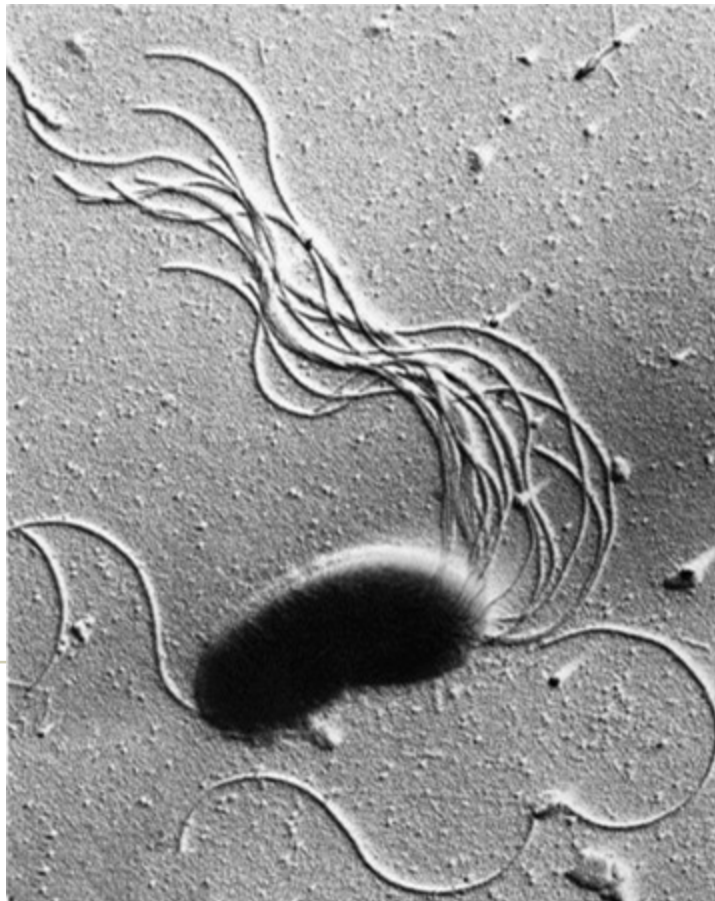


Mali Mærk

# Bioinformatisk analyse og genetisk modifisering av karbohydratmetabolismen i *Pseudomonas fluorescens*, med fokus på alginatsyntese fra glukose

Masteroppgave  
Trondheim Januar 2006





## **Forord**

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Institutt for Bioteknologi ved NTNU i Trondheim, under veiledning av professor Svein Valla og dr.scient. Helga Ertesvåg. Først og fremst vil jeg takke mine veiledere for gode råd og oppfølging underveis. Jeg setter stor pris på at dere tok dere tid til å svare på spørsmål, komme med faglige innspill, eller bare slå av en prat. Jeg vil også takke alle som jobber på bioteknologilaboratoriene i Realfagbygget for å ha skapt et hyggelig arbeidsmiljø, og for tips og råd når det gjelder praktisk laboratoriearbeid.

Jeg vil også takke Tommy for støtte og oppmuntring underveis, og for å ha hatt forståelse for at arbeidet med denne oppgaven til tider opptok svært mye av tiden min. Sist, men ikke minst, vil jeg sende en takk til mine foreldre, som har støttet alle mine veivalg og alltid stilt opp for meg.

Denne oppgaven markerer avslutningen av mitt mastergradsstudium i bioteknologi, og slutten på en mangeårig studenttilværelse. Jeg har trivdes veldig godt med studiene mine, og vil nok savne denne tiden. Like fullt vil det bli spennende å se hva fremtiden bringer.

## Innhold

Forord .....	3
Innhold .....	4
Sammendrag .....	6
1. Innledning.....	8
1.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> - Taksonomi og biologi.....	8
1.2. Glukoseopptak i bakterier .....	8
1.2.1. Poriner .....	9
1.2.2. “Major facilitator” superfamilien.....	9
1.2.3. ATP-bindende kassett superfamilien .....	10
1.2.4. Fosfoenolpyruvat:sukker fosfotransferasesystemet .....	11
1.3. Sentral glukosemetabolisme i bakterier .....	12
1.3.1. Glykolysen .....	12
1.3.2. Entner-Doudoroff-sporet og det direkte oksidative sporet .....	14
1.3.3. Pentosefosfatsporet .....	15
1.3.4. Glukoneogenesen .....	16
1.4. Alginat.....	17
1.4.1. Struktur, sammensetning og fysiokjemiske egenskaper .....	17
1.4.2. Forekomst og funksjoner i naturen .....	19
1.4.3. Bruksområder.....	19
1.5. Bakteriell biosyntese av alginat .....	20
1.6. Formål med oppgaven.....	23
2. Materialer og metoder .....	25
2.1. Kartlegging av glukosemetabolisme i <i>P. fluorescens</i> .....	25
2.1.1. Bioinformatikkverktøy .....	25
2.1.2. Fremgangsmåte .....	27
2.2. Medier og løsninger .....	29
2.3. Primersekvenser .....	33
2.4. Bakteriestammer og plasmider.....	34
2.5. Metoder .....	36
2.5.1. Oppdyrking og nedfrysing av cellekulturer .....	36
2.5.2. Amplifisering av DNA-fragmenter ved PCR.....	36
2.5.3. Rensing av DNA-fragmenter fra løsning .....	38
2.5.4. Plasmidisolering .....	39
2.5.5. Restriksjonskutting.....	40
2.5.6. Separering av DNA-fragmenter ved agarosegelelektroforese .....	40
2.5.7. Ekstraksjon av DNA-fragmenter fra agarosegel .....	41
2.5.8. Ligering av DNA-fragmenter.....	42
2.5.9. Preparering av kompetente celler og transformering av plasmid .....	42
2.5.10. Sekvensering av DNA-fragmenter .....	43
2.5.11. Konjugering og isolering av konjuganter.....	45
2.5.12. Undersøkelse av vekst med glukose som karbonkilde.....	46
2.5.13. Preparering av vasket cellesuspensjon for glukose dehydrogenase assay .....	46
2.5.14. Preparering av cellefritt ekstrakt for glukose-6-fosfat dehydrogenase assay .....	47
2.5.15. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon .....	47
2.5.16. Glukose dehydrogenase assay.....	48
2.5.17. Glukose-6-fosfat dehydrogenase assay .....	49
2.5.18. Enzymatisk alginatanalyse .....	50

3. Resultater.....	52
3.1. Kartlegging av glukosemetabolisme i <i>P. fluorescens</i> .....	52
3.1.1. Lokalisering av gener for glukoseopptak.....	54
3.1.2. Lokalisering av gener for glykolyesen og glukoneogenesen.....	55
3.1.3. Lokalisering av gener for Entner-Doudoroff-sporet og det direkte oksidative sporet.....	58
3.1.4. Lokalisering av gener for pentosefosfatsporet .....	61
3.1.5. Oppsummering.....	63
3.2. Bakgrunn for eksperimentelt arbeid.....	63
3.3. Optimalisering av PCR-reaksjon.....	65
3.4. Kloning av <i>gcd</i> , <i>zwf-1</i> og <i>zwf-2</i> inn i vektorer .....	66
3.4.1. Amplifisering av DNA-fragmenter fra <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525.....	66
3.4.2. Konstruksjon av plasmider inneholdende <i>gcd</i> , <i>zwf-1</i> og <i>zwf-2</i> .....	67
3.5. Sekvensering av <i>gcd</i> , <i>zwf-1</i> og <i>zwf-2</i> .....	68
3.6. Innføring av delesjoner i <i>gcd</i> , <i>zwf-1</i> og <i>zwf-2</i> .....	68
3.7. Konstruksjon av plasmider for genutskiftning.....	69
3.8. Konstruksjon av <i>P. fluorescens</i> delesjonsmutanter.....	71
3.8.1. Overføring og integrering av genutskiftningsvektorer i <i>P. fluorescens</i> .....	71
3.8.2. Isolering av integranter med plasmidtap.....	72
3.8.3. Verifisering av delesjonsmutanter .....	73
3.9. Undersøkelse av vekst med glukose som karbonkilde.....	75
3.10. Aktivitet av glukose dehydrogenase i <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525, Pf201 og $\Delta gcd$ -mutanter .....	76
3.11. Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase i <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525, Pf201, $\Delta zwf-1$ - og $\Delta zwf-2$ -mutanter .....	77
3.12. Alginatproduksjon i <i>P. fluorescens</i> Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter.....	79
3.13. Kloning av <i>pgi</i> inn i vektor .....	79
3.13.1. Amplifisering av DNA-fragment fra <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525.....	79
3.13.2. Konstruksjon av plasmid inneholdende <i>pgi</i> .....	80
3.14. Sekvensering av <i>pgi</i> .....	81
4. Diskusjon.....	82
4.1. Vekst med glukose som karbonkilde .....	82
4.2. Enzymaktivitet .....	84
4.3. Alginatproduksjon.....	85
4.4. Forslag til videre arbeid .....	87
5. Konklusjon .....	89
Litteratur.....	90
Bilagsliste .....	100

## Sammendrag

Den sentrale karbohydratmetabolismen i *Pseudomonas fluorescens*, med vekt på opptak og metabolisme av glukose, ble forsøkt kartlagt ved litteraturstudier og bioinformatisk analyse av tilgjengelige genomsekvenser. Det ble konkludert med at *P. fluorescens* tar opp glukose fra omgivelsene via poriner i ytre membran og glukose ABC-transportere i indre membran, og at den sentrale glukosemetabolismen omfatter ED-sporet, det direkte oksidative sporet, pentose-fosfatsporet, glukoneogenesen og nedre del av glykolysen. Ved glukosekatabolisme via det direkte oksidative sporet omdannes glukose til glukonat og 2-ketoglukonat i periplasma. Keto-glukonat og 2-ketoglukonat transporteres deretter over indre membran via transportere drevet av kjemiosmotiske gradienter. Genkandidater for alle enzymene og proteinene i de ovennevnte transportsystemene og metabolske sporene ble funnet.

Biosyntese av alginat er koblet til den sentrale karbohydratmetabolismen ved at fruktose-6-fosfat er utgangspunktet for alginatsyntese. I forkant av alginatsyntese i *P. fluorescens* dannes sannsynligvis fruktose-6-fosfat fra glukose ved nedbryting til trioser via ED-sporet, etterfulgt av resirkulering til fruktose-6-fosfat via glukoneogenesen. Konvertering av glukose til 6-fosfoglukonat, et viktig mellomprodukt i ED-sporet, kan gå via to spor; det direkte oksidative sporet og det fosforylative sporet. *P. fluorescens* har også genet for glukose-6-fosfat isomerase (*pgi*), som katalyserer isomerisering av glukose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Det ble framsatt en hypotese om at å blokkere glukosemetabolisme via det direkte oksidative sporet eller det fosforylative sporet kunne kanalisere mer glukose mot direkte konvertering til fruktose-6-fosfat, fremfor nedbryting og resirkulering via ED-sporet og glukoneogenesen. Dette kunne tenkes å bedre utnyttelsen av glukose med hensyn på alginatsyntese.

I den eksperimentelle delen av arbeidet ble *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201 benyttet. NCIMB 10525 produserer ikke alginat, mens Pf201 er en alginatproduserende NCIMB 10525-mutant. Med utgangspunkt i disse stammene ble det konstruert mutanter med en delesjon i genet for glukose dehydrogenase (*gcd*) eller glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-1* eller *zwf-2*). Disse enzymene katalyserer tidlige trinn i henholdsvis det direkte oksidative sporet og det fosforylative sporet. Mutantenes evne til å vokse med glukose som karbonkilde, samt aktiviteten av glukose dehydrogenase og glukose-6-fosfat dehydrogenase, ble undersøkt. For mutantene avledet fra Pf201 ble også alginatproduksjon undersøkt. I tillegg ble *pgi* sekvensert og klonet inn i en vektor, da overuttrykk av dette genet også kunne tenkes å kanalisere mer glukose mot direkte konvertering til fruktose-6-fosfat. Overuttrykk ble imidlertid ikke gjennomført.

De innførte mutasjonene så ikke ut til å forbedre alginatsyntese fra glukose. I Pf201 $\Delta$ *gcd* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* lå alginatproduksjonen på samme nivå som i Pf201, mens Pf201 $\Delta$ *zwf-1* ikke produserte alginat. *Zwf-1* ser altså ut til å være nødvendig for alginatsyntese, men det er uvisst hvorfor. Alle de konstruerte mutantene var i stand til å vokse med glukose som eneste karbonkilde. Inaktivering av *zwf-1* førte til kortere generasjonstid, mens inaktivering av *zwf-2* ikke påvirket veksten. Dobbelmutanten NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2* hadde imidlertid både lengre lag-fase og lengre generasjonstid enn utgangstammen. Inaktivering av *gcd* førte til lengre lag-fase og lengre generasjonstid i Pf201-mutanten, men påvirket ikke vekst i mutantene avledet fra NCIMB 10525. Det er imidlertid usikkert om inaktivering av *gcd* lyktes i NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*. I både NCIMB 10525 og Pf201 ble det detektert høyest aktivitet av glukose dehydrogenase etter dyrking ved lave glukosekonsentrasjoner. I NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2* var aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase høyest etter dyrking ved lave glukosekonsentrasjoner, mens aktiviteten var lik ved begge konsentrasjonene i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*. Pf201,

### *Sammendrag*

Pf201 $\Delta$ zwf-1 og Pf201 $\Delta$ zwf-2 viste høyest aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase etter dyrking ved høye glukosekonsentrasjoner. Forskjellene i enzymaktivitet og påvirkning av vekst tyder på at det kan være forskjeller i glukosemetabolismen til NCIMB 10525 og Pf201.

## 1. Innledning

### 1.1. *Pseudomonas fluorescens* - Taksonomi og biologi

Slekten *Pseudomonas* tilhører familien *Pseudomonadaceae* og orden *Pseudomonadales*. Pseudomonader er en stor og heterogen gruppe, hvor mange av artene kan degradere et vidt spekter av organiske forbindelser (Prescott *et al.*, 2002). Bakteriene i slekten *Pseudomonas* er rette eller lett buede Gram-negative staver med en eller flere polare flageller som sørger for bevegelse. De er vanligvis kjemoorganotrofe og aerobe, og har respiratorisk metabolisme med oksygen som terminal elektronakseptor. I noen tilfeller kan nitrat fungere som alternativ elektronakseptor, hvilket tillater anaerob vekst. Slekten er svært utbredt i naturen, og enkelte arter er patogene for dyr, mennesker eller planter. De fleste *Pseudomonas*-arter kan vokse i mineralmedier med ammoniumioner eller nitrat, samt en enkelt organisk forbindelse som eneste karbon- og energikilde. Kun noen få arter krever organiske vekstfaktorer i tillegg. Optimal veksttemperatur ligger vanligvis rundt 28°C, og få arter kan vokse ved pH under 4,5.

Slekten *Pseudomonas* kan deles inn i fem undergrupper (I-V) basert på rRNA-homologi. *P. fluorescens* tilhører rRNA-gruppe I, sammen med blant andre *P. aeruginosa*, *P. putida* og *P. syringae*. Gruppen omfatter både saprofytter og plante- og dyrepato gener. De fleste bakteriene i denne gruppen kjennetegnes ved produksjon av vannløselige, fluorescerende pigmenter (pyoverdiner). *P. fluorescens* finnes i jord og vann, har optimale vekstbetingelser ved nøytral pH og 25-30°C, og kan utnytte mange ulike karbonkilder. Alle artene i gruppe I kan vokse ved 4°C, og *P. fluorescens* er involvert i ødeleggelse av matvarer (egg, kjøtt, fisk og melk) oppbevart i kjøleskap (Palleroni, 1984). *P. fluorescens* er vanligvis ikke patogen for dyr, da stammene vokser dårlig ved 37°C (Madigan og Martinko, 2006). Arten kan deles inn i fem biovarer (I-V) (Palleroni, 1984), og denitrifiserende stammer forekommer i biovar II, III og V<sup>1</sup> (Zumft, 2004). Naturlig alginatproduserende *P. fluorescens* stammer er observert i biovar I og II (Fett *et al.*, 1989; Fett *et al.*, 1995).

I den eksperimentelle delen av arbeidet med denne oppgaven ble *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201 benyttet. NCIMB 10525 er isolert fra springvann og tilhører biovar I (NCIMB, 2005). Denne stammen produserer ikke alginat, men har alle de nødvendige genene for alginatsyntese. Pf201, en alginatproduserende stamme, er utviklet ved kjemisk mutagenese av NCIMB 10525 (Gimmestad *et al.*, 2004).

### 1.2. Glukoseopptak i bakterier

Det første trinnet i utnyttelse av ekstracellulære karbonkilder vil vanligvis være å transportere molekylet inn i cellen. I Gram-negative bakterier innebærer dette at molekylet må passere gjennom to membraner; ytre membran og indre membran (plasmamembranen). I ytre membran skjer transport via poriner, mens transport over plasmamembranen kan foregå ved hjelp av flere ulike systemer. "Major facilitator" superfamilien, ATP-bindende kassett superfamilien og fosfotransferasesystemene er de vanligste transportsystemene i plasmamembranen, både hos Gram-negative og Gram-positive bakterier (Prescott *et al.*, 2002).

---

1. Omtalt som biovar B, C og F av Zumft (2004).

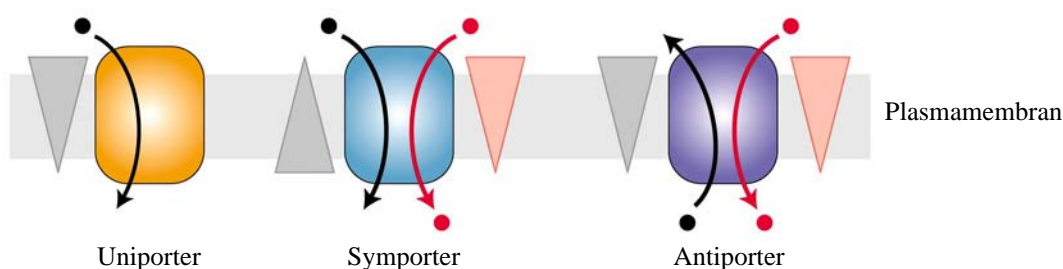


### 1.2.1. Poriner

Poriner danner vannfylte kanaler i ytre membran. Porin-proteiner har antiparallell  $\beta$ -tønnestruktur, i motsetning til de fleste plasmamembranproteiner, som forankres i membranen ved hjelp av hydrofobe  $\alpha$ -helikser (Branden og Tooze, 1999). Bakterielle poriner er organisert enten som trimere eller monomere. I trimere poriner danner hver av monomere en egen kanal (Koebnik *et al.*, 2000). Mange poriner er uspesifikke (generelle poriner), mens andre utviser spesifisitet for bestemte typer molekyler. Dette gjelder blant annet OprB-familien, som består av glukosespesifikke poriner (Saier, 2000). Generelle poriner tillater diffusjon av hydrofile forbindelser. Hvilke molekyler som kan passere gjennom kanalen begrenses hovedsakelig av molekylets størrelse, men noen poriner har også en viss preferanse for enten kat- eller anioner. Kanalen(e) i spesifikke poriner tillater derimot kun diffusjon av gitte forbindelser, og sørger antagelig for mer effektivt opptak av disse. Noen spesifikke poriner kan i tillegg fungere som generelle poriner for små molekyler. Permeabilitetsegenskapene til både generelle og spesifikke poriner bestemmes i hovedsak av løkke 3 på ekstracellulær side av tønnestrukturen, da denne løkken foldes inn i kanalen (Koebnik *et al.*, 2000).

### 1.2.2. “Major facilitator” superfamilien

“Major facilitator” superfamilien (MFS) er en av de to mest utbredte superfamilie av transportproteiner, både blant bakterier, arkebakterier og eukaryoter. MFS er en svært mangfoldig superfamilie, og fungerer både ved opptak og eksport (Saier, 2000). MFS er også kjent som uniporter-symporter-antiporter-familien. Proteinene i denne superfamilien kan bare transportere små, løselige molekyler, ved hjelp av kjemiosmotiske gradienter (Pao *et al.*, 1998). Uniportere transporterer spesifikke molekyler med det aktuelle molekylets konsentrasjonsgradient ved fasilitert diffusjon. Sym- og antiportere kobler transporten av en type ion/molekyl mot en konsentrasjonsgradient med transporten av en eller flere andre ioner/molekyler med deres konsentrasjonsgradient (Lodish *et al.*, 2003) (Figur 1.1). MFS-permeaser er monomere, og har en karakteristisk topologi med tolv transmembranhelikser, hvorav de første seks har sekvenshomologi med de siste seks. Enkelte MFS-permeaser inneholder ytterligere to transmembranhelikser (Pao *et al.*, 1998).



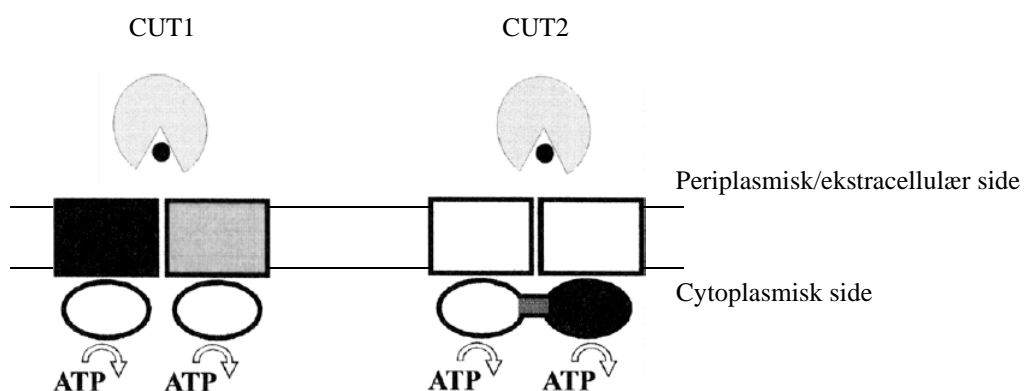
**Figur 1.1:** MFS-transportere transporterer molekyler over plasmamembranen ved hjelp kjemiosmotiske gradienter. Gradienter er indikert ved trekanter, hvor spissen peker mot den laveste konsentrasjonen. Uniportere transporterer en enkelt molekyltype med dens konsentrasjonsgradient. Sym- og antiportere kobler transport av et molekyl mot dets konsentrasjonsgradient (sorte sirkler) med forflytning av en eller flere ioner/molekyler med deres konsentrasjonsgradient (røde sirkler) (Lodish *et al.*, 2003).

MFS omfatter per i dag 49 familier, hvorav to er involvert i glukoseopptak. Disse to er sukkerporter (SP)-familien og fukose: $H^+$  symporter (FHS)-familien (Saier, 2005). Proteiner i SP-familien kan fungere som uni-, anti- og/eller kation-symportere, mens proteiner i FHS-familien er proton-symportere (Pao *et al.*, 1998).

### 1.2.3. ATP-bindende kassett superfamilien

ATP-bindende kassett (ABC)-superfamilien er den andre av de to mest utbredte superfamiliene av transportproteiner. Transportproteiner i ABC-superfamilien kobler energien fra hydrolyse av ATP til transport av en rekke ulike forbindelser inn eller ut av celler og organeller. ABC-transportere for eksport finnes i alle grupper av organismer, mens ABC-transportere for opptak bare er identifisert i prokaryoter (Saier, 2000). Alle ABC-transportere ser ut til å bestå av fire domener: to hydrofobe transmembrandomener som antas å danne transportsporet eller kanalen over plasmamembranen, og to hydrofile nukleotidbindende domener på cytoplasmisk side som sørger for energien til aktiv transport (Davidson og Chen, 2004). Transmembrandomenene inneholder vanligvis seks transmembrane  $\alpha$ -helikser hver. I de fleste tilfeller foreligger de fire domenenene som separate polypeptider, men de kan også være fusjonert på ulike måter (Higgins, 2001). Alle bakterielle ABC-transportere involvert i opptak er i tillegg avhengige av et høyaffinitets substratbindende protein, som stimulerer transporterens ATPase-aktivitet. Dette proteinet er lokalisert i periplasma hos Gram-negative, og er enten festet til celleoverflaten eller fusjonert til transporteren i Gram-positive (Davidson og Chen, 2004). Bindingsproteinet har to funksjoner: å sørge for høy affinitet og spesifisitet, og å bestemme transportretning (Higgins, 2001). Mekanismene for transport er fremdeles noe uklare, men det antas at binding og/eller hydrolyse av ATP fører til konformasjonsendringer i transmembrandomenene, og at dette tilrettelegger for retningsbestemt transport av substrater over membranen (Davidson og Chen, 2004).

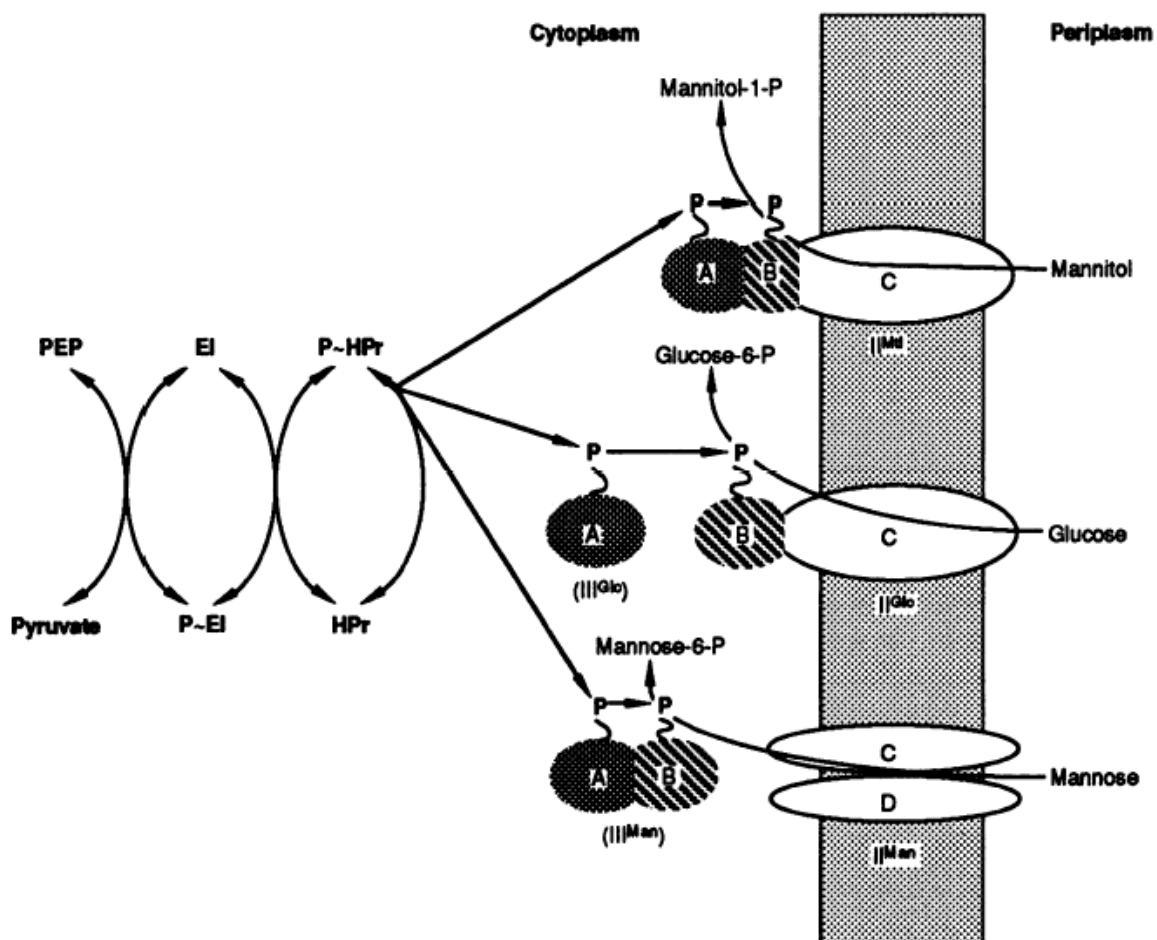
Det er hittil identifisert 24 familier involvert i substratopptak i prokaryoter, hvorav to transporter karbohydrater. Disse er kalt "carbohydrate uptake transporter" (CUT)-familiene. CUT1-familien transporterer en rekke mono-, di-, tri- og høyere oligosakkarider, samt polyoler, mens CUT2-familien bare transporterer monosakkarider (Saier, 2005). CUT1-transportere er satt sammen av fire genprodukter; substratbindende protein, to transmembranproteiner og nukleotidbindende protein. Sistnevnte antas å foreligge i to kopier i det fullstendige komplekset. CUT2-transportere består derimot av tre genprodukter; substratbindende protein, transmembranprotein og nukleotidbindende protein. Transmembranproteinet antas å foreligge i to kopier i det fullstendige komplekset, og det nukleotidbindende proteinet er en fusjon av to nukleotidbindende domener (Schneider, 2001) (Figur 1.2).



**Figur 1.2:** Domeneorganisering i ABC-transportere i CUT1- og CUT2-familien. Transmembrandomener er representert ved rektangler og nukleotidbindende domener ved ovaler. Substratbindende proteiner er representert ved "pacman"-lignende symboler (Schneider, 2001).

1.2.4. Fosfoenolpyruvat:sukker fosfotransferasesystemet

Mange prokaryote organismer tar opp molekyler ved gruppetransport, en prosess hvor molekylet transporteres inn i cellen samtidig som det endres kjemisk. Det mest kjente systemet er fosfoenolpyruvat (PEP):sukker fosfotransferasesystemet (PTS) (Prescott *et al.*, 2002). Homologer av PTS-permeaser for sukkeropptak er hittil bare identifisert i bakterier (Saier, 2000). Ved PTS-mediert sukkeropptak fosforyleres suktermolekylet samtidig som det transporteres over plasmamembranen. Fosfatgruppen og energien til disse prosessene kommer fra PEP. PEP:sukker PTS består av tre komponenter; enzym I (EI), histidinprotein (Hpr) og enzym II (EII). EI og Hpr er cytoplasmiske, løselige proteiner som er felles for alle PEP:sukker PTS i en organisme. EII utgjør den karbohydratspesifikke delen av systemet, og kan bestå av tre eller fire domener (A, B, C og eventuelt D) fordelt på ett til fire proteiner. Variasjonene i antall proteiner som utgjør et gitt EII-kompleks skyldes fusjon eller splitting av domenene i løpet av evolusjonen, og reflekterer ikke forskjeller i mekanisme. EIIC og EIIB er hydrofile og befinner seg på cytoplasmisk side, mens EIIC og EIID er hydrofobe og integrert i membranen (Figur 1.3). Strukturstudier tyder på at EIIC vanligvis inneholder seks til åtte transmembrane  $\alpha$ -helikser. Fosfatgruppen overføres fra PEP til karbohydratmolekylet via fosforylerte mellomtrinn av EI, Hpr, EIIC og EIIB. EIIC og eventuelt EIID antas å danne transportkanalen over membranen, og iallfall deler av det spesifikke substratbindingssetet (Postma *et al.*, 1993).



**Figur 1.3:** Organisering av fosfotransferasesystemer (PTS), eksemplifisert ved tre ulike PTS fra *Escherichia coli*. EI og Hpr er felles for alle PTS i en organisme, mens EII utgjør den substratspesifikke delen av systemet. EII består av to cytoplasmiske (A og B) og ett eller to transmembrane (C og D) domener, fordelt på ett til fire proteiner. (EIIC var tidligere kjent som EIIC, derav navngivningen i figuren.) P~ indikerer fosforylert form av de ulike proteinene (Postma *et al.*, 1993).

Det er per i dag identifisert syv PEP:sukker PTS-familier, hvorav en (PTS glukose-glukosid (Glc)-familien) er involvert i glukoseopptak (Saier, 2005). EII i PEP:glukose PTS består av tre domener som kan være fordelt på ett (EIICBA) eller to (EIIA og EIICB) proteiner. Opptak av glukose foregår sannsynligvis ved at glukose binder til periplasmisk side av EIIC, transporteres gjennom membranen, og fosforyleres av EIIB. Mekanismen for transport er fremdeles uklar. Antagelig fører fosforylering av EIIB til konformasjonsendringer i EIIC, hvilket gir fasilitert diffusjon av glukose inn i cellen (Postma *et al.*, 1993).

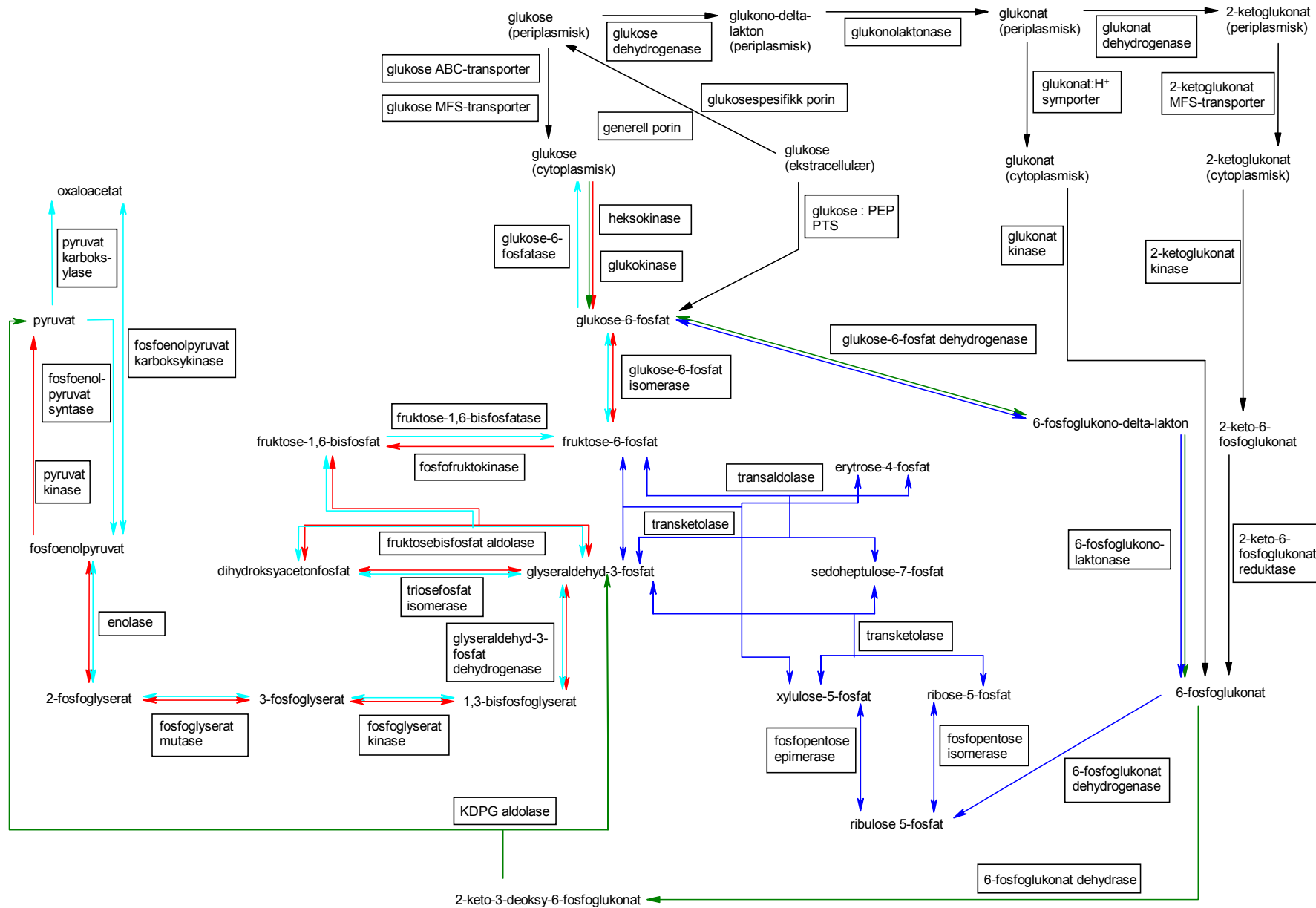
### 1.3. Sentral glukosemetabolisme i bakterier

Bakterier utviser stor metabolsk diversitet, og benytter flere metabolske spor for nedbryting av glukose og andre sukkerer. De tre hovedsporene bakterier benytter for å omdanne sukkerer til pyruvat og andre mellomprodukter er glykolysen (Embden-Meyerhof-sporet), Entner-Doudoroff (ED)-sporet og pentosefosfatsporet (heksosemonofosfatsporet). De fleste bakterier benytter glykolysen og pentosefosfatsporet, men noen erstatter glykolysen med ED-sporet (Prescott *et al.*, 2002). Det finnes også eksempler på organismer som har mulighet til å benytte både glykolysen og ED-sporet (Conway, 1992). Pyruvat kan prosesseres videre via fermentering eller ved fullstendig oksidasjon til CO<sub>2</sub> (respirasjon). Fermentering skjer vanligvis under anaerobe forhold, men foregår også i noen tilfeller i nærvær av oksygen. De vanligste fermenteringsproduktene er etanol og melkesyre. Ved aerob respirasjon er den endelige elektronakseptoren oksygen, og denne prosessen kan dermed bare foregå under aerobe forhold. En del mikroorganismer kan imidlertid benytte andre eksogene forbindelser (for eksempel nitrat) som elektronakseptorer, og på denne måten utføre anaerob respirasjon. Respirasjon gir et betydelig høyere energiutbytte enn fermentering.

De fleste mikroorganismer er også i stand til å syntetisere sukkerer fra ikke-karbohydrater. Dette skjer via et spor kalt glukoneogenesen, som har mange enzymer felles med glykolysen (Prescott *et al.*, 2002). Figur 1.4 gir en oversikt over glykolysen, Entner-Doudoroff-sporet, pentosefosfatsporet og glukoneogenesen, samt transportsystemer for glukoseopptak.

#### 1.3.1. Glykolysen

Glykolysen (Figur 1.4 og 3.2) er det vanligste sporet for nedbryting av glukose til pyruvat. Glykolysen fungerer både i nærvær og fravær av O<sub>2</sub>, og alle trinnene finner sted i cytoplasma. Dette katabolske sporet kan deles inn i to deler; sekskarbonstadiet og trekarbonstadiet (Prescott *et al.*, 2002). I sekskarbonstadiet omdannes glukose til fruktose-1,6-bisfosfat. Denne prosessen foregår i tre trinn; en fosforylering, en isomerisering og enda en fosforylering. I det første trinnet konverteres glukose til glukose-6-fosfat, ved at en fosfatgruppe overføres fra ATP til glukose. Denne irreversible reaksjonen katalyseres av heksokinase eller glukokinase. Glukose-6-fosfat har en negativ ladning, og kan derfor ikke diffundere gjennom plasmamembranen. Dette trinnet er dermed viktig for å holde glukose inne i cellen. I tillegg destabiliserer fosfatgruppen glukosemolekylet, og tilrettelegger dermed for videre nedbryting. I neste trinn isomeriseres glukose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat, katalysert av glukose-6-fosfat isomerase. I det tredje trinnet overføres en fosfatgruppe fra ATP til fruktose-6-fosfat, og fruktose-1,6-bisfosfat dannes. Dette irreversible trinnet er hastighetsbestemmende for glykolysen, og katalyseres av fosfofruktokinase (Berg *et al.*, 2002). Enkelte organismer har en pyrofosfat (PP<sub>i</sub>)-avhengig fosfofruktokinase istedet for, eller i tillegg til, den ATP-avhengige fosfofruktokinasen. PP<sub>i</sub>-avhengig fosfofruktokinase katalyserer den reversible overføringen av en fosfatgruppe fra PP<sub>i</sub> til fruktose-6-fosfat. Fordi denne reaksjonen er reversibel kan dette enzymet i teorien også erstatte fruktose-1,6-bisfosfatase i glukoneogenesen (Se kapittel 1.3.4.) (Mertens, 1991).



Inledning

**Figur 1.4:** Oversikt over de vanligste sporene for metabolisme av glukose til pyruvat, samt de vanligste transportsystemene for glukoseopptak. Alle forbindelser er cytoplasmiske med mindre annet er oppgitt. Glykolysen er angitt ved røde piler, ED-sporet ved grønne piler, det direkte oksidative sporet og transportproteiner ved sorte piler, pentosefosfatsporet ved blå piler og glukoneogenesen ved lyseblå piler.

Trekarbonstadiet innledes ved at fruktose-1,6-bisfosfat spaltes til glyseraldehyd-3-fosfat og dihydroksyacetonfosfat, katalysert av fruktosebisfosfat aldolase. Disse to triosene er interkonvertible via en isomerisering som katalyseres av triosefosfat isomerase. Likevekten i denne reaksjonen ligger egentlig sterkt forskjøvet mot dihydroksyacetonfosfat. Isomerisering av dihydroksyacetonfosfat til glyseraldehyd-3-fosfat skjer likevel raskt, da de påfølgende trinnene i glykolysen fjerner dette produktet. I praksis får man dermed dannet to molekyler glyseraldehyd-3-fosfat fra ett molekyl fruktose-1,6-bisfosfat.

Glyseraldehyd-3-fosfat konverteres til pyruvat via en femtrinns prosess. I løpet av disse trinnene høstes noe av energien i glyseraldehyd-3-fosfat ved dannelse av ATP. I det første trinnet konverteres glyseraldehyd-3-fosfat til 1,3-bisfosfoglyserat, katalysert av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase. I denne reaksjonen kobles to prosesser. Aldehydet oksideres til en karboksylsyre samtidig som  $\text{NAD}^+$  reduseres til NADH, og karboksylsyren føyes sammen med ortofosfat ved en dehydreringsreaksjon. Den termodynamisk gunstige oksidasjonen kobles til den ugunstige fosforyleringen via et tioester-mellomtrinn som er kovalent bundet til enzymet. 1,3-Bisfosfoglyserat har høyt fosforyloverføringspotensiale, og fosforylerer ADP ved substratnivåfosforylering. Denne reaksjonen katalyseres av fosfoglyserat kinase, og produktene er 3-fosfoglyserat og ATP. Fosfoglyserat mutase katalyserer omleiringen av 3-fosfoglyserat til 2-fosfoglyserat, hvoretter enolase katalyserer dehydrering av 2-fosfoglyserat til fosfoenolpyruvat (PEP). Enolfosfater har høyt fosforyloverføringspotensiale, så PEP kan fosforylere ADP ved substratnivåfosforylering. Denne irreversible reaksjonen katalyseres av pyruvat kinase, og produktene er ATP og pyruvat. Netto utbytte av glykolysen blir dermed to ATP og to NADH per glukose (Berg *et al.*, 2002). Ved bruk av  $\text{PP}_i$ -avhengig fosfofruktokinase istedet for ATP-avhengig fosfofruktokinase vil netto utbytte øke med en ATP (Mertens, 1991).

Glykolysen er involvert i produksjon av byggestener for biosyntese, i tillegg til produksjon av ATP. Det er derfor viktig at dette sporet er nøye regulert for å møte cellens behov. Reaksjonene katalysert av hekso-/glukokinase, ATP-avhengig fosfofruktokinase og pyruvat kinase er, som nevnt over, så og si irreversible. Disse reaksjonene fungerer som kontrollpunkter i glykolysen, og enzymene som katalyserer dem er regulert ved reversibel binding av allosteriske effektorer eller ved kovalent modifikasjon. I tillegg kontrolleres nivåene av disse enzymene ved transkripsjonell regulering (Berg *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Entner-Doudoroff-spolet og det direkte oksidative spolet

Entner-Doudoroff (ED)-spolet (Figur 1.4 og 3.4) har en rolle som ligner glykolysens, da dette spolet konverterer glukose til pyruvat samtidig som ATP, NADH og NADPH produseres (Prescott *et al.*, 2002). I likhet med glykolysen starter ED-spolet med fosforylering av glukose til glukose-6-fosfat, på bekostning av ett ATP-molekyl per glukosemolekyl. Hovedforskjellen mellom glykolysen og ED-spolet ligger i de øvrige sekskarbonforbindelsene som inngår i de to sporene. I ED-spolet oksideres glukose-6-fosfat til 6-fosfoglukono- $\delta$ -lakton, som hydrolyseres til 6-fosfoglukonat. Disse reaksjonene katalyseres av glukose-6-fosfat dehydrogenase og 6-fosfoglukonolaktonase. I oksidasjonsreaksjonen reduseres en  $\text{NAD(P)}^+$  for hver glukose-6-fosfat som oksideres. 6-Fosfoglukonat dehydreres videre til 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukonat (KDPG). Denne irreversible reaksjonen katalyseres av 6-fosfoglukonat dehydrase, et enzym som er unikt for ED-spolet (Conway, 1992). KDPG spaltes deretter til pyruvat og glyseraldehyd-3-fosfat, ved en aldolspalting katalysert av KDPG aldolase. Denne reaksjonen er reversibel, men likevekten favoriserer dannelse av trekarbonforbindelsene. Konvertering av glyseraldehyd-3-fosfat til pyruvat katalyseres av de samme enzymene som i glykolysen. Netto utbytte per glukose blir dermed to NADH eller en NADPH og en NADH, samt en ATP.

Det er kjent at ED-sporet kan operere i flere ulike varianter. Sporet opptrer som et konstitutivt lineært spor i blant annet *Zymomonas mobilis*. Konvertering av glukose til pyruvat skjer da som beskrevet ovenfor. I mange bakterier, inkludert *E. coli*, forekommer ED-sporet som et induserbart lineært spor med en mer perifer rolle i den sentrale karbohydratmetabolismen. Disse bakteriene benytter primært glykolysen, men ED-sporet induseres for metabolisme av enkelte karbohydrater, for eksempel glukonat. Glukonat går da inn i ED-sporet via fosforylering til 6-fosfoglukonat, katalysert av glukonat kinase. Pseudomonader og beslektede bakterier benytter en syklisk form av ED-sporet. I den sykliske formen forekommer resirkulering av trioser til heksoser via enzymer i glukoneogenesen, i tillegg til reaksjonene beskrevet ovenfor (Conway, 1992).

Enkelte organismer, deriblant pseudomonader, har også et alternativt spor for konvertering av glukose til 6-fosfoglukonat; det direkte oksidative sporet (Figur 1.4 og 3.4). Det direkte oksidative sporet virker på glukose i periplasma, mens sporet beskrevet over (det fosforylative sporet) virker på glukose intracellulært. Disse to sporene representerer to uavhengige ruter for dannelse av 6-fosfoglukonat, og kan kompensere for hverandre. Vanligvis vil imidlertid ett av sporene dominere, avhengig av fysiologiske forhold. I det direkte oksidative sporet oksideres glukose til glukono- $\delta$ -lakton, som hydrolyseres til glukonat, i periplasma. Disse reaksjonene katalyseres av glukose dehydrogenase og glukonolaktase. Glukonat kan deretter transporteres inn i cellen og fosforyleres til 6-fosfoglukonat på bekostning av en ATP (Lessie og Phibbs, 1984). Glukonat-transporteren er en glukonat:H<sup>+</sup> symporter, men tilhører ikke MFS (Se kapittel 1.2.2.) (Saier, 2000). Fosforyleringen etter opptak katalyseres av glukonat kinase. Glukonat i periplasma kan også oksideres videre til 2-ketoglukonat før transport inn i cellen. Denne reaksjonen katalyseres av glukonat dehydrogenase. Både glukose og glukonat dehydrogenase er plasmamembranproteiner (Lessie og Phibbs, 1984). 2-Ketoglukonat transporteres deretter inn i cellen av en MFS-transporter, muligens i anion:kation symporter (ACS)-familien (Swanson *et al.*, 2000). Etter opptak katalyserer 2-ketoglukonat kinase fosforyleringen av 2-ketoglukonat til 2-keto-6-fosfoglukonat på bekostning av en ATP. 2-Keto-6-fosfoglukonat reduseres deretter til 6-fosfoglukonat samtidig som en NAD(P)H oksideres. Denne reaksjonen katalyseres av 2-keto-6-fosfoglukonat reduktase (Lessie og Phibbs, 1984).

### 1.3.3. Pentosefosfatsporet

Pentosefosfatsporet (Figur 1.4 og 3.8) kan benyttes samtidig som glykolysen eller ED-sporet, og er like viktig i biosyntese som i katabolisme. Pentosefosfatsporet kan fungere både aerobt og anaerobt, og har de innledende reaksjonene felles med ED-sporet. Alle trinnene i dette sporet foregår i cytoplasma (Prescott *et al.*, 2002). Pentosefosfatsporet innledes ved oksidasjonsreaksjoner som konverterer glukose-6-fosfat til ribulose-5-fosfat samtidig som to NADPH dannes for hvert molekyl glukose-6-fosfat. Konverteringen av glukose-6-fosfat til 6-fosfoglukonat katalyseres av samme enzymer som i ED-sporet, men glukose-6-fosfat dehydrogenaser som fungerer i pentosefosfatsporet er vanligvis spesifikke for NADP<sup>+</sup>. 6-Fosfoglukonat dehydrogenase katalyserer deretter oksidasjon og dekarboksylering av 6-fosfoglukonat til ribulose-5-fosfat. Ribulose-5-fosfat kan isomeriseres til ribose-5-fosfat eller epimeriseres til xylulose-5-fosfat, ved reaksjoner katalysert av henholdsvis fosfopentose isomerase og fosfopentose epimerase. De ovennevnte reaksjonene utgjør den oksidative fasen av pentosefosfatsporet. I den ikke-oksidative fasen katalyseres interkonvertering av en rekke tre- til syvkarbon sukkerfosfater. Disse reversible reaksjonene katalyseres av transketolase og transaldolase (Berg *et al.*, 2002). Reaksjonene ser ut til å være koblet, og disse to enzymene danner muligens et kompleks (Wood, 1985).

Det overordnede resultatet av pentosefosfatsporet er at tre glukose-6-fosfat konverteres til to fruktose-6-fosfat, ett glyseraldehyd-3-fosfat og tre CO<sub>2</sub>, samtidig som det dannes seks NADPH. Sukkerproduktene utnyttes på to måter. Fruktose-6-fosfat kan konverteres tilbake til glukose-6-fosfat, mens glyseraldehyd-3-fosfat kan brytes ned til pyruvat via trekarbonstadiet i glykolysen. Glyseraldehyd-3-fosfat kan også returneres til pentosefosfatsporet via dannelse av glukose-6-fosfat. Dette fører til fullstendig nedbryting av glukose-6-fosfat til CO<sub>2</sub> og produksjon av totalt 12 NADPH per glukose-6-fosfat. Pentosefosfatsporet har som nevnt både katabolske og anabolske roller. NADPH som produseres fungerer som elektrondonor i biosyntese, fire- og femkarbonsukkerer kan benyttes til en rekke ulike biosyntetiske formål i cellen, og tre- og sekskarbonsukkerer kan benyttes for å produsere ATP via glykolysen (Prescott *et al.*, 2002). Den oksidative og ikke-oksidative fasen av pentosefosfatsporet kontrolleres antagelig primært via henholdsvis glukose-6-fosfat dehydrogenase og transketolase (Wood, 1985). Metabolismen av glukose-6-fosfat via pentosefosfatsporet er dessuten koordinert med glykolysen, slik at flyten av glukose-6-fosfat gjennom metabolismen kan tilpasses cellens behov for energi og byggestener (Berg *et al.*, 2002).

#### 1.3.4. Glukoneogenesen

Glukoneogenesen (Figur 1.4 og 3.2) er et spor for biosyntese av fruktose-6-fosfat, glukose-6-fosfat og glukose fra ikke-karbohydrater. Forløperne omdannes enten først til pyruvat, eller går inn i glukoneogenesen via senere mellomtrinn (Berg *et al.*, 2002). Sukkerne som dannes i glukoneogenesen kan benyttes videre som utgangspunkt for syntese av andre vanlige sukkerer (Prescott *et al.*, 2002). Glukoneogenesen har de fleste enzymene felles med glykolysen. Unntakene er de tre enzymene som katalyserer de irreversible trinnene. Når sporet fungerer biosyntetisk forbigås disse trinnene ved hjelp av enzymer som katalyserer den motsatte reaksjonen.

