

Karakterisering av gener som påvirker biosyntesen av alginat i *Pseudomonas fluorescens*

Eirik Selsaas

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Svein Valla, IBT

Biveileder(e): Helga Ertesvåg, IBT

Takk til

Dette studiet ble utført ved Institutt for bioteknologi, med Professor Svein Valla og Dr. Scient. Helga Ertesvåg som veiledere. Denne oppgaven er resultatet av en 5-årig mastergrad i bioteknologi på NTNU.

Først ønsker jeg å takke Helga som gjennom hele perioden har vært tilgjengelig for spørsmål, og for å være usedvanlig rask til å svare på e-post. Jeg vil også takke henne for å dele kunnskap og ekspertise i gode diskusjoner vi har hatt gjennom denne perioden.

Jeg vil også takke familien min, som alltid har støttet meg og vist interesse for mitt fagfelt. Mine medstudenter fortjener også en takk for samarbeid, konstruktive diskusjoner, og for å le av vitsene mine i lunsjpausene.

Mest av alt vil jeg takke Ida Anette som har gjort hverdagen enda bedre under hele studiet her på NTNU. Siden vi begge har jobbet med masteroppgave den siste tiden, har det vært godt å ha en som forstår hvordan det er å være i “mastermodus”, og at vi har kunnet støtte, oppmuntre og hjelpe hverandre i denne perioden.

Sammendrag

Pseudomonas fluorescens har evne til å produsere store store mengder alginat. Tidligere er det laget en stamme, *P. fluorescens* SBW25 MS1 Δ algC::TnKb61, hvor *algD*-operonet og *algC* er satt under kontroll av Pm-promotor. Dette gjør at den produserer alginat ved tilsats av m-toluensyre. Denne stammene har blitt mutert med transposon og effekten på alginatproduksjonen har blitt undersøkt. Ved transposonmutagenese ble det funnet 180 mutanter med endret alginatproduksjon, og insersjonspunktet for transposonet ble identifisert.

I to av disse mutantene var henholdsvis genene *clpA* og *PFLU3927* inaktivert. *clpA* er en Clp-protease, mens *PFLU3927* er en protease som tilhører lon-proteasefamilien. I denne oppgaven skulle disse genenes rolle i biosyntesen av alginat verifiseres. For å gjøre dette ble mutantene komplementert ved å sette inn villtypevarianten av genet inn i mutantene. Innføringen av genet ble gjort ved bruk av transposon.

Siden *algD*-operonet var satt under kontroll av Pm-promotoren i stammen som ble benyttet, skal denne stammen være uavhengig av sigmafaktoren AlgU, som normalt er nødvendig for ekspresjon av *algD*-operonet. For å teste om stammen virkelig var uavhengig av AlgU, ble det laget en mutant hvor AlgU ble inaktivert. Dette ble gjort ved å fjerne en del i *algU* ved bruk av PCR. Videre ble villtypegenet erstattet med delesjonsgenet i *P. fluorescens*. Dette ble gjort ved bruk av homolog rekombinering.

For å se hvilken effekt genene hadde på alginatproduksjonen, ble det målt alginatproduksjon i transposonmutantene og i de komplementerte stammene som ble laget i dette arbeidet. Alginatmålingene gikk ikke som ventet, da det ikke kunne registreres alginat i de positive kontrollene. Det var kun to stammer hvor det ble registrert alginatproduksjon, 3001 *clpA* og 3001 *clpA*::TnES4. Dette forsøket ble utført gjentatte ganger, men med samme resultat.

Det er foreslått at forskjellen i alginatproduksjon mellom mediene PIM og DEF3 i tidligere forsøk på *clpA* kan komme av forskjeller i fosfatmengde og/eller peptonmengde i mediene. Det er også foreslått at *PFLU3927* kan være et varmesjokkprotein og at proteinaktiviteten kan økes av ulike former for stress, og videre at dette kan føre til at alginatproduksjonen endres som følge av det.

Innhold

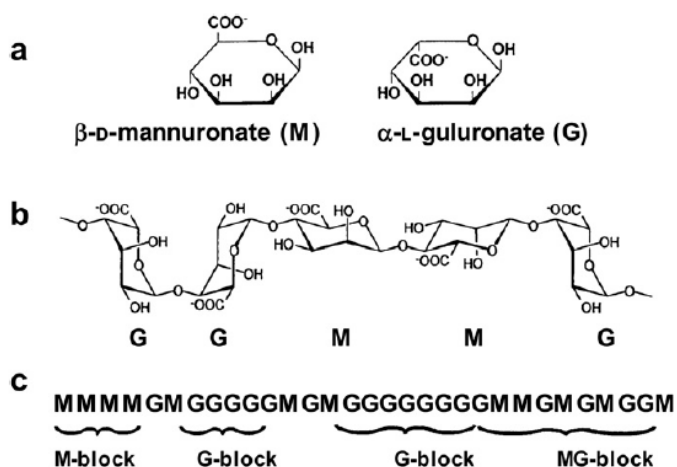
1	Introduksjon	1
1.1	Alginat	1
1.2	Bruksområder for alginat.....	2
1.3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3
1.4	Biosyntese av alginat i <i>P. fluorescens</i>	4
1.5	Motiv for oppgaven	8
1.6	Gener som påvirker biosyntesen av alginat	9
1.6.1	<i>algU</i>	9
1.6.2	<i>PFLU3927</i>	10
1.6.3	<i>clpA</i>	12
2	Metoder	15
2.1	Medier og løsninger.....	15
2.1.1	Psi-medium.....	15
2.1.2	TFB1.....	15
2.1.3	TFB2.....	15
2.1.4	SOC-medium.....	16
2.1.5	Luria broth(LB)	16
2.1.6	Luria agar(LA)	16
2.1.7	Loading dye	16
2.1.8	<i>Pseudomonas</i> isoleringsagar (PIA)	16
2.1.9	<i>Pseudomonas</i> isoleringsmedium (PIM)	17
2.1.10	50 X TAE-buffer	17
2.2	Bakteriestammer og plasmid brukt i oppgaven	18
2.3	Polymerase Chain Reaction.....	20
2.4	Isolering av høykopitallsplasmid.....	22
2.5	Isolering av lavkopitallsplasmid.....	23

2.6	Kjemisk transformering av <i>Escherichia coli</i>	23
2.7	Agarose Gelelektroforese	25
2.8	Restriksjonskutting	25
2.9	Sekvensering.....	27
2.10	Konjugering	28
2.10.1	Konjugering for å overføre transposon	28
2.10.2	Homolog rekombinering	30
2.11	Isolering av G-lyase.....	31
2.12	Alginatmåling	32
3	Resultater	34
3.1	Isolering av G-lyase.....	34
3.2	Komplementering av <i>clpA</i>	35
3.3	Komplementering av <i>PFLU3927</i>	39
3.4	Delesjon av <i>algU</i>	43
3.5	Måling av alginatproduksjon	49
4	Diskusjon	54
5	Konklusjon.....	61
	Kilder.....	62
Vedlegg A	DNA-standarder	1
Vedlegg B	Sekvensdata	2
Vedlegg C	Primere	12
Vedlegg D	Plasmidkart.....	13
Vedlegg E	Isolering av G-lyase	16
Vedlegg F	Rådata fra alginatmålinger	19

1 Introduksjon

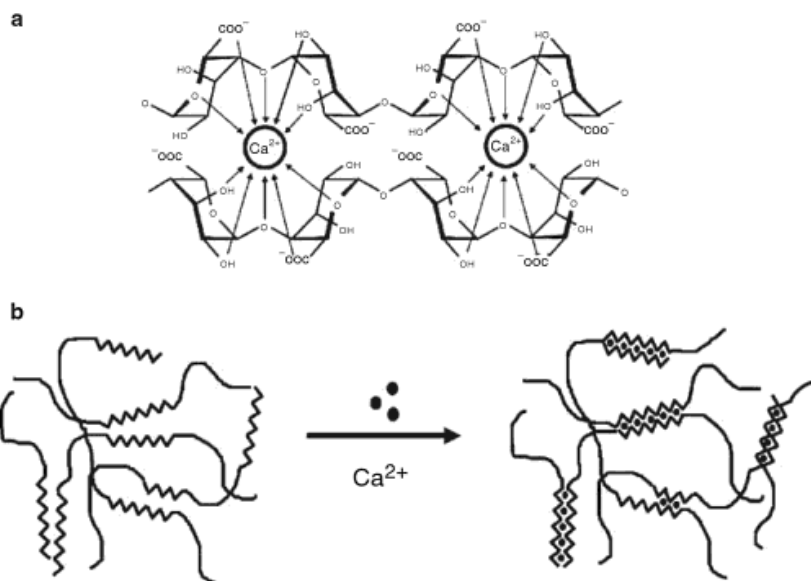
1.1 Alginat

Alginat er en lineær kopolymer som består av 1,4-bundet β -D-mannuronsyre (M) og α -L-guluronsyre (G) (Figur 1.1). β -D-mannuronsyre og α -L-guluronsyre er C-5 epimerer av hverandre. Alginat finnes som strukturdannende komponent i celleveggen hos marine brunalger, og skilles i tillegg ut av enkelte *Pseudomonas sp.* og *Azotobacter sp.*. Monomerene i alginat er ikke tilfeldig fordelt, men finnes som blokker i polymeren (Figur 1.1-c) (Draget og Taylor, 2011). Bakterielt alginat er O-acetylt i 2- og/eller 3-posisjon, noe som ikke er funnet i alginat fra marine alger (Rehm, 2009). Bakterielt alginat fra *Pseudomonader* skiller seg fra alginat fra *Azotobacter sp.* ved å mangle G-blokker (Skjåk-Bræk *et al.*, 1986). Felles for all syntese av alginat er at det først syntetiseres som mannuronsyre, mens guluronsyre-monomerer blir dannet av mannuron C-5-epimeraser senere i syntesen (Valla *et al.*, 2001)



Figur 1.1: Oppbygningen til alginat; a) monomerene i alginat. b) polymerens konformasjon. c) de ulike blokkene av monomerer (Draget og Taylor, 2011)

Alginat er et polyanion ved fysiologisk pH. Alginsyre, som er protonert alginat, er uløselig i vann, men de fleste monovalente kationer gir vannløselige alginater. G-blokker gir alginatet evne til å danne gel sammen med multivalente kationer. Høyere innhold av G-blokker gir sterkere geler. Årsaken til dette er at multivalente kationer katalyserer assosiasjoner mellom G-blokker i par av enkeltkjeder, og stabiliserer disse assosiasjonene (Figur 1.2). Dette er kjent som eggekartong-modellen (Smidsrød og Moe, 1995). Alginat med høyt G-innhold kan utvinnes fra stivt algevev, som for eksempel stilk fra stortare (*Laminaria hyperborea*) (Draget og Taylor, 2011).



Figur 1.2: Assosiasjon mellom multivalente kation og alginat (eggekartong-modellen). a) assosiasjon mellom par av G-blokker. b) assosiasjon mellom kjeder som resulterer i geldannelse (Rehm, 2009).

1.2 Bruksområder for alginat

Bruksområdene for alginat er mange og diverse. Alginatets viskositetsøkende, stabiliserende og geldannende egenskaper, samt evne til å holde på vann, er det som danner grunnlaget for de fleste bruksområdene til alginat. Alginatets skjær-tynnende egenskaper gjør at det ofte blir brukt til tekstil-trykk. Et annet stort bruksområde for alginat er som tilsetning i mat. Til bruk i mat er det de geldannende og viskositetsøkende egenskapene som er essensielle, da det ofte brukes til å lage restrukturert mat (dyrefôr, løkringer, paprika i oliven etc.), samt som viskositetsdanner i syltetøy og gelé (Rehm, 2009).

Innenfor farmasøytisk industri finnes det flere applikasjoner for alginat. De tradisjonelle bruksområdene innen medisin er som komponent i tannavtrykksmaterialer, i kapsler som gir sakte frigivelse av medisin, i sårbandasjer, og i noen anti-refluks medisiner (f.eks. Gaviscon). I tillegg til de tradisjonelle bruksområdene finnes det også flere potensielle bruksområder som ikke er fullt utnyttet i dag (Draget og Taylor, 2011).

En av disse mulighetene er å bruke alginat til immobilisering av celler. Dette brukes i dag til å forbedre produksjonen i klassiske bioprosesser, f.eks. produksjon av etanol og antibiotika. Den kanskje mest spennende muligheten for alginat-immobiliserte celler, er å kunne bruke de til transplantasjon av celler. Alginat med høyt innhold av G-blokker virker da som en barriere

mot vertens immunforsvar (Draget og Taylor, 2011). Alginat med høyt M-innhold er immunstimulerende, noe som er en uønsket egenskap når alginatet skal brukes til transplantasjon av celler. På en annen side åpner de immunstimulerende egenskapene for andre applikasjoner. Immunstimulerende alginat brukes i dag blant annet som tilsetning i fiskefôr for å minske behovet for antibiotika (www.biomar.com).

Det er vist at oligomerer av guluronsyre modifiserer strukturen i mucin-nettverk og at de kan bryte opp mucus i lungene hos pasienter som lider av cystisk fibrose (CF). G-blokkene virker ved å interagere med interaksjonspunkter mellom mucin og andre makromolekylære komponenter i mucus. G-blokkenes ikke-immunstimulerende egenskap er også viktig for å bruke dem til dette formålet (Draget og Taylor, 2011). Kliniske forsøk på mennesker er ferdig med fase 1 for et slikt medikament (www.algipharma.com).

De nyere bruksområdene for alginat som er forklart her krever ikke bare mer utredning for å kunne komme ut på markedet, de krever også mer av alginatet. For at de nye bruksområdene skal kunne realiseres er det behov for å vite mer om lengde, blokkfordeling og renhet av alginatet som skal brukes. Dagens kommersielt tilgjengelige alginat fra alger oppfyller ikke disse kravene godt nok. Det kreves ofte mye nedstrøms-prosessering for å fjerne kontaminanter, og sammensetningen av alginatet er ofte for variabel. Dette åpner for kommersiell produksjon av bakterielt alginat, da bakterier har stort potensial til å kunne produsere alginater med høy grad av renhet og med funksjonelle egenskaper som per i dag ikke finnes. Dette betyr at selv om bakteriell produksjon av alginat ikke er lønnsomt nok i dag, kan de bli det i fremtiden som følge av det økende behovet for “skreddersydde” alginater (Rehm, 2009).

1.3 *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens er en gammaproteobakterie som finnes i terrestriske habitater. Den er stavformet, gram-negativ, ikke-fermentativ, har multiple polare flageller, og bruker Entner-Doudoroff-spolet til å metabolisere glukose (Madigan og Martinko, 2006). *P. fluorescens* trives ved temperaturer fra 0 - 32 °C. Selv om bakterien normalt ikke vokser ved høyere temperaturer, og derfor normalt ikke er patogen for varmblodige organismer, er det funnet stammer som kan vokse ved 37 °C i noen tilfeller av sykehusfremkalte sykdommer (Bodilis *et al.*, 2004).

Genomet i *P. fluorescens* har høy grad av diversitet mellom de ulike stammene som hittil har blitt sekvensert. Bare 61 % av genene deles av de tre stammene SBW25, Pf0-I og Pf-5. Den største graden av likhet finnes i området hvor replikasjonen starter, mens diversiteten mellom stammene øker mot termineringspunktet. Den store diversiteten i *P. fluorescens* skiller seg fra andre arter av *Pseudomonas*. I *Pseudomonas aeruginosa* viser de ulike stammene som er sekvensert stor grad av innbyrdes likhet. Dette kan imidlertid komme av et skjevt utvalg som ble skapt av at *P. aeruginosa* som har blitt sekvensert, utelukkende er isolert fra kliniske isolater. Gitt at dette er tilfellet, kan diversiteten hos *P. fluorescens* samsvare med diversiteten innen slekten *Pseudomonas*. På den andre siden er diversiteten som er vist i de ulike isolatene av *P. fluorescens* så stor at det kan tenkes at de ikke tilhører samme art, men dette er noe som kreves mer utredning for å fastslå (Silby *et al.*, 2009).

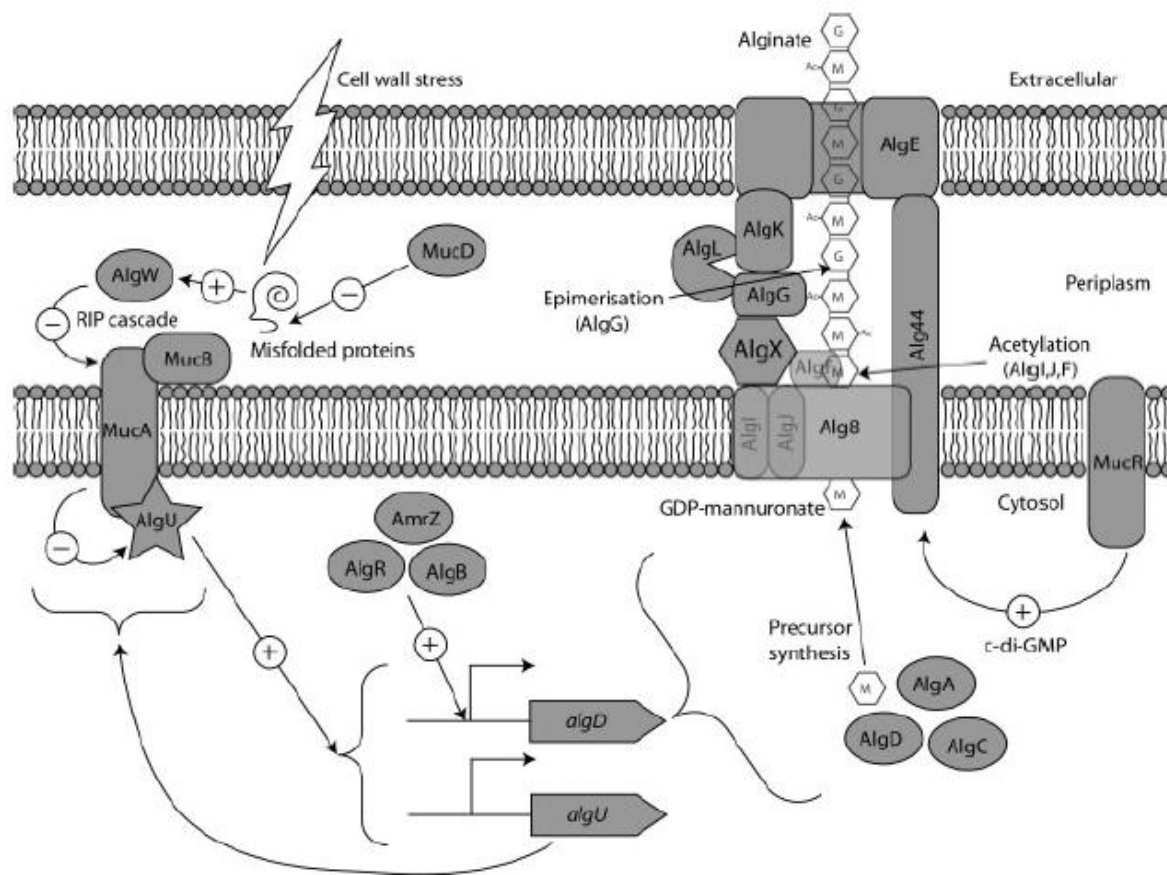
Genomet hos *P. fluorescens* SBW25 er på 6 722 539 bp og inneholder 6 009 kodende sekvenser. Det inneholder mange repeterte DNA-sekvenser og mange av disse ligner små invertert-repeterte transposable elementer. Stammen SBW25 skiller seg fra de andre stammene som er sekvenserte ved at den inneholder større områder der man ikke finner repeterte DNA-sekvenser, såkalte ørkener. Disse ørkenene kan skyldes det at disse områdene inneholder essensielle gener, noe som gjerne fører til en renhetsskapende seleksjon. En annen forklaring som heller ikke utelukker den foregående er at disse fragmentene kan ha blitt overført fra en organisme med liten grad av repeterte DNA-sekvenser (Silby *et al.*, 2009).

P. fluorescens kan bruke og omdanne mange ulike organiske stoffer. Det er vist at noen stammer (SBW25 og Pf-5) virker positivt på helse og ernæring hos planter (de Bruijn *et al.*, 2007; Rodriguez og Pfender, 1997). Stammen som ble brukt i denne oppgaven (SBW25) ble først isolert i 1989 fra et sukkerroeblad ved Oxford i Storbritannia (Rainey og Bailey, 1996).

1.4 Biosyntese av alginat i *P. fluorescens*

P. fluorescens er en av flere bakterier der det er påvist produksjon av alginat. Andre mye brukte bakterier for studie og produksjon av alginat er *Azotobacter vinelandii* og *P. aeruginosa* (Hay *et al.*, 2010). En fordel ved å studere og bruke *P. fluorescens* fremfor *P. aeruginosa* er at den generelt ikke er patogen for varmblodige dyr (Madigan og Martinko, 2006). *P. fluorescens* er nært beslektet med *P. aeruginosa*, og biosyntesen av alginat er derfor veldig lik i disse organismene. Det er likevel mulig at reguleringen av syntesen er noe ulik i de ulike *Pseudomonas*-stammene. Det er f.eks. vist at AlgR ikke regulerer *algD*-operonet i *P. syringae*, noe den gjør i *P. aeruginosa* (Wozniak og Ohman, 1994). Inntil videre kan likevel

Figur 1.3, som viser en oversikt over alginatsyntesen i *P. aeruginosa*, brukes som en modell over alginatsyntesen i *P. fluorescens*. En oversikt over de viktigste genene som påvirker alginatsyntese og genproduktenes funksjon er gitt i Tabell 1.1.



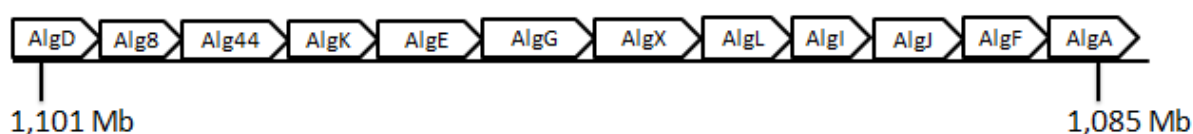
Figur 1.3: Oversikt over alginatsyntesen i *P. aeruginosa* (Hay et al., 2010). Nye studier av Keiski *et al.* viser at AlgK er et lipoprotein som er bundet til den ytre membranen og som sammen med AlgE og sannsynligvis Alg44 og kanskje Alg8 tilrettelegger for transport av alginat gjennom det periplasmiske rommet (Keiski *et al.*, 2010). Med dette tatt i betraktning, skulle nok AlgK hatt en tydeligere forbindelse til Alg44 og Alg8 i figuren.

Tabell 1.1: Oversikt over gener og genproduktenes funksjon eller antatte funksjon i biosyntese av alginat (Hay *et al.*, 2010)

Gen	Genprodukt
AlgD	GDP-mannose-dehydrogenase involvert i syntese av mannuronsyremonomerer
Alg8	Glykosyltransferase/polymerase involvert i transport av GDP-mannuronsyre over plasmamembranen
Alg44	c-di-GMP-bindende regulering. Involvert i periplasmisk bro for transport av alginat
AlgK	Involvert i periplasmisk bro for transport av alginat
AlgE	Porin i ytre membran. Transport av alginat ut av ytre membran
AlgX	Periplasmisk protein med ukjent funksjon/bro/hindrer MucD
AlgL	Alginat lyase
AlgI	O-acetylering
AlgJ	O-acetylering
AlgF	O-acetylering
AlgA	Fosfomannose isomerase/GDP mannose pyrofosforylase (Syntese av mannuronsyremonomerer)
AlgB	Positiv regulator av <i>algD</i> -operon
AlgC	Fosfomannomutase. Syntese av mannuronsyremonomerer
AlgR	Responsregulator som positivt regulerer <i>algD</i> -operon i <i>P. aeruginosa</i> .
AmrZ	Arc-lignende DNA-bindende protein. Positiv regulator av <i>algD</i> -operon
AlgU	Sigma-faktor som positivt regulerer transkripsjon fra <i>algD</i> -promotor
MucA	Anti-sigma-faktor for AlgU
MucB	Anti-sigma-faktor for AlgU
MucC	Regulator med ukjent mekanisme
MucD	Protease med homologi til serin-protease DegP i <i>E. coli</i> . Negativ regulator av AlgU
AlgW	Protease med homologi til serin-protease DegS i <i>E. coli</i> . Positiv regulator av AlgU
MucR	Alginatspesifikk diguanylat syklase

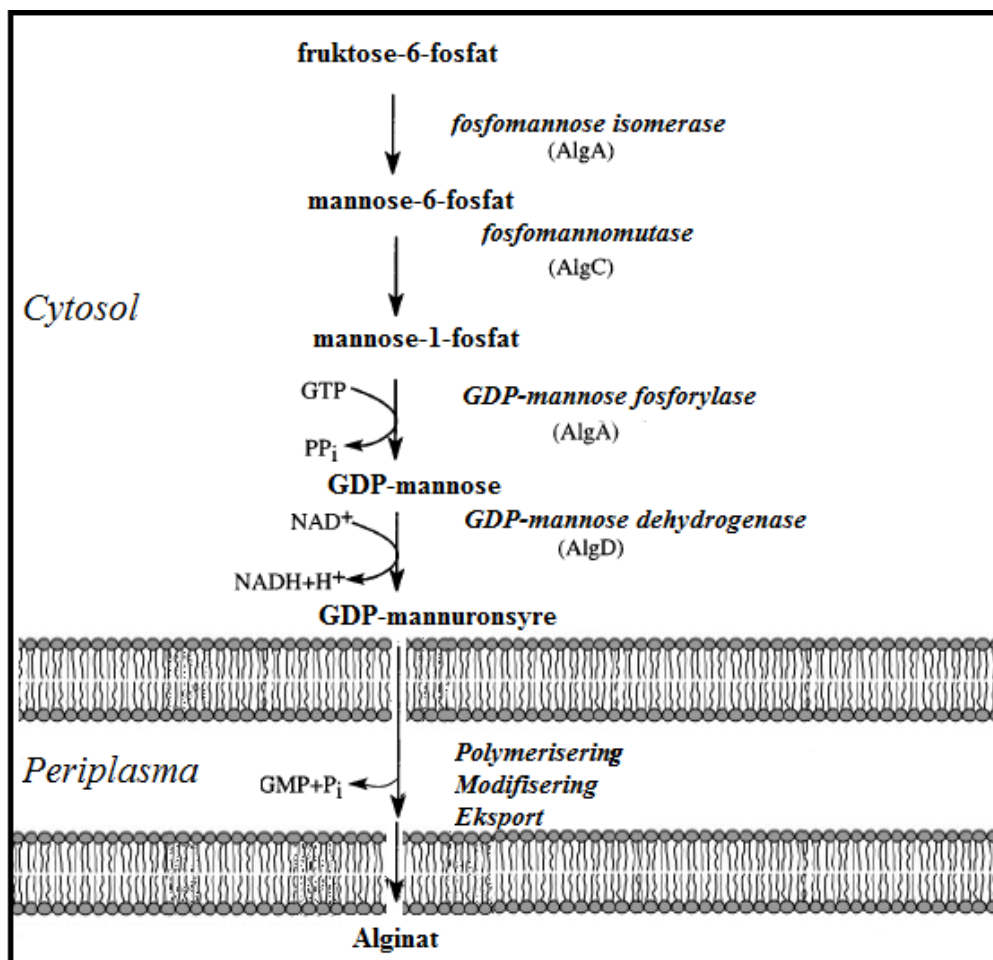
Reguleringen av alginatsyntesen *Pseudomonas* er kompleks og foregår både på transkripsjonsnivå og post-translasjonsnivå. I tillegg har noen regioner i genomet hos *P. aeruginosa* meget høy mutasjonsrate, noe som i mange tilfeller aktiverer alginatproduksjon. Den viktigste faktoren som påvirker alginatsyntesen, er transkripsjonsraten fra *algD*-promotoren som styrer ekspresjonen av *algD*-operonet. Transkripsjonen av operonet styres av AlgU/MucA-balansen som er forklart i 1.6.1. Reguleringen av *algD*-operonet har høy grad av likhet med et operon som er sentralt i stress-respons hos *E. coli*. I *E. coli* reguleres operonet positivt når bakterien utsettes for stress som fører til misfoldinger i proteiner ved en regulert intramembran-proteolyse (RIP). Mye tyder på at reguleringen i *Pseudomonas* virker på samme måte, da alginatproduksjonen blir induisert av ulike typer stress (temperatur, tørke, osmotisk ubalanse etc.) (Hay *et al.*, 2010).

Til nå er det funnet minst 24 gener som er direkte involvert i alginatsyntesen i *P. aeruginosa*. Flere av disse, og deres funksjon er presentert i Tabell 1.1. 12 av disse genene er samlet i operonet *algD*. *algD*-operonet i stammen SBW25 er vist i Figur 1.4.



Figur 1.4: *algD*-operonet i *P. fluorescens* SBW25

Biosyntesen av alginat i *Pseudomonas* skjer ved at fruktose-6-fosfat omdannes til alginat ved en rekke trinn som vist i Figur 1.5. Alle genproduktene som deltar direkte i dette sporet stammer fra *algD*-operonet, unntatt AlgC.



Figur 1.5: Syntese av alginat fra fruktose-6-fosfat i *Pseudomonas*

1.5 Motiv for oppgaven

P. fluorescens har evne til å produsere store mengder alginat. Tidligere er det laget en stamme (SBW25 MS), hvor *algD*-operonet og *algC* er satt under kontroll av Pm-promotoren. Dette gjør at den produserer alginat i nærvær av en inducer (m-toluensyre). Denne stammen har blitt mutagenisert med et transposon, og det ble funnet over 180 mutanter med endret alginatproduksjon. I disse mutantene ble insersjonspunktet funnet, slik at man vet hvilke gener som har blitt inaktivert.

To av genene som ble funnet på denne måten er *clpA* og *PFLU3927*. For å verifisere at den endrede alginatproduksjonen skyldes inaktivering av genene, kan genene komplementeres. Komplementering er nødvendig for å kunne være sikker på at det ikke var andre faktorer som førte til fenotypen.

For å se på effekten av å overprodusere genene som skal undersøkes, kan man sette inn en ekstra kopi av genet i en stamme hvor genet ikke har blitt inaktivert. Dette skal gjøres på en mukoid *mucA*⁻-stamme hvor *algC* er satt under kontroll av Pm-promotor.

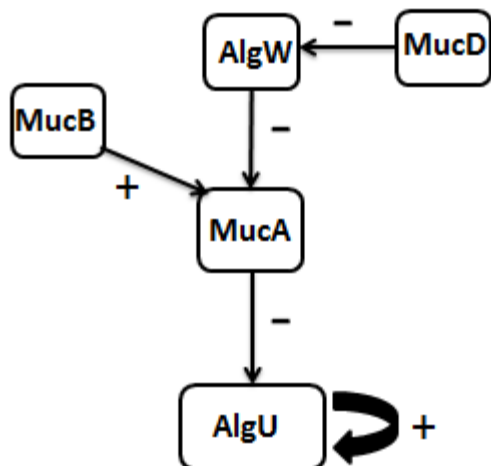
Siden *algD*-operonet er satt under kontroll av Pm-promotoren, skal alginatproduksjonen i MS-stammen være uavhengig av AlgU. Siden AlgU er en sigmafaktor som kan regulere mer enn *algD*-operonet, skal *algU* inaktiveres for å se om dette har effekt på alginatproduksjonen. Dersom det viser seg at inaktivering av *algU* endrer alginatproduksjonen, vil det si at AlgU regulerer alginatproduksjonen på flere måter enn å regulere transkripsjonen fra *algD*-promotoren.

