S H S C F L C E L L S A H N P H T Y E R A *

Translation +3 L R N H L I A V S C V N C Y P L T I H T H T S E H K

Translation -1 A Y D D * L Q K R H S N N D A * L G C V Y S R A Y L

Translation -2 R L * R M A T E Q T F Q * G S V I W V C V L S C L

Translation -3 Q T I M E Y S N G T H I T I R E C D V C M R A L M F

Trace data



1498_3_f_d07_029 GTGTAAGCCTGGTGCATGATGACTAACTOMATATGGGTGSCCTCACTGCCGCTTCAGTGGAACTGTTCTGCACTGCG

Translation +1 C K P G A M W Y N S I C V X H C R F S R T V L Q L

Translation +2 S V S L V L * * L T X Y A X L T A A S V E L F C S C

Translation +3 V * A W C Y D D * L X M R X S L P L Q S N C S A A A

Translation -1 T L R T S H H S V G Y A H X V A A E T S S N Q L Q

Translation -2 T Y A Q H * S S * S X I R X E S G S * D F Q E A A A

Translation -3 H L G P A I I V L E X H T X * Q R K L R V T R C S C

Trace data

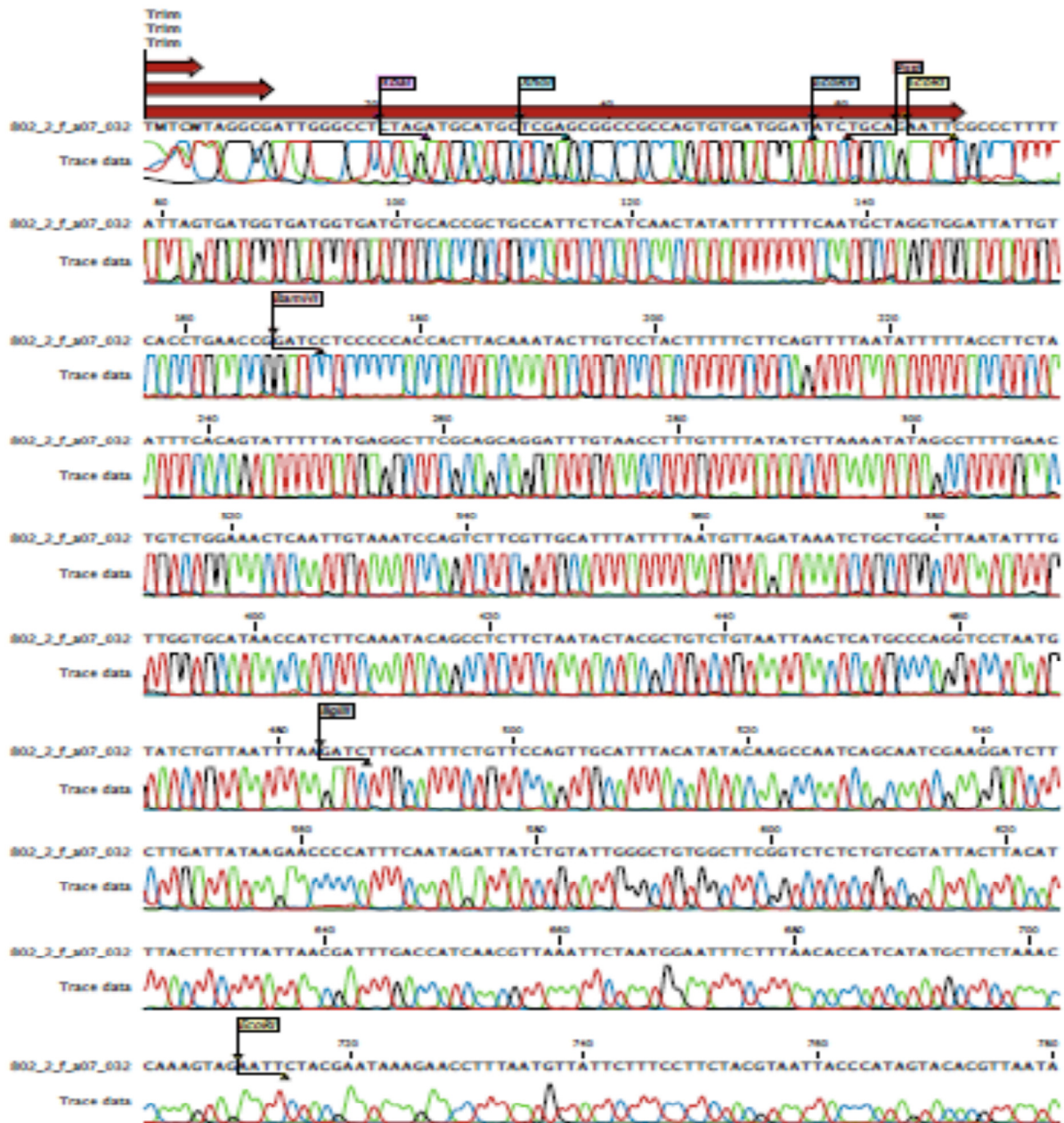


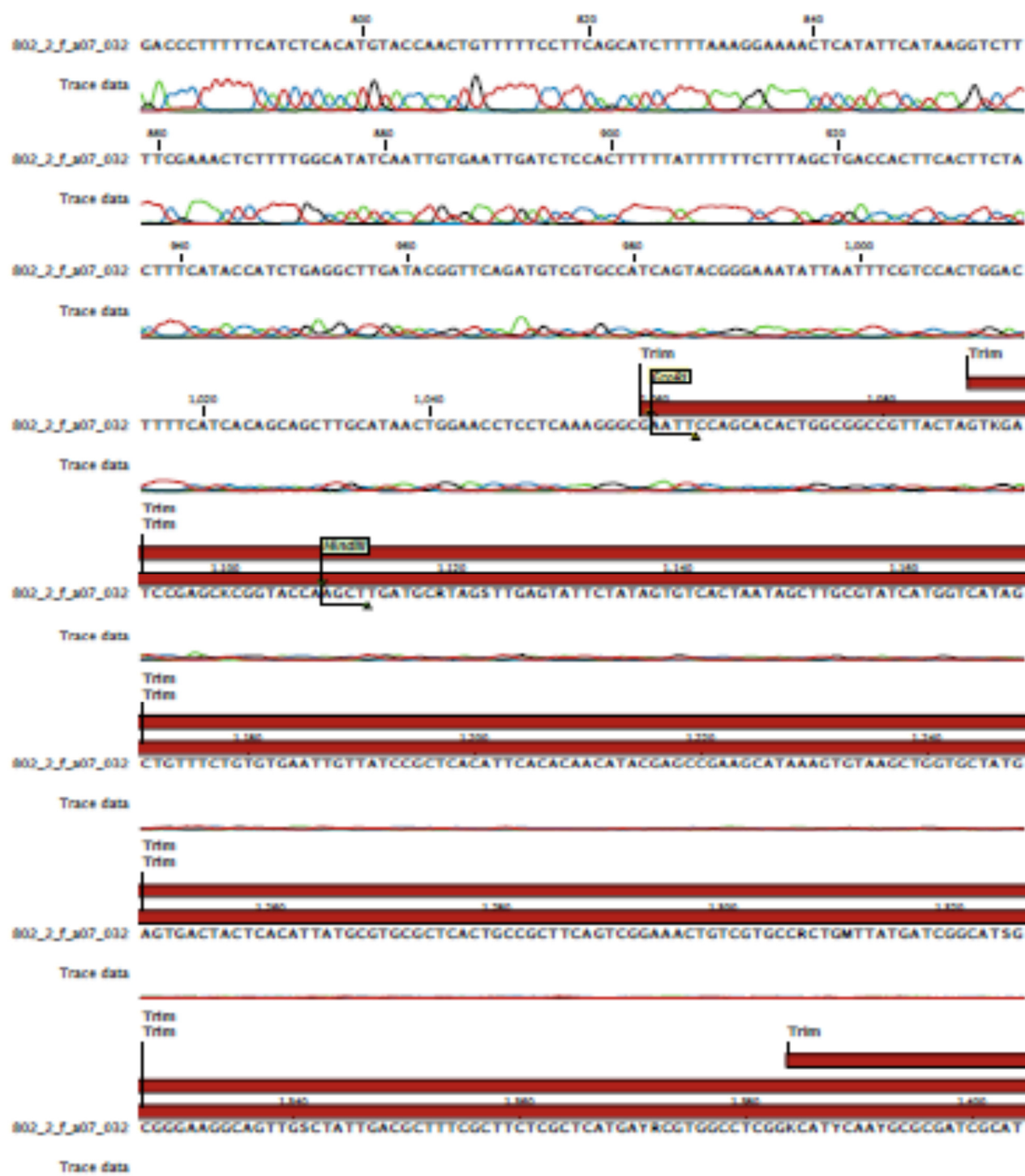
Trim
 Trim

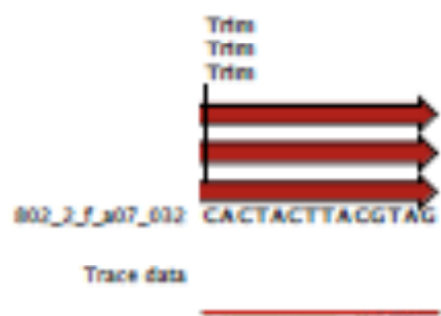
 1498_3_f_407_029 ATAAATGAATCCGC
 Translation +1 H N E S
 Translation +2 I M N R
 Translation +3 * * I G
 Translation -1 M I F R
 Translation -2 Y H I P
 Translation -3 L S D A