Omdanning av pyruvat til fosfoenolpyruvat (PEP) foregår vanligvis i to trinn. Pyruvat karboksylase katalyserer først karboksyleringen av pyruvat til oxaloacetat. Denne reaksjonen drives av hydrolyse av ett molekyl ATP til ADP. Oxaloacetat blir deretter dekarboksylert og fosforylert til PEP. Fosfatgruppen overføres fra GTP, som har høyt fosforyloverføringspotensiale, og reaksjonen katalyseres av PEP karboksykinase (Berg *et al.*, 2002). Pyruvat karboksylase består av flere subenheter, og to typer holoenzymer har blitt karakterisert. Den ene typen er en homotetramer ( $\alpha_4$ ), og er observert i både dyr, planter, gjær og bakterier.  $\alpha_4$ -formen av pyruvat karboksylase aktiveres av acetyl-CoA og inhiberes av L-aspartat (Jitrapakdee og Wallace, 1999). Den andre typen består av to polypeptidkjeder,  $\alpha$  og  $\beta$ , arrangert i en  $(\alpha\beta)_4$ -struktur. Denne formen krever ikke acetyl-CoA for aktivitet, og inhiberes ikke av L-aspartat.  $(\alpha\beta)_4$ -formen av pyruvat karboksylase er observert i noen få organismer, deriblant *P. citronellolis* (Goss *et al.*, 1981), *Azotobacter vinelandii* (Scrutton og Taylor, 1974; Segura og Espín, 2004) og *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Konvertering av pyruvat til PEP kan også skje ved en ettrinns reaksjon katalysert av PEP syntase. Denne reaksjonen drives av hydrolyse av ett molekyl ATP til AMP, og en av fosfatgruppene i ATP overføres til pyruvat (Cooper og Kornberg, 1967).

Konvertering av PEP til fruktose-1,6-bisfosfat katalyseres av enzymene i glykolysen, men i motsatt retning. Disse reaksjonene er nær likevekt ved intracellulære forhold. Når betingelsene favoriserer glukoneogenese vil derfor de motsatte av de glykolytiske reaksjonene finne sted inntil neste irreversible trinn. Hydrolyse av fruktose-1,6-bisfosfat til fruktose-6-fosfat og ortofosfat (P<sub>i</sub>) katalyseres av fruktose-1,6-bisfosfatase. Fruktose-6-fosfat konverteres til glukose-6-fosfat av glukose-6-fosfat isomerase, som også er aktiv i glykolysen. I mange tilfeller ender glykolysen med dannelse av glukose-6-fosfat. Eventuell hydrolyse av glukose-6-fosfat til



glukose og  $P_i$  katalyseres av glukose-6-fosfatase. Glukose-6-fosfatase forekommer primært i dyrevev som er involvert i å opprettholde blodglukose-homeostase. Totalt krever syntese av en glukose fra to pyruvat hydrolyse av to ATP og to GTP, og oksidasjon av to NADH.

Glukoneogenesens aktivitet er, i likhet med glykolysens, kontrollert via de irreversible trinnene i prosessen. Også for dette sporet kontrolleres disse enzymenes aktivitet ved reversibel binding av allosteriske effektorer eller ved kovalent modifikasjon, samt at enzymnivåene reguleres på transkripsjonelt nivå. Glukoneogenesen og glykolysen er regulert slik at det ene sporet er så og si inaktivt når det andre er aktivt (Berg *et al.*, 2002).

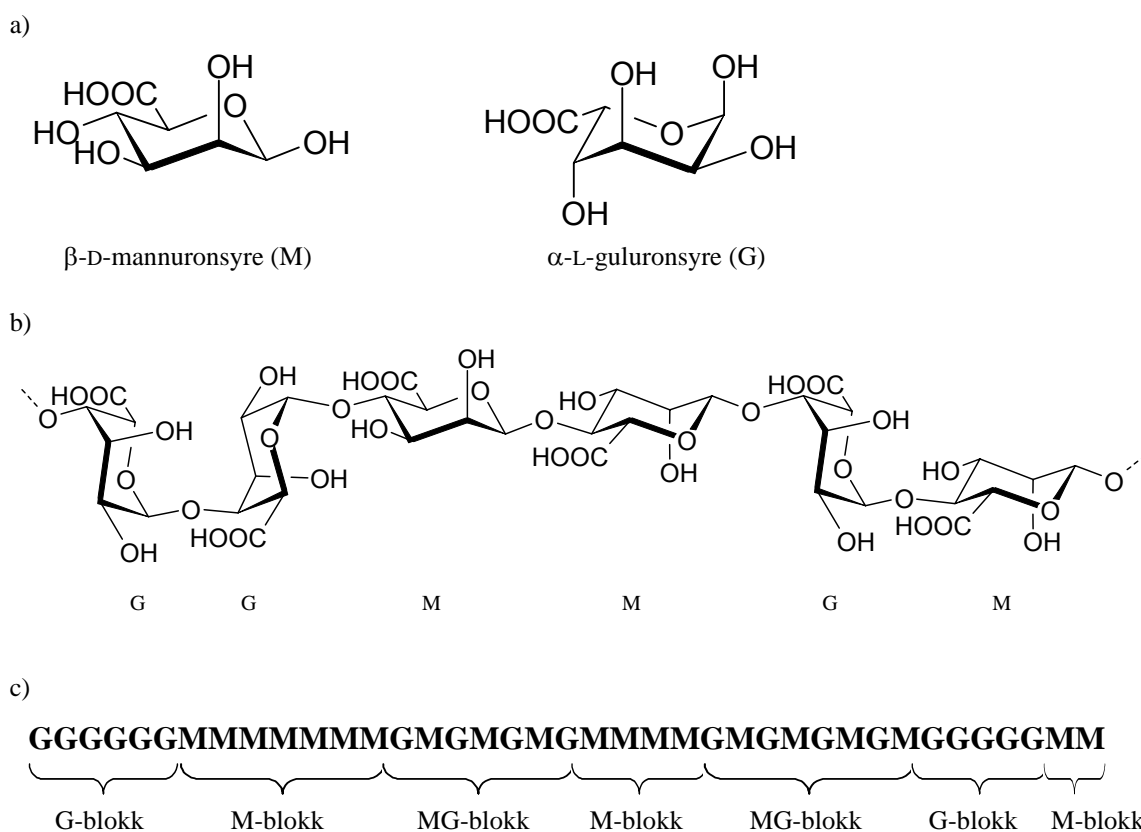
## 1.4. Alginat

### 1.4.1. Struktur, sammensetning og fysiokjemiske egenskaper

Alginater er en familie av lineære (1-4)-bundne kopolymere bestående av monosakkaridene  $\beta$ -D-mannuronsyre (M) og dens C5-epimer  $\alpha$ -L-guluronsyre (G) (Figur 1.5 a og b). Alginatkjeden består ikke av repeterende enheter, men av blokker av heteropolymere (MG-blokker) og homopolymere (M- og G-blokker) med varierende lengde og fordeling i kjeden (Figur 1.5 c) (Haug *et al.*, 1966). M-enhetene i alginatmolekyler har  $^4C_1$ -konformasjon og er bundet sammen med diekvatoriale bindinger, mens G-enhetene har  $^1C_4$ -konformasjon og er bundet sammen med diaksiale bindinger (Atkins *et al.*, 1970). De diaksiale bindingene i G-blokker fører til hindret rotasjon rundt glykosidbindingene, hvilket gir stivere og mer utstrakte kjeder (Smidsrød *et al.*, 1973). Mengden og sekvensen av de to monomerene varierer for alginater fra ulike kilder. Monomerinnholdet kan variere fra ren polymannuronsyre (kun M) til alginater med over 70 % G. Sekvensene kan variere fra nesten rent alternerende, via tilfeldige sekvenser, til nesten rene blokkpolymere (Smidsrød og Moe, 1995).

Alginat produseres av brunalger og av enkelte stammer i bakteriefamilien *Pseudomonadaceae* (Smidsrød og Moe, 1995). G-blokker forekommer ikke i alginater produsert av bakterier i slekten *Pseudomonas* (Ertesvåg *et al.*, 1996), men det er vist at *P. syringae* har et gen for en mannuronan C5-epimerase som kan introdusere G-blokker i alginat *in vitro* (Bjerkas *et al.*, 2004). I bakterielle alginater er noen av M-enhetene acetylerert i O-2- og/eller O-3-osisjon. Acetylering beskytter M-enhetene mot epimerisering (Davidson *et al.*, 1977; Skjåk-Bræk *et al.*, 1985). Graden av acetylering varierer for alginater fra ulike bakteriestammer, og variasjoner fra 4 % til 57 % er rapportert (Skjåk-Bræk *et al.*, 1986). Acetylering fører også til økt vannbindings- evne og lavere affinitet for divalente kationer (Skjåk-Bræk *et al.*, 1989) (Se avsnittene under.).

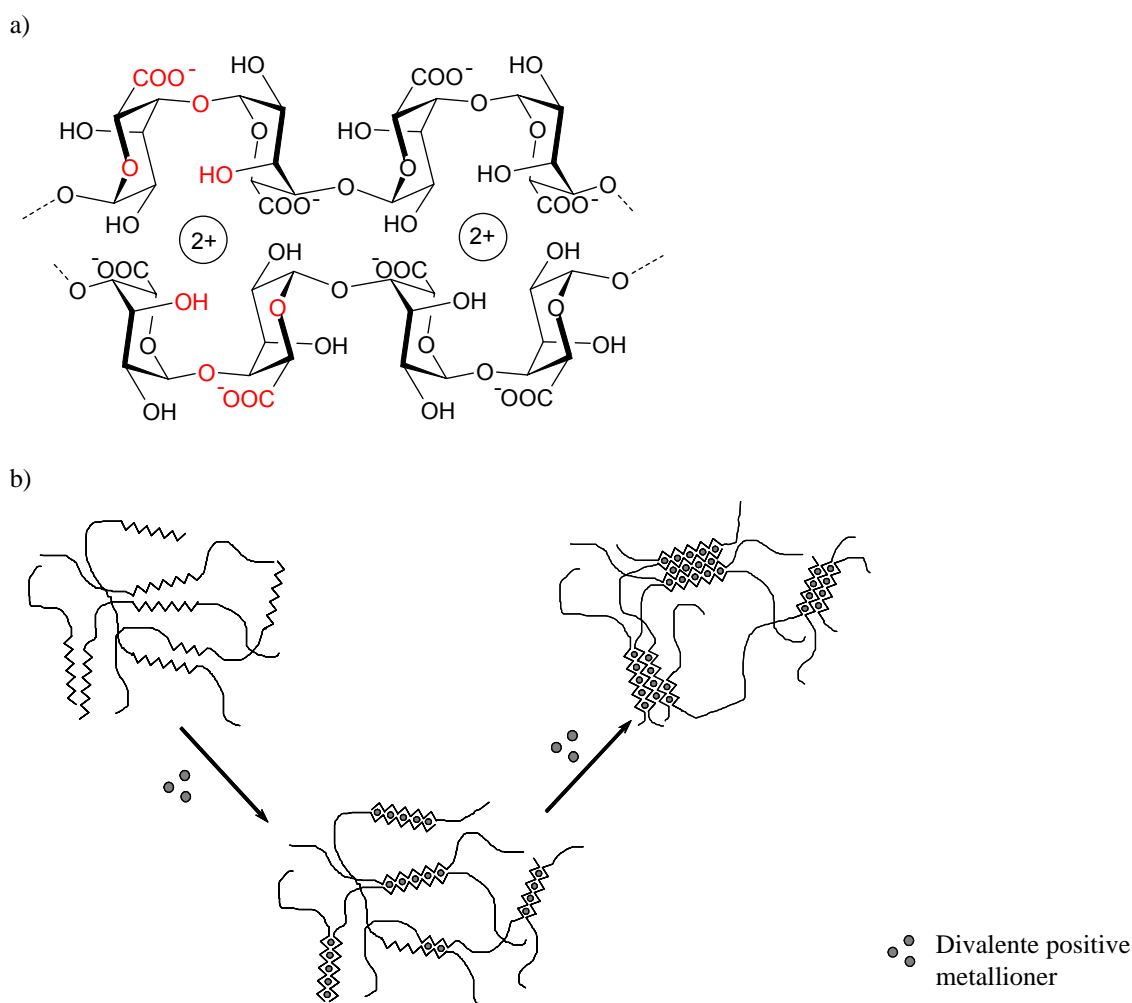
Viktige egenskaper ved alginater er deres evne til å danne viskøse løsninger og geler. Egenviskositeten til alginat er hovedsakelig avhengig av molekylvekten (Smidsrød og Moe, 1995). Ved pH-verdier høyere enn 5 er karboksylgruppene i alginat dissosiert, og molekylet er dermed et polyanion ved fysiologisk pH (Haug, 1964). Alginatmolekylet er en fleksibel kjede, og frastøtning mellom de negative ladningene forårsaker at kjeden blir mer utstrakt, hvilket påvirker egenviskositeten. Monovalente positive metallioner (for eksempel  $Na^+$ ) reduserer disse interaksjonene ved å nøytralisere molekylet. Egenviskositet for alginat må derfor oppgis ved spesifisert pH og ionestyrke (Smidsrød og Moe, 1995).



**Figur 1.5:** a) Alginatmonomerene  $\beta$ -D-mannuronsyre (M) (i  ${}^4C_1$ -konformasjon) og  $\alpha$ -L-guluronsyre (G) (i  ${}^1C_4$ -konformasjon). b) M- og G-enheter bundet sammen til en alginatkjede. Figuren viser strukturen til både GG-, MM-, MG- og GM-bindinger. c) Eksempel på alginatkjedesekvens, med M-, G- og MG-blokker av varierende lengde (Smidsrød og Moe, 1995).

Alginater som inneholder G-blokker danner geler i nærvær av divalente positive metallioner (for eksempel  $Ca^{2+}$ ) (Smidsrød og Haug, 1965; Haug og Smidsrød, 1965). De diaksiale bindingene i G-blokkene fører til at kjeden inntar en vridd siksak-struktur, med hulrom hvor ioner kan bindes (Figur 1.6 a). Polymerkjeder kryssbindes ved at ioner kompleksbindes mellom G-blokker i kjedene, beskrevet ved “eggekartong”-modellen (Figur 1.6 b) (Grant *et al.*, 1973). Det vil dermed være andelen og lengden av G-blokker som er avgjørende for dannelse av ionegeler, samt gelens styrke. Generelt gir G-rike alginater sterke, sprø geler, mens M-rike alginater gir mer fleksible geler med lavere gelstyrke (Smidsrød og Draget, 1996).

Alginater kan også danne syregeler, ved at pH senkes under  $pK_a$ -verdien til uronsyremonomere (Smidsrød og Draget, 1996). Denne er henholdsvis 3,38 og 3,65 for M og G (Haug, 1964). Disse gelene er foreslått å være stabilisert av intermolekylære hydrogenbindinger (Atkins *et al.*, 1971). Monomersammensetningen bestemmer i stor grad syregelens mekaniske egenskaper. G-blokker gir de sterkeste gelene, men også M-blokker gir geldannelse. Alternierende strukturer gir redusert gelingsevne, men i ekstreme tilfeller kan rent alternierende (MG/GM)-blokker fungere som repeterende sekvenser i stand til å danne kryssbindinger (Draget *et al.*, 1994).



**Figur 1.6:** a) Kompleksbinding av divalente kationer mellom to G-blokker i alginat. I ett av hulrommene er gruppene involvert i koordinering av ionene merket med rødt (Smidsrød og Moe, 1995). b) Interaksjoner mellom G-blokker i alginat og kationer ved ionegeldannelse, beskrevet ved “eggekartong”-modellen (Strand *et al.*, 2000).

#### 1.4.2. Forekomst og funksjoner i naturen

Alginat produseres av marine brunalger og av enkelte arter i bakteriefamilien *Pseudomonadaceae*, deriblant *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. syringae*, *A. vinelandii* (Smidsrød og Moe, 1995) og *A. chroococcum* (Cote og Krull, 1988). I alger forekommer alginat som en gel i ekstracellulær matriks, og bidrar til å gi plantevevet elastisitet og mekanisk styrke. Alginat kan være involvert i dannelse av biofilmer i *P. aeruginosa* (Nivens *et al.*, 2001), og det ser det ut til at uttrykk av gener involvert i alginatbiosyntese er assosiert med infeksjon av vertsplanter i *P. syringae* (Keith *et al.*, 2003). I *A. vinelandii* er alginat en viktig komponent ved cystedannelse (Page og Sadoff, 1975). Alginatsyntese ser ut til å vanligvis være avslått i *Pseudomonas*-arter, mens *A. vinelandii* produserer alginat også under vegetative forhold (Sabra *et al.*, 2001).

#### 1.4.3. Bruksområder

I industrien benyttes alginat blant annet som tykningsmiddel i tekstiltrykk, som stabilisator, myknings- og bindemiddel i sveisetråd, som koflokkulent ved vannrensing og som vannbinder i keramikkproduksjon. Innen næringsmiddelindustrien benyttes alginat som tykningsmiddel, stabilisator og/eller emulgator i en rekke matvarer, deriblant iskrem, sauser, dressinger og leske-

drikker. Alginaters gelende egenskaper utnyttes dessuten i produksjon av blant annet syltetøy, hermetikk og restrukturert mat (for eksempel paprikafyll til oliven). Gelsystemer basert på alginat gir mulighet for geling ved lav temperatur, og produktene er stabile under frysing og tining og er varmeresistente. Alginatgeler benyttes også innen farmasi; som middel mot sure oppstøt, innen sårheling og for å lage tableter med gradvis frigjøring av virkestoff. Innen tannpleie benyttes alginater i materialer for å ta tannavtrykk (Onsøyen, 1996). De milde betingelsene for geling gjør alginater egnet for immobilisering av enzymer og levende celler. I fermenteringsprosesser blir celler og enzymer immobilisert for å lett kunne skille dem fra produktet. Denne typen systemer har en rekke bruksområder, fra produksjon av etanol fra gjær til monoklonale antistoffer fra hybridoma. Innkapsling av planteembryo kan dessuten benyttes for produksjon av kunstige frø. Det foregår også forskning på bruk av alginatmikrokapsler som immunbarrierer mellom transplanterte celler og vertens immunforsvar. Alginater med mye mannuronan er dessuten sterke immunostimulanter, hvilket muligens kan utnyttes i situasjoner hvor dette er ønskelig (Skjåk-Bræk og Espevik, 1996).

Foreløpig isoleres alt alginat som utnyttes kommersielt fra alger. Alginater isolert fra alger er imidlertid inhomogene blandinger, og sammensetningen avhenger av en rekke faktorer. Disse inkluderer blant annet arten og plantedelen alginatet isoleres fra, samt årstid og sted for høsting. Bakteriell alginatproduksjon vil antagelig være dyrere enn høsting fra alger, men kan ha fordeler ved produksjon av homogene alginater eller alginater med bestemte egenskaper. Sannsynligvis kan sammensetningen av bakterielle alginater i større grad kontrolleres, både med hensyn på polymeriseringsgrad, acetylering og monomersammensetning. Ved genetisk modifisering av alginatproduserende bakteriestammer kan det bli mulig å produsere nye typer alginat med bestemte egenskaper (Rehm og Valla, 1997).

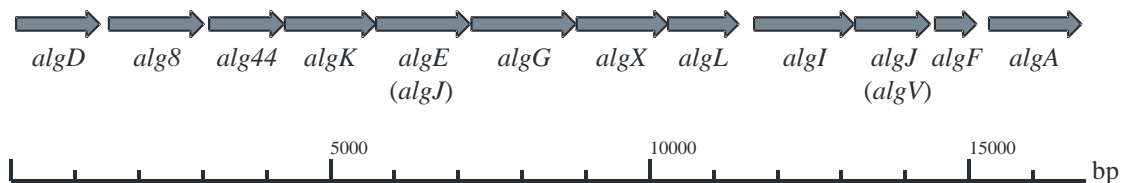
Stammer av *P. aeruginosa* og *P. fluorescens* som produserer alginat uten G-enheter (mannuronan) har blitt konstruert ved å innføre mutasjoner i *algG* (Chitnis og Ohman, 1990; Gimmestad *et al.*, 2003). Deacetylerert mannuronan kan brukes som substrat for epimerisering med ulike mannuronan C5-epimeraser *in vitro*, hvilket kan tenkes å gi alginater med skreddersydde monomersekvenser (Rehm og Valla, 1997). Ved å kontrollere epimeriseringsmønsteret har man for eksempel laget alginater som danner mindre geler med større motstandsdyktighet mot osmotisk svelling, og gir redusert permeabilitet i alginatkapsler (Strand *et al.*, 2003).

Alginat kan også brukes som utgangspunkt for forbindelser med nye egenskaper, ved å tilføre nye kjemiske grupper til monomerene. Kjemisk modifisering av G-enhetene reduserer imidlertid evnen til å binde divalente kationer, og gir dermed mindre stabile geler. For å beholde gelingsevnen bør altså tilførsel av kjemiske grupper skje på M-enhetene. Deacetylerert bakteriell mannuronan har blitt benyttet som substrat for kjemoenzymatisk modifisering, hvilket resulterte i alginatlignende forbindelser med selektiv modifisering av M-enhetene. Noen av M-enhetene i mannuronan ble først tilført en kjemisk gruppe, og deretter ble ikke-modifiserte M-enheter omdannet til G ved hjelp av mannuronan C5-epimeraser (Donati *et al.*, 2005).

## 1.5. Bakteriell biosyntese av alginat

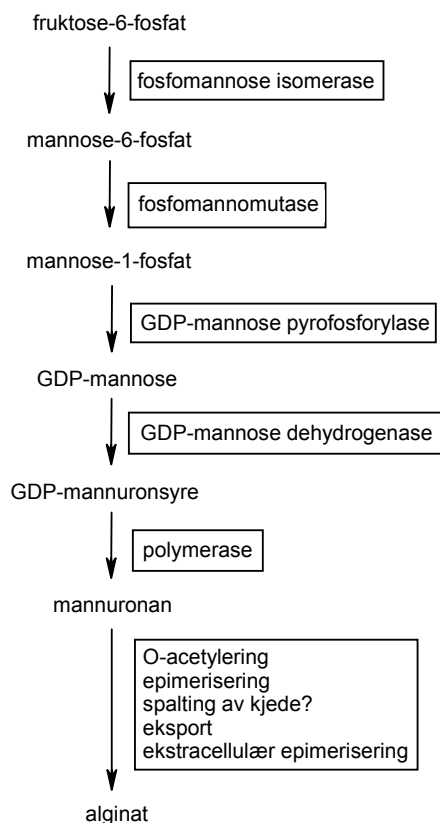
Bakteriell biosyntese av alginat er best studert i *P. aeruginosa* og *A. vinelandii*. I disse organismene er de fleste av de strukturelle genene involvert i alginatbiosyntese samlet i en klynge med lik organisering (May og Chakrabarty, 1994; Rehm *et al.*, 1996; Mejía-Ruiz *et al.*, 1997b; Vazquez *et al.*, 1999) (Figur 1.7). Tilsvarende organisering er også observert i *P. syringae* (Peñaloza-Vázquez *et al.*, 1997) og *P. fluorescens* (Morea *et al.*, 2001). I *P. aeruginosa* er klyngen organisert i ett operon (Chitnis og Ohman, 1993), mens den i *A. vinelandii* består av

flere transkripsjonelle enheter (Campos *et al.*, 1996; Lloret *et al.*, 1996; Mejía-Ruíz *et al.*, 1997a; Vazquez *et al.*, 1999).



**Figur 1.7:** Genklynge for alginatbiosyntese, navngitt som i *P. aeruginosa*. Alternativ navngiving for *A. vinelandii* er gitt i parentes (Gimmestad, 2005).

Biosyntesen av alginat (Figur 1.8) er koblet til den sentrale karbohydratmetabolismen (Figur 1.4) ved at fruktose-6-fosfat er utgangspunkt for alginatsyntese. Gener for alle proteinene i figur 1.8, unntatt fosfomannomutase og ekstracellulære mannuronan C5-epimeraser, er lokalisert i genklyngen for alginatbiosyntese. I *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* omdannes glukose til fruktose-6-fosfat primært via ED-sporet og glukoneogenesen i forkant av alginatsyntese. Glukose brytes først ned til trioser via ED-sporet, og triosene (i hovedsak glyseraldehyd-3-fosfat) resirkuleres deretter til heksosier via glukoneogenesen (Lynn og Sokatch, 1984; Beale og Foster, 1996).

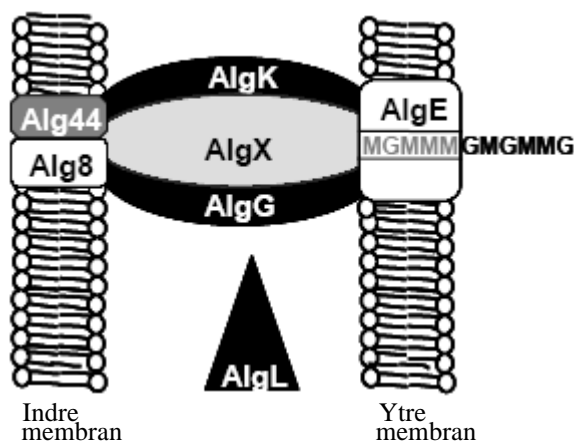


**Figur 1.8:** Bakteriell biosyntese av alginat fra fruktose-6-fosfat.

Biosyntese av alginat fra fruktose-6-fosfat foregår i flere trinn. Fruktose-6-fosfat isomeriseres først til mannose-6-fosfat, katalysert av fosfomannose isomerase (AlgA<sup>1</sup>) (Shinabarger *et al.*,

1. AlgA er et bifunksjonelt enzym, og fungerer både som fosfomannose isomerase og GDP-mannose pyrofosforylase.

1991; Lloret *et al.*, 1996). Fosfomannomutase (AlgC) (Zielinski *et al.*, 1991; Gaona *et al.*, 2004) katalyserer omleringen av mannose-6-fosfat til mannose-1-fosfat. Mannose-1-fosfat omdannes videre til GDP-mannose, katalysert av GDP-mannose pyrofosforylase (AlgA<sup>1</sup>) (Shinabarger *et al.*, 1991; Lloret *et al.*, 1996). GDP-mannose konverteres deretter til GDP-mannuronsyre. Denne reaksjonen katalyseres av GDP-mannose dehydrogenase (AlgD) (Roychoudhury *et al.*, 1989; Campos *et al.*, 1996), og er det forpliktende og hastighetsbestemmende trinnet i alginat-syntesen (Tatnell *et al.*, 1994). Det er fremdeles uklart hvordan polymerisering av GDP-mannuronsyre til mannuronan (polyM) foregår. Antagelig er proteinene Alg8 og Alg44 lokalisert i plasmamembranen og involvert i polymerisering og transport til periplasma (Maharaj *et al.*, 1993; Mejía-Ruíz *et al.*, 1997a). I periplasma acetyleres noen av M-enhetene ved hjelp av AlgI, AlgJ (AlgV i *A. vinelandii*) og AlgF (Franklin og Ohman, 1993; Franklin og Ohman, 1996; Vazquez *et al.*, 1999; Franklin og Ohman, 2002), og noen av de ikke-acetylerede M-enhetene epimeriseres til G-enheter av mannuronan C5-epimerase (AlgG) (Franklin *et al.*, 1994; Rehm *et al.*, 1996). AlgL, en lyase som spalter alginat, er også lokalisert i periplasma (Schiller *et al.*, 1993; Ertesvåg *et al.*, 1998). Dette enzymets biologiske funksjon kan være å redusere toksisk opphopning av alginat, ved å degradere kjedene til oligouronider som kan lekke ut av ytre membran (Bakkevig *et al.*, 2005; Jain og Ohman, 2005). AlgK (Aarons *et al.*, 1997; Mejía-Ruíz *et al.*, 1997b), AlgX (Monday og Schiller, 1996; Vazquez *et al.*, 1999) og AlgG danner muligens et kompleks som transporterer alginatkjeden gjennom periplasma, og samtidig beskytter den mot AlgLs lyaseaktivitet (Gimmestad *et al.*, 2003; Robles-Price *et al.*, 2004; Bakkevig *et al.*, 2005; Jain og Ohman, 2005) (Figur 1.9). Alginatkjeden antas å transporteres gjennom ytre membran ved hjelp av porinen AlgE (AlgJ i *A. vinelandii*) (Rehm *et al.*, 1994; Rehm, 1996). I *A. vinelandii* epimeriseres ikke-acetylerede M-enheter i alginatkjeden også etter sekresjon, da denne arten har gener for minst syv ekstracellulære mannuronan C5-epimeraser (AlgE1-7) (Ertesvåg *et al.*, 1994; Ertesvåg *et al.*, 1995; Svanem *et al.*, 1999) i tillegg til periplasmisk epimerase.



**Figur 1.9:** Modell for transport av alginatkjeden gjennom periplasma og ytre membran. Ifølge denne modellen danner AlgK, AlgX og AlgG et transportkompleks som forhindrer opphopning av alginat i periplasma, og samtidig beskytter alginatkjeden mot AlgLs lyaseaktivitet (Bakkevig *et al.*, 2005).

Det er også funnet et gen for ytterligere en mannuronan C5-epimerase (PsmE) i *P. syringae*. PsmE har både epimerase- og acetylhydrolaseaktivitet, og kan introdusere G-blokker i både acetyleret og deacetyleret alginat *in vitro*. Dette enzymets eventuelle biologiske rolle er ennå ikke kjent, og det er ikke funnet homologer i *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* eller *P. putida* (Bjerkan *et al.*, 2004).

1. Se fotnote side 21.

## 1.6. Formål med oppgaven

Bakteriell alginatproduksjon kan påvirkes av opptak og metabolisme av karbonkilden, og av genene direkte involvert i biosyntese av alginat. Det har blitt utført en rekke studier på betydningen av *alg*-genklyngen og *algC* for alginatsyntese, samt regulering av disse genene. Det har også blitt vist at bruk av ulike karbonkilder i dyrkingsmediet gir ulikt utbytte av alginat (Gimmestad *et al.*, 2004). Det er derimot gjort lite for å undersøke den sentrale karbohydratmetabolismens betydning for biosyntese av alginat, samt å forsøke å styre denne slik at tilsatt sukker i større grad kanaliseres mot alginatsyntese. Tilgangen på genomsekvenser for de aktuelle organismene er av stor betydning for denne typen studier, da slike data gjør det mulig å identifisere målgenene. Det vil deretter være relativt enkelt å klonere de aktuelle genene, og innføre endringer ved genetisk manipulering. Genetisk modifisering av den sentrale karbohydratmetabolismen kan tenkes å føre til en mer effektiv alginatsyntese, med hensyn på produksjonshastighet eller utbytte i forhold til mengde tilsatt sukker.

Formålet med denne oppgaven var å forsøke å kartlegge den sentrale glukosemetabolismen i *P. fluorescens*, og deretter benytte disse kunnskapene til å prøve å effektivisere alginatproduksjonen i organismen ved genetisk endring av glukosemetabolismen. Arbeidet med oppgaven ble derfor todelt. Den første delen bestod av kartlegging av den sentrale glukosemetabolismen ved hjelp av litteraturstudier og bioinformatikkverktøy. Med utgangspunkt i resultatene av dette arbeidet ble det utarbeidet forslag til genetiske endringer av den sentrale glukosemetabolismen, som potensielt kunne ha positive innvirkninger på utnyttelse av glukose med hensyn på alginatsyntese. Den andre delen av oppgaven bestod av eksperimentelt arbeid som innebar at noen av disse endringene ble innført i *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201.

Da arbeidet med denne oppgaven ble påbegynt (august 2004) var de foreløbige resultatene fra tre *P. fluorescens* sekvenseringsprosjekter tilgjengelige via internett:

- 1) Sekvensering av *P. fluorescens* PfO-1 ved US Department of Energy Joint Genome Institute (JGI). Tilgjengelig fra [http://genome.jgi-psf.org/finished\\_microbes/psefl/psefl.home.html](http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/psefl/psefl.home.html).
- 2) Sekvensering av *P. fluorescens* SBW25 ved The Wellcome Trust Sanger Institute. Tilgjengelig fra [http://www.sanger.ac.uk/Projects/P\\_fluorescens](http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_fluorescens).
- 3) Sekvensering av *P. fluorescens* Pf-5 ved The US Department of Agriculture Cooperative State Research, Education and Extension Service, Initiative for Future Agriculture and Food Systems. Tilgjengelig fra <http://www.ars-grin.gov/ars/PacWest/Corvallis/hcrl/Pf5genome/index.htm>.

I løpet av arbeidet med denne oppgaven ble genomsekvensene til PfO-1 og SBW25 satt sammen til en contig, mens sekvenseringen av Pf-5 ble ferdigstilt og publisert (Paulsen *et al.*, 2005).

Genomet til *P. fluorescens* NCIMB 10525 er per i dag ikke sekvensert. Det er imidlertid denne stammen det så langt har blitt arbeidet med i forskningsgruppen hvor arbeidet med denne oppgaven ble utført, og alginatoverprodusenten Pf201 er avledet fra denne stammen. NCIMB 10525 og Pf201 ble derfor benyttet også i dette arbeidet. Gruppen har nylig begynt å arbeide med *P. fluorescens* SBW25 i tillegg, og vil antagelig gå mer over til bruk av denne stammen i tiden fremover, da det er ønskelig å jobbe med en stamme hvor genomsekvensen er kjent (Svein Valla, [pers. med.]).

Av de tre sekvenserte *P. fluorescens*-stammene er SBW25 den som er mest lik NCIMB 10525 (Helga Ertesvåg, [pers. med.]). Det ble likevel tatt utgangspunkt i resultatene fra *P. fluorescens*

PfO-1 sekvenseringsprosjektet ved JGI ved kartlegging av glukosetransport- og metabolisme i *P. fluorescens*. Hovedårsaken til dette var at dette prosjektet hadde det mest brukervennlige grensesnittet, især fordi også foreløbige annoteringsresultater ble lagt ut. I tillegg hadde Svegården og Aamodt (2002) gjort et innledende arbeid på kartlegging av deler av karbohydratmetabolismen i *P. fluorescens*, med utgangspunkt i de daværende resultatene fra dette sekvenseringsprosjektet. Karbohydratmetabolismen er en svært sentral del av en organismes metabolisme, og metabolske spor i karbohydratmetabolismen er høyt konserverte. En kan derfor anta at det er en høy grad av konservering mellom ulike *P. fluorescens*-stammer, slik at resultatene fra lokalisering av gener i *P. fluorescens* PfO-1 også i stor grad vil gjelde *P. fluorescens* NCIMB 10525.

*P. fluorescens* kan utnytte en rekke ulike karbonkilder, men det ble valgt å begrense denne oppgaven til å fokusere på opptak og metabolisme av glukose. Glukose er en mye brukt karbonkilde, og flere andre aktuelle karbonkilder, for eksempel stivelse, sukrose og laktose, brytes dessuten ned til glukose og eventuelle andre bestanddeler. Den delen av arbeidet som omfatter glukosemetabolisme er derfor også aktuell for nedbryting og utnyttelse av slike forbindelser. *P. fluorescens* har ikke genet for  $\beta$ -galaktosidase, og kan dermed ikke benytte laktose som karbonkilde. Det er imidlertid konstruert en stamme av *P. fluorescens*, Pf201(pHM2), som kan vokse og produsere alginat med laktose som karbonkilde (Gimmestad *et al.*, 2004). Store deler av de metabolske sporene som ble studert i denne oppgaven er også relevante for metabolisme av andre karbonkilder, som for eksempel glyserol, fruktose og mannitol, da pseudomonader primært omdanner disse forbindelsene til glukose-6-fosfat før videre nedbryting (Lessie og Phibbs, 1984).



## 2. Materialer og metoder

Fremgangsmåter og verktøy benyttet i den teoretiske delen av arbeidet med denne oppgaven er beskrevet i kapittel 2.1., mens kapittel 2.2.-2.5. beskriver materialer og metoder benyttet i den eksperimentelle delen av arbeidet.

### 2.1. Kartlegging av glukosemetabolisme i *P. fluorescens*

Den sentrale glukosemetabolismen i *P. fluorescens* ble forsøkt kartlagt ved hjelp av litteraturstudier og ved analyse av tilgjengelige sekvenser ved bruk av bioinformatikkverktøy. En kort beskrivelse av de viktigste bioinformatikkverktøyene som ble benyttet i arbeidet med denne oppgaven er gitt i kapittel 2.1.1. Det er viktig å huske at denne typen analyser ikke kan gi 100 % sikre svar på hvorvidt en ORF virkelig koder for et gen, eller hva funksjonen til et predikert genprodukt er.

#### 2.1.1. Bioinformatikkverktøy

##### *BLAST*

Nukleotidsekvenser fra sekvensering er samlet i databaser, hvorav EMBL, GenBank og DDBJ er de største. Disse utveksler informasjon på daglig basis. Det finnes også en rekke databaser hvor aminosyresekvenser er samlet, hvorav de største er Swiss-Prot og TrEMBL. Swiss-Prot er manuelt annotert av eksperter, hvilket sikrer høy kvalitet på annoteringene. Da dette er et tidkrevende arbeid ble TrEMBL opprettet som et supplement. TrEMBL inneholder automatisk annoterte aminosyresekvenser translaterert fra alle kodende og putativt kodende sekvenser i EMBL/GenBank/DDBJ som ikke allerede foreligger i SwissProt (Apweiler, 2005).

**Tabell 2.1:** Oversikt over standard BLAST-programmer (Baxevanis, 2005).

Program	Søkesekvens	Databasesekvenser
BLASTN	Nukleotid	Nukleotid
BLASTP	Protein	Protein
BLASTX	Nukleotid, translaterert i alle seks leserammer	Protein
TBLASTN	Protein	Nukleotid, translaterert i alle seks leserammer
TBLASTX	Nukleotid, translaterert i alle seks leserammer	Nukleotid, translaterert i alle seks leserammer

En gitt nukleotid- eller aminosyresekvens kan sammenlignes med sekvensene i databasene ved hjelp av BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Svært forenklet fungerer BLAST ved å finne korte matchende sekvenser (segmentpar) og forleng disse utover, mens en kumulativ poengsum ("score") basert på likheter, konservative substitusjoner, ulikheter og åpenrom telles opp. Når kumulativ poengsum faller under en bestemt verdi avsluttes forlengelsen, og segmentparet kuttet ned til den lengden som ga høyest poengsum. Dette kalles et "high-scoring segment pair" (HSP). Det kan forekomme mer enn ett HSP for ett sekvenspar. HSPs med høyere poengsum enn en satt terskelverdi rapporteres som treff ved BLAST-søk. For hvert treff oppgis også en E-verdi, som angir sannsynligheten for at

likheten er tilfeldig. Det finnes flere varianter av BLAST. En oversikt over standardprogrammene er gitt i tabell 2.1. I tillegg er det etterhvert utviklet en rekke varianter av de opprinnelige programmene, for å dekke spesifikke behov innen parvis sekvenssammenligning (Baxevanis, 2005).

Som tabell 2.1 viser, kan altså en nukleotidsekvens translateres *in silico* og sammenlignes med sekvenser i proteindatabasene. Da DNA kun består av opptil 4 ulike nukleotider, mens proteiner består av opptil 20 ulike aminosyrer, gir sammenligning av aminosyresekvenser vanligvis bedre resultater enn sammenligning av nukleotidsekvenser. Likhet med andre proteiner i databasene kan tyde på at søkesekvensen er et proteinkodende gen, og gi hint om mulig funksjon. Det er imidlertid viktig å huske mange av proteinene i databasene ikke er karakterisert eksperimentelt, men kun tildelt en antatt funksjon ut fra likhet med andre proteiner med etablert funksjon (Dale og von Schantz, 2002). Denne typen analyser antar at det er en direkte sammenheng mellom aminosyresekvens og tredimensjonal struktur, og mellom struktur og biokjemisk funksjon. Dette stemmer best for nært beslektede proteiner. Ved signifikant likhet over størstedelen av sekvensen kan man ofte forutsi en god del om det mulige proteinets biokjemiske funksjon og cellulære plassering, selv om de biologiske prosessene proteinene er involvert i ikke nødvendigvis er de samme. Større proteiner er dessuten ofte modulære av natur; de inneholder flere domener. Domener er strukturelle og funksjonelle enheter, og utfører ofte spesifikke biokjemiske funksjoner. Lokal signifikant likhet kan tyde på at et predikert protein inneholder ett eller flere konserverte domener. Funksjonen til et domene kan imidlertid variere avhengig av sammenhengen, så en bør være forsiktig med direkte overføring av funksjon (Nagl, 2003).

### *Sekundære proteindatabaser*

Som nevnt over, antas det ofte at sekvenslikhet mellom to proteiner også innebærer lik funksjon. Det finnes imidlertid en del unntak fra denne regelen. Proteiner med lignende sekvenser kan ha ulike funksjoner, og proteiner med lignende funksjoner kan ha ulike sekvenser. Noen av disse problemene er forsøkt løst ved opprettelsen av sekundære proteindatabaser. Disse databasene inneholder sekvensmotiver som er evolusjonært konservert, hvorav en del i tillegg utgjør domener med kjent funksjon. Motivene er basert på sammenligning av sekvenser i de primære proteindatabasene, og kan være et resultat av manuelle undersøkelser eller bruk av automatiske algoritmer for mønstersøk. Flere av disse databasene har søkeverktøyer som gjør det mulig å undersøke om en gitt aminosyresekvens inneholder kjente motiver.

Sekundære proteindatabaser benytter ofte profiler og mønstre eller signaturer. Profiler er numeriske representasjoner av multiple sekvenssammenligninger. De baseres på sannsynlighetsfordelinger for at ulike aminosyrer skal forekomme i ulike posisjoner, og representerer felles egenskaper for sekvenssamlingen de er basert på (vanligvis en proteinfamilie). Ved bruk av profiler kan man finne likheter mellom sekvenser med liten eller ingen absolutt sekvenslikhet. Mønstre eller signaturer representerer også felles egenskaper for en samling sekvenser, ved å oppgi hvilke aminosyrer som kan være tilstede i gitte posisjoner. For eksempel betyr signaturen [IV]-G-x-G-T-[LIVMF]-x(2)-[GS] at første posisjon kan være enten isoleucin eller valin, andre posisjon kan bare være glycin, tredje posisjon kan være en hvilken som helst aminosyre og så videre. Tall i parentes bak x angir antall posisjoner som kan ha en uspesifikk aminosyre.

Ved bruk av denne typen verktøy er det ofte hensiktsmessig å hente inn informasjon fra flere kilder, da de ulike databasene utfyller hverandre. Som nevnt over, kan dessuten funksjonen til et konservert domene variere avhengig av sammenhengen. Såkalte komposittdatabaser, som for eksempel InterPro, er derfor nyttige verktøy. InterPro er en integrert ressurs for å finne infor-

masjon om proteinfamilier, domener og funksjonelle seter. Ved å søke med en sekvens i InterPro får man frem informasjon fra en rekke sekundære proteindatabaser, deriblant PROSITE, PRINTS, Pfam og ProDom. Ved å se på informasjonen fra flere kilder i sammenheng vil man ofte få flere og klarere hint om mulig funksjon for et predikert protein (Ofran og Rost, 2005).

### *Prediksjon av subcellulær lokalisering*

Det finnes en rekke ulike verktøy som forsøker å forutsi et (mulig) proteins subcellulære lokalisering ut fra aminosyresekvensen, da også dette kan gi informasjon om mulig funksjon. De vanligste tilnærmingene går ut på å forsøke å identifisere signalpeptider, samt strukturelle trekk som kan indikere hvorvidt proteinet er løselig eller integrert i en membran (Ofran og Rost, 2005). I bakterier er signalpeptider N-terminale sekvenser som merker proteinet for sekresjon, eller transport til periplasma eller ytre membran i Gram-negative. Signalsekvensene fjernes av peptidaser (Prescott *et al.*, 2002). Membranbundne proteiner forankres ofte i membranen ved hjelp av transmembrane  $\alpha$ -helikser, og disse kan til dels forutsettes ut fra aminosyresekvens (Branden og Tooze, 1999).

To verktøy for å forutsi subcellulær lokalisering er SignalP og TMHMM. SignalP 3.0 søker etter tilstedeværelse av signalpeptid og peptidase I kuttesete, ut fra aminosyresekvens og taksonomisk tilhørighet (Bendtsen *et al.*, 2004). TMHMM 2.0 søker etter tilstedeværelse av transmembrane helikser ut fra aminosyresekvens. I tillegg forsøker programmet å forutsi hvilke deler av aminosyrekjeden som befinner seg på innsiden og utsiden av membranen (Krogh *et al.*, 2001).

### *CLUSTAL W*

CLUSTAL W er et program som kan benyttes for å optimalisere sammenligning av nukleotid- eller aminosyresekvenser. Programmet kan foreta både parvis og multippel sekvenssammenligning, samt generere en konsensussekvens. Ut fra sammenligningen foreslås også evolusjonære slektskap mellom sekvensene (Thompson *et al.*, 1994).

### *Clone Manager Professional Suite*

Clone Manager Professional Suite er et integrert sett av verktøy som kan benyttes for å simulere kloning, designe og analysere primere, simulere PCR-amplifisering, identifisere ORFs og potensielle startkodon, foreta enkel sekvenssammenligning, editere og translaterer sekvenser, samt lage grafiske kart over sekvenser (SciEd, 2005).

#### 2.1.2. Fremgangsmåte

De foreløbige resultatene fra sekvensering av genomene til *P. fluorescens* PfO-1, SBW25 og Pf-5 er tilgjengelige via internett (Se kapittel 1.6.). Som nevnt i kapittel 1.6. ble det tatt utgangspunkt i resultatene fra sekvensering av PfO-1 ved kartlegging av glukosetransport- og metabolisme i *P. fluorescens*, hovedsakelig fordi dette prosjektet hadde det mest brukervennlige grensesnittet. I tillegg hadde Svegården og Aamodt (2002) gjort et innledende arbeid på kartlegging av deler av karbohydratmetabolismen i *P. fluorescens*, med utgangspunkt i dette sekvenseringsprosjektet. Svegården og Aamodt (2002) tok for seg blant annet glykolysen/ glukoneogenesen, ED-sporet og pentosefosfatsporet i sitt arbeid. Glukoseopptak, det direkte oksidative sporet og enkelte av enzymene i glukoneogenesen ble imidlertid ikke undersøkt. Arbeidet med sekvenseringsprosjektene har fremdeles pågått i tidsrommet fra Svegården og

Aamodt avsluttet sitt prosjekt til arbeidet med denne oppgaven ble påbegynt. Det ble derfor vurdert som hensiktsmessig å også vurdere gener som allerede var dekket av Svegården og Aamodts arbeid, da de tilgjengelige dataene antagelig har gjennomgått en del forandringer.

Ved forsøk på å lokalisere et gen i genomet til *P. fluorescens* PfO-1 ble det først undersøkt om en eller flere kandidater allerede var foreslått på sekvenseringsprosjektets nettsider. Dersom forslag til kandidat(er) ikke forelå ble det forsøkt å finne en sekvens for det aktuelle proteinet eller genet fra andre organismer, fortrinnsvis nært beslektet med *P. fluorescens*. Det ble deretter foretatt et BLAST-søk mot genomet til *P. fluorescens* PfO-1 med denne sekvensen. Dersom det fremdeles ikke ble funnet noen kandidat(er) for det aktuelle genet ble det undersøkt om det kunne finnes alternative enzymer eller spor for den aktuelle reaksjonen, primært via litteratursøk og ved bruk av KEGG (Kanehisa og Goto, 2000). Hvis så var tilfelle ble det undersøkt om kandidater for disse kunne lokaliseres, på samme måte som beskrevet over.

Genkandidatene ble vurdert ut fra de samlede resultatene av undersøkelser med ulike bioinformattikkverktøy. I tillegg ble det tatt hensyn til eventuell organisering i forhold til andre gener i karbohydratmetabolismen, og eventuell relevant informasjon fra litteraturen. En gjengivelse av den fullstendige vurderingen av hver enkelt kandidat er for omfattende til at det ble inkludert i denne oppgaven. Istedet har hver av kandidatene blitt tilordnet et konfidensnivå, basert på vurdering av hvor sannsynlig det er at kandidaten koder for det aktuelle proteinet. Det er vanskelig å gi klare betingelser for denne vurderingen, da informasjonen som forelå for hver enkelt kandidat varierte. Konfidensnivå 3 angir imidlertid at det regnes som svært sannsynlig at genkandidaten koder for det angitte proteinet og 2 regnes som sannsynlig. Konfidensnivå 1 angir at det er mulig kandidaten koder for det aktuelle proteinet, men at usikkerheten er høy.

Kort oppsummert ble kandidatene vurdert på følgende måte: Det ble først foretatt BLAST-søk, og genkandidatene ble vurdert ut fra grad av likhet med proteiner eller gener med kjent funksjon, samt E-verdi for de aktuelle treffene. Det ble også sett på fordelingen av likheten, da lokal homologi kan tyde på konserverte domener fremfor lik eller lignende overordnet funksjon. Ved sammenligning av aminosyresekvenser ble over 50 % homologi over hele sekvensen, og få åpenrom, regnet som en god indikasjon på funksjonell likhet. For nukleotidsekvenser ble over 80 % homologi, og ingen åpenrom som førte til rammeskift, regnet som en god indikasjon på at det dreide seg om homologe gener. Både gode genkandidater og kandidater med lavere homologi ble undersøkt videre, da også resultatene av analyser med andre verktøy ble tatt med i totalvurderingen. For alle kandidater ble det videre foretatt søk mot sekundære proteindatabaser, og resultatene av disse søkene ble vurdert og sammenlignet med både hverandre og resultatene fra BLAST-søk. Samsvar mellom resultatene fra BLAST-søk og søk i sekundære proteindatabaser ble ansett å styrke sannsynligheten for at kandidaten kodet for det aktuelle proteinet. For periplasmiske eller ekstracellulære proteiner ble det i tillegg undersøkt om sekvensen inneholdt et mulig signalpeptid, og for membranbundne proteiner ble det undersøkt om det forelå mulige transmembranhelikser. I noen tilfeller ble kandidaten også sammenlignet med flere beslektede sekvenser. Dette ble gjort for å undersøke om det så ut til å foreligge noen konserverte aminosyrer i den aktuelle typen proteiner, og om disse også forekom i kandidatsekvensen. Som nevnt over, ble det også tatt hensyn til eventuell organisering i forhold til andre gener, og eventuell annen informasjon. En helhetsvurdering av all informasjon som var funnet for den aktuelle kandidaten ble deretter lagt til grunn for tilordning av konfidensnivå 1-3.

## 2.2. Medier og løsninger

### Luria-Bertani (LB)-medium

10 g/l trypton (BD Bacto™)  
5 g/l gjærekstrakt (Oxoid)  
5 g/l NaCl (BDH)  
Ionefritt vann

Mediet autoklaveres i 20 minutter ved 120°C.

### LA-medium

LB-medium med 15 g/l agar (Oxoid)

Mediet autoklaveres i 20 minutter ved 120°C. Mediet kjøles ned til cirka 50°C før eventuell tilsetning av antibiotika og støping av plater.

### Psi-medium

20 g/l trypton (BD Bacto™)  
5 g/l gjærekstrakt (Oxoid)  
5 g/l MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Prolabo)  
Ionefritt vann

Mediet pH-justeres med KOH til pH 7,6 og autoklaveres i 20 minutter ved 120°C.

### TFB1

2,94 g/l KAc (Acros Organics)  
12,0 g/l RbCl (Merck)  
1,5 g/l CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (SDS)  
10,0 g/l MnCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (Acros Organics)  
150 ml/l glyserol (Prolabo)  
Ionefritt vann

Løsningen pH-justeres med fortynnet eddiksyre til pH 5,8 og sterilfiltreres.

### TFB2

2,1 g/l MOPS (Research Organics)  
1,2 g/l RbCl (Merck)  
11 g/l CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (SDS)  
150 ml/l glyserol (Prolabo)  
Ionefritt vann

Løsningen pH-justeres med NaOH til pH 6,5 og sterilfiltreres.