1.6 Gener som påvirker biosyntesen av alginat

Som forklart i 1.5 er genene *PFLU3927* og *clpA* sin rolle for alginatproduksjonen i *P. fluorescens* undersøkt i denne oppgaven. Det er også undersøkt om en stamme (*P. fluorescens* SBW25 MS), hvor transkripsjonen av *algD*-operonet er underlagt Pm-promotoren, er uavhengig av sigma-faktoren AlgU for produksjon av alginat. Videre følger teori om disse genene og det som er kjent om deres rolle i syntese av alginat.

1.6.1 *algU*

Sigma-faktoren AlgU er kodet av genet *algU*, og er en positiv regulator for transkripsjon av *algD*-operonet fra *algD*-promotoren. Transkripsjonen fra *algD*-promotoren styrer hele *algD*-operonet og er normalt det hastighetsbestemmende leddet i syntesen av alginat. AlgU sin positive effekt på transkripsjonen av *algD*-operonet blir regulert av flere proteiner (Hay *et al.*, 2010). En oversikt over disse regulatorene og deres effekt på AlgU er gitt i Figur 1.6



Figur 1.6: Regulering av AlgU. + betyr positiv regulering. – betyr negativ regulering.

Som Figur 1.6 viser er MucA, MucB, AlgW og MucD de viktigste regulatorene av AlgU vi kjenner til i dag. MucA er den eneste av regulatorene som direkte interagerer med AlgU, mens de andre regulerer AlgU ved å påvirke mengden og aktiviteten til MucA. MucA er en anti-sigmafaktor som binder seg til AlgU på den cytosoliske delen av plasmamembranen (Figur 1.3). MucB er også en negativ regulator av AlgU og virker ved å binde seg til den periplasmiske delen av MucA og beskytte MucA mot proteaser. AlgW regulerer AlgU positivt, og er en protease som kløyver MucA på periplasmisk side. Kløyvingen fører til videre degradering av MucA på cytosolisk side av proteasen YaeL. Regulatoren MucD sin rolle på AlgU er ikke fullt forstått, men det virker som om MucD er en protease som degraderer proteiner i periplasma som ellers ville ha aktivert AlgW. Foruten regulatorene beskrevet over, er transkripsjonen av *algU* positivt regulert av AlgU (Hay *et al.*, 2010).

Foruten å regulere alginatsyntese er det vist at AlgU er en del av bakteriers forsvar mot ekstreme miljøpåvirkninger, selv i stammer hvor alginatproduksjonen er slått ut (Govan og Deretic, 1996). I *P. aeruginosa* og *Pseudomonas syringae* øker AlgU toleranse mot osmotisk stress, oksidativt stress, samt varme. I *P. fluorescens* er AlgU essensiell for toleranse mot osmotisk stress og uttørking, men ikke mot oksidativt stress og varme (Schnider-Keel *et al.*, 2001).

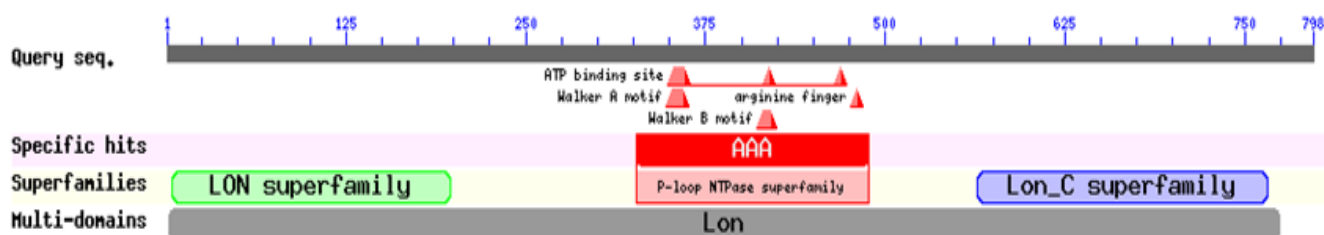
1.6.2 PFLU3927

PFLU3927 er et gen med en lengde på 2397 basepar som koder for et protein på 798 aminosyrer (www.ncbi.nlm.nih.gov). Proteinene er klassifisert som en DNA-bindende, ATP-

avhengig protease La, og tilhører Lon proteasefamilien. Lon proteasefamilien tilhører proteinsuperfamilien AAA^+ (ATPaser assosierte med ulike cellulære aktiviteter). Felles for proteiner i denne familien er deres generelle mekanisme; gjenkjenning og binding til substrat fører til hydrolyse av ATP og utfolding av substratet. Videre blir det utfoldede substratet ført til det proteolytiske kammeret hvor peptidbindingene blir brutt (Tsilibaris *et al.*, 2006).

Tidligere er det gjort transposonmutagenese hvor *PFLU3927* ble inaktivert ved transposonmutagenese. Dette førte til at alginatproduksjonen i PIM ble redusert kraftig, nesten eliminert. Mutanten hadde litt større vekst en villtypen. (Helga Ertesvåg, ikke publisert).

Et homologisøk med lon-protease fra *E. coli* som spørresekvens viser at *PFLU3927* er den nærmeste homologen til lon-protease i *P. fluorescens* SBW25 med en likhet på 97 % i aminosyresekvens. Et søk etter konserverte områder i polypeptidet til *PFLU3927* gir treff på kjente motiver som finnes i Lon proteaser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En oversikt over disse motivene og konserverte områder er gitt i Figur 1.7.



Figur 1.7: Konserverte områder og motiver i *PFLU3927* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Felles for alle proteiner i AAA^+ -superfamilien er at de har motivene arginin-finger, ATP-bindingssete og Walker A- og Walker B-motiv. Walker A-motivet er essensielt for at proteinet skal kunne binde seg til ATP. Walker A motivet former en loop som binder seg til alfa- og betafosfatgruppen på nukleotidet. Walker B-motivet er viktig for interaksjon med Mg^{2+} . Arginin finger motivet er spesielt for AAA^+ -motivet og virker ved at det detekterer binding av ATP noe som gjør at motivet viderefører endringer i konformasjon hos proteinet (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Lon protease, den nærmeste homologen til *PFLU3927*, ble først isolert fra *Escherichia coli*. Senere ble homologer til Lon funnet i flere organismer, både prokaryoter og i organeller hos eukaryoter (Tsilibaris *et al.*, 2006). Krystallstrukturen til Lon protease fra *Thermococcus*

onnurineus ble nylig bestemt og viser at Lon er en heksamere som består av seks identiske subenheter (Cha *et al.*, 2010). I Lon proteasefamilien er ATPase-domenet og det proteolytiske domenet på samme polypeptid, mens det imidlertid er fordelt på forskjellige polypeptider hos f.eks. Clp proteaser (Tsilibaris *et al.*, 2006). Det er ikke funnet noen generelle gjenkjenningsmønstre hos substratene til Lon proteaser, men det er funnet noen fellestrekk i strukturen til proteinene som blir degradert av Lon. Det har vist seg at en ikke-globulær konformasjon er typisk for substratene til Lon (Tsilibaris *et al.*, 2006).

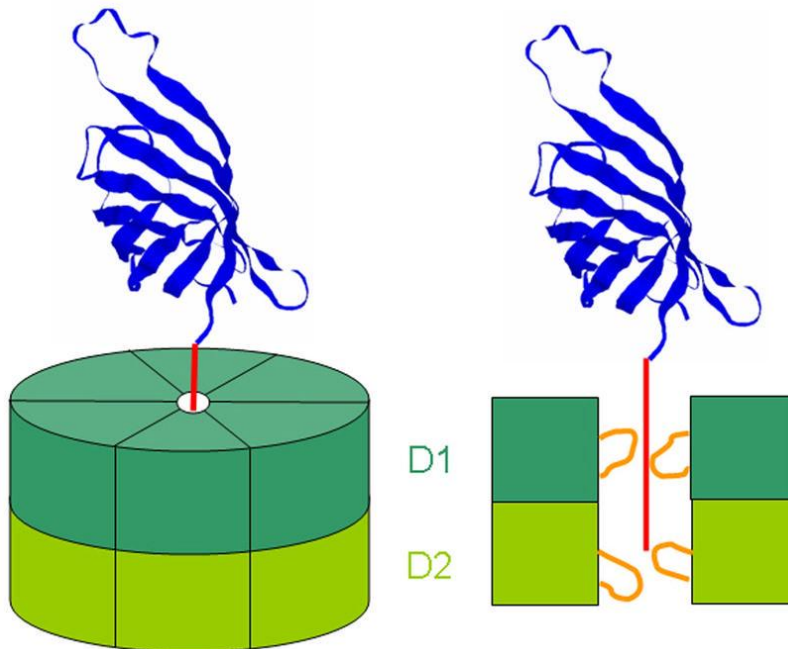
Lon proteasen klassifiseres ofte som et varmesjokk-protein da transkripsjonen av genet øker ved varmesjokk. Det er likevel flere Lon-lignende proteaser fra ulike organismer der transkripsjonen ikke blir induert av varme. Hos *Bacillus subtilis* er det vist at transkripsjon av Lon protease-genet kan indueres ved påføring av andre typer stress som f.eks. uttørking ved tilførsel av etanol eller salt i vekstmediet (Tsilibaris *et al.*, 2006). I *E. coli* er det vist at Lon-mutanter danner mukoide kolonier pga. stabilisering av RcsA som er en positiv regulator for kapsel-syntese (Torrescabassa og Gottesman, 1987).

1.6.3 *clpA*

ClpA er kodet av genet *clpA* og er en protease, som i likhet med Lon protease, hører til protein-superfamilien AAA⁺. Den var den første Clp-ATPase til å bli oppdaget (Zolkiewski, 2006). I et tidligere forsøk er det utført transposonmutagenese på *P. fluorescens* hvor *clpA* ble inaktivert. Alginatproduksjonen ble undersøkt og det viste seg at den ble signifikant endret som følge av at *clpA* ble inaktivert. I to medier (DEF3 med glyserol/fruktose) økte alginatproduksjonen. I PIM med glyserol ble det observert en nedgang på 40 % i alginatproduksjon. Celleveksten var imidlertid 47 % større (Helga Ertesvåg, ikke publisert).

ClpA er et protein på 756 aminosyrer og kodes av genet *clpA* på 2271 nt (<http://www.genome.jp/kegg/>). Siden ClpA tilhører AAA⁺-superfamilien, har også ClpA motivene arginin-finger, ATP-bindingssete, samt Walker A- og Walker B-motiv. Clp proteaser er funnet i alle prokaryoter, samt i mitokondrier og kloroplaster hos eukaryoter. ClpA er en del av et større proteinkompleks hvor ClpA er den ATP-bindende delen av komplekset. ClpA danner kompleks sammen med peptidase-enheten ClpP, og sammen utgjør de proteasen ClpAP. Som vist i Figur 1.8 danner ClpA en ringformet heksamere med et hull i senter som har en diameter på ca. 9 Å på det smaleste. Det smale hullet gjør at foldede proteiner ikke kan passere gjennom, men må foldes ut, som en hyssing gjennom et nåløye. Utfoldingen og transporten av proteiner gjennom dette "nåløyet" krever energi, noe som blir

tilført ved hydrolyse av ATP. Hydrolysen av ATP medfører konformasjonsendringer i ClpA som igjen hjelper til å få proteiner gjennom ClpA. Fra ClpA blir substratet ført mot peptidaseenheten ClpP og degradert (Zolkiewski, 2006).



Figur 1.8: Mekanisme for hvordan ClpA folder ut og trekker substratet gjennom det smale hullet i midten. Til venstre er hele heksameren bestående av seks ClpA-enheter der hver har to moduler, D1 og D2, vist. Til høyre vises hvordan to ClpA enheter trekker substratet gjennom. De fleksible løkkene (vist i oransje) driver translokasjonen av substratet ved hydrolyse av ATP (Zolkiewski, 2006).

Det er vist at ClpA gjenkjenner SsrA-merking, som er et kvalitetskontroll-system for å velge ut proteiner som skal degraderes. SsrA-merking virker ved å legge til et polypeptid på C-terminus på substratet. Denne merkelappen gjenkjennes av ClpA. En SsrA-merkelapp betyr likevel ikke at proteinet nødvendigvis gjenkjennes av ClpA. Det finnes flere kofaktorer og inhibitorer som i tillegg avgjør om ClpA vil binde SsrA-merkelappen. SsrA-merking er i tillegg bare en av flere typer merking som fører til aktivering av ClpAP-proteasen. Likevel, SsrA-merking er en av de sterkeste faktorene for degradering, og har vært sentrale for å studere mekanismen til ClpA (Sauer *et al.*, 2004).

Til nå er ikke sammenhengen mellom ClpA og alginatproduksjon undersøkt mer enn det som er funnet i transposonforsøket hvor det ble vist at inaktivering av *clpA* endret alginatproduksjonen. I *P. aeruginosa* er det imidlertid vist at proteasen ClpXP er en positiv regulator av alginatproduksjon når *muca* er mutert (Qiu *et al.*, 2008). ClpXP er en protease hvor ClpX er assosiert med ClpP i stedet for ClpA. Mekanismene for degradering og

gjenkjenningsmønstre er veldig lik for ClpAP og ClpXP (Zolkiewski, 2006). I studien av Qui *et al.* ble det påvist at ClpXP degraderte mutert MucA. MucA var mutert slik at leserammen ble endret, noe som førte til en avkorting av proteinet på C-terminal ende. Degraderingen av den muterte versjonen av MucA førte videre til overproduksjon av alginat som følge av MucA sin rolle som en negativ regulator på transkripsjon av *algD*-operonet. Det ble ikke funnet signifikant korrelasjon mellom ClpXP og alginatproduksjon med villtype-MucA (Qiu *et al.*, 2008).

2 Metoder

2.1 Medier og løsninger

Dersom det ikke står spesifisert annet er det brukt destillert ionefritt vann i løsningene/mediene.

2.1.1 Psi-medium

Forbindelse	Konsentrasjon(g/l)
Gjærekstrakt(Oxoid)	5
Trypton(Oxoid)	20
MgSO ₄ (magnesiumsulfat)	5

pH ble justert til 7.6 med KOH og mediet ble autoklavert.

2.1.2 TFB1

Forbindelse	Konsentrasjon
KAc (kaliumacetat)	30 mM
RbCl (rubidiumklorid)	100 mM
CaCl ₂ ×2H ₂ O (kalsiumklorid)	10 mM
MnCl ₂ ×4H ₂ O (mangan(II)klorid)	50 mM
Glycerol	15 % v/v

pH ble justert til 5.8 med fortennet eddiksyre og løsningen ble sterilfiltrert.

2.1.3 TFB2

Forbindelse	Konsentrasjon
MOPS	10 mM
CaCl ₂ ×2H ₂ O (kalsiumklorid)	75 mM
RbCl (rubidiumklorid)	10 mM
Glycerol	15 % v/v

pH ble justert til 6.5 med fortennet eddiksyre, og løsningen ble sterilfiltrert.

2.1.4 SOC-medium

Forbindelse	Konsentrasjon
Trypton	20 g/l
Gjærekstrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl	2,5 mM
Glukose	3,6 g/l
MgCl ₂	5,08 g/l

Mediet ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm filter.

2.1.5 Luria broth(LB)

Forbindelse	Konsentrasjon (g/l)
Trypton	20
Gjærekstrakt	5
NaCl(natriumklorid)	0,5

Mediet ble autoklavert.

2.1.6 Luria agar(LA)

Det ble laget LB-medium (2.1.5), men mediet ble tilsatt 15 g/l agar før autoklivering. Eventuell antibiotika ble tilsatt etter nedkjøling til ca. 50°C.

2.1.7 Loading dye

Forbindelse	Konsentrasjon(% volum)
Glyserol	70
Bromfenolblått	0,25
Ficoll 400	10
Sterilt ionefritt vann	19,75

2.1.8 Pseudomonas isoleringsagar (PIA)

Forbindelse	Konsentrasjon
Pseudomonas Isolation Agar (Difco)	45 g/l
Glyserol	20 ml/l

Løsningen ble autoklavert

2.1.9 Pseudomonas isoleringsmedium (PIM)

Forbindelse	Konsentrasjon (g/l)
Pepton	20
NaCl	5
MgCl ₂	1,4
K ₂ SO ₄	10
Glyserol	20

Mediet ble autoklavert.

2.1.10 50 X TAE-buffer

Forbindelse	Mengde
Tris base	242,0 g
Eddiksyre (100%)	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
Destillert ionefritt vann	til 1000 ml totalvolum

Fortynnes med ionefritt vann for å lage 1 X TAE-buffer

2.2 Bakteriestammer og plasmid brukt i oppgaven

En oversikt over alle plasmid som er brukt i forsøket er gitt i Tabell 2.1. og en oversikt over alle stammene som ble brukt er gitt i Tabell 2.2.

Tabell 2.1: Oversikt over plasmid brukt i oppgaven

Plasmid	Beskrivelse	Kilde
pUC128	Kloningsvektor med <i>lacZ</i> for blå-hvit seleksjon og Ap^r Høykopitall.	(Keen <i>et al.</i> , 1988)
pEM2	pLitmus28-derivat. Kloningsvektor med Pm-promotor. Ap^r . Høykopitall.	E. Mellemsæter, Masteroppgave
pYQ1	<i>Pir</i> -avhengig R6K-replikasjon. Inneholder Tn5-basert minitransposon. Ap^r , Apr^r . Lavkopitall.	Yi-Qian Sun, Ikke publisert
pHE246	RK''-basert vektor med TrfA-avhengig replikasjon. Inneholder <i>lacZ</i> . Ap^r , Tc^r . Lavkopitall	Helga Ertesvåg, Ikke publisert
pHE179	pLitmus 28-basert kloningsvektor. Ap^r , Tc^r .	Helga Ertesvåg, Ikke publisert
pES1	Derivat av pHE179 med BamHI- og XbaI-kuttet PCR-amplifisert $\Delta algU$ -fragment satt inn.	Denne oppgaven
pES2	Derivat av pUC128. pUC128 (EcoRV) med innsatt PCR-amplifisert <i>PFLU3927</i>	Denne oppgaven
pES3	Derivat av pEM2 med PCR-amplifisert NdeI + NotI <i>clpA</i> -fragment	Denne oppgaven
pES4	Derivat av pYQ1 med BsrGI + NotI <i>clpA</i> fra pES3	Denne oppgaven
pES5	Derivat av pHE246 med BamHI + XbaI $\Delta algU$ fragment fra pES1	Denne oppgaven
pES6	Derivat av pYQ1 med NotI + NdeI <i>PFLU3927</i> fragment fra pES2	Denne oppgaven

Tabell 2.2: Oversikt over stammer brukt i forsøket

Stamme	Beskrivelse	Kilde
<i>P. fluorescens</i> SBW25 MS1 Δ algC::TnKb61	Stamme hvor <i>algD</i> -operonet er kontrollert av Pm-promotor. <i>algC</i> er satt under kontroll av PmG5. Tc ^r	Mona Senneset, ikke publisert
SBW25 MS1 Δ algC ::TnKb60	Stamme som ble brukt til å deletere det meste av <i>algU</i> . <i>algC</i> er satt under kontroll av PmG5. Km ^r	Denne oppgaven
SBW25 <i>mucA</i> ⁻ HE230	<i>mucA</i> ⁻ stamme av SBW25 der <i>algC</i> er kontrollert av PmG5	Helga Ertesvåg, ikke publisert
SBW25 <i>mucA</i> ⁻ HE230 ::TnES4	Variant av SBW25 <i>mucA</i> ⁻ HE230 hvor <i>clpA</i> underlagt Pm-promotor er satt inn med Tn5-minitransposon fra pES4.	Denne oppgaven
SBW25 <i>mucA</i> ⁻ HE230 ::TnES6	Variant av SBW25 <i>mucA</i> ⁻ HE230 hvor <i>PFLU3927</i> underlagt Pm-promotor er satt inn med Tn5-minitransposon fra pES6.	Denne oppgaven
SBW25 MS1 Δ algC::TnKb61 30O1 <i>clpA</i> ⁻	Derivat av MS1 Δ algC::TnKb61 hvor <i>clpA</i> er inaktivert ved transposonmutagenese.	Mona Senneset, ikke publisert
SBW25 MS1 Δ algC::TnKb61 30O1 <i>clpA</i> ⁻ ::TnES4	30O1 <i>clpA</i> ⁻ hvor <i>clpA</i> underlagt Pm-promotor er satt inn med Tn5-minitransposon fra pES4	Denne oppgaven
SBW25 MS1 Δ algC::TnKb61 17P19 <i>PFLU397</i>	Derivat av SBW25 MS1 Δ algC::TnKb61 hvor <i>PFLU3927</i> er inaktivert ved transposonmutagenese.	Mona Senneset, ikke publisert
SBW25 Δ algC::TnKb61 17P19 <i>PFLU3927</i> ::TnES6	17P19 Δ PFLU3927 hvor <i>PFLU3927</i> underlagt Pm-promotor er satt inn med Tn5-minitransposon fra pES6	Denne oppgaven
SBW25 MS1 Δ algC::TnKb60 Δ algU	SBW25 MS1 Δ algC::TnKb60 hvor villtype- <i>algU</i> er erstattet med Δ algU ved homolog rekombinering fra pES5	Denne oppgaven
<i>E. coli</i> DH5 α	Stamme som ble brukt til transformering. Mulighet for blå/hvit-seleksjon	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> S17.1 λ pir	Stamme som ble brukt til transformering/konjugering. Vert for <i>pir</i> -avhengige plasmid	(Simon <i>et al.</i> , 1983)

2.3 Polymerase Chain Reaction

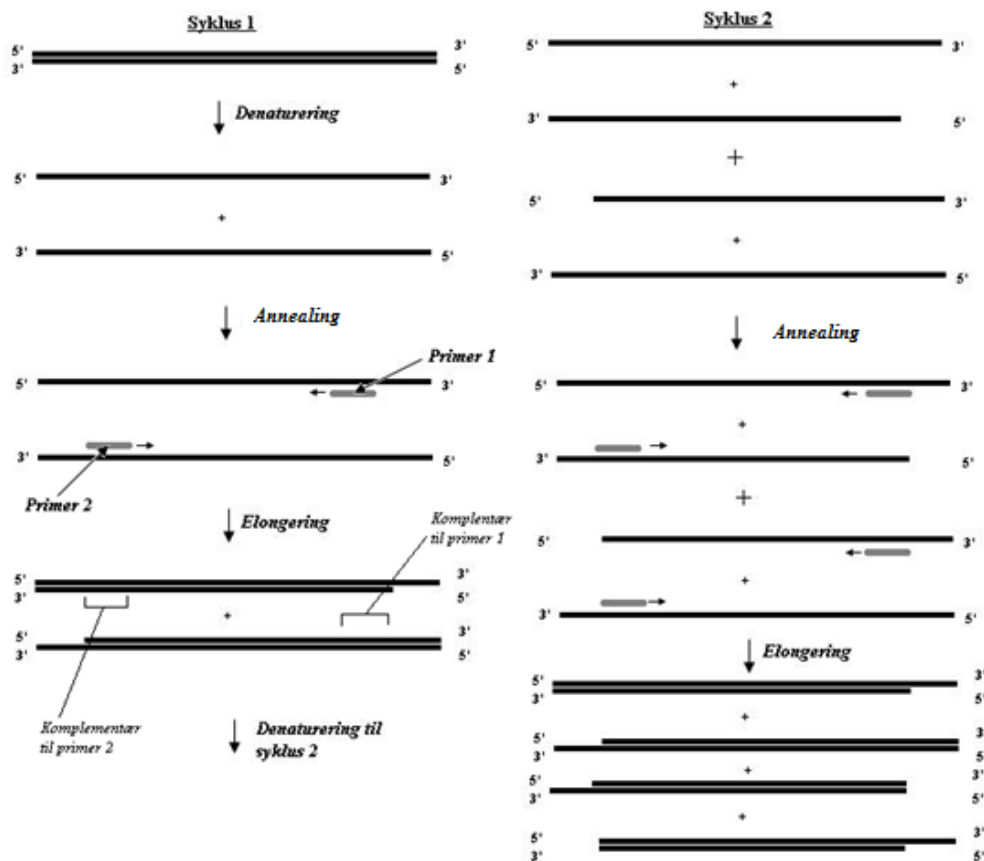
Polymerase Chain Reaction (PCR) er en *in vitro* enzymatisk reaksjon som gir eksponentiell amplifisering av korte (<7kb ved bruk av Taq-polymerase) DNA-sekvenser. PCR ble utviklet i 1984 av Kary Mullins som mottok Nobelpris i kjemi for det i 1993 (Reece, 2004).

PCR ble utført med Expand High Fidelity^{plus} PCR System fra Roche og mekanismene for metoden er beskrevet videre.

Først ble det laget en reaksjonsmiks som bestod av følgende komponenter:

- DNA templat(1 µL plasmid eller 2-4 µl cellekultur)
- 5 µl buffer (Roche, 2010). Denne bufferen har en saltkonsentrasjon og en pH som gir gunstige surhets- og ioniske forhold for reaksjonen. Den inneholder også magnesiumioner som er kofaktor for Taq DNA-polymerase (Roche, 2010).
- 1 µl av hver primer. Primerene er typisk 15-30 basepar lange og komplementære til hver sin flanke av DNA-fragmentet som skal amplifiseres. Primere brukt i denne oppgaven er vist i Vedlegg C.
- 0,5 µl enzymblanding. Enzymblandingen inneholder Taq DNA-polymerase samt et termostabilt korrekturlesende protein uten polymeraseaktivitet Dette gjør at enzymblandingen skal gi en nøyaktighet som er 6 ganger bedre enn den opprinnelige Taq DNA-polymerasen, og en feilrate på ca. 1b per 50kb (Roche, 2010)

Reaksjonsmiksen ble videre satt inn PCR-maskinen. Betingelsene for PCR som ble brukt i denne oppgaven er vist i Tabell 2.2. Mekanismen for PCR er vist i Figur 2.1 og forklart videre. Primere som ble brukt i oppgaven er vist i Vedlegg C.



Figur 2.1: De to første syklusene i PCR

Tabell 2.2: Temperatur og varighet av de ulike trinnene i PCR. Før den første syklusen ble det gjort et trinn ved 95 °C i 5 min for å sikre denaturering. Trinn 1, 2 og 3 ble kjørt i syklus 35 ganger. Etter syklusen ble det utført et ekstra elongeringstrinn ved 72 °C i 7 min for å sikre at alle fragmentene bli fullstendig elongert.

Trinn	Temperatur (°C)	Varighet (s)
1	95	30
2	55	30
3	72	180

Figur 2.1 viser en oversikt over de 2 første syklusene i PCR. Denatureringstrinnet fører til at hydrogenbindingene mellom DNA-trådene brytes slik at det kun er enkeltrådet DNA igjen i reaksjonsmiksen. Etter denaturering ble reaksjonskomponentene avkjølt, noe som fører til binding av primere (annealing). Temperaturen som brukes er tilpasset det spesifikke primerpar som benyttes. Det siste trinnet, elongeringstrinnet, skjer ved temperatur som tilsvarer optimumstemperaturen til Taq DNA-polymerase. De to første syklusene gir

fragmenter med ulik lengde på de komplementære trådene. Det er først i syklus 3 der 2/6 DNA-fragmenter vil ha butte ender. Etter 3. syklus vil mengde DNA-fragmenter med butte ender øke, og som følge av den eksponentielle veksten PCR gir vil DNA med ulik lengde på trådene etter hvert bli ubetydelig (Berg, 2002).

2.4 Isolering av høykopitalplasmid

For å kunne skille plasmid-DNA fra kromosomalt DNA benyttes en alkalisk lyseringsmetode som først ble brukt av Birnboim og Doly i 1979 (Birnboim og Doly, 1979). Denne metoden baserer seg på at lukkede sirkulære DNA-molekyler er stabile ved alkalisk pH (mellom 12 og 12.5), i motsetning til lineære DNA-molekyler som vil bli degradert (Reece, 2004). For å isolere plasmid ble Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system fra Promega benyttet. Utførelse og virkning av de ulike trinnene i metoden er som følger:

Lysering av celler

En kultur på 1-3 ml ble sentrifugert (13000 rpm i 5 min) og supernatanten ble fjernet. Cellene ble så resuspendert i 250 µl resuspenderingsbuffer. Bufferen inneholder RNase og EDTA. RNase vil degradere RNA som frigjøres i lyseringstrinnet. EDTA inhiberer DNase ved å binde divalente ioner som er kofaktorer for DNase (Reece, 2004). Videre ble cellene lysert ved å tilsette 150 µl lyseringsløsning. Blandingen ble inkubert til det ble observert en klarere blanding. Lyseringsløsningen inneholder natriumdodecylsulfat (SDS) og natriumhydroksid (NaOH). SDS er en detergent som ødelegger cellemembranen og denaturerer proteiner. NaOH tilsettes for å oppnå alkalisk pH som fører til denaturering av kromosomalt DNA (Sambrook og Russell, 2001).

Det ble så tilsatt 10 µl alkalisk proteaseløsning og blandingen ble inkubert i 5 min. Proteasene øker utbyttet av plasmid ved å degradere proteiner som kan påvirke plasmidet. Etter dette ble det tilsatt 250 µl nøytraliseringsbuffer. Bufferen inneholder surt kaliumacetat. Bufferen fører til renaturering av kromosomalt DNA, men det aggregerer og former et uløselig kompleks. Kaliumacetatet fører til utfelling av protein-SDS kompleks samt av RNA med høy molekylvekt (Reece, 2004). Til slutt ble utfellingen fjernet ved sentrifugering (13000 rpm i 10 min).

Isolering av plasmid DNA

Supernatanten ble overført til en minikolonne og sentrifugert (13000 rpm i 1 min). Minikolonnas matriks består av resin som binder DNA. Dette gjør at DNA forblir i kolonna mens kontaminanter vaskes ut. Kolonna ble så tilsatt 750 µl vaskebuffer, sentrifugert (13000 rpm i 1 min), og eluatet ble kastet. Videre ble trinnet repetert med 250 µl vaskebuffer. Til slutt ble kolonna sentrifugert i 2 minutter for å fjerne rester av vaskebuffer. Hensikten med vasketrinnet er å fjerne eventuelle kontaminanter i kolonna. Bufferen inneholder EDTA, kaliumacetat og etanol. Etanol brukes for å hindre at DNAet skal løse seg i vaskebufferen. Til slutt ble plasmid-DNA eluert ved tilsats av 100 µl ionefritt vann og påfølgende sentrifugering (13000 rpm, 1 min). Vannet senker saltkonsentrasjonen i kolonna, DNA løses og kan elueres ut sammen med vannet.

2.5 Isolering av lavkopitallsplasmid

For å isolere lavkopitallsplasmid ble det brukt mer kultur for å sikre nok utbytte. Dette fører til noen endringer fra protokollen i 2.4 som er beskrevet her.

1: Det ble brukt 10 ml kultur dyrket i 100 ml kolbe over natt

2: Cellene ble resuspendert i 500 µl resuspendingsbuffer og fordelt på to eppendorfrør. Prosedyren ble vider fulgt som beskrevet i 2.4 frem til overføringen til minikolonna. Supernatanten fra det ene røret ble overført til kolonna og sentrifugert, og eluatet ble kastet. Videre ble supernatanten fra det andre røret overført til den samme kolonnen og prøven ble sentrifugert.