Trace data

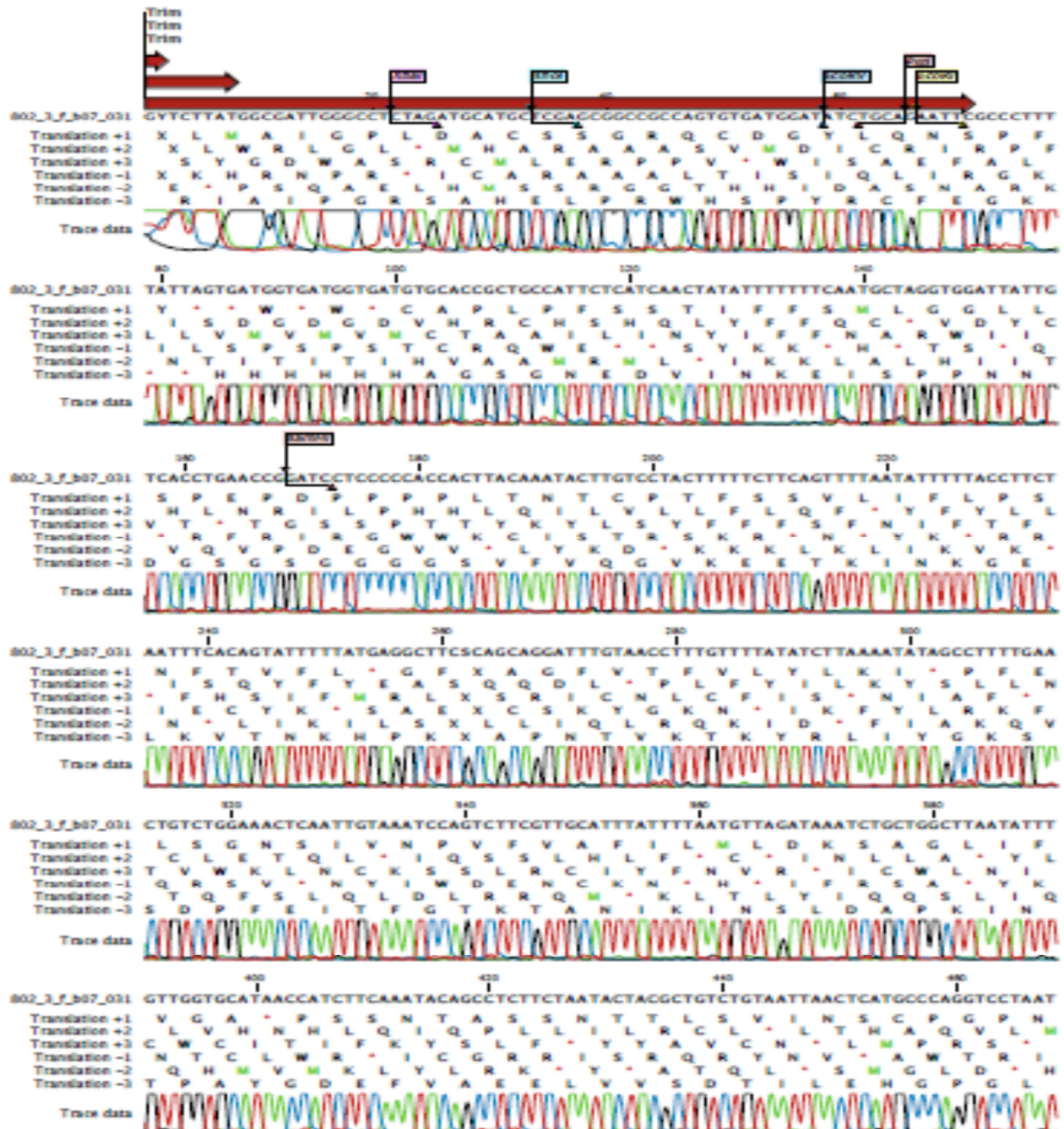

7.3 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i TOPO–vektor i *E. coli* BL21 DE3 (AH802), biologisk replikat 2 (klon AH802₂)