### SOC-medium

20 g/l trypton (BD Bacto™)  
5 g/l gjærekstrakt (Oxoid)  
0,5 g/l NaCl (BDH)  
3,6 g/l glukose (BDH)  
5,08 g/l MnCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (Merck)  
2,5 mM KCl (Merck)  
Ionefritt vann

Mediet sterilfiltreres.

### Stock-løsninger av antibiotika og XGal

Ampicillin natriumsalt (Sigma): 200 mg/ml  
Løses i ionefritt vann

Løsningen sterilfiltreres, alikvoteres og lagres ved -20°C. Tilsettes i medium til konsentrasjon 200 µg/ml.

Tetracyclin hydroklorid (Sigma): 15 mg/ml  
Løses i 50 % etanol

Løsningen alikvoteres og lagres mørkt (lyssensitiv) ved -20°C. Tilsettes i medium til konsentrasjon 15 µg/ml.

5-Bromo-4-kloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (XGal) (Sigma): 20 mg/ml  
Løses i DMSO

Løsningen alikvoteres og lagres mørkt (lyssensitiv) ved -20°C. 60 µl plates ut per agarplate (9 cm diameter), og platene inkuberes i minst 30 minutter før bruk. Eventuelt kan 60 µl per plate tilsettes i mediet før støping av platene.

### Gel loading buffer (10x)

70 % glyserol (Prolabo)  
0,25 % bromfenolblått (Merck)  
10 % Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemicals AB)  
Ionefritt vann til 100 %

Blandingen bør varmes (60-65°C) på vannbad eller i varmeskap for å få løst Ficoll 400 og bromfenolblått.

### Pseudomonas Isolation Agar (PIA)-medium

45 g/l Pseudomonas Isolation Agar (BD Difco™)  
20 ml/l glyserol (Prolabo)  
Ionefritt vann

Mediet autoklaveres i 20 minutter ved 120°C. Mediet kjøles ned til cirka 50°C før eventuell

tilsetning av antibiotika eller XGal og støping av plater.

### dNTP-løsninger

Stock-løsning (25 mM av hver enkelt dNTP, 100 mM totalt):

- 25 % 100 mM dATP (Roche)
- 25 % 100 mM dCTP (Roche)
- 25 % 100 mM dGTP (Roche)
- 25 % 100 mM dTTP (Roche)

Bruksløsning (2,5 mM av hver enkelt dNTP, 10 mM totalt) lages ved å fortynne stock-løsning 10x med sterilt ionefritt vann.

Lagres ved -20°C.

### DEF3 minimalmedium med glukose som karbonkilde

Stock-løsninger:

- 6 g/l jerncitrat (Sigma)
  - 30 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck)
  - 10 g/l MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O (Riedel-De Haen AG)
  - 84 g/l EDTA•2H<sub>2</sub>O (Merck)
  - 15 g/l CuCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (Acros Organics)
  - 25 g/l Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>O<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O (Merck)
  - 25 g/l CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O
  - 4 g/l Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O (Merck)
  - 246,47 g/l MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (Prolabo)
- Løses i ionefritt vann.

Glukoseløsninger:

- 20 % glukose (BDH) (For DEF3 med 20 g/l glukose.)
  - 2 % glukose (BDH) (for DEF3 med 2 g/l glukose.)
- Løses i ionefritt vann.

DEF3 minimalmedium med glukose:

- 0,39 g/l gjærekstrakt (Oxoid)
- 0,65 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- 2,73 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- 0,9 g/l sitronsyre•H<sub>2</sub>O (Prolabo)
- 3,413 ml/l jerncitrat stock-løsning
- 0,034 ml/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> stock-løsning
- 0,513 ml/l MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O stock-løsning
- 0,047 ml/l EDTA•2H<sub>2</sub>O stock-løsning
- 0,034 ml/l CuCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O stock-løsning
- 0,034 ml/l Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>O<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O stock-løsning
- 0,034 ml/l CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O stock-løsning

0,683 ml/l  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  stock-løsning  
1,56 g/l NaCl (BDH)  
2,34 ml/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  stock-løsning  
100 ml/l glukoseløsning  
Ionefritt vann

Alle komponentene, unntatt  $\text{MgSO}_4$  og glukose, løses i vannet i rekkefølgen gitt over for å hindre utfelling. I tillegg tilsettes mediet 25 mg/l triclosan (KIC Chemicals AWC) og bufres med 5 g/l MOPS (Research Organics). Mediet pH-justeres til 7,0 med NaOH.

Mediet og glukoseløsningene autoklaveres ved 120°C i 20 minutter.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  stock-løsningen sterilfiltreres.

$\text{MgSO}_4$  og 2 % eller 20 % glukoseløsning tilsettes i mediet etter autoklaving.

#### Transportbuffer (TB)

0,02 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,4):

1,06 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)  
2,12 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck)  
Løses i cirka 950 ml ionefritt vann.  
pH justeres til 7,4 med KOH.  
Ionefritt vann tilsettes til totalt volum 1000 ml.

TB:

0,25 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo)  
0,5 mg/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck)  
Løses i 0,02 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,4).

Løsningen sterilfiltreres.

#### Glukose dehydrogenase assayblanding

Glukose dehydrogenase assayblanding ble laget både med glukose og DCIP, uten glukose og uten DCIP.

5 mM diNa-EDTA (Titriplex<sup>®</sup> III, Merck)  
0,075 mM DCIP natriumsalt (Fluka)  
5 mM glukose (BDH)  
Løses i transportbuffer.

Løsningene sterilfiltreres. Assayblanding med glukose bør benyttes fersk, men kan lagres for kortere perioder i kjøleskap.



### Glukose-6-fosfat dehydrogenase assayblanding

Glukose-6-fosfat dehydrogenase assayblanding ble laget både med og uten glukose-6-fosfat.

0,04 M Tris-HCl-buffer (pH 7,4):

4,844 g Trizma<sup>®</sup>Base (Sigma) løses i cirka 950 ml ionefritt vann.  
35 ml 1 M HCl tilsettes.  
pH justeres til 7,4 med 1 M HCl.  
Ionefritt vann tilsettes til totalt volum 1000 ml.

Løsningen autoklaveres ved 120°C i 20 minutter.

Assayblanding:

1 mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (Acros Organics)  
0,2 mM β-NADP natriumsalt (Sigma)  
2,5 mM glukose-6-fosfat (Sigma)  
Løses i 0,04 M Tris-HCl-buffer (pH 7,4).

Løsningene sterilfiltreres.

### 0,05 M Tris-HCl, 1,5 % NaCl (pH 7,5)

50,0 ml 0,1 M Tris-base (Trizma<sup>®</sup>Base, Sigma)  
40,3 ml 0,1 M HCl  
pH justeres til 7,5 med 1 M HCl hvis nødvendig.  
Ionefritt vann tilsettes til totalt volum 100 ml.  
15 g/l NaCl (BDH)

Løsningen autoklaveres ved 120°C i 20 minutter.

## **2.3. Primersekvenser**

Primere er korte syntetiske oligonukleotider som er komplementære til en del av DNA-templatet, og kan benyttes som startpunkt for DNA-syntese for en DNA polymerase. Komplementæritet med andre posisjoner i templatet enn målet bør unngås. I tillegg bør primerne ikke danne stabile sekundærstrukturer eller hybridisere med seg selv. Primere som benyttes i samme reaksjonsblanding bør heller ikke hybridisere med hverandre og bør ha nærliggende smeltepunkter (Dale og von Schantz, 2002).

Primere for PCR og sekvensering ble designet ut fra sekvensdata produsert av *Pseudomonas fluorescens* SBW25 Sequencing Group ved Sanger Institute, tilgjengelig fra ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/pf. Primerne ble designet ved hjelp av Primer Designer 4.20, som er en del av Clone Manager Professional Suite (Scientific & Educational Software). Alle egendesignede primere ble bestilt fra MWG Biotech AG. På grunn av problemer med primerparet gcd fwd/-rev ble disse primerne senere bestilt fra Operon Biotechnologies Inc istedet (Se kapittel 3.3.).

I sekvensene under er nukleotider uthevet med fet skrift ikke en del av villtypesekvensene i *P.*

*fluorescens* SBW25. Seter for restriksjonsendonukleaser er understreket, og de korresponderende enzymene er indikert i parentes.

Ved amplifisering av *P. fluorescens* NCIMB 10525 *gcd*, *zwf-1*, *zwf-2* og *pgi* og testing av hvorvidt genutskiftning hadde fungert ble følgende primerpar benyttet:

*gcd*fwd (*Nde*I): 5'-**TAATAACATATGAGCACTGACGGTGCCTCAAGC**-3'  
*gcd*rev (*Not*I): 5'-**TAAGCGGCCGCTGCGTTGGTGGAAAGACTTGATCAGG**-3'

*zwf1*fwd (*Nde*I): 5'-**TGCTGCCATATGCCTTCGATAACCGTAGAAC**-3'  
*zwf1*rev (*Not*I): 5'-**TAAGCGGCCGCAATGCAGGCGTACGGTACTC**-3'

*zwf2*fwd (*Nde*I): 5'-**TAATAACATATGACCGCCAACGGCAAGAAAC**-3'  
*zwf2*rev (*Not*I): 5'-**TAAGCGGCCGCAATCGCTGCGTCACTCATC**-3'

*pgi*fwd (*Nde*I): 5'-**TCGTGCGCATATGGCGTACTACCGCACTC**-3'  
*pgi*rev (*Not*I): 5'-**TAAGCGGCCGCAAGGCCAACCTCCAAAC**-3'

Ved sekvensering av PCR-produkter av *gcd*, *zwf-1*, *zwf-2* og *pgi* ble følgende primere, samt PCR-primene ovenfor, benyttet:

*gcd*1: 5'-TGCCAGCCAATTCACCAACC-3'  
*gcd*2: 5'-GCCTACGCTTCCGAGCAGAG-3'  
*gcd*3: 5'-AGACCTACACCCGCAACTCG-3'  
*gcd*4: 5'-CCAGATGCTGTGCCGGATTG-3'

*zwf1*1: 5'-TCTGCGAGAACCTGTCTGAAG-3'  
*zwf1*2: 5'-TGGTACGCGGCCAGTACATC-3'

*zwf2*1: 5'-AACGCGGTGTTCTACCTGGC-3'  
*zwf2*2: 5'-TCCAAGTCTGGCGATGGTG-3'

*pgi*1: 5'-GGCGTGGCTACACCGAAAAG-3'  
*pgi*2: 5'-ACTCACTGTGGTCGGCCATC-3'

Ved sekvensering av *gcd* i pMM1, *zwf-1* i pMM3, *zwf-2* i pMM2 og *pgi* i pMM4 ble det benyttet samme primere som ved sekvensering av de respektive PCR-produktene. Primerne *gcd*fwd, *zwf2*fwd, *zwf1*rev og *pgi*rev ble imidlertid erstattet av M13/pUC rev 1233 (NEB):

5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

## 2.4. Bakteriestammer og plasmider

Tabell 2.2 gir en oversikt over bakteriestammene og plasmidene benyttet i arbeidet med denne oppgaven. Figurer av plasmidene pHKK*phOx-scFv-c-myc*-His6, pEM2, pMG48, pMM1, pMM2, pMM3 og pMM4 er gitt i bilag 2.

**Tabell 2.2:** Bakteriestammer og plasmider benyttet i arbeidet med denne oppgaven.

Stamme eller plasmid	Beskrivelse <sup>a</sup>	Kilde
Stammer		
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>E. coli</i> 294 med plasmid RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 (som inneholder <i>tra</i> -gener og <i>trfA</i> ) integrert i kromosomet.	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>P. fluorescens</i>		
NCIMB 10525	Ikke-mukoid <i>P. fluorescens</i> villtype.	NCIMB
NCIMB 10525Δ <i>gcd</i>	<i>gcd</i> i-ramme delesjonsmutant av NCIMB 10525.	Denne oppgaven
NCIMB 10525Δ <i>zwf-1</i>	<i>zwf-1</i> i-ramme delesjonsmutant av NCIMB 10525.	Denne oppgaven
NCIMB 10525Δ <i>zwf-2</i>	<i>zwf-2</i> i-ramme delesjonsmutant av NCIMB 10525.	Denne oppgaven
NCIMB 10525Δ <i>zwf-1</i> Δ <i>zwf-2</i>	<i>zwf-2</i> i-ramme delesjonsmutant av NCIMB 10525Δ <i>zwf-1</i> .	Denne oppgaven
Pf201	Mukoid mutant av NCIMB 10525.	Gimmestad <i>et al.</i> , 2004
Pf201Δ <i>gcd</i>	<i>gcd</i> i-ramme delesjonsmutant av Pf201.	Denne oppgaven
Pf201Δ <i>zwf-1</i>	<i>zwf-1</i> i-ramme delesjonsmutant av Pf201	Denne oppgaven
Pf201Δ <i>zwf-2</i>	<i>zwf-2</i> i-ramme delesjonsmutant av Pf201	Denne oppgaven
Plasmider		
pHKK <i>phOx-scFv-c-myc-His6</i>	pHKK med <i>phOx-scFv-c-myc</i> klonet inn mellom <i>pelB</i> og His6-kodende sekvens. Høyt kopitall. Ap <sup>r</sup> .	Sletta <i>et al.</i> , 2004
pEM2	pLitmus28-basert vektor med <i>trfA254D</i> klonet inn nedstrøms for G5 Pm-promotor. Høyt kopitall. Ap <sup>r</sup> .	E.R. Mellemsæther, ikke publisert
pMG48	RK2-basert suicide (mangler <i>trfA</i> ) genutskiftningsvektor med <i>lacZ</i> . Lavt kopitall. Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> .	Gimmestad <i>et al.</i> , 2003
pMM1	Derivat av pHKK <i>phOx-scFv-c-myc-His6</i> hvor et 2,6 kb <i>NdeI-NotI</i> DNA-fragment inneholdende <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525 <i>gcd</i> er satt inn i de samme setene.	Denne oppgaven
pMM2	Derivat av pHKK <i>phOx-scFv-c-myc-His6</i> hvor et 1,6 kb <i>NdeI-NotI</i> DNA-fragment inneholdende <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525 <i>zwf-2</i> er satt inn i de samme setene.	Denne oppgaven
pMM3	Derivat av pEM2 hvor et 1,5 kb <i>NdeI-NotI</i> DNA-fragment inneholdende <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525 <i>zwf-1</i> er satt inn i de samme setene.	Denne oppgaven
pMM4	Derivat av pEM2 hvor et 1,7 kb <i>NdeI-NotI</i> DNA-fragment inneholdende <i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525 <i>pgi</i> er satt inn i de samme setene.	Denne oppgaven

**Tabell 2.2:** Bakteriestammer og plasmider benyttet i arbeidet med denne oppgaven.

Stamme eller plasmid	Beskrivelse <sup>a</sup>	Kilde
pMM5	Derivat av pMM1 hvor et 0,4 kb <i>PciI</i> DNA-fragment er fjernet for å lage en i-ramme delesjon i <i>gcd</i> . ( <i>gcd</i> med delesjon kalles $\Delta gcd$ .)	Denne oppgaven
pMM6	Derivat av pMM2 hvor et 0,09 kb <i>BstBI</i> DNA-fragment er fjernet for å lage en i-ramme delesjon i <i>zwf-2</i> . ( <i>zwf-2</i> med delesjon kalles $\Delta zwf-2$ .)	Denne oppgaven
pMM7	Derivat av pMM3 hvor et 0,4 kb <i>OliI</i> DNA-fragment er fjernet for å lage en i-ramme delesjon i <i>zwf-1</i> . ( <i>zwf-1</i> med delesjon kalles $\Delta zwf-1$ .)	Denne oppgaven
pMM8	<i>SpeI-NotI</i> -kuttet derivat av pMG48 hvor et 1,5 kb <i>XbaI-NotI</i> DNA-fragment fra pMM6, inneholdende $\Delta zwf-2$ , er satt inn.	Denne oppgaven
pMM9	<i>SpeI-NotI</i> -kuttet derivat av pMG48 hvor et 2,2 kb <i>XbaI-NotI</i> DNA-fragment fra pMM5, inneholdende $\Delta gcd$ , er satt inn.	Denne oppgaven
pMM10	<i>SpeI-NotI</i> -kuttet derivat av pMG48 hvor et 1,2 kb <i>XbaI-NotI</i> DNA-fragment fra pMM7, inneholdende $\Delta zwf-1$ , er satt inn.	Denne oppgaven

a. Ap<sup>r</sup> og Tc<sup>r</sup> angir resistens ovenfor henholdsvis ampicillin og tetracyclin.

## 2.5. Metoder

### 2.5.1. Oppdyrking og nedfrysing av cellekulturer

#### *Dyrking av cellekultur:*

Dyrkingsmedium ble overført til sterile rystekolber eller rør, og eventuelt tilsatt antibiotika for å hindre tap av plasmid eller kontaminering av kulturen. Antibiotikakonsentrasjonene som ble benyttet er angitt i kapittel 2.2. Celler ble plukket fra kolonier på agarplater eller skrappt fra nedfrosne kulturer ved hjelp av steril tannpirker, overført til mediet, og inkubert i rysteinkubator (Infors). Kulturer av *E. coli* ble inkubert ved 37°C og 250 rpm, og kulturer av *P. fluorescens* ble inkubert ved 30°C og 225 rpm. Hvilket medium som ble benyttet er angitt i underkapittelet som omhandler den aktuelle metoden.

#### *Nedfrysing av cellekultur:*

Overnattskultur av alle utviklede stammer ble fryst ned for lagring. Kultur dyrket i LB-medium ble overført til et sterilt cryorør og tilsatt 200 µl autoklavert 60 % glyserol (Prolabo) per ml kultur. Løsningen ble blandet ved vortexing, og lagret i fryser ved -80°C.

### 2.5.2. Amplifisering av DNA-fragmenter ved PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) er en metode for eksponentiell amplifisering av et DNA-fragment fra et lengre templat. Fragmentet som amplifiseres defineres av to primere, en i hver ende. Primerne er to syntetiske oligonukleotider som er komplementære til de motstående DNA-trådene i templatet. PCR-reaksjonen kan deles inn i tre trinn. Det dobbeltrådige templatet

må først *denatureres*, hvilket skjer ved å varme opp reaksjonsblandingen til 94°C. Reaksjonsblandingen kjøles deretter ned for å få *hybridisering* av primerne til templatet. Optimal hybridiseringstemperatur avhenger primernes lengde og GC-innhold. For høy temperatur kan føre til at primerne ikke binder, og for lav temperatur kan føre til at primerne binder til andre posisjoner på templatet (feilpriming). Hybridiseringstemperaturen velges vanligvis mellom 40 og 60°C. Det siste trinnet er *forlengelse*, hvor komplementære DNA-tråder syntetiseres med primerne som startpunkt. Optimal temperatur for forlengelse er vanligvis 72°C. Disse trinnene gjentas i et gitt antall sykluser. Nysyntetiserte fragmenter fungerer som templat i etterfølgende sykluser, hvilket gir en eksponentiell amplifisering av det ønskede fragmentet. Endene til de nye fragmentene defineres av primerne, ikke templatet, hvilket kan utnyttes til å introdusere modifikasjoner i fragmentet via primerne. For eksempel kan det legges inn restriksjonsseter i endene av PCR-produktet for å lette påfølgende kloningsarbeid.

Magnesiumioner er en nødvendig kofaktor for DNA polymeraser, og konsentrasjonen av disse påvirker PCR-reaksjonen. Høy magnesiumkonsentrasjon øker utbyttet, men senker samtidig spesifisiteten. Ved PCR benyttes termostabile DNA polymeraser, vanligvis *Taq* polymerase. Disse polymerasene tåler de høye temperaturene som benyttes for denaturering av templatet, slik at man slipper å tilsette nytt enzym for hver syklus. *Taq* polymerase har høy prosessivitet (legger til etterfølgende nukleotider uten å dissosiere fra DNA-templatet), men mangler "proofreading"-aktivitet, og kan dermed ikke rette opp feilinkorporerte nukleotider (Dale og von Schantz, 2002).

I arbeidet med denne oppgaven ble Expand High Fidelity PCR System (Roche) benyttet. I dette systemet benyttes en enzymblending bestående av *Taq* DNA polymerase og *Tgo* DNA polymerase, en termostabil polymerase med "proofreading" (3'-5' eksonuklease)-aktivitet. Denne polymeraseblandingen er designet for å gi PCR-produkter med høyt utbytte, lite feilinkorporering og høy spesifisitet (Roche, 2005).

Reaksjonsblending:

- 2 µl overnattskultur
- 5 µl 10x Expand High Fidelity PCR buffer med eller uten MgCl<sub>2</sub> (Roche)
- 1 µl 10 mM dNTP
- 1 µl 10 µM fwd primer
- 1 µl 10 µM rev primer
- Eventuelt 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Roche) til ønsket konsentrasjon
- Sterilt ionefritt vann til 49,5 µl

Med mindre annet er oppgitt ble det benyttet en MgCl<sub>2</sub>-konsentrasjon på 1,5 mM i reaksjonsblandingen. Ved amplifisering fra kolonier på plate ble overnattskultur erstattet med likt volum sterilt ionefritt vann, og celler ble skrapet fra koloni på plate og suspendert i reaksjonsblandingen.

PCR ble kjørt i PCR-maskin (Eppendorf Mastercycler Personal eller Eppendorf Mastercycler Gradient) med følgende program:

Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 96°C i 4 minutter for å lysere cellene, og deretter avkjølt til 85°C. Det ble deretter tilsatt 0,75 µl Expand High Fidelity Enzyme mix (Roche).

Det ble kjørt 35 sykluser med:

- Denaturering: 94°C i 30 sekunder.

Hybridisering: 55°C i 1 minutt.

Forlengelse: 68°C i 4 minutter.

Prøvene ble deretter avkjølt til 4°C, og lagret ved -20°C.

### 2.5.3. Rensing av DNA-fragmenter fra løsnings

QIAquick PCR Purification Kit Protocol eller QIAEX II Protocol for Desalting and Concentrating DNA Solutions (Qiagen) ble benyttet for å rense PCR-produkter, både etter amplifisering og restriksjonskutting. QIAquick-protokollen kan benyttes for å rense DNA-fragmenter fra 100 bp til 10 kb (Qiagen, 2002), mens QIAEX II-protokollen kan benyttes for å rense fragmenter fra 40 bp til 50 kb (Qiagen, 1999). Det ble benyttet Biofuge fresco sentrifuge (Heraeus) for begge protokollene.

QIAquick-systemet er basert på at DNA bindes til silikagelmembranen i spinnkolonnen ved høye saltkonsentrasjoner og  $\text{pH} \leq 7,5$ , mens kontaminanter (primære, salter, proteiner, uinkorporerte nukleotider, agarose, fargestoffer, etidumbromid, oljer og detergenter) passerer gjennom kolonnen. Bindingsbufferen sørger for riktig saltkonsentrasjon og pH for binding av DNA. Salter blir kvantitativt vasket vekk med etanolholdig Buffer PE. DNA-eluering er mest effektiv ved lave saltkonsentrasjoner og basiske forhold, og kan gjøres med Buffer EB, vann eller annen egnet buffer. QIAEX II-systemet er basert på samme prinsipp som QIAquick-systemet, men i QIAEX II bindes DNA til silikagelpartikler mens kontaminanter forblir i supernatanten (Qiagen, 1999; Qiagen, 2002).

#### *Rensing av DNA-fragmenter fra 100 bp til 10 kb (QIAquick PCR Purification Kit Protocol):*

Det ble tilsatt 5 volum Buffer PB (bindingsbuffer) til 1 volum prøve, og løsningen ble blandet ved vortexing.

Prøven ble overført til en QIAquick spinn-kolonne plassert i et oppsamlingsrør. DNA ble bundet til kolonnematerialet ved å sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt.

Kolonnen ble vasket ved å tilsette 0,75 ml Buffer PE og sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt. Nedspunnet væske ble fjernet, og kolonnen ble satt tilbake i samme oppsamlingsrør. Kolonnen ble deretter sentrifugert ved 13 000 rpm i ytterligere 1 minutt for å fjerne rester av Buffer PE.

DNA ble eluert fra kolonnen til et sterilt eppendorfrør ved å tilsette 50 µl Buffer EB og sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt. Ved rensing av restriksjonskuttet DNA ble 1x T4 DNA ligasebuffer (NEB) benyttet i stedet for Buffer EB.

DNA-løsningen ble lagret ved -20°C.

#### *Rensing av DNA-fragmenter over 10 kb (QIAEX II Protocol for Desalting and Concentrating DNA Solutions):*

Det ble tilsatt 3 volum Buffer QX1 (bindingsbuffer med pH-indikator) og 2 volum sterilt ione-fritt vann til 1 volum prøve, og løsningen ble blandet ved å vende og knipse på røret. (Vortexing kan forårsake brudd på DNA-fragmenter over 10 kb.) Det ble deretter undersøkt om løsningen hadde gul farge. Adsorpsjon av DNA til QIAEX II partikler er kun effektivt ved  $\text{pH} \leq 7,5$ , hvilket indikeres av gul farge.

QIAEX II ble resuspendert ved vortexing i 30 sekunder. Det ble tilsatt 10 µl QIAEX II per 5 µg DNA, og løsningen ble blandet ved å vende og knipse på røret. Røret ble inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. Løsningen ble blandet hvert 2. minutt, for å holde QIAEX II i suspensjon.

Prøven ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 1 minutt, og supernatanten ble fjernet. Pelleten ble deretter vasket to ganger med 500 µl Buffer PE.

Pelleten ble lufttørket i 10-15 minutter, eller inntil den ble hvit.

DNA ble eluert ved å tilsette 20 µl 1x T4 DNA ligasebuffer (NEB) og resuspendere pelleten ved å knipse på røret. Prøven ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 1 minutt, og supernatanten ble forsiktig overført til et sterilt eppendorfrør.

DNA-løsningen ble lagret ved -20°C.

#### 2.5.4. Plasmidisolering

Plasmider ble isolert ved hjelp av Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System, Centrifugation Protocol (Promega). Dette systemet er silikamembran-basert (i likhet med QIAquick-systemet beskrevet i kapittel 2.5.3.). Denne protokollen er beregnet for isolering av plasmid-DNA fra 1-10 ml *E. coli* overnattskultur, og fungerer best for plasmider mindre enn 20 kb. For plasmider med høyt kopitall anbefales det å benytte maksimalt 5 ml kultur. Utbytte vil avhenge av kulturvolum, kulturens tetthet, plasmidets kopitall, bakteriestamme og type medium (Promega, 2005). Det ble benyttet Biofuge fresco sentrifuge (Heraeus).

3-4,5 ml overnattskultur, dyrket i LB-medium med Ap, ble overført til eppendorfrør (1,5 ml i hvert rør) og sentrifugert ved 13 000 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellene ble resuspendert i 250 µl Cell Resuspension Solution.

Suspensjonen ble tilsatt 250 µl Cell Lysis Solution, blandet og inkubert 1-5 minutter (til suspensjonen klarnet) ved romtemperatur.

Endonukleaser og andre proteiner frigjort ved lysis av cellene ble inaktivert ved tilsettelse av 10 µl Alkaline Protease Solution. Løsningen ble blandet og inkubert 5 minutter ved romtemperatur.

Løsningen ble nøytralisert med 350 µl Neutralization Solution, og utfellingene ble sentrifugert ned ved 13 000 rpm i 10 minutter.

Lysatet ble overført til en kolonne plassert i et oppsamlingsrør. Plasmid-DNA ble bundet til kolonnematerialet ved å sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt.

Kolonnen ble vasket to ganger ved å tilsette henholdsvis 750 og 250 µl Wash Solution (tilsatt etanol) og sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt. Nedspunnet væske ble fjernet, og kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 rpm i ytterligere 2 minutter for å fjerne rester av Wash Solution.

Plasmid-DNA ble eluert fra kolonnen til et sterilt eppendorfrør ved å tilsette 100 µl Nuclease-Free Water og sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt.

Plasmidløsningen ble lagret ved -20°C.

### 2.5.5. Restriksjonskutting

Restriksjonsendonukleaser er enzymer som kutter DNA. Både Type I og Type II restriksjonsendonukleaser gjenkjenner og binder til spesifikke sekvenser i DNA. Type I vil deretter vandre en variabel distanse langs DNA-tråden før den kutter, mens Type II kutter i eller like ved målsekvensen. Type II er derfor vanligst å bruke ved DNA-manipulering. Lengden og sekvensen til gjenkjennelsesstedet varierer for ulike restriksjonsenzymer, men de fleste er palindrome. Avhengig av det aktuelle enzymets kuttemønster vil kuttingen resultere i enten butte ender eller ender med overheng. De sistnevnte gir mer effektiv ligering, men det forutsetter at overhengene er komplementære (Dale og von Schantz, 2002). Kuttasetene for restriksjonsenzymene benyttet i arbeidet med denne oppgaven er gitt i bilag 3.

Ulike restriksjonsenzymer har høyest aktivitet ved ulike ionekonsentrasjoner og temperaturer. Riktig ionekonsentrasjon oppnås ved bruk av ulike buffere. Egnede buffere, inkuberingstemperatur og eventuelle andre krav (for eksempel tilsettelse av BSA eller SAM) oppgis av leverandøren. Leverandøren oppgir også ofte enzymets aktivitet i andre buffere enn den optimale. Ved kutting med to eller flere enzymer kan de ulike enzymene ha ulike anbefalte buffere. Man må da velge den som er mest egnet for den aktuelle kombinasjonen, eller utføre kuttingene separat.

For plasmider med høyt kopitall ble det benyttet 3 µl DNA-løsning, for plasmider med lavt kopitall ble det benyttet 17 µl, og for PCR-produkter ble det benyttet 5 µl.

Reaksjonsblanding:

- 3-17 µl DNA-løsning
- 2 µl 10x egnet buffer
- Eventuelt 0,5 µl 100x BSA (NEB)
- Eventuelt SAM (NEB) til anbefalt konsentrasjon
- Maksimalt 2 µl enzym totalt
- Sterilt ionefritt vann til 20 µl

Blandingen ble inkubert ved anbefalt temperatur i minimum to timer, av og til over natt. Ved bruk av buffer hvor ett eller flere av enzymene hadde 50 % eller lavere aktivitet ble blandingen alltid inkubert over natt.

Kuttede prøver ble lagret ved -20°C.

### 2.5.6. Separering av DNA-fragmenter ved agarosegelelektroforese

Når et ladet molekyl plasseres i et elektrisk felt, vil det migrere mot elektroden med motsatt ladning. Dette kan utnyttes til analyse og rensing av nukleinsyrer, da disse molekylene er negativt ladet og dermed vil bevege seg mot anoden. En agarosegel består av et komplekst nettverk av porer, og ved vandring gjennom en slik gel vil hastigheten bestemmes av molekylets evne til å trenge gjennom dette nettverket. For lineært dobbeltrådet DNA innen et gitt størrelsesområde vil vandringshastigheten reflektere molekylets størrelse. Agarosegeler kan benyttes til separering av DNA-fragmenter større enn cirka hundre bp. Spennvidden til en agarosegel bestemmes av agarosekonsentrasjonen; ved å øke konsentrasjonen oppnås bedre separasjon av små fragmenter, og ved å redusere konsentrasjonen oppnås bedre separasjon av større fragmenter. Når gelelektroforese skal benyttes for å bestemme størrelse på DNA-fragmenter må en standard bestående av fragmenter med kjent størrelse kjøres samtidig med prøven(e).



Ikke-lineære DNA-molekyler vil bevege seg forskjellig fra lineære molekyler av samme størrelse. I nativ form foreligger plasmider som sirkulære supercoils. Ved brudd på en av trådene får plasmidet en åpen sirkulær form, mens brudd på dobbelttråden gir et linearisert plasmid. Til tross for at de tre formene har samme størrelse i bp, vil de bevege seg ulikt i en gel. Åpen sirkulær form beveger seg langsommere enn de to andre formene. Forholdet mellom lineær form og supercoil er vanskeligere å forutsi, og avhenger av størrelse og elektroforetiske betingelser (Dale og von Schantz, 2002).

DNA-fragmenter ble separert ved hjelp av gelelektroforese etter restriksjonskutting, slik at fragmentet av interesse kunne isoleres. Metoden ble også benyttet for å identifisere plasmidkonstrukt hvor kutting og ligering hadde lyktes. GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) ble benyttet som DNA-standard. Størrelsen på fragmentene i standarden er vist i figur B4.1 i bilag 4.

Gelen (0,8 % agarose i 1x TAE-buffer) ble plassert i et gelkar fylt med 1x TAE-buffer. Det ble applisert 5-20 µl prøve, på forhånd blandet med 1/10 volum loading buffer (10x), i hver sin brønn på gelen. Det ble i tillegg applisert 4-6 µl DNA-standard i en eller flere brønner.

Det ble satt på 100V spenning over gelen i 50-60 minutter.

Gelen ble farget i et etidiumbromidbad i cirka 10 minutter, og deretter avfarget i 10-20 minutter. Etidiumbromid er et fargestoff med en flat ringstruktur, og fungerer som en interkalaterende agent. Dette vil si at den kan stables mellom baseparene i DNA-tråden. Etidiumbromid fluorescerer når det utsettes for UV-lys, og DNA i gelen kan dermed indirekte visualiseres (Dale og von Schantz, 2002). Farge bundet til DNA har sterkere fluorescens enn fri farge. UV-lys ved 254 nm absorberes av DNA og overføres til fargestoffet, og fargestoffet absorberer selv UV-lys ved 302 og 366 nm (Faulkner-Jones, 1995). Visualisering og fotografering etter farging ble gjort ved hjelp av Bio-Rad GelDoc 2000.

#### 2.5.7. Ekstraksjon av DNA-fragmenter fra agarosegel

DNA-fragmenter ble ekstrahert fra agarosegel ved QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen). DNA-fragmenter fra 70 bp til 10 kb kan ekstraheres ved denne protokollen (Qiagen, 2002). QIAquick-systemet er beskrevet i kapittel 2.5.3. Det ble benyttet Biofuge fresco sentrifuge (Heraeus).

DNA-fragmentet ble skåret ut av agarosegelen med en skalpell, overført til et eppendorfrør og veid.

Det ble tilsatt 3 volum Buffer QG (bindingsbuffer som også løser agarosegel) til 1 volum gel (100 mg ~ 100 µl), og røret ble inkubert på 50°C vannbad i 10 minutter. Løsningen ble blandet ved vortexing hvert 2.-3. minutt under inkuberingen.

Ved rensing av fragmenter større enn 4 kb ble det tilsatt 1 gelvolum isopropanol, og løsningen ble blandet ved vortexing. (Tilsettelse av isopropanol øker utbyttet av DNA-fragmenter under 500 bp og over 4 kb.)

Prøven ble overført til en QIAquick spinn-kolonne plassert i et oppsamlingsrør. DNA ble bundet til kolonnematerialet ved å sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt.

Kolonnen ble vasket ved å tilsette 0,75 ml Buffer PE og sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt. Dersom DNA-prøven skulle benyttes til liggering av butte ender fikk kolonnen stå i 2-3 minutter etter tilsettelse av Buffer PE før sentrifugering. Nedspunnet væske ble fjernet, og kolonnen ble satt tilbake i samme oppsamlingsrør. Kolonnen ble deretter sentrifugert ved 13 000 rpm i ytterligere 1 minutt for å fjerne rester av Buffer PE.

DNA ble eluert fra kolonnen til et sterilt eppendorfrør ved å tilsette 50 µl 1x T4 DNA ligasebuffer (NEB) og sentrifugere ved 13 000 rpm i 1 minutt.

DNA-løsningen ble lagret ved -20°C.

### 2.5.8. Ligering av DNA-fragmenter

Ligering (sammenføring) av DNA-fragmenter gjøres ved bruk av enzymer kalt DNA ligaser. Ligasenes naturlige rolle er å reparere brudd i DNA, og de krever en 3'-OH og en 5'-fosfat i endene som skal føyes sammen. Kutting med restriksjonsendonukleaser gir denne typen ender. Noen ligaser kan bare ligere fragmenter med overlappende ender, mens andre, for eksempel T4 DNA ligase, også kan føye sammen butte ender. T4 DNA ligase krever ATP som ko-substrat.

DNA-konsentrasjonen i reaksjonsblandingen vil påvirke utfallet av reaksjonen. Lave DNA-konsentrasjoner øker sannsynligheten for at to ender av samme molekyl føyes sammen (intramolekylær liggering). Ved liggeringer som involverer to eller flere DNA-molekyler (intermolekylær liggering) kan i tillegg ofte en rekke ulike reaksjoner finne sted. Det bør derfor benyttes et molart vektor:insert forhold hvor den ønskede reaksjonen er mest sannsynlig. Dette er vanskelig å forutsi, men vil vanligvis være mellom 3:1 og 1:3 (Dale og von Schantz, 2002). Ved liggering med T4 DNA ligase anbefales et vektor:insert forhold mellom 2:1 og 6:1 for singulære inserts (New England Biolabs, 2005). For å unngå selvligering av vektor uten insert kan man også kutte vektor og insert med to ulike restriksjonsenzymer, slik at vektor-religering ikke er mulig (Dale og von Schantz, 2002).

Ligering ved hjelp av T4 DNA ligase ble benyttet både ved kloning av DNA-fragmenter inn i vektorer og ved selvligering av plasmid etter kutting (for å innføre delesjon i gener).

Reaksjonsblanding:

- Totalt 17 µl DNA (løst i 1x T4 DNA ligasebuffer)
- 1 µl 10x T4 DNA ligasebuffer (NEB)
- 1 µl sterilt ionefritt vann
- 1 µl T4 DNA ligase (NEB)

Blandingen inkuberes i kjølerom (4°C) over natt.

### 2.5.9. Preparering av kompetente celler og transformering av plasmid

En celle som har evne til å ta opp "nakent" DNA fra omgivelsene (transformering) sies å være kompetent. Hos noen bakteriearter utvikles denne evnen naturlig, men dette gjelder ikke for *E. coli*. *E. coli* kan imidlertid induseres til å bli kompetent, blant annet ved å behandle cellene med saltløsninger. Plasmid kan transformeres inn i de kompetente cellene ved å tilsette plasmid-DNA og deretter gi cellene et mildt varmesjokk. Etter transformering må cellene fortynnes i vekstmedium og inkuberes, så de får tid til å komme seg og uttrykke resistensmarkøren intro-

duisert via plasmidet, før de plates ut på selektivt medium (Dale og von Schantz, 2002).

Preparering av kompetente celler og transformering av plasmid ble utført ved en modifisering av metoden beskrevet av Hanahan (1985).

#### *Preparering av rubidiumklorid-kompetente celler:*

1 % *E. coli* S17.1 overnattekultur (dyrket i LB-medium) ble inokulert i 50 ml Psi-medium i 250 ml rysteflasker med strømningsbrytere, og dyrket til OD<sub>600</sub> var nøyaktig 0,4. For *E. coli* tar dette omtrent 1,5-2 timer. Måling av OD<sub>600</sub> ble gjort med Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer Instruments), og Psi-medium ble benyttet som blank.

Cellekulturene ble avkjølt på is i 15 minutter, og deretter overført til sentrifugekopper. Kulturrene ble sentrifugert i 5 minutter ved 4500 rpm og 4°C (Sorvall RC5C). Supernatanten ble helt av, og cellene ble resuspendert i 40 ml TFB1 og inkubert på is i 5 minutter.

Løsningen ble sentrifugert i 5 minutter ved 4500 rpm og 4°C (Sorvall RC5C). Supernatanten ble helt av, og cellene ble resuspendert i 3 ml TFB2.

Løsningen ble alikvotert i sterile eppendorfrør, 100 µl i hvert rør, og snabbfryst på etanol/tørris.

Cellene ble lagret ved -80°C.

#### *Transformering av plasmid til rubidiumklorid-kompetente celler:*

100 µl kompetente celler ble tint forsiktig på is, og det ble tilsatt 10 µl plasmidløsning.

Blandingen ble inkubert på is i 30 minutter, deretter på 42°C vannbad i 50 sekunder og så på is i 2 minutter.

Det ble tilsatt 1 ml SOC-medium forvarmet til 37°C, og cellene ble inkubert i rysteinkubator (Infors), 250 rpm og 37°C, i 1-2 timer.

200 µl uforynnet og 200 µl konsentrert cellekultur ble platet ut på agarplater med seleksjon, og platene ble inkubert ved 37°C over natt.

Ved transformering ble det også utført en positiv og en negativ kontroll. Ved positiv kontroll ble et karakterisert plasmid med samme antibiotikaresistens som plasmidene det ble jobbet med transformert inn i de kompetente cellene. Vekst på platene med positiv kontroll tyder på at cellene er kompetente. Ved negativ kontroll ble det ikke tilsatt plasmidløsning. Ingen vekst på platene med negativ kontroll tyder på at seleksjonen fungerer og at man ikke har kontaminasjon.

#### 2.5.10. Sekvensering av DNA-fragmenter

Sekvensering av DNA-fragmenter er vanligvis basert på dideoksey-metoden (Sanger *et al.*, 1977). Startpunktet for sekvenseringen defineres av en primer (syntetisk oligonukleotid som er komplementært til en målsekvens i templatet). Tilføyelse av nye nukleotider (dNTPs) til en voksende DNA-tråd skjer i 3'-enden av den voksende tråden. Sukkerdelen av dNTP er en 2'-deoksyribose (har ikke en hydroksylgruppe i 2'-posisjon). dNTP har en hydroksylgruppe i 3'-posisjon, og denne er nødvendig for at ytterligere en nukleotid skal kunne legges til. Dersom en

nukleotid med 2',3'-dideoksyribose som sukkerenhet (ddNTP) legges til istedet får man en tråd uten 3'-OH i enden. Dermed kan ikke flere nukleotider legges til, og DNA-syntese termineres. Dersom både dNTPs og ddNTPs er tilstede i reaksjonsblandingen vil dette resultere i produkter av ulike lengder, avhengig av når i prosessen en ddNTP ble inkorporert i hvert enkelt produkt.

I dag utføres vanligvis sekvensering ved hjelp av en automatisert sekvensator. I sekvensatoren separeres DNA-fragmentene ved elektroforese i et matriks-fylt kapillær. Oppløsningsevnen er høy nok til at lengdeforskjeller ned til ett bp kan skilles fra hverandre. I sekvenseringsreaksjonen er enten primeren eller ddNTPs merket ved inkorporering av fluorescerende farge. Maskinen kan dermed lese av fluorescensen fra fargen (ved hjelp av laser) etterhvert som fragmentene passerer et fiksert punkt. Ved å merke hver av de fire typene ddNTPs med ulike farger kan alle tilsettes i samme reaksjonsblanding. Den avleste sekvensen og/eller kromatogrammet sendes direkte fra sekvensatoren til en datamaskin (Dale og von Schantz, 2002).

Sekvensering ble utført ved hjelp av BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems). I dette systemet foreligger alle nødvendige komponenter for sekvenseringsreaksjonen, unntatt primer og templat, i en ferdigblandet reaksjonsmiks (Applied Biosystems, 2002).

*Sekvenseringsreaksjon:*

Reaksjonsblanding:

- 4 µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix v1.1 (Applied Biosystems)
- 4 µl fortynningsbuffer (250 mM Tris-HCl (pH 9,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, 2005))
- 1 µl 3,2 µM primer
- x µl DNA
- Sterilt ione-fritt vann til 20 µl.

For PCR-produkter på 1000-2000 bp anbefales det å bruke 10-40 ng DNA i prøven, og for PCR-produkter større enn 2000 bp anbefales 20-50 ng. For plasmider anbefales 150-300 ng (Applied Biosystems, 2002). DNA-konsentrasjonen i prøvene som skulle benyttes ble anslått ut fra sammenligning med bånd med kjent DNA-konsentrasjon i DNA-standard.

Sekvenseringsreaksjon ble kjørt i PCR-maskin (Eppendorf Mastercycler Personal) med følgende program:

Blandingen ble inkubert ved 96°C i 2 minutter.

Det ble kjørt 25 sykluser med:

- Denaturering: 96°C i 30 sekunder.
- Hybridisering: 50°C i 15 sekunder.
- Forlengelse: 60°C i 4 minutter.

Prøvene ble deretter avkjølt til 4°C.

Prøvene ble oppbevart på is eller lagret ved -20°C fram til rensing/felling av ekstensjonsproduktene.

*Reinsing/felling av ekstensjonsprodukter:*

2  $\mu$ l 3 M natriumacetat (pH 4,6) og 50  $\mu$ l 96 % etanol (Arcus) ble blandet i ett eppendorfrør og sekvenseringsblandingen ble tilsatt. Det hele ble blandet godt ved vortexing, og prøven ble inkubert ved romtemperatur i 15 minutter.

Prøven ble sentrifugert i 20 minutter ved 13 000 rpm og 4°C (Biofuge fresco, Heraeus). Supernatanten ble fjernet ved hjelp av sprøytespiss koblet til sug.

Pelleten ble vasket med 250  $\mu$ l 70 % etanol (Arcus), og sentrifugert i 5 minutter ved 13 000 rpm og 4°C (Biofuge fresco, Heraeus). Supernatanten ble fjernet ved hjelp av sprøytespiss koblet til sug.

Pelleten ble lufttørket over natt i romtemperatur, og lagret ved -20°C fram til sekvensering.

*Sekvensering*

Sekvensering ble utført ved NTNU (Trondheim), ved hjelp av ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

2.5.11. Konjugering og isolering av konjuganter

Konjugering er overføring av genetisk materiale mellom celler ved direkte celle-celle kontakt. Denne prosessen er ensidig, hvilket vil si at overføringen skjer fra en donorcelle til en mottakercelle. En del plasmider har evnen til å fremme overføring av seg selv fra en celle til en annen (konjugativitet). Konjugativitet forutsetter to momenter. For det første må plasmidet ha et startpunkt for overføring, kalt *oriT* (“origin of transfer”) eller *mob* (“mobility”). For det andre må proteinene som er nødvendige for mobilisering være tilstede. Disse kodes for av *tra*-gener. Overføring skjer ved at donorcellen danner pilus som fysisk kontakter mottakercellen, og en konjugasjonsbro dannes mellom de to cellene. Deretter introduseres et enkelttrådig brudd i *oriT*, og en enkelttråd overføres til mottakeren mens “rolling circle”-replikasjon av plasmidet foregår i donorcellen. Den overførte enkelttråden blir gjort dobbeltrådet og sirkularisert i mottakercellen (Roberts, 2003).

*E. coli* S17.1 har *trfA* og *tra*-genene fra plasmid RP4 integrert i kromosomet (Simon *et al.*, 1983), og pMG48 (og dets derivater) inneholder *oriT*. pMG48 (og dets derivater) inneholder også gen for tetracyclin-resistens og *lacZ*, som koder for  $\beta$ -galaktosidase (Gimmestad *et al.*, 2003).  $\beta$ -galaktosidases naturlige oppgave er å hydrolysere laktose, men det kan også spalte det kromogene substratet XGal. XGal er i utgangspunktet fargeløst, men  $\beta$ -galaktosidase frigjør farge-delen, hvilket gir blå farge (Dale og von Schantz, 2002). Etter konjugering fra *E. coli* til *P. fluorescens* kan vektoren med insatt genomisk DNA integreres i vertens kromosom, hvilket vil gi *P. fluorescens*-stammer som danner blå kolonier i nærvær av XGal og er Tc<sup>r</sup>. Deretter kan det skje en utkryssing. Avhengig av hvor utkryssingen skjer, vil en sekvens tilsvarende enten villtypegenet eller delesjonsutgaven bli igjen i kromosomet. pMG48 og dets derivater mangler *trfA*, et gen som er essensielt for initiering av plasmidreplikasjon, og er dermed suicide vektorer. Det utkryssede plasmidet vil derfor tapes fra cellen, hvilket gir stammer som danner hvite kolonier i nærvær av XGal og er Tc<sup>s</sup> (Gimmestad *et al.*, 2003).

Overnattskulturer av donorstammen(e) og mottakerstammen(e) ble dyrket opp i LB-medium. For donorstammene ble Ap tilsatt i mediet for å hindre plasmidtap. 1 % av hver av overnatts-

kulturene ble inokulert i nytt LB-medium, og dyrket til eksponentiell fase.  $OD_{600}$  bør da ligge rundt 0,4. For *E. coli* tar dette omtrent 1,5-2 timer, for *P. fluorescens* tar det omtrent 3,5-4 timer. Måling av  $OD_{600}$  ble gjort med Lambda 35 UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer Instruments), og LB-medium ble benyttet som blank.

3 ml donorkultur og 3 ml mottakerkultur ble blandet i et 13 ml rør og sentrifugert i 5 minutter ved 5000 rpm og 4°C (Sorvall RC6). Supernatanten ble helt av, og cellene ble resuspendert i væskeresten som ble igjen i røret (cirka 100 µl).

Suspensjonen ble avsatt som en dråpe på LA uten antibiotika, og inkubert i varmeskap, 30°C, over natt.

Cellene ble skrapet av LA-platen med en steril spatel, overført til et sterilt eppendorfrør med 1 ml LB-medium, og resuspendert. Det ble laget en fortyningsserie med konsentrasjonene  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  og  $10^{-6}$ , og 100 µl av hver fortyning ble platet ut på PIA med Tc og XGal. Platene ble inkubert ved 30°C i to døgn.

Celler ble plukket fra frittstående blå kolonier ved hjelp av sterile tannpirkere og dyrket opp over natt i LB-medium. (Hvis koloniene sto svært tett ble en eller flere kolonier resuspendert i 1 ml LB-medium, og restrøket på PIA-plater med Tc og XGal. Platene ble inkubert ved 30°C i to døgn, og frittstående blå kolonier ble plukket.)

0,1 % kultur ble inokulert i nytt LB-medium. Kulturen ble holdt gående med 0,1 % inokulering i nytt LB-medium 1-2 ganger i døgnet. Etter 2-4 dager ble det tatt ut en prøve av kulturen og laget en fortyningsserie med konsentrasjonene  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  eller  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  før hver nye inokulering. 100 µl av hver fortyning ble platet ut på PIA med XGal, og platene ble inkubert ved 30°C i to døgn.

Hvite kolonier ble prikket over på PIA med og uten Tc. Kolonier som vokste på plater uten Tc, men ikke på plater med Tc, ble undersøkt ved hjelp av PCR, samt eventuell restriksjonsanalyse av PCR-produkter.

#### 2.5.12. Undersøkelse av vekst med glukose som karbonkilde

Forkultur av stammene som skulle undersøkes ble dyrket i 3 ml DEF3-medium med 20 g/l glukose i 13 ml rør, i cirka ett døgn. 1 % forkultur ble inokulert i nytt medium; 10 ml DEF3 med 20 g/l glukose i 125 ml kolber, og dyrket i tre døgn.

Celltetthet i kulturene ble målt som  $OD_{600}$  etter 24, 48 og 72 timers dyrking. Målingene ble utført med Spectramax Plus 384 spektrofotometer (Molecular Devices), og DEF3-medium ble benyttet som blank.

#### 2.5.13. Preparering av vasket celleduspensjon for glukose dehydrogenase assay

Vaskede celleduspensjoner for glukose dehydrogenase assay (kapittel 2.5.16.) ble preparert ved en modifisering av metoden beskrevet av Lynch (1982).

Forkultur av stammene som skulle undersøkes ble dyrket i 3 ml DEF3-medium med 2 og 20 g/l glukose i 13 ml rør, i cirka ett døgn. 1 % forkultur ble inokulert i nytt medium; 50 ml DEF3 med 2 og 20 g/l glukose i 500 ml kolber, og dyrket i ett døgn.

Kulturer som var merkbart viskøse ble fortynnet 5x med 0,2 M NaCl (BDH) før høsting. Viskositeten skyldes sannsynligvis alginatproduksjon, og alginat gir mindre viskøse løsninger i nærvær av monovalente metallioner (Smidsrød og Moe, 1995). Lavere viskositet i kulturen vil lette separeringen av cellene fra mediet.

Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 10 000 x g i 10 minutter ved 4°C (Sorvall RC6). Cellene ble vasket to ganger med henholdsvis 50 og 25 ml transportbuffer (TB). (Resuspenderes og sentrifugeres som over.)

Cellene ble resuspendert i TB til OD<sub>660</sub> ≈ 20. Måling av OD<sub>660</sub> ble gjort med Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), og TB ble benyttet som blank.