2.6 Kjemisk transformering av *Escherichia coli*

Kjemisk transformering er en metode for å sørge for at fremmed DNA kan bli tatt opp av verten, *Escherichia coli*. Metoden er utviklet empirisk, og det er mye rundt mekanismene i metoden som er ukjent (Reece, 2004). En skisse av trinnene i kjemisk transformering er vist i Figur 2.2. Utførelse og virkning av trinnene er forklart under.



Figur 2.2: Kjemisk transformering av *E.coli* (Reece 2004).

Produksjon av kompetente celler:

1 ml kultur av *E.coli* ble inokulert i Psi-medium (2.1.1) til $OD_{600} = 0.4$ og inkubert på is i 15 min. Cellene ble høstet ved sentrifugering (4500 rpm, 5 min). Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 40 ml kald TFB1(2.1.2), og blandingen ble inkubert på is i 5 min. TFB1 inneholder divalente kationer (Ca^{2+} , Rb^{2+} og Mn^{2+}). De divalente ionenes virkning på celleveggen til verten er uklar, men det antas at de har en virkning på strukturen i celleveggen og at de muligens bidrar til å binde fremmed DNA på celleveggen (Reece, 2004).

Videre ble cellene høstet igjen ved sentrifugering (4500 rpm, 5 min). Supernatanten ble fjernet og cellene ble resuspendert i 3 ml kald TFB2 (2.1.3). Denne løsningen inneholder også divalente kationer, men er også tilsatt næringsstoffer for å øke overlevelsesgraden til *E.coli*. Kulturen ble til slutt fordelt i 1,5 ml sentrifugerør (å 100 μ l) og nedfrost hurtig på en blanding av etanol og tørris. Hurtigfrysingen er nødvendig for at flest mulig celler skal overleve. Cellene ble lagret ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Heat-shock transformasjon:

Cellene ble tint på is, før plasmid (1 μ l) eller ligeringsmiks (10 μ l) ble tilsatt. Blandingene ble inkubert på is i 30 min. Videre ble cellene utsatt for varmesjokk ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5 min eller $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 45-55 sek. Varmebehandlingen stimulerer opptak av fremmed DNA. Cellene ble så inkubert på is i 2 min før de ble tilsatt 1ml SOC-medium (2.1.4), som var forvarmet til $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. SOC-medium er et vekstmedium som sørger for at cellene kommer seg, noe som er nødvendig siden kompetente celler blir utsatt for harde påkjenninger for å gjøre dem kompetente. Cellekulturen ble så inkubert ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ med resting i 1-2 timer. Til slutt ble cellene platet ut på LA (2.1.6) med antibiotikum som selekterte for plasmidet. Det ble først platet ut 200 μ l fra kulturen. Deretter ble kulturen sentrifugert ved lav hastighet (ved bruk av liten bordsentrifuge uten hastighetsmåler). Litt av supernatanten ble fjernet slik at det var ca 200 μ l igjen i røret. Deretter ble cellene resuspendert i supernatanten og platet ut på ei ny plate. For å kontrollere

transformasjonen ble det utført positiv og negativ kontroll av metoden. Til negativ kontroll ble det brukt kompetente celler uten tilsats av DNA. Til positiv kontroll ble 1 µl plasmid tilsatt de kompetente cellene.

2.7 Agarose Gelelektroforese

Agarose gelelektroforese er en enkel måte å separere DNA-fragmenter etter størrelse. Teknikken baserer seg på at DNA er negativt ladet ved pH til gelbufferen. Når et elektrisk felt påføres en gel vil DNA bevege seg i gelen fra den negative polen (katoden), mot den positive polen (anoden). Ladningen til DNA er uavhengig av størrelsen på fragmentet, noe som gjør at alle DNA-fragmenter ville vandret med lik hastighet dersom friksjon kunne neglisjeres. For å kunne skille DNA-fragmentene blir det påført friksjon ved å la DNA-fragmentene vandre i en gel basert på agarose. Når agarose løses i buffer i konsentrasjoner mellom 0,3 % - 4 % dannes et porøst gitter, tettere jo høyere agarosekonsentrasjon. Lange DNA-fragmenter vil vandre saktere gjennom et slikt gitter enn korte fragmenter. Dette gjør at fragmenter i en blanding kan separeres og lengden deres kan estimeres (Reece, 2004).

For å skille lange fragmenter er det hensiktsmessig å bruke lav agarosekonsentrasjon for at fragmentene skal kunne vandre i gelen. For korte fragmenter brukes høy agarosekonsentrasjon (Berg, 2002). Siden DNA ikke er synlig i gelen alene ble GelRed fra Gentauro brukt for å kunne visualisere DNA i gelen. GelRed binder seg til DNA og kan visualiseres ved at DNA-GelRed-komplekset fluorescerer når det blir utsatt for UV-lys.

I denne oppgaven ble det brukt 0,8 % agarose i 1x TAE buffer (2.1.10). For å få DNA ned i brønnene i gelen ble det tilsatt loading dye (2.1.7). Dette ble tilsatt for å få DNA til å synke og for å kunne visualisere hastigheten på elektroforesen. For å kunne estimere lengden av DNA-fragmentene ble det brukt DNA-standarder. En DNA-standard er en løsning som inneholder flere DNA-fragmenter med kjent størrelse, noe som gjør at disse kan brukes til å estimere størrelse fragmentene som skal undersøkes. En oversikt over DNA-standardene er vist i Vedlegg A.

2.8 Restriksjonskutting

Restriksjonszymer av klasse II kutter DNA på spesifikke basesekvenser. Basesekvensene som gjenkjennes av restriksjonsenzymene varierer i lengde og basesammensetning. Restriksjonsenzym med korte gjenkjenningssekvenser, eksempelvis 4 basepar, vil kutte oftere (gj.snitt hvert 4⁴ bp) enn et restriksjonsenzym med en gjenkjenningssekvens på 12 (gj.snitt

hvert 4^{12} bp). Gjenkjenningssekvensene er ofte palindromer (Figur 2.3), som vil si at sekvensen er den samme på begge tråder i 5'-3' retningen



Figur 2.3: Palindrom gjenkjenningssekvens for restriksjonsenzymet EcoRI (Reece 2004).

Restriksjonszymer blir oftest brukt i kloning til å kutte DNA-fragmenter som skal klones ut fra plasmidet, kromosomet eller PCR-produktet hvor fragmentet er. Vektoren genet skal klones inn i blir også behandlet med restriksjonsenzym. Vektoren blir som regel behandlet med restriksjonszymer som gir like kuttemønstre på vektor og insert slik at de "klebrige endene" på fragmentet og vektoren er komplementære. For å hindre at restriksjonsfragmentet ligger tilbake til det opphavelige plasmidet, kan restriksjonsfragmentene separeres ved gelelektroforese. Restriksjonszymer blir også brukt for å sjekke vellykket kloning. Dette gjøres ved at vektoren blir isolert fra verten og behandlet med restriksjonsenzym som identifiserer vektoren (Reece, 2004).

Restriksjonskutting ble utført som beskrevet under:

Reaksjonsmiks ble laget:

3-17 μ L DNA
 2 μ L 10 X NEB (New England Biolabs) buffer type 1-4 avhengig av enzym
 0,5 μ L NEB BSA
 Sterilt ione-fritt vann til 19,5 μ L
 0,5-1,5 μ L NEB enzym

Bufferen følger med enzymene og tilrettelegger for at enzymet skal virke. BSA tilsettes for å stabilisere enzymet utover det bufferen gjør. Ved bruk av flere enzymer ble det brukt en buffer som passer alle enzymene.

Restriksjonsmiksen ble inkubert ved enzymenes optimale temperatur (oftest 37°C) i 1 time til over natt, avhengig av hvilke enzym som ble brukt. Videre ble fragmentene separert ved agarose gelelektroforese.

2.9 Sekvensering

DNA-sekvensering er en metode som blir brukt for å kunne bestemme nukleotidsekvensen i DNA. Sekvensering av DNA er et område med stor utvikling av nye metoder, som gir både høyere hastighet og større nøyaktighet enn tidligere mulig. I denne oppgaven ble den tradisjonelle Sanger-metoden brukt for å sekvensere DNA. Metoden baserer seg på å benytte dideoksy-nukleotider sammen med deoksynukleotidene slik at DNA-polymerase noen ganger setter inn en dideoksy-nukleotid i stedet for deoksynukleotid. Dideoksynukleotidet fører til at syntesen av fragmentet stopper. Mange slike reaksjoner fører til at man til slutt har DNA-fragmenter med dideoksynukleotider som representerer alle nukleotidene i DNA-fragmentet. Tidligere måtte man kjøre 4 reaksjoner, en for hver base, for å kunne bestemme sekvensen (Sanger *et al.*, 1977). Sanger-metoden er i dag gjort enklere ved at de ulike dideoksynukleotidene er merket med hvert sitt fluorescerende stoff slik at man kan bare trenge å kjøre en reaksjon, samt at separeringen av fragmentene går mye raskere.

I denne oppgaven ble det sekvensert for å verifisere PCR-amplifisert DNA hadde den riktige sekvensen. Da det kan oppstå feil i PCR-reaksjonen eller under kloningsarbeidet, er sekvensering essensielt for at resultatene skal representere de forskjellene som skal testes, og ikke komme av feil i forsøket.

Separering av sekvenseringsprodukter ble utført ved Institutt for biologi på NTNU. Sekvensering og rensing av sekvenseringsprodukter ble utført og prosedyre for sekvensering og rensing av sekvenseringsprodukter er vist under.

Sekvensering

Det ble laget en sekvenseringsmiks som bestod av komponentene vist i Tabell 2.3.

Tabell 2.3: reaksjonsmiks til sekvensering. BigDye ble tilsatt til slutt.

Komponent	Mengde
Plasmid DNA	150 – 300 ng
Primer	1 µl (3,2 pmol/µl)
Fortynningsbuffer	4 µl
Sterilt ionefritt vann	Slik at totalvolum ble 20 µl
BigDye	4 µl

Videre ble et sekvenseringsprogram kjørt på en PCR-maskin med program vist i Tabell 2.4.

Tabell 2.4: Reaksjonsbetingelser for sekvensering. Før trinn 1 ble miksen varmet opp til 96 °C og holdt i 4 min. Trinnene i tabellen ble utført i syklus 25 ganger.

Trinn	Temperatur (°C)	Varighet (s)
1	96	30
2	50	15
3	60	240

Rensing av sekvenseringsprodukter

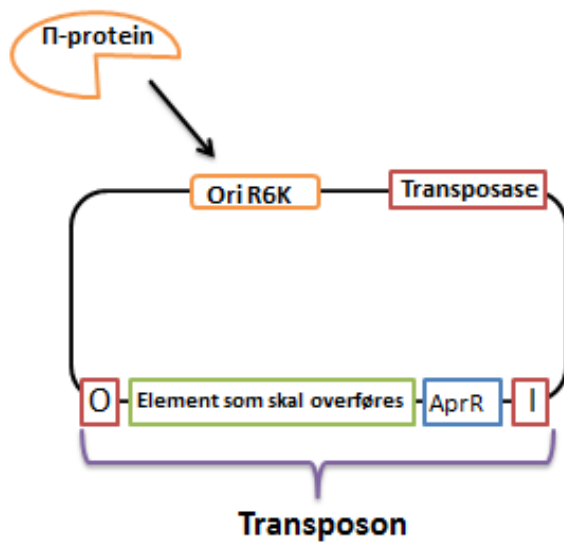
Blandingen ble overført til 1,5 ml sentrifugerør. Utfelling av DNA ble gjort ved tilsats av 2 µl natriumacetat (NaAc) og 50 µl etanol (96 %). Blandingen sto ved romtemperatur i 15 min før den ble sentrifugert (13000 rpm i 20 min). Videre ble supernatanten fjernet og bunnfallet ble vasket ved tilsats av 250 µl 70% etanol, miksing, og påfølgende sentrifugering (13000 rpm i 5 min). Supernatanten ble fjernet og rørene ble satt med lokket åpent til tørking over natt, før de ble sendt inn for separering av sekvenseringsproduktene.

2.10 Konjugering

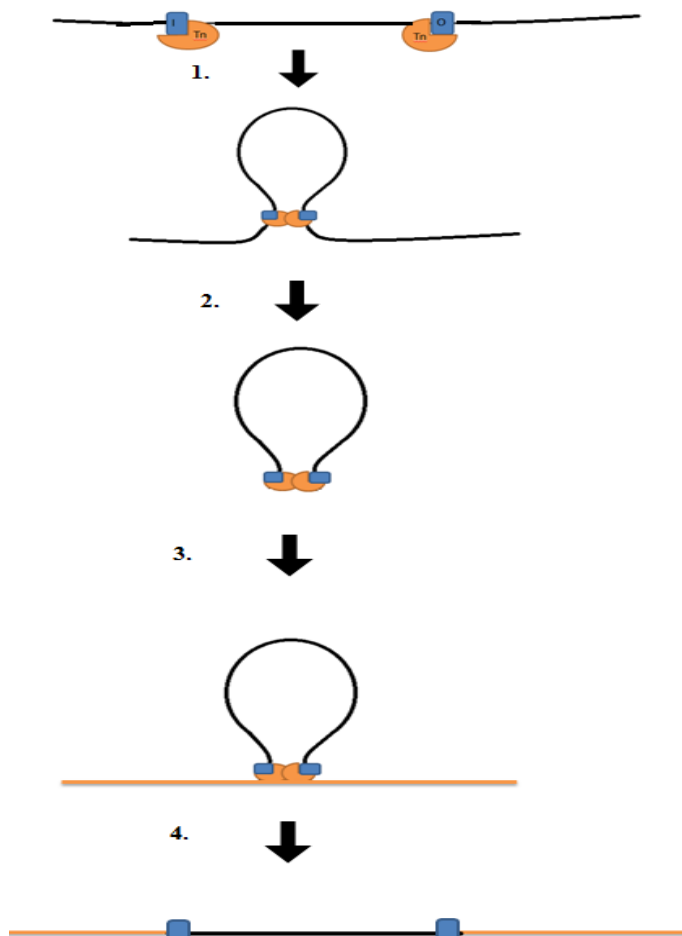
Konjugering er direkte overføring av DNA fra en bakteriecelle til en annen, og er en vanlig metode for å overføre DNA mellom ulike stammer og arter av gram-negative bakterier (Dale og Park 2010). I denne oppgaven ble konjugering brukt for å overføre DNA fra *E. coli* til *P. fluorescens* (Dale og Park, 2010). Det ble brukt to ulike måter for å inkorporere det overførte DNA-et inn i *P. fluorescens*. Disse måtene er forklart videre.

2.10.1 Konjugering for å overføre transposon

Transposon er mobile genetiske elementer som kan forflytte seg fra et sted til et annet i DNA. I denne metoden ble det brukt plasmid med transposon for å overføre DNA fra *E. coli* til kromosomet i *P. fluorescens* (Reznikoff, 2003). Plasmidene som ble brukt, som er derivater av pYQ1 inneholder gener som koder for transposase, men disse sitter ikke på selve transposonet (Figur 2.4). Plasmidet som ble brukt i denne oppgaven er også avhengig av proteinet pir for å replikere fra Ori R6K, noe som gjør at plasmidet ikke vil replikeres i *P. fluorescens*, da den ikke produserer Π -protein. En skjematisk skisse av hvordan transposon blir satt inn i kromosomet er vist i Figur 2.5.



Figur 2.4: Skisse av plasmid med minitransposon som ble brukt i oppgaven.



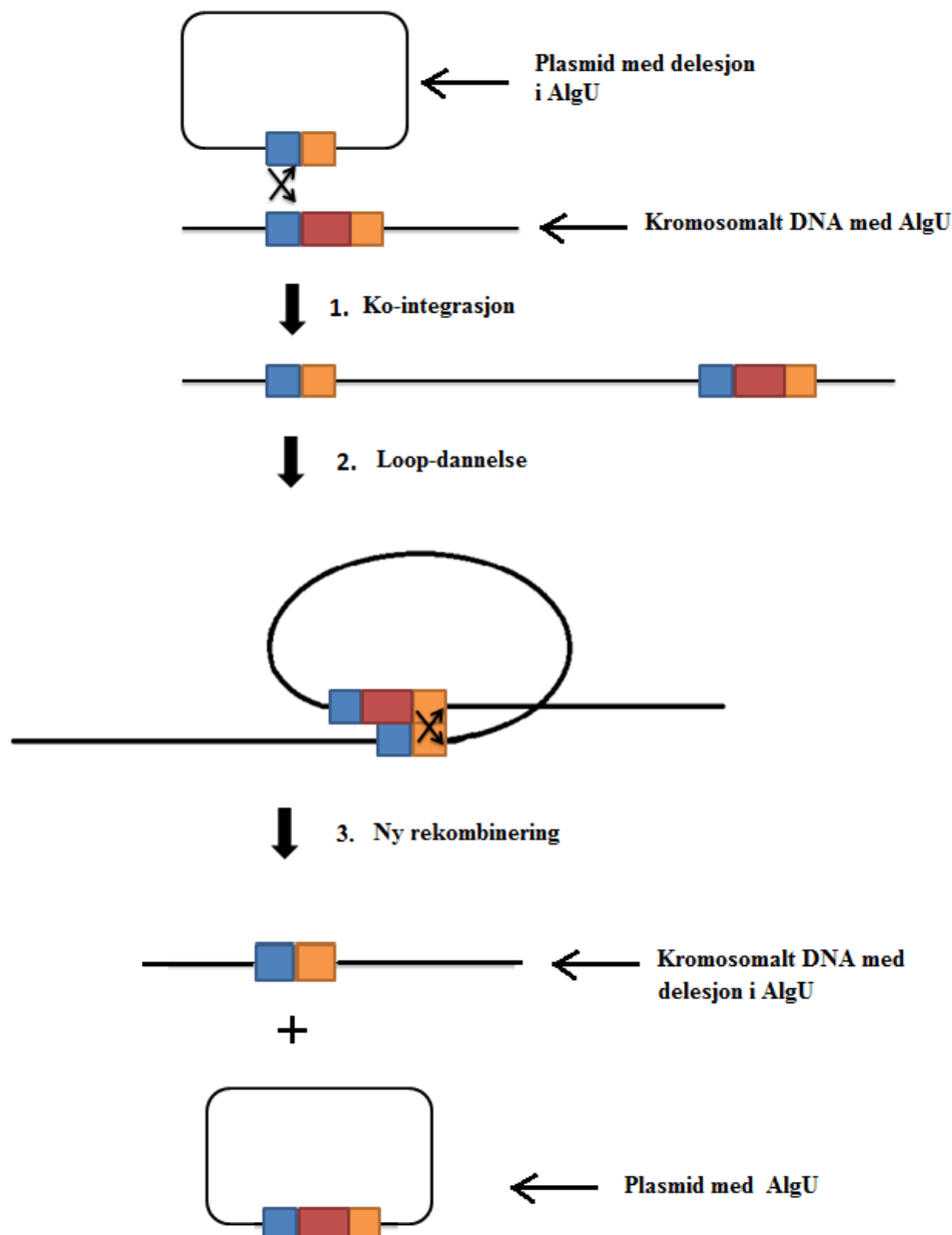
Figur 2.5: Mekanisme for innsetning av transposon. I trinn 1 skjer en assosiering av transposase slik at det dannes en loop. I trinn 2 kuttes DNA-et på dette punktet. I trinn 3 setter transposase-DNA-komplekset seg på mål-DNA. I trinn 4 introduseres det nye elementet til mål-DNA (Reznikoff, 2003).

For å konjugere plasmid til *P. fluorescens* ble først 1% kulturer av donor (*E. coli*) og mottaker (*P. fluorescens*) inkubert ved henholdsvis 37 og 30 °C til eksponentiell fase ($OD \approx 0,4$) ble nådd. Videre ble tilnærmet lik mengde bakterier blandet til totalvolum 6 ml. Kulturen ble sentrifugert (5000 rpm i 5 min) og supernatanten ble helt av. Pelleten ble resuspendert i den resterende væsken ($\approx 0,1$ ml), suspensjonen ble plassert på LA og inkubert over natt ved 30 °C. Videre ble suspensjonen skrapet av platen og en fortytningsserie ble laget. 100 μ l av fortytningene (10^{-2} , 10^{-4} og 10^{-6}) ble platet ut på PIA med Apr og inkubert ved 30 °C i 48 timer. Kolonier som kunne sees på PIA med apramycin, bestemt til å ha Tn5-elementet integrert i kromosomet og ble lagret ved -80 °C.

2.10.2 Homolog rekombinering

Konjugasjon ble også brukt til å overføre plasmid som skulle integreres i kromosomet til *P. fluorescens* ved homolog rekombinering. Rekombinering er en mekanisme hvor DNA kan overføres til et annet DNA-fragment ved å kutte både donor-DNA og mottaker-DNA, krysse de, og knytte dem sammen på nytt. En slik mekanisme krever at det finnes homologe regioner på DNA-molekylene som skal rekombineres. Dette kalles homolog rekombinering.. (Dale og Park, 2010). Overførselen av DNA på plasmidet i denne oppgaven til kromosom skjer ved to rekombineringer og en skjematisk tegning er vist i Figur 2.6.

Konjugeringen ble utført på samme måte som beskrevet i 2.10.1 frem til utplating av fortytningsserie. 100 μ l av fortytningene (10^{-2} , 10^{-4} og 10^{-6}) ble her platet ut på PIA (2.1.8) med X-gal og Tc og inkubert ved 30 °C i 48 timer. Det ble videre tatt to blå kolonier som ble inokulert i nytt LB-medium 1-2 ganger per dag i 2-4 dager. Før hver ny inokulering ble det tatt ut prøve fra kulturen og en ny fortytningsserie ble laget, og 100 μ l av fortytningene 10^{-5} og 10^{-7} ble platet ut på PIA med X-gal. Platene ble inkubert i to dager, før hvite kolonier ble overført til plater med og uten Tc. Kolonier som vokste på PIA uten Tc, men ikke med, ble testet ved PCR-analyse for å identifisere stammer hvor genvarianten med deleksjon, og ikke villtypen hadde blitt igjen i kromosomet.



Figur 2.6: Skisse av homolog rekombinering mellom plasmid med $\Delta algU$ og kromosomalt DNA med *AlgU*. De blå og oransje boksene illustrerer flankene av *AlgU*. Den røde boksen er den delen av *AlgU* som er tatt bort i $\Delta algU$. I trinn 3 kan det også skje en ny rekombinering mellom de blå boksene. Dette vil føre til en revertering til det opphavelige kromosomet/plasmidet (Heintz, 2001).

2.11 Isolering av G-lyase

Alginat lyaser er enzymer som bryter bindinger i alginat. Genet *alyA* fra *Klebsiella pneumoniae* koder for en lyase (AlyA) som bryter G-G og G-M bindinger i alginat (Tøndervik *et al.*, 2010). G-lyase ble isolert for å bruke til alginat-målinger i oppgaven. Produksjonen og isoleringen av G-lyase ble gjort i henhold til Tøndervik *et al.* (2010) som beskrevet videre.

E.coli rv308 med plasmid pAT77 ble inokulert i 3 ml 3X LB med 200 µg/ml ampicillin ved 30 °C over natt. Kulturen (3 ml) ble overført til 400 ml 3X LB med 200 µg/ml ampicillin i en 2000 ml kolbe med strømningsbrytere og inkubert ved 30 °C i 3 timer. Ekspresjon av lyasegenet ble induert ved tilsats av m-toluensyre til 0,5 mM, med videre inkubering i 4 timer. Etterpå ble cellene høstet ved sentrifugering (7000 rpm i 10 min), supernatanten ble fjernet og cellene ble frosset ved -80 °C (nedfrysning her er ikke nødvendig, men ble gjort av praktiske hensyn). Cellene ble tint og resuspendert i 40 ml 20mM Na₂HPO₄, 1mM CaCl₂, pH 6,8 og sonikert i 10 min. Videre ble prøven sentrifugert og filtrert (0,2 µm). Proteinet ble rensert ved bruk av 5-ml HiTrap HP SP kolonne ekvilibrert med 20 mM Na₂HPO₄, 1mM CaCl₂, pH 6,8. Proteinet ble eluert ved å bruke en trinnvis NaCl-gradient mellom 0 og 1 M. Programmet var stilt inn slik at det ga en sakte økning i saltkonsentrasjon fra 0 til 0,25 M da det var ventet at G-lyasen ville bli eluert i dette intervallet.

Enzymaktiviteten til alginat lyase ble bestemt ved å måle økning i A₂₃₀ som skyldes dannelse av umettede uronsyrer når lyase bryter bindinger i alginat. Målingene ble gjort i 1 ml reaksjonsmikse. Reaksjonsmiksen bestod av 50 µl alginat (20 mg/ml), 950 µl buffer (50 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,5) og 10 µl G-lyase. A₂₃₀ ble målt i 10 min med avlesning hvert 10. sekund på kinetikkprogram. 1 enhet enzymaktivitet (u) for lyaser er definert som den mengden enzym som øker A₂₃₀ med 1 per minutt. Aktiviteten ble bestemt ved å finne stigningstallet i det området hvor økningen i A₂₃₀ var lineær.

For en initiell vurdering av hvilke prøver som inneholdt AlyA (G-lyase) ble det først utført en nedskalert måling i 200 µl prøve. Det ble utført på samme måte som beskrevet under, men ved å bruke 1:5 av alle reagenser, og ble målt på en 96-brønns UV-plate.

2.12 Alginatmåling

Alginatmålingene ble gjort etter metoden utarbeidet av Kjetill Østgård (Østgaard, 1993). Alginat lyase bryter bindinger i alginat ved β-eliminering og gir umettede uronsyrer på den ikke-reduserende enden. De umettede uronsyrene absorberer mye lys ved 230 nm. Ved tilsats av G- og M-lyase vil mengden umettede uronsyrer i forhold til den initielle mengden være proporsjonal med A₂₃₀. Metoden baserer seg på å måle økningen i A₂₃₀ i prøvene, og ved å sammenligne denne økningen med økninger av kjente konsentrasjoner av alginat kan alginatkonsentrasjonen bestemmes (Østgaard, 1993). Alginatmålingene ble utført som beskrevet under.

En forkultur av bakterien ble inkubert over natt i PIM (2.1.9) ved 30 °C. 0,1 ml av kulturen ble overført til 9,9 ml PIM tilsatt proteaser (0,15 ml/l av Alkalase 2,4L og Nøytrase 0,5L fra Novozymes). Proteasene ble tilsatt for å hindre enzymatisk aktivitet som kan påvirke alginatmengden i forsøket. Kulturen ble inkubert i 48 timer og OD₆₀₀ ble målt.

1,00 g kultur ble tatt ut og fortynnet med 4 ml 0,2 M NaCl og mikset godt. 3 ml ble tatt ut og fordelt på to 1,5 ml sentrifugerør. Rørene ble sentrifugert (13000 rpm i 10 min) og 1 ml supernatant ble overført til nye rør. 33 µl natriumhydroksid (NaOH) ble tilsatt og prøvene ble frosset ved -20 °C.

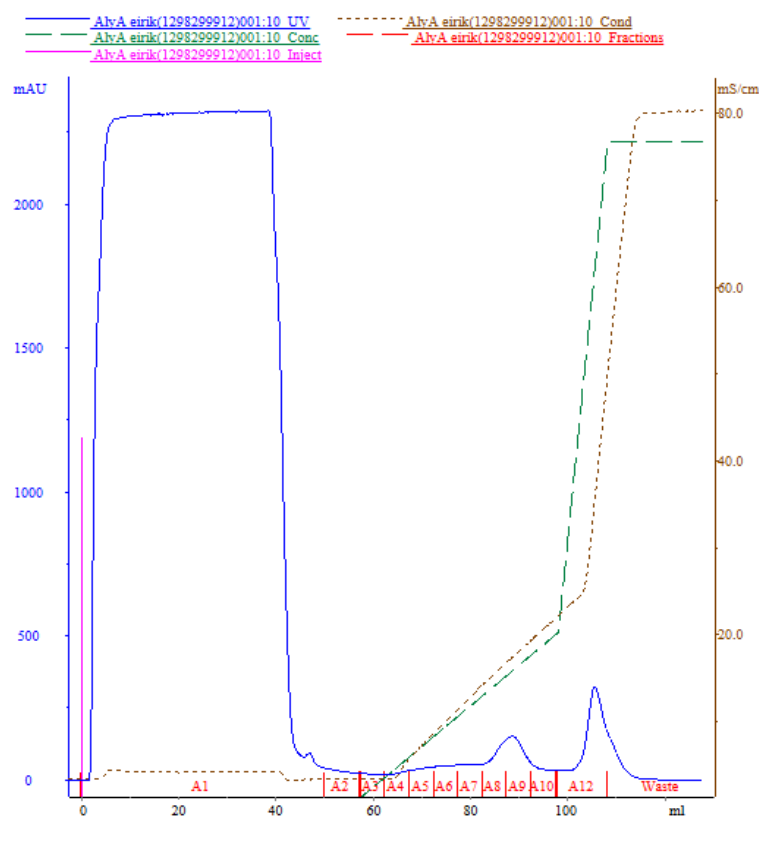
Prøvene ble tint og deacetylerert ved risting i 1 time og videre sentrifugert (13000 rpm i 10 min). 100 µl supernatant ble overført til nytt rør og 300 µl buffer (0,05 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1mM CaCl₂, pH 7,5) ble tilsatt.

Til standardkurve med kjente konsentrasjoner av alginat ble alginat (LF 10/60) løst i destillert vann og standarder med konsentrasjoner fra 0,0 til 0,5 g/l brukt. Til målingen ble det brukt en 96-brønns UV-plate fra Costar. 150 µl buffer (0,05 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 1mM CaCl₂, pH 7,5) ble tilsatt hver brønn og 75 µl av prøve eller standard, med 3 paralleller for hver prøve. A₂₃₀ ble målt. Videre ble det tilsatt 0,008 u av M-lyase og G-lyase og prøvene ble inkubert ved romtemperatur. A₂₃₀ ble målt etter 3 og 4 timer. Da det ikke ble observert økning i A₂₃₀ fra 3 til 4 timer, ble det antatt at reaksjonen er ferdig og forsøket ble avsluttet.

3 Resultater

3.1 Isolering av G-lyase

Enzymene G-lyase og M-lyase er nødvendige for å kunne utføre alginatmålinger som beskrevet i 2.11. Siden G-lyase ikke var tilgjengelig, ble enzymet produsert som beskrevet i 2.12. Figur 3.1 viser resultatet av FPLC-kromatografi og viser hvordan forsøket gikk med hensyn på hvor, og ved hvilke saltkonsentrasjoner, protein ble eluert. Programmet som ble brukt ga først en sakte økning i saltkonsentrasjon opp til 0,25 M NaCl (Dette er vist med grønn stiplet linje frem til 100 ml eluert prøve). Konsentrasjonsøkningen fra 0,25 M til 1 M NaCl var over et kortere intervall, da det var forventet at AlyA skulle bli eluert før 0,25 M NaCl ble nådd. Som Figur 3.1 viser, er det en topp i A_{230} i intervallet A8 til A9. Det lokale maksimumet, der mest protein ble eluert i denne toppen ut tilsvarer en saltkonsentrasjon på ca. 0,19 M NaCl.



1 (8)

Figur 3.1: FPLC av AlyA (G-lyase). Blå linje viser absorbans ved 280 nm. Grønn linje viser konsentrasjon av NaCl. Brun linje viser konduktivitet og de røde strekene markerer fraksjonene som eluatet ble delt opp i.