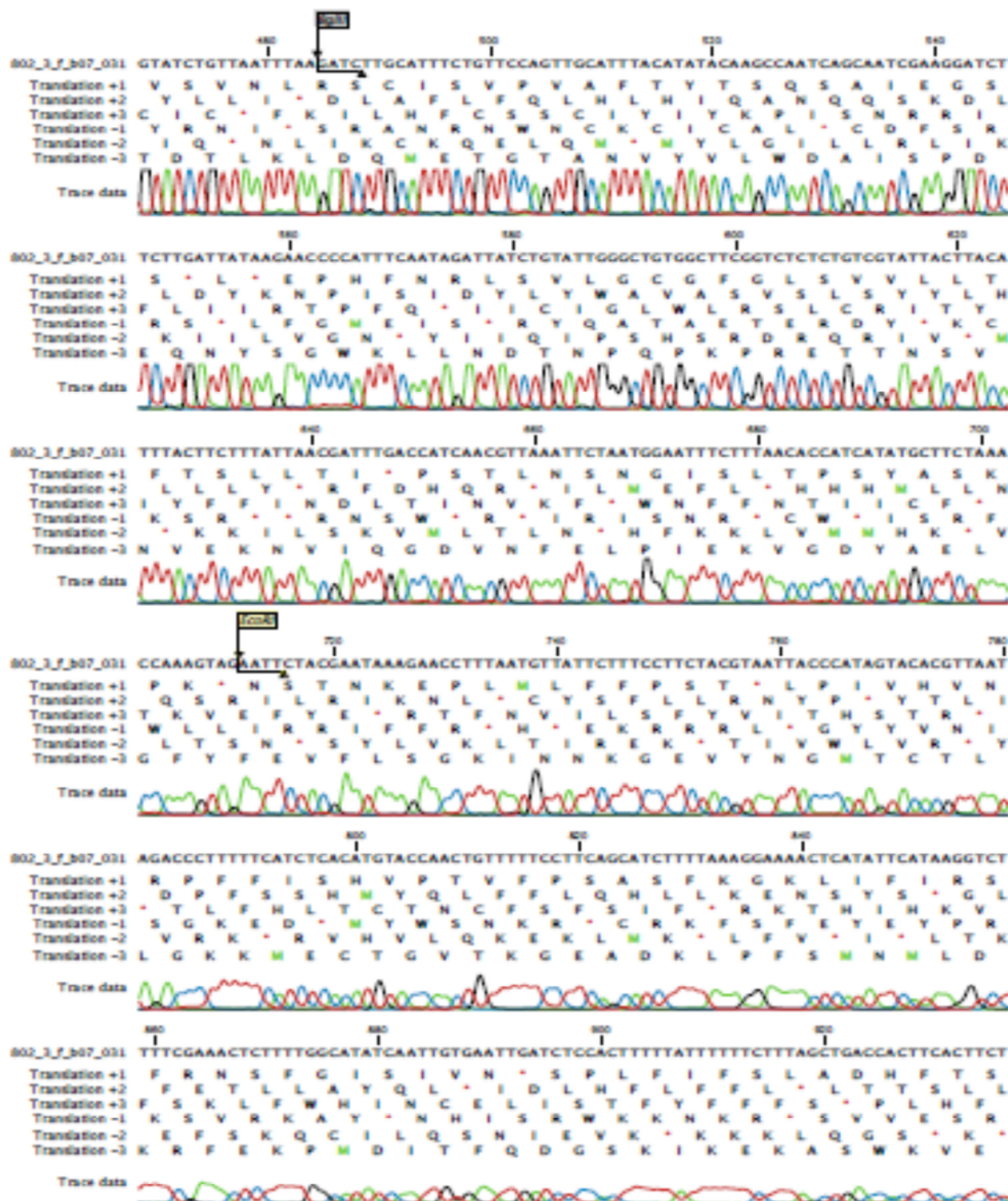






7.4 Nukleotidsekvens av klonet PCR–produkt, BC1060 subdomener N1–N2, klonet i *E.coli* BL21 DE3 (AH802), biologisk replikat 3 (klon AH802₃)





802_3_f_307_031 ACTTTTCATACCATCTGAGGCTTGATACGGTTTCAGATGTCGTGCCATCAGTASGGGAAATATTAATTTTCGTCCTCACTGGA
 Translation +1 T F I P S E A * Y G S D V V P S V X E I L I S S T G
 Translation +2 L S Y H L R L D T V Q M S C H Q Y G K Y * F R P L D
 Translation +3 Y F H T I * G L I R F R C R A I S X G N I N F R V H W
 Translation -1 S E Y W R L S S V T * I D H W * Y P F Y * N R G S S
 Translation -2 K * V M Q P K I R N L H R A M L X P F I L K T W Q V
 Translation -3 V K M G D S A Q Y P E S T T G D T X S I N I E D V P

Trace data



802_3_f_307_031 CTTTTTCATCACAGCAGCTTGCATAACTGGAACTCCTCAAGGGCCGCAATTCAGCACACTGGCGGGCCGTTACTAGTKG
 Translation +1 L F I T A A C I T G T S S K G E F Q H T G G R Y * X
 Translation +2 I R A R Y K L D A * X * V F Y S V T K * L G V S W S
 Translation +3 T F H H S S L H N W N L L K G R I P A H W R P L L V
 Translation -1 K E D C C S A Y S S G G * L A F E L V S A A T V L X
 Translation -2 K * * L L K C L Q F R R L P R I G A C Q R G N S T P
 Translation -3 S K M V A A Q M V P V E E F P S N W C V P P R * * X

Trace data



802_3_f_307_031 SATCCGAGCKCGGTACAGGCTTGATGCRTAGSTTGAGTATTCTATAGTGTCACTAAATAGCTGGCGGTATCATGGTC
 Translation +1 D P S X V Q A * C X X L S I L * C H * I A W R I M V
 Translation +2 I R A R Y K L D A * X * V F Y S V T K * L G V S W S
 Translation +3 G S E X G T S L M X X X E Y S I V S L N S L A Y H G
 Translation -1 I R A R Y L S S A Y X Q T N * L T V L Y S A P T D H D
 Translation -2 D S X P V L K I X L X S Y E I T D S F L K A Y * P *
 Translation -3 S G L X T C A Q H X X X L I R Y H * * I A Q R I M T