Cellesuspensjonene ble oppbevart på is inntil bruk.

#### 2.5.14. Preparering av cellefritt ekstrakt for glukose-6-fosfat dehydrogenase assay

Kultur av stammene som skulle undersøkes ble dyrket opp som beskrevet i kapittel 2.5.13.

Cellefri ekstrakter for glukose-6-fosfat dehydrogenase assay (kapittel 2.5.17.) ble preparert ved hjelp av B-PER<sup>®</sup> II Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce). Denne reagensen er utviklet for å ekstrahere proteiner fra bakterieceller, og benytter en mild, ikke-ionisk detergent for å lysere cellene (Pierce, 2001).

Protokoll for midi-skala bakteriell proteinekstraksjon ble benyttet. Ved bruk av denne protokollen anbefales det å benytte 40 ml kultur med OD<sub>600</sub> på 1,5-3,0 (Pierce, 2001). For å oppnå omtrent denne cellemengden i alle prøvene ble kulturene enten fortynnet med 0,9 % NaCl (BDH) eller ulike volum ble benyttet. Merkbart viskøse kulturer ble alltid fortynnet (Se kapittel 2.5.13.).

Cellene ble høstet ved sentrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter (Biofuge Primo R, Heraeus, eller Sorvall RC6), og pelleten ble fryst ned ved -80°C.

Cellene ble resuspendert i 2,5 ml B-PER<sup>®</sup> II reagent ved hjelp av vorteksing og pipettering, inntil cellesuspensjonen var homogen. Homogen cellesuspensjon ble ristet forsiktig ved romtemperatur i 10-20 minutter.

1,5 ml suspensjon ble overført til et eppendorfrør. Løselige proteiner ble skilt fra uløselige proteiner ved sentrifugering ved 15 000 rpm i 15 minutter (Biofuge Primo R, Heraeus). Supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør, da glukose-6-fosfat dehydrogenase befinner seg i løselig fraksjon.

De cellefri ekstraktene ble oppbevart på is inntil bruk, eller fryst ned ved -80°C.

#### 2.5.15. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

Proteinkonsentrasjoner i vaskede cellesuspensjoner og cellefri ekstrakter ble bestemt ved hjelp av Bio-Rad Protein Assay. Dette assayet er basert på Bradford-metoden (Bradford, 1976), og er et kolorimetrisk assay for måling av total proteinkonsentrasjon. Assayet er basert på at absorpsjonsmaksimum for en sur løsning av fargestoffet Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G-250 endres fra 465 nm til 595 nm ved binding til protein. Proteinkonsentrasjon i prøver bestemmes ved å

sammenligne med en standardkurve laget samtidig (Bio-Rad, 1994).

Proteinkonsentrasjoner ble bestemt ved Microassay Procedure:

- 800 µl standard- og prøveløsninger overføres til hvert sitt eppendorfrør.
- 200 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate tilsettes i hvert rør, og løsningene blandes ved hjelp av vorteks.
- Blandingen inkuberes i romtemperatur i 5-60 minutter.
- Absorbans måles ved 595 nm. (Spektrofotometeret nullstilles med en av blank-parallellene.)

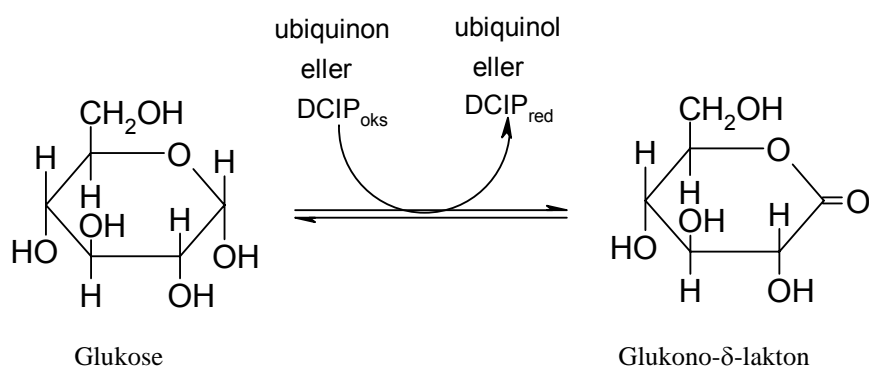
Hele celler må løses ved hjelp av alkali eller detergenter for å få målt totalt celleprotein (Gogstad og Krutnes, 1982). Ved måling av proteinkonsentrasjoner i vaskede celleduspensjoner ble prøvene preparert ved at 250 µl vasket celleduspensjon ble tilsatt 250 µl 1 M NaOH (Merck) og kokt i 15 minutter (Lynch, 1982). Preparerte prøver ble fortynnet 1:500 med ionefritt vann.

Ved måling av proteinkonsentrasjoner i cellefri ekstrakter ble prøvene fortynnet 1:1000 med ionefritt vann.

BSA ble benyttet som standard. For denne prosedyren er det lineære området til BSA 1,2-10,0 µg/ml (Bio-Rad, 1994). En 1,34 mg/ml BSA stock-løsning ble benyttet for å lage fortynninger på 1,34, 3,35, 5,36, 7,37 og 9,38 µg/ml. Det ble også laget nullprøver uten protein. Ved bestemmelse av proteinkonsentrasjoner i vaskede celleduspensjoner ble 1 µl ionefritt vann i standard-løsningene erstattet med 1 µl 1 M NaOH, for å få tilsatt samme mengde NaOH som i prøveløsningene. Dette ble gjort fordi NaOH kan påvirke assayet (Gogstad og Krutnes, 1982).

#### 2.5.16. Glukose dehydrogenase assay

Glukose dehydrogenase (EC 1.1.5.2<sup>1</sup>) katalyserer oksidasjon av glukose til glukono-δ-lakton, med ubiquinon som naturlig elektronakseptor (Schomburg *et al.*, 2004b) (Figur 2.1).



**Figur 2.1:** Oksidasjon av glukose til glukono-δ-lakton, med ubiquinon eller DCIP som elektronakseptor. Denne reaksjonen katalyseres av glukose dehydrogenase, som kodes for av *gcd* i *P. fluorescens*.

DCIP kan fungere som en kunstig elektronakseptor i denne reaksjonen (Figur 2.1). Oksidert form av DCIP absorberer ved 600 nm, mens redusert form ikke absorberer ved denne bølgelengden. Reduksjon av DCIP kan dermed benyttes som mål på enzymaktivitet (Matsushita *et al.*, 1980).

1. I Schomburg *et al.* (2004b) er glukose dehydrogenase ført opp under EC 1.1.99.17, men er senere overført til EC 1.1.5.2 (Schomburg, 2005).



Glukose dehydrogenase aktivitet ble målt i vaskede cellesuspensjoner (Se kapittel 2.5.13.) ved en modifisering av metoden beskrevet av Lynch (1982), hvor initiell hastighet for absorbansendring ved 600 nm måles. Assayet ble utført i 96-brønns plate (Nunc) og målingene ble gjort med Spectramax Plus 384 plateleser (Molecular Devices).

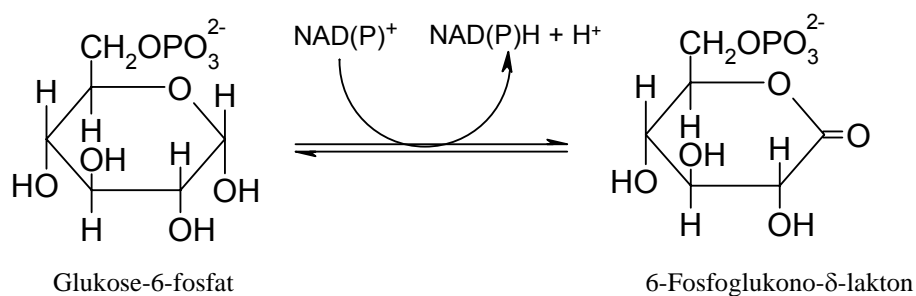
Reaksjonen ble satt i gang ved at 15  $\mu\text{l}$  cellesuspensjon ble tilsatt i 185  $\mu\text{l}$  assayblanding. (Totalt assayvolum 200  $\mu\text{l}$ .) Det ble målt tre paralleller for hver suspensjon, samt tre kontroller for hver suspensjon. I kontrollene ble assayblanding uten glukose benyttet, for å måle uspesifikk reduksjon av DCIP. Absorbans ved 600 nm ble avlest hvert 9. sekund i 60 minutter.

Cellesuspensjonen som tilsettes i assayblandingen vil også absorbere lys ved 600 nm (i tillegg det som absorberes av DCIP). Det ble derfor i tillegg utført en enkeltmåling av absorbans ved 600 nm i prøver hvor 15  $\mu\text{l}$  cellesuspensjon var tilsatt i 185  $\mu\text{l}$  assayblanding uten DCIP. Det ble målt tre paralleller for hver suspensjon, og gjennomsnittet av de tre parallellene ble benyttet som blank for kinetikmålingene.

Enzymaktivitet kan beregnes ut fra de målte verdiene for  $\text{OD}_{600}$ . OD-verdiene konverteres først til  $\mu\text{M DCIP}_{\text{oks}}$ . For disse beregningene ble det benyttet en molar ekstinksjonskoeffisient. Ekstinksjonskoeffisienten for DCIP ved 600 nm avhenger av pH, og ble beregnet å være  $21,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ved pH 7,4. Beregningen ble gjort ved tilnærmingen beskrevet av Armstrong (1964). Ytterligere informasjon om beregning av enzymaktivitet er gitt i bilag 8.

### 2.5.17. Glukose-6-fosfat dehydrogenase assay

Glukose-6-fosfat dehydrogenase (EC 1.1.1.49) katalyserer oksidasjon av glukose-6-fosfat til 6-fosfoglukono- $\delta$ -lakton samtidig som  $\text{NAD(P)}^+$  reduseres til  $\text{NAD(P)H}$  (Schomburg *et al.*, 2004a) (Figur 2.2).



**Figur 2.2:** Oksidasjon av glukose-6-fosfat til 6-fosfoglukono- $\delta$ -lakton. Denne reaksjonen katalyseres av glukose-6-fosfat dehydrogenaser, som kodes for av *zwf-1* og *zwf-2* i *P. fluorescens*.

$\text{NAD(P)H}$  absorberer lys ved 340 nm, mens  $\text{NAD(P)}^+$  ikke absorberer ved denne bølgelengden. Reduksjon av  $\text{NAD(P)}^+$  kan dermed måles spektrofotometrisk og benyttes som et mål på enzymaktivitet (Price og Stevens, 1999). *P. fluorescens* har to ulike glukose-6-fosfat dehydrogenaser (*Zwf-1* og *Zwf-2*), som begge kan benytte både  $\text{NAD}^+$  og  $\text{NADP}^+$  som kofaktor. *Zwf-2* viser imidlertid sterk preferanse for  $\text{NADP}^+$  (Lessmann *et al.*, 1975). Det ble derfor besluttet å benytte  $\text{NADP}^+$  som kofaktor ved måling av enzymaktivitet.

Glukose-6-fosfat dehydrogenase aktivitet ble målt i cellefri ekstrakter (Se kapittel 2.5.14.) ved en modifisering av metoden beskrevet av Lynch *et al.* (1975), hvor initiell hastighet for absorbansendring ved 340 nm måles. Assayet ble utført i 96-brønns UV-plate (Costar) og målingene ble gjort med Spectramax Plus 384 plateleser (Molecular Devices).

Reaksjonen ble satt i gang ved at 10  $\mu\text{l}$  cellefritt ekstrakt ble tilsatt i 190  $\mu\text{l}$  assayblanding. (Totalt assayvolum 200  $\mu\text{l}$ .) Det ble målt tre paralleller for hvert ekstrakt, samt tre kontroller for hvert ekstrakt. I kontrollene ble assayblanding uten glukose-6-fosfat benyttet, for å måle uspesifikk reduksjon av  $\text{NADP}^+$ . Absorbans ved 340 nm ble målt hvert 9. sekund i 60 minutter.

Enzymaktivitet kan beregnes ut fra de målte verdiene for  $\text{OD}_{340}$ . OD-verdiene konverteres først til  $\mu\text{M NADP}^+$  redusert. For disse beregningene ble det benyttet en molar ekstinksjonskoeffisient på  $6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for NADPH ved 340 nm (Lessie og Neidhardt, 1967). Ytterligere informasjon om beregning av enzymaktivitet er gitt i bilag 9.

#### 2.5.18. Enzymatisk alginatanalyse

Kultur av stammene som skulle undersøkes ble dyrket opp som beskrevet i kapittel 2.5.12., men 1 % forkultur ble nå inokulert i 25 ml medium i 250 ml kolber. Det ble tatt ut prøver for alginatanalyse etter 24, 48 og 72 timer.

Alginatkonsentrasjon i prøvene ble målt ved assayet beskrevet av Østgaard (1992). Dette assayet er basert på at umettede uronider utviser betydelig absorpsjon ved 230-240 nm (Nakada og Sweeney, 1967). Alginatlyaser spalter alginatkjeden ved en  $\beta$ -elimineringsreaksjon, og danner en ny umettet uronsyre-gruppe på den nye ikke-reduserende enden (Wong *et al.*, 2000). Denne enheten vil dermed absorbere ved 230 nm. Ved overskudd av enzym vil  $\text{OD}_{230}$  etter cirka tre timer nå et stabilt nivå som avhenger av initiell substratkonsentrasjon. Alginatkonsentrasjon i prøvene kan dermed bestemmes ved å sammenligne med en standardkurve laget samtidig. I dette assayet benyttes en blanding av M-lyase (kan ikke spalte G-blokker) og G-lyase (kan ikke spalte M-blokker) (Østgaard, 1992). I bakterielle alginater er noen av M-enhetene acetyleret. Prøvene ble derfor først deacetyleret ved mild alkalisk behandling, som beskrevet av Ertesvåg og Skjåk-Bræk (1999).

Prøveuttak:

- 1,00 g kultur ble veid ut til et 13 ml rør.
- Prøven ble fortynnet 5x eller 10x med 0,2 M NaCl (BDH), avhengig av prøvens viskositet.
- Fortynnet prøve ble overført til to eppendorfrør og sentrifugert ved 13 000 rpm i 10 minutter (Biofuge fresco, Heraeus).
- 1 ml superntant ble overført til to eppendorfrør, og 33  $\mu\text{l}$  3 M NaOH (Merck) ble tilsatt i hvert rør.
- Prøvene ble fryst ned ved  $-20^\circ\text{C}$ .

Opparbeiding av prøver:

- Prøvene ble tint og plassert på rørsnurrer i 1 time for å deacetyleres.
- Prøvene ble sentrifugert ved 13 000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) i 10 minutter.
- 100  $\mu\text{l}$  supernatant ble overført til et nytt eppendorfrør og fortynnet 3x med 0,05 M Tris-HCl, 1,5 % NaCl (pH 7,5).

Alginatassay:

Assayet ble utført i 96-brønns UV-plate (Costar) og målingene ble gjort med Spectramax Plus 384 plateleser (Molecular Devices). Alginat LF10/60 løst i ionefritt vann ble benyttet som standard. Det ble laget standardløsninger med konsentrasjonene 0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 og 0,5 g/l.

- 150  $\mu$ l 0,05 M Tris-HCl, 1,5 % NaCl (pH 7,5) ble tilsatt i hver brønn.
- 75  $\mu$ l blank (ionefritt vann), standard- og prøveløsninger ble tilsatt i hver sin brønn og løsningene ble blandet. Det ble målt to paralleller for hver standardløsning og tre paralleller for hver prøve.
- Absorbans ved 230 nm ble avlest.
- 8  $\mu$ l 1 U/ml M-lyase og 8  $\mu$ l 1 U/ml G-lyase ble tilsatt i alle brønnene unntatt blank-brønnene, og løsningene ble blandet.
- Platen ble inkubert statisk i romtemperatur.
- Absorbans ved 230 nm ble avlest etter 3 og 4 timer.

### 3. Resultater

#### 3.1. Kartlegging av glukosemetabolisme i *P. fluorescens*

Gener for alle enzymene og transportproteinene i figur 1.4 ble forsøkt lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1 ved hjelp av bioinformatikkverktøy, og funnene ble vurdert opp mot opplysninger fra litteraturen. Tabell 3.1 viser en oversikt over genene og de korresponderende enzymene/proteinene. Tabellen angir også hvorvidt kandidater til genene ble funnet i genomet til PfO-1, og eventuell locusID.

**Tabell 3.1:** Oversikt over genene forsøkt lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1. Tabellen angir også navn og EC- eller TC-nummer for enzymene/proteinene genene koder for, og locusID og konfidensnivå for lokaliserte kandidater.

Enzym/protein	Gen	EC-/TC-nummer <sup>a</sup>	LocusID	Konfidensnivå <sup>b</sup>
<i>Glukoseopptak</i>				
Generell porin	<i>ompF</i>	1.B.1.1.1	Ingen kandidater.	-
	<i>ompC</i>	1.B.1.1.3	Ingen kandidater.	-
	<i>oprF</i>	1.B.6.1.2	Pfl1777	3
Glukosespesifikk porin	<i>oprB-1</i>	1.B.19.1.1	Pfl4366	3
	<i>oprB-2</i>	1.B.19.1.1	Pfl4576	3
Glukose ABC-transportssystem				
Medlem av CUT1-familien		3.A.1.1.13		
ATP-bindende protein	<i>gltK</i>		Pfl4367	3
Transmembranprotein	<i>gltG</i>		Pfl4368	2
Transmembranprotein	<i>gltF</i>		Pfl4369	2
Glukosebindende protein	<i>gltB</i>		Pfl4370	2
Medlem av CUT2-familien		3.A.1.2.3	Ingen kandidater.	-
Glukose:PEP PTS				
EIIA og EIICB	<i>crr</i> og <i>ptsG</i>	4.A.1.1.1	Ingen kandidater.	-
EIICBA	<i>ptsG</i>	4.A.1.1.9	Ingen kandidater.	-
MFS glukosetransportprotein				
Medlem av SP-familien	<i>glf/glcP</i>	2.A.1.1	Pfl0670	1
Medlem av FHS-familien	<i>ggp/glcP</i>	2.A.1.7	Ingen kandidater.	-
<i>Glykolysen/glukoneogenesen</i>				
Heksokinase	<i>hvk</i>	2.7.1.1	Ingen kandidater.	-
Glukokinase <sup>c</sup>	<i>glk</i>	2.7.1.2	Pfl4374	3
Glukose-6-fosfat isomerase	<i>pgi</i>	5.3.1.9	Pfl4813	3
Fosfofruktokinase (ATP-avhengig)	<i>pfkA/-B</i>	2.7.1.11	Ingen kandidater.	-

## Resultater

**Tabell 3.1:** Oversikt over genene forsøkt lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1. Tabellen angir også navn og EC- eller TC-nummer for enzymene/proteinene genene koder for, og locusID og konfidensnivå for lokaliserte kandidater.

Enzym/protein	Gen	EC-/TC-nummer <sup>a</sup>	LocusID	Konfidensnivå <sup>b</sup>
Fosfofruktokinase (PP <sub>i</sub> -avhengig)	<i>pfp</i>	2.7.1.90	Ingen kandidater.	-
Fruktosebisfosfat aldolase	<i>fda</i>	4.1.2.13	Pfl5262	3
Triosefosfat isomerase	<i>tpiA</i>	5.3.1.1	Pfl0775	3
Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase	<i>gap</i>	1.2.1.12	Pfl4376	3
Fosfoglyserat kinase	<i>pgk</i>	2.7.2.3	Pfl5265	3
Fosfoglyserat mutase	<i>gpmA</i>	5.4.2.1	Pfl0333	3
Enolase	<i>eno</i>	4.2.1.11	Pfl1121	3
Pyruvat kinase	<i>pyk</i>	2.7.1.40	Pfl4448	3
	<i>pykF</i>	2.7.1.40	Pfl1594	3
Pyruvat karboksylase	<i>pyc</i>	6.4.1.1	Ingen kandidater.	-
	<i>pycA</i>	6.4.1.1	Pfl5640	3
	<i>pycB</i>	6.4.1.1	Pfl5639	3
Fosfoenolpyruvat karboksykinase	<i>pckA</i>	4.1.1.49	Pfl0268	3
Fosfoenolpyruvat syntase	<i>ppsA</i>	2.7.9.2	Pfl1770	3
Fruktose-1,6-bisfosfatase	<i>fbp</i>	3.1.3.11	Pfl0352	3
Glukose-6-fosfatase	<i>g6pc</i>	3.1.3.9	Ingen kandidater.	-
<i>Det direkte oksidative sporet</i>				
Glukose dehydrogenase	<i>gcd</i>	1.1.5.2	Pfl4577	3
Glukonolaktonase	<i>gnl</i>	3.1.1.17	Pfl2803	2
Glukonat/H <sup>+</sup> symporter	<i>gntP</i>	2.A.8.1	Pfl0721	2
	<i>gntP</i>	2.A.8.1	Pfl2796	2
	<i>gntP</i>	2.A.8.1	Pfl4335	3
Glukonat kinase	<i>gntK</i>	2.7.1.12	Pfl4336	3
Glukonat dehydrogenase	<i>gad</i>	1.1.99.3	Pfl0085	2
2-Ketoglukonat transporter	<i>kguT</i>	2.A.1.14	Pfl2903	2
2-Ketoglukonat kinase	<i>kguK</i>	2.7.1.13	Pfl2902	2
2-Keto-6-fosfoglukonat reduktase	<i>kguD</i>	1.1.1.43	Pfl2904	2
<i>Entner-Doudoroff-sporer</i>				
Glukose-6-fosfat dehydrogenase	<i>zwf-1</i>	1.1.1.49	Pfl4363	3
6-Fosfoglukonolaktonase <sup>d</sup>	<i>pgl</i>	3.1.1.31	Pfl4362	3

**Tabell 3.1:** Oversikt over genene forsøkt lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1. Tabellen angir også navn og EC- eller TC-nummer for enzymene/proteinene genene koder for, og locusID og konfidensnivå for lokaliserte kandidater.

Enzym/protein	Gen	EC-/TC-nummer <sup>a</sup>	LocusID	Konfidensnivå <sup>b</sup>
6-Fosfoglukonat dehydrogenase	<i>edd</i>	4.2.1.12	Pfl4375	3
2-Keto-3-deoksy-6-fosfoglukonat (KDPG) aldolase	<i>eda</i>	4.1.2.14	Pfl4361	3
<i>Pentosefosfatsporet</i>				
Glukose-6-fosfat dehydrogenase	<i>zwf-2</i>	1.1.1.49	Pfl2587	3
6-Fosfoglukonat dehydrogenase	<i>gnd</i>	1.1.1.44	Pfl2586	3
Fosfopentose isomerase	<i>rpiA</i>	5.3.1.6	Pfl5382	3
Fosfopentose epimerase	<i>rpe</i>	5.1.3.1	Pfl5120	3
Transketolase	<i>tktA</i>	2.2.1.1	Pfl5267	3
Transaldolase	<i>tal</i>	2.2.1.2	Pfl3847	3

- TC-nummer er angitt for transportproteiner, EC-nummer er angitt for enzymer.
- 3: Svært sannsynlig at genkandidaten koder for det angitte proteinet, 2: sannsynlig, 1: høy usikkerhet. Se kapittel 2.1.2. for mer utfyllende informasjon.
- Inngår også Entner-Doudoroff-sporet.
- Inngår også i pentosefosfatsporet.

### 3.1.1. Lokalisering av gener for glukoseopptak

Gen for OprF, men ikke for OmpF og OmpC, ble funnet i genomet til *P. fluorescens* PfO-1. Dette var som forventet, da OprF er det generelle porinet i *P. aeruginosa* (Hancock og Brinkman, 2002). OprF er også påvist i *P. fluorescens* (De Mot *et al.*, 1994; Dé *et al.*, 1995).

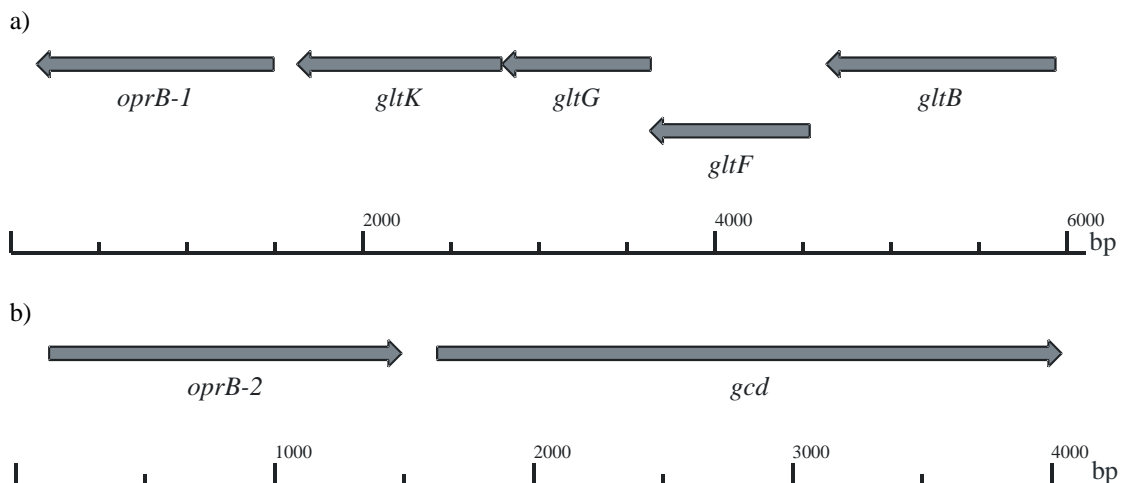
Det karbohydratspesifikke porinet OprB har en viktig rolle i glukoseopptak i *P. aeruginosa* (Hancock og Carey, 1980; Wylie og Worobec, 1995), og det har blitt vist at OprB-homologer også forekommer hos andre pseudomonader, deriblant *P. fluorescens* (Wylie og Worobec, 1994; Adewoye *et al.*, 1998). To gener for OprB (*oprB-1* og *oprB-2*) ble lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

Det ble ikke funnet gener for glukose:PEP PTS i genomet til *P. fluorescens* PfO-1, men det ble funnet fire gener som antagelig koder for komponenter i en glukose ABC-transporter. Disse funnene er i samsvar med litteraturen, da aerobe bakterier i slekten *Pseudomonas* er rapportert å mangle heksose:PEP PTS for glukoseopptak (Romano *et al.*, 1970). Videre er *P. fluorescens* og *P. aeruginosa* vist å ha et ikke-fosforlyerende system for aktiv transport av glukose (Eisenberg *et al.*, 1974; Guymon og Eagon, 1974). I *P. aeruginosa* er dette systemet vist å være avhengig av et periplasmisk glukosebindende protein (GBP) (Stinson *et al.*, 1977), og i *P. fluorescens* er det vist at systemet drives av ATP-hydrolyse (Romano *et al.*, 1980). Det ble også funnet et gen hvor translateret sekvens hadde noe likhet (25 % identisk, 43 % positiv likhet) med translasjonsproduktet av *glcP* fra *Synechocystis* sp. PCC6803, som koder for en MFS-glukose-transporter (Zhang *et al.*, 1989; Schmetterer, 1990). Dette genet viste imidlertid også like stor likhet med andre MFS-transportere i SP-familien og aromatsyre/H<sup>+</sup> symporter-familien. Det er

med andre ord mulig at dette er et gen for en MFS-transporter, men umulig å si noe nærmere om substratspesifisitet. Litteratursøk ga ingen indikasjoner på at MFS-transportere for glukoseopptak er identifisert i *Pseudomonas* spp.

De fire ovennevnte ABC-transportergenene (*gltB*, *gltF*, *gltG* og *gltK*) ser ut til å være organisert i et operon som også kan inkludere *oprB-1* (Figur 3.1 a). Disse fem genene har tilsvarende organisering i *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000). I *P. aeruginosa* mangler en klar promotor oppstrøms for *gltK*, hvilket også indikerer at genene er organisert i et operon (Adewoye og Worobec, 2000). Lite er kjent om dette transportsystemet i pseudomonader, men i *P. aeruginosa* koder antagelig *gltK* for ATP-bindende protein (Adewoye og Worobec, 2000), mens *gltB*, *gltF* og *gltG* sannsynligvis koder for henholdsvis GBP og transmembranpermeaser (Stover *et al.*, 2000).

*oprB-2* er lokalisert oppstrøms for genet for glukose dehydrogenase (*gcd*) (Figur 3.1 b). Glukose dehydrogenase katalyserer første trinn i det direkte oksidative sporet; omdanning av glukose til glukono- $\delta$ -laktone. Det direkte oksidative sporet og det fosforylative sporet er to alternative spor, som virker på glukose henholdsvis ekstracellulært (i periplasma) og intracellulært. Et av sporene vil vanligvis dominere, avhengig av fysiologiske betingelser (Lessie og Phibbs, 1984). Organiseringen av *oprB-1* og *-2* i forhold til andre gener indikerer at *oprB-1* og *oprB-2* kan være koregulert med gener involvert i henholdsvis det fosforylative sporet og det direkte oksidative sporet.

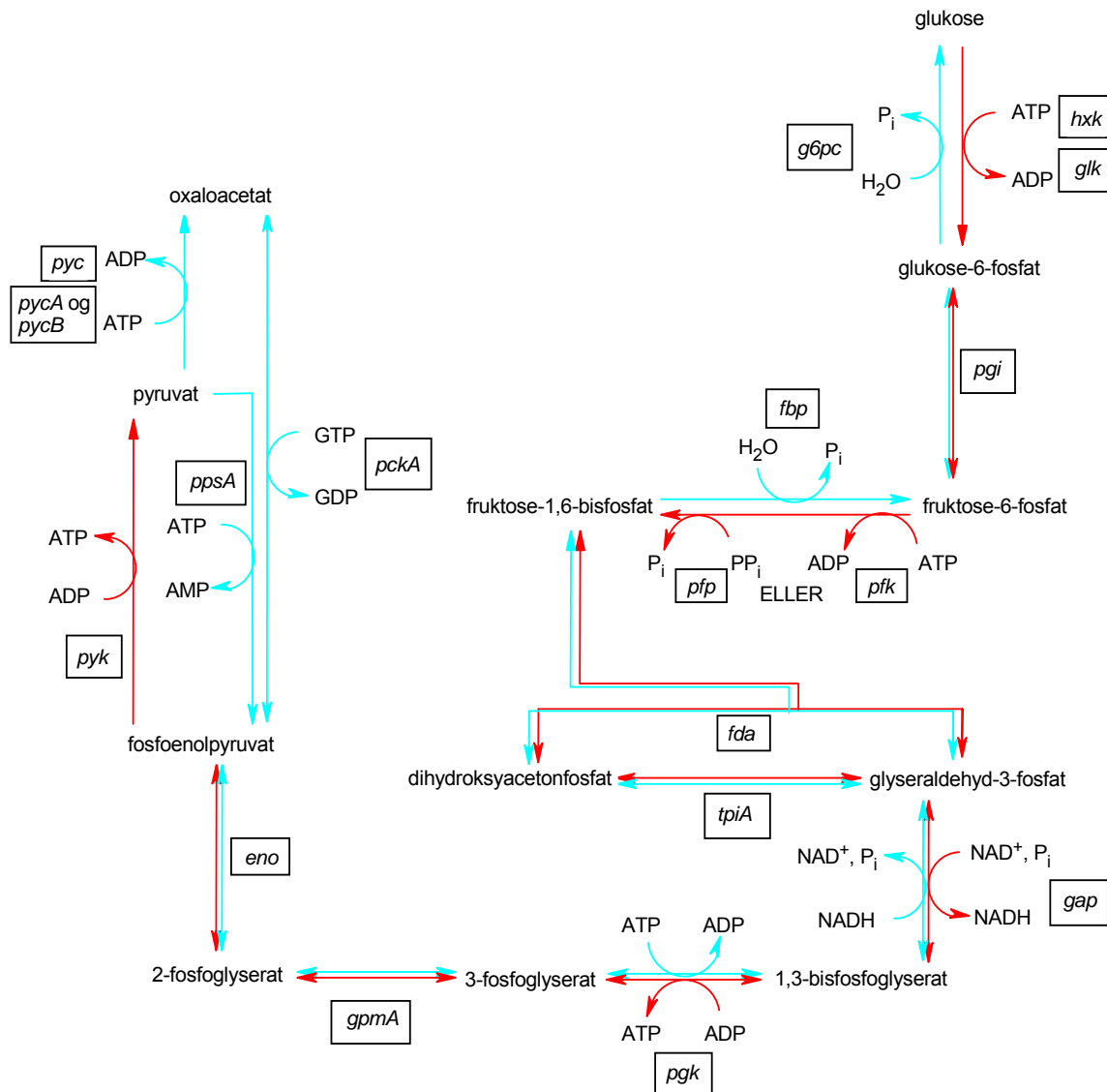


**Figur 3.1:** Organisering av gener for a) glukosespesifikk porin (*oprB-1*) og glukose ABC-transporter (*gltB*, *gltF*, *gltG* og *gltK*), og b) glukosespesifikk porin (*oprB-2*) og glukose dehydrogenase (*gcd*) i et utsnitt av genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

### 3.1.2. Lokalisering av gener for glykolysen og glukoneogenesen

Gener for alle enzymene i glykolysen (Figur 3.2), unntatt *hxx*, *pfk* og *ppf*, ble lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1. Første trinn i glykolysen kan imidlertid katalyseres av både heksokinase (Hxx) og glukokinase, og gen for sistnevnte (*glk*) ble funnet. Pfk og Pfp er fosfofruktokinaser, som katalyserer fosforylering av fruktose-6-fosfat. I de fleste tilfeller er dette trinnet hastighetsbestemmende for glykolysen, og katalyseres av ATP-avhengig fosfofruktokinase (Pfk) (Berg *et al.*, 2002). I noen organismer erstattes Pfk av  $PP_i$ -avhengig fosfofruktokinase (Pfp). Reaksjonen katalysert av Pfp er reversibel, hvilket antagelig gir en annerledes regulering av glykolysen i disse organismene (Mertens, 1991). Mangelen på fosfofruktokinaser indikerer at *P. fluorescens* ikke benytter første del av glykolysen. Disse funnene er i samsvar

med Svegård og Aamodts arbeid (2002), hvor det ble konkludert med at *P. fluorescens* PfO-1 hadde gener for alle enzymene i glykolysen unntatt Pfk. De inkluderte imidlertid ikke Hxk og Pfp i sine undersøkelser, og det ble nå funnet to gener for pyruvat kinase (*pyk* og *pykF*) istedet for ett.



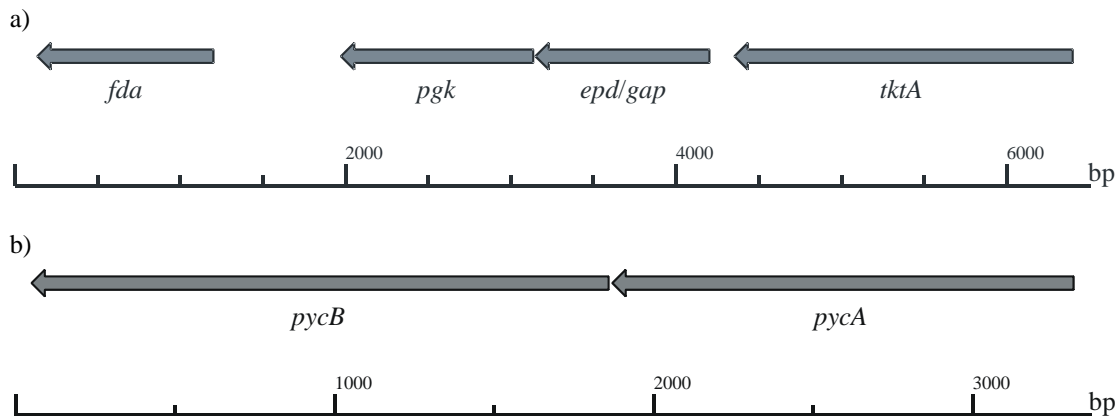
**Figur 3.2:** Oversikt over reaksjonene i glykolysen og glukoneogenesen. Glykolytiske reaksjoner er angitt med røde piler, mens reaksjoner i glukoneogenesen er angitt med lyseblå piler. Figuren angir også genene for enzymene som katalyserer de ulike reaksjonene. Merk at fosforyleringen av fruktose-6-fosfat til fruktose-1,6-bisfosfat kan foregå ved to ulike reaksjoner, hvorav den PP<sub>i</sub>-avhengige reaksjonen er reversibel.

Glukoneogenesen (Figur 3.2) har syv enzymer felles med glykolysen. Av de øvrige enzymene ble det funnet gener for alle unntatt glukose-6-fosfatase (*g6pc*). Glukose-6-fosfatase katalyserer omdanning av glukose-6-fosfat til glukose. Det ble ikke funnet noen alternative spor eller enzymer for denne reaksjonen, og heller ikke noe informasjon om dette enzymet i *Pseudomonas* spp. Så og si alle kjente sekvenser for dette enzymet kom fra dyrevæv, og ingen kom fra bakterier. Flercellede dyr har i stor grad behov for å kunne produsere og distribuere glukose mellom ulike vev, hvilket ikke er tilfelle for bakterier. Antagelig avsluttes glukoneogenesen i *P. fluorescens* ved dannelse av glukose-6-fosfat. Det ble ikke funnet noen kandidater for genet *pyc*, som koder for  $\alpha_4$ -formen av pyruvat karboksylase, men det ble funnet gener for  $(\alpha\beta)_4$ -formen



(*pycA* og *pycB*). Dette er i overensstemmelse med at pyruvat karboksylase fra *P. fluorescens* tidligere er vist å ha regulatoriske egenskaper og molvekt som ligner pyruvat karboksylaser fra *P. citronellolis* og *A. vinelandii* (Milrad de Forchetti og Cazzulo, 1976), da enzymene fra disse organismene er av  $(\alpha\beta)_4$ -typen (Goss *et al.*, 1981; Scrutton og Taylor, 1974; Segura og Espín, 2004).

Resultatene av lokalisering av gener for glykolysen og glukoneogenesen er i samsvar med litteraturen. Bakterier i slekten *Pseudomonas* benytter ED-sporet istedet for glykolysen for nedbrytning av glukose til pyruvat (Lessie og Phibbs, 1984), mens glukoneogenesen er et mer universelt spor for biosyntese av heksoser (Prescott *et al.*, 2002). Man kan dermed forvente å finne genene glykolysen har felles med glukoneogenesen. Glukokinase er ikke en del av glukoneogenesen, men inngår i ED-sporet i tillegg til glykolysen. I ED-sporet dannes dessuten glyseraldehyd-3-fosfat, som brytes ned videre til pyruvat via siste del av glykolysen (Prescott *et al.*, 2002). Man kan dermed også forvente å finne genene for glukokinase og pyruvat kinase. Dette støttes også av at Wood (1955) detekterte glukose-6-fosfat isomerase, fruktosebisfosfat aldolase, glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase og enzymer for konvertering av 3-fosfoglyserat til pyruvat i *P. fluorescens*, men ikke fosfofruktokinase. Wood detekterte heller ikke glukokinase, men glukokinaseaktivitet ble senere påvist i *P. fluorescens* av Eisenberg *et al.* (1974).



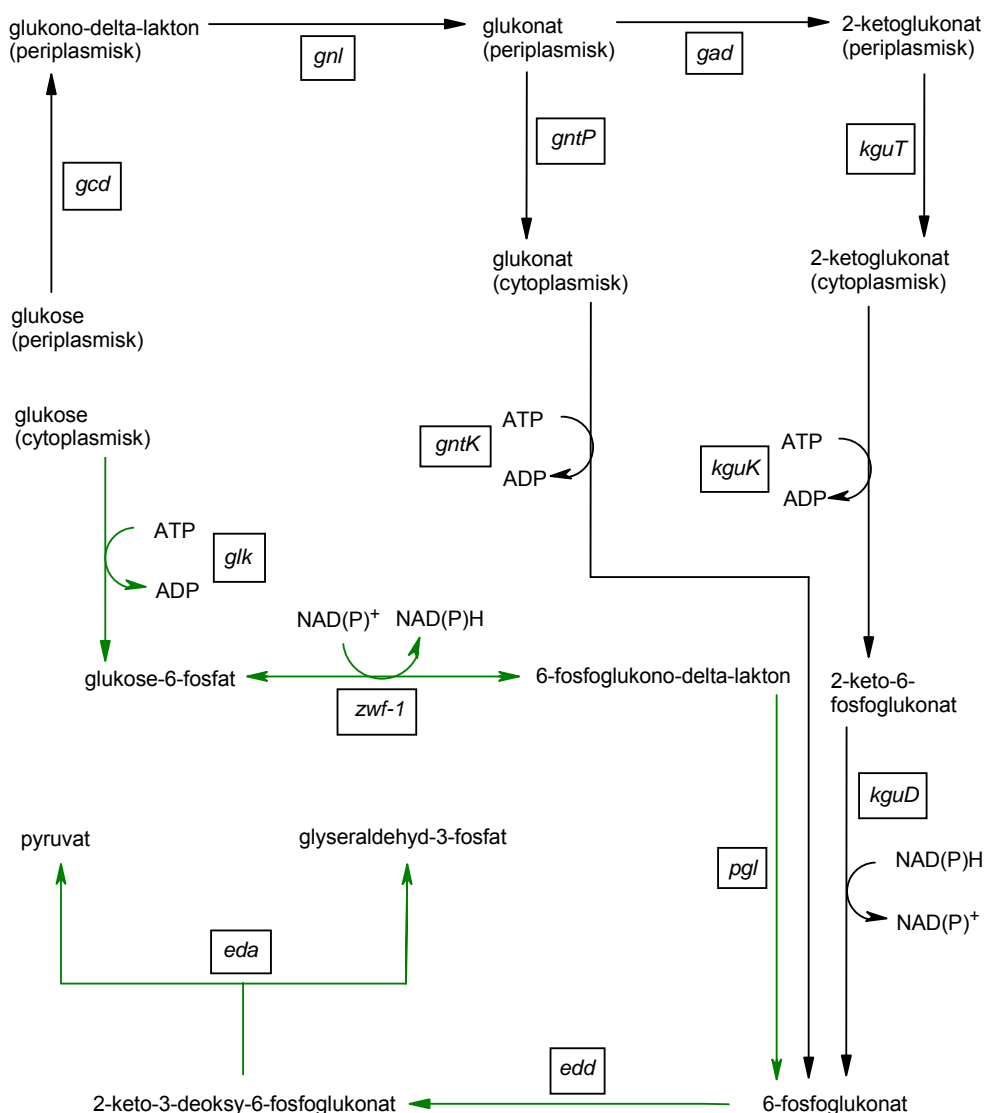
**Figur 3.3:** Organisering av gener for a) fruktosebisfosfat aldolase (*fda*), fosfoglyserat kinase (*pgk*), transketolase (*tktA*) og mulig gen for erytrose-4-fosfat eller glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (*epd/gap*), og b) pyruvat karboksylase (*pycA* og *pycB*) i et utsnitt av genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

Det ble også sett på plasseringen av genene i forhold til hverandre. Genet for fruktosebisfosfat aldolase (*fda*) er plassert nedstrøms for genet for fosfoglyserat kinase (*pgk*), som igjen er lokalisert nedstrøms for genet for transketolase (*tktA*) (Figur 3.3 a). Samme organisering er observert i *A. vinelandii* (Svegården og Aamodt, 2002). I *P. fluorescens* PfO-1 er avstanden mellom *fda* og *pgk* 770 bp, og avstanden mellom *pgk* og *tktA* er 1216 bp. Det ble derfor sett nærmere på mellomrommene mellom disse tre genene. Mellom *tktA* og *pgk* ble det funnet et mulig gen for erytrose-4-fosfat dehydrogenase (*epd*) eller glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (*gap*) (Figur 3.3 a). *fda*, *pgk* og *gap* koder for enzymer i glukoneogenesen/glykolysen, mens transketolase inngår i pentosefosfatsporet. Disse sporene er imidlertid relativt tett knyttet til hverandre. Erytrose-4-fosfat dehydrogenaser virker på erytrose-4-fosfat, som dannes i pentosefosfatsporet. Disse fire genene koder med andre ord for enzymer som ligger nær hverandre i metabolske spor, uavhengig av om det mulige genet mellom *tktA* og *pgk* er *epd* eller *gap*. Det kan altså se ut som disse genene ligger i et operon, iallfall dersom *epd/gap* er et reellt gen. I mellomrommet mellom *fda* og *pgk* ble det funnet to korte orf, men translatererte produkter av disse viser kun likhet med hypotetiske proteiner fra andre *Pseudomonas*-arter. Kodonbruken i begge orf'ene avviker fra

kodonbruk i *P. fluorescens* biovar I (Nakamura *et al.*, 2000), og en av dem gir en aminosyresekvens med mye prolin. Dette kan tyde på at det ikke dreier seg om reelle gener. En lignende organisering av genene i figur 3.3 a og de to orf'ene er observert i *P. aeruginosa*, men her er det i tillegg funnet to korte orf mellom *tktA* og *epd/gap* (Stover *et al.*, 2000).

Genene for pyruvat karboksylase (*pycA* og *pycB*) er plassert rett etter hverandre (Figur 3.3 b). *PycA* og *PycB* er subenheter i holoenzymet pyruvat karboksylase, så det er rimelig å anta at disse to genene inngår i et operon. Samme organisering av *pycA* og *pycB* er også observert i *A. vinelandii* (Segura og Espín, 2004).

### 3.1.3. Lokalisering av gener for Entner-Doudoroff-sporet og det direkte oksidative sporet

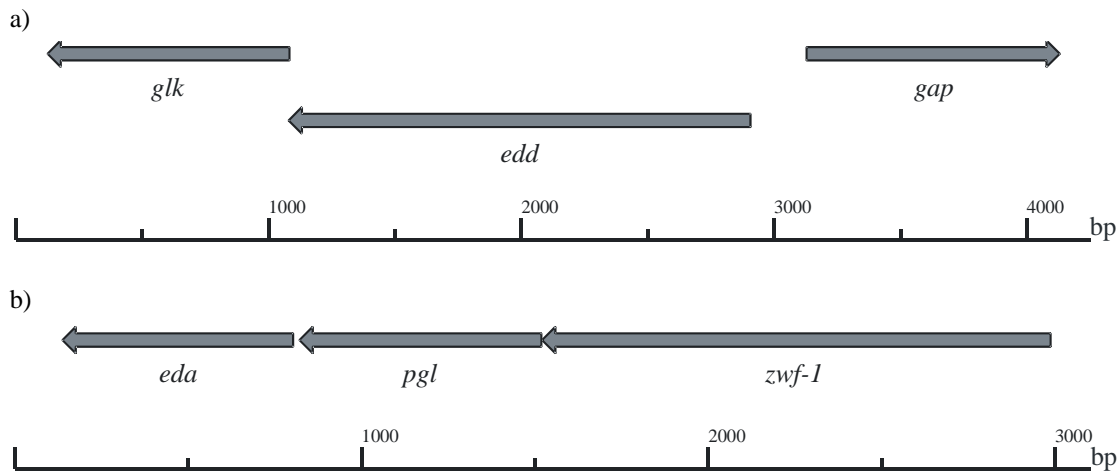


**Figur 3.4:** Oversikt over reaksjonene i Entner-Doudoroff-sporet (inkludert det fosforylative sporet) og det direkte oksidative sporet. Reaksjoner i ED-sporet er angitt med grønne piler, og reaksjoner i det direkte oksidative sporet er angitt med sorte piler. Figuren angir også genene for enzymene som katalyserer de ulike reaksjonene, samt genene for transportproteiner. *Zwf-1* og *Zwf-2* antas å fungere primært i henholdsvis ED-sporet og pentosefosfatsporet, og *zwf-2* er derfor utelatt fra denne figuren.

Gener for alle enzymene i ED-sporet (Figur 3.4) ble funnet i *P. fluorescens* PfO-1, hvilket er i samsvar med resultatene fra Svegård og Aamodt (2002). Det ble imidlertid nå funnet to gener

for glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-1* og *zwf-2*). Dette er i samsvar med resultater fra Lessman *et al.* (1975), som påviste to ulike glukose-6-fosfat dehydrogenaser i *P. fluorescens*. En av disse fungerer primært i ED-sporet, og den andre primært i pentosefosfatsporet. Det ble også funnet gener for alle enzymer og proteiner i det direkte oksidative sporet (Figur 3.4). Dette var som forventet, da pseudomonader konverterer glukose til pyruvat via ED-sporet, men har to spor for å omdanne glukose til 6-fosfoglukonat: det fosforylative sporet og det direkte oksidative sporet (Lessie og Phibbs, 1984). I tillegg er det påvist aktivitet av alle enzymene i figur 3.4 i *P. fluorescens* (Wood og Schwerdt, 1954; Kovachevich og Wood, 1955a; Kovachevich og Wood, 1955b; Narrod og Wood, 1956; Frampton og Wood, 1961; Quay *et al.*, 1972; Eisenberg *et al.*, 1974). Tre mulige gener for glukonat permease (*gntP*) ble funnet.

Plasseringen av genene i genomet tyder på at enkelte av genene i ED-sporet og det direkte oksidative sporet kan være organisert i operon. Genet for glukose dehydrogenase (*gcd*) er lokalisert nedstrøms for et av genene for glukosespesifikk porin (*oprB-2*) (Figur 3.1 b). (Omtalt i kapittel 3.1.1.)



**Figur 3.5:** Organisering av gener for a) glukokinase (*glk*), 6-fosfoglukonat dehydrase (*edd*) og glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (*gap*), og b) KDPG aldolase (*eda*), 6-fosfoglukonolaktonease (*pgl*) og glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-1*) i et utsnitt av genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

Genet for glukokinase (*glk*) er plassert rett nedstrøms for genet for 6-fosfoglukonat dehydrase (*edd*). En tilsvarende organisering av *glk* og *edd* er observert i *A. vinelandii* (Svegården og Aamodt, 2002). I *P. fluorescens* PfO-1 er også gen for glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (*gap*) plassert i nærheten av disse genene, men på motsatt tråd (Figur 3.5 a). Både glukokinase og 6-fosfoglukonat dehydrase inngår i ED-sporet, og på grunnlag av lokaliseringen ser det ut til at disse to genene kan inngå i et operon. *gap* er lokalisert på motsatt tråd, og inngår dermed ikke i et eventuelt operon. Det er likevel mulig at dette genet er regulert i sammenheng med *edd* og *glk*. Glyseraldehyd-3-fosfat dannet i ED-sporet omdannes til pyruvat via nedre del av glykolysen. Første trinn i denne prosessen katalyseres av glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase, og det er dermed ikke usannsynlig at *gap* kan være koregulert med gener involvert i ED-sporet. Tilsvarende organisering av disse tre genene er dessuten observert i *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000), hvor de inngår i et regulon for glukoseutnyttelse (*hex*-regulonet) (Temple *et al.*, 1994).