Alle prøvene ble først testet for lyaseaktivitet med en nedskalert måling. Data fra disse målingene er vist i Vedlegg E. Det ble påvist enzymaktivitet i prøvene A8, A9, A10, A11 og i A1-2 (void). A1-2 ble ikke brukt videre pga. at void-prøver ikke er rene nok. Prøvene A8, A9, A10 og A11 ble testet videre for enzymaktivitet ved bruk av 1 ml-måling. Ut fra disse målingene som er vist i Vedlegg E ble konsentrasjon av AlyA bestemt. Konsentrasjon og mengde av AlyA i de ulike prøvene er vist i Tabell 3.1.

Tabell 3.1: Aktivitet av AlyA

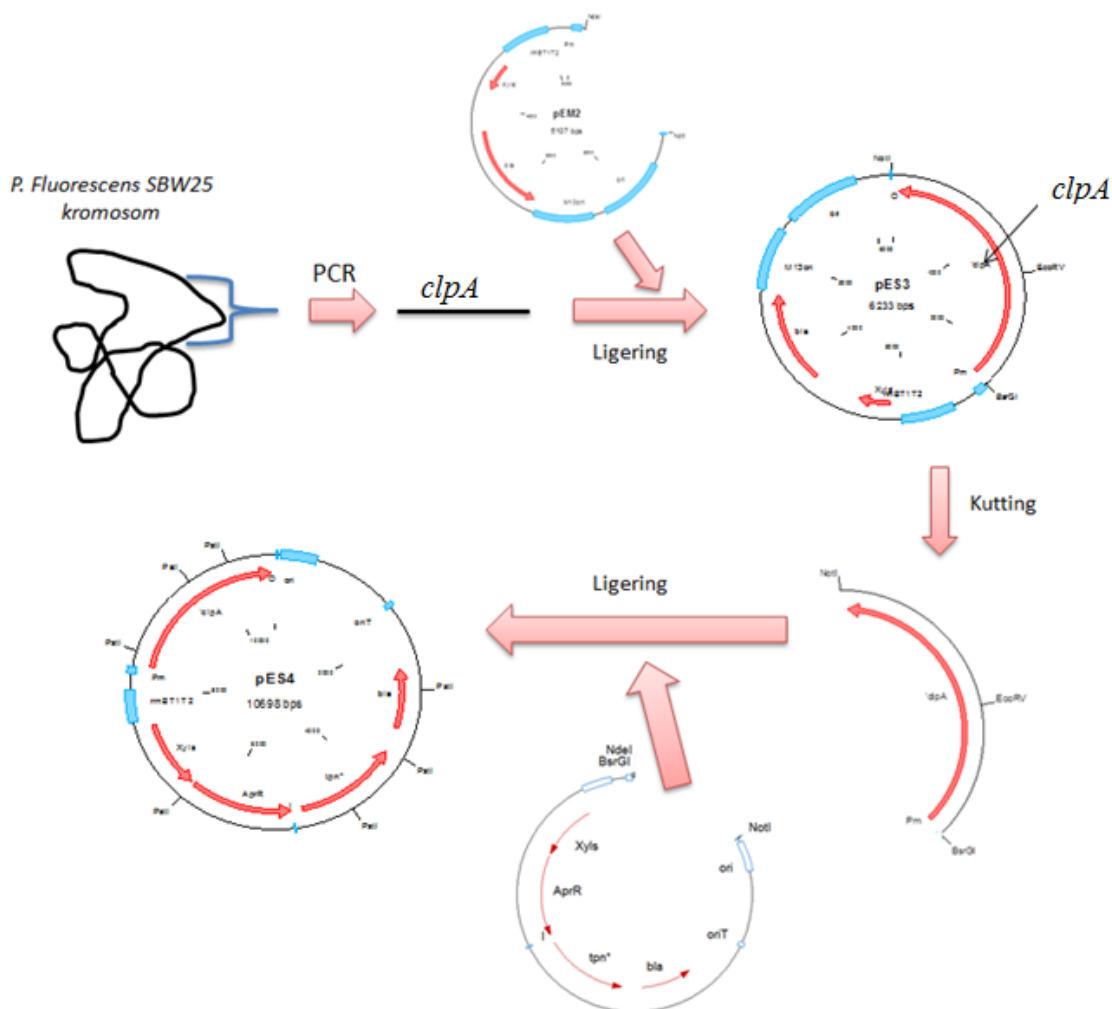
Prøve	Konsentrasjon av AlyA-aktivitet (u/ml)	Volum prøve (ml)	Aktivitet AlyA (u)
A8	34,8	5	174
A9	64,8	5	324
A10	4,2	5	21
A11	2,4	1	2,4

Totalt ble det isolert 521,4 u AlyA fra den opprinnelige kulturen på 400 ml, noe som er nok til å måle økning i A_{230} i ca. 65 tusen prøver (0,008 u per prøve).

3.2 Komplementering av *clpA*

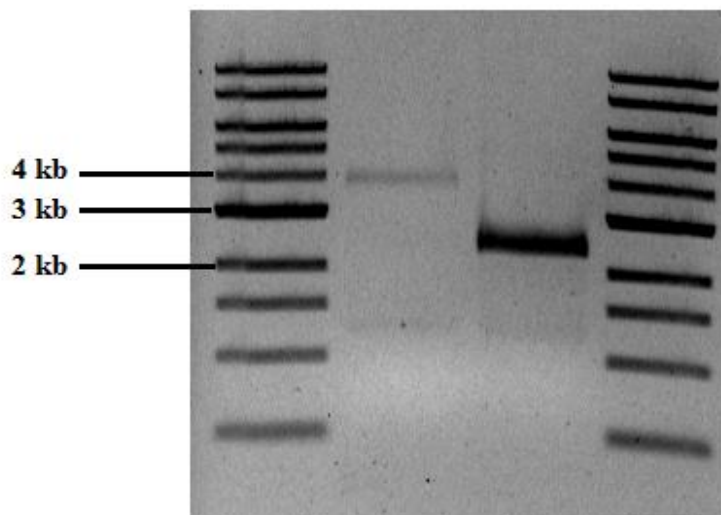
Ved et tidligere forsøk er det utført en transposonmutagenese hvor *clpA* ble inaktivert. Dette førte til en signifikant økning av alginatproduksjonen i 2 medier (DEF3 glyserol/fruktose), og en signifikant reduksjon i PIM. For å verifisere at muteringen av *clpA* var årsaken til den endrede alginatproduksjonen, ble villtype-*clpA* satt tilbake i den muterte stammen for å se om dette resulterte i alginatproduksjon som villtypen. For å gjøre dette måtte villtype-*clpA* overføres til *P. fluorescens*, og et plasmid med *clpA* som kunne overføres måtte konstrueres. En oversikt over hvordan dette plasmidet ble konstruert er vist i Figur 3.2.

Det ble utført PCR for å amplifisere *clpA* fra *P. fluorescens* SBW25 med primerene ClpAF og ClpAR (Vedlegg C). PCR-produktet *clpA* og pEM2 ble videre kuttet med NdeI og NotHF og separert på gel som vist i Figur 3.3. *clpA*-fragmentet og pEM2-fragmentet (3,9 kb) ble isolert fra gelen og *clpA* ble ligert inn i pEM2-fragmentet. Ligeringsblandingen ble transformert til *E. coli*. Plasmidet ble isolert fra 4 transformanter og sjekket med restriksjonsenzymer som vist i Figur 3.4. Brønn 2 og 4 ble antatt å inneholde det riktige plasmidet og ble tatt med videre til verifisering ved sekvensering.

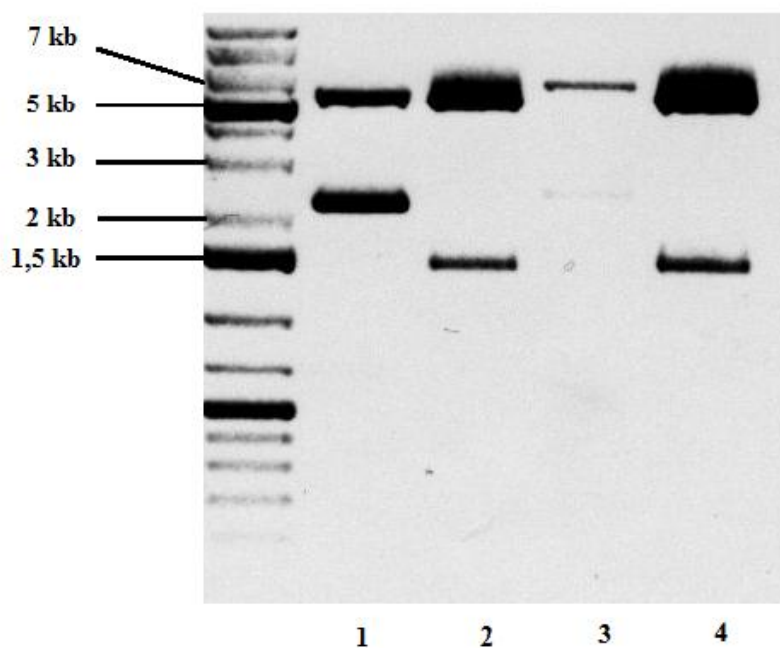


Figur 3.2: Kloningsskisse for komplementering av *clpA*

Ved sekvensering av prøven fra brønn 4 ble det påvist en punktmutasjon ved 576 nt i forhold til det forventede plamidet. Punktmutasjonen endret aminosyreprodukt fra glutamin til arginin. Sekvenseringen av prøven fra brønn 2 viste imidlertid korrekt sekvens, som vist av sekvensdata i Vedlegg B. Prøven ble derfor bestemt til å inneholde pES3.



Figur 3.3: Kloning av *clpA*. *clpA* (høyre) og pEM2 (venstre) er kuttet med NdeI og NotHF. Dette skulle gi pEM2-fragmenter på 3,9 kb + 1,2 kb og *clpA*-fragment på 2,3 kb.

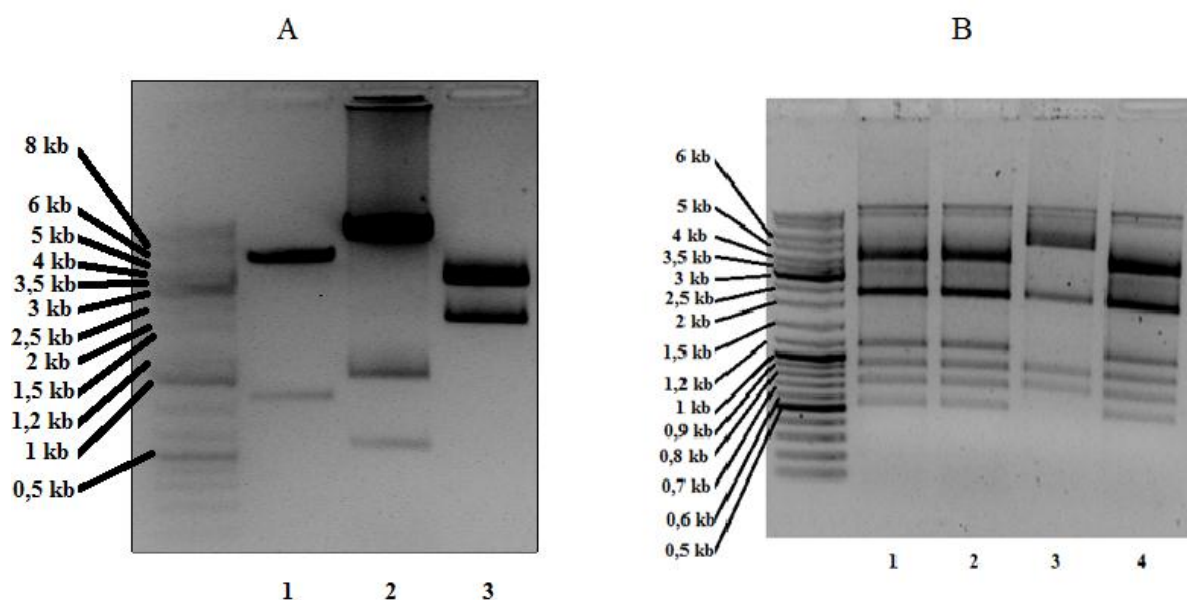


Figur 3.4: Restriksjonsanalyse av ligert pEM2-fragment og *clpA*-fragment kuttet med EcoRV og NotI. Kuttingen skulle gi fragmenter på 4,9 kb og 1,4 kb.

Videre ble *clpA* kuttet ut av pES3 og ligert inn i pYQ1. Kuttingen av pES3 og pYQ1 er vist i Figur 3.4 A. Fragmentet på 2,4 kb fra kuttet pES3 og 8,2 kb fra kuttet pYQ1 ble isolert fra gelen og brukt videre. pES3-fragmentet og pYQ1-fragmentet ble ligert og transformert til *E.*

coli. Plasmid ble isolert fra 4 transformanter. Figur 3.5B viser restriksjonsanalyse av antatt pES4. Av Figur 3.4 3.5 B kan det se ut som det mangler et fragment (kun 6 på bildet). Det kan se ut som om fragmentene på 2,2 kb og 2,0 kb har gått inn i hverandre. Prøven i brønn 3 ser ut til å inneholde pYQ1, siden fragmentene på 1,1 og 0,5 mangler. pYQ1 (6,2 kb + 2,2 kb + 0,89 kb + 0,86 kb) skal heller ikke gi fragmentet på 2,0 kb. Ved å sammenligne båndene på rundt 2 kb kan det observeres at båndene i de andre brønnene har vandret noe lengre enn det i brønn 3. Dette tyder på at fragmentene i de andre brønnene ikke har blitt separert godt nok, men at de inneholder fragmentet på 2,0 kb. Alle fragmentene stemmer heller ikke helt i størrelse i forhold til standarden. Det er en tendens til at de virker større enn hva som skal være tilfelle. Da disse resultatene ble utarbeidet, ble metoden for farging av gel endret, noe som viste seg å føre til en del usikkerhet i DNA-fragmentenes vandring i gelen. Det ble derfor gått ut fra at størrelsen på fragmentene var riktig.

Båndene som skal være 0,86 kb og 0,89 kb er for godt separert på gelen til at det kan være så liten forskjell i størrelse på fragmentene. Ved å se på plasmidkartet for pES4 kan man se at disse fragmentene er resultat av kutting i vektoren, og ikke i *clpA*. På grunnlag av dette ble det konkludert med at vektoren ikke var helt som den skulle. Plasmidet ble likevel brukt videre siden restriksjonsanalysen viste at *clpA* var i vektoren, og ble kalt pES4.

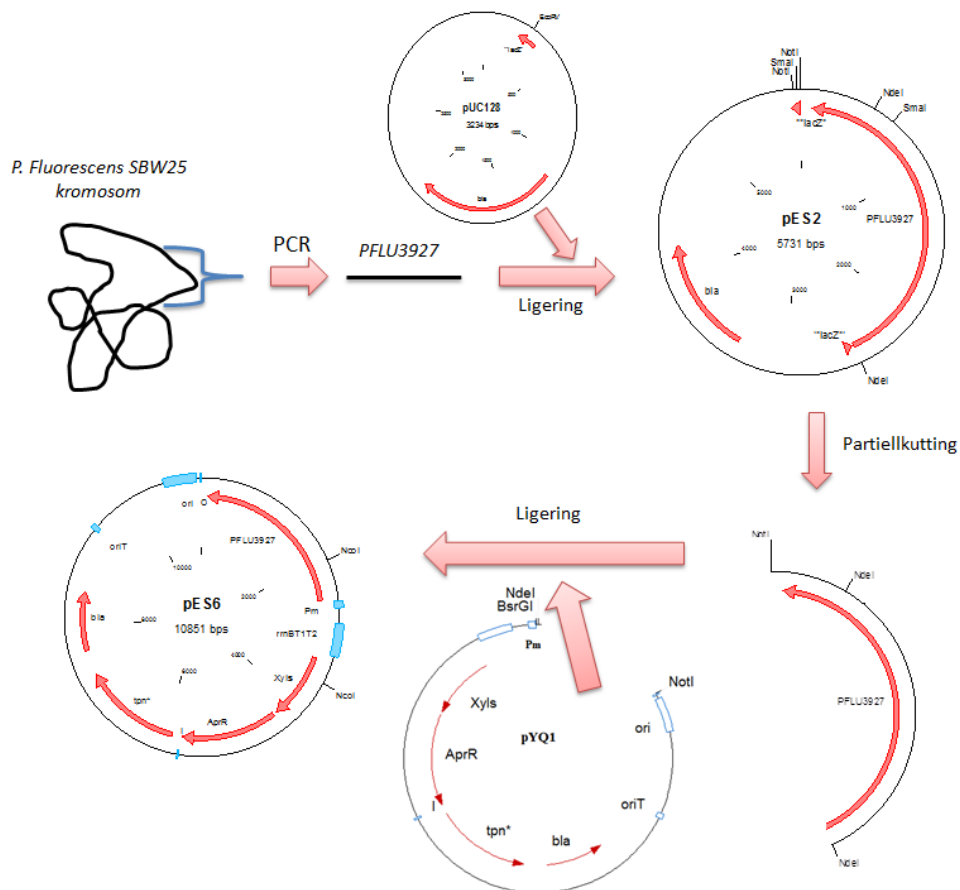


Figur 3.5 A: Kloning av pES3 (3,9 kb + 2,4 kb) (brønn 3) og YQ1 (8,2 kb + 1,2 kb + 0,5 kb) (brønn 2) kuttet med BsrGI og NotHF. B: Restriksjonsanalyse av PstI-kuttete transformanter. Forventede fragmenter var på: 3,2 kb + 2,2 kb 2 kb + 1,1 kb + 0,89kb + 0,86 kb + 0,5 kb.

Videre ble pES4 konjugert til *P. fluorescens* 30O1. pES4 er et plasmid med minitransposon som beskrevet i 2.10.1 og ved bruk av transposon ble villtype-*clpA* satt inn i *P. fluorescens* 30O1 hvor dette genet var inaktivert. Det ble utført alginatmålinger som beskrevet i 2.12 på *clpA*⁻–stammen og den komplementert med villtype-*clpA*. Hensikten med dette var å se om ClpA hadde en effekt på alginatproduksjonen, som har blitt påvist ved tidligere forsøk. pES4 ble også konjugert til *P. fluorescens mucA*⁻. Grunnen til at pES4 ble konjugert til denne mutanten var for å se om overuttrykk av *clpA* hadde effekt på denne stammen.

3.3 Komplementering av *PFLU3927*

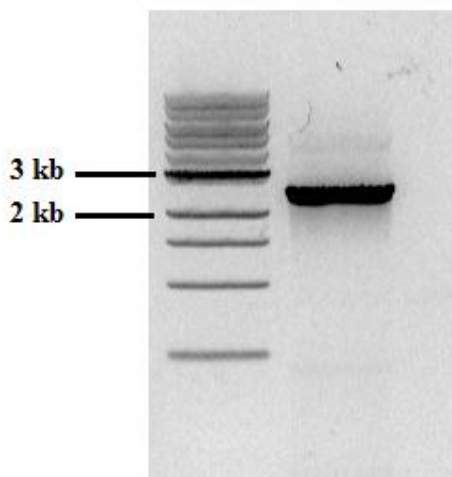
På samme måte som for ClpA beskrevet i 3.2 ble *PFLU3927* komplementert. En skjematisk beskrivelse av kloningsarbeidet er gitt i Figur 3.6.



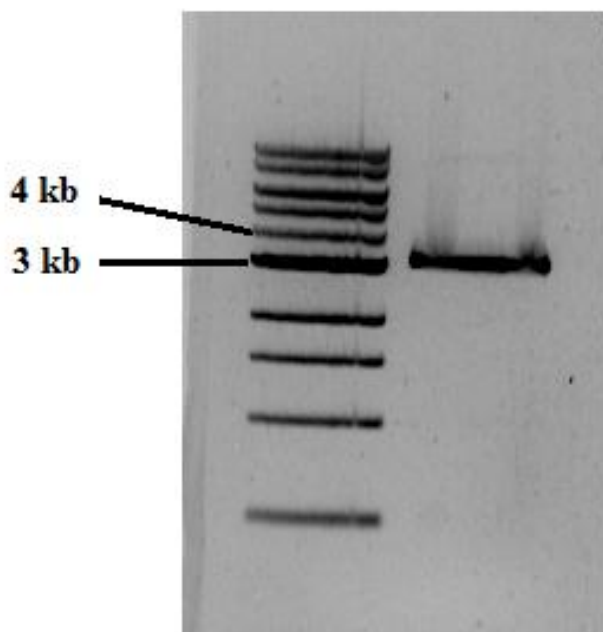
Figur 3.6: Kloningsskisse for komplementering av *PFLU3927*

Først ble det utført PCR for å amplifisere genet *PFLU3927* med primerne PFLU3927 F og PFLU3927 R. på *P. fluorescens SBW25*. PCR-produktet ble sjekket på gel som vist i Figur 3.7. *PFLU3937* skulle settes inn i pUC128 og pUC128 ble derfor kuttet med EcoRV som vist i Figur 3.8. *PFLU2927* og kuttet pUC128 ble så ligert og transformert til *E. coli*. 4 transformanter ble sjekket ved kutting som vist i Figur 3.9. Prøvene i brønn 1 og 4 så ut til å være riktige og ble derfor sendt inn til sekvensering.

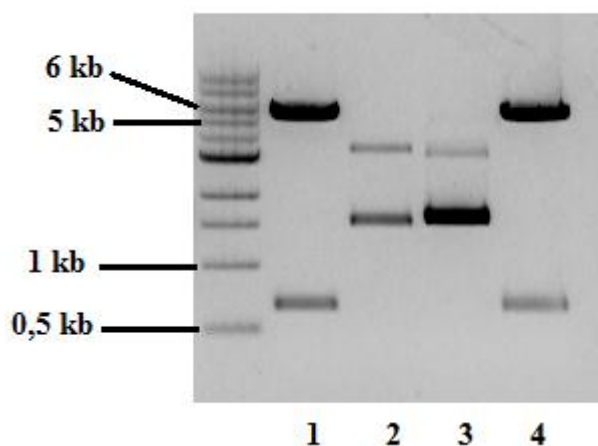
Sekvenseringen viste at prøven fra brønn 1 inneholdt en punktmutasjon som ville resultert i endring av aminosyre. Sekvensdata fra brønn 4 viste også en punktmutasjon på 325 nt i forhold til 128PFLU3927A (Vedlegg B). På denne posisjonen var en tymin endret til cytosin. Denne mutasjonen viste seg å være en stille mutasjon som ikke ville endre aminosyre (lysin). Det ble derfor konkludert med at plasmidet kunne brukes, og plasmidet er heretter referert til som pES2.



Figur 3.7: PCR-amplifisering av PFLU3927. PCR-produktet skulle være 2,5 kb.

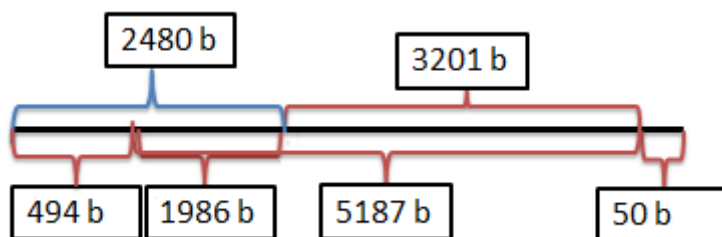


Figur 3.8: pUC128 kuttet med EcoRV. Forventet fragment var på 3,2 kb.



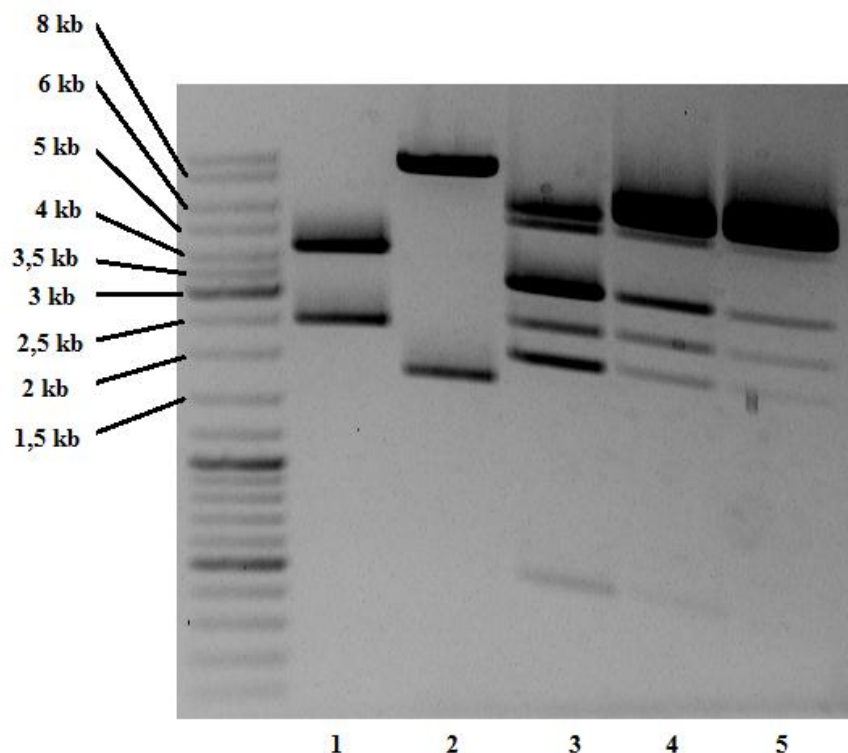
Figur 3.9: Restriksjonsanalyse av transformanter kuttet med SmaI. Forventede fragmenter er på 5,1 kb + 0,7 kb.

pES2 ble brukt videre for å overføre *PFLU3927* til pYQ1. For å kunne overføre *PFLU3927* fra pES2 og inn i pYQ1 i ett trinn ved bruk av enzymene NotI og NdeI, ble det gjort en partiellkutting med NdeI, siden NdeI har gjenkjenningssekvens inni *PFLU3927*. Partiellkuttingen ble utført ved å lage en fortynningsgradient av enzym mellom prøver som allerede var fullstendig kuttet med NotI, slik at det var stor sjanse for at en av disse hadde fragmenter som kun var kuttet på enden av *PFLU3927*, og ikke i genet. De forventede fragmentene av kuttingen er vist i Figur 3.10.



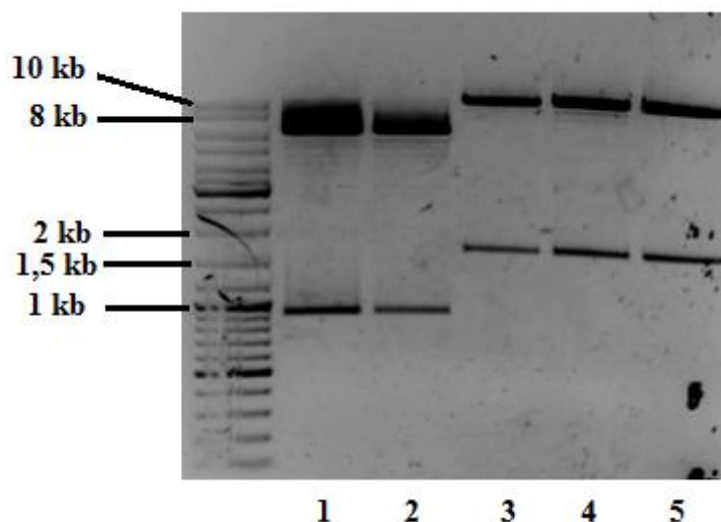
Figur 3.10: Partiellkutting av pES2. pES2 ble kuttet fullstendig med NotI slik at det ble dannet et lineært fragment som vist i figuren. Partiellkuttingen ga fragmenter som vist, og det ønskede fragmentet er vist med blå klamme.

Resultatet av partiellkuttingen er vist i Figur 3.11. Det var tydelig mest av det ønskede fragmentet på 2,5 kb i brønn 3 og 4 og båndet ble kuttet ut av gel fra disse brønnene. Kuttingen av pYQ1 hadde forventede fragmenter på 8,4 kb og 1,7 kb og fragmentet på 8,4 kb ble isolert fra gel og brukt videre i kloningen.



Figur 3.11: Partiellkutting av pES2 (brønn 3-5) og kutting av pYQ1 (brønn 2) med NotI og NdeI. Forventede fragmenter for pYQ1 var på 8,4 kb og 1,7 kb. Forventede fragmenter for pES2 er vist i Figur 3.10. I brønn 1 er det en prøve med forventede fragmenter på 3,9 kb og 2,3 kb (ikke med under konstruksjon av pES6)

Til slutt ble partiellkuttet pES2 og kuttet pYQ1 ligert sammen til pES6. Kontrollkutt av pES6 er vist i Figur 3.12. Av figuren kan det se ut som om det største fragmentet har vandret for kort til å være pES6. Det samme hadde imidlertid skjedd i brønn 1 og 2 med en et annet plasmid, hvor det var forventet fragmenter på 5,5 kb og 0,9 kb. Det ble derfor konkludert med at plasmidet var riktig.

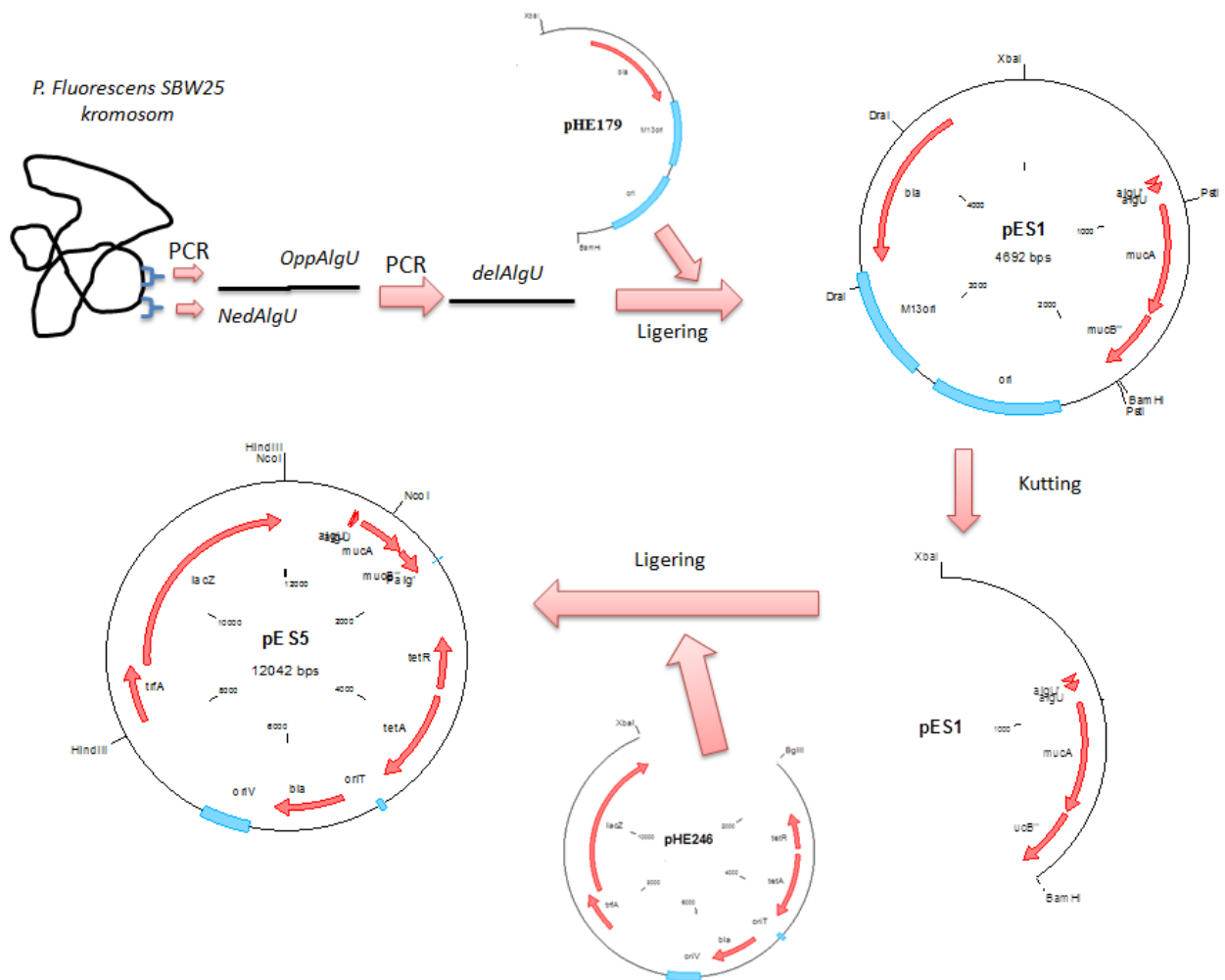


Figur 3.12: Restriksjonsanalyse av ligert *PFLU3927* fra pES2 og pYQ1 transformert til *E. coli* kuttet med *NcoI* og (brønn 3-5). Forventede fragmenter var på 9,3 kb + 1,6 kb. I brønn 1 og 2 er det plasmid med forventede fragmenter på 5,5 kb og 0,9 kb (ikke relevant for konstruksjon av pES6).