Trace data



802_3_f_307_031 ATAGCTGTTTCCTGTGTGAATTGTTATCSCCTCACAATTCACACACATACGAGCCCGGAGCAATAGKGTAAAGGCTGGGG
 Translation +1 I A V S C V N C Y X L T I H T H T S R S I X V R L G
 Translation +2 * L F P V * I V I X S Q F T H I R A G A * X * G W G
 Translation +3 H S C F L C E L L S X H N S H T Y E P E H K X K A G
 Translation -1 Y S N G T H I T I X E C N V C M R A P A Y X Y P Q P
 Translation -2 L Q K R H S N N D X * L E C V Y S G S C L X L A P T
 Translation -3 M A T E Q T F Q * X X V I * V C V L R L M L T L S P

Trace data



802_3_f_307_031 TGCCTATGGAGKAGCTAACTMCATTATGGCGTRGSCYOMCKGCCGCTTCAGTCGGAAACCTGGTCTGRTCRCTGCAT
 Translation +1 C L W X E L T X L W R X X X A A S V G N L V X S L H
 Translation +2 A Y G X S * L H Y G V X X X P L Q S E T W S X X C I
 Translation +3 V P M E G A N X I M A X X X X R F S R K P G L X X A
 Translation -1 A * P X L * S X * P T X X X G S * D S V Q D X R Q M
 Translation -2 G I S X A L E M I A X X X X R K L R F G P R X X A N
 Translation -3 H R H L S S V X N H R X X X A A E T P F F R T Q X S C

Trace data



Title
 Title
 Title

802_3_f_b07_031 TATGAATC SGCCACCYS CGGARAA GCGATTG GAAATTG GGCCTCT YCGCTTCT CKCTACKG ATACTTGC CCGTGGCAGT

Translation +1 Y E S A T X G X A I G N W A S X L L X T D T C P G S
 Translation +2 M N X P P X E K R L E I G P L R F S L X I L A L A V
 Translation +3 L I X H X R X S D W K L G L X A S X Y G Y L P W Q
 Translation -1 I F X G G X S F R N S I P G R R K E X X I S A R A T
 Translation -2 H I X W X R X L S Q F N P R X A E R X Y K G Q C D
 Translation -3 S D A V X P X A I P F Q A E X S R X V S V Q G P L

Trace data

Title
 Title
 Title

802_3_f_b07_031 CCGTGGGCTAAGGAGATY CAGTCTACTTCTACAG

Translation +1 P C G G D I S L L L Q
 Translation +2 R A A K E I S V Y F Y
 Translation +3 S V R L R R Y Q S T S T
 Translation -1 R A A L S I D T K L
 Translation -2 T R S L L Y D V E V
 Translation -3 G H P P S I L R S R C

Trace data

7.5 Gensekvenser av forward og revers primere for referansegener og target-gen BC1060

Tabell 20. Gensekvenser av forward og revers primere for referansegener og target-gen BC1060 (Fagerlund *et al.*, ikke publisert).

Gene name	ATCC14579 locus tag	Bt407 locus tag	Forward primer		Reverse primer		E
			Designation	Sequence 5' to 3'	Designation	Sequence 5' to 3'	
gatB/Yqey	BC_4306	bthur0002_41620	gatB_left	agctggtcgtgaagacctg	gatB_right	cggcataacagcagtcacatca	1,93
rpsU	BC_4307	bthur0002_41630	rpsU_left	aagatcggtttctaaaactggtaca	rpsU_right	tttcttgccgcttca gattt	1,87
udp	BC_5201	bthur0002_50610	udp_left	actagagaaacttggaatgatcg	udp_right	gacgcttaattgc acggaac	1,85
BC1060	BC_1060		02561-BC1060-F3	atgtaacaggggacggcata	02561-BC1060-R3	tactgccccggttt ctttgt	1,95