## Resultater

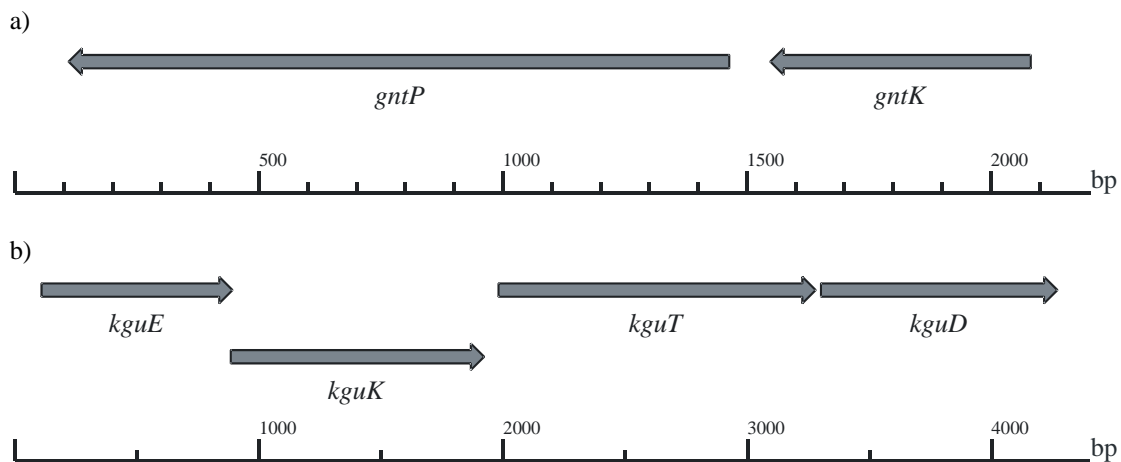
Paer_zwf	-MPDVR-----VLPCTLALFGALGDLALRKLFPALYQLDRENLLHRDTRVLALARDEG	52
Pflu_zwf-1	-MPSIT-----VEPCTFALFGALGDLALRKLFPALYHLDGALLHEDTRIALAREAG	52
Pflu_zwf-2	MTHTIRKSKAEPAPPTTLFLFGAHGDLVKRLLMPALYNLSRDGLLDDGLRIVGVDHNAI	60
	: . * *: **** * . * *:****: . ** . * : : : :	
Paer_zwf	APAHLATLEQRLRLAVP-----AKEWDDVWQRFRRERLDYLSMDFLDPQAYVGLREAV	106
Pflu_zwf-1	TEQQHLAFIAAELRRYV-----GKELDEAVAERFLARLTYLHVDFLKAEDYVALAELA	105
Pflu_zwf-2	TDEAFAQKLEDFIRTEVAAKVGKGDQMLDPALWAKLAKGISYVQGDFLDDSTYSALAAKI	120
	: . : : * * . : * . : : : * : * * . . * . *	
Paer_zwf	DDELP--LVAYFATPASVFGGICENLAAAGLAERT-----RVVLEKPIGHDLLESSREVNE	159
Pflu_zwf-1	GSTQR--MIAFYFATPAAVYGAIENLANVGLAENT-----RVVLEKPIGSDLESSRKVND	158
Pflu_zwf-2	ADSGTGNNAV FYLATAPRFFSEVVRRLGSAGLLEETAEAFRRVVEKPFSGDLQTAEALNA	180
	. : * : * * . . : . : . * . * * * * : * * : * * : : . : *	
Paer_zwf	AVARFFPESRIYRIDHYLGKETVQNLIARFANSLFETQWNQNHISHVEITVAEKVGI EG	219
Pflu_zwf-1	AVAQFFPENRTYRIDHYLGKETVQNLIARFANSLFETQWNQNYISHVEITVAEKVGI EG	218
Pflu_zwf-2	CLLKVMSEKQIYRIDHYLGKETVQNILVSFRSLSLFEAFWNNHYIDHVQITAAETVGVET	240
	. : : . * . : * * * * * * * * * * : . * : * * * * : * * : : * . * : * * . * * : *	
Paer_zwf	RWGYFDQAGQLRDMVQNHLQLLCLIAMDPPSADLSADSIKDEKVKVLRALRLEPIPAEQLAS	279
Pflu_zwf-1	RWGYFDKAGQLRDMIQNHLQLLCLIAMDPPADLSADSIKDEKVKVLRALRLEPIPAEQLAS	278
Pflu_zwf-2	RGSFYEHTGALRDMVPHLFLQLLAMVAMEPPAAFADAVRGEKAKVVGAIKRWPTTEEARE	300
	* . : : : : * * * * : * * : * * . : : * * * * : . * * : * . * . * : * : * . *	
Paer_zwf	RVVRGQYTAGFSDGKAVPGYLEEEHANRSDAETFVALRVDIRNWRWVGVPFYLRRTGKRM	339
Pflu_zwf-1	QVVRGQYIAGHSEGKSVPGYLEEPNSNAQSDTETTFVALRADIRNWRWAGVPFYLRRTGKRM	338
Pflu_zwf-2	NSVRGQYSAGEVAGKPVSGYRDENNVPDSTTETTYVALKVMIDNWRWVGVPFYLRRTGKRM	360
	. * * * * * * * * * * . * * * : * : . : * : * * * * : . * * * * * * * * * * *	
Paer_zwf	PQKLSQIVIHFKEPHYIFAP-EQRSLISNRLIIRLQPDEGISLQVMTKDQGLGKGMQLR	398
Pflu_zwf-1	PQKLSQIVIHFKEPHYIFAP-EQRLQISNKLIRLQPDEGISLRVMTKEQGLDKGMQLR	397
Pflu_zwf-2	SVRDTEIVICFKPAPYAQFRDTEVDELQPTYLRIQIQPNEGMMWFDLLAKRPGPALNMAN-	419
	. : : * * * * * . : . * * . . * * : * * * * * : : : : * * . *	
Paer_zwf	TGPLQLSFS-ETYHAARIPDAYERLLEVTQGNQYLFVRKDEVEFAWKWCDQLIAGWERL	457
Pflu_zwf-1	SGPLQLNFS-DTWR SARIPDAYERLLEVMNGNQNLFVRKDEIEAAWKWCDQLIAGWKKS	456
Pflu_zwf-2	---IELGFAYKDFEFEMQPSTGYETLIYDCLTGDQTLFQRADNIENGWRAVQPFLEDAWQQ-	475
	: . : : * . * : . : . * * : : * : * * * * : * * . * : : : . * : :	
Paer_zwf	SEAPKPYAGSWGPPASVALVARDGRSWYGDF	489
Pflu_zwf-1	GDAPKPYAAGSWGPMSSIALITRDGRSWYGD	488
Pflu_zwf-2	DASVQTYAAGEDGPKAADDLLTRDGRVWHGLG	507
	. : . * . * . * * : : * : * * * * : * * :	

**Figur 3.6:** Sekvenssammenligning av translasjonsprodukter av *P. aeruginosa* PAO1 *zwf* (Stover *et al.*, 2000) og *P. fluorescens* PfO-1 *zwf-1* og *zwf-2*. Sammenligning ble gjort ved hjelp av CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Konsensusymboler: \* angir identisk aminosyre i alle sekvenser, : indikerer konserverte substitusjoner og . indikerer semi-konserverte substitusjoner.

Et av genene for glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-1*), og genene for 6-fosfoglukonolaktose (p<sub>gl</sub>) og KDPG aldolase (*eda*) er plassert rett etter hverandre (Figur 3.5 b). Samme organisering av disse genene forekommer i *P. aeruginosa* (Hager *et al.*, 2000; Stover *et al.*, 2000) og *P. putida* (Nelson *et al.*, 2002; Petruschka *et al.*, 2002). I *P. aeruginosa* kalles imidlertid genet for glukose-6-fosfat dehydrogenase *zwf*, da det bare er funnet ett gen for dette enzymet i denne arten (Stover *et al.*, 2000). Dette er i overensstemmelse med at pentosefosfatsporet ikke ser ut til å spille noen rolle i metabolisme av 6-fosfoglukonat i *P. aeruginosa*, på grunn av mangel på 6-fosfoglukonat dehydrogenase (Lessie og Phibbs, 1984). Glukose-6-fosfat dehydrogenase, 6-fosfoglukonolaktose og KDPG aldolase opptrer etter hverandre i ED-sporet, men med 6-fosfoglukonat dehydrase mellom 6-fosfoglukonolaktose og KDPG aldolase. Det er derfor rimelig å anta at disse tre genene er organisert i et operon. *zwf-1*, *p<sub>gl</sub>* og *eda* er vist å danne

et operon i *P. putida* (Petruschka *et al.*, 2002). De tilsvarende genene danner antagelig også et operon i *P. aeruginosa*, hvor det mulige operonet inngår i *hex*-regulonet (Hager *et al.*, 2000). Organiseringen av disse genene i *P. fluorescens* PfO-1 tyder på at *zwf-1* koder for glukose-6-fosfat dehydrogenasen som fungerer primært i ED-sporet. Dette støttes av at translasjonsprodukt av *P. aeruginosa zwf* (Stover *et al.*, 2000) viser større likhet med translasjonsprodukt av *P. fluorescens* PfO-1 *zwf-1* enn produkt av *zwf-2* (Figur 3.6).

Et av genene for glukonat/H<sup>+</sup> symporter (*gntP*) er plassert nedstrøms for genet for glukonat kinase (*gntK*) (Figur 3.7 a). Samme organisering er observert i *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000) og *E. coli* (Izu *et al.*, 1997). Glukonat transporteres inn i cellen via en glukonat/H<sup>+</sup> symporter, og fosforyles deretter av glukonat kinase. Ut fra nærliggende plassering og funksjon er det sannsynlig at *gntP* og *gntK* er koregulert i *P. fluorescens*. I *E. coli* inngår de tilsvarende genene i et operon for glukonatutnyttelse (Izu *et al.*, 1997).

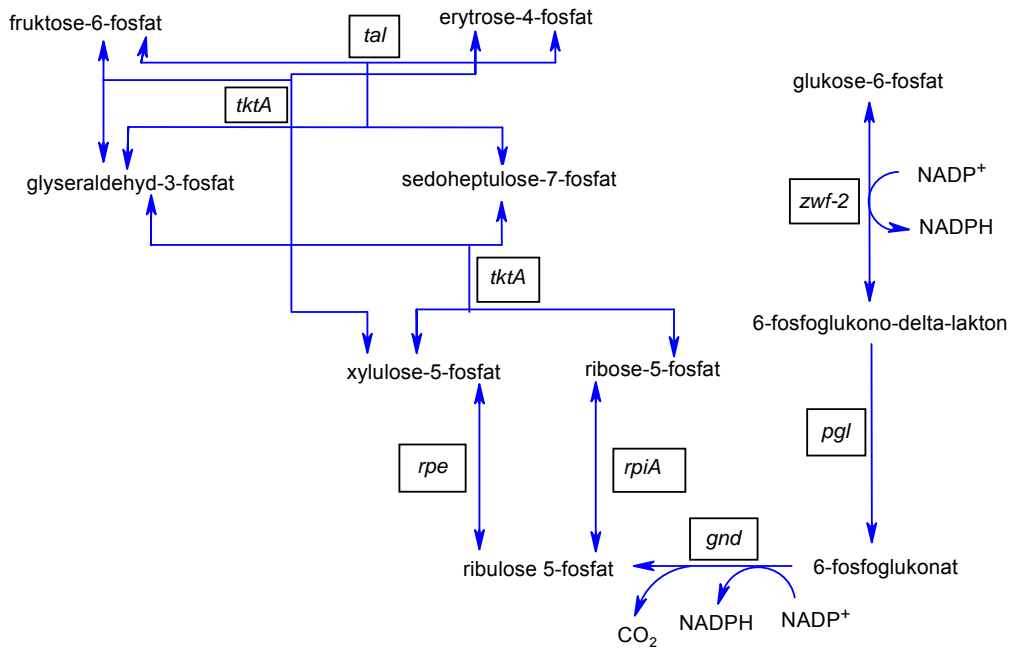


**Figur 3.7:** Organisering av gener for **a)** glukonat/H<sup>+</sup> symporter (*gntP*) og glukonat kinase (*gntK*), og **b)** 2-ketoglukonat permease (*kguT*), 2-ketoglukonat kinase (*kguK*), 2-keto-6-fosfoglukonat reduktase (*kguD*) og hypotetisk protein (*kguE*) i et utsnitt av genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

I *P. aeruginosa* er det vist at genene *kguE*, *kguK*, *kguT* og *kguD* inngår i et operon for utnyttelse av 2-ketoglukonat. De enkelte genproduktene i operonet ble ikke biokjemisk karakterisert. Ut fra sekvenslikhet med kjente proteiner ble det imidlertid konkludert med at *kguK*, *kguT* og *kguD* antagelig koder for henholdsvis 2-ketoglukonat kinase, 2-ketoglukonat transporter og 2-keto-6-fosfoglukonat reduktase. Det ble ikke foreslått en funksjon for KguE i 2-ketoglukonatutnyttelse (Swanson *et al.*, 2000). Homologer av disse fire genene har samme organisering i *P. fluorescens* PfO-1 (Figur 3.7 b). Det er derfor rimelig å anta at disse genene også danner et operon for utnyttelse av 2-ketoglukonat i *P. fluorescens*.

#### 3.1.4. Lokalisering av gener for pentosefosfatsporet

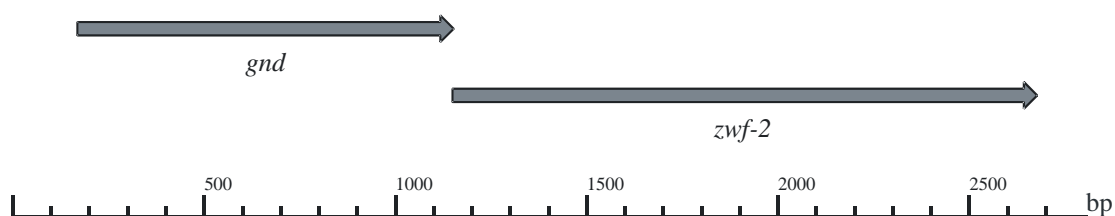
Gener for alle enzymer i pentosefosfatsporet (Figur 3.8) ble funnet med god sikkerhet i genomet til *P. fluorescens* PfO-1. Dette er i samsvar med resultatene fra Svegården og Aamodt (2002), med unntak av gen for 6-fosfoglukonat dehydrogenase (*gnd*), som de kun fant med stor usikkerhet. Som nevnt i kapittel 3.1.3. ble det nå i tillegg funnet to gener for glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-1* og *zwf-2*).



**Figur 3.8:** Oversikt over reaksjonene i pentosefosfat. Figuren angir også genene for enzymene som katalyserer de ulike reaksjonene. *Zwf-1* og *Zwf-2* antas å fungere primært i henholdsvis ED-sporet og pentosefosfatsporet, og *zwf-1* er derfor utelatt fra denne figuren.

Disse funnene stemmer overens med det som er kjent fra litteraturen. I en del pseudomonader kataboliseres noe 6-fosfoglukonat via pentosefosfatsporet istedet for ED-sporet (Lessie og Phibbs, 1984). Videre påviste Wood og Schwerdt (1954) to spor for utnyttelse av 6-fosfoglukonat i *P. fluorescens*, hvor det ene ble katalysert av 6-fosfoglukonat dehydrogenase og det andre førte til dannelse pyruvat og triosefosfat. 6-Fosfoglukonat dehydrogenase aktivitet i *P. fluorescens* ble også påvist av Stournaras *et al.* (1983). (Pentosefosfatsporet har de innledende enzymene felles med ED-sporet, og 6-fosfoglukonat dehydrogenase katalyserer det første trinnet som er unikt for pentosefosfatsporet.)

Et av genene for glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-2*) er plassert rett nedstrøms for gen for 6-fosfoglukonat dehydrogenase (*gnd*) (Figur 3.9). Denne organiseringen tyder på at *gnd* og *zwf-2* er organisert i et operon, og at *zwf-2* koder for glukose-6-fosfat dehydrogenasen som fungerer primært i pentosefosfatsporet. Tilsvarende organisering av disse genene er også observert i *P. putida* (Nelson *et al.*, 2002).



**Figur 3.9:** Organisering av gener for 6-fosfoglukonat dehydrogenase (*gnd*) og glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-2*) i et utsnitt av genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

Genet for transketolase (*tktA*) er plassert oppstrøms for gener for fosfoglyserat kinase (*pgk*) og fruktosebisfosfat aldolase (*fda*) (Figur 3.3), som inngår i glykolysen/glukoneogenesen. (Omtalt i kapittel 3.1.2.)

### 3.1.5. Oppsummering

Resultatene av kartleggingsarbeidet tyder på at *P. fluorescens* har de nødvendige genene for å benytte glukoneogenesen, Entner-Doudoroff-sporet, det direkte oksidative sporet, pentosefosfatsporet og siste del av glykolysen, samt ta opp glukose ved hjelp av poriner og en ABC-transporter. Dette er i samsvar med litteraturen. En oversikt over sentral glukosemetabolisme i *P. fluorescens*, basert på disse resultatene, er gitt i figur 3.10.

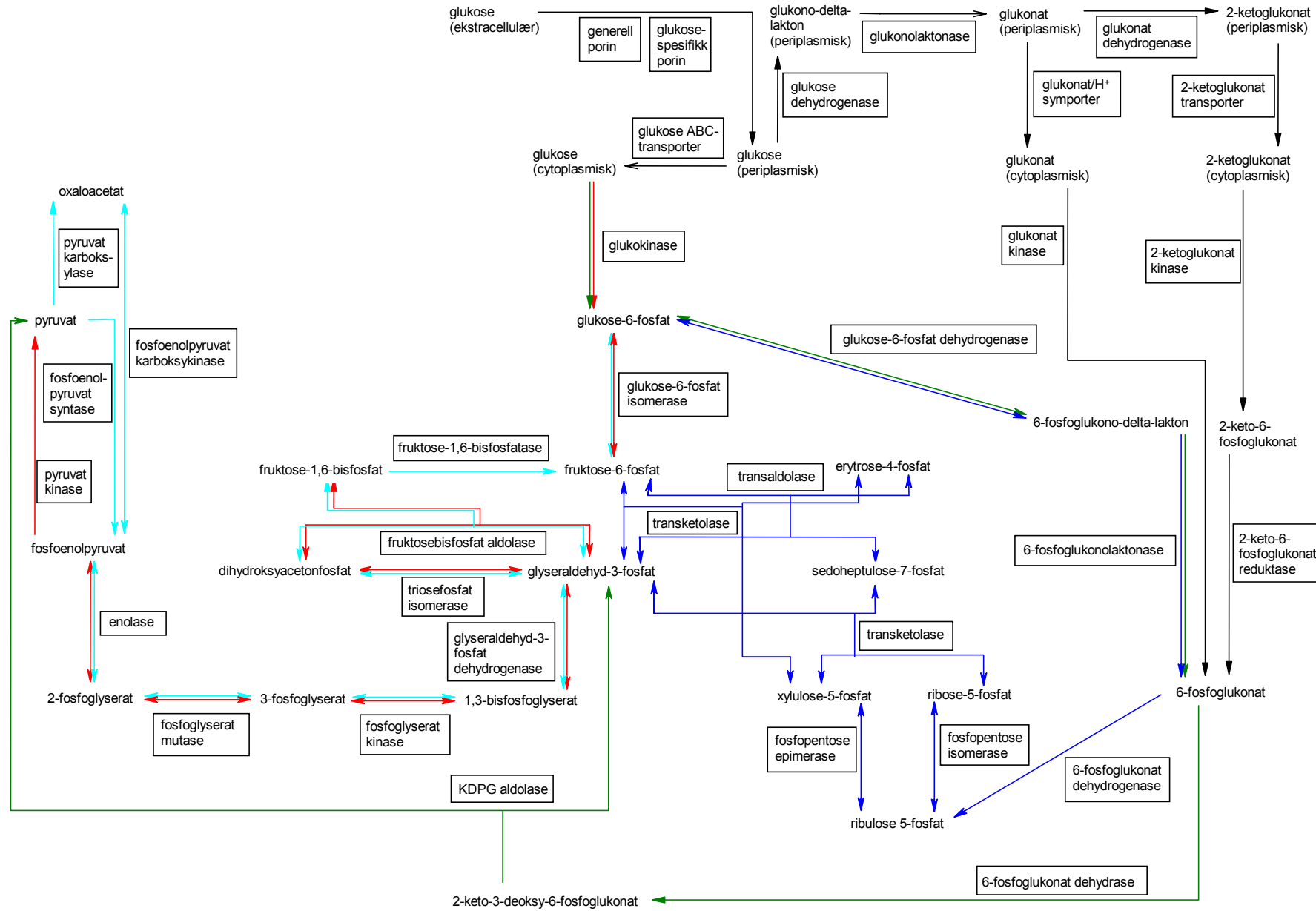
### 3.2. Bakgrunn for eksperimentelt arbeid

Bakteriell biosyntese av alginat (Figur 1.8) er koblet til den sentrale glukosemetabolismen (Figur 1.4 og 3.10) via fruktose-6-fosfat. I *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* er det vist at omdanning av glukose til fruktose-6-fosfat i forkant av alginatsyntese primært foregår ved nedbryting til glyseraldehyd-3-fosfat i ED-sporet, etterfulgt av fruktose-6-fosfat-syntese via glukoneogenesen (Lynn og Sokatch, 1984; Beale og Foster, 1996). Det direkte oksidative sporet og ED-sporet kan ses som omveier for konvertering av glukose til fruktose-6-fosfat, i forhold til direkte konvertering av glukose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat katalysert av glukose-6-fosfat isomerase. Inaktivering av *gcd*, *zwf-1* eller *zwf-2* kunne tenkes å føre til at mer glukose kanaliseres til direkte konvertering til fruktose-6-fosfat, hvilket muligens kan føre til at mer fruktose-6-fosfat blir raskere tilgjengelig for alginatproduksjon. Direkte konvertering kan dessuten tenkes å gi bedre utnyttelse av glukose, med tanke på alginatsyntese, da splittingen til trioser fører til at en del pyruvat kanaliseres inn i sitronsyresyklusen fremfor glukoneogenesen.

I samråd med veiledere, og med basis i resultatene fra kartleggingsarbeidet, ble det bestemt at det skulle forsøkes å slå ut genene for glukose dehydrogenase (*gcd*) og glukose-6-fosfat dehydrogenase (*zwf-1* og *zwf-2*) i *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201. I tillegg skulle genet for glukose-6-fosfat isomerase (*pgi*) klones inn i en plasmidvektor, med tanke på mulig overuttrykk. Målet med dette ville også være å øke den direkte konverteringen av glukose til fruktose-6-fosfat.

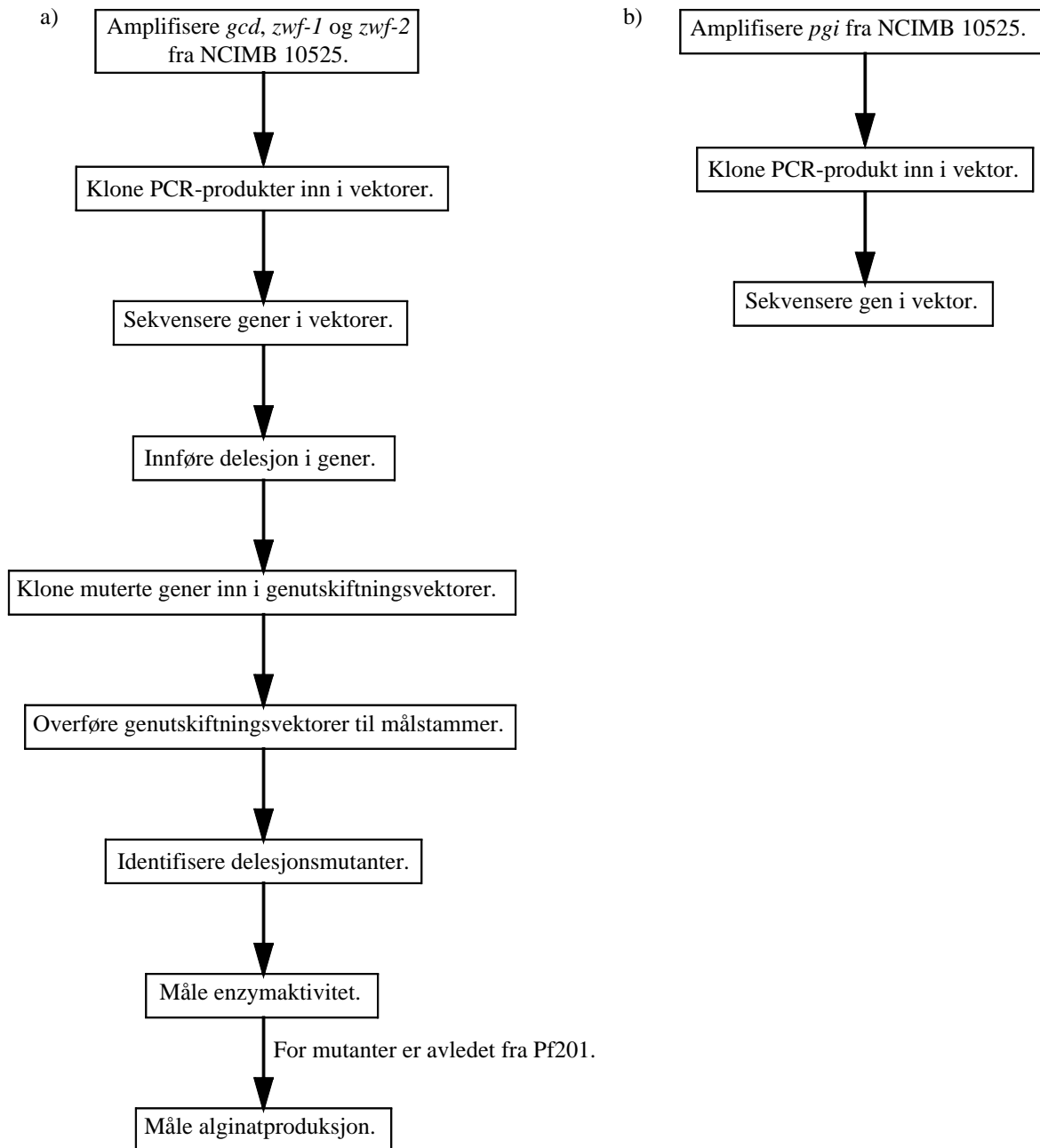
Strategien for å slå ut *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* gikk ut på å lage muterte utgaver av disse genene, hvor en deleksjon var innført, og deretter erstatte villtypegenet i bakterienes kromosom med den muterte utgaven. Da alle disse tre genene muligens er organisert i operon med andre gener (Figur 3.1 b, 3.5 b og 3.9) ble det bestemt at deleksjonene skulle være i ramme, for å minske faren for at øvrige gener i operonet ble påvirket av genutskiftningen. Inaktivering kunne verifiseres ved å måle aktiviteten til de aktuelle enzymene i deleksjonsmutantene, og for mutanter avledet fra alginatoverprodusenten Pf201 kunne eventuell innvirkning på alginatproduksjon måles direkte. Figur 3.11 viser flytskjema for utvikling og testing av deleksjonsmutanter, og for konstruksjon av plasmidvektor inneholdende *pgi*.

*P. fluorescens* NCIMB 10525 er mer lik *P. fluorescens* SBW25 enn *P. fluorescens* PfO-1 (Helga Ertesvåg, [pers. med.]). Det var derfor ønskelig å ta utgangspunkt i sekvenser fra SBW25 ved design av primere og lokalisering av aktuelle kuttsteder for restriksjonsendonukleaser. For å finne de tilsvarende sekvensene i SBW25 ble det derfor gjennomført BLAST-søk med PfO-1 *gcd*, *zwf-1*, *zwf-2* og *pgi* mot genomsekvensen til SBW25.



**Figur 3.10:** Oversikt over den sentrale glukosemetabolismen i *P. fluorescens*. Reaksjoner i glykolysen er angitt ved røde piler, glukoneogenesen ved lyseblå piler, Entner-Doudoroff-sporet (inkludert det fosforylative sporet) ved grønne piler, glukoseopptak og det direkte oksidative sporet ved sorte piler, og pentosefosfatsporet ved blå piler.



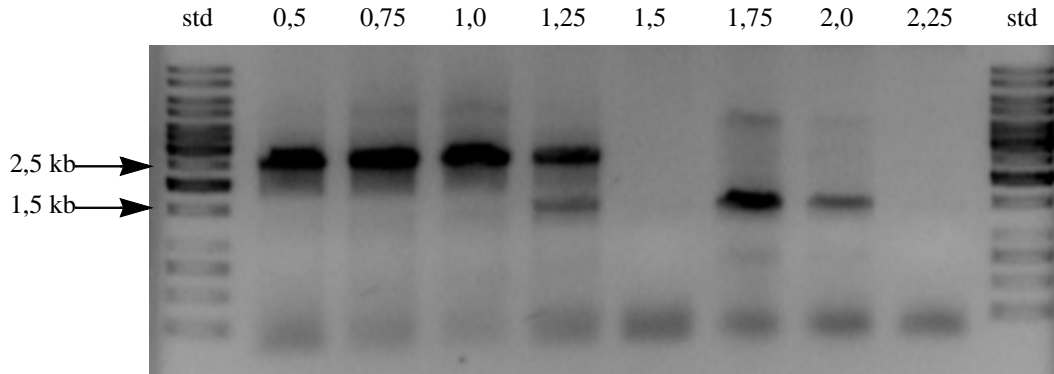


**Figur 3.11:** Flytskjema over trinnene for a) utvikling og testing av delesjonsmutanter, b) kloning og sekvensering av *pgi*.

### 3.3. Optimalisering av PCR-reaksjon

Utbytte og spesifisitet for en PCR-reaksjon avhenger av en rekke faktorer, hvorav de to mest fremtredende er hybridiseringstemperatur og magnesiumkonsentrasjon (Se kapittel 2.5.2.). Det kan derfor være nødvendig å optimalisere reaksjonsbetingelsene med hensyn på en eller flere av disse faktorene. PCR med primerparene *gcd*fwd/-rev, *zwf1*fwd/-rev, *zwf2*fwd/-rev og *pgi*fwd/-rev (Se kapittel 2.3.) ble først testet med hybridiseringstemperatur 55°C og 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> i reaksjonsblandingen. Hybridiseringstemperaturen ble satt ut fra primernes beregnede smeltepunktstemperaturer. 1,5 mM Mg<sup>2+</sup> er anbefalt startkonsentrasjon for Expand High Fidelity PCR System (Roche). PCR med primerparene *zwf1*fwd/-rev, *zwf2*fwd/-rev og *pgi*fwd/-rev ga stabil og reproducerbar amplifisering av henholdsvis *zwf-1*, *zwf-2* og *pgi* ved disse betingelsene.

PCR med primerpar *gcd*fwd/-rev ga ustabil og dårlig utbytte av *gcd* ved de ovennevnte betingelsene, og det ble observert uspesifikk priming. Etter bytte av primerleverandør (Se kapittel 2.3.) og optimalisering av hybridiseringstemperatur og  $Mg^{2+}$ -konsentrasjon (Figur 3.12) ga også dette primerparet stabilt og reproducerbart utbytte av det ønskede fragmentet (*gcd*). Hybridiseringstemperaturen på 55°C ble beholdt, men  $Mg^{2+}$ -konsentrasjonen ble senket til 0,5 mM ved PCR med primerpar *gcd*fwd/-rev.

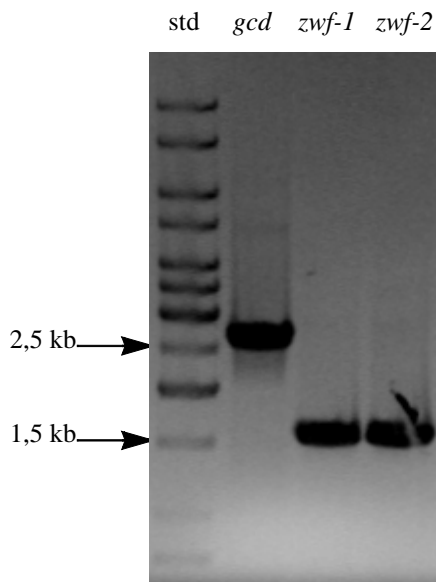


**Figur 3.12:** Optimalisering av  $Mg^{2+}$ -konsentrasjon ved PCR med primerpar *gcd*fwd/-rev (hybridiseringstemperatur 55°C).  $MgCl_2$ -konsentrasjon (mM) benyttet i de ulike prøvene er oppgitt over brønnene. Ønsket fragment har en størrelse på 2,6 kb.

### 3.4. Kloning av *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* inn i vektorer

Genene *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* ble amplifisert og klonet inn i vektorer, slik at det kunne lages muterte genutgaver ved genetisk manipulering.

#### 3.4.1. Amplifisering av DNA-fragmenter fra *P. fluorescens* NCIMB 10525



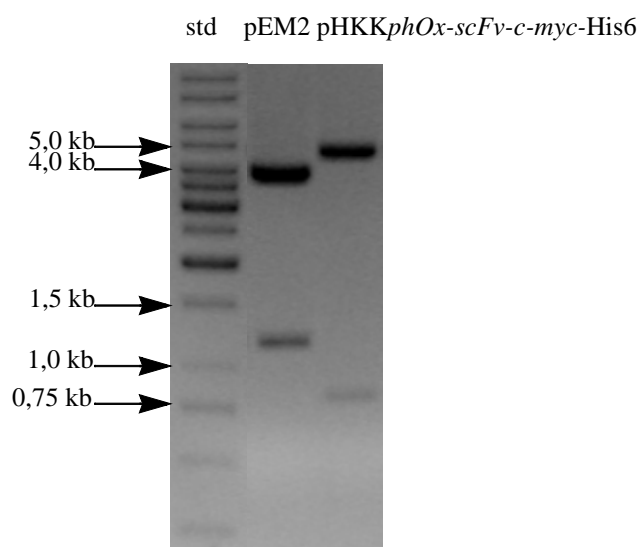
**Figur 3.13:** PCR-produktene *gcd* (2,6 kb), *zwf-1* (1,5 kb) og *zwf-2* (1,6 kb) separert ved gelelektroforese. Forventede fragmentstørrelser gitt i parentes.

DNA-fragmenter inneholdende genene *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* ble amplifisert fra *P. fluorescens* NCIMB 10525 ved hjelp av primerparene *gcd*fwd/-rev, *zwf1*fwd/-rev og *zwf2*fwd/-rev (Se

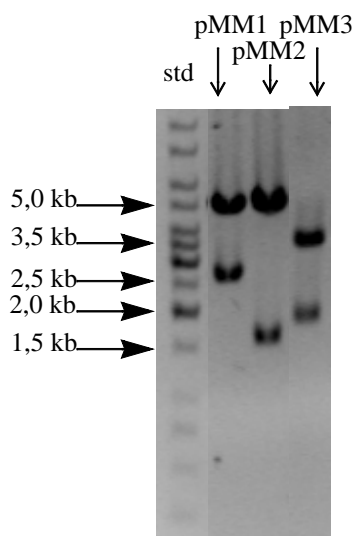
kapittel 2.3.). Ved amplifisering av *gcd* ble det benyttet en  $Mg^{2+}$ -konsentrasjon på 0,5 mM. De forventede fragmentstørrelsene var henholdsvis 2601 bp, 1538 bp og 1559 bp. PCR-produktene ble analysert ved gelelektroforese (Figur 3.13), for å verifisere at amplifisering av de ønskede fragmentene hadde lyktes. Hver av prøvene ga bånd av forventet størrelse.

### 3.4.2. Konstruksjon av plasmider inneholdende *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2*

Plasmidene pEM2 og pHKK*phOx-scFv-c-myc*-His6 ble i dette arbeidet benyttet som generelle kloningsvektorer. Andre egenskaper enn genet for ampicillin-resistens og evnen til å replikere var derfor ikke relevante. De ovennevnte plasmidene og PCR-produktene *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* ble kuttet med restriksjonsenzymene *NdeI* og *NotI*. Kuttete plasmid ble separert ved gelelektroforese (Figur 3.14). Begge plasmidene viste bånd av forventet størrelse, og fragmentene på 3,9 kb og 4,8 kb ble ekstrahert fra gelen.



**Figur 3.14:** *NdeI-NotI*-kuttet pEM2 (3,9 kb + 1,2 kb) og pHKK*phOx-scFv-c-myc*-His6 (4,8 kb + 0,8 kb) separert ved gelelektroforese. Forventede fragmentstørrelser er gitt i parentes.



**Figur 3.15:** Gelbilde fra restriksjonsanalyse av pMM1 (4,8 kb + 2,6 kb) og pMM2 (4,8 kb + 1,5 kb) (kuttet med *NdeI-NotI*) og pMM3 (3,6 kb + 1,8 kb) (kuttet med *NcoI*). Forventede fragmentstørrelser er gitt i parentes.

Kuttet *gcd* og *zwf-2* ble ligert med 4,8 kb fragmentet fra pHKK*phOx-scFv-c-myc*-His6, for å gi

henholdsvis plasmidene pMM1 og pMM2. Kuttet *zwf-1* ble ligert med 3,9 kb fragmentet fra pEM2, for å gi plasmidet pMM3. Ligeringsblandingene ble transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1, og transformantene ble selektert på LA med Ap.

Tre kolonier fra hver av de tre transformeringene ble dyrket opp for plasmidisolering. Isolerte plasmider ble undersøkt ved restriksjonskutting og gelelektroforese, for å identifisere transformanter som inneholdt de korrekte konstruktene. For hver transformering ble ett plasmid som ga de forventede fragmentene (Figur 3.15) valgt ut. Disse ble benyttet for videre arbeid.

### 3.5. Sekvensering av *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2*

I forbindelse med PCR-amplifisering kan det oppstå mutasjoner i enkelte av produktene. For å sikre at plasmidene som ble valgt ut for videre arbeid ikke inneholdt mutasjoner som kunne være til hindring, ble *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* i plasmidene pMM1, pMM2 og pMM3 sekvensert. Da villtypesekvensen til disse genene i *P. fluorescens* NCIMB 10525 ikke er kjent ble også PCR-produktene med disse genene sekvensert.

I *gcd* i pMM1 ble det funnet en punktmutasjon i posisjon 1424 (nummerering fra NCIMB 10525 PCR-produkt), hvor T var erstattet med C. Denne mutasjonen endrer kodon for valin (GTG) til kodon for alanin (GCG). Mutasjonen lå inne i området som skulle fjernes for å innføre en delesjon, og påvirket ikke restriksjonssetene det var planlagt å benytte. Dette plasmidet ble derfor likevel benyttet for videre arbeid.

I *zwf-1* i pMM3 ble det funnet en punktmutasjon i posisjon 276 (nummerering fra NCIMB 10525 PCR-produkt), hvor C var erstattet med T. Denne mutasjonen endrer kodonet CAC til CAT. Begge disse koder for histidin, og mutasjonen påvirket ikke restriksjonssetene det var planlagt å benytte. Dette plasmidet ble derfor likevel benyttet for videre arbeid.

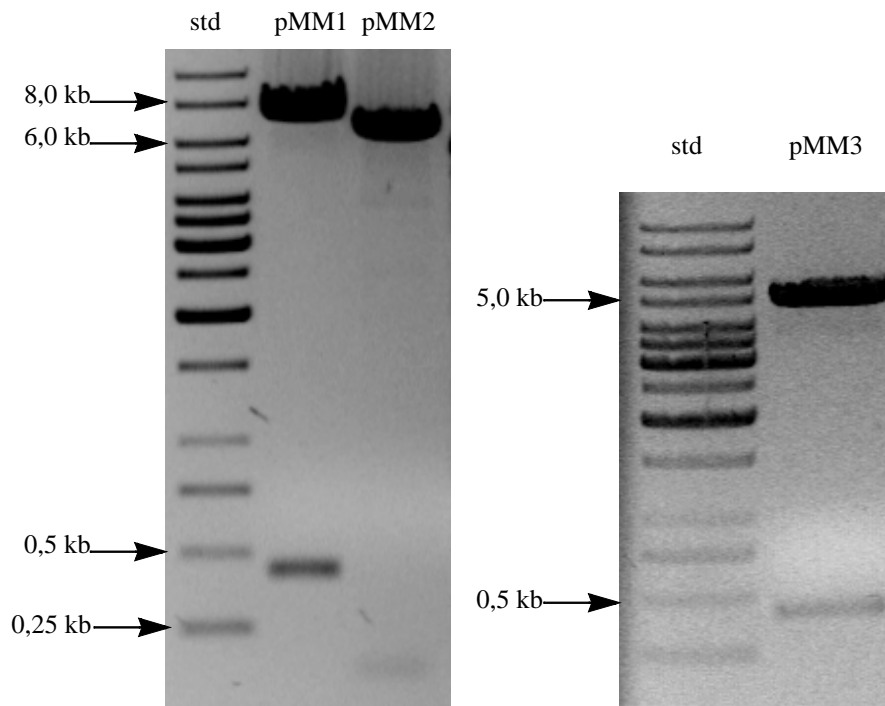
I *zwf-2* i pMM2 ble det ikke funnet noen mutasjoner.

NCIMB 10525 *gcd*-, *zwf-1*- og *zwf-2*-sekvensene ble også sammenlignet med tilsvarende sekvenser fra SBW25. Det ble observert noen forskjeller mellom sekvensene fra SBW25 og NCIMB 10525, men disse forskjellene påvirket ikke restriksjonssetene det var planlagt å benytte. Sammenligning av sekvensene fra *P. fluorescens* SBW25, NCIMB 10525 og plasmider er gitt i bilag 5.

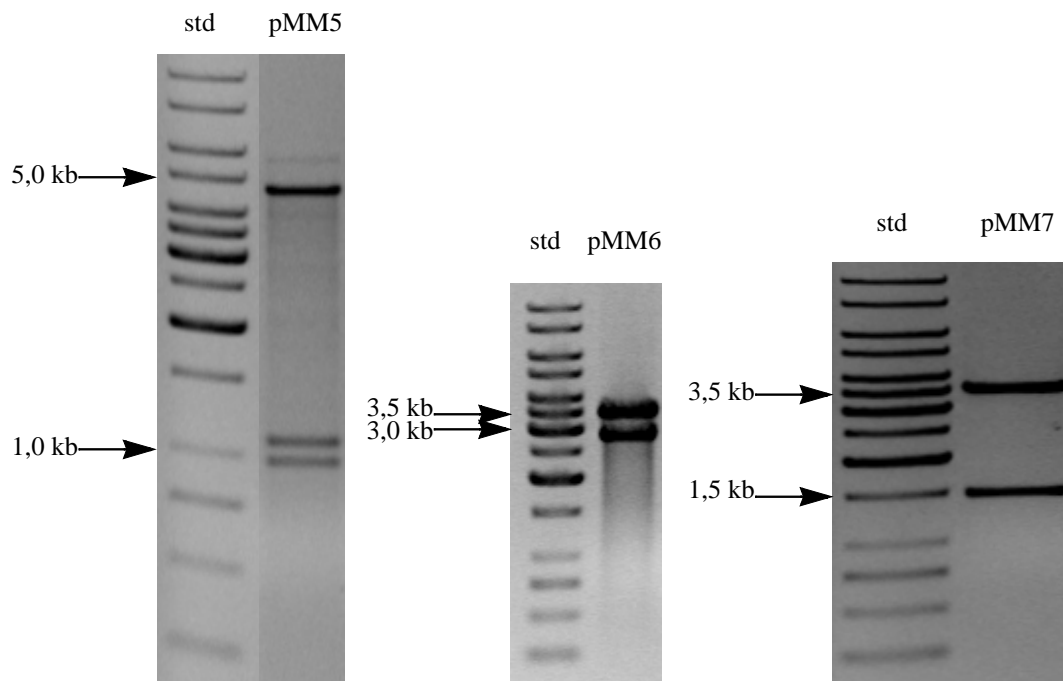
### 3.6. Innføring av delesjoner i *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2*

Det ble innført delesjoner i *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* for å kunne inaktivere disse genene. Delesjonene ble innført ved å kutte ut et fragment fra hver av genene i pMM1, pMM2 og pMM3, og deretter religere vektoren uten dette fragmentet. Kuttete plasmid ble separert ved gelelektroforese (Figur 3.16). Alle plasmidene ga bånd av forventet størrelse. Fragmentene på 6,9 kb, 6,2 kb og 5,0 kb ble ekstrahert fra gelen og religert, for å gi henholdsvis pMM5, pMM6 og pMM7. Ligeringsblandingene ble transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1, og transformantene ble selektert på LA med Ap.

Tre kolonier fra hver av de tre transformeringene ble dyrket opp for plasmidisolering. Isolerte plasmider ble undersøkt ved restriksjonskutting og gelelektroforese, for å identifisere transformanter som inneholdt de korrekte konstruktene. For hver transformering ble ett plasmid som ga de forventede fragmentene (Figur 3.17) valgt ut. Disse ble benyttet for videre arbeid.



**Figur 3.16:** *PciI*-kuttet pMM1 (6,9 kb + 0,4 kb), *BstBI*-kuttet pMM2 (6,2 kb + 0,1 kb) og *OliI*-kuttet pMM3 (5,0 kb + 0,4 kb) separert ved gelelektroforese. Forventede fragmentstørrelser er gitt i parentes.



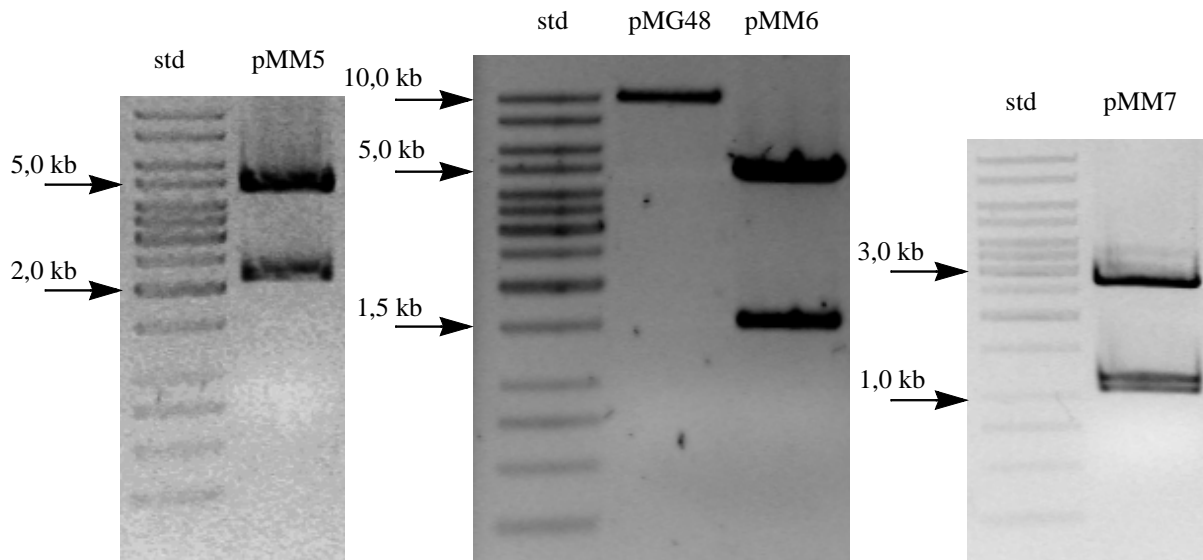
**Figur 3.17:** Gelbilder fra restriksjonsanalyse av pMM5 (4,8 kb + 1,1 kb + 1,0 kb), pMM6 (3,4 kb + 2,8 kb) og pMM7 (3,5 kb + 1,5 kb), kuttet med henholdsvis *Eco57I*, *BsaAI-NdeI* og *NcoI-PsiI*. Forventede fragmentstørrelser er gitt i parentes.

### 3.7. Konstruksjon av plasmider for genutskiftning

Fragmenter som inneholdt  $\Delta gcd$ ,  $\Delta zwf-1$  og  $\Delta zwf-2$  (gener med innført delesjon) ble kuttet ut av henholdsvis pMM5, pMM6 og pMM7 ved hjelp av *XbaI*<sup>1</sup> og *NotI*, og satt inn i genutskiftnings-

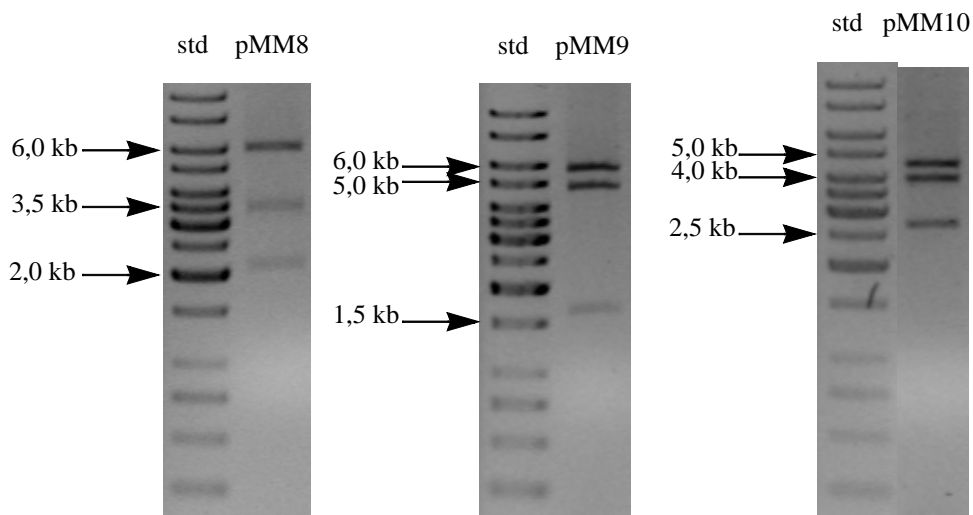
1. Kutting med *XbaI* og *SpeI* gir kompatible ender.

vektoren pMG48 (*SpeI*<sup>1</sup>-*NotI*-kuttet). Kuttete plasmid ble separert ved gelelektroforese (Figur 3.18). Alle prøvene ga bånd av forventet størrelse. Fragmentene på 2,2 kb ( $\Deltagcd$ ), 1,5 kb ( $\Delta zwf-2$ ) og 1,2 kb ( $\Delta zwf-1$ ) ble ekstrahert fra gelene, mens fragmentet på 10,0 kb (kuttet pMG48) ble rensert fra løsning.  $\Delta gcd$ ,  $\Delta zwf-1$  og  $\Delta zwf-2$  ble ligert med kuttet pMG48 for å gi henholdsvis pMM9, pMM10 og pMM8. Ligeringsblandingene ble transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1, og transformantene ble selektert på LA med Ap



**Figur 3.18:** *XbaI-NotI*-kuttet pMM5 (4,8 kb + 2,2 kb), pMM6 (4,8 kb + 1,5 kb) og pMM7 (2,8 kb + 1,2 kb + 1,1 kb) og *SpeI-NotI*-kuttet pMG48 (10,0 kb) separert ved gelelektroforese. Forventede fragmentstørrelser er gitt i parentes.

Tre kolonier fra hver av de tre transformeringene ble dyrket opp for plasmidisolering. Isolerte plasmider ble undersøkt ved restriksjonskutting og gelelektroforese, for å identifisere transformanter som inneholdt de korrekte konstruktene. For hver transformering ble ett plasmid som ga de forventede fragmentene (Figur 3.19) valgt ut. Disse ble benyttet for videre arbeid.



**Figur 3.19:** Gelbilder fra restriksjonsanalyse av pMM8 (6,0 kb + 3,4 kb + 2,1 kb), pMM9 (5,7 kb + 4,8 kb + 1,7 kb) og pMM10 (4,5 kb + 4,0 kb + 2,7 kb), kuttet med henholdsvis *DrdI*, *PciI-PsiI* og *PshAI-HindIII*. Forventede fragmentstørrelser er gitt i parentes.

1. Se fotnote side 69.

### 3.8. Konstruksjon av *P. fluorescens* delesjonsmutanter

Genene *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2* ble forsøkt inaktivert i *P. fluorescens* stammer ved dobbel rekombinering ved hjelp av genutskiftningsvektorene pMM8, pMM9 og pMM10.

#### 3.8.1. Overføring og integrering av genutskiftningsvektorer i *P. fluorescens*

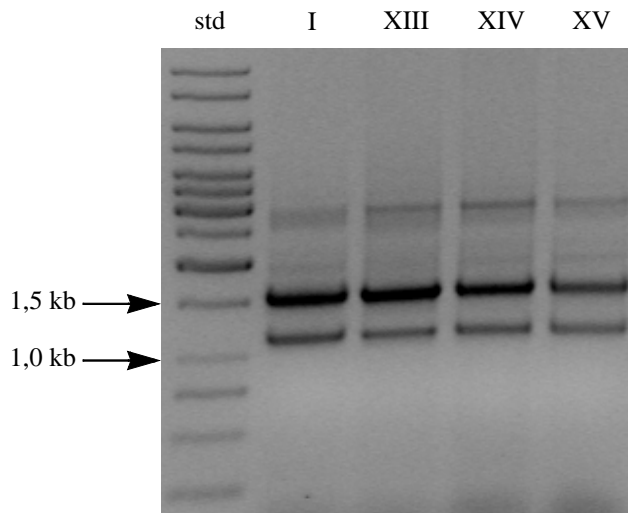
*E. coli* S17.1 har mobiliseringsgener som gjør at plasmider kan overføres fra denne stammen til andre bakterieceller ved konjugering. pMM8, pMM9 og pMM10 ble overført fra *E. coli* S17.1 til *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201. Disse plasmidene inneholder *lacZ* og gen for tetracyclin-resistens, så konjugantene ble selektert på PIA med Tc og XGal. Etter konstruksjon av mutanten *P. fluorescens* NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* ble pMM8 også overført til denne stammen, for å konstruere en dobbeltmutant hvor begge *zwf*-genene var slått ut. Pf201 $\Delta$ *zwf-1* ga ikke-mukoide kolonier (Se kapittel 3.8.2.), hvilket tyder på at denne stammen ikke produserer alginat. Det ble derfor ikke vurdert som hensiktsmessig å konstruere en *zwf*-dobbeltmutant avledet fra Pf201.