Videre ble pES6 konjugert til *P. fluorescens* 17p19 hvor *PFLU3927* var inaktivert. pES6 er et plasmid med minitransposon. Ved bruk av mekanisme beskrevet i 2.10.1 ble *PFLU3927* satt inn i *P. fluorescens* 17P19 hvor *PFLU3927* var inaktivert. pES6 ble også konjugert til til *P. fluorescens mucA*⁻ for å se om overuttrykk av *PFLU3927* ville påvirke alginatproduksjonen i denne stammen.

3.4 Delesjon av *algU*

I tidligere arbeid er det laget en stamme av *P. fluorescens* hvor *algD*-operonet er satt under kontroll av Pm-promotoren, slik at alginatproduksjonen ikke lenger er avhengig av AlgU/Muc-balansen. For å vise at alginatproduksjonen i denne stammen virkelig er uavhengig av AlgU, ble laget et plasmid som inneholdt de flankerende genene til *algU*, men der det meste av *algU* var fjerna. Plasmidet ble brukt til å erstatte villtype-*algU* med deletert *algU* ved homolog rekombinering. En skisse av kloningsarbeidet er vist i Figur 3.13.



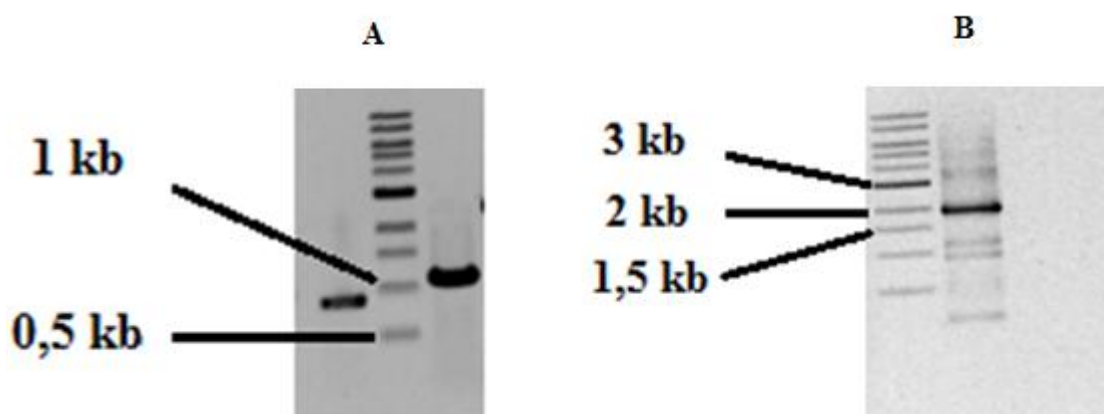
Figur 3.13: Kloningsskisse for innføring av delesjon i *algU*.

Innføringen av delesjon i *algU* ble gjort ved å først amplifisere flankene av *algU* fra *P. fluorescens*. Fragmentene ble kalt OppAlgU og NedAlgU. OppAlgU ble amplifisert ved bruk av primerene OppAlgUF og OppAlgUR. NedAlgU ble amplifisert ved bruk av primerene NedAlgUF og NedAlgUR. Videre ble det gjort en ny PCR med en blanding av OppAlgU og NedAlgU og primerene OppAlgUF + NedAlgUR. Siden primerene som ble brukt innad i *algU* er komplementære til hverandre som vist i Figur 3.14, vil endene på OppAlgU og NedAlgU hybridisere og ved PCR bli til ett fragment. Denne sammenføyingen gir et fragment der start- og stoppkodon fremdeles er i samme leseramme, men det innføres en stor delesjon i genet. Fragmentet ble kalt $\Delta algU$. Agarose gelelektroforese av de PCR-amplifiserte flankene av *algU* er vist i Figur 3.15. Opp AlgU skulle ha lengde på 0,9 kb og NedAlgU 1,1 kb. Dette passer med Figur 3.15A og fragmentene ble brukt videre. Forventet lengde på $\Delta algU$ var 1,9 kb og stemmer med Figur 3.15B, og $\Delta algU$ ble brukt videre i kloningsarbeidet.

OppAlgUR* : 3' GAAGAGGATCAGCAGCTGGTCCGGGAAGCCA 5'

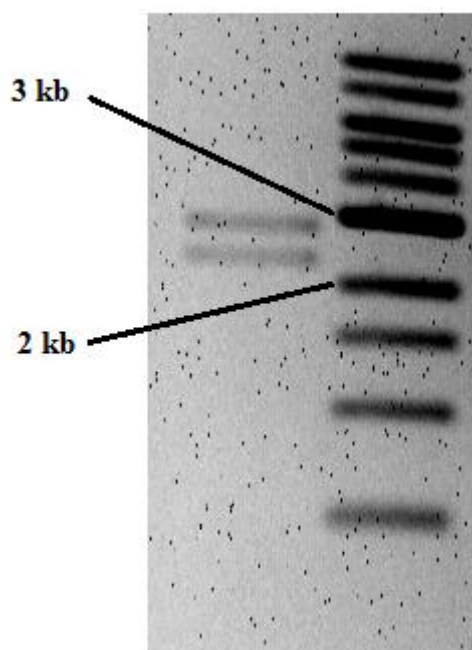
NedAlgUF : 5' CAGCAGCTGGTCCGGGAAGCCATCGATAAAGC 3'

Figur 3.14: Komplementære primere



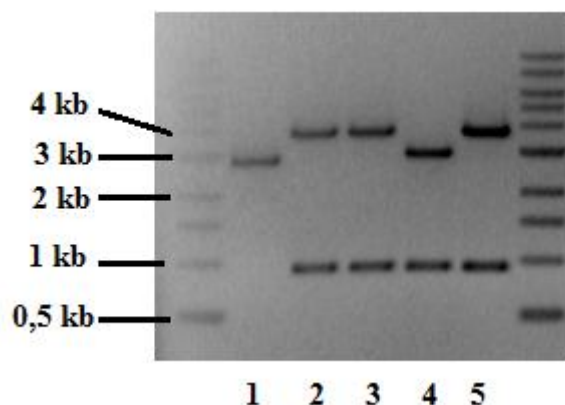
Figur 3.15: PCR-amplifisering av DNA som flankerer *algU*. A: OppAlgU (venste brønn) og NedAlgU (høyre brønn) B: $\Delta algU$

$\Delta algU$ ble videre ligert inn i pHE179 ved å først kutte med XbaI og BamHI. Kutteproduktet av $\Delta algU$ ble renset ved bruk av spin-protokoll, mens kutteproduktet av pHE179 ble separert på gel som vist i Figur 3.16, hvor fragmentet på 2,8 kb ble isolert fra gelen og renset.



Figur 3.16: pHE179 kutte med XbaI og BamHI. Forventede fragmenter på 2,8 kb + 2,3 kb.

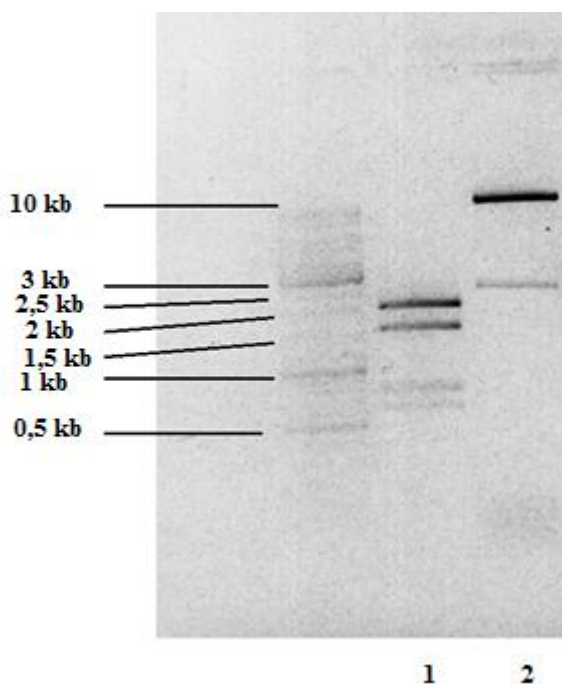
Kutteproduktene av *ΔalgU* og pHE179 ble ligert sammen og transformert til *E. coli*. Plasmider ble isolert og sjekket ved restriksjonskutting som vist i Figur 3.17.



Figur 3.17: Restriksjonskutting av plasmid som skulle inneholde *ΔalgU* med PstI. Forventede fragmenter var på 3,8 kb + 0,9 kb.

Fragmentene i Figur 3.17 stemte med forventede bånd for brønn 2,3 og 5. Disse ble sendt videre til sekvensering. Prøven i brønn 3 viste korrekt sekvens og den ble derfor bestemt til å være pES1, og ble brukt videre i kloningsarbeidet. Sekvenseringsresultatet av pES1 er vist i Vedlegg B.

For å overføre delAlgu til *P. fluorescens* ble $\Delta algU$ ligert inn i pHE246, et konjugativt plasmid som kan overføres til *P. fluorescens*. For å gjøre dette ble først pHE246 kuttet med XbaI + BglII, og pES 1 med XbaI + BamHI + DraI. Resultatet av kuttingen er vist i Figur 3.18. Fragmentene i figuren stemte med de forventede. Fragmentet på 10,2 kb fra pHE246 og fragmentet på 1,9 kb ($\Delta algU$) fra pES1 ble isolert fra gelen og brukt videre.

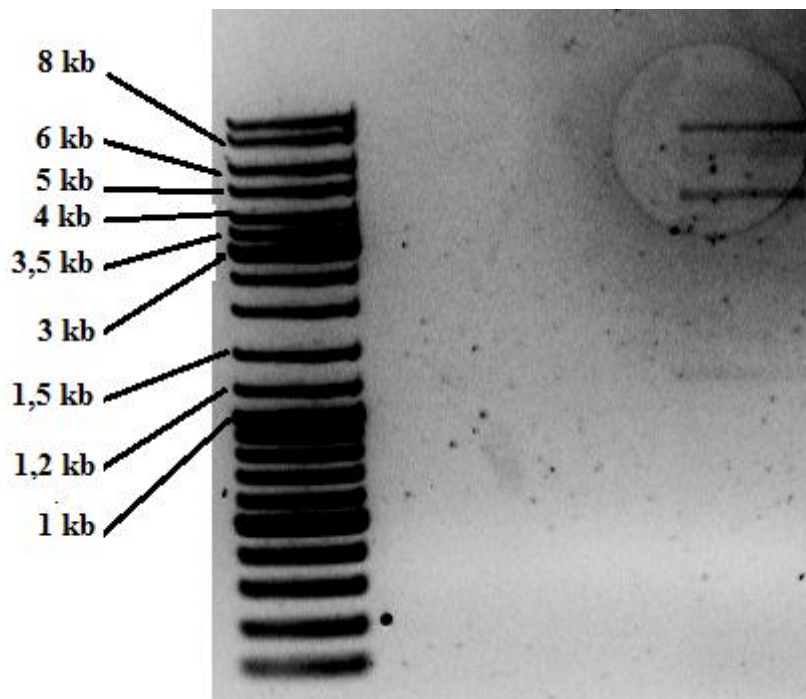


Figur 3.18: Kutting av pES1 og pHE246. pES1 ble kuttet med XbaI + BamHI + DraI (brønn 1) med forventede fragmenter på 1,9 kb + 1,4 kb + 0,8 kb + 0,6 kb. Kutting av pHE246 med XbaI og BglII (brønn 2) med forventede fragmenter på 10,2 kb + 2,3 kb.

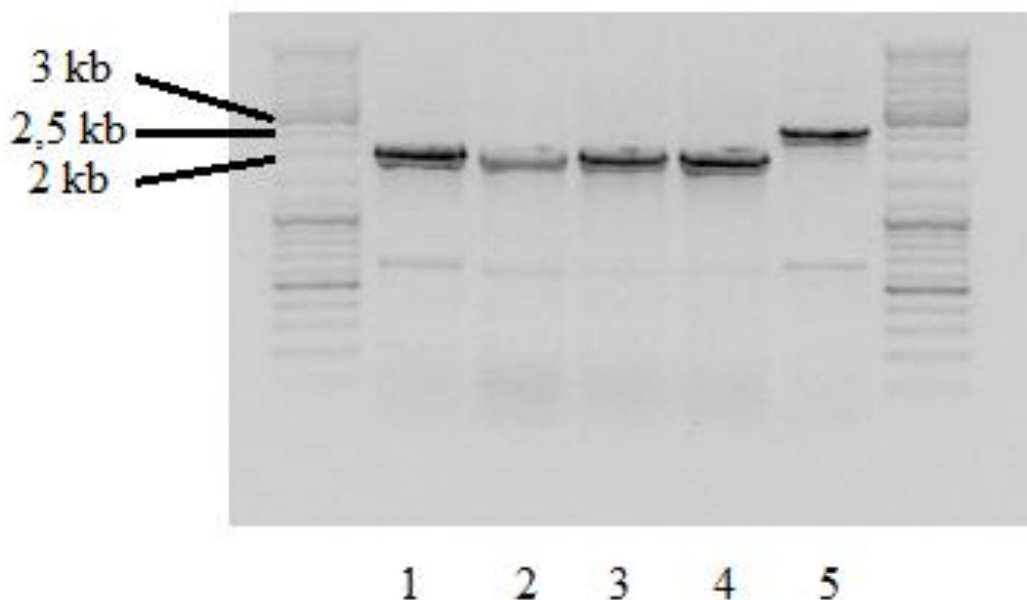
Videre ble $\Delta algU$ -fragmentet ligert sammen med pHE246-fragmentet og transformert til *E. coli*. pHE246 ble brukt fordi det kan overføres til *P. fluorescens*. Plasmid ble isolert fra transformanter og restriksjonsanalyse ble utført som vist i Figur 3.19. Fragmentene i prøven stemte med de forventede, og prøven ble bestemt til å være pES5. Det var veldig lite av fragmentene i prøven, noe som kommer av at plasmidet er lavkopitallsplasmid.

pES5 ble så konjugert til *P. fluorescens* SBW25 MS1 $\Delta algC::TnKb60$ og overført til kromosomet ved homolog rekombinering. For å sjekke om $\Delta algU$ var blitt overført til kromosomet og hadde erstattet villtype-*algU* ble PCR utført på 4 stammer med primerene OppAlgUF og NedAlgUR som amplifiserer villtype-*algU*/ $\Delta algU$. De PCR-amplifiserte

fragmentene ble separert på gel som vist i Figur 3.20. Analysen viste at alle koloniene hadde *ΔalgU* varianten i kromosomet.



Figur 3.19: pES5 kuttet med *HindIII* og *NcoI*. Forventede fragmenter var 6,9 kb + 3,9 kb + 1,2 kb.

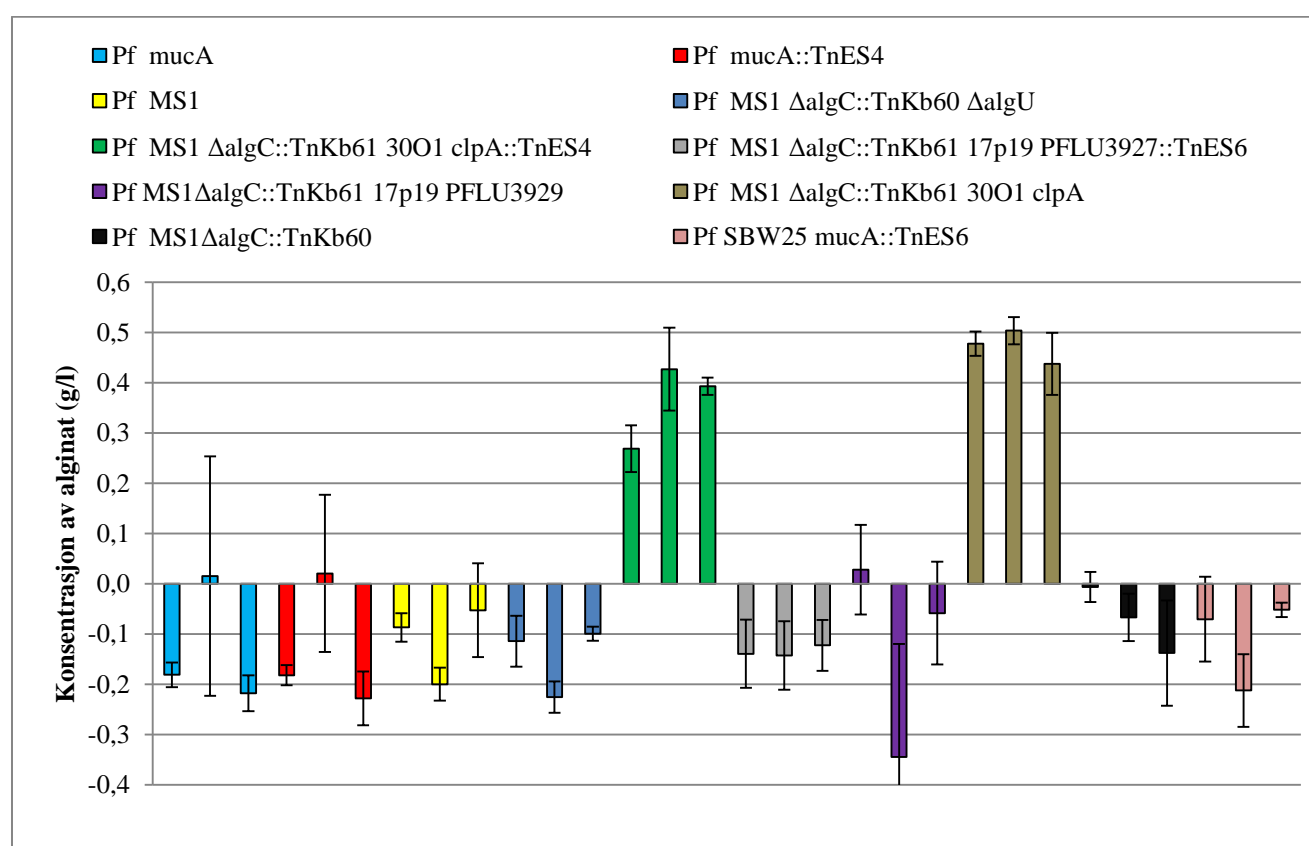


Figur 3.20: PCR-analyse av *P. fluorescens ΔalgU* rekombinanter. Brønn 1-4 er kolonier hvor *ΔalgU* har blitt konjugert og forsøkt rekombinert til *P. fluorescens*. Brønn 5 er PCR av villtype-*algU*. Lengde på *ΔalgU* er 1,9 kb, på villtype-*algU* 2,4 kb.

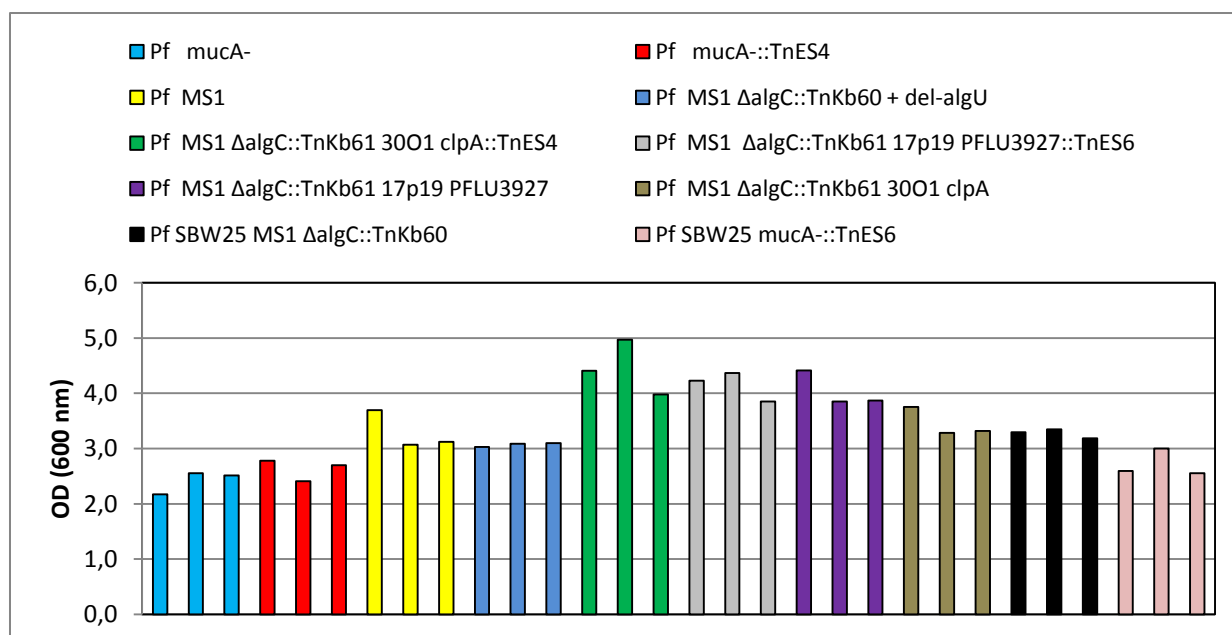
3.5 Måling av alginatproduksjon

Målet med oppgaven var å se på effekten av mutasjonene på alginatproduksjon. For å gjøre dette ble stammene dyrket i PIM med proteaser i 48 timer. OD_{600} ble målt etter 48 timer (Figur 3.22) og prøver ble tatt ut til måling av alginatproduksjon. Prøvene ble målt etter metode beskrevet i 2.12.

Resultatene av alginatmålingene er vist i Figur 3.21 og Figur 3.23. Som figurene viser er det kun registrert alginat i 3001-stammene. I de andre kulturene er det beregnet negative alginatkonsentrasjoner, som indikerer at det ikke er alginat i prøvene. Negative verdier skyldes at absorbansen gikk ned i disse prøvene. Det ble også målt OD_{600} i disse prøvene. Resultatene av OD-målingene er vist i Figur 3.22.



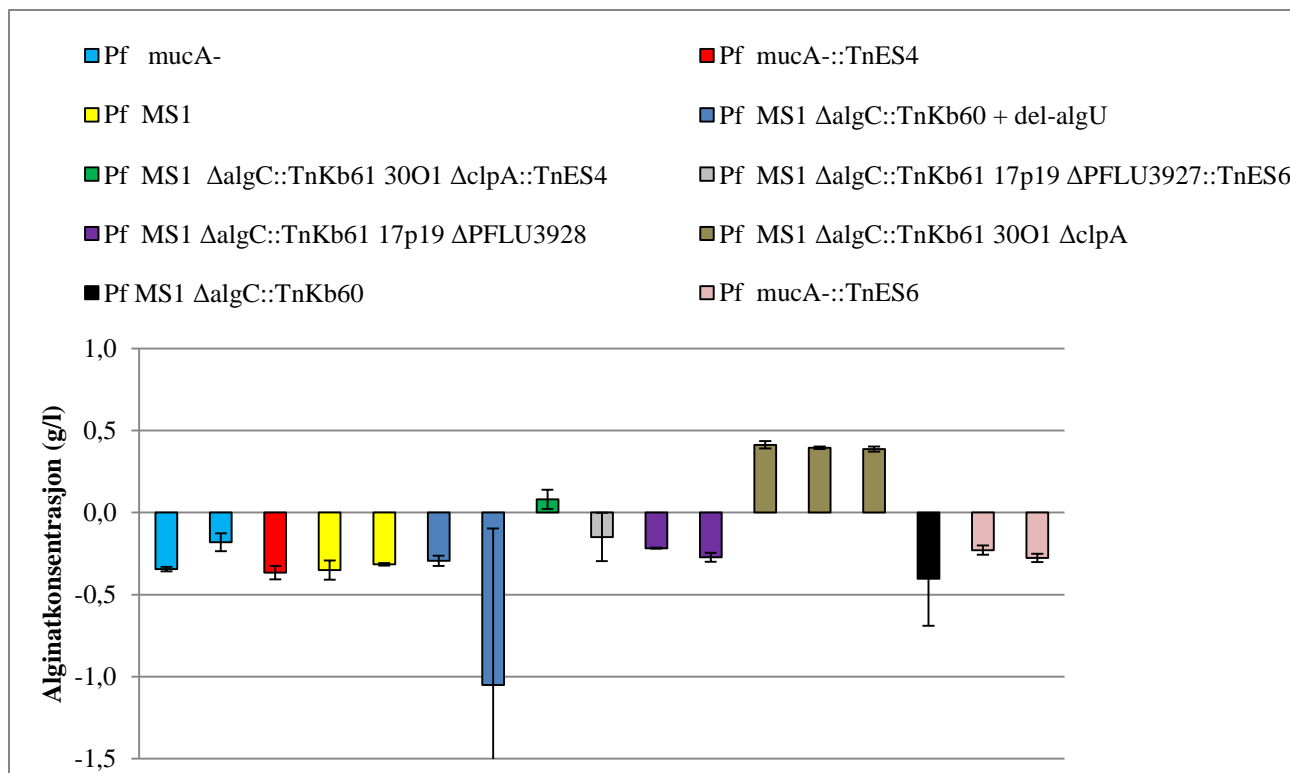
Figur 3.21: Konsentrasjon av alginat i kulturer etter 48 timer inkubering. Det er vist 3 biologiske replikat per stamme. Usikkerheten som er vist er standardavviket til gjennomsnittet av de tekniske replikatene i alginatmålingen. Absorbansdata er vist i Vedlegg F. Alginatkonsentrasjon er beregnet ut fra standardkurve 1 vist i vedlegg F. Alle kulturene er tilsatt m-toluensyre til 0,2 mM ved start av forsøk.



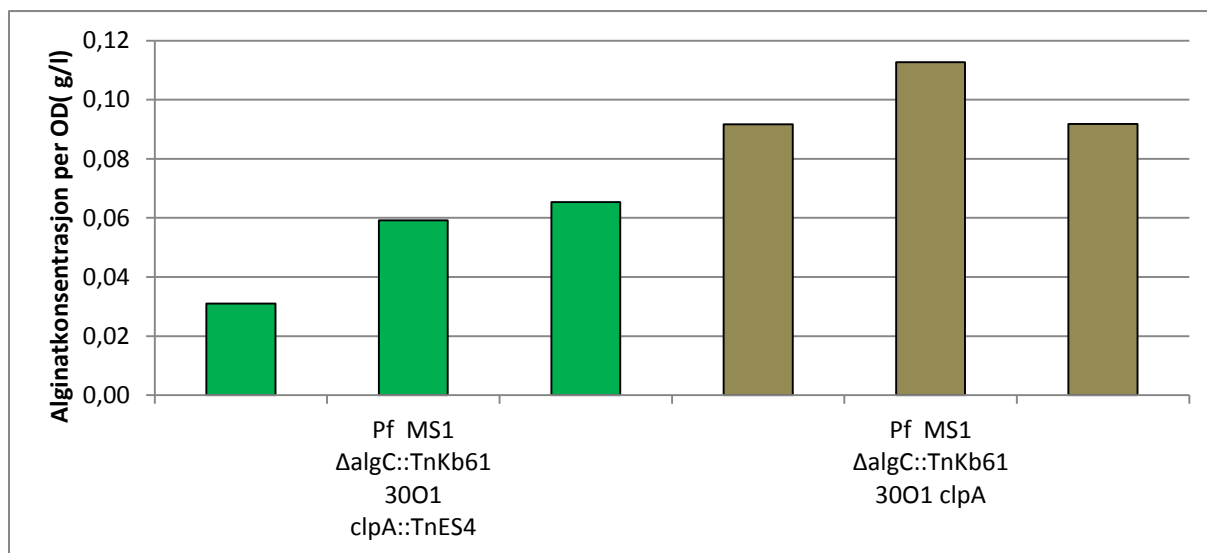
Figur 3.22: Måling av celletetthet etter 48 timer inkubering

Som Figur 3.22 viser er det minst vekst i *mucA*⁻-mutantene, mens det er mest vekst i 3001-stammene 17p19-stammene. I tillegg til forsøket som er presentert i Figur 3.21 og Figur 3.22, ble det også gjort flere forsøk med de samme stammene. Et av disse forsøkene er vist i Figur 3.23. I dette forsøket er det vist et variabelt antall biologiske replikater for hver stamme. Resultatene fra dette forsøket viser samme tendens som i Figur 3.21. Den viser også en alginatproduksjon i underkant av 0,5 g/l i 3001 *clpA*. Den viser også produksjon i 3001 *clpA*::TnES4, men noe mindre enn i det andre forsøket. I likhet med det andre forsøket er det ikke registrert alginat i noen av de andre prøvene.

For å sammenligne produksjon av alginat, gir alginat produsert per celle et godt sammenlignbart mål på alginatproduksjonen. Ved å kun se på forskjeller i total alginatproduksjon, kan det hende at forskjellene bare representerer forskjeller i vekst mellom kulturene. Ved å sjekke opp mot OD får man et mål som viser hvor mye alginat en kultur med en konsentrasjon på en gitt cellemengde produserer. En sammenligning mellom 3001-stammene, de eneste som produserte alginat, er gitt i Figur 3.24.



Figur 3.23: Konsentrasjon av alginat produsert av ulike stammer etter inkubering i 48 timer. Feilfelt som er indikert viser usikkerheten i gjennomsnittet av tekniske replikater i alginatmåling. Rådata er vist i Vedlegg F. Alginatkonsentrasjon er beregnet ut fra standardkurve 2 i Vedlegg F. Alle kulturene er tilsatt m-toluensyre til 0,2 mM ved start av forsøk.