Omtrentlig antall blå kolonier som vokste opp per ml cellesuspensjon er gitt i tabell 3.2. Pf201-koloniene var mukoide med mindre annet er oppgitt. Det ble i tillegg observert at noen av platene hadde et belegg av bittesmå hvite kolonier.

**Tabell 3.2:** Omtrentlig antall blå kolonier per ml cellesuspensjon observert ved utplating av konjuganter på PIA med Tc og XGal. Pf201-kolonier var mukoide med mindre annet er oppgitt.

Stamme	Plasmid	Omtrentlig antall blå kolonier per ml cellesuspensjon
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM8	$8,0 \cdot 10^3$
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM9	1. konjugering: $6,0 \cdot 10^3$
		2. konjugering: $1,3 \cdot 10^5$
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM10	$2,0 \cdot 10^3$
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM8	$3,7 \cdot 10^6$
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM9	$2,3 \cdot 10^6$
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM10	1. konjugering: $2,3 \cdot 10^4$
		2. konjugering: $5,6 \cdot 10^4$ mukoide $3,0 \cdot 10^3$ ikke-mukoide
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	pMM8	$1,7 \cdot 10^5$

Ved andre gangs konjugering av pMM10 inn i *P. fluorescens* Pf201 ble det observert både mukoide og ikke-mukoide kolonier (Tabell 3.2). En mukoid og tre ikke-mukoide kolonier ble undersøkt ved PCR med primerpar *zwf1fwd*/*rev*. Dersom kolonien er *P. fluorescens* med pMM10 forventes amplifisering av både *zwf-1* (1538 bp) og  $\Delta$ *zwf-1* (1118 bp). Ved gelelektroforese av PCR-produktene ga alle koloniene to bånd, og størrelsen på disse samsvarte med at både *zwf-1* og  $\Delta$ *zwf-1* hadde blitt amplifisert (Figur 3.20). (Alle prøvene viste også et svakere bånd på cirka 3 kb, hvilket antagelig skyldtes uspesifikk priming.)



**Figur 3.20:** Gelbilde fra analyse av mukoid (I) og ikke-mukoide (XIII, XIV og XV) kolonier av *P. fluorescens* Pf201 etter konjugering av pMM10. Forventede fragmentstørrelser: 1,5 kb + 1,1 kb.

### 3.8.2. Isolering av integranter med plasmidtap

Blå kolonier ble plukket fra platene med konjuganter (Tabell 3.2), og dyrket for videre arbeid. Integranter hvor utkryssing og plasmidtap hadde funnet sted ble identifisert ved blå-hvit seleksjon på PIA med XGal. Det ble i tillegg kontrollert at hvite kolonier var Tc<sup>S</sup>.

**Tabell 3.3:** Oversikt over antall hvite kolonier overført fra PIA med XGal til PIA med og uten Tc, samt antall kolonier som var Tc<sup>S</sup>.

Stamme	Integrert plasmid	Koloni <sup>a</sup>	Antall kolonier overført til PIA med og uten Tc	Antall Tc <sup>S</sup> -kolonier
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM8	III	10	9
		IV	10	10
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM9	III-1	210	210
		IV-1	210	209
		I-2	50	50
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM10	I	126	122
		II	110	109
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM8	I	17	8
		II	6	3
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM9	I	10	6
		II	10	6
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM10	I-1	8	2
		II-1	13	2
		I-2	23	9
		II-2	15	10
		XIII-2 <sup>b</sup>	100	99
		XIV-2	100	100
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525Δ <i>zwf-1</i>	pMM8	I	50	50

- a. Nummerering angir hvilken koloni fra utplating etter konjugering kulturen ble inokulert fra. Suffikset angir om kolonien er fra 1. eller 2. konjugering, i de tilfellene hvor konjugering ble utført to ganger.  
 b. Koloniene XIII-2 og XIV-2 var ikke mukoide. (Se kapittel 3.8.1.)



Etter to-tre døgns dyrking ga alle kulturene hvite kolonier ved utplating på PIA med XGal, med unntak av kulturene inokulert fra mukoide kolonier etter konjugering av pMM10 til Pf201. Ved utplating av disse kulturene på PIA med XGal ble det observert svært få eller ingen hvite kolonier, selv etter at kulturene var holdt gående over en uke. De få hvite koloniene som ble observert var ikke-mukoide og dukket opp først mot slutten av dyrkingsperioden. De fleste var Tc<sup>r</sup> (Tabell 3.3). Resistens mot tetracyclin tyder på at delvis utkryssing kan ha funnet sted. Det ble besluttet å plukke to av de ikke-mukoide *P. fluorescens* Pf201(pMM10)-koloniene. Disse ga hvite kolonier etter to-tre døgns dyrking.

Hvite kolonier ble overført fra PIA med XGal til PIA med og uten Tc. Antall overførte og antall Tc<sup>s</sup>-kolonier er gitt i tabell 3.3.

### 3.8.3. Verifisering av delesjonsmutanter

Delesjonsmutanter ble identifisert blant hvite Tc<sup>s</sup>-kolonier ved PCR-amplifisering av målgenet. Ved amplifisering av *gcd/Δgcd* ble det benyttet en Mg<sup>2+</sup>-konsentrasjon på 0,5 mM. *gcd* og *Δgcd* forventes å gi PCR-produkter på henholdsvis 2601 bp og 2169 bp, og *zwf-1* og *Δzwf-1* forventes å gi produkter på henholdsvis 1538 bp og 1118 bp. *zwf-2* og *Δzwf-2* forventes å gi PCR-produkter på henholdsvis 1559 bp og 1472 bp, hvilket gir liten (87 bp) størrelsesforskjell. Disse PCR-produktene ble derfor i tillegg kuttet med *PmlI*, som vil kutte *zwf-2* men ikke *Δzwf-2*. Tabell 3.4 gir en oversikt over antall testede kolonier og antall identifiserte delesjonsmutanter. Det ble observert stor variasjon i andel delesjonsmutanter for de ulike integrantene.

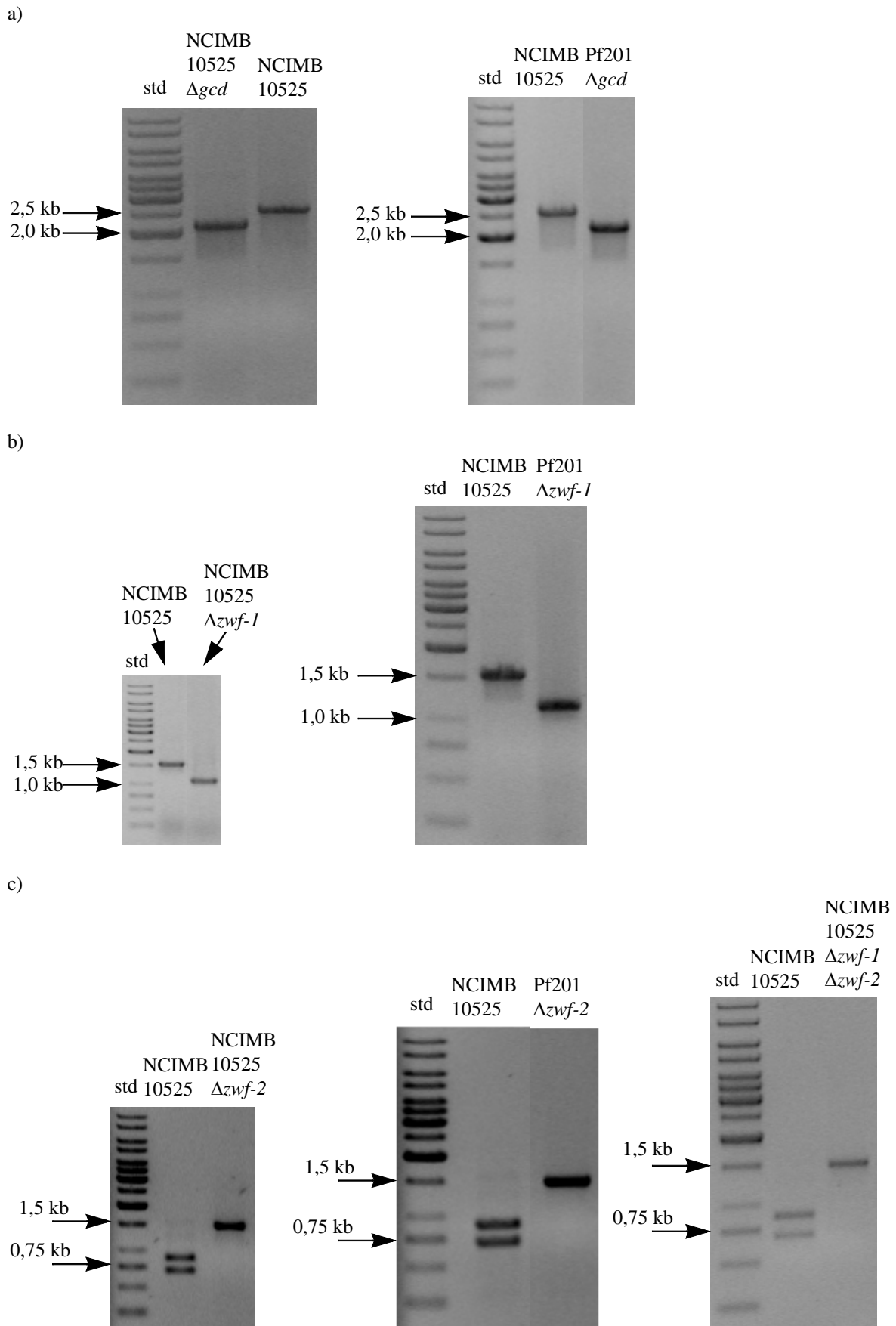
**Tabell 3.4:** Oversikt over antall hvite Tc<sup>s</sup>-kolonier testet ved PCR, og antall identifiserte delesjonsmutanter.

Stamme	Integrert plasmid	Koloni <sup>a</sup>	Antall hvite Tc <sup>s</sup> -kolonier testet	Antall delesjonsmutanter
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM8	III	9	3
		IV	10	4
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM9	III-1	210	0
		IV-1	209	0
		I-2	50	12
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	pMM10	I	122	1
		II	109	0
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM8	I	8	0
		II	3	1
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM9	I	5	0
		II	6	1
<i>P. fluorescens</i> Pf201	pMM10	I-1	2	0
		II-1	2	0
		I-2	9	0
		II-2	10	0
		XIII-2 <sup>b</sup>	99	2
		XIV-2	100	0
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	pMM8	I	20	1

a. Nummerering angir hvilken koloni fra utplating etter konjugering kulturen ble inokulert fra. Suffikset angir om kolonien er fra 1. eller 2. konjugering, i de tilfellene hvor konjugering ble utført to ganger.

b. Koloniene XIII-2 og XIV-2 var ikke-mukoide. (Se kapittel 3.8.1.)

Resultater



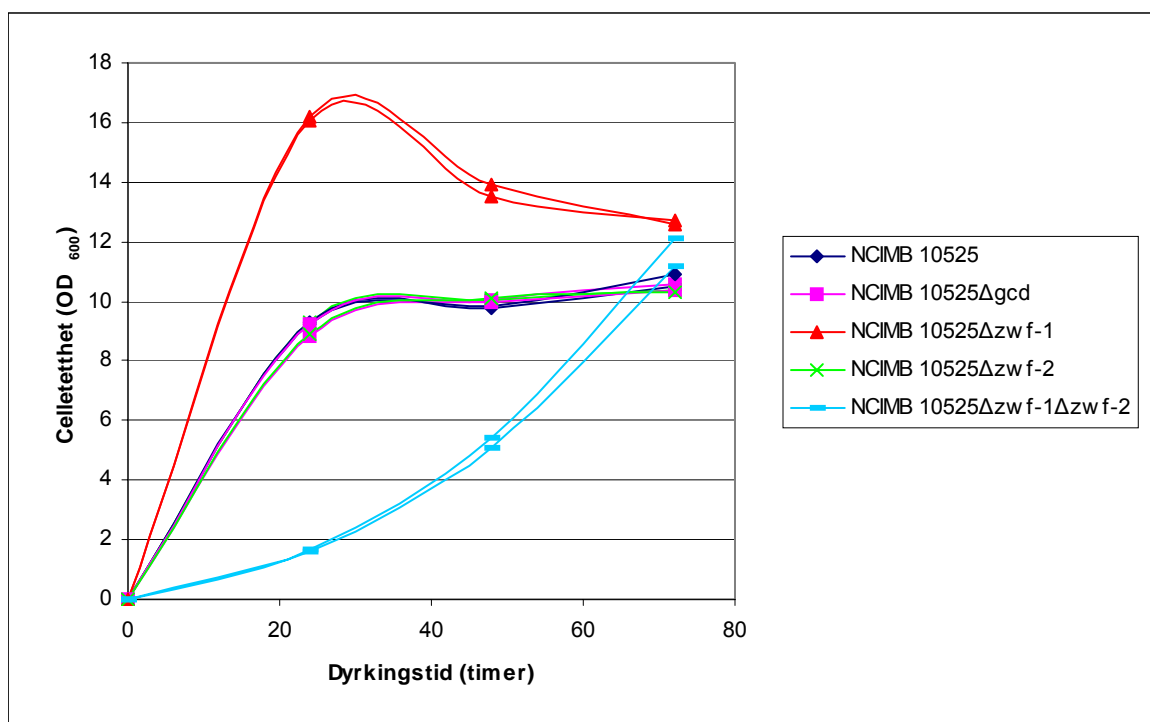
**Figur 3.21:** Gelbilder fra analyse/restriksjonsanalyse av PCR-produkter for identifisering av **a)**  $\Delta gcd$ -mutanter, **b)**  $\Delta zwf-1$ -mutanter, og **c)**  $\Delta zwf-2$ -mutanter. Forventede fragmentstørrelser: *gcd*: 2,6 kb,  $\Delta gcd$ : 2,2 kb, *zwf-1*: 1,5 kb,  $\Delta zwf-1$ : 1,1 kb, *zwf-2*: 0,9 kb + 0,7 kb og  $\Delta zwf-2$ : 1,5 kb.

Ut fra resultater av analyse/restriksjonsanalyse av PCR-produkter (Figur 3.21) ble en delesjonsmutant av hver type valgt ut for videre arbeid. Disse stammene ble kalt NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*, Pf201 $\Delta$ *gcd*, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*.

### 3.9. Undersøkelse av vekst med glukose som karbonkilde

Mutasjonene som ble innført i *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201 var laget med hensyn på alginatsyntese fra glukose, og det var dermed ønskelig å benytte et medium med glukose som eneste karbonkilde for alginatproduksjon. Mutantenes evne til å vokse med glukose som eneste karbonkilde ble derfor undersøkt. Stammene ble dyrket i DEF3 minimalmedium med 20 g/l glukose, og celletetthet i kulturene ble målt som OD<sub>600</sub>. NCIMB 10525 og Pf201 ble benyttet som referanser ved vekstundersøkelsene.

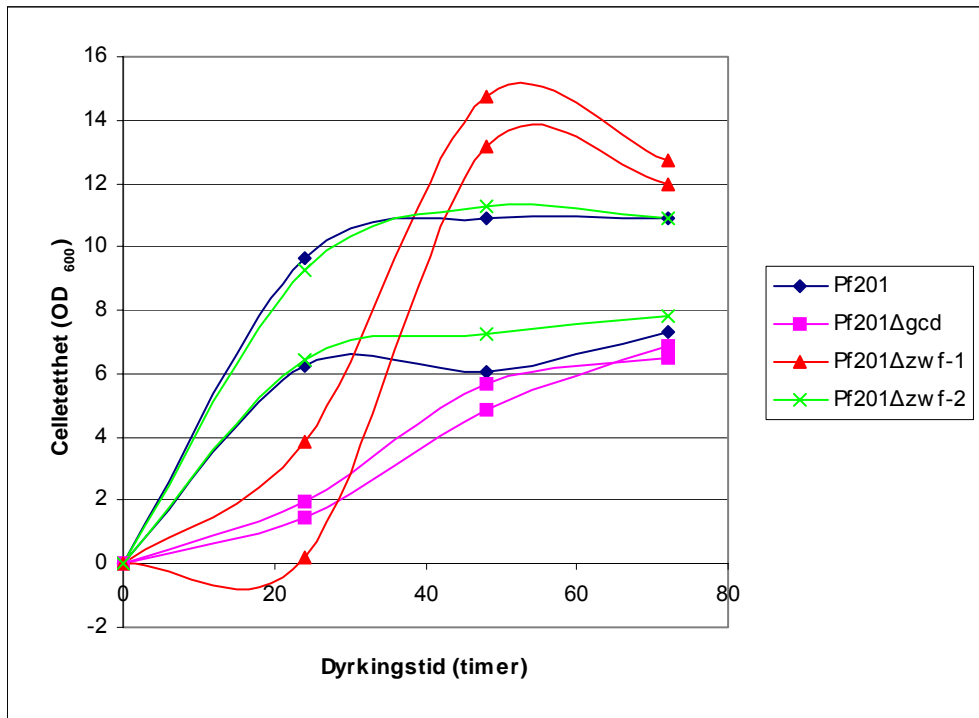
Det ble dyrket opp to uavhengige kulturer for hver stamme. For Pf201 og dens derivater ble kulturene som ble dyrket opp for å undersøke alginatproduksjon (Kapittel 3.12.) benyttet som en av parallellene. Plott av celletetthet mot dyrkingstid er vist i figur 3.22 og 3.23. Rådata er gitt i bilag 6.



**Figur 3.22:** Plott av celletetthet (målt som OD<sub>600</sub>) mot dyrkingstid (i timer) for *P. fluorescens* NCIMB 10525 og NCIMB 10525 delesjonsmutanter. Stammene ble dyrket i DEF3 minimalmedium med 20 g/l glukose, og det ble dyrket opp to kulturer for hver stamme.

Figur 3.22 og 3.23 viser at alle stammene vokste med glukose som karbonkilde. Dette er som forventet, da alle mutantene har enten det direkte oksidative eller det fosforylative sporet intakt. De ulike mutasjonene ser imidlertid ut til å ha gitt ulike effekter på vekst. For NCIMB 10525 ga inaktivering av *gcd* eller *zwf-2* ingen effekt på vekst, mens inaktivering av *zwf-1* førte til kortere generasjonstid. Inaktivering av både *zwf-1* og *zwf-2* førte imidlertid til lengre lag-fase og lengre generasjonstid. De to parallellene av Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* viste ulik vekst, men kulturene dyrket samtidig hadde sammenfallende vekstkurver. Inaktivering av *zwf-2* ga altså

ingen effekt på vekst i Pf201. Inaktivering av *gcd* førte til lengre lag-fase og lengre generasjonstid, mens inaktivering av *zwf-1* førte til lengre lag-fase og kortere generasjonstid.



**Figur 3.23:** Plott av cellethet (målt som OD<sub>600</sub>) mot dyrkingstid (i timer) for *P. fluorescens* Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter. Stammene ble dyrket i DEF3 minimalmedium med 20 g/l glukose, og det ble dyrket opp to kulturer for hver stamme.

### 3.10. Aktivitet av glukose dehydrogenase i *P. fluorescens* NCIMB 10525, Pf201 og $\Delta gcd$ -mutanter

Aktivitet av glukose dehydrogenase ble målt i *P. fluorescens* NCIMB 10525, NCIMB 10525 $\Delta gcd$ , Pf201 og Pf201 $\Delta gcd$ , for å verifisere at den innførte delesjonen hadde ført til inaktivering av *gcd*. I *P. aeruginosa* er det observert at glukose metaboliseres primært via det fosforylative sporet ved lave glukosekonsentrasjoner, og primært via det direkte oksidative sporet ved høye glukosekonsentrasjoner (Whiting *et al.*, 1976a; Whiting *et al.*, 1976b). Vaskede cellesuspensjoner av hver stamme ble derfor preparert fra kulturer dyrket i DEF3 minimalmedium med både høy og lav glukosekonsentrasjon, for å sikre at mangel på aktivitet grunnet nedregulering av ett av sporene ikke ble mistolket som vellykket inaktivering av *gcd*. For hver stamme ble det preparert to cellesuspensjoner; en fra kultur dyrket med 2 g/l glukose og en fra kultur dyrket med 20 g/l glukose. Proteinkonsentrasjon og aktivitet av glukose dehydrogenase ble målt i tre paralleller fra hver suspensjon.

Proteinkonsentrasjon i de vaskede cellesuspensjonene (Tabell 3.5) ble målt ved hjelp av Bio-Rad Protein Assay. Rådata og standardkurver for bestemmelse av proteinkonsentrasjon er gitt i bilag 7. Enzymaktivitet i de vaskede cellesuspensjonene ble målt som DCIP-reduksjon ved 600 nm. Rådata er gitt i bilag 8. En enhet aktivitet (U) reduserer 1  $\mu$ mol DCIP per minutt. Spesifikk aktivitet (U/mg protein) (Tabell 3.5) ble beregnet som beskrevet i bilag 8.

**Tabell 3.5:** Proteinkonsentrasjon og spesifikk aktivitet av glukose dehydrogenase i vaskede cellesuspensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose.

Stamme	Glukose (g/l) tilsatt i medium	Proteinkonsentrasjon (mg/ml)	Spesifikk aktivitet (U/mg protein)
NCIMB 10525	2	4,4	0,0026
NCIMB 10525	20	4,6	0,0020
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>gcd</i>	2	4,2	0,0021
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>gcd</i>	20	3,3	0,0013
Pf201	2	4,1	0,0031
Pf201	20	3,4	0,0019
Pf201 $\Delta$ <i>gcd</i>	2	3,4	0,0002
Pf201 $\Delta$ <i>gcd</i>	20	3,7	-0,0002

Det ble detektert aktivitet av glukose dehydrogenase i Pf201, men ikke i Pf201 $\Delta$ *gcd*. Dette tyder på at inaktivering av *gcd* har lyktes i Pf201 $\Delta$ *gcd*. Ved målinger i NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd* ble det detektert aktivitet i begge stammene, hvilket tyder på at inaktivering kan ha mislyktes i NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*. Dersom regulering av glukosekatabolisme i *P. fluorescens* er lik regulering i *P. aeruginosa* (Whiting *et al.*, 1976a; Whiting *et al.*, 1976b) forventes det at aktiviteten av glukose dehydrogenase er høyest ved høye glukosekonsentrasjoner. Både NCIMB10525, NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd* og Pf201 viste imidlertid høyere aktivitet etter dyrking med 2 g/l glukose enn etter dyrking med 20 g/l, hvilket er motsatt av forventet.

### 3.11. Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase i *P. fluorescens* NCIMB 10525, Pf201, $\Delta$ *zwf-1*- og $\Delta$ *zwf-2*-mutanter

Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase ble målt i *P. fluorescens* NCIMB 10525, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*, Pf201, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*, for å verifisere at de innførte delesjonene hadde ført til inaktivering av *zwf-1* og/eller *zwf-2*. I *P. aeruginosa* er det observert at glukose metaboliseres primært via det fosforylative sporet ved lave glukosekonsentrasjoner, og primært via det direkte oksidative sporet ved høye glukosekonsentrasjoner (Whiting *et al.*, 1976a; Whiting *et al.*, 1976b). Cellefri ekstrakter fra hver stamme ble derfor preparert fra kulturer dyrket i DEF3 minimalmedium med både høy og lav glukosekonsentrasjon, for å sikre at mangel på aktivitet grunnet nedregulering av ett av sporene ikke ble mistolket som vellykket inaktivering av *zwf-1* og/eller *zwf-2*. For hver stamme ble det preparert to cellefri ekstrakter; ett fra kultur dyrket med 2 g/l glukose og ett fra kultur dyrket med 20 g/l glukose. Proteinkonsentrasjon og glukose-6-fosfat dehydrogenase aktivitet ble målt i tre paralleller fra hvert ekstrakt.

Proteinkonsentrasjon i ekstraktene (Tabell 3.6) ble målt ved hjelp av Bio-Rad Protein Assay. Rådata og standardkurver for bestemmelse av proteinkonsentrasjon er gitt i bilag 7. Enzymaktivitet i ekstraktene ble målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm. Rådata er gitt i bilag 9. En enhet aktivitet (U) reduserer 1  $\mu$ mol NADP<sup>+</sup> per minutt. Spesifikk aktivitet (U/mg protein) (Tabell 3.6) ble beregnet som beskrevet i bilag 9.

**Tabell 3.6:** Proteinkonsentrasjon og spesifikk aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose.

Stamme	Glukose (g/l) tilsatt i medium	Proteinkonsentrasjon (mg/ml)	Spesifikk aktivitet (U/mg protein)
NCIMB 10525	2	2,4	0,064
NCIMB 10525	20	2,9	0,037
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	2	2,5	0,017
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	20	2,0	0,017
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	2	1,9	0,050
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	20	2,3	0,038
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i> $\Delta$ <i>zwf-2</i>	2	2,4	0,000
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i> $\Delta$ <i>zwf-2</i>	20	2,2	0,001
Pf201	2	1,8	0,027
Pf201	20	1,5 <sup>a</sup>	0,041
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	2	1,7	0,008
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	20	2,0	0,041
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	2	1,4	0,009
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	20	0,5 <sup>a</sup>	0,034

- a. På grunn av høy viskositet i kulturen var det vanskelig å få spunnet ned celler for Pf201- og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*-kulturene dyrket med 20 g/l glukose i mediet, til tross for at kulturene ble fortennet med 0,9 % NaCl. Cellemengden disse ekstraktene ble preparert fra ble dermed mindre enn for de øvrige prøvene. Dette gjelder især Pf201 $\Delta$ *zwf-2*.

Det ble detektert aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase i NCIMB 10525, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*, Pf201, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*, men ikke i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*. Aktiviteten var lavere i  $\Delta$ *zwf-1*- og  $\Delta$ *zwf-2*-mutantene enn i utgangsstammene ved minst en av glukosekonsentrasjonene. Dette tyder på at inaktivering av både *zwf-1* og *zwf-2* lyktes i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*, og at inaktivering av *zwf-1* eller *zwf-2* lyktes i de øvrige delesjonsmutantene. Dersom regulering av glukosekatabolisme i *P. fluorescens* er lik regulering i *P. aeruginosa* (Whiting *et al.*, 1976a; Whiting *et al.*, 1976b) forventes det at aktiviteten av glukose-6-fosfat dehydrogenase er høyest ved lave glukosekonsentrasjoner. Dette gjelder i hovedsak *Zwf-1*, da det er denne dehydrogenasen som antas å fungere primært i ED-sporet. NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2* viste høyere aktivitet etter dyrking med 2 g/l enn glukose etter dyrking med 20 g/l, hvilket er som forventet. Begge NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*-ekstraktene viste samme aktivitet, noe som tyder på at *Zwf-2*-aktivitet ikke avhenger av glukosekonsentrasjon i NCIMB 10525. Pf201, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* viste derimot høyere aktivitet etter dyrking med 2 g/l glukose enn etter dyrking med 20 g/l, og det var liten forskjell i aktivitet mellom Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*. Dette er motsatt av forventet, og tyder dessuten på at aktiviteten til de to glukose-6-fosfat dehydrogenasene er mer lik i Pf201 enn i NCIMB 10525.

### 3.12. Alginatproduksjon i *P. fluorescens* Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter

Det ble undersøkt om de innførte delesjonene hadde innvirkning på alginatproduksjon i stammene avledet fra *P. fluorescens* Pf201. Mutasjonene var laget med hensyn på alginatsyntese fra glukose, og det ble derfor benyttet et medium med glukose som eneste karbonkilde.

En kultur av hver av stammene Pf201 (referanse), Pf201 $\Delta$ *gcd*, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* ble dyrket i DEF3 minimalmedium tilsatt 20 g/l glukose. Det ble tatt ut prøver 24, 48 og 72 timer etter inokulering, og alginatkonsentrasjon ble målt ved enzymatisk alginatanalyse. Beregnede alginatkonsentrasjoner er gitt i tabell 3.7. Rådata og standardkurver foreligger i bilag 10.

**Tabell 3.7:** Beregnede alginatkonsentrasjoner i prøver fra *P. fluorescens* Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter dyrket i DEF3 minimalmedium med 20 g/l glukose.

Stamme	Dyrkingstid (t)	Alginatkonsentrasjon (g/l)
Pf201	24	7,518
	48	6,489
	72	7,607
Pf201 $\Delta$ <i>gcd</i>	24	1,614
	48	5,959
	72	6,777
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	24	0,338
	48	-0,039
	72	0,173
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	24	6,544
	48	6,528
	72	6,897

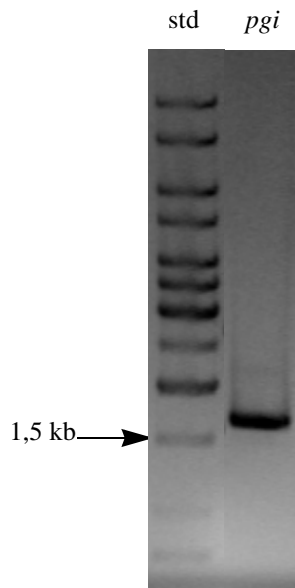
Ut fra verdiene i tabell 3.7 ser det ut til at Pf201 $\Delta$ *zwf-1* ikke produserer alginat. Dette samsvarer med at denne stammen danner ikke-mukoide kolonier. Det ser også ut til at alginatproduksjon i Pf201 $\Delta$ *gcd* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* er på samme nivå som i Pf201. Lavere alginatkonsentrasjon i de første Pf201 $\Delta$ *gcd*-prøvene skyldes antagelig dårlig vekst (Figur 3.22 b), ikke lav alginatproduksjon.

### 3.13. Kloning av *pgi* inn i vektor

Genet *pgi* ble amplifisert og klonet inn i en vektor, for å forberede eventuelt overuttrykk av glukose-6-fosfat isomerase i *P. fluorescens* NCIMB 10525, Pf201 eller delesjonsmutanter.

#### 3.13.1. Amplifisering av DNA-fragment fra *P. fluorescens* NCIMB 10525

Et DNA-fragment inneholdende *pgi* ble amplifisert fra *P. fluorescens* NCIMB 10525 ved PCR med primerparet *pgifwd*/*-rev* (Se kapittel 2.3.). Forventet fragmentstørrelse var 1727 bp. PCR-produktet ble analysert ved gelelektroforese (Figur 3.24), for å verifisere at amplifisering av det ønskede fragmentet hadde lyktes. Prøven viste bånd av forventet størrelse.



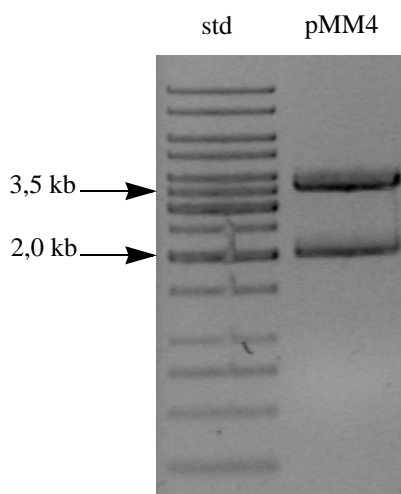
**Figur 3.24:** *pgi* PCR-produkt separert ved gelelektroforese. Forventet fragmentstørrelse: 1,7 kb.

### 3.13.2. Konstruksjon av plasmid inneholdende *pgi*

Plasmid pEM2 og *pgi* PCR-produkt ble kuttet med restriksjonsenzymene *NdeI* og *NotI*. Fragmenter på 3908 bp og 1199 bp var forventet ved kutting av pEM2. Kuttet plasmid ble separert ved gelelektroforese (Figur 3.14). Plasmidet viste bånd av forventet størrelse, og fragmentet på 3,9 kb ble ekstrahert fra gelen.

Kuttet *pgi* ble ligert med 3,9 kb fragmentet fra pEM2, for å gi plasmidet pMM4. Ligeringsblandingen ble transformert inn i kompetente *E. coli* S17.1, og transformantene ble selektert på LA med Ap.

Tre kolonier fra transformeringen ble dyrket opp for plasmidisolering. Isolerte plasmider ble undersøkt ved restriksjonskutting og gelelektroforese, for å identifisere transformanter som inneholdt korrekt konstrukt. Ett av plasmidene som ga de forventede fragmentene (Figur 3.25) ble valgt ut for videre arbeid.



**Figur 3.25:** Gelbilde fra restriksjonsanalyse av pMM4 (kuttet med *NcoI*). Forventede fragmentstørrelser: 3,6 kb + 2,0 kb.



### 3.14. Sekvensering av *pgi*

I forbindelse med PCR-amplifisering kan det oppstå mutasjoner i enkelte av produktene. For å sikre at plasmidet som ble valgt ut for videre arbeid ikke inneholdt mutasjoner, ble *pgi* i plasmidet pMM4 sekvensert. Da villtypesekvensen til dette genet i *P. fluorescens* NCIMB 10525 ikke er kjent ble også PCR-produktet fra amplifisering av *pgi* sekvensert.

Det ble ikke funnet noen mutasjoner i *pgi* i pMM4. NCIMB 10525 *pgi* ble også sammenlignet med tilsvarende sekvens fra SBW25. Sammenligning av sekvensene fra *P. fluorescens* SBW25, NCIMB 10525 og pMM4 er gitt i bilag 5.

## 4. Diskusjon

I første del av arbeidet med denne oppgaven ble den sentrale glukosemetabolismen i *P. fluorescens* forsøkt kartlagt ved hjelp av litteraturstudier og bioinformatisk analyse av genomsekvensen til *P. fluorescens* PfO-1. Resultatene av dette arbeidet er oppsummert i figur 3.10 og tabell 3.1. Som figuren viser, mangler *P. fluorescens* fosfofruktokinase, og kan dermed ikke metabolisere karbohydrater via glykolysen. *P. fluorescens* benytter istedet ED-sporet og det direkte oksidative sporet for nedbryting av glukose og andre sukkerer til pyruvat. *P. fluorescens* har glukose-6-fosfat isomerase, som katalyserer isomerisering av glukose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat, den primære forløperen for alginatsyntese. Ut fra undersøkelser av karbohydrat-fluks i *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* ser det imidlertid ut til at syntese av fruktose-6-fosfat fra glukose i forkant av alginatsyntese foregår via ED-sporet og glukoneogenesen i pseudomonader (Lynn og Sokatch, 1984; Beale og Foster, 1996), fremfor isomerisering av glukose-6-fosfat.

Med basis i resultatene fra kartleggingsarbeidet ble det utarbeidet en hypotese om at glukose kanskje kunne utnyttes mer effektivt med hensyn på alginatsyntese dersom en større andel av glukosen ble kanalisert mot direkte konvertering til fruktose-6-fosfat. Bakgrunnen for dette var at omdanning via ED-sporet og glukoneogenesen består av langt flere trinn, samt at splittelsen til pyruvat og glyseraldehyd-3-fosfat fører til større tap av karbon. Det ble derfor konstruert mutanter av NCIMB 10525 og Pf201 med en delesjon i genet for glukose dehydrogenase (*gcd*) eller glukose-6-fosfat dehydrogenase(r) (*zwf-1* og *zwf-2*) (Tabell 2.2). Disse enzymene katalyserer tidlige trinn i henholdsvis det direkte oksidative sporet og det fosforylative sporet. Glukose-6-fosfat dehydrogenase katalyserer også første trinn i pentosefosfatsporet. I tillegg ble genet for glukose-6-fosfat isomerase (*pgi*) klonet inn i en vektor og sekvensert. Intensjonen bak dette var at overuttrykk av *pgi* også kunne tenkes å bidra til at en høyere andel av glukosen tatt opp fra mediet ble konvertert til fruktose-6-fosfat via isomerisering av glukose-6-fosfat.

De konstruerte delesjonsmutantene ble undersøkt med hensyn på vekst med glukose som karbonkilde og aktivitet av glukose dehydrogenase og glukose-6-fosfat dehydrogenase. For mutantene derivert fra Pf201 ble i tillegg alginatproduksjon med glukose som karbonkilde undersøkt.

### 4.1. Vekst med glukose som karbonkilde

Alle delesjonsmutantene vokste med glukose som eneste karbonkilde (Figur 3.22 og 3.23). Dette var som forventet, da alle mutantene har det fosforylative eller det direkte oksidative sporet intakt, og disse to skal kunne kompensere for hverandre (Lessie og Phibbs, 1984). Quay *et al.* (1972) observerte dessuten at *P. fluorescens* mutanter som mangler glukose dehydrogenase kan vokse med glukose som karbonkilde. Det er også observert at *P. aeruginosa* mutanter som mangler glukose-6-fosfat dehydrogenase kan vokse på glukose (Hunt og Phibbs, 1983). Lugtenberg *et al.* (1999) isolerte imidlertid en stamme av *P. fluorescens* med en mutasjon i *zwf-1*, og denne stammen vokste ikke med glukose som karbonkilde.

Ved vekstforsøkene ble celletetthet målt hver 24. time, hvilket ikke gir tilstrekkelig med punkter til å kunne beregne generasjonstid. Vekstkurvene (Figur 3.22 og 3.23) ga likevel en indikasjon på hvorvidt generasjonstiden var forskjellig i de ulike stammene, og på variasjoner i lag-fasens lengde. Kurvene viste at de ulike mutasjonene så ut til å ha svært ulike effekter på vekst med glukose som karbonkilde. Inaktivering av *zwf-2* så ikke ut til å påvirke veksten, da vekstkurvene til NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* var like kurvene til henholdsvis NCIMB 10525 og

Pf201. De to parallellene for Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf*-2 var forskjellige, men parallellene dyrket samtidig ga like kurver. I begge tilfeller så kulturene ut til å nå stasjonærfase etter litt over ett døgn, men ved andre parallell så generasjonstiden ut til å være kortere, og celletettheten i stasjonærfase større. ( $OD_{600}$  i stasjonærfase var cirka 7 for første parallell og cirka 11 for andre parallell.) Dette kan skyldes medieforskjeller, da mediet benyttet for de to parallellene av Pf201 og dens derivater kom fra ulike prepareringer. Kulturene av NCIMB 10525, Pf201 og  $\Delta$ *zwf*-2-mutanter så ut til å fremdeles være i stasjonærfase da målingene ble avsluttet etter tre døgn.

Vekstkurvene til NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd* var like kurvene til NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-2, hvilket tyder på at inaktivering av *gcd* heller ikke påvirker vekst i forhold til denne utgangsstammen. Disse tre stammene ser også ut til å nå stasjonærfase ( $OD_{600} \approx 10$ ) etter litt over ett døgn, i likhet med Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf*-2. Pf201 $\Delta$ *gcd* hadde derimot lengre lag-fase og lengre generasjonstid enn Pf201, og så ut til å nå stasjonærfase ( $OD_{600} \approx 7$ ) etter cirka tre døgn. Dette tyder på at glukose dehydrogenase er viktigere for vekst i Pf201 enn i NCIMB 10525. Dette kan ha sammenheng med at Pf201 $\Delta$ *gcd*, men ikke NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*, bruker glukose til alginatproduksjon, slik at mindre karbon og energi blir tilgjengelig for vekst. Det kan også tenkes at hittil ukjente forskjeller mellom NCIMB 10525 og Pf201 gjør sistnevnte mer avhengig av det direkte oksidative sporet. Det er imidlertid mulig at inaktivering av *gcd* ikke lyktes i NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd* (Se kapittel 4.2.). Hvis dette er tilfelle er det mulig at også NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd* egentlig ville hatt dårligere vekst enn utgangsstammen.

Både NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1 og Pf201 $\Delta$ *zwf*-1 så ut til å ha kortere generasjonstid enn sine respektive utgangsstammer. Etter ett døgn var  $OD_{600} \approx 16$  i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1-kulturene. Pf201 $\Delta$ *zwf*-1 hadde lengre lag-fase enn Pf201, men etter to døgn var  $OD_{600} \approx 13-15$ . Ved de påfølgende målingene gikk celletettheten i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1- og Pf201 $\Delta$ *zwf*-1-kulturene ned, hvilket tyder på at kulturene gikk inn i dødsfase. Dette kan skyldes at den hurtige veksten førte til raskt forbruk av glukosen i mediet, opphopning av toksiske avfallsprodukter og/eller pH-endringer. Det er uvisst hvorfor inaktivering av *zwf*-1 fører til høyere veksthastighet. Pf201 $\Delta$ *zwf*-1 produserer ikke alginat, hvilket kunne tenkes å forklare noe av vekstøkningen i forhold til Pf201, da alginatsyntese går på bekostning av energi og karbon til andre prosesser. Økningen i vekst-hastighet er imidlertid like påfallende hos NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1, som er avledet fra en ikke-mukoid stamme. Umiddelbart skulle man tro veksten ville gå ned eller forbli den samme ved blokkering av et av de alternative sporene for nedbryting av glukose. Kanskje er glukoseutnyttelse via det direkte oksidative sporet mer gunstig enn via det fosforylative sporet, da førstnevnte for eksempel har transportsystemer som ikke forbruker ATP. (I motsetning til det fosforylative sporet, som benytter en glukose ABC-transporter.)

Det ble også konstruert en dobbeltmutant fra NCIMB 10525, med inaktivering av både *zwf*-1 og *zwf*-2. Denne stammen (NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1 $\Delta$ *zwf*-2) hadde både en betydelig lengre lag-fase og lengre generasjonstid enn NCIMB 10525. Etter tre døgn var celletettheten på samme nivå som NCIMB 10525. Det er ikke mulig å avgjøre om kulturen fremdeles var i eksponentiell fase eller om den hadde nådd stasjonærfase, da det ikke ble foretatt flere målinger. Vekstkurvene for denne stammen var overraskende, da NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-2 hadde lik eller raskere vekst i forhold til NCIMB 10525. Det er vanskelig å komme med noen forklaring på dette uten videre undersøkelser. En mulighet kan være at det dannes glukose-6-fosfat som cellen ikke klarer å utnytte på grunn av mangelen på glukose-6-fosfat dehydrogenaser. NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf*-1 $\Delta$ *zwf*-2 har det direkte oksidative sporet intakt, og bør derfor kunne metabolisere glukose via dette sporet. I pseudomonader ser det imidlertid ut til at glyseraldehyd-3-fosfat dannet ved spalting av 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukonat ikke konverteres direkte til pyruvat, men istedet resirkuleres til 6-fosfoglukonat via fruktose-1,6-bisfosfat, fruk-

tose-6-fosfat og glukose-6-fosfat (Lessie og Phibbs, 1984). I NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2* er dette sporet blokkert som følge av inaktivering av *zwf-1* og *zwf-2*. Da *P. fluorescens* heller ikke har fosfofruktokinase kan ikke eventuell fruktose-6-fosfat og glukose-6-fosfat dannet fra glyseraldehyd-3-fosfat metaboliseres via glykolysen. Det kan dermed tenkes at veksten begrenses som følge av dårligere utnyttelse av resirkulert glukose-6-fosfat. Hvorvidt denne hypotesen stemmer kan sannsynligvis undersøkes ved å måle cellulære glukose-6-fosfat-nivåer, og se om det forekommer en opphopning av denne metabolitten i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*.

#### 4.2. Enzymaktivitet

Det ble detektert aktivitet av glukose dehydrogenase i Pf201, men ikke i Pf201 $\Delta$ *gcd* (Tabell 3.5). Dette tyder på at delesjonen innført i *gcd* gir et inaktivt genprodukt, og at inaktivering av *gcd* har lyktes i Pf201 $\Delta$ *gcd*. Det ble imidlertid detektert aktivitet av glukose dehydrogenase i NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*, og aktiviteten var bare marginalt lavere enn i NCIMB 10525 (Tabell 3.5). Dette kan tyde på at inaktivering av *gcd* ikke har lyktes i denne stammen. NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd* bør derfor undersøkes nærmere, og eventuelt konstrueres på nytt.

Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase ble detektert i NCIMB 10525, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*, Pf201, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*, men ikke NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2* (Tabell 3.6). Dette tyder på at delesjonene innført i *zwf-1* og *zwf-2* gir inaktive genprodukter, og at inaktivering av begge genene har lyktes i NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*. Enkeltmutantene viste lavere aktivitet enn sine respektive utgangsstammer ved minst en av glukosekonsentrasjonene (Tabell 3.6), hvilket tyder på at inaktivering av *zwf-1* eller *zwf-2* har lyktes i disse stammene.

I *P. aeruginosa* metaboliseres glukose primært via det direkte oksidative sporet ved høye glukosekonsentrasjoner, og primært via det fosforylative sporet ved lave glukosekonsentrasjoner (Whiting *et al.*, 1976a; Whiting *et al.*, 1976b). Glukose dehydrogenase og glukose-6-fosfat dehydrogenase katalyserer første trinn i henholdsvis det direkte oksidative sporet og det fosforylative sporet (Figur 3.4 og 3.10). Dersom aktiviteten til disse sporene reguleres på samme måte i *P. fluorescens* som i *P. aeruginosa* kan man altså forvente høyere aktivitet av glukose dehydrogenase i cellene dyrket med 20 g/l glukose i mediet enn i cellene dyrket med 2 g/l glukose. Tilsvarende kan man forvente høyere aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase i ekstrakt fra cellene dyrket med 2 g/l glukose enn i ekstrakt fra cellene dyrket med 20 g/l. *P. aeruginosa* har én glukose-6-fosfat dehydrogenase (Zwf) (Stover *et al.*, 2000), og denne fungerer i ED-sporer (Lessie og Phibbs, 1984). *P. fluorescens* har to glukose-6-fosfat dehydrogenaser (Zwf-1 og Zwf-2), hvorav den ene fungerer primært i ED-sporer (det fosforylative sporet) og den andre primært i pentosefosfatsporer (Lessmann *et al.*, 1975). Ut fra organisering i genomet (Figur 3.5 b) og likhet med *P. aeruginosa* Zwf (Figur 3.6) er det sannsynligvis Zwf-1 som fungerer primært i ED-sporer.

For både NCIMB 10525 og Pf201 ble det detektert høyere aktivitet av glukose dehydrogenase etter dyrking med 2 g/l glukose enn etter dyrking med 20 g/l glukose (Tabell 3.5). Forskjellen var mest fremtredende for Pf201. Dette kan tyde på ulik regulering av det direkte oksidative sporet i *P. fluorescens* og *P. aeruginosa*.

NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2* viste høyere aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase etter dyrking med 2 g/l glukose enn etter dyrking med 20 g/l glukose (Tabell 3.6). NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2* har *zwf-1* intakt. Disse resultatene er dermed som forventet dersom regulering av det fosforylative sporet i *P. fluorescens* ligner regulering i *P. aeruginosa*. I NCIMB

10525 $\Delta$ *zwf-1* ble det ikke observert noen forskjell i aktivitet mellom cellene dyrket med 2 og 20 g/l glukose. Dette kan tyde på at aktiviteten til *Zwf-2* er mindre avhengig av glukosekonsentrasjon enn aktiviteten til *Zwf-1*. *Zwf-1* og *Zwf-2* antas å fungere primært i henholdsvis ED-sporet og pentosefosfatsporet, og det er dermed godt mulig at regulering av uttrykk og/eller aktivitet er forskjellig. Pf201, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* viste høyere aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase etter dyrking med 20 g/l glukose enn etter dyrking med 2 g/l glukose (Tabell 3.6), hvilket er omvendt av det som ble observert for NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*. Dette kan tyde på reguleringsforskjeller i forhold til *P. aeruginosa* og *P. fluorescens* NCIMB 10525. En annen overraskende observasjon var at både Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* viste svært lav aktivitet etter dyrking med 2 g/l glukose, mens aktiviteten etter dyrking med 20 g/l glukose var nær aktivitet ved samme betingelser i Pf201. Det kan dermed se ut som *Zwf-1* og *Zwf-2* har en mer lik aktivitet i Pf201 enn i NCIMB 10525, og at aktiviteten til begge enzymene avhenger av glukosekonsentrasjon i Pf201.

Enzymaktivitet ble målt i tre paralleller fra samme kultur for hver av stammene ved de to glukosekonsentrasjonene. For å kunne dra sikre konklusjoner angående enzymaktivitet i de ulike stammene bør det foretas målinger i prøver fra flere uavhengige kulturer. Assayet som ble benyttet for å måle aktivitet av glukose dehydrogenase ga dessuten relativt svakt signal og ofte mye støy, især i de tidligste målingene (Bilag 8.). Modifiseringer av dette assayet bør derfor vurderes dersom ytterligere målinger skal foretas. En mulighet kan være å tilsette fenazinmetosulfat i assayblandingen, da dette førte til økt sensitivitet i et lignende assay (Hunt og Phibbs, 1983).

### 4.3. Alginatproduksjon

Hypotesen om at inaktivering av genene for glukose dehydrogenase eller glukose-6-fosfat dehydrogenase kan gi bedre utnyttelse av glukose med hensyn på alginatsyntese ser ikke ut til å stemme, da alginatproduksjonen i de konstruerte Pf201-mutantene var på samme eller lavere nivå i forhold til utgangsstammen (Tabell 3.7). Det bør imidlertid foretas målinger i flere uavhengige kulturer for å verifisere disse resultatene, da alginatproduksjon foreløpig bare er målt i tre paralleller av en kultur for hver stamme.

Inaktivering av *gcd* eller *zwf-2* ser ikke ut til å ha innvirkning på evnen til å produsere alginat fra glukose, da prøver fra Pf201 $\Delta$ *gcd* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* hadde alginatkonsentrasjoner på samme nivå som prøver fra Pf201 (Tabell 3.7). I prøvene tatt ut etter 24 og 48 timer var alginatkonsentrasjonen lavere for Pf201 $\Delta$ *gcd* enn Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*, men dette skyldes mest sannsynlig at denne stammen vokste saktere enn de to andre. Pf201 $\Delta$ *gcd* hadde lengre lag-fase og lengre generasjonstid enn Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*, og så ut til å nå stasjonærfase først etter cirka tre døgn. Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* så ut til å nå stasjonærfase etter litt over ett døgn. Etter tre døgn hadde alle kulturene  $OD_{600} \approx 7$  (Figur 3.23).

Inaktivering av *zwf-1* hadde derimot stor innvirkning på alginatsyntese, da Pf201 $\Delta$ *zwf-1* ble observert å produsere lite eller ingen alginat (Tabell 3.7). Denne stammen dannet også ikke-mukoide kolonier på PIA, hvor glyserol er karbonkilden. I pseudomonader omdannes glyserol til glyseraldehyd-3-fosfat, som inngår i den sentrale karbohydratmetabolismen. Videre antas det at glyseraldehyd-3-fosfat dannet fra glyserol omdannes til glukose-6-fosfat via glukoneogenesen, og kanaliseres inn i ED-sporet (Lessie og Phibbs, 1984). Dersom dette også er tilfelle i *P. fluorescens* NCIMB 10525 og Pf201 kan det forklare hvorfor delesjonen i *zwf-1* påvirker utnyttelse av både glukose og glyserol.

Kraftig nedgang eller tap av alginatsyntese som følge av inaktivering av *zwf* er også observert i *P. aeruginosa* (Banerjee *et al.*, 1983; Silo-Suh *et al.*, 2005). Dette bygger opp under at ED-sporet er viktig for dannelsen av forløpere for alginatsyntese, som observert i *P. aeruginosa* og *A. vinelandii* (Lynn og Sokatch, 1984; Beale og Foster, 1996). Banerjee *et al.* (1983) observerte at alginatproduksjon ble gjenopprettet i spontane revertanter, og Silo-Suh *et al.* (2005) gjenopprettet alginatproduksjon ved å komplementere mutanten med villtype *zwf*. Ved verifisering av delesjonsmutanter ga de fleste testede koloniene PCR-produkter som samsvarte med villtype-utgaven av *zwf-1* (Tabell 3.4), men også disse var ikke-mukoide. Dette kan imidlertid skyldes ukjente genetiske effekter av utkryssing av den integrerte genutskiftningsvektoren. Det er også tidligere observert at utkryssing med tilsynelatende gjenopprettelse av villtype likevel har ført til genetiske endringer (Svein Valla, [pers. med.]). Det bør derfor utføres et komplementeringsforsøk med villtype *zwf-1* i Pf201 $\Delta$ *zwf-1*, for å se om dette er tilstrekkelig til å gjenopprette alginatproduksjon.

Tap av alginatsyntesen i Pf201 $\Delta$ *zwf-1* er vanskelig å forklare. Begge  $\Delta$ *zwf-1*-mutantene konstruert i denne oppgaven ser ut til å vokse godt med glukose som eneste karbonkilde (Figur 3.22 og 3.23), hvilket tyder på at evnen til å utnytte glukose ikke er nedsatt. Silo-Suh *et al.* (2005) foreslo at nedgangen i alginatproduksjon kunne skyldes en reduksjon av forekomsten av fruktose-6-fosfat, den primære forløperen til alginat. Da Pf201 $\Delta$ *zwf-1* har det direkte oksidative sporet intakt bør denne stammen være i stand til å danne fruktose-6-fosfat ved vekst på glukose. I tillegg er katabolisme av glyserol rapportert å gå via fruktose-6-fosfat som et av mellomtrinnene i pseudomonader (Lessie og Phibbs, 1984). Det er derfor sannsynlig at Pf201 $\Delta$ *zwf-1* kan danne fruktose-6-fosfat ved vekst med både glukose og glyserol som karbonkilder, men av ukjente årsaker produserer stammen likevel lite eller ingen alginat. Det kan tenkes at inaktivering av *zwf-1* har ført til endringer i balansen mellom ulike metabolitter i cellen, og at dette påvirker tilgangen på forløpere for alginatsyntese.

En annen mulighet er at andre gener har blitt påvirket i sammenheng med inaktiveringen av *zwf-1*. Dette kan imidlertid utelukkes som årsak til tap av alginatproduksjon dersom komplementering av Pf201 $\Delta$ *zwf-1* med villtype *zwf-1* fører til gjenopprettelse av alginatproduksjon. *zwf-1* inngår høyst sannsynlig i et operon sammen *pgl* og *eda* (Figur 3.5 b), hvor sistnevnte koder for KDPG aldolase. Dersom inaktivering av *zwf-1* har påvirket uttrykk av *eda* vil også det direkte oksidative sporet påvirkes, hvilket kan forklare nedgang i alginatproduksjon som følge av redusert produksjon av fruktose-6-fosfat. Dersom komplementering med *zwf-1* ikke gjenoppretter alginatproduksjon kunne det derfor vært interessant å undersøke om det er forskjeller i KDPG aldolase aktivitet mellom Pf201 og Pf201 $\Delta$ *zwf-1*, eller uttrykke *eda* i Pf201 $\Delta$ *zwf-1* ved hjelp av en ekspresjonsvektor. God vekst med glukose som karbonkilde tyder imidlertid på at det direkte oksidative sporet fungerer normalt. Oppstrøms for *zwf-1*, og på motsatt tråd, ligger *hexR*, som koder for en negativ repressor av *hex*-regulonet. Dette regulonet omfatter gener for mange av de sentrale enzymene i karbohydratmetabolismen (Temple *et al.*, 1994; Hager *et al.*, 2000). Dersom inaktivering av *zwf-1* har påvirket dette genet kan det altså ha fått følger for regulering av flere sentrale gener i karbohydratmetabolismen.

Det er også en mulighet at indusering av 6-fosfoglukonat dehydrase og/eller KDPG aldolase kan ha blitt påvirket. Dersom uttrykk og/eller aktivitet av disse enzymene senkes kan dette tenkes å gi lavere produksjon av fruktose-6-fosfat. Dette virker imidlertid lite sannsynlig, da enzymene i ED-sporet ser ut til å induseres av glukonat eller 6-fosfoglukonat i pseudomonader (Lessie og Phibbs, 1984). Da Pf201 $\Delta$ *zwf-1* har det direkte oksidative sporet intakt bør stammen danne både glukonat og 6-fosfoglukonat ved nedbryting av glukose.

#### 4.4. Forslag til videre arbeid

Som allerede nevnt bør aktivitet av glukose dehydrogenase og glukose-6-fosfat dehydrogenase undersøkes nærmere, først og fremst ved målinger fra flere uavhengige dyrkingsforsøk. Ved måling av aktivitet av glukose dehydrogenase bør i tillegg modifisering av assayet vurderes. Det bør også undersøkes om komplementering av Pf201 $\Delta$ *zwf-1* med villtype *zwf-1* er tilstrekkelig for å gjenopprette alginatproduksjon. *zwf-1* fra NCIMB 10525 er sekvensert og klonet inn i plasmid pMM3, og kan dermed enkelt overføres til en ekspresjonsvektor for uttrykk i Pf201 $\Delta$ *zwf-1*. *zwf-1* i pMM3 har imidlertid en synonym substitusjon i forhold til villtype *zwf-1*, så det må vurderes hvorvidt denne klonen likevel kan brukes eller om genet bør klones på nytt.

Det ville også vært interessant å undersøke karbohydrat-fluks i NCIMB 10525, Pf201 og delesjonsmutantene. Slike studier kan kanskje belyse eventuelle forskjeller i glukosemetabolisme i NCIMB 10525 og Pf201, samt endringer i glukosemetabolisme som følge av inaktivering av gener for glukose dehydrogenase eller glukose-6-fosfat dehydrogenase(r).

Pf201 er avledet fra NCIMB 10525 ved kjemisk mutagenese, og genomet til Pf201 kan dermed inneholde en rekke ukjente mutasjoner. Det kan derfor tenkes at mutasjonene innført i arbeidet med denne oppgaven gir ulike effekter med hensyn på alginatsyntese i de to stammene. Det er imidlertid ikke mulig å måle eventuelle endringer i alginatsyntese i NCIMB 10525 direkte, da denne stammen og dens derivater ikke produserer alginat. Et alternativ for å evaluere NCIMB 10525-mutantene kan være å måle fruktose-6-fosfat-produksjon i disse stammene. Fruktose-6-fosfat er den primære forløperen for alginatsyntese, og økt produksjon av fruktose-6-fosfat kan dermed tenkes å gi bedre betingelser for alginatproduksjon. Det har nå også blitt konstruert alginatproduserende stammer av NCIMB 10525 og SBW25 ved å erstatte promoterne foran *alg*-operonet og *algC* med induserbare promotere (Helga Ertesvåg, [pers. med.]). Disse stammene har villtype-bakgrunn, med unntak av de innførte endringene. Det er derfor også en mulighet å konstruere samme type delesjonsmutanter som i denne oppgaven fra en av disse stammene. Mutasjonenes effekt på alginatsyntese vil da kunne måles direkte ved enzymatisk alginat-analyse. Mutantene kan konstrueres ved hjelp av genutskiftningsvektorene (pMM8, pMM9 og pMM10) som ble konstruert i løpet av arbeidet med denne oppgaven. De aktuelle sekvensene er nesten identiske i NCIMB 10525 og SBW25 (Bilag 5.), så vektorene bør også kunne benyttes i stammer avledet fra SBW25.

I arbeidet med denne oppgaven ble også genet for glukose-6-fosfat isomerase (*pgi*) klonet inn i en vektor (pMM4) og sekvensert. Dette enzymet katalyserer isomerisering av glukose-6-fosfat til fruktose-6-fosfat. Det er tenkelig at overuttrykk av *pgi* kan føre til at mer glukose-6-fosfat isomeriseres direkte til fruktose-6-fosfat fremfor å omdannes via ED-sporet og glukoneogensen. Glukose-6-fosfat er et mellomprodukt i det fosforylative sporet, men ikke i det direkte oksidative sporet. Overuttrykk av *pgi* vil derfor være mest interessant i  $\Delta$ *gcd*-mutanter, da disse er blokkert for glukoseutnyttelse via det direkte oksidative sporet.

Eksperimenter utført av Steinbüchel (1986) har vist at det er mulig å få en art som mangler fosfofruktokinase, og benytter ED-sporet for nedbryting av karbohydrater, til å gå over til glykolytisk metabolisme. Ved å uttrykke *E. coli pfkA* (som koder for fosfofruktokinase) i mutanter av *Alcaligenes eutrophus* med inaktiv KDPG aldolase lyktes det å etablere karbohydratmetabolisme via glykolysen i denne organismen. Steinbüchel (1986) viste også at det var mulig å benytte samme system for å uttrykke *E. coli pfkA* i andre gram-negative bakterier, deriblant arter i slektene *Pseudomonas* og *Azotobacter*. Da blokkering av ED-sporet eller det direkte oksidative sporet alene ikke ser ut til å kanalisere mer glukose mot direkte konvertering til fruk-

### *Diskusjon*

tose-6-fosfat kunne det vært interessant å konstruere en *P. fluorescens* mutant med glykolytisk metabolisme, og undersøke alginatproduksjon i denne mutanten i forhold til utgangstammen.



## 5. Konklusjon

Ut fra resultatene av litteraturstudier og bioinformatisk analyse ble det konkludert med at *P. fluorescens* tar opp glukose fra omgivelsene via poriner i ytre membran og glukose ABC-transportere i indre membran, og at den sentrale glukosemetabolismen omfatter ED-sporet, det direkte oksidative sporet, pentosefosfatsporet, glukoneogenesen og nedre del av glykolysen. Ved glukosekatabolisme via det direkte oksidative sporet omdannes glukose til glukonat og 2-ketoglukonat i periplasma. Disse forbindelsene transporteres over indre membran via glukonat og 2-ketoglukonat transportere drevet av kjemiosmotiske gradienter. Genkandidater for alle enzymer og proteiner i de ovennevnte transportsystemene og metabolske sporene ble lokalisert i genomet til *P. fluorescens* PfO-1.

De innførte delesjonene så ut til å gi inaktive genprodukter for både *gcd*, *zwf-1* og *zwf-2*. Inaktivering av *gcd* så ut til å ha lyktes i *P. fluorescens* Pf201 $\Delta$ *gcd*, men muligens ikke i NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*. Inaktivering av *zwf-1* og/eller *zwf-2* så ut til å ha lyktes i både NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*, NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* $\Delta$ *zwf-2*, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*. Resultatene av aktivitetsmålingene bør imidlertid verifiseres.

Inaktivering av *zwf-2* så ikke ut til å påvirke vekst med glukose som karbonkilde. Inaktivering av *gcd* så ikke ut til å påvirke vekst for mutanten derivert fra NCIMB 10525, men mutanten derivert fra Pf201 vokste dårligere enn utgangstammen. Mutantene med inaktivert *zwf-1* vokste raskere enn utgangstammene. Inaktivering av både *zwf-1* og *zwf-2* samtidig ga imidlertid langt dårligere vekst enn utgangstammen. Årsaken til vekstforskjellene er ikke kjent.

I både NCIMB 10525 og Pf201 indikerte aktivitetsmålingene for glukose dehydrogenase at det direkte oksidative sporet hadde høyere aktivitet ved lav glukosekonsentrasjon enn ved høy glukosekonsentrasjon. Aktivitetsmålinger for glukose-6-fosfat dehydrogenase indikerte at det fosforylative sporet var mer aktivt ved lave glukosekonsentrasjoner enn ved høye glukosekonsentrasjoner i NCIMB 10525 og NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-2*, mens det omvendte ble observert for Pf201, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2*. I NCIMB 10525 $\Delta$ *zwf-1* ble det ikke observert noen forskjell i aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase ved de to glukosekonsentrasjonene, hvilket indikerer at Zwf-2-aktivitet i NCIMB 10525 avhenger mindre av glukosekonsentrasjon enn Zwf-1-aktivitet. Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase i Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* var svært lik, og varierte med glukosekonsentrasjon. Dette indikerer at både Zwf-1- og Zwf-2-aktivitet avhenger av glukosekonsentrasjon i Pf201, og at aktiviteten til de to enzymene er mer lik i denne stammen enn i NCIMB 10525. Det ser altså ut til å være forskjeller i glukosemetabolismen i NCIMB 10525 og Pf201. Årsaken til de mulige metabolske forskjellene er ikke kjent, men kan ha sammenheng med hittil ukjente mutasjoner i Pf201. Resultatene av aktivitetsmålingene bør verifiseres før man kan dra sikre konklusjoner angående enzymaktivitet i utgangstammene og mutantene.

Inaktivering av *gcd* eller *zwf-2* så ikke ut til å påvirke alginatproduksjon i stammene derivert fra Pf201. Inaktivering av *zwf-1* førte til tap av alginatsyntese, men årsaken til dette er ukjent. Det ser altså ut til at Zwf-1 er nødvendig for alginatsyntese, men dette bør verifiseres ved kompletteringsforsøk.

## Litteratur

- Aarons, S.J., Sutherland, I.W., Chakrabarty, A.M. og Gallagher, M.P., 1997, A novel gene, *algK*, from the alginate biosynthetic cluster of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology* **143** (2): 641-652
- Adewoye, L.O., Tschetter, L., O'Neil, J. og Worobec, E.A., 1998, Channel specificity and secondary structure of the glucose-inducible porins of *Pseudomonas* spp., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **30** (3): 257-267
- Adewoye, L.O. og Worobec, E.A., 2000, Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane-associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*, *Gene* **253**: 323-330
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. og Lipman, D.J., 1990, Basic Local Alignment Search Tool, *Journal of Molecular Biology* **215** (3): 403-410
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. og Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402
- Applied Biosystems, 2002, *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol*, Applied Biosystems, Foster City, 74 s.
- Apweiler, R., 2005, Sequence databases. Baxevanis, A.D. og Ouellette, B.F.F. (Red.), *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*, John Wiley & Sons, New Jersey, s. 3-24
- Armstrong, J.McD., 1964, The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol, *Biochimica et Biophysica Acta* **86**: 194-197
- Atkins, E.D.T., Mackie, W., Parker, K.D og Smolko, E.E., 1971, Crystalline structures of poly-D-mannuronic and poly-L-guluronic acids, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **9** (4): 311-316
- Atkins, E.D.T., Mackie, W. og Smolko, E.E., 1970, Crystalline structures of alginic acids, *Nature* **225**: 626-628
- Bakkevig, K., Sletta, H., Gimmetstad, M., Aune, R., Ertesvåg, H., Degnes, K., Christensen, B.E., Ellingsen, T.E. og Valla, S., 2005, Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment, *Journal of Bacteriology* **187** (24): 8375-8384
- Banerjee, P.C., Vanags, R.I., Chakrabarty, A.M. og Maitra, P.K., 1983, Alginic acid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in carbohydrate metabolism, *Journal of Bacteriology* **155** (1): 238-245
- Baxevanis, A.D., 2005, Assessing pairwise sequence similarity: BLAST and FASTA. Baxevanis, A.D. og Ouellette, B.F.F. (Red.), *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*, John Wiley & Sons, New Jersey, s. 295-324
- Beale, J.M. (Jr.) og Foster, J.L., 1996, Carbohydrate fluxes into alginate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* NCIB 8789: NMR investigations of the triose pools, *Biochemistry* **35** (14): 4492-4501
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G. og Brunak, S., 2004, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *Journal of Molecular Biology* **340**: 783-795
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. og Stryer, L., 2002, *Biochemistry*, 5<sup>th</sup> ed., W. H. Freeman and Company, New York, 974 s.
- Bio-Rad, 1994, *Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, 27 s.
- Bjerkan, T.M., Bender, C.L., Ertesvåg, H., Drabløs, F., Fakhr, M.K., Preston, L.A., Skjåk-Bræk, G. og Valla, S., 2004, The *Pseudomonas syringae* genome encodes a combined mannuronan C-5-epimerase and O-acetylhydro-

lase, which strongly enhances the predicted gel-forming properties of alginates, *The Journal of Biological Chemistry* **279** (28): 28920-28929

Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254

Branden, C. og Tooze, J., 1999, *Introduction to Protein Structure*, 2<sup>nd</sup> ed., Garland Publishing, New York, 410 s.

Campos, M., Martínez-Salazar, J.M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G. og Soberón-Chávez, G., 1996, Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*, *Journal of Bacteriology* **178** (7): 1793-1799

Chitnis, C.E. og Ohman, D.E., 1990, Cloning of *Pseudomonas aeruginosa algG*, which controls alginate structure, *Journal of Bacteriology* **172** (6): 2894-2900

Chitnis, C.E. og Ohman, D.E., 1993, Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure, *Molecular Microbiology* **8** (3): 583-593

Conway, T., 1992, The Entner-Doudoroff pathway: History, physiology and molecular biology, *FEMS Microbiology Reviews* **103**: 1-27

Cooper, R.A. og Kornberg, H.L., 1967, The direct synthesis of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **168** (1012): 263-280

Cote, G.L. og Krull, L.H., 1988, Characterization of the exocellular polysaccharides from *Azotobacter chroococcum*, *Carbohydrate Research* **181**: 143-152

Dale, J.W. og von Schantz, M., 2002, *From Genes to Genomes - Concepts and Applications of DNA Technology*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 360 s.

Davidson, A.L. og Chen, J., 2004, ATP-binding cassette transporters in bacteria, *Annual Review of Biochemistry* **73**: 241-268

Davidson, I.W., Sutherland, I.W. og Lawson, C.J., 1977, Localization of *O*-acetyl groups of bacterial alginate, *Journal of General Microbiology* **98**: 603-606

Dé, E., De Mot, R., Orange, N., Saint, N. og Molle, G., 1995, Channel-forming properties and structural homology of major outer membrane proteins from *Pseudomonas fluorescens* MFO and OE 28.3, *FEMS Microbiology Letters* **127**: 267-272

Dean, J.A. (Red.), 1999, *Lange's Handbook of Chemistry*, 15<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York, 1521 s.

De Mot, R., Schoofs, G., Roelandt, A., Declerck, P., Proost, P., Van Damme, J. og Vanderleyden, J., 1994, Molecular characterization of the major outer-membrane protein OprF from plant root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*, *Microbiology* **140** (6): 1377-1387

Donati, I., Draget, K.I., Borgogna, M., Paoletti, S. og Skjåk-Bræk, G., 2005, Tailor-made alginate bearing galactose moieties on mannuronic residues: Selective modification achieved by a chemoenzymatic strategy, *Biomacromolecules* **6**: 88-98

Draget, K.I., Skjåk-Bræk, G. og Smidsrød, O., 1994, Alginic acid gels: The effect of alginate chemical composition and molecular weight, *Carbohydrate Polymers* **25**: 31-38

Eisenberg, R.C., Butters, S.J., Quay, S.C. og Friedman, S.B., 1974, Glucose uptake and phosphorylation in *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Bacteriology* **120** (1): 147-153

Ertesvåg, H., Doseth, B., Larsen, B., Skjåk-Bræk, G. og Valla, S., 1994, Cloning and expression of an *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase gene, *Journal of Bacteriology* **176** (10): 2846-2853

- Ertesvåg, H., Erlien, F., Skjåk-Bræk, G., Rehm, B.H.A. og Valla, S., 1998, Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase, *Journal of Bacteriology* **180** (15): 3779-3784
- Ertesvåg, H., Høidal, H.K., Hals, I.K., Rian, A., Doseth, B. og Valla, S., 1995, A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*, *Molecular Microbiology* **16** (4): 719-731
- Ertesvåg, H. og Skjåk-Bræk, G., 1999, Modification of alginate using mannuronan C-5-epimerases. Bucke, C. (Red.), *Methods in Biotechnology 10: Carbohydrate biotechnology protocols*, Humana Press, Totowa, s. 71-78
- Ertesvåg, H., Valla, S. og Skjåk-Bræk, G., 1996, Genetics and biosynthesis of alginates, *Carbohydrates in Europe* **14**: 14-18
- Faulkner-Jones, B., 1995, Quantitation of nucleic acid concentration [online]. Kilde: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Tilgjengelig fra: <http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/au/m6g.html> [Nedlastet 31.10.2005]
- Fett, W.F., Osman, S.F. og Dunn, M.F., 1989, Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated fluorescent pseudomonads, *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 579-583
- Fett, W.F., Wells, J.M., Cescutti, P. og Wijey, C., 1995, Identification of exopolysaccharides produced by fluorescent pseudomonads associated with commercial mushroom (*Agaricus bisporus*) production, *Applied and Environmental Microbiology* **61** (2): 513-517
- Frampton, E.W. og Wood, W.A., 1961, Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens* VI. Conversion of 2-keto-6-phosphogluconate to pyruvate, *The Journal of Biological Chemistry* **236** (10): 2571-2577
- Franklin, M.J., Chitnis, C.E., Gacesa, P., Sonesson, A., White, D.C. og Ohman, D.E., 1994, *Pseudomonas aeruginosa* *algG* is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase, *Journal of Bacteriology* **176** (7): 1821-1830
- Franklin, M.J. og Ohman, D.E., 1993, Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation, *Journal of Bacteriology* **175** (16): 5057-5065
- Franklin, M.J. og Ohman, D.E., 1996, Identification of *algI* and *algJ* in the *Pseudomonas aeruginosa* alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate acetylation, *Journal of Bacteriology* **178** (8): 2186-2195
- Franklin, M.J. og Ohman, D.E., 2002, Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **184** (11): 3000-3007
- Gaona, G., Núñez, C., Goldberg, J.B., Linford, A.S., Nájera, R., Castañeda, M., Guzmán, J., Espín, G. og Soberón-Chávez, G., 2004, Characterization of the *Azotobacter vinelandii* *algC* gene involved in alginate and lipopolysaccharide production, *FEMS Microbiology Letters* **238** (1): 199-206
- Gimmestad, M., 2005, *A Study of Bacterial Genes Involved in Post-Polymerization Control of Alginate Structure*, Doktoravhandling NTNU, Tapir Uttrykk, Trondheim, 61 s.
- Gimmestad, M., Sletta, H., Ertesvåg, H., Bakkevig, K., Jain, S., Suh, S., Skjåk-Bræk, G., Ellingsen, T., Ohman, D.E. og Valla, S., 2003, The *Pseudomonas fluorescens* AlgG protein, but not its mannuronan C-5-epimerase activity is needed for alginate polymer formation, *Journal of Bacteriology* **185** (12): 3515-3523
- Gimmestad, M., Sletta, H., Karunakaran, K.P., Bakkevig, K., Ertesvåg, H., Ellingsen, T., Skjåk-Bræk, G. og Valla, S., 2004, Engineering *Pseudomonas fluorescens* variants for improved alginate production for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrients and animal feed, *PCT International Application WO2004011628*
- Gogstad, G.O. og Krutnes, M., 1982, Measurement of protein in cell suspensions using the coomassie brilliant blue dye-binding assay, *Analytical Biochemistry* **126**: 355-359

- Goss, J.A., Cohen, N.D. og Utter, M.F., 1981, Characterization of the subunit structure of pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*, *The Journal of Biological Chemistry* **256** (22): 11819-11825
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. og Thom, D., 1973, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *FEBS Letters* **32** (1): 195-198
- Guymon, L.F. og Eagon, R.G., 1974, Transport of glucose, gluconate, and methyl  $\alpha$ -D-glucoside by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **117** (3): 1261-1269
- Hager, P.W., Calfee, M.W., Phibbs, P.V., 2000, The *Pseudomonas aeruginosa devB/SOL* homolog, *pgl*, is a member of the *hex* regulon and encodes 6-phosphogluconolactonase, *Journal of Bacteriology* **182** (14): 3934-3941
- Hanahan, D., 1985, Techniques for transformation of *E. coli*. Glover, D.M. (Red.), *DNA Cloning Volume I*, IRL Press, Oxford, s. 109-135
- Hancock, R.E.W. og Brinkman, F.S.L., 2002, Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux, *Annual Review of Microbiology* **56**: 17-38
- Hancock, R.E.W. og Carey, A.M., 1980, Protein D1 -A glucose-inducible, pore-forming protein from the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEMS Microbiology Letters* **8**: 105-109
- Haug, A., 1964, *Report No. 30: Composition and Properties of Alginates*, Doktoravhandling NTH, N.T.H. Trykk, Trondheim, 123 s.
- Haug, A., Larsen, B. og Smidsrød, O., 1966, A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis, *Acta Chemica Scandinavica* **20**: 183-190
- Haug, A. og Smidsrød, O., 1965, The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions II. Comparison of different metal ions, *Acta Chemica Scandinavica* **19**: 341-351
- Higgins, C.F., 2001, ABC transporters: Physiology, structure and mechanism - an overview, *Research in Microbiology* **152**: 205-210
- Hunt, J.C. og Phibbs, P.V. (Jr.), 1983, Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **154** (2): 793-802
- Izu, H., Adachi, O. og Yamada, M., 1997, Gene organization and transcriptional regulation of the *gntRKU* operon involved in gluconate uptake and catabolism of *Escherichia coli*, *Journal of Molecular Biology* **267**: 778-793
- Jain, S. og Ohman, D.E., 2005, Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Infection and Immunity* **73** (10): 6429-6436
- Jitrapakdee, S. og Wallace, J.C., 1999, Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase, *Biochemical Journal* **340**: 1-16
- Kanehisa, M. og Goto, S., 2000, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Research* **28** (1): 27-30
- Keith, R.C., Keith, L.M.W., Hernández-Guzmán, G., Uppalapati, S.R. og Bender, C.L., 2003, Alginate gene expression by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in host and non-host plants, *Microbiology* **149**: 1127-1138
- Koebnik, R., Locher, K.P. og Van Gelder, P., 2000, Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell, *Molecular Microbiology* **37** (2): 239-253
- Kovachevich, R. og Wood, W.A., 1955a, Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens* III. Purification and properties of a 6-phosphogluconate dehydrase, *The Journal of Biological Chemistry* **213** (2): 745-756

- Kovachevich, R. og Wood, W.A., 1955b, Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens* IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase, *The Journal of Biological Chemistry* **213** (2): 757-767
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. og Sonnhammer, E.L.L., 2001, Predicting transmembrane protein topology with a Hidden Markov Model: Application to complete genomes, *Journal of Molecular Biology* **305**: 567-580
- Lessie, T. og Neidhardt, F.C., 1967, Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Journal of Bacteriology* **93** (4): 1337-1345
- Lessie, T.G. og Phibbs, P.V. (Jr.), 1984, Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads, *Annual Review of Microbiology* **38**: 359-388
- Lessmann, D., Schimz, K. og Kurz, G., 1975, D-Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Entner-Doudoroff enzyme) from *Pseudomonas fluorescens*: Purification, properties and regulation, *European Journal of Biochemistry* **59**: 545-559
- Lloret, L., Barreto, R., León, R., Moreno, S., Martínez-Salazar, J.M., Espín, G. og Soberón-Chávez, G., 1996, Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthesis genes: Identification of two independent promoters, *Molecular Microbiology* **21** (3): 449-457
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L. og Darnell, J., 2003, *Molecular Cell Biology*, 5<sup>th</sup> ed., W. H. Freeman and Company, New York, 973 s.
- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V. og Simons, M., 1999, Tomato seed and root exudate sugars: Composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization, *Environmental Microbiology* **1** (5): 439-446
- Lynch, W.H., MacLeod, J. og Franklin, M., 1975, Effect of temperature on the activity and synthesis of glucose-catabolizing enzymes in *Pseudomonas fluorescens*, *Canadian Journal of Microbiology* **21**: 1560-1572
- Lynch, W.H., 1982, The role of some membrane dehydrogenases in *Pseudomonas fluorescens*, *Canadian Journal of Microbiology* **28**: 907-915
- Lynn, A.R. og Sokatch, J.R., 1984, Incorporation of isotope from specifically labeled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*, *Journal of Bacteriology* **158** (3): 1161-1162
- Madigan, M.T. og Martinko, J.M., 2006, *Brock Biology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> ed., Pearson Prentice Hall, New Jersey, 992 s.
- Maharaj, R., May, T.B., Wang, S. og Chakrabarty, A.M., 1993, Sequence of the *alg8* and *alg44* genes involved in the synthesis of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*, *Gene* **136**: 267-269
- Matsushita, K., Ohno, Y., Shinagawa, E., Adachi, O. og Ameyama, M., 1980, Membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas* sp.: Solubilization, purification and characterization, *Agricultural and Biological Chemistry* **44** (7): 1505-1512
- May, T.B. og Chakrabarty, A.M., 1994, *Pseudomonas aeruginosa*: Genes and enzymes of alginate synthesis, *Trends in Microbiology* **2** (5): 151-157
- Mejía-Ruíz, H., Guzmán, J., Moreno, S., Soberón-Chávez, G. og Espín, G., 1997a, The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter, *Gene* **199**: 271-277
- Mejía-Ruíz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G. og Espín, G., 1997b, Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant, *FEMS Microbiology Letters* **156** (1): 101-106

- Mertens, E., 1991, Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme?, *FEBS Letters* **285** (1): 1-5
- Milrad de Forchetti, S.R. og Cazzulo, J.J., 1976, Some properties of the pyruvate carboxylase from *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of general Microbiology* **93** (1): 75-81
- Monday, S.R. og Schiller, N.L., 1996, Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: The role of AlgL (alginate lyase) and AlgX, *Journal of Bacteriology* **178** (3): 625-632
- Morea, A., Mathee, K., Franklin, M.J., Giacomini, A., O'Regan, M. og Ohman, D.E., 2001, Characterization of *algG* encoding C5-epimerase in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens*, *Gene* **278**: 107-114
- Mukhopadhyay, B., Stoddard, S.F. og Wolfe, R.S., 1998, Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain  $\Delta$ H, *The Journal of Biological Chemistry* **273** (9): 5155-5166
- Nagl, S.B., 2003, Function prediction from protein sequence. Orengo, C.A., Jones, D.T. og Thornton, J.M. (Red.), *Bioinformatics: Genes, proteins & computers*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, s. 65-79
- Nakada, H.I. og Sweeney, P.C., 1967, Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas, *Journal of Biological Chemistry* **242** (5): 845-851
- Nakamura, Y., Gojobori, T. og Ikemura, T., 2000, Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000, *Nucleic Acids Research* **28** (1): 292
- Narrod, S.A. og Wood, W.A., 1956, Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens* V. Evidence for gluconokinase and 2-ketogluconokinase, *The Journal of Biological Chemistry* **220** (1): 45-55
- NCIMB, 2005, NCIMB - Culture collection [online]. Kilde: NCIMB Ltd. Tilgjengelig fra: [http://www.ncimb.com/html/culture\\_collection.php](http://www.ncimb.com/html/culture_collection.php) [Nedlastet 11.11.2005]
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T. *et al.*, 2002, Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440, *Environmental Biology* **4** (12): 799-808
- New England Biolabs, 2005, T4 DNA Ligase FAQs, Ligases, New England Biolabs [online]. Kilde: New England Biolabs. Tilgjengelig fra: <http://www.neb.com/nebecomm/products/faqproductM0202.asp> [Nedlastet 03.10.2005]
- Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J. og Franklin, M.J., 2001, Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms, *Journal of Bacteriology* **183** (3): 1047-1057
- Ofran, Y. og Rost, B., 2005, Predictive methods using protein sequences. Baxevanis, A.D. og Ouellette, B.F.F. (Red.), *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*, John Wiley & Sons, New Jersey, s. 197-221
- Onsøyen, E., 1996, Commercial applications of alginates, *Carbohydrates in Europe* **14**: 26-31
- Page, W.J. og Sadoff, H.L., 1975, Relationship between calcium and uronic acids in the encystment of *Azotobacter vinelandii*, *Journal of Bacteriology* **122** (1): 145-151
- Palleroni, N.J., 1984, Family I. *Pseudomonadaceae*. Krieg, N.R. og Holt, J.G. (Red.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1*, Williams & Wilkins, Baltimore, s. 141-218
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. og Saier, M.H. (Jr.), 1998, Major facilitator superfamily, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62** (1): 1-34
- Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J. *et al.*, 2005, Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Nature Biotechnology* **23** (7): 873-878

- Peñalosa-Vázquez, A., Kidambi, S.P., Chakrabarty, A.M. og Bender, C.L., 1997, Characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Journal of Bacteriology* **179** (14): 4464-4472
- Petruschka, L., Adolf, K., Burchhardt, G., Dervedde, J., Jürgensen, J. og Herrmann, H., 2002, Analysis of the *zwf-pgl-eda*-operon in *Pseudomonas putida* strains H and KT2440, *FEMS Microbiology Letters* **215**: 89-95
- Pierce, 2001, *Instructions: B-PER® II Bacterial Protein Extraction Reagent*, Pierce Chemical Company, Rockford, 4 s.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. og Jacobson, G.R., 1993, Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria, *Microbiological Reviews* **57** (3): 543-594
- Prescott, L.M., Harley, J.P. og Klein, D.A., 2002, *Microbiology*, 5<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York, 1026 s.
- Price, N.C. og Stevens, L., 1999, *Fundamentals of Enzymology*, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford, 478 s.
- Promega, 2005, *Technical Bulletin: Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, Promega, Madison, 17 s.
- Qiagen, 1999, *QIAEX II Handbook*, Qiagen, Alameda, 24 s.
- Qiagen, 2002, *QIAquick® Spin Handbook*, Qiagen, Alameda, 36 s.
- Quay, S.C., Friedman, S.B. og Eisenberg, R.C., 1972, Gluconate regulation of glucose catabolism in *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Bacteriology* **112** (1): 291-298
- Rehm, B.H., 1996, The *Azotobacter vinelandii* gene *algJ* encodes an outer-membrane protein presumably involved in export of alginate, *Microbiology* **142** (4): 873-880
- Rehm, B.H.A., Boheim, G., Tommassen, J. og Winkler, U.K., 1994, Overexpression of *algE* in *Escherichia coli*: Subcellular localization, purification, and ion channel properties, *Journal of Bacteriology* **176** (18): 5639-5647
- Rehm, B.H., Ertesvåg, H. og Valla, S., 1996, A new *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase gene (*algG*) is part of an *alg* gene cluster physically organized in a manner similar to that in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **178** (20): 5884-5889
- Rehm, B.H.A. og Valla, S., 1997, Bacterial alginates: Biosynthesis and applications, *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**: 281-288
- Roberts, G., 2003, Plasmids and conjugation [online]. Kilde: Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison. Tilgjengelig fra: <http://www.bact.wisc.edu/Bact370/conjugation1.html> [Nedlastet 05.10.2005]
- Robles-Price, A., Wong, T.Y., Sletta, H., Valla, S. og Schiller, N.L., 2004, AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **186** (21): 7369-7377
- Roche, 2005, Expand High Fidelity PCR System package insert [online]. Kilde: Roche Applied Science. Tilgjengelig fra: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1732641a.pdf> [Nedlastet 13.06.2005]
- Romano, A.H., Eberhard, S.J., Dingle, S.L. og McDowell, T.D., 1970, Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in bacteria, *Journal of Bacteriology* **104** (2): 808-813
- Romano, A.H., Voytek, A. og Bruskin, A.M., 1980, Energization of glucose transport by *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of Bacteriology* **142** (3): 755-762
- Roychoudhury, S., May, T.B., Gill, J.F., Singh, S.K., Feingold, D.S. og Chakrabarty, A.M., 1989, Purification and characterization of guanosine-D-mannose dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry* **264** (16): 9380-9385



- Sabra, W., Zeng, A. og Deckwer, W., 2001, Bacterial alginate: Physiology, product quality and process aspects, *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**: 315-325
- Saier, M.H. (Jr.), 2000, Families of transmembrane sugar transport proteins, *Molecular Microbiology* **35** (4): 699-710
- Saier, M.H. (Jr.), 2005, TCDB: Transport Classification Database [online]. Kilde: Saier Lab Bioinformatics Group, Division of Biological Sciences, University of California. Tilgjengelig fra: <http://www.tcdb.org> [Nedlastet 16.11.2005]
- 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): 5463-5467
- Schiller, N.L., Monday, S.R., Boyd, C.M., Keen, N.T. og Ohman, D.E., 1993, Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* **175** (15): 4780-4789
- Schmetterer, G.R., 1990, Sequence conservation among the glucose transporter from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and mammalian glucose transporters, *Plant Molecular Biology* **14** (5): 697-706
- Schneider, E., 2001, ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake, *Research in Microbiology* **152**: 303-310
- Schomburg, D., Schomburg, I. og Chang, A. (Red.), 2004a, *Springer Handbook of Enzymes Vol. 16: Class 1: Oxidoreductases I: EC 1.1.1.1-1.1.1.50*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer, Berlin, 504 s.
- Schomburg, D., Schomburg, I. og Chang, A. (Red.), 2004b, *Springer Handbook of Enzymes Vol. 19: Class 1: Oxidoreductases IV: EC 1.1.2-1.1.99*, 2<sup>nd</sup> ed., Springer, Berlin, 424 s.
- Schomburg, D., 2005, BRENDA Enzyme Database, Release 5.1 [online]. Kilde: Cologne University Bioinformatics Center. Tilgjengelig fra: <http://brenda.bc.uni-koeln.de> [Nedlastet 14.09.2005]
- SciEd, 2005, Clone Manager Suite 8 [online]. Kilde: Scientific & Educational Software. Tilgjengelig fra: [http://www.sciEd.com/ses\\_ste8.htm](http://www.sciEd.com/ses_ste8.htm) [Nedlastet 04.11.2005]
- Scrutton, M.C. og Taylor, B.L., 1974, Isolation and characterization of pyruvate carboxylase from *Azotobacter vinelandii* OP, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **164**: 641-654
- Segura, D. og Espín, G., 2004, Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium, *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**: 414-418
- Shinabarger, D., Berry, A., May, T.B., Rothmel, R., Fialho, A. og Chakrabarty, A.M., 1991, Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase, *The Journal of Biological Chemistry* **266** (4): 2080-2088
- Silo-Suh, L., Suh, S., Phibbs, P.V. og Ohman, D.E., 2005, Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment can include deregulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Journal of Bacteriology* **187** (22): 7561-7568
- Simon, R., Priefer, U. og Pühler, A., 1983, A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria, *Bio/Technology* **1**: 784-791
- Skjåk-Bræk, G. og Espevik, T., 1996, Application of alginate gels in biotechnology and biomedicine, *Carbohydrates in Europe* **14**: 19-25
- Skjåk-Bræk, G., Grasdalen, H. og Larsen, B., 1986, Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates, *Carbohydrate Research* **154**: 239-250

- 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**: 169-174
- Skjåk-Bræk, G., Zanetti, F. og Paoletti, S., 1989, Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates, *Carbohydrate Research* **185** (1): 131-138
- Sletta, H., Nedal, A., Aune, T.E.V., Hellebust, H., Hakvåg, S., Aune, R., Ellingsen, T.E., Valla, S. og Brautaset, T., 2004, Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology* **70** (12): 7033-7039
- Smidsrød, O. og Draget, K.I., 1996, Chemistry and physical properties of alginates, *Carbohydrates in Europe* **14**: 6-13
- Smidsrød, O., Glover, R.M. og Whittington, S.G., 1973, The relative extension of alginates having different chemical composition, *Carbohydrate research* **27** (1): 107-118
- Smidsrød, O. og Haug, A., 1965, The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions I. Calcium ions, *Acta Chemica Scandinavica* **19**: 329-340
- Smidsrød, O. og Moe, S.T., 1995, *Biopolymerkjemi*, 2. utg., Tapir Forlag, Trondheim, 459 s.
- Steinbüchel, A., 1986, Expression of the *Escherichia coli* *pfkA* gene in *Alcaligenes eutrophus* and in other gram-negative bacteria, *Journal of Bacteriology* **166** (1): 319-327
- Stinson, M.W., Cohen, M.A. og Merrick, J.M., 1977, Purification and properties of the periplasmic glucose-binding protein of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **131**: 672-681
- Stournaras, C., Maurer, P. og Kurz, G., 1983, 6-Phospho-D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*; Properties and subunit structure, *European Journal of Biochemistry* **130**: 391-396
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L. *et al.*, 2000, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature* **406**: 959-964
- Strand, B.L., Mørch, Y.A. og Skjåk-Bræk, G., 2000, Alginate as immobilization matrix for cells, *Minerva Biotecnologica* **12** (4): 223-233
- Strand, B.L., Mørch, Y.A., Syvertsen, K.R., Espevik, T. og Skjåk-Bræk, G., 2003, Microcapsules made by enzymatically tailored alginate, *Journal of Biomedical Materials Research* **64A** (3): 540-550
- Svanem, B.I.G., Skjåk-Bræk, G., Ertesvåg, H. og Valla, S., 1999, Cloning and expression of three new *Azotobacter vinelandii* genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5-epimerases, *Journal of Bacteriology* **181** (1): 68-77
- Svegården, I. og Aamodt, K., 2002, *Bruk av bioinformatikk for å sammenligne karbohydratmetabolismen i Pseudomonas fluorescens og Azotobacter vinelandii, med fokus på nedbrytingen av karbonkilder mot alginatsyntesen*, Prosjektoppgave i SIK4090 Fordypningsemnet i bioteknologi, NTNU, Trondheim, 62 s.
- Swanson, B.L., Hager, P., Phibbs (Jr.), P., Ochsner, U., Vasil, M.L. og Hamood, A.N., 2000, Characterization of the 2-ketogluconate utilization operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Molecular Microbiology* **37** (3): 561-573
- Tatnell, P.J., Russell, N.J. og Gacesa, P., 1994, GDP-mannose dehydrogenase is the key regulatory enzyme in alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence from metabolite studies, *Microbiology* **140** (7): 1745-1754
- Temple, L., Sage, A., Christie, G.E. og Phibbs, P.V. (Jr), 1994, Two genes for carbohydrate catabolism are divergently transcribed from a region of DNA containing the *hexC* locus in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Journal of Bacteriology* **176** (15): 4700-4709

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. og Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research* **22** (22): 4673-4680
- Vazquez, A., Moreno, S., Guzmán, J., Alvarado, A. og Espín, G., 1999, Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: Characterization of *algF* mutants, *Gene* **232** (2): 217-222
- Whiting, P.H., Midgley, M. og Dawes, E.A., 1976a, The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate and of glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemical Journal* **154** (3): 659-668
- Whiting, P.H., Midgley, M. og Dawes, E.A., 1976b, The role of glucose limitation in the regulation of the transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of General Microbiology* **92** (2): 304-310
- Wong, T.Y., Preston, L.A. og Schiller, N.L., 2000, Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications, *Annual Review of Microbiology* **54**: 289-340
- Wood, T., 1985, *The Pentose Phosphate Pathway*, Academic Press, Orlando, 204 s.
- Wood, W.A., 1955, Pathways of carbohydrate degradation in *Pseudomonas fluorescens*, *Bacteriological Reviews* **19**: 222-233
- Wood, W.A. og Schwerdt, R.F., 1954, Carbohydrate oxidation in *Pseudomonas fluorescens* II. Mechanism of hexose phosphate oxidation, *The Journal of Biological Chemistry* **206** (2): 625-635
- Wylie, J.L. og Worobec, E.A., 1994, Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* glucose-selective OprB porin gene and distribution of OprB within the family *Pseudomonadaceae*, *European Journal of Biochemistry* **220**: 505-512
- Wylie, J.L. og Worobec, E.A., 1995, The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **177** (11): 3021-3026
- Zhang, C.C., Durand, M.C., Jeanjean, R. og Josef, F., 1989, Molecular and genetical analysis of the fructose-glucose transport system in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, *Molecular Microbiology* **3** (9): 1221-1229
- Zielinski, N.A., Chakrabarty, A.M. og Berry, A., 1991, Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encoding phosphomannomutase, *The Journal of Biological Chemistry* **266** (15): 9754-9763
- Zumft, W.G., 2004, Denitrification by pseudomonads: Control and assembly processes. Ramos, J. (Red.), *Pseudomonas Vol. 3: Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, s. 193-227
- Østgaard, K., 1992, Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates, *Carbohydrate Polymers* **19** (1): 51-59

## Bilagliste

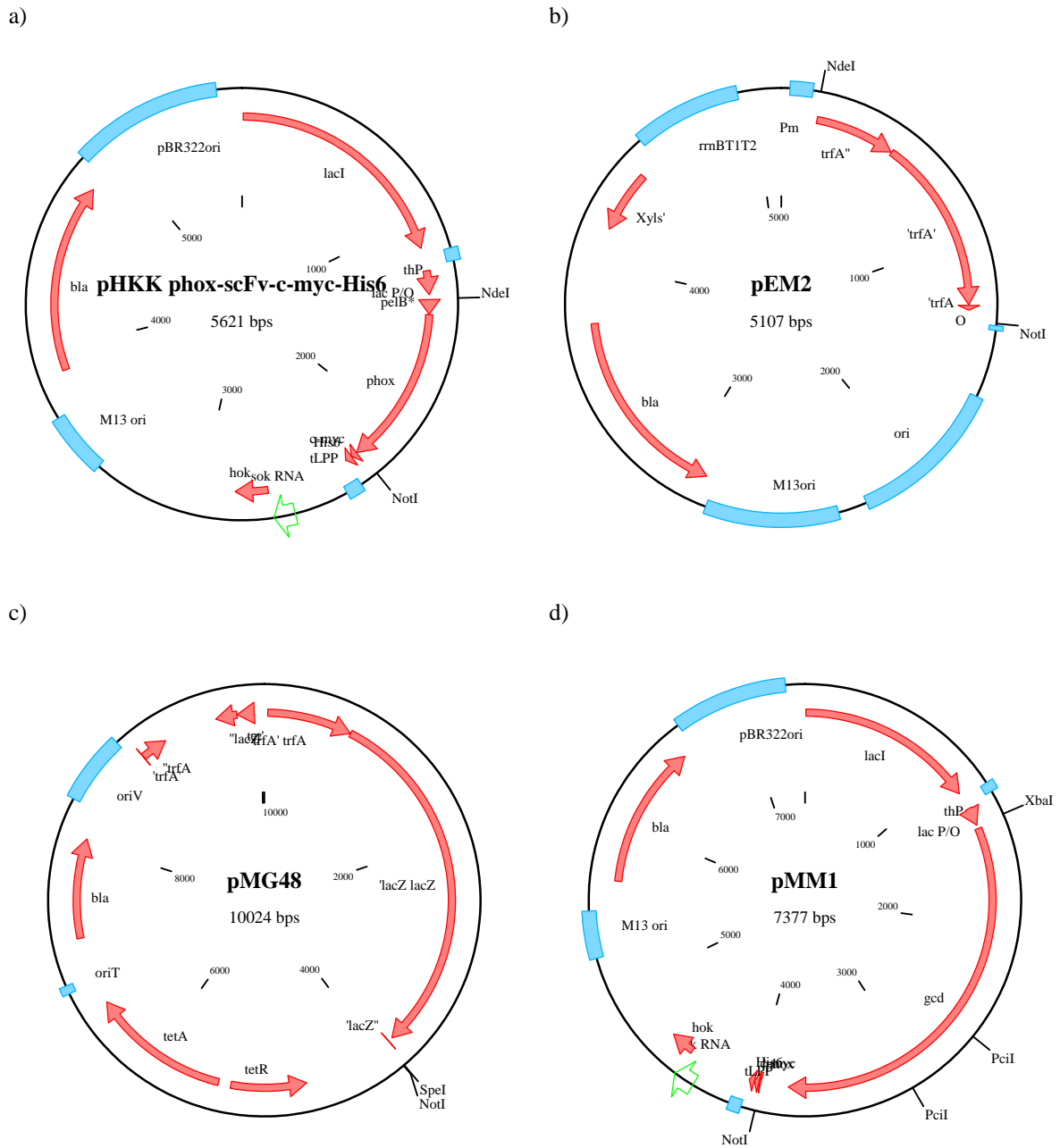
Bilag 1. Forkortelser.....	B1
Bilag 2. Plasmidkart.....	B2
Bilag 3. Gjenkjennelsesseter for restriksjonsendonukleaser .....	B4
Bilag 4. DNA-standard for gelelektroforese .....	B5
Bilag 5. Gensekvenser.....	B6
Bilag 6. Rådata for vekstundersøkelse med glukose som karbonkilde .....	B15
Bilag 7. Rådata og standardkurver for måling av proteinkonsentrasjoner.....	B17
Bilag 8. Rådata og beregninger for glukose dehydrogenase assay .....	B20
Bilag 9. Rådata og beregninger for glukose-6-fosfat dehydrogenase assay .....	B29
Bilag 10. Rådata og standardkurver for enzymatisk alginatanalyse .....	B44

## Bilag 1. Forkortelser

$A_{\lambda}$ :	absorbans ved bølgelengde $\lambda$
ADP:	adenosindifosfat
AMP:	adenosinmonofosfat
Ap:	ampicillin
Ap <sup>r</sup> :	ampicillin-resistent
ATP:	adenosintrifosfat
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BSA:	bovint serum albumin
CUT:	carbohydrate uptake transporter
DCIP:	2,6-dikloroindofenol
DDBJ:	DNA Databank of Japan
ED:	Entner-Doudoroff
ddNTP:	dideoksynukleotid
dNTP:	deoksynukleotid
EDTA:	etylendiamintetraeddiksyre
EM:	Emden-Meyerhof
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory
FHS:	fukose:H <sup>+</sup> symporter
G:	guluronsyre
GBP:	glukosebindende protein
GTP:	guanosintrifosfat
HSP:	high-scoring segment pair
KDPG:	2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukonat
KEGG:	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB:	Luria-Bertani
M:	mannuronsyre
MFS:	major facilitator superfamiliy
MOPS:	3-( <i>N</i> -morfolino)propansvovelsyre
NAD <sup>+</sup> /NADH:	nikotinamidadenindinukleotid (oksidert og redusert form)
NADP <sup>+</sup> /NADPH:	nikotinamidadenindinukleotidfosfat (oksidert og redusert form)
NEB:	New England Biolabs
OD <sub><math>\lambda</math></sub> :	optisk tetthet ved bølgelengde $\lambda$
ORF:	open reading frame (åpen leseramme)
P <sub>i</sub> :	ortofosfat
PP <sub>i</sub> :	pyrofosfat
PCR:	polymerase chain reaction
PEP:	fosfoenolpyruvat
PIA:	Pseudomonas Isolation Agar
PTS:	fosfotransferasesystem
SAM:	S-adenosylmetionin
SP:	sukkerporter
Tc:	tetracyclin
Tc <sup>r</sup> :	tetracyclin-resistent
Tc <sup>s</sup> :	tetracyclin-sensitiv
TrEMBL:	“translation of EMBL nucleotide sequences”
XGal:	5-bromo-4-kloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

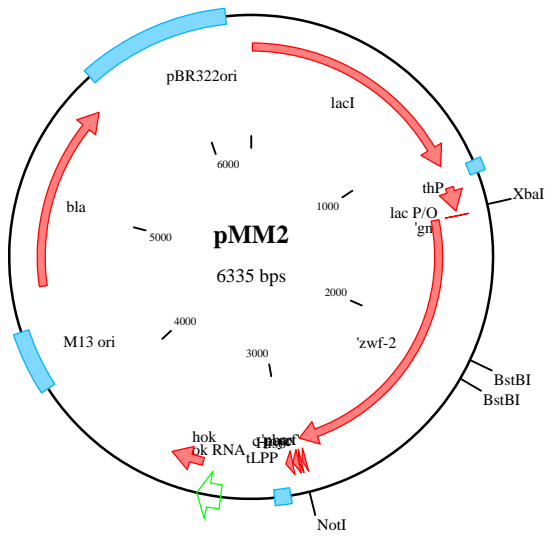
## Bilag 2. Plasmidkart

Plasmidkart for pHKK*phOx-scFv-c-myc-His6*, pEM2, pMG48, pMM1, pMM2, pMM3 og pMM4 er gitt i figur B.2.1. Gjenkjennelsessteder for restriksjonsenzymene benyttet for kloning og innføring av deleksjoner er avmerket på kartene.