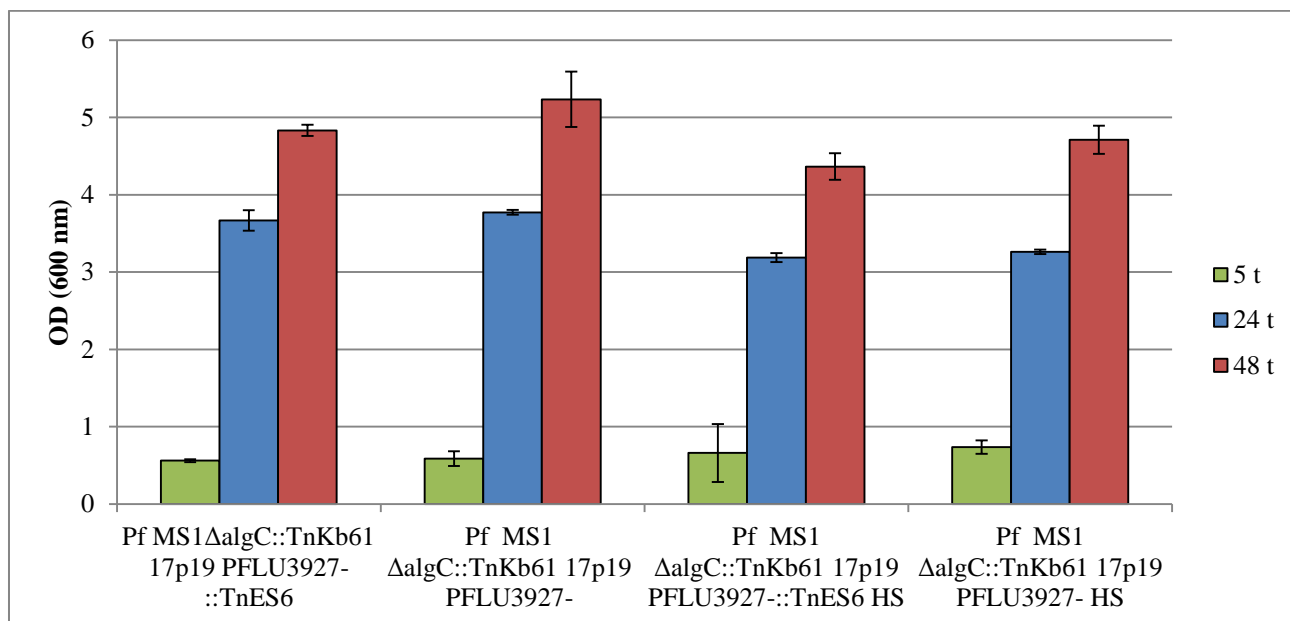
Figur 3.24: Alginatkonsentrasjon per OD

Som alle figurene som er presentert her viser, er det høyere alginatkonsentrasjon i *P. fluorescens* 3001 Δ *clpA* enn i Δ *clpA*::TnES4 som er komplementert med villtype-*clpA*.

Tabell 3.2: Alginatkonsentrasjon og OD₆₀₀ i mediet etter 48 timer inkubering

Stamme	Delforsøk	Parallell	Alginat (g/l)	OD 600 etter 48 t
Pf <i>mucA</i> -	2	1	-0,310	2,170
		2	-0,115	2,556
		3	-0,347	2,512
Pf MS1 <i>mucA</i> ::TnES4	2	1	-0,311	2,780
		2	-0,110	2,407
		3	-0,357	2,696
Pf MS1	1	1	-0,217	3,697
		2	-0,329	3,070
		3	-0,183	3,122
Pf MS1 Δ algC::TnKb60 <i>algU</i>	1	1	-0,244	3,028
		2	-0,355	3,087
		3	-0,229	3,096
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 3001 <i>clpA</i> ::TnES4	1	1	0,137	4,409
		2	0,294	4,971
		3	0,260	3,981
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 <i>PFLU3927</i> ::TnES6	2	1	-0,269	4,231
		2	-0,272	4,365
		3	-0,252	3,854
Pf MS1 MS1 Δ algC::TnKb61 <i>PFLU3927</i>	2	1	-0,102	4,412
		2	-0,473	3,850
		3	-0,188	3,870
Pf MS1 MS1 Δ algC::TnKb61 3001 <i>clpA</i>	1	1	0,344	3,756
		2	0,370	3,284
		3	0,305	3,319
Pf MS1 MS1 Δ algC::TnKb60	1	1	-0,136	3,296
		2	-0,197	3,349
		3	-0,267	3,185
Pf <i>mucA</i> ::TnES6	2	1	-0,200	2,594
		2	-0,341	2,997
		3	-0,182	2,552

For å undersøke om varmesjokk hadde en effekt på *PFLU3927*, og dermed en effekt på alginatproduksjonen, ble det utført et forsøk hvor kulturene ble utsatt for varmesjokk. Kulturene ble grodd ved 30 °C i PIM i 48 timer som i vanlig måling, men på 2 tidspunkt ble cellene utsatt for varmesjokk ved å overføre kulturene til 37 °C vannbad i 1 time. På grunn av mislykket måling av alginatproduksjon kunne det ikke registreres alginat i kulturene. Etter hvert varmesjokk og ved endt forsøk ble celleveksten målt. Celleveksten ble også målt i kulturene som ikke ble utsatt for varmesjokk. Resultatene av målingene er presentert i Figur 3.25. Som figuren viser, blir celleveksten hemmet av varmesjokkbehandlingen. Det er også større vekst i *PFLU3927*-stammen enn i *PFLU3927::TnES6*, uavhengig av varmesjokkbehandlingen. Det ser ut til at stammene reagerer likt på varmesjokkbehandlingen.



Figur 3.25: OD₆₀₀-målinger gjort under forsøk på 30 °C og ved varmesjokkbehandling. HS-kulturene har blitt utsatt for varmesjokk. Alle kulturene er tilsatt m-toluensyre til 0,2 mM ved start av forsøk.

4 Diskusjon

I dette arbeidet ble flere nye mutanter av *P. fluorescens* SBW25 laget for å studere genes effekt på alginatproduksjon. For å undersøke *clpA*, ble genet komplementert til en stamme hvor *clpA* var inaktivert. I tillegg ble *clpA* overført til en mukoid stamme som er *mucA*⁻ og hvor *algC* er satt under kontroll av Pm-promotor. Dette ble gjort for å se på effekten av å øke uttrykket av *clpA* i denne stammen. Samme prosedyre ble brukt på genet *PFLU3927*, som ble overført til stamme med inaktivert *PFLU3927* og til *mucA*⁻. Genene ble overført til *P. fluorescens* ved bruk av transposon. For å undersøke om *algU* har effekt på alginatproduksjonen i stammen hvor *algD*-operon er satt under kontroll av Pm-promotor, ble villtype-*algU* erstattet med en delesjonsvariant av *algU* som ble satt inn i *P. fluorescens* ved homolog rekombinering. Videre skulle alginatproduksjonen måles i stammene som ble laget. Til tross for gjentatte forsøk på å måle alginatproduksjon, kunne ikke målingene gi rimelige resultater. Den første delen av forsøket, som var å konstruere klonene som skulle testet for alginatproduksjon, gikk som ventet. Disse stammene er klare til å bli testet for alginatproduksjon, eller andre eventuelle forsøk for å studere de undersøkte genene.

Det var noen avvik i kloningsarbeidet som bør tas hensyn til i videre arbeid med stammene. Ved sekvensering av *PFLU3927*-fragment fra pES2 ble det funnet en stille punktmutasjon. Det ble også funnet en aminosyreendrende punktmutasjon på et av *clpA*-fragmentene som ikke ble brukt videre. I følge produsent av PCR-komponentene, skal polymerasen som ble brukt ha en feilrate på ca. 1 b per 50 kb. Antallet mutasjoner som ble funnet var altså noe i overkant av det som var forventet.

PFLU3927-fragmentet som inneholdt en stille mutasjon ble brukt videre i kloningen. Dette ble gjort fordi den ikke vil føre til noen endring i aminosyresekvens og dermed ikke endring i proteinaktivitet. Likevel er det mulig at en stille mutasjon endrer ekspresjonsnivået til genet. Dette kommer av at organismer har foretrukne kodon for aminosyrer. Det er ofte slik at ekspresjonsnivået av foretrukne kodon er høyere enn andre kodon. Dette kan ha flere årsaker, f.eks. tilgjengelighet av t-RNA med antikodon og sekundærstruktur av mRNA. I dette tilfellet var en tymin endret til cytosin i *PFLU3927*. Siden kodonet sitter på den komplementære tråden til den som ble sekvensert, var det en adenin som ble endret til guanin på 3. posisjon i lysin-kodonet, dvs. at kodonet ble endret fra AAA til AAG. I *P. fluorescens* er kodonet AAG oftere brukt enn AAA (<http://www.kazusa.or.jp/>). I følge undersøkelser som er gjort på kodonbruk i *P. aeruginosa* er det vist at AAA blir brukt oftest i gen med lavt ekspresjonsnivå,

mens AAG blir brukt oftest i gen med høyt ekspresjonsnivå (Carbone *et al.*, 2005). Siden det er klare forskjeller i kodonbruk for gener med høyt og lavt ekspresjonsnivå i *P. aeruginosa*, og det er forskjeller i kodonbruk hos *P. fluorescens* kan det bety at ekspresjonsnivået endres som følge av den stille mutasjonen. Den stille mutasjonen bør derfor tas hensyn til ved videre forsøk med mutanten som ble laget i denne oppgaven.

Ved kloning av *clpA* hadde pES4 noen uventede restriksjonsfragmenter. Fragmenter som skulle være 0,86 kb og 0,89 kb viste usannsynlig stor separasjon på gel. Grunnen til at plasmidet ble tatt med videre i kloningen var at de uventede fragmentene så ut til å stamme fra vektoren, og ikke fra *clpA*. Ved påfølgende konjugering og transponering av *clpA* viste det seg at plasmidet både kunne overføres til *P. fluorescens*, og indusere apramycinresistens i konjugantene. Dette er sterke indisier på at plasmidet var av den riktige typen. De andre restriksjonsfragmentene var riktige, noe som også forsterker teorien. Ut fra dette er det mest sannsynlig at sekvensen som ble gitt av pYQ1 ikke stemmer helt med plasmidet. Selv om det virker som om pYQ1-varianten har de elementene som er ønsket, bør plasmidet og datafilen for plasmidet sjekkes for å finne hva som ikke samsvarer. Dette bør gjøres for å unngå at det blir tatt feil konklusjoner i andre forsøk med dette plasmidet.

Produksjonen av G-lyase var vellykket, med en total enzymaktivitet på 521,4 u. Dersom man ønsker å øke renheten av G-lyase kunne det vært gunstig å øke saltgradienten enda saktere der G-lyase ble eluert (0,15-0,25 M NaCl), spesielt der hvor det meste av proteinet ble eluert (ca. 0,19 M NaCl). Grunnen til dette er at ved å eluere lenge over små intervaller i saltkonsentrasjon minsker sjansen for at det ønskede proteinet blir eluert ut sammen med andre proteiner. Til alginatmålingene som G-lyasen skulle brukes til i dette forsøket er ikke renheten vanligvis avgjørende for kvaliteten på målingene. Kvaliteten på G-lyasen ble også bekreftet god nok ved at det ble oppnådd nøyaktige standardkurver, altså et forventet proporsjonalt forhold mellom økning i A_{230} og konsentrasjon av alginat.

Resultatene fra alginatmålingene kunne ikke forklares ut fra forventet alginatproduksjon. Verken *P. fluorescens* SBW25 MS1 eller SBW25 *mucA*⁻ viste tegn til alginatproduksjon. Forsøket ble gjort flere ganger på begge stammene med flere biologiske replikater for hvert forsøk. Det ble ikke registrert alginat i kulturene fra disse stammene etter 48 inkubering med tilsatt m-toluensyre. Disse stammene skal produsere alginat ved tilsatt av m-toluensyre, og ble brukt som positive kontrollstammer i forsøket. Sett bort fra stamme 3001, viste ingen av de andre stammene heller tegn på alginatproduksjon. Det er 3 mulige årsaker til denne

observasjonen; 1) Stammene produserte ikke alginat i forsøket, og viste derfor ikke tegn til alginatproduksjon. 2) Alginat ble produsert, men ble degradert før målingene ble gjort, slik at det ikke kunne måles noen økning i A_{230} . 3) Det var alginat i prøvene, men alginatmålingene kunne ikke registrere dette.

Det ble sjekket om årsak 1 kunne være den riktige. Det ble utført en kvalitativ test som viser om det er alginat i en prøve. Denne viste en antydning til utfelling av alginat i positiv kontroll, men ikke så sterk som ventet. Prøven måtte sentrifugeres for å verifisere at det hadde skjedd en utfelling. Ved betydelige mengder alginat, skal det være mulig å se en klar utfelling av alginat ved bruk av denne metoden. Siden det ikke kunne måles alginat i de positive kontrollene, var det ikke ventet at det skulle måles alginat fra de andre stammene. I *P. fluorescens* SBW25 MS1 30O1, både i *clpA*⁻ og i den komplementerte stammen, ble det imidlertid registrert alginatproduksjon. Denne stammen skal ikke produsere mer alginat enn *mucA*⁻, og det er derfor vanskelig å forklare at det blir målt alginat i denne stammen, men ikke i positiv kontroll.

Årsak 2 ble ansett som en mulig forklaring siden det ble observert relativt høy bakgrunnsabsorbans i prøvene, noe som kan skyldes at alginatet har blitt degradert av lyaser. For å sjekke om dette kunne være tilfelle ble det målt absorbans i mediet (PIM) som ble brukt. Det ble påvist A_{230} på ca. 0,3 i tilsvarende konsentrasjon som i alginatmålingene, så bakgrunnsabsorbansen kan ikke utelukkende forklares av dette. Alginatmålinger er også gjort tidligere fra kulturer med PIM (Konradsen, 2009). I Konradsens forsøk lå bakgrunnsabsorbansen på 0,5 - 0,7, mens den lå på 1,1 - 1,4 i forsøkene som er gjort i denne oppgaven. Disse forskjellene tyder på at noe av bakgrunnsabsorbansen i dette forsøket kan komme fra nedbrutt alginat. Den svakt positive kvalitative testen på alginat forsterker også denne teorien. Dersom alginatet allerede hadde blitt nedbrutt, tyder det på at det har vært aktive alginat lyaser i mediet. I forsøket ble det tilsatt proteaser i mediet for å hindre nettopp lyaseaktivitet. Dersom det skal ha vært lyaser i mediet, kan ikke proteasene ha fungert som de skal. Proteasene er kommersielle enzymer som skal være testet godt, og sannsynligheten anses som liten for at disse ikke skal ha fungert. Det kan tenkes at de har vært for gamle og at de dermed ikke hadde den ønskede aktiviteten. Den høye bakgrunnsabsorbansen som indikerer mulig nedbrutt alginat, gjør at det kan være hensiktsmessig å sjekke aktiviteten til proteasene i PIM ved 30 °C. For å finne ut om det er aktive lyaser i mediet, kan man tilsette alginat til cellekulturen hvor man mistenker lyaseaktivitet se om A_{230} øker med tiden. En økning av A_{230} tyder på at det er aktive lyaser i mediet.

Siden det andre forsøket med alginatproduksjon i PIM (Konradsen, 2009) med glyserol hadde vesentlig lavere bakgrunnsabsorbans, ble det forsøkt å bruke et gjennomsnitt av den lave bakgrunnsabsorbansen som bakgrunnsabsorbans i dette forsøket. Dette er en grov og muligens feil antagelse, men ble likevel gjort for å se om det viste noen forskjeller som ikke hittil var sett. Resultatene viste da naturlig nok høy alginatproduksjon på mellom 3-6 g/l. Den viste imidlertid ingen klare forskjeller som ikke var sett før. Den viste også høy produksjon i stammen med inaktivert *PFLU3927*. Denne var forventet til å produsere neglisjerbare mengder alginat. Denne metoden kunne altså ikke forklare om nedbrutt alginat var årsaken til mislykket alginatmåling. I Konradsens forsøk var det heller ingen klar korrelasjon mellom total absorbans i slutten av forsøket og konsentrasjon av alginat i prøven. Dette er fordi at absorbansen i de tekniske replikatene har høy variasjon mellom seg, men at de øker tilnærmet like mye i absorbans.

Årsak 3, at prøvene inneholdt alginat, men ikke kunne måles, er kanskje den mest sannsynlige forklaringen på at det ikke ble registrert alginatproduksjon i den positive kontrollen. Siden standardkurvene var gode, kan det utelukkes at lyasene ikke var aktive, eller feil med bufferen. Ved feil i selve målingen, må avviket ligge i forholdene i prøven, og at disse gjør at enzymreaksjonen ikke går som den skal. En av årsakene til at dette kan skje, er at alginatet ikke har blitt deacetylerert. Det er vist at *O*-acetylerert alginat kan forstyrre enzymreaksjoner, slik det gjør med mannuron-C5-epimerase (Skjåk-bræk *et al.*, 1985). Før målingene ble det tilsatt NaOH for å deacetylere alginatet. Dersom NaOH-tilsetningen ikke har ført til fullstendig deacetylering, kan dette være årsaken til mislykket enzymreaksjon. Utover dette kan det ikke pekes på noen konkret grunn til mislykket alginatmåling, men alginatmåling ved å bruke en slik enzymreaksjon er følsom, og det er derfor ikke alltid mulig å finne årsaken til feil. Det er kjent at alginatmålinger flere ganger har vært mislykkede av ukjente årsaker også ved tidligere forsøk (Helga Ertesvåg, personlig kommunikasjon). Det som gjør denne årsaken vanskeligere å godta, er at det ble målt alginat i samtlige av 3001-stammene. Dersom det skulle vært noe galt med selve målingen, skulle ikke denne gitt så stabile og positive resultater for akkurat disse stammene. Dersom mislykket deacetylering skal være årsaken til feil i måling, må det enten være en forskjell i NaOH sin virkning på denne stammen sammenlignet med de andre, eller at det ble produsert så mye alginat i denne stammen at det likevel ble målt alginat i den.

Dersom man neglisjerer de uforklarlige resultatene kan man se på de som produserte alginat, 3001 *clpA* og 3001 *clpA::TnES4*. Resultatene viste størst vekst i *clpA::TnES4*, og størst

alginatproduksjon i 3001 *clpA*. Sammenlignet med transposonscreenet som er gjort tidligere, viser ikke dette forsøket samme tendens. I det forsøket var det størst alginatproduksjon i villtypen, mens det var størst vekst i 3001 *clpA*. Siden det ikke ble målt alginat i *Pf* SBW25 MS1, er det vanskelig å sammenligne disse forsøkene. Ut fra dette forsøket ser det ut til at inaktiv *clpA* fører til høyere alginatproduksjon enn den komplementerte. Motsatt effekt ble observert i PIM ved tidligere forsøk, men da sammenlignet med utgangsstammen SBW25 MS1. Siden alginatmålingene av de andre kulturene var til dels uforklarlige, kan det ikke konkluderes med noe sikkert om effekten av å komplementere *clpA*.

Ved å se generelt på vekstresultatene, ser det ut til at 3001, som det ble registrert produksjon av alginat på, har relativt høy vekst sammenlignet med de fleste andre som ikke produserte alginat. Denne observasjonen var ikke ventet, siden produksjon av alginat bruker karbonkilde som ellers kunne blitt brukt til vekst. Likevel er tilgjengeligheten på karbon en veldig teoretisk antagelse, hvor det blir antatt at karbonkilden er begrensende faktor for forholdet mellom cellevekst og produksjon av alginat. Siden det heller ikke kan fastslås om de andre kulturene produserte alginat, kan det ikke trekkes konklusjoner om dette ut fra vekstresultatene.

Siden PFLU3927 tilhører lon-proteasefamilien og lon-protease er et varmesjokk-protein, ble det forsøkt å gjøre et varmesjokk-eksperiment på 17P19 *PFLU3927* og på 17P19 *PFLU3927::TnES6*. Dette ble gjort for å se om alginatproduksjonen ble endret av varmesjokk-behandling, som følge av en eventuell endring i transkripsjon av *PFLU3927*, eller aktivitet av proteinet. Om det skulle vise seg at det er en forskjell, vil det tyde på at proteinet er et varmesjokkprotein. For å sjekke dette ble det brukt samme prosedyre som for det vanlige eksperimentet, men 2 ganger ble cellene utsatt for varmesjokk ved å overføre kulturene til 37 °C vannbad i 1 time. Ved 37 °C vil ikke kulturen vokse, men cellekulturen blir heller ikke ødelagt. Da det ikke kunne måles alginatproduksjon (forsøket er ikke vist i resultater), kunne ikke hypotesen om at *PFLU3927* er et varmesjokkprotein bekreftes eller avkreftes. Varmesjokk så ikke ut til å påvirke *PFLU3927* med hensyn på vekst. Varmesjokk reduserte vekst, men veksten så ut til å bli like mye redusert i stammen med inaktivert *PFLU3927* og den komplementerte. Dette betyr at ved varmebehandlingen i dette forsøket, virker det ikke som om *PFLU3927* har en sentral rolle i cellenes evne til å overleve varmesjokket. Det kan tenkes at *PFLU3927* virker som et varmesjokkprotein, men at det blir komplementert av andre varmesjokkproteaser når *PFLU3927* er inaktivert. For videre undersøkning av om *PFLU3927* påvirker cellevekst ved varmesjokk, kan det gjøres endringer i forsøket som gjør at

behandlingen blir hardere på cellene. Cellene kan utsettes for hyppigere varmesjokk, og det kan prøves å øke temperaturen noe. Dette vil gjøre at aktiviteten til varmesjokkproteiner vil være viktigere for overlevelse, enn ved betingelsene som ble brukt i dette forsøket.

I videre forskning på alginatproduksjon i *P. fluorescens*, er slike varmesjokkforsøk en type forsøk som kan benyttes for å studere mulige varmesjokkprotein, ikke bare PFLU3927, men også andre lignende protein. Et slikt forsøk kan også brukes til å se på andre parametere enn alginatproduksjon (vekst, andre sekundærmetabolitter, etc.). Påføring av stress for å karakterisere gener som påvirker alginatproduksjon er brukt tidligere i *P. aeruginosa*, og har ført til økt forståelse av hvordan stress kan regulere alginatproduksjon (Wood og Ohman, 2009).

Som nevnt tidligere, førte inaktivering av *clpA* i et tidligere forsøk til en økning av alginatproduksjon i DEF3 med glyserol/fruktose som karbonkilde. Veksten var uforandret med glyserol som karbonkilde, men var vesentlig større med fruktose. Det ble imidlertid registrert nedgang i alginatproduksjon og økt vekst i PIM med glyserol som karbonkilde (Helga Ertesvåg, ikke publisert materiale).

For å finne årsaken til forskjellen i alginatproduksjon som var observert mellom PIM og DEF3, kan man se på den generelle sammensetningen av mediene. PIM er et medie som inneholder mindre fosfat enn DEF3 (Helga Ertesvåg, Personlig kommunikasjon). Siden *clpA* avhenger av ATP for proteolyse, kan det tenkes at celler som vokser i DEF3, som er rikt på fosfat, har mer tilgjengelig ATP, og dermed mer *clpA*-aktivitet. Hvis dette er tilfellet, og det antas at ClpA-aktiviteten er høyes i DEF3-medium, fører det til en konklusjon som på at, sammenlignet med inaktivert ClpA virker høy ClpA-aktivitet negativt på alginatproduksjon, mens lav ClpA-aktivitet virker positivt på alginatproduksjon. Dette er bare en av mange muligheter for årsaken til den observerte forskjellen i mediene. Som en generell konklusjon kan det sies at forskjellen i fosfatmengde kan gi en forskjell i ClpA-aktivitet som kan være med på å forklare forskjellen i fenotype i de ulike mediene.

I tillegg til forskjell i fosfatmengde, er PIM rikt på pepton, en komponent som inneholder mye aminosyrer. Det kan tenkes at det høye nivået av nitrogenforbindelser i PIM kan ha en påvirkning på aktiviteten av ClpA, som ikke skjer i DEF3-medium. Forskjellen i aminosyremengde i mediene, kan tenkes å utgjøre en forskjell på proteinsyntese i mediene. Forskjeller i proteinsyntese, som f.eks. hastighet, kan føre til forskjeller i hvordan proteinene

blir foldet. Siden det er kjent at ClpA i størst grad deltar i degradering av misfoldede proteiner kan det tenkes at forskjellene i effekten av *clpA* kan forklares ut fra det. Dvs. at proteiner som positivt påvirker alginatproduksjonen blir degradert av ClpA fordi de er misfoldet pga. lavt aminosyre-/nitrogeninnhold i mediet.

ClpX som er en homolog av ClpA, og som i likhet med ClpA binder seg til peptidaseenheten ClpP, kan også tenke seg å spille en rolle i de observerte effektene av inaktiveringen av *clpA*. Det kan tenkes at ClpX i fravær av ClpA, har større sjanse for å binde seg til ClpP og degradere substrat enn når ClpA ikke blir syntetisert. Det er fullt mulig at den registrerte effekten av ClpA på alginatproduksjonen egentlig representerer forskjell i aktivitet av ClpX, som følge av at ClpA ikke blir syntetisert. For å undersøke dette, ville det vært interessant å lage en mutant hvor både *clpA* og *clpX* er slått ut, og se på alginatproduksjonen i den. Ved å sammenligne en slik mutant opp mot mutantene hvor bare ett av genene er slått ut kan man se på om ClpA og ClpX komplementerer hverandre når den ene blir slått ut. Siden det ble observert forskjell på effekt i DEF3 og PIM, kan det også hende at komplementeringen bare skjer ved gitte forhold, representert av ulikheter i sammensetningen av mediene.

5 Konklusjon

I dette studiet ble det laget 5 nye mutanter av *P. fluorescens*. Det er laget en mutant hvor villtype-*clpA* er komplementert til mutant med inaktivert *clpA* og en mutant hvor villtype-*PFLU3927* er komplementert til mutant med inaktivert *PFLU3927*. Villtype-genene er også overført til en mukoid stamme som er *mucA*⁻ og *algC* er under kontroll av Pm-promotor, noe som fører til økt uttrykk av genene som blir satt inn. I tillegg er det laget en mutant hvor en deletert versjon av *algU* har erstattet villtype-*algU*. Studiet legger til rette for å studere genenes rolle i alginatsyntesen ved bruk av stammene som er laget.

Det ble forsøkt gjentatte ganger å måle alginat fra kulturene, uten at det kunne registreres alginat i stammer som tidligere har produsert alginat. Det ble kun målt alginat i stammen 30O1. På grunn av tidsmangel kunne ikke årsaken til mislykkede alginatmålinger undersøkes videre, noe som bør gjøres for å finne eventuelle avvik i stammene som ble brukt, eller avvik i prosedyren som har ført til mislykkede alginatmålinger.

Det er foreslått at forskjellen i alginatproduksjon mellom mediene PIM og DEF3 i tidligere forsøk på *clpA* kan forklares ut fra forskjeller i fosfatmengde og/eller peptonmengde i mediene. Det er også foreslått at PFLU3927 er et varmesjokkprotein og at proteinaktiviteten kan økes av ulike former for stress og at dette kan føre til at alginatproduksjonen endres som følge av det.

Kilder

- Berg, J. M. (2002), *Biochemistry* (5th edn.; New York: W.H. Freeman & Co).
- Birnboim, H. C. og Doly, J. (1979), 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7 (6), 1513-23.
- Bodilis, J., *et al.* (2004), 'Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences', *Systematic and Applied Microbiology*, 27 (1), 93-108.
- Carbone, A., Kepes, F., og Zinovyev, A. (2005), 'Codon bias signatures, organization of microorganisms in codon space, and lifestyle', *Molecular Biology and Evolution*, 22 (3), 547-61.
- Cha, S. S., *et al.* (2010), 'Crystal structure of Lon protease: molecular architecture of gated entry to a sequestered degradation chamber', *Embo Journal*, 29 (20), 3520-30.
- Dale, Jeremy W. og Park, Simon F. (2010), *Molecular Genetics of Bacteria* (5th edn.: John Wiley & Sons, Ltd).
- de Bruijn, I., *et al.* (2007), 'Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species', *Molecular Microbiology*, 63 (2), 417-28.
- Draget, Kurt I. og Taylor, C. (2011), 'Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications', *Food Hydrocolloids*, 25 (2), 251-56.
- Govan, J. R. W. og Deretic, V. (1996), 'Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*', *Microbiological reviews*, 60 (3), 539-+.
- Hanahan, D. (1983), 'STUDIES ON TRANSFORMATION OF *ESCHERICHIA COLI* WITH PLASMIDS', *Journal of Molecular Biology*, 166 (4), 557-80.
- Hay, I. D., *et al.* (2010), 'Bacterial biosynthesis of alginates', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85 (6), 752-59.
- Heintz, N. (2001), 'Bac to the future: The use of bac transgenic mice for neuroscience research', *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (12), 861-70.
- Keen, N. T., *et al.* (1988), 'Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria', *Gene*, 70 (1), 191-97.

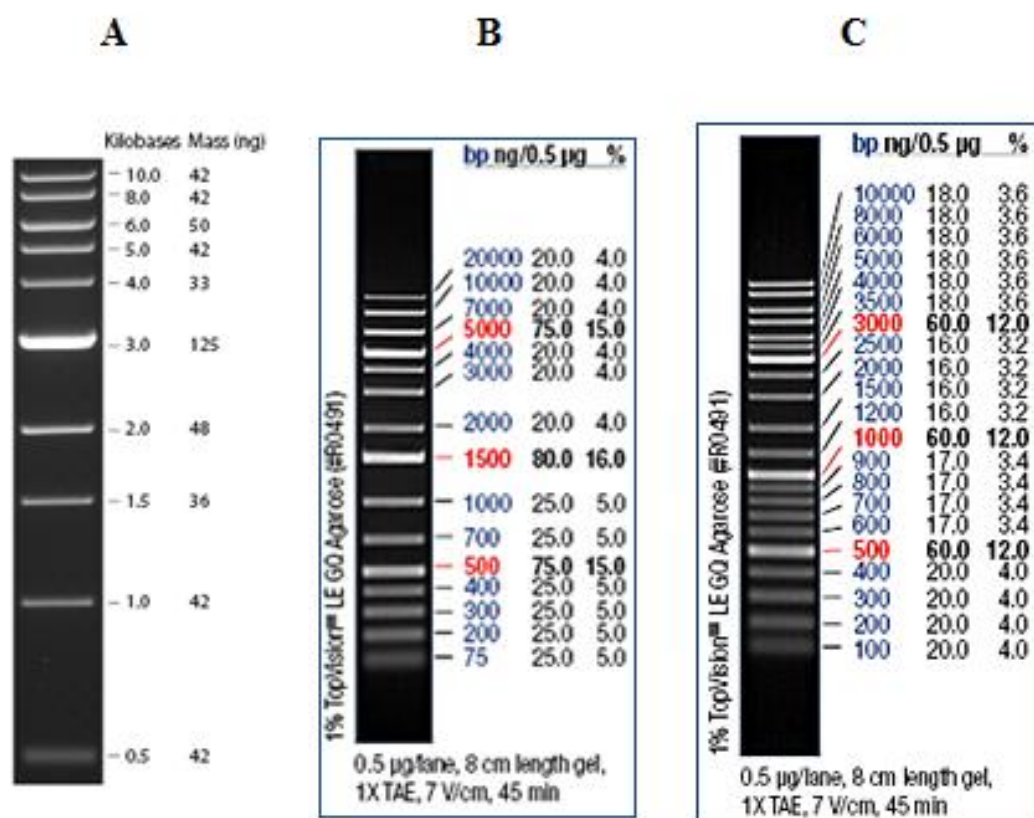
-
- Keiski, C. L., *et al.* (2010), 'AlgK Is a TPR-Containing Protein and the Periplasmic Component of a Novel Exopolysaccharide Secretin', *Structure*, 18 (2), 265-73.
- Konradsen, Therese Aursand (2009), 'Characterization of genes that influences biosynthesis of alginate in *Pseudomonas fluorescens*'.
- Madigan, Michael T. og Martinko, John M. (2006), *Brock Biology of Microorganisms* (11th edn.; San Fransisco: Pearson Education, Inc.).
- Qiu, D. R., *et al.* (2008), 'ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiology-Sgm*, 154, 2119-30.
- Rainey, P. B. og Bailey, M. J. (1996), 'Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome', *Molecular Microbiology*, 19 (3), 521-33.
- Reece, Richard J. (2004), *Analysis of Genes and Genomes* (Chichester: John Wiley & Sons Ltd) 469.
- Rehm, B. H. A. (ed.), (2009), *Alginates: Biology and Applications*, ed. Alexander Steinbüchel (Berlin: Springer Verlag).
- Reznikoff, W. S. (2003), 'Tn5 as a model for understanding DNA transposition', *Molecular Microbiology*, 47 (5), 1199-206.
- Roche (2010), 'PCR applications manual', accessed 10.10.2010.
- Rodriguez, F. og Pfender, W. F. (1997), 'Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta', *Phytopathology*, 87 (6), 614-21.
- Sambrook, Joseph og Russell, David W. (2001), *Molecular Cloning*, 3 vols. (3 edn., 1; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., og Coulson, A. R. (1977), 'DNA SEQUENCING WITH CHAIN-TERMINATING INHIBITORS', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12), 5463-67.
- Sauer, R. T., *et al.* (2004), 'Sculpting the proteome with AAA+ proteases and disassembly machines', *Cell*, 119 (1), 9-18.

- Schnider-Keel, U., *et al.* (2001), 'The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0', *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12), 5683-93.
- Silby, M. W., *et al.* (2009), 'Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*', *Genome Biol*, 10 (5), R51.
- Simon, R., Priefer, U., og Puhler, A. (1983), 'A BROAD HOST RANGE MOBILIZATION SYSTEM FOR INVIVO GENETIC-ENGINEERING - TRANSPOSON MUTAGENESIS IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA', *Bio-Technology*, 1 (9), 784-91.
- Skjåk-bræk, G., Larsen, B., og Grasdalen, H. (1985), 'THE ROLE OF O-ACETYL GROUPS IN THE BIOSYNTHESIS OF ALGINATE BY *AZOTOBACTER-VINELANDII*', *Carbohydrate Research*, 145 (1), 169-74.
- Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H., og Larsen, B. (1986), 'MONOMER SEQUENCE AND ACETYLATION PATTERN IN SOME BACTERIAL ALGINATES', *Carbohydrate Research*, 154, 239-50.
- Smidsrød, Olav og Moe, Størker T. (1995), *Biopolymerkjemi* (Trondheim: Tapir Forlag).
- Torrescabassa, A. S. og Gottesman, S. (1987), 'CAPSULE SYNTHESIS IN *ESCHERICHIA COLI* K-12 IS REGULATED BY PROTEOLYSIS', *Journal of Bacteriology*, 169 (3), 981-89.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., og Van Melderen, L. (2006), 'Biological roles of the Lon ATP-dependent protease', *Research in Microbiology*, 157 (8), 701-13.
- Tøndervik, A., *et al.* (2010), 'Isolation of Mutant Alginate Lyases with Cleavage Specificity for Diglucuronic Acid Linkages', *Journal of Biological Chemistry*, 285 (46), 35284-92.
- Valla, S., *et al.* (2001), 'Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis', *Biochimie*, 83 (8), 819-30.
- Wood, L. F. og Ohman, D. E. (2009), 'Use of cell wall stress to characterize sigma(22) (AlgT/U) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*', *Molecular Microbiology*, 72 (1), 183-201.
- Wozniak, D. J. og Ohman, D. E. (1994), 'TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* GENES ALGR, ALGB, AND ALGD REVEALS A HIERARCHY OF ALGINATE GENE-EXPRESSION WHICH IS MODULATED BY ALGT', *Journal of Bacteriology*, 176 (19), 6007-14.
- Zolkiewski, M. (2006), 'A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases', *Molecular Microbiology*, 61 (5), 1094-100.

Østgaard, Kjetill (1993), 'Determination of alginate composition by a simple enzymatic assay',
Hydrobiologia, 260-261 (0), 513-20.

Vedlegg A DNA-standarder

DNA-standarder er løsninger av DNA med kjente størrelser. Når disse løsningene separeres ved gelelektroforese kan de sammenlignes med løsninger av DNA med ukjent størrelse og størrelsen på de ukjente kan da bestemmes. I denne oppgaven ble det brukt flere DNA-standarder som var passende for å bestemme størrelsen på DNA-fragmenter mellom 0,5 – 10 kb som var aktuelt for denne oppgaven. DNA-standardene er vist i Figur A.1.



Figur A.1: DNA-standarder. A er NEB 1 kb DNA-standard (<http://www.neb.com/>). B er Generuler 1kb plus DNA ladder (<http://www.fermentas.com/>). C er Generuler 1kb DNA ladder mix (<http://www.fermentas.com/>).


```

pES1          2869 atagagctccttacggattagcggttttccagacttgctgcgcgagcgtatggcagagcgctttcagtgc
NedAlguF:    662 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1204 -----
M13 R :      446 .....

pES1          2939 ctttcagggtgattcctgtgctgttgacgcaggtaacctggaagacgctggcttgccagccgattg
NedAlguF:    592 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1204 -----nnnnnnnnnnnn.nnnnnnnnnnn.nn.nnnnnnnnn
M13 R :      516 .....

pES1          3009 cccttgcaacacaccgtagccatagggccgggtggtgctcgagctttccttgtagccggccagtaccgct
NedAlguF:    522 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1164 nnnnnnnnnnn.nnnnnnnnn.-----
M13 R :      586 .....

pES1          3079 gggcctttgacttgccgaccggccatgaccggctgctgagtctggtggcgagctcggcaccgcgattt
NedAlguF:    452 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1141 -----
M13 R :      656 .....

pES1          3149 cgtcttgattgtacaggcgaacaccggccaacacggcaacagtcaccaggctgcaactgccaggcgacc
NedAlguF:    382 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1141 -----
M13 R :      726 .....

pES1          3219 caggctacgccatggaccacgagtagcttttagccggaacggcttcatcagccagcgcagcagaaacagcc
NedAlguF:    312 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1141 -----
M13 R :      796 .....

pES1          3289 gcagcaatatccagacgagggattagaagatccttgtgcatcaccgccgagcgacttgtaacgagacc
NedAlguF:    242 .....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1141 -----nnnnn.nn.n.nnn.nnnnnnn.nnnncnn
M13 R :      866 .....

pES1          3359 aggtgtcacgggtttcggcatcatcaaatgcattgagcactcgacgaagt-ccagttcatccgctt-cg
NedAlguF:    172 .....-.....-..
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1110 nnn.nnnnn.n.n.nnn.n.nnn...nnn...n.nnnnnnn.nn.n.nn-n.n...n...n...-..
M13 R :      936 .....n..n..n..n...n...n...n...n...n...n...n...t..

pES1          3427 ttatccatcactcggacagcgattcctgacggcatcacgactcatggcggttcctctcttggtgctg
NedAlguF:    104 .....-.....
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      1042 .....nn.....
M13 R :      1006 ...n.n.n...nnn.....n...-nnnn.....n.n...nnnn.nnnnnnnnn.----

pES1          3497 c--cgctgtcttttagttctcttgcaacaacggttgcaaggctttatcgatggcttccggaccagctgct
NedAlguF:    35  .-----
OppAlguR:    1 -----
M13 F :      972  .-----
M13 R :      1071 -cnnnn.nnnn...n.-----

pES1          3565 gatcctcttctgggttagcatgaacactcctcgttgacttgaaggaggcttgcataactaaacgatca
NedAlguF:    28  -----
OppAlguR:    1 -----nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn.....n.....
M13 F :      904  -----
M13 R :      1086 -----

```

```

pES1      3635 ggcttgcaaacatagactcggctcttttcgcaaaagttctcccccttcaagcaagtttcggcacgcactg
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   57 .....
M13 F  :   834 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      3705 atttggcacacacgaaaaacgcagtacgggcaacgccgactgcgcaataatcttgcgtcggttttctg
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:  127 .....
M13 F  :   764 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      3775 acgcgccaatgctcccgacgggccaataaaactcaacgttttccagctttcgggcaacctgctattgag
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:  197 .....
M13 F  :   694 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      3845 tcgaggcttatgcaaaaagttcccgttcaataaccagccgattttacccaagctgtgcaccgtaactc
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   267 .....
M13 F  :   624 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      3915 cacattgccacgaatgcccggtattgtgccgtccaccctctatatactagtagcccgtgtgaccctt
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   337 .....
M13 F  :   554 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      3985 tgattcgccgatccaggcgtcctgtttgcgccccctcttcggatcgctttttgcggaatccttccaatga
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   407 .....
M13 F  :   484 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      4055 gccaacagtttcaacacgatgtcctgggtgatcggcagcggcgccggctttgagccttgcgctgaccct
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   477 .....
M13 F  :   414 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      4125 cccgggccacctgcgcattgcggtcctgagcaaaggcgacctggccaacggctcgacattctgggccag
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   547 .....
M13 F  :   344 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      4195 ggcgggtgtcgcccgctgctggacgacaccgacacagtgcaatctcacgtcgaagacacactcaacgccg
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   617 .....
M13 F  :   274 .....
M13 R  :  1086 -----

pES1      4265 gtggcggcctgtgcaatgaagaggcgggtgcgattcacgctcgagcacagccgagggcgatccaatggct
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   687 .....
M13 F  :   204 .....
M13 R  :  1086 -----nnnnn.nnn.nnnnnnnn..nnnntn..nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnan

pES1      4335 gatcgatcagggcgtgccgttcaccctgacgaacacgcaggcagcgacgacggcggcttgaattctag
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:   757 .....n.....
M13 F  :   134 .....
M13 R  :  1150 nn.nnnnnnnnnnnnnnnn.-----

```

```

pES1      4405 atacctaggtgagctctggtaccctctagtcaggccttaagtgagtcgtattacggactggccgctcgtt
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:  827 .....n.....nn.....
M13 F   :   64 .....n.....nnnn.....-nnnn.....n.....nnnnnnnnn----
M13 R   :  1171 -----

pES1      4475 ttacaacgctgactgggaaaacctggcgttacccaacttaatcgccttgacacacatccccctttcg
NedAlguF:   28 -----
OppAlguR:  897 .....n.....
M13 F   :    0 -----
M13 R   :  1171 -----

pES1      4545 ccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgccttcccaacagttgcgagcctgaatggcga
NedAlguF:    0 -----
OppAlguR:  967 .....nn.....n.....n..n.....--nngnn
M13 F   :    0 -----
M13 R   :  1171 -----

pES1      4615 atggcgcttcgcttgtaataaagcccgcttcggcgggcttttttt-----
NedAlguF:    0 -----
OppAlguR: 1034 .an.nnn.....-n.n.....n..nn.---n.n.gn.....gnnnnncntnngnngnnnttttn
M13 F   :    0 -----
M13 R   :  1171 ----nnnnnn.nn.nnnnnn.nnnnnnnnnnnn-----

```

Figur B.1: Multippel sammenstilling av sekvensdata fra *Aalgu* satt inn i pHE179. Sekvensdata er sammenlignet med ønsket plasmid (pES1). Prikk betyr riktig base. Strek betyr ingen base. n betyr ukjent base. Sekvensfragmentene er navngitt etter primerene som er brukt for å lage fragmentene.

Sekvensdata for pES2:

```

128PFLU3927A  47 agctgtcaaggaagccccaggctccagcacattaatgcgtgctaattcgttccttggaatcagactcgc
M13 R   :  1128 -----
M13 F   :  141 .....
3927 739 :    1 -----
3927 1759:  1182 -----

128PFLU3927A  117 gtttttcgcttcgactatctccggagccacatccggcaagggtcggcgctattgcagcgcaat
M13 R   :  1128 -----
M13 F   :  211 .....
3927 739 :    1 -----
3927 1759:  1182 -----

128PFLU3927A  187 ttgcaggacctcgtcaatccatttaaccggtttaaactgaagatcctgcttgatattgtcaggaatctcc
M13 R   :  1128 -----nnn..nnnnnnnnnnnnnnn.nnnnnnnnnnnnnnnn.nnnnnnnnnnnnn
M13 F   :  281 .....
3927 739 :    1 -----
3927 1759:  1182 -----

128PFLU3927A  257 ttcaagtcgcaacattctcttcaggaatgatcacggtcttgataccgccccggtgtgccgaagcaatt
M13 R   :  1077 nnnnnnnnnnnn.nnnnnnnn.-----
M13 F   :  351 .....C.
3927 739 :    1 -----
3927 1759:  1182 nnnnnnnnnn.n.nn..nnnnnn.-----

128PFLU3927A  327 tctctttcaggccaccgatggccaatacctggccacgcagggtgatttccccggtcattgcgacatcggc
M13 R   :  1054 nnnn..nnnn.nnnnnnnnnn.-----
M13 F   :  421 .....
3927 739 :    1 -----
3927 1759:  1158 -----

```

```

128PFLU3927A 397 tcgcaccggaatgccggtcaatgccgacaccagcgcctgtcacatgcctacgccggcgctagggccgtct
M13 R : 1033 -----
M13 F : 491 .....
3927 739 : 1 -----
3927 1759: 1158 -----

128PFLU3927A 467 ttaggcgtcgcccccttccggcatatggatgtgggtgtcgtgcttctcgtggaagtccaggggatccca
M13 R : 1033 -----
M13 F : 561 .....
3927 739 : 1 -----
3927 1759: 1158 .nnnnnnnnn..nnnnnnnnntn..nnn.-----

128PFLU3927A 537 ggctcctggcgcggctgcgaccacggctctgtgcgcggtgatggattcgaccatcacgtcaccagggga
M13 R : 1033 -----
M13 F : 631 .....
3927 739 : 1 -----
3927 1759: 1129 -----

128PFLU3927A 607 accggtcttgatcagttggcctttaccgggatcaccgcggcttcgat-ggtcagcaattcgccgccac
M13 R : 1033 -----
M13 F : 701 .....-.....
3927 739 : 1 -----
3927 1759: 1129 -----nnnnnn..nnnnnnnnnnnn.nn.nn..nn.nn..n.n.n.n..nn..nn

128PFLU3927A 676 t-tgggtccacgccaggcccgctcacctgccctactgatcctgttgctcgg-ccaggcc-atagcggaat
M13 R : 1033 -----
M13 F : 770 .-.....-.....-.....-.....
3927 739 : 1 -----
3927 1759: 1074 nn...n...n.....nn...n...n..n..n...nn...n...n..n.n.nn....

128PFLU3927A 743 ttacgcacgcccaggaagtgttccaggagtcggccgtgaccttcaccgagaagcgtttttccagcgcac
M13 R : 1033 -----
M13 F : 836 .....n.n...n.....nnn.....n...nnn.nnan.ancg...nnn..nnn.
3927 739 : 1 -----c.nnn..nnn.....
3927 1759: 1004 .....

128PFLU3927A 813 gttccttgaccgccttgccggcagatcttcgcgatctggcgctccaggccccgtacaccggcctcgcgggt
M13 R : 1033 -----
M13 F : 906 ..-n..nn...nn...-----
3927 739 : 63 .....
3927 1759: 934 .....

128PFLU3927A 883 gtaataacgcacgatatcgcgatcgctcgacctgaattcgatctcgcccttcttcaggccattggcc
M13 R : 1033 -----
M13 F : 921 -----
3927 739 : 133 .....
3927 1759: 864 .....

128PFLU3927A 953 gaaatctgcttggcgcgaggatattgaccgcgatgttgatcttctcgtcttcggtgtagcccggcagac
M13 R : 1033 -----
M13 F : 921 -----
3927 739 : 203 .....
3927 1759: 794 .....

128PFLU3927A 1023 gaatcacctccatccgggtccagcaatgccggcggaatgttcatggagttggaggtgcacaggaacatcac
M13 R : 1033 -----
M13 F : 921 -----
3927 739 : 273 .....
3927 1759: 724 .....

128PFLU3927A 1093 gtcggacaggctcgtagtcgacttccaggtaatggctcgttgaaattgtggttctgctcggggtcgagcact
M13 R : 1033 -----
M13 F : 921 -----
3927 739 : 343 .....
3927 1759: 654 .....

128PFLU3927A 1163 tcgagcaacgccgaggccggatcgccacgcatgtcactgccattttgtcgatttcatcgagcaggaaca

```

```

M13 R      :    1033 -----
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     413 .....
3927 1759  :     584 .....

128PFLU3927A 1233 gcgggttgcgcacaccaccttcgtcatcttttgaatcaatcttcctggcatcgaaccgatgtacgtccg
M13 R      :    1033 -----
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     483 .....
3927 1759  :     514 .....

128PFLU3927A 1303 gcgatgaccacgaatttcgcttcacgcgtacaccaccgaggccatgcgcacgaatttacggttggtg
M13 R      :    1033 -----
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     553 .....
3927 1759  :     444 .....

128PFLU3927A 1373 gcattggcaatcgactcggccagcgagggtttaccacaccaggcgggcccaccaggcacaacaccggac
M13 R      :    1033 -----nnn.nn
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     623 .....
3927 1759  :     374 .....

128PFLU3927A 1443 cggaatcttttcacgcgcttttcacggcgagggtattcgaggatgcggtctttgacttcttcaaggcc
M13 R      :    1027 nnn.nnnnnn..nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnngnn.nn.-----
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     693 .....
3927 1759  :     304 .....

128PFLU3927A 1513 atagtggcggcatcgaggatgtcttcagcgggcccaggctcggcgccaccttggctctgagccttccac
M13 R      :     985 -----nn.nnn
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     763 .....
3927 1759  :     234 .....n..nn.....

128PFLU3927A 1583 ggcacctgcaccagccagtcgatgtaggagcgcaccacgggtggcttcggccgacatcggcgacatttgc
M13 R      :     979 nnnnn.nnnnn.cnnn...n.n.nnnnn.nn.n.nnn.nnn..nnnnnnnnnn.....n..n...n
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     833 .....
3927 1759  :     164 .....n..-----

128PFLU3927A 1653 tgagcttggtcagctcggcgttggccttggctcagggcgtctttcggcaggccggc-ggcatcgatacgct
M13 R      :     909 nn..n.n.n...n.n...nnnnnnn..n.n..nn..n-nn...nnnn.nnn.....
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     903 .....
3927 1759  :     121 -----

128PFLU3927A 1722 ttttcagctcttcgatttcggttggtggccttcctcgtctgcgccgagttccttctgaatggccttcatctg
M13 R      :     840 .....n.....n.....
M13 F      :     921 -----
3927 739   :     972 .....n.....nn..nn.....nnnn.nnnn..n-nnnnnnn.n.nn..
3927 1759  :     121 -----

128PFLU3927A 1792 ctattcaggtagtagtactcgcgctggctgcgctccatttgtttcttcacacgaccacggatgcggtttctca
M13 R      :     770 .....
M13 F      :     921 -----
3927 739   :    1041 ..nn..n-nnn..n...nnnn...-----
3927 1759  :     121 -----

128PFLU3927A 1862 acctgcaacaggtcgatttcggcatccagcagtgccagcacatgctcaacacgggcccggcaggctcgatga
M13 R      :     700 .....
M13 F      :     921 -----
3927 739   :    1064 .....
3927 1759  :     121 -----

```

```

128PFLU3927A 1932 tttcaggatgtcttgcttctgctcgatcttcagcgccatgtgcgcgccatggtgtcgaccaggcggct
M13 R      :   630 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2002 tggctcatcgatgctgttaaggagacaggacttcagccgggactttcttgccaactgcacatactgc
M13 R      :   560 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2072 tcgaattgagagagcaggctgctgacaaaaacttcagactcgcgctccggggcctcgacttcgtcgatca
M13 R      :   490 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2142 gcgctacttcggcgcgcaggtgaccatccacctccatgaagcgtcgaccgcaccgcgctgctgccttc
M13 R      :   420 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2212 caccaacaccttgacggtgccatccggcagtttgagcaattgcagaacagtggcaatggtgccaacgcga
M13 R      :   350 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2282 tacagggcctcttcgcccggatcatcatcagcaggatttctttggccaacagcaggatctgcttgcgc
M13 R      :   280 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2352 ccgtcatcgctgcctcaagggttcgatagacttctcgcgccccacgaacagcgggataaccatgtgcgg
M13 R      :   210 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2422 atagacgacgacatcacgcaacggcaggagaggcaattcgatggttcttcatatgttcgcctcatcaa
M13 R      :   140 .....
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----
3927 1759  :   121 -----

128PFLU3927A 2492 gcttatcgataccgtcgacctcgagggggggcccggtaccgatgcatgcaagcttggcactggccgtcgt
M13 R      :    70 .....nnnnn.....n.....-----
M13 F      :   921 -----
3927 739   :  1064 -----nn.nnn..n.
3927 1759  :   121 -----

```

Figur B.2: Multippel sammenstilling av sekvensdata fra PFLU3927 satt inn i pUC128. Sekvensdata er sammenlignet med ønsket plasmid (128PFLU3927A). Prikk betyr riktig base. Strek betyr ingen base. n betyr ukjent base. Sammenstillingen viser at sekvensen som ble undersøkt inneholder en mutasjon på 325 nt i forhold til 128PFLU3927A hvor en t er endret til c. Mutasjonen er likevel en stille mutasjon som fremdeles gir lysin som aminosyre, og fragmentet kunne derfor brukes videre. Sekvensfragmentene er navngitt etter primerene som er brukt for å lage fragmentene.

PES3	800	cgcttcggtccttgccgacgccggctcgggcctgcgaacaggaacgaaccgacaggcttgtccggcgacttgaggcccgac
M13R	781
264R	1154	-----
ClpA 1714	866
ClpA 721	56	.n..--nnnnn.....n.....
PES3	880	gcgacagcttgatcgcggtggacagcgcgtcgcgatggctgcacacctggcgaatacggtagtcttcaggctcgcgctccagg
M13R	861n..n-n.....
264R	1154	-----
ClpA 1714	786
ClpA 721	134
PES3	960	ttacgcagcagctccttatcggaactggtgacgtgtttagggcgaatccgcgcgatcttgccacgatgtcctcgacctg
M13R	887	-----
264R	1154	-----nnn .nnnnnnnnnn .nnnnnnnnnn .nn.n. nnnnnnnnnnnnn
ClpA 1714	706
ClpA 721	214
PES3	1040	agcaacgtcgcgatgcgcttcacacgcttctcgaccggctgcaggcgtggtaggcgccctcctcgcgatcacatcgatgg
M13R	887	-----
264R	1107	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn .-----
ClpA 1714	626
ClpA 721	294
PES3	1120	ctttgtccggcatgtgccggtcattgatgtagcgcgatgcgagctcagcagccgcacgcagagcctcatcggtgtactcg
M13R	887	-----
264R	1084	-----
ClpA 1714	546
ClpA 721	374
PES3	1200	atgccatggtgcgcttcgaaacgcccttgagcccgccgagcagataccgatggtgtcttcgactgaaggctcggacacgtc
M13R	887	-----
264R	1084	-----nnn.n...c.nn.nn..nn.n.-----
ClpA 1714	466
ClpA 721	454
PES3	1280	gaccttctggaagcgcgcgccaaggcagcgtctttctcaagatgccacggaattcctggaactggtcgaaccgatgc
M13R	887	-----
264R	1062	-----
ClpA 1714	386
ClpA 721	534
PES3	1360	agcggatatcaccgcagagagcagcggtttgagcaggtggaggcatccattacccgccggacgccgaccggcaccg
M13R	887	-----
264R	1062	-----
ClpA 1714	306
ClpA 721	614
PES3	1440	atgatggtgtggatctcgtcgcgatgaacaaaatcgctgaggcgttttttcagttcaccagcaacgccttgaagcgttt
M13R	887	-----
264R	1062	-----
ClpA 1714	226
ClpA 721	694
PES3	1520	ctcgaatcggcagctatttggctccggcgagcaaggcggcaggtccaggagtagacgacgctgtttgcccagcaggt
M13R	887	-----
264R	1062	-----
ClpA 1714	147n..nn...nnnnn.---annnnnnnn.....-nnnnn
ClpA 721	774
PES3	1600	ccggcacctggttatcgcgatgcgcttggccaggccttcggcaatcgcggtttaccacgcccgcctcaccaccagc
M13R	887	-----
264R	1062	-----
ClpA 1714	72nnnn.-----tnnnnnnn.nnt.gnnnn.nn.....nn.....nnnnnnnnnnnnnnnnnnnn--
ClpA 721	854
PES3	1680	aacgggttgttcttgcgacgacgcgagggatctgcgctacacgctcaacctcaagctcgcgccccaccagcggatcgat
M13R	887	-----

264R	1062	-----
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	934
PES3	1760	ccgcccctggcgcgccagttcgttgaggttgctggcataggcatccagtggattgccgaagaagaagactcaccgccct
M13R	887	-----
264R	1062	-----
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1014
PES3	1840	cgtcgtcctgcatttcctgctcacctcggaatgatcgccgtgccaggcactttggagataccgtggcgatgtaattg
M13R	887	-----nnnnnn.nnn.nnnn...n-----
264R	1062	-----cnn.n.....
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1094nnnnnnnnnnnnnn.n.nnnnnn.n.nnnnnnnnnn-----
PES3	1920	acgacatcaatacgggcaacgctctgctgtttgagcaggaacactgcctggctttcctgttgcgtgaaaatggccacaag
M13R	907	-----
264R	993
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1161	-----
PES3	2000	cacattggcgcccgtgacttcacgcttaccggagctctgaacgtggaaaacagcgcgctgcaatacccgctgaaagccca
M13R	907	-----
264R	913
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1161	-----
PES3	2080	gggttgctgggtttcacggtcctcgtcgtgcacgggatcagtgccgtggtggagtcgataaactcctgcaggtcgtgc
M13R	907	-----
264R	833
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1161	-----
PES3	2160	ttgagtttgcgaggttgccgcccgcacgcacgtagaacggtggcggcagcttcgttatccaaaagtgccagcagcaggtg
M13R	907	-----
264R	753
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1161	-----
PES3	2240	ttcgacggatcatgaattcatgacgcttcgaacggcctccttgaaggcaagattgagggtagcttcgagctcgcggttta
M13R	907	-----
264R	673
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1161	-----
PES3	2320	acatatgttcatgacttcattattattgtacatggtgcatagagcctcagggtaggtctttctagagatagccatTTTT
M13R	907	-----
264R	593
ClpA 1714	0	-----
ClpA 721	1161	-----

Figur B.3: Multipl sammenstilling av sekvensdata fra ClpA satt inn i pEM2. Sekvensdata er sammenlignet med ønsket plasmid (pES3). Prikk betyr riktig base. Strek betyr ingen base. n betyr ukjent base. Sammenstillingen viser at det er riktig sekvens, med dekning over hele ClpA-fragmentet i pES3. Templat er pES3. Sekvensfragmentene er navngitt etter primerene som er brukt for å lage fragmen

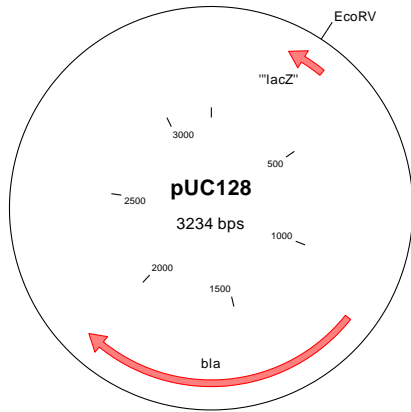
Vedlegg C Primere

Tabell C.1: Primere brukt i oppgaven

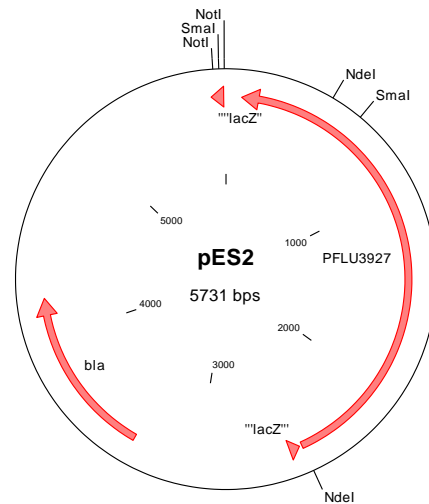
Primer	Sekvens
ClpA 721	5' ATCAGGCGCGATACCGTGTG 3'
ClpA 1714	5' CGCGTCGTCGCAAGAACAAC 3'
ClpA R	5' ATTGCGGCCGCTACCGCTATCGGGAGCAAG 3'
ClpA F	5' TAATCATATGTTAAACCGCGAGCTCGAAGTC 3'
OppAlgU R	5' TGGCTTCCCGACCAGCTGCTGATCCTCTTC 3'
OppAlgU F	5' TAATCTAGAATTCGAAGCCGCCGTCGTC 3'
NedAlgU R	5' CAATGACGGCCAGTTCGTAG 3'
NedAlgU F	5' CAGCAGCTGGTCCGGGAAGCCATCGATAAAGC 3'
PFLU3927 R	5' ATTGCGGCCGCTGGCCTACAGACACTTAAGAG 3'
PFLU3927 F	5' GAGGCGAACATATGAAGACAACCATCGAATTGC 3'
PFLU3927 1759	5' GCCACAACGAAATCGAAGAG 3'
PFLU3927 739	5' AGGCCATAGCGGAATTTACG 3'
M13 F	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
M13 R	5' AGCGGATAACAATTTACACAGGA 3'
pHE264R	5' GTAGCGCCGATGGTAGTGTG 3'

Vedlegg D Plasmidkart

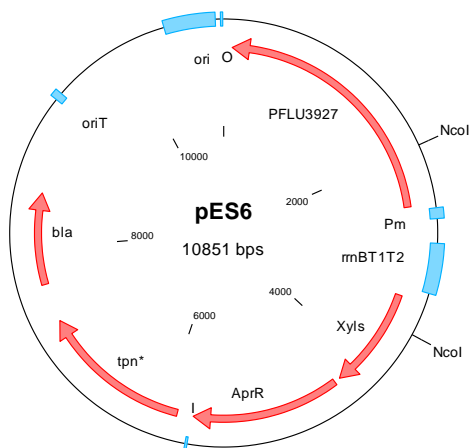
For å overføre genetiske elementer til *P. fluorescens* ble det brukt plasmider som vektorer. En oversikt over plasmidene som ble brukt i oppgaven er gitt under.



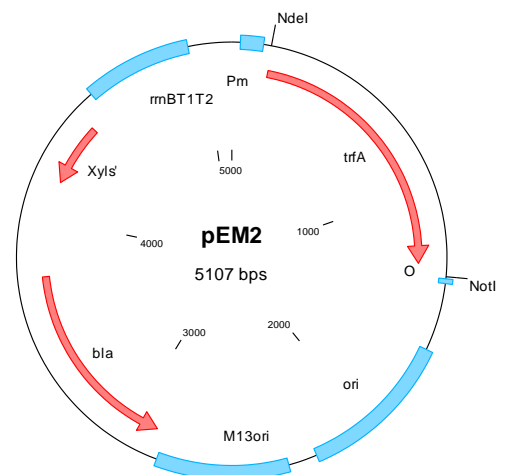
Figur D.1: pUC128



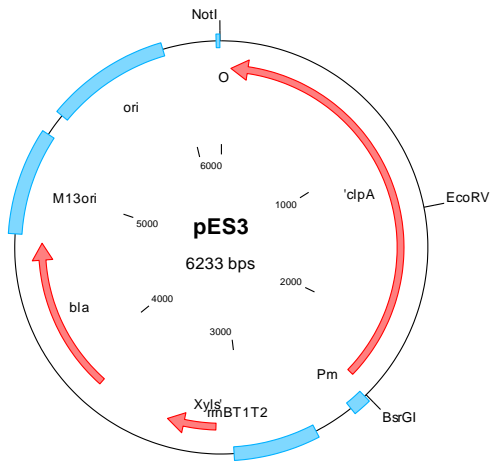
Figur D.2: pES2



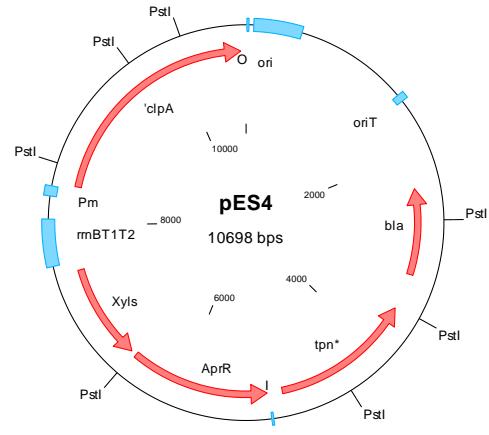
Figur D.3: pES6



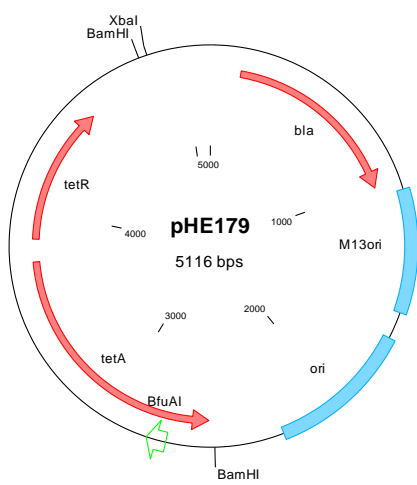
Figur D.4: pEM2



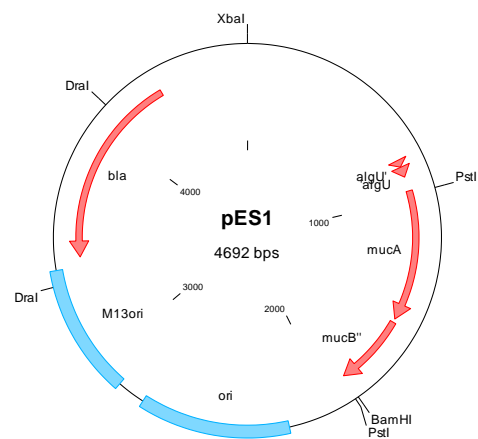
Figur D.5: pES3



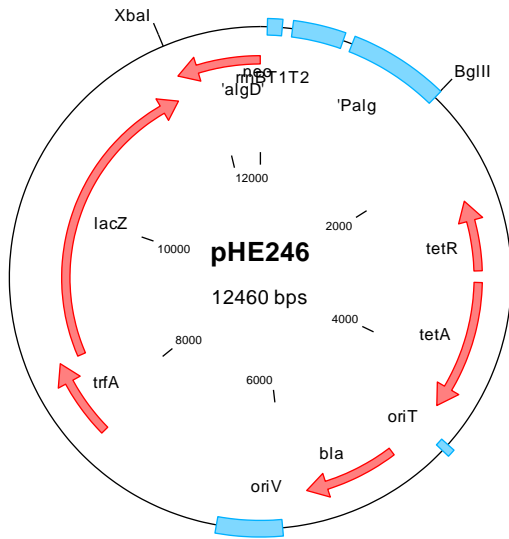
Figur D.6: pES4



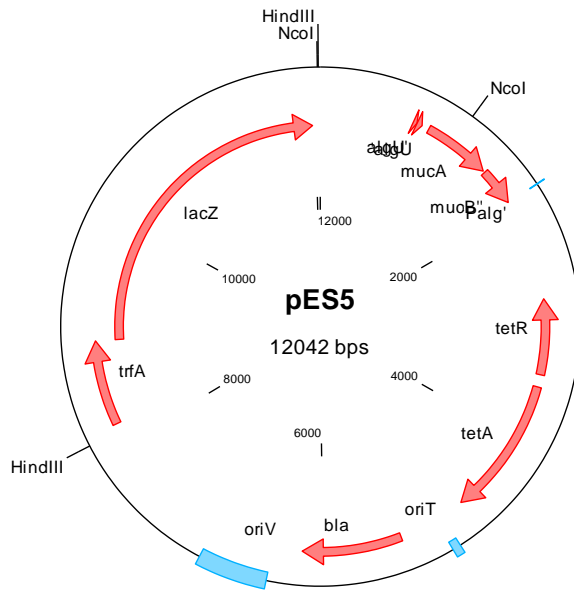
Figur D.7: pHE179



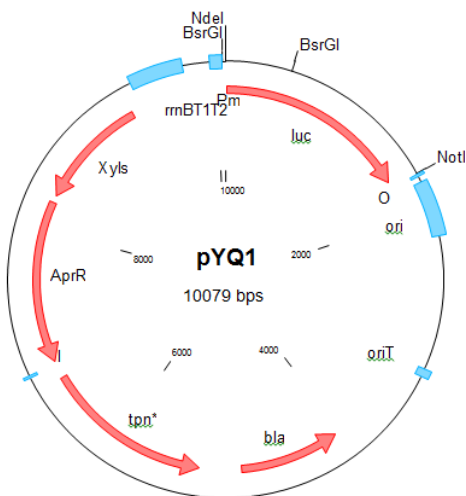
Figur D.8: pES1



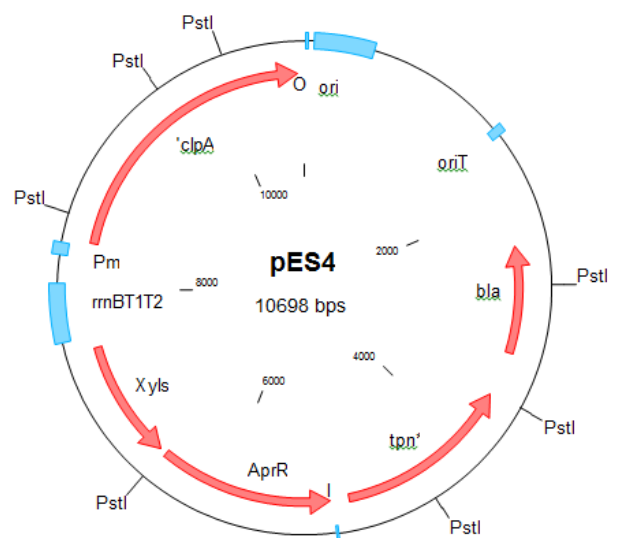
Figur D.9: pHE246



Figur D.10: pES5



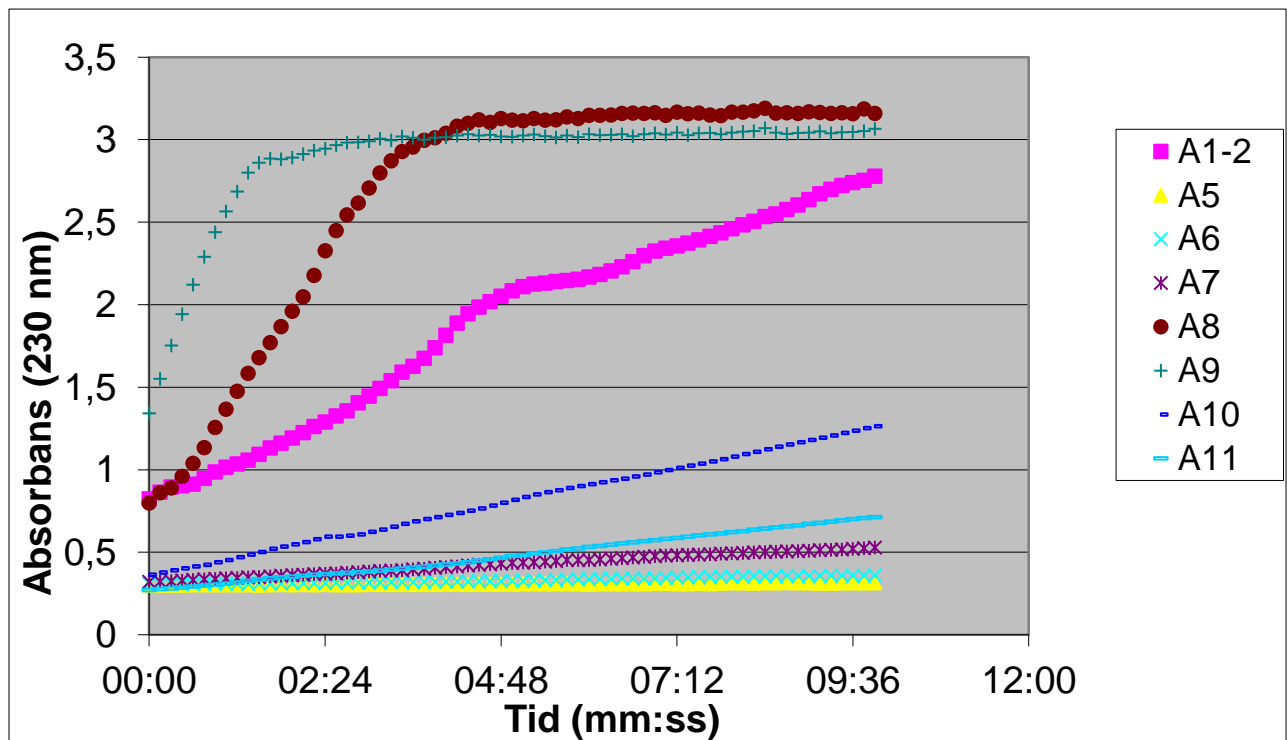
Figur D.11: pYQ1



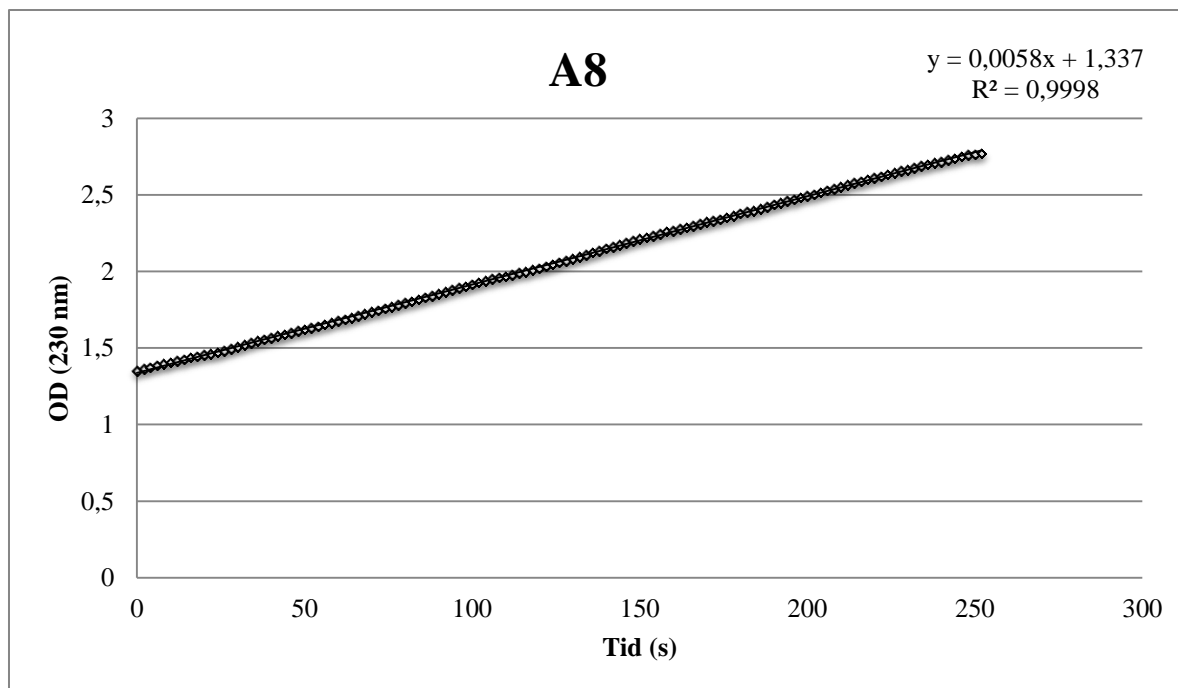
Figur D.12: pES4

Vedlegg E Isolering av G-lyase

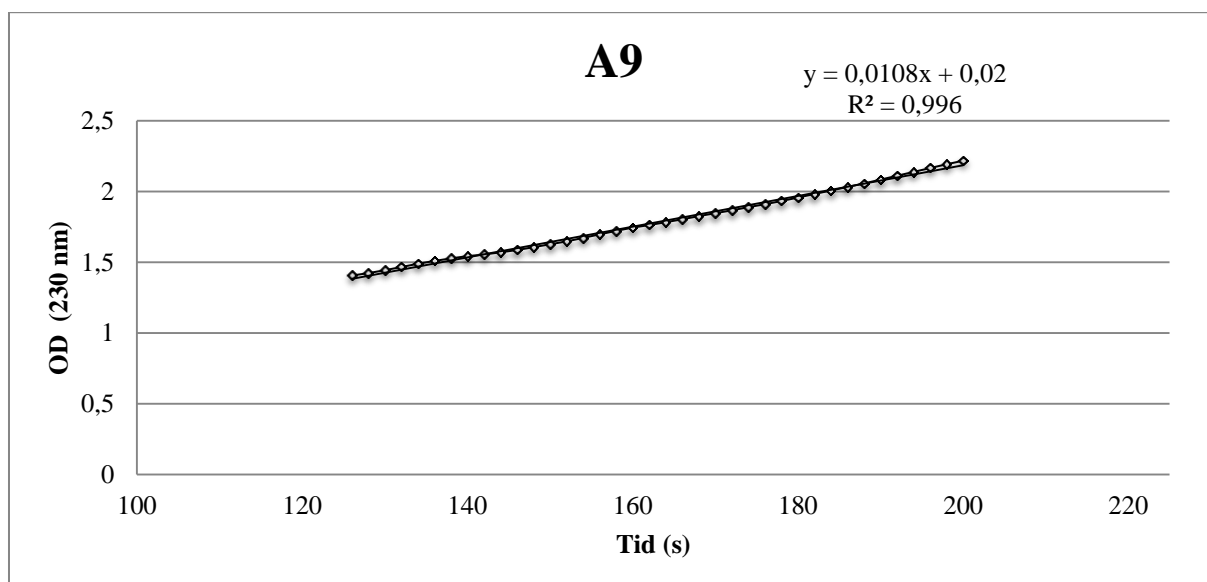
For å sjekke hvilke prøver som hadde lyase-aktivitet ble det utført en nedskalert måling. Denne målingen er vist i Figur E.1. I de prøvene hvor det ble påvist enzymaktivitet, ble det gjort enzymaktivitetsmåling som ble beregnet ut fra stigningstallet til trendlinjen i kurven til de respektive målingene. Disse målingene er vist i Figur E.2-4.



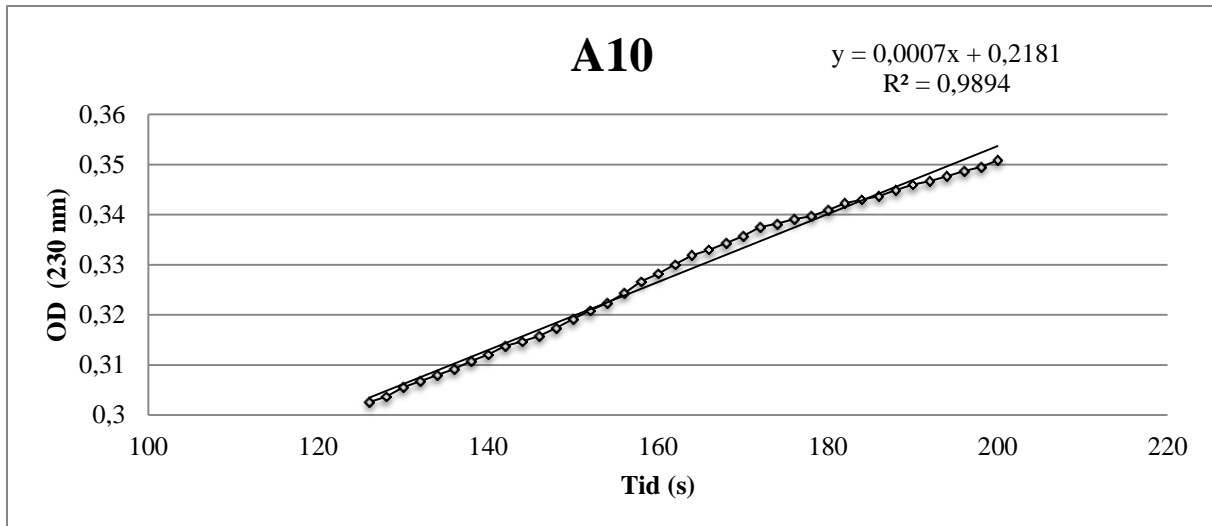
Figur E.1: Nedskalert enzymaktivitetsmåling av flere prøver



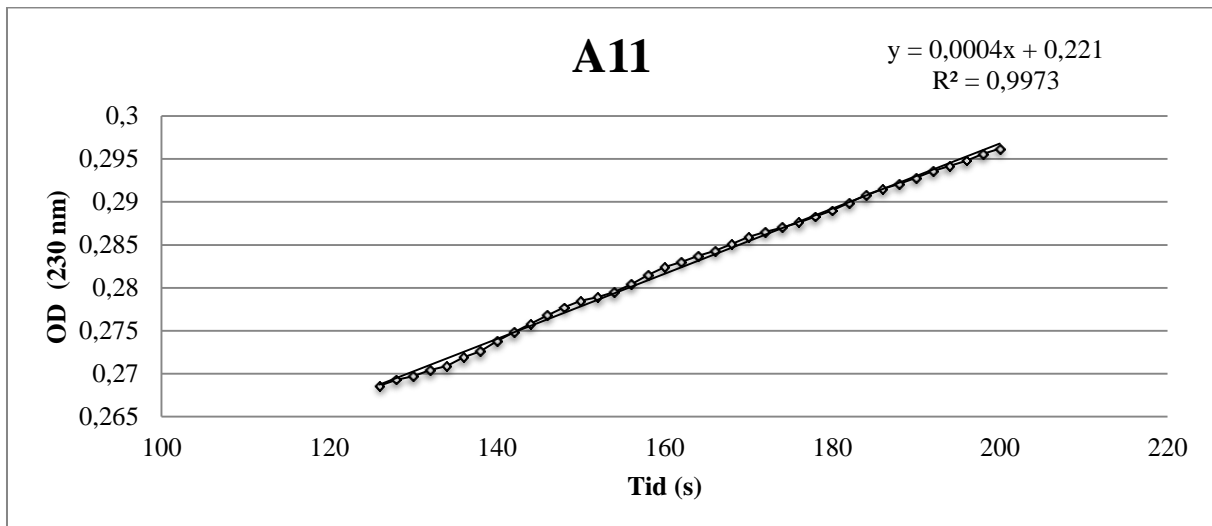
Figur E.2: Absorbansøkning for prøve A8. Trendlinjen ble brukt til å beregne konsentrasjon av AlyA i prøven.



Figur E.0.1: Absorbansøkning for prøve A9. Trendlinjen ble brukt til å beregne konsentrasjon av AlyA i prøven.



Figur E.0.2: Absorbansøkning for prøve A10. Trendlinjen ble brukt til å beregne konsentrasjon av AlyA i prøven.



Figur E.0.3: Absorbansøkning for prøve A11. Trendlinjen ble brukt til å beregne konsentrasjon av AlyA i prøven.

Vedlegg F Rådata fra alginatmålinger

Tabell F.1: Rådata for alginatmålinger

Stamme	Delfor søk	Paral lell	A ₂₃₀					
			Før tilsats av enzym			Etter 4 t enzymreaksjon		
			1	2	3	1	2	3
Pf <i>mucA</i>	2	1	1,174	1,188	1,207	1,160	1,166	1,195
		2	1,173	1,236	1,218	1,159	1,208	1,291
		3	1,275	1,249	1,149	1,253	1,220	1,136
Pf <i>mucA</i> ::TnES4	2	1	1,176	1,209	1,225	1,162	1,188	1,213
		2	1,240	1,212	1,316	1,221	1,263	1,318
		3	1,308	1,204	1,209	1,271	1,188	1,195
Pf MS1	1	1	1,203	1,182	1,284	1,207	1,174	1,278
		2	1,241	1,316	1,303	1,229	1,289	1,287
		3	1,170	1,180	1,162	1,195	1,163	1,158
Pf MS1 Δ algC::TnKb60 Δ algU	1	1	1,129	1,153	1,199	1,132	1,149	1,179
		2	1,390	1,290	1,174	1,361	1,268	1,159
		3	1,185	1,183	1,220	1,177	1,182	1,214
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 30O1 <i>clpA</i> ::TnES4	1	1	1,129	1,155	1,242	1,183	1,201	1,275
		2	1,440	1,318	1,306	1,491	1,405	1,364
		3	1,316	1,303	1,376	1,375	1,368	1,433
Pf Δ algC::TnKb61 17p19 <i>PFLU3927</i> ::TnES6	2	1	1,305	1,395	1,377	1,313	1,373	1,360
		2	1,297	1,312	1,347	1,302	1,300	1,321
		3	1,261	1,304	1,331	1,262	1,301	1,310
Pf Δ algC::TnKb61 17p19 <i>PFLU3927</i>	2	1	1,367	1,275	1,204	1,356	1,304	1,221
		2	1,143	1,143	1,144	1,045	1,138	1,133
		3	1,202	1,222	1,305	1,223	1,229	1,280
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 30O1 <i>clpA</i>	1	1	1,300	1,185	1,170	1,369	1,254	1,249
		2	1,188	1,223	1,269	1,268	1,291	1,348
		3	1,264	1,461	1,494	1,344	1,513	1,562
Pf MS1 Δ algC::TnKb60	1	1	1,212	1,229	1,197	1,227	1,229	1,204
		2	1,216	1,226	1,256	1,210	1,238	1,248
		3	1,331	1,278	1,150	1,295	1,272	1,161
Pf <i>mucA</i> ::TnES6	2	1	1,191	1,190	1,236	1,211	1,183	1,219
		2	1,277	1,279	1,424	1,247	1,278	1,394
		3	1,320	1,238	1,251	1,324	1,236	1,253

Tabell F.2: Rådata for alginatmålinger

A₂₃₀

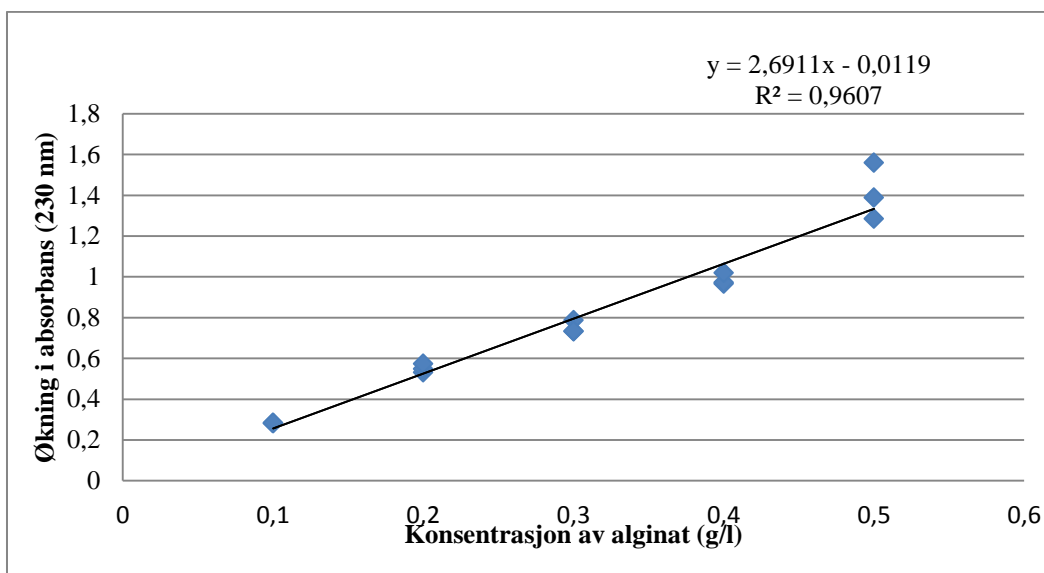
Stamme	Delforsøk	Parallell	Før tilsats av enzym			Etter 4 timer enzymreaksjon		
			1	2	3	1	2	3
Pf <i>mucA</i> ⁻	2	1	1,193	1,253	1,200	1,168	1,228	1,181
		2	1,229	1,335	1,234	1,240	1,326	1,225
Pf <i>mucA</i> ::TnES4	2	1	1,246	1,244	1,356	1,227	1,223	1,320
Pf MS1	1	1	1,252	1,323	1,219	1,213	1,307	1,202
		2	1,254	1,237	1,255	1,234	1,217	1,238
Pf MS1 Δ algC::TnKb60 Δ algU	1	1	1,239	1,400	1,227	1,228	1,377	1,213
		2	1,692	1,218	1,245	1,338	1,216	1,265
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 30O1 <i>clpA</i> ::TnES4	1	1	1,441	1,476	1,509	1,477	1,493	1,550
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 17p19 <i>PFLU3927</i> ::TnES6	2	1	1,432	1,268	1,347	1,407	1,262	1,385
Pf MS1 Δ algC::TnKb60 17p19 <i>PFLU3927</i>	2	1	1,205	1,233	1,230	1,198	1,226	1,224
		2	1,230	1,233	1,368	1,221	1,221	1,348
Pf MS1 Δ algC::TnKb61 30O1 <i>clpA</i>	1	1	1,230	1,325	1,217	1,297	1,401	1,293
		2	1,354	1,270	1,347	1,427	1,339	1,417
		3	1,305	1,443	1,278	1,375	1,517	1,344
Pf MS1 Δ algC::TnKb60	1	1	1,428	1,211	1,251	1,326	1,216	1,258
Pf <i>mucA</i> ::TnES6	2	1	1,186	1,235	1,239	1,182	1,230	1,224
		3	1,411	1,240	1,325	1,393	1,223	1,318

Tabell F.3: Rådata for standardkurver

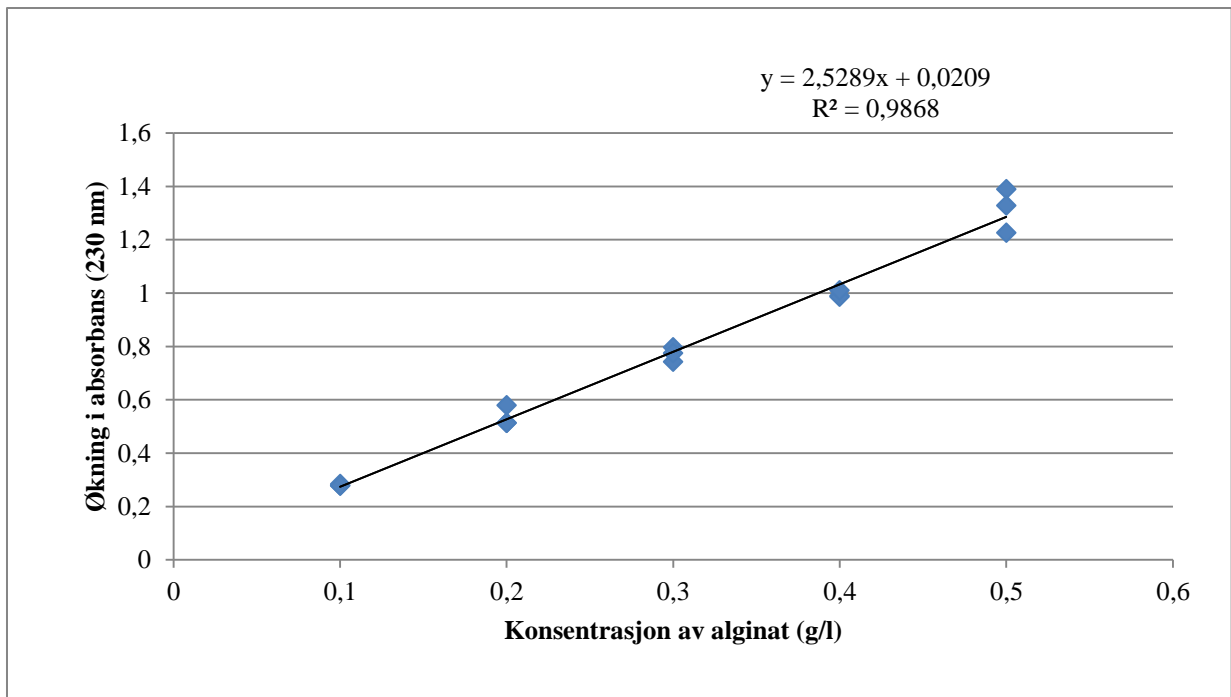
	Alginatkonsentrasjon (g/l)	A ₂₃₀ før enzym			A ₂₃₀ etter 4 timer		
		1	2	3	1	2	3
Standardkurve 1	0,0	0,224	0,234	0,198	0,238	0,248	0,212
	0,1	0,210	0,205	0,209	0,504	0,501	0,504
	0,2	0,219	0,226	0,233	0,763	0,788	0,820
	0,3	0,242	0,203	0,208	1,043	0,949	0,955
	0,4	0,226	0,229	0,233	1,204	1,214	1,266
	0,5	0,247	0,281	0,242	1,648	1,852	1,539
Standardkurve 2	0,0	0,226	0,236	0,216	0,246	0,258	0,225
	0,1	0,203	0,283	0,224	0,504	0,578	0,519
	0,2	0,227	0,238	0,211	0,757	0,834	0,741
	0,3	0,244	0,202	0,204	1,058	0,962	0,996
	0,4	0,207	0,205	0,210	1,213	1,208	1,237
	0,5	0,243	0,206	0,241	1,650	1,450	1,587

Tabell F.4: Vekstmålinger under varmesjokkeksperiment. HS indikerer varmesjokkbehandling

Stamme	OD ₆₀₀ 5 t	OD ₆₀₀ 24 t	OD ₆₀₀ 48 t
17p19 PFLU3927::TnES6	3,917	3,917	4,727
17p19 PFLU3927::TnES6	3,621	3,621	4,972
17p19 PFLU3927::TnES6	3,462	3,462	4,796
17p19 PFLU3927-	3,734	3,734	4,517
17p19 PFLU3927-	3,749	3,749	5,545
17p19 PFLU3927-	3,835	3,835	5,642
17p19 PFLU3927::TnES6 HS	3,095	3,095	4,027
17p19 PFLU3927::TnES6 HS	3,170	3,170	4,581
17p19 PFLU3927::TnES6 HS	3,299	3,299	4,487
17p19 PFLU3927- HS	3,252	3,252	4,367
17p19 PFLU3927- HS	3,316	3,316	4,980
17p19 PFLU3927- HS	3,217	3,217	4,786



Figur F.1: Standardkurve 1



Figur F.2: Standardkurve 2