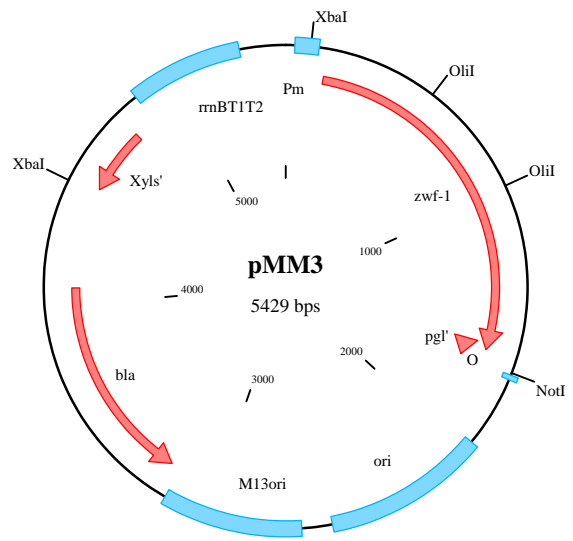


**Figur B.2.1:** Plasmidkart for a) pHKK*phOx-scFv-c-myc-His6*, b) pEM2, c) pMG48, d) pMM1, e) pMM2, f) pMM3 og g) pMM4. Kuttsteder benyttet for kloning og innføring av deleksjoner er avmerket på kartene.

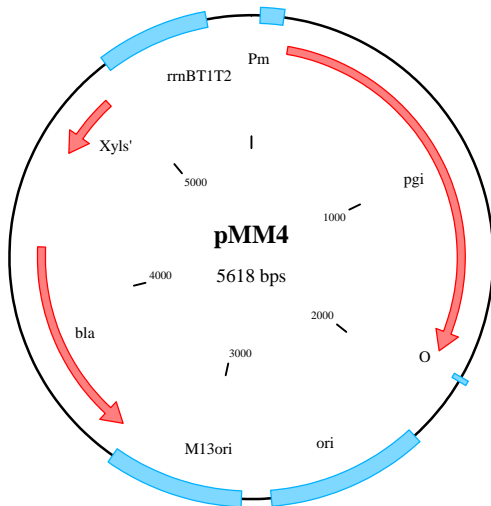
e)



f)



g)



**Figur B2.1:** Plasmidkart for a) pHKK*phOx-scFv-c-myc-His6*, b) pEM2, c) pMG48, d) pMM1, e) pMM2, f) pMM3 og g) pMM4. Kuttsetter benyttet for kloning og innføring av delesjoner er avmerket på kartene.

### Bilag 3. Gjenkjennelsesseter for restriksjonsendonukleaser

Tabell B3.1 angir gjenkjennelsessetene og kuttemønsteret til restriksjonsendonukleasene benyttet i arbeidet med denne oppgaven.

**Tabell B3.1:** Gjenkjennelsesseter for restriksjonsendonukleasene benyttet i arbeidet med denne oppgaven. Tabellen angir også enzymenes kuttemønster.

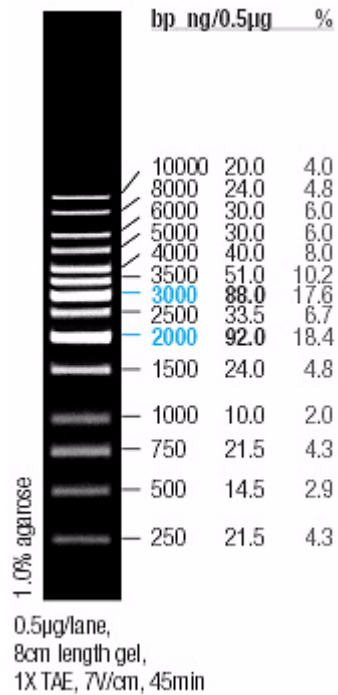
Restriksjonsenzym	Gjenkjennelsessete med kuttemønster <sup>a</sup>
<i>Bsa</i> AI	5'-YACGTR-3' 3'-RTGCAY-5'
<i>Bst</i> BI	5'-TTCGAA-3' 3'-AAGCTT-5'
<i>Drd</i> I	5'-GACNNNNNGTC-3' 3'-CTGNNNNNCAG-5'
<i>Eco</i> 57I	5'-CTGAAGNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' 3'-GACTTCNNNNNNNNNNNNNNNN-5'
<i>Hind</i> III	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'
<i>Nco</i> I	5'-CCATGG-3' 3'-GGTACC-5'
<i>Nde</i> I	5'-CATATG-3' 3'-GTATAC-5'
<i>Not</i> I	5'-GCGGCCGC-3' 3'-CGCCGGCG-5'
<i>Oli</i> I	5'-CACNNNGTG-3' 3'-GTGNNNCAC-5'
<i>Pci</i> I	5'-ACATGT-3' 3'-TGTACA-5'
<i>Pml</i> I	5'-CACGTG-3' 3'-GTGCAC-5'
<i>Psh</i> AI	5'-GACNNNGTC-3' 3'-CTGNNNCAG-5'
<i>Psi</i> I	5'-TTATAA-3' 3'-AATATT-5'
<i>Spe</i> I	5'-ACTAGT-3' 3'-TGATCA-5'
<i>Xba</i> I	5'-TCTAGA-3' 3'-AGATCT-5'

a. N: vilkårlig nukleotid, Y: pyrimidin, R: purin. Kuttemønster er indikert ved at de resulterende endene er farget henholdsvis rød og blå.



## Bilag 4. DNA-standard for gelelektroforese

Ved separasjon av DNA-fragmenter på agarosegel ble GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) (Figur B4.1) benyttet som standard. Ved hjelp av denne kunne størrelse og konsentrasjon estimeres for fragmentene i prøvene.



**Figur B4.1:** Fragmentstørrelser og -konsentrasjoner i GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas).

**Bilag 5. Gensekvenser**

Villtypesekvensen til genene *gcd*, *zwf-1*, *zwf-2* og *pgi* i *P. fluorescens* NCIMB 10525 ble funnet ved sekvensering av PCR-produkter inneholdende disse genene. Det ble observert noen forskjeller i forhold til tilsvarende sekvenser fra *P. fluorescens* SBW25. Det ble også foretatt sekvensering av de fire ovennevnte genene etter ligering inn i vektorer og transformering til *E. coli*. Det ble funnet punktmutasjoner i *gcd* og *zwf-1*. Sammenligninger av hvert av genene i SBW25, NCIMB 10525 og i plasmid er gitt under. Prikker angir at basen er den samme som i SBW25-sekvensen. Forskjeller i endene skyldes at nye kutteseter ble introdusert via primerne. Halen på sekvensene fra plasmider skyldes at enten fwd eller rev primer ble erstattet med M13/pUC rev 1233 ved sekvensering fra plasmider.

Sammenligning av *gcd*-sekvenser fra SBW25, NCIMB 10525 og pMM1:

SBW25	1	-----
NCIMB 10525	1	-----
pMM1	1	agcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgaatttctagagaag
SBW25	7	--aacacacatatgagcactgacgggtgcctcaagcccaagtcgcctgctgccaggtgc
NCIMB 10525	7	--t.ata.....a.....
pMM1	61	gag.t.t.....a.....
SBW25	59	taggcgtcttgctgctgatcatgggctggccttgttggccgggggatcaagctgagca
NCIMB 10525	59	.....
pMM1	121	.....
SBW25	119	tgctcgggtgggtcgctgtactacctgctggccggatcggcatcaccttgaccggcgctcc
NCIMB 10525	119	.....
pMM1	181	.....
SBW25	179	tgctgctggccaccgccgcgcgcttgggtctgtacgcactgggtgctggttcgccagca
NCIMB 10525	179	.....
pMM1	241	.....
SBW25	239	ccgtgtgggccttgtgggaagtcggcctggactgggtggcagttgggtgccgcgctggcgc
NCIMB 10525	239	.....
pMM1	301	.....
SBW25	299	tgctgttcgccctgggtatcgatcatgctgctcccgtggtttcgccgctccgttgctgctg
NCIMB 10525	299	.....
pMM1	361	.....
SBW25	359	gccagcctgccccgctgggcactggcgcgcttgagcgtggccggtgctggccggtgcgg
NCIMB 10525	359	.....
pMM1	421	.....
SBW25	419	ctgccgttgccagccaattcaccaacccgggtgagatcaaggggtcaactggaccgcatg
NCIMB 10525	419	.....c.....c.....
pMM1	481	.....c.....c.....
SBW25	479	cgggtgccggcatggccagcgtgcgcgctcccaggccgatggcgactggaactcctacg
NCIMB 10525	479	...a.....a.....
pMM1	541	...a.....a.....
SBW25	539	gccgttcggcctacggtgatcgctactcgccgctggcacagatcactccgaaaacgccc
NCIMB 10525	539	.....
pMM1	601	.....

Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	599	acaaactggtgcctgcgtggaccttccgcaccggtgacatccctggcccgaatgatccag
NCIMB 10525	599	.....
pMM1	661	.....
SBW25	659	gcgagaccaccgcagaaaacaccccgctgaaagtcaacggcatgctctacgtgtgcacgc
NCIMB 10525	659	.....
pMM1	721	.....
SBW25	719	cgcacagccaggtgattgcactcgaccggacaccggcaaggaaatctggcgcttcgatc
NCIMB 10525	719	.....
pMM1	781	.....
SBW25	779	cgaagatcagcagccaggggtgcccagagaacttcaagggttggggcgacatgacctgccgtg
NCIMB 10525	779	.....
pMM1	841	.....
SBW25	839	gcgtgtcgtatcacgatgacgcccctacgcttccgagcagagcccgaccggcagcgcca
NCIMB 10525	839	.....
pMM1	901	.....
SBW25	899	gccccgcgctgcaccgaatgcctgcccgaacgtattttcgtaccgactgccgacacc
NCIMB 10525	899	.....
pMM1	961	.....
SBW25	959	gtctgatcgccctcaacgcccgcacaccggcaagatgtgcaagacttcggcgacaaaggcc
NCIMB 10525	959	.....t.....
pMM1	1021	.....t.....
SBW25	1019	aggtcgacctgcgtgccaacatcggcagcttcgccccaggcggttactactccacgtcgc
NCIMB 10525	1019	.....
pMM1	1081	.....
SBW25	1079	caccggcgtgaccaagaacctgggtggtgatcggcgccacgtcaccgataacgtttcca
NCIMB 10525	1079	.....
pMM1	1141	.....
SBW25	1139	ccgacgagccaagcggcgtgatccgcgcttcgacgtgcacaccggcaagctgggtgtgga
NCIMB 10525	1139	.....
pMM1	1201	.....
SBW25	1199	actgggatagcggcaaccggacgacaccacgcccgttggccgagggcaagacctacacc
NCIMB 10525	1199	.....c.....
pMM1	1261	.....c.....
SBW25	1259	gcaactcgccgaacatgtggtccatgttcgcccgtggatgaaaaactcggcatgctgtacc
NCIMB 10525	1259	.....
pMM1	1321	.....
SBW25	1319	tgccgatgggcaaccagatgcccgaccaatacggcggcgaccgtaccgaagactcggaaa
NCIMB 10525	1319	.....
pMM1	1381	.....
SBW25	1379	aatacagcgccggcctgaccgcccctggacatcgacagcggccacgtgaagtggaccttc
NCIMB 10525	1379	.....
pMM1	1441	.....c.....
SBW25	1439	agttcaccaccacgacctgtgggacatggacgtggcgccagccttcgctcatcgaca
NCIMB 10525	1439	.....
pMM1	1501	.....
SBW25	1499	tcaagaccgctgaaggcgtgaagcaagcgggtgatggcgtcgaccaagcaaggcagcatct
NCIMB 10525	1499	.....
pMM1	1561	.....

Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	1559	acgtgctggaccgcgccaccggccaaccggttggtgccgatccacgaagtggcggtaccgc
NCIMB 10525	1559	.....
pMM1	1621	.....
SBW25	1619	aaggtgcggtcgcgggcgaccacacgtcgccgaccaaccaagtccgacctgaactca
NCIMB 10525	1619	.....
pMM1	1681	.....
SBW25	1679	tgccgccgctcaaagagcgcgacatgtggggcgtgacgccgttcgaccagatgctgt
NCIMB 10525	1679	.....
pMM1	1741	.....
SBW25	1739	gccggattgatttcaaatccatgcgctacgacgggtgctttcaccceggccatcgctgcaag
NCIMB 10525	1739	.....
pMM1	1801	.....
SBW25	1799	gctcgatcgtttaccaggaacttcggcgtgttcgactgggggtggcatttcgctcgacc
NCIMB 10525	1799	.....
pMM1	1861	.....
SBW25	1859	cggttcgccagattgccttcgtgaaccaagctacatggcgttcaaatcgaaactgatcc
NCIMB 10525	1859	.....
pMM1	1921	.....
SBW25	1919	cggccgcccagatcgccaagcaaggtccacgcgtcagcgaaacgaaggcgtgcagccga
NCIMB 10525	1919	.....
pMM1	1981	.....
SBW25	1979	acaaaggcgcgccgtacggcgtgatcctcgaagccatgctgctcgccaatgggcctgccgt
NCIMB 10525	1979	.....
pMM1	2041	.....
SBW25	2039	gccaggcaccggcgtggggctatgtggcggcggtcgacctgaccaccacaaaaccctct
NCIMB 10525	2039	.....
pMM1	2101	.....
SBW25	2099	ggatgcacaagaacggcaccgtgctgacagctcgccggttccaatcccgtgaccatgg
NCIMB 10525	2099	.....
pMM1	2161	.....
SBW25	2159	gcgtagcttagcctgggcgccaccttcaccaccgcccgtggcggtgctcctcagcggta
NCIMB 10525	2159	.....
pMM1	2221	.....
SBW25	2219	ccctcgaccagtacctgcgtgcctacgacgtcaaaaacggcaagcaactgtgggaaggcc
NCIMB 10525	2219	.....
pMM1	2281	.....
SBW25	2279	gcctgcctgcaggcgcgcaaaccacaccgatgacctacaccggcaaggacggcaagcagt
NCIMB 10525	2279	.....
pMM1	2341	.....
SBW25	2339	acgtgctgggtcatggccggcgtcatggctccctgggtaccaagcagggtgactatgtga
NCIMB 10525	2339	.....
pMM1	2401	.....
SBW25	2399	tggcgttcaaaactgccggattaagcgacaccgacaacaagactgtgggaggggacaagcc
NCIMB 10525	2399	.....
pMM1	2461	.....

Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	2459	ccctcccacagttgcatcagtggttcgatcacttccccgcgcatcaccgccagccgcgca
NCIMB 10525	2459	.....
pMM1	2521	.....
SBW25	2519	atcagggcattctgtaccggcactgcaatcccctcgctgtccatcgccctgatcaagtct
NCIMB 10525	2519	.....
pMM1	2581	.....
SBW25	2579	tccaccaacgcattgaaatcact
NCIMB 10525	2579	.....gc.gccg.tta
pMM1	2641	.....gc.gccg.--

Sammenligning av *zwf-1*-sekvenser fra SBW25, NCIMB 10525 og pMM3:

SBW25	1	acaaacatcatgccttcgataaccgtagaacctgcacctttgcctgtttggcgcttg
NCIMB 10525	1	tgctg.cat.....
pMM3	1	-----cat.....
SBW25	61	ggtgatctggcgctgcgcaagttatctcctgcctctaccaacttgatggcgcggggctc
NCIMB 10525	61	.....
pMM3	55	.....
SBW25	121	ctgcacgacgacacgcgcatcctggcctggcccgggaagccggttccgagcaacagcac
NCIMB 10525	121	.....t.....g.....
pMM3	115	.....t.....g.....
SBW25	181	ctggcgcacatcgaacaagcactgcgcaaatcgtcggcaaggaactggacgaaaccatc
NCIMB 10525	181	.....
pMM3	175	.....
SBW25	241	gccagcgtttcctggcgcgctgacctatgttcacgtcgacttcatgaaagccgatgac
NCIMB 10525	241	.....
pMM3	235	.....t.....
SBW25	301	tacgtggcctggcggaatcgccggcactgcgcagcgctgatcgccacttcgccacc
NCIMB 10525	301	.....a.....
pMM3	295	.....a.....
SBW25	361	ccggcgcggtgtacggcgcatctgcgagaacctgtcgaaggtcggcctggcggaaaac
NCIMB 10525	361	.....
pMM3	355	.....
SBW25	421	accgcgtggtgctggaaaaaccatcggttcggacctggagtcctcgcgcaaggtcaac
NCIMB 10525	421	.....g.....
pMM3	415	.....g.....
SBW25	481	gatgccgtggcgagttttcccgagaaaccgcacctaccgcatcgaccactacctgggc
NCIMB 10525	481	..c.....
pMM3	475	..c.....
SBW25	541	aaagagaccgtccagaacctgatcgccctgcggttcgccaacagcctgttcgaaaccag
NCIMB 10525	541	.....
pMM3	535	.....
SBW25	601	tggaaccagaactacatctcccacgtggaatcaccgtggccgagcaggtcggatcgaa
NCIMB 10525	601	.....
pMM3	595	.....
SBW25	661	ggcgttggggctatctcgacaaggccggccagctgcgtgacatgatccagaaccacctg
NCIMB 10525	661	.....
pMM3	655	.....

Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	721	ctgcaactgctttgctgatcgccatggaccgcggcgacactgtccgcgacagcatc
NCIMB 10525	721	.....t.....
pMM3	715	.....t.....
SBW25	781	cgcgacgagaaggtcaaggtgctcaaggccctggcgccgatcagcccggatggcctgacc
NCIMB 10525	781	.....a.....
pMM3	775	.....a.....
SBW25	841	acccaagtggtacgcggccagtacatcgccggctacagcgccggcaagccggtgccgggt
NCIMB 10525	841	.....
pMM3	835	.....
SBW25	901	tacctggaagaagagaactccaacaccagagcgacaccgagaccttcgtcgccctgcgt
NCIMB 10525	901	...t...g.....
pMM3	895	...t...g.....
SBW25	961	gccgatatccgcaactggcgatgggcccgggtgccgttctacctgcgaccggcaagcgt
NCIMB 10525	961	.....
pMM3	955	.....
SBW25	1021	atgccgaaaagctgtcgcagatcgatccacttcaaggaaccgtcccactacatcttc
NCIMB 10525	1021	.....
pMM3	1015	.....
SBW25	1081	gccccgagcagcgctgcagatcagcaaaaactgatcatccgcctgcagccggacgaa
NCIMB 10525	1081	.....
pMM3	1075	.....
SBW25	1141	ggtatttctctgcgctgatgaccaaggagcagggcctggacaagggcatgcaactgcg
NCIMB 10525	1141	.....
pMM3	1135	.....
SBW25	1201	agcggcccgtgcaactgaatttttccgacacttaccgcagcggccgatcccggatgcc
NCIMB 10525	1201	.....c.....
pMM3	1195	.....c.....
SBW25	1261	tacgagcggttggtgctggaagtgatgcgaggcaatcagaacctgttggctcgcaaat
NCIMB 10525	1261	.....
pMM3	1255	.....
SBW25	1321	gaaatcgaagccgctggaagtgggtgaccagttgatcgccgggtgaaaaagtccggt
NCIMB 10525	1321	.....t.....
pMM3	1315	.....t.....
SBW25	1381	gatgcgcccagccgtacgcggcggttctggggccgatgagctcgattgcactgatc
NCIMB 10525	1381	.....
pMM3	1375	.....
SBW25	1441	acgcgggatgggaggtcgtggtatggcgatatctgaattgaaactgcctcaggggtgtgac
NCIMB 10525	1441	.....
pMM3	1435	.....
SBW25	1501	ggcccatgagtaccgtacgcctgcatgttggcgagc-----
NCIMB 10525	1501	.....cg.c.ctta-----
pMM3	1495	.....cg.c.c.ttggtataagagtcagaattcc
SBW25	1536	-----
NCIMB 10525	1536	-----
pMM3	1555	tcgagacgtacggtgcgcgcatgcattcgaagatctgccactagtgagtcgtattacg
SBW25	1539	-----
NCIMB 10525	1539	-----
pMM3	1615	tagctggcgtaatcatggtcatagctgttctctggtgaaattggtatccgct

Bilag 5. Gensekvenser

Sammenligning av zwf-2-sekvenser fra SBW25, NCIMB 10525 og pMM2:

SBW25	1	-----
NCIMB 10525	1	-----
pMM2	1	agcggataacaatttcacacaggaacagctatgaccatgattacgaatttctagagaag
SBW25	7	--gagacttccatgaccgccaacggcaagaaactcaaggccgaaccgctccgcccacca
NCIMB 10525	7	--t.ataacat.....
pMM2	61	ga..t.tacat.....
SBW25	59	ccctgtttctgtttggtgcccatggtgaccttgtaaagcgctgctgatgccggcgttgt
NCIMB 10525	59	.....
pMM2	121	.....
SBW25	119	acaacctcagtcgggatgggctgctggccgatggcttgcgcattgtcggcgttgatcaca
NCIMB 10525	119	.....
pMM2	181	.....
SBW25	179	acgccatcagcgatgccgatttcgccaagaaactcgaggacttcattcgtaccgaggccg
NCIMB 10525	179	.....
pMM2	241	.....
SBW25	239	cgagcaaggccaagggcaacgcggataacgcctcgcaccacaaactgtggcgcaattgg
NCIMB 10525	239	.....
pMM2	301	.....
SBW25	299	ccaagggcatcagctacgtcgagggcgattttctcgacgacagcacttacgtcgacatcg
NCIMB 10525	299	.....C.....C.....
pMM2	361	.....C.....C.....
SBW25	359	gcaagaagatcgccgacagcggcaccggcaacgcggtgttctacctggcaaccgcaccgc
NCIMB 10525	359	.....
pMM2	421	.....
SBW25	419	gcttcttcagcgacgtggtgcagcgctgggcagtgccggcctgctgacggagaccgacg
NCIMB 10525	419	.....
pMM2	481	.....
SBW25	479	acagtttccgtcgcgtggtcatcgagaagcccttcggctccgacctggccaccgccaag
NCIMB 10525	479	.....
pMM2	541	.....
SBW25	539	cgctgaacgccagcctgctcaaggatgatgagcgagaagcagatctatcgcatcgaccatt
NCIMB 10525	539	.....
pMM2	601	.....
SBW25	599	acctgggcaaggaaacggtgcagaacatcctgatcagccgtttctccaacgtgctgttcg
NCIMB 10525	599	.....
pMM2	661	.....
SBW25	659	aagcgttctggaacaaccattacattgaccacgtgcaaatcaccgcccgaaccgctcg
NCIMB 10525	659	.....
pMM2	721	.....
SBW25	719	gcgtagaaacacggggcaatttcttcgaaaaaacggcacggttgcgcgacatggtgccca
NCIMB 10525	719	.....
pMM2	781	.....
SBW25	779	atcacctgttccaactgctggcgatggtggccatggagccgcctgcagcctttggcgccg
NCIMB 10525	779	.....
pMM2	841	.....

Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	839	acgccgtgcgcgggcgagaaagccaaggtgattggcgccgtacgcccttgggtccctggagg
NCIMB 10525	839	.....
pMM2	901	.....
SBW25	899	atgcgcgggccaactcggtagcgggcagtagaccgcccggcgaaattggcggtaaacaat
NCIMB 10525	899	.....
pMM2	961	.....
SBW25	959	tgccgggctatcgcgagaagccaactggcgccctgacagcagcaccgagaccttcgtcg
NCIMB 10525	959	.....
pMM2	1021	.....
SBW25	1019	ccctcaaggtgatgatcgacaactggcgttgggtcggcgtgccgttctacctgcgaccg
NCIMB 10525	1019	.....
pMM2	1081	.....
SBW25	1079	gcaagcgcatgagcgtgcgcgacaccgaaatcgatcatctgcttcaagcccgcgccgatg
NCIMB 10525	1079	...a.....
pMM2	1141	...a.....
SBW25	1139	cgcagtttcgacacaccgaggtcgatgagctcaagccgacctacttgaagatccagatcc
NCIMB 10525	1139	.....C.....
pMM2	1201	.....C.....
SBW25	1199	aaccgaatgagggcatgtggttcgacctgctggcgaaaaagccggggccgaccctggaca
NCIMB 10525	1199	.....
pMM2	1261	.....
SBW25	1259	tggccaatatccagttgggctttgcctataaggacttcttcgagatgcaaccgtctaccg
NCIMB 10525	1259	.....
pMM2	1321	.....
SBW25	1319	ggtacgaaaccctgatctacgactgcatgaccggcgaccagaccttgttccagcgtgccg
NCIMB 10525	1319	.....
pMM2	1381	.....
SBW25	1379	acaacatcgagaacggctggcgtgcggtgcagccattcctcgatgctggaaggaagatg
NCIMB 10525	1379	.....
pMM2	1441	.....
SBW25	1439	acgggatccaggcctacaaggcgggtgaggatggcccggccgctgctgacgcctttgctgg
NCIMB 10525	1439	.....
pMM2	1501	.....
SBW25	1499	cccgtgatggccgcagctggcacagcctcggatgagtgacgcagcgattcatccatccg
NCIMB 10525	1499	.....gcgg.cg.tt
pMM2	1561	.....gcgg.cg.--
SBW25	1559	t
NCIMB 10525	1559	a
pMM2	1619	-

Sammenligning av *pgi*-sekvenser fra SBW25, NCIMB 10525 og pMM4:

SBW25	1	cccgcagcgatggcgtactaccgcactcctcatgacgttaccgctctgccgcctggcaa
NCIMB 10525	1	t.gt.gcat.....
pMM4	1	-----cat.....
SBW25	61	gcgctcaatcaacatcgccaagccatgcaggatttcagcatgcgcgaaagcattcaatgcc
NCIMB 10525	61	.....
pMM4	55	.....



Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	121	gatcctcagcgTTTTctcccagttcaccttgagcagctgCGGacttttctcgattactcg
NCIMB 10525	121	.....
pMM4	115	.....
SBW25	181	aaaaacctgatcaccagcGaaacccgtgacctcctcgtgggcctggccaaagaagtCGGc
NCIMB 10525	181	.....g.....
pMM4	175	.....g.....
SBW25	241	ctgaaagacgCGatcaattcGctgtatgCCggcgagCCcgtcaactcttccgaaggtCGc
NCIMB 10525	241	.....
pMM4	235	.....
SBW25	301	ccagcGctgcacaccGctctgCGccgtCCggTgggtgacaagctgtCGgtgaacGGcgtg
NCIMB 10525	301	.....
pMM4	295	.....
SBW25	361	aacatcatgCCggacgtgcacaaggtGctgaaccagatcactgacctGGtCGGCCgcatc
NCIMB 10525	361	.....
pMM4	355	.....
SBW25	421	catgatggcctgtGGcgtGGctacaccGaaagCCgatcaccgacgtGGtgaacatCGgt
NCIMB 10525	421	.....
pMM4	415	.....
SBW25	481	atCGgtGGctCGttcctCGGCCGgaactGGtctCCgaagCGttGttGtctacGCCcat
NCIMB 10525	481	.....g.....c.....t.....
pMM4	475	.....g.....c.....t.....
SBW25	541	aaaggCGtgCGctGCCattacctGGcGaaacatCGacGGcagCGagttCCacGagctGacc
NCIMB 10525	541	.....
pMM4	535	.....
SBW25	601	atgaagctgCGcCGcGagaccCGctGtttatCGtctCGtcaaaatccttcaacaccctc
NCIMB 10525	601	.....
pMM4	595	.....
SBW25	661	gaaaccctgaaaaacGCCagGCCGccCGcCGcctGGtacctGGctcagGGtGGctCGGaa
NCIMB 10525	661	.....
pMM4	655	.....
SBW25	721	gCCgagttGtatCGtCacttcatCGccGtatCCagcaacaacCGGGcagCCgtGGccttc
NCIMB 10525	721	.....
pMM4	715	.....
SBW25	781	GGtatCCGcGaaGaaacatcttCCcGatgtGGgactGGgtCGGCGccgttactcactg
NCIMB 10525	781	.....
pMM4	775	.....
SBW25	841	tGGtCGGCCatCGgcttGCCatCGccctGGCGatCGGcatGtCCaacttcaagGaaCTg
NCIMB 10525	841	.....
pMM4	835	.....
SBW25	901	ctgtCCGGtgCctacaccatGGaccagcatttCCagaacGCCcattCGaagCCaacatg
NCIMB 10525	901	.....
pMM4	895	.....
SBW25	961	CCGGtGctGctGGgcttGctGGGcgtGtGGtacGGcaacttctGGGGtGCGcagagCCac
NCIMB 10525	961	.....g.....
pMM4	955	.....g.....
SBW25	1021	gCGatcctGCCgtacGaccactacctGCGtaacatCCaagcacttGcaacagctGGac
NCIMB 10525	1021	.....
pMM4	1015	.....

Bilag 5. Gensekvenser

SBW25	1081	atggaatccaacggcaagagcggttcgccaggacggtagcccgctcgctaccgataccggc
NCIMB 10525	1081	.....a..a.....
pMM4	1075	.....a..a.....
SBW25	1141	ccggtgatctgggggtggcgtggggtgcaacggccagcacgcttaccaccagttgctgcat
NCIMB 10525	1141	.....
pMM4	1135	.....
SBW25	1201	caggggacccaactgatcccggccgacttcatcgtgccgatcgtcagcttcaaccgggtg
NCIMB 10525	1201	.....
pMM4	1195	.....
SBW25	1261	tccgaccaccatcagtggctgtacgccaactgcctgtcccagagccaggcgctgatgctc
NCIMB 10525	1261	.....
pMM4	1255	.....
SBW25	1321	ggcaagaccccgctcgaagccgaagccgagctgcgcgacaaaggcatcccggaagacgaa
NCIMB 10525	1321	.....
pMM4	1315	.....
SBW25	1381	gtgcagaagctggcaccgcacaaggtgatcccgggcaaccgtccgagcaacaccctcgtg
NCIMB 10525	1381	.....t.....
pMM4	1375	.....t.....
SBW25	1441	gtcgagcgcacatcagcccgcgtcgctgggggactggctcgccatgtatgagcacaaagtg
NCIMB 10525	1441	.....t.....
pMM4	1435	.....t.....
SBW25	1501	ttcgtgcagagcgtgatctggggcatcaacgccttcgaccaatggggcgtggaactgggc
NCIMB 10525	1501	.....
pMM4	1495	.....
SBW25	1561	aaagagctgggcaaaggcgtctacaaccgcctgaccggcgccgaagaaacctcggccgag
NCIMB 10525	1561	.....
pMM4	1555	.....
SBW25	1621	gacgcttcgaccaggcctgatcaactacttccgcggtcgtcaccgcggctgatacagg
NCIMB 10525	1621	.....
pMM4	1615	.....
SBW25	1681	tattgcagggccaaacgtccgtttggaggttggccttgaaccctcccc-----
NCIMB 10525	1681	.....cgg..g.tta-----
pMM4	1675	.....cgg..g.a.ttggtataagagt
SBW25	1725	-----
NCIMB 10525	1725	-----
pMM4	1735	cagaattcctcgagacgtacggtgcgcgcgatgcattcgaagatctgccactagtgagt
SBW25	1725	-----
NCIMB 10525	1725	-----
pMM4	1795	cgtattacgtagcttggcgtaatcatggatcatagctgttctcgtgtgaaattggtatcc
SBW25	1728	---
NCIMB 10525	1728	---
pMM4	1855	gct

**Bilag 6. Rådata for vekstundersøkelse med glukose som karbonkilde****Tabell B6.1:** Målt og beregnet OD<sub>600</sub> ved dyrking av *P. fluorescens* NCIMB 10525, Pf201 og delesjonsmutanter i DEF3 minimalmedium med 20 g/l glukose.

Stamme	Dyrkingstid (t)	Fortynning		Målt OD <sub>600</sub>		Beregnet OD <sub>600</sub>	
		I	II	I	II	I	II
NCIMB 10525	24	1:40	1:40	0,231	0,232	9,24	9,28
	48	1:50	1:50	0,196	0,197	9,80	9,85
	72	1:100	1:100	0,105	0,109	10,50	10,90
NCIMB 10525 <i>Δgcd</i>	24	1:40	1:40	0,221	0,231	8,84	9,24
	48	1:50	1:50	0,201	0,200	10,05	10,00
	72	1:100	1:100	0,106	0,104	10,60	10,40
NCIMB 10525 <i>Δzwf-1</i>	24	1:40	1:40	0,405	0,402	16,20	16,08
	48	1:50	1:50	0,278	0,271	13,90	13,55
	72	1:100	1:100	0,126	0,127	12,60	12,70
NCIMB 10525 <i>Δzwf-2</i>	24	1:40	1:40	0,233	0,223	9,32	8,92
	48	1:50	1:50	0,201	0,202	10,05	10,10
	72	1:100	1:100	0,104	0,103	10,40	10,30
NCIMB 10525 <i>Δzwf-1Δzwf-2</i>	24	1:20	1:20	0,082	0,079	1,64	1,58
	48	1:50	1:50	0,109	0,102	5,45	5,10
	72	1:100	1:100	0,121	0,112	12,10	11,20
Pf201	24	1:40	1:20	0,241	0,312	9,64	6,24
	48	1:50	1:50	0,218	0,121	10,90	6,05
	72	1:100	1:100	0,109	0,073	10,90	7,30
Pf201 <i>Δgcd</i>	24	1:20	1:20	0,099	0,072	1,98	1,44
	48	1:50	1:50	0,114	0,097	5,70	4,85
	72	1:100	1:100	0,065	0,069	6,50	6,90
Pf201 <i>Δzwf-1</i>	24	1:10	1:20	0,021	0,194	0,21	3,88
	48	1:50	1:50	0,263	0,295	13,15	14,75
	72	1:100	1:100	0,120	0,127	12,00	12,70
Pf201 <i>Δzwf-2</i>	24	1:40	1:20	0,232	0,322	9,28	6,44
	48	1:50	1:50	0,226	0,145	11,30	7,25
	72	1:100	1:100	0,109	0,078	10,90	7,80

Det ble undersøkt om delesjonsmutantene *P. fluorescens* NCIMB 10525*Δgcd*, NCIMB 10525*Δzwf-1*, NCIMB 10525*Δzwf-2*, NCIMB 10525*Δzwf-1Δzwf-2*, Pf201*Δgcd*, Pf201*Δzwf-1* og Pf201*Δzwf-2* vokste i DEF3-minimalmedium med 20 g/l glukose. Som referanser ble

utgangstammene NCIMB 10525 og Pf201 dyrket i samme medium.

Celletetthet i to uavhengige kulturer per stamme ble målt som OD<sub>600</sub>. Målinger ble utført med Spectramax Plus 384 (Molecular Devices), og DEF3 med 20 g/l glukose ble benyttet som blank. Rådata fra disse målingene er gitt i tabell B6.1.

**Bilag 7. Rådata og standardkurver for måling av proteinkonsentrasjoner**

Proteinkonsentrasjoner i vaskede cellesuspensjoner av *P. fluorescens* NCIMB 10525, Pf201 og  $\Delta gcd$ -mutanter, og i cellefri ekstrakter fra NCIMB 10525, Pf201,  $\Delta zwf-1$ - og  $\Delta zwf-2$ -mutanter ble målt ved hjelp av Bio-Rad Protein Assay. Rådata fra måling av absorbans ved 595 nm i standardprøvene er samlet i tabell B7.1.

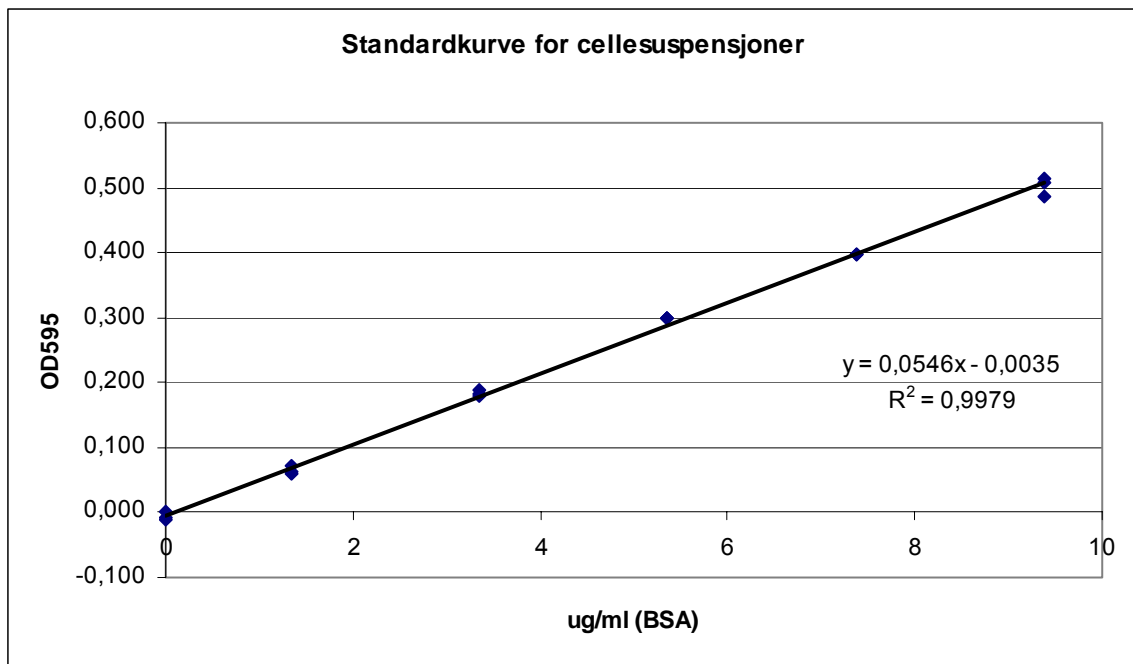
**Tabell B7.1:** Målt absorbans ved 595 nm for standardene (BSA) benyttet ved bestemmelse av proteinkonsentrasjon i cellesuspensjoner og cellefri ekstrakter.

BSA-konsentrasjon ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_{595}$		
	I	II	III
<i>Standarder for bestemmelse av proteinkonsentrasjon i cellesuspensjoner</i>			
0,00	0,000	-0,008	-0,012
1,34	0,063	0,073	0,061
3,35	0,180	0,181	0,188
5,36	0,299	0,300	0,300
7,37	0,312 <sup>a</sup>	0,397	0,398
9,38	0,487	0,508	0,513
<i>Standarder for bestemmelse av proteinkonsentrasjon i cellefri ekstrakter</i>			
0,00	0,000	-0,009	-0,007
1,34	0,041	0,057	0,056
3,35	0,166	0,160	0,145
5,36	0,245	0,250	0,247
7,37	0,346	0,332	0,358
9,38	0,438	0,424	0,419

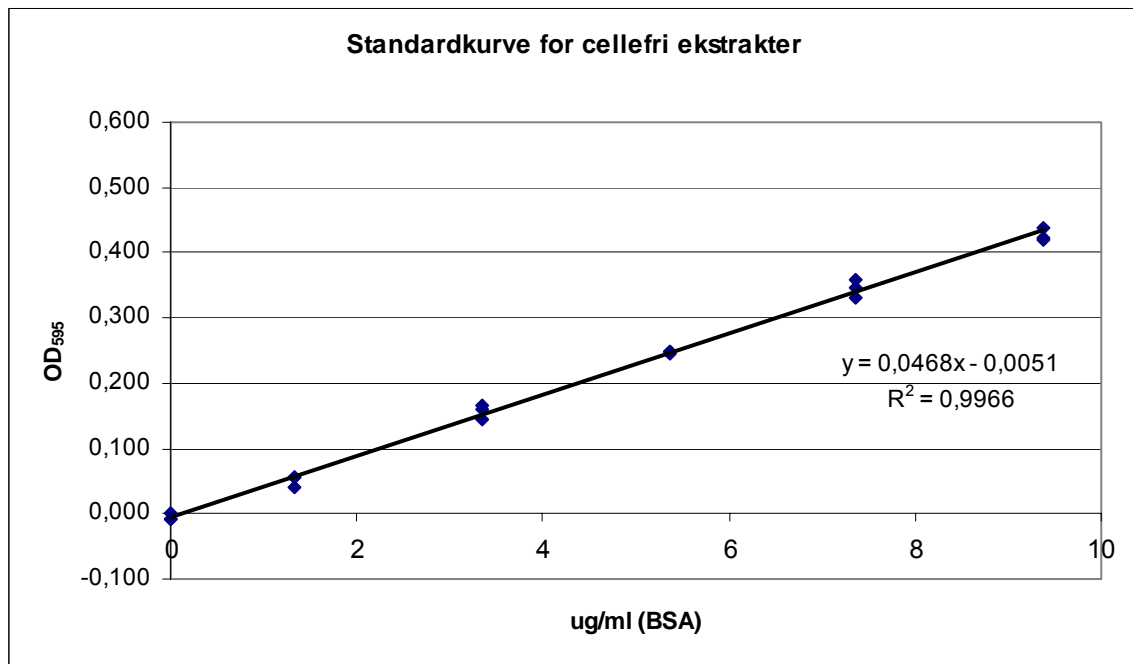
a. Utelatt ved tegning av standardkurve.

Standardkurver basert på dataene i tabell B7.1 er vist i figur B7.1. Standardkurvene ble benyttet for bestemme proteinkonsentrasjon i cellesuspensjoner og cellefri ekstrakter. Rådata fra måling av absorbans ved 595 nm i prøvene er gitt i tabell B7.2.

a)



b)



**Figur B7.1:** Standardkurver for bestemmelse av proteinkonsentrasjoner i **a)** vaskede celleduspensjoner, og **b)** celledfri ekstrakter.

**Tabell B7.2:** Målt absorbans ved 595 nm for prøver av vaskede celleduspensjoner og cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Vaskede celleduspensjoner og cellefri ekstrakter ble fortynnet 1:1000 før målingene ble foretatt. Det ble målt tre paralleller for hver av suspensjonene/ekstraktene.

Stamme	$A_{595}$							
	Dyrket i DEF3 med 2 g/l glukose				Dyrket i DEF3 med 20 g/l glukose			
	I	II	III	Gj.snitt	I	II	III	Gj.snitt
<i>Vaskede celleduspensjoner</i>								
NCIMB 10525	0,222	0,238	0,243	0,234	0,253	0,238	0,247	0,246
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>gcd</i>	0,220	0,237	0,223	0,227	0,191	0,164	0,170	0,175
Pf201	0,233	0,214	0,220	0,222	0,189	0,182	0,181	0,184
Pf201 $\Delta$ <i>gcd</i>	0,177	0,176	0,189	0,181	0,353 <sup>a</sup>	0,198	0,194	0,196
<i>Cellefri ekstrakter</i>								
NCIMB 10525	0,111	0,104	0,104	0,106	0,127	0,137	0,129	0,131
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	0,095	0,121	0,115	0,110	0,087	0,092	0,091	0,090
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	0,094	0,080	0,080	0,085	0,096	0,116	0,101	0,104
NCIMB 10525 $\Delta$ <i>zwf-1</i> $\Delta$ <i>zwf-2</i>	0,058 <sup>a</sup>	0,114	0,098	0,106	0,100	0,104	0,089	0,098
Pf201	0,086	0,078	0,078	0,081	0,072	0,067	0,063	0,067
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-1</i>	0,021 <sup>a</sup>	0,068	0,082	0,075	0,084	0,090	0,090	0,088
Pf201 $\Delta$ <i>zwf-2</i>	0,062	0,052	0,061	0,058	0,016	0,018	0,016	0,017

a. Utelatt ved beregning av gjennomsnitt.

## Bilag 8. Rådata og beregninger for glukose dehydrogenase assay

Aktivitet av glukose dehydrogenase ble målt som DCIP-reduksjon ved 600 nm, i vaskede celle-suspensjoner av *P. fluorescens* NCIMB, Pf201 og  $\Delta gcd$ -mutanter.  $A_{600}$  ble målt i assayblanding med og uten glukose. Det ble målt tre paralleller med glukose og tre paralleller uten glukose for hver prøve. Assayblanding uten DCIP ble benyttet for blank-prøver. Rådata fra målingene (med blank-verdier trukket fra) er gitt i figur B8.1.

DCIP<sub>oks</sub>-konsentrasjon (M) beregnes ved hjelp av følgende likning (Dean, 1999):

$$A_{\lambda} = \varepsilon c l \quad (\text{B8.1})$$

$A_{\lambda}$ : absorbans ved bølgelengde  $\lambda$   
 $\varepsilon$ : molar ekstinksjonskoeffisient ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )  
 $c$ : molar konsentrasjon (M)  
 $l$ : lysbanens lengde (cm)

Det ble benyttet en molar ekstinksjonskoeffisient på  $21,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for DCIP ved 600 nm og pH 7,4 (Armstrong, 1964). Ved assayvolum på 200  $\mu\text{l}$  i 96-brønns plate (Nunc) ble lysbanens lengde beregnet å være 0,611 cm.

Figur B8.2 viser et plott av DCIP<sub>oks</sub> ( $\mu\text{mol/ml}$ ) mot tid (min), med uspesifikk reduksjon av DCIP trukket fra. En enhet aktivitet (U) gir reduksjon av 1  $\mu\text{mol}$  DCIP per minutt ved de aktuelle forholdene. Spesifikk aktivitet (U/mg celleprotein) beregnes ved følgende likning:

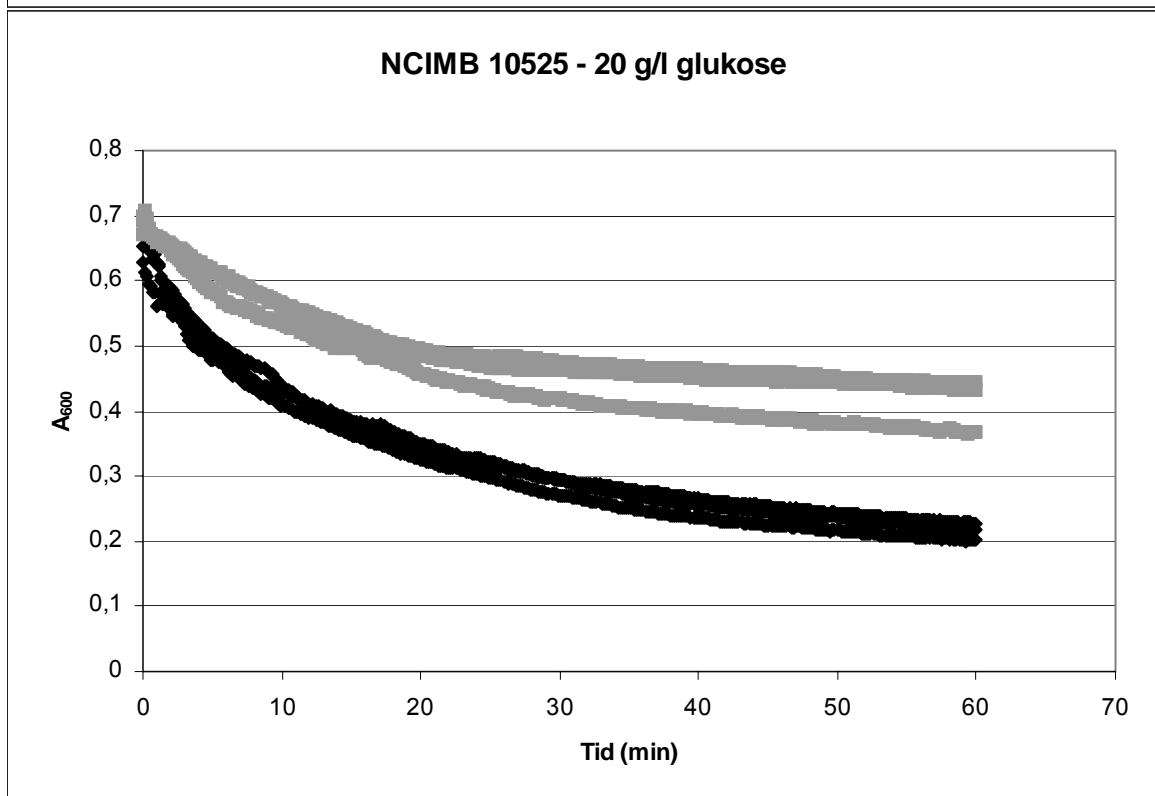
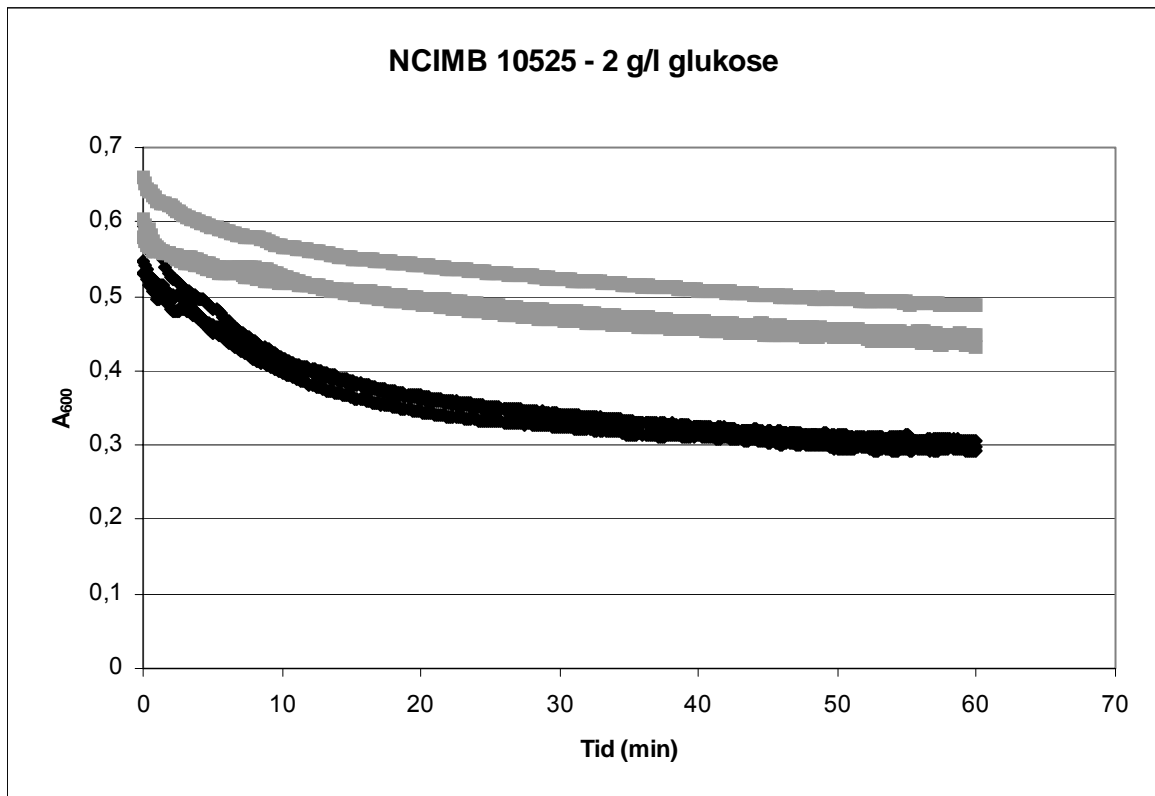
$$\text{Spesifikk aktivitet} = \frac{\frac{c_2 - c_1}{t_2 - t_1} \cdot V_{\text{assay}}}{\frac{V_{\text{suspensjon}}}{c_{\text{prot}}}} \quad (\text{B8.2})$$

$c_x$ : konsentrasjon av DCIP<sub>oks</sub> ved tid  $t_x$  ( $\mu\text{mol/ml}$ )  
 $t$ : tid (min)  
 $V_{\text{assay}}$ : totalt assayvolum (ml)  
 $V_{\text{suspensjon}}$ : volum suspensjon tilsatt i assayet (ml)  
 $c_{\text{prot}}$ : proteinkonsentrasjon i suspensjon (mg/ml)

$c_x$  og  $t_x$  leses av fra det lineære området (initiell reaksjonshastighet) i kurvene i figur B8.2. Noen av kurvene er svært ujevne i starten, og disse områdene er derfor sett bort fra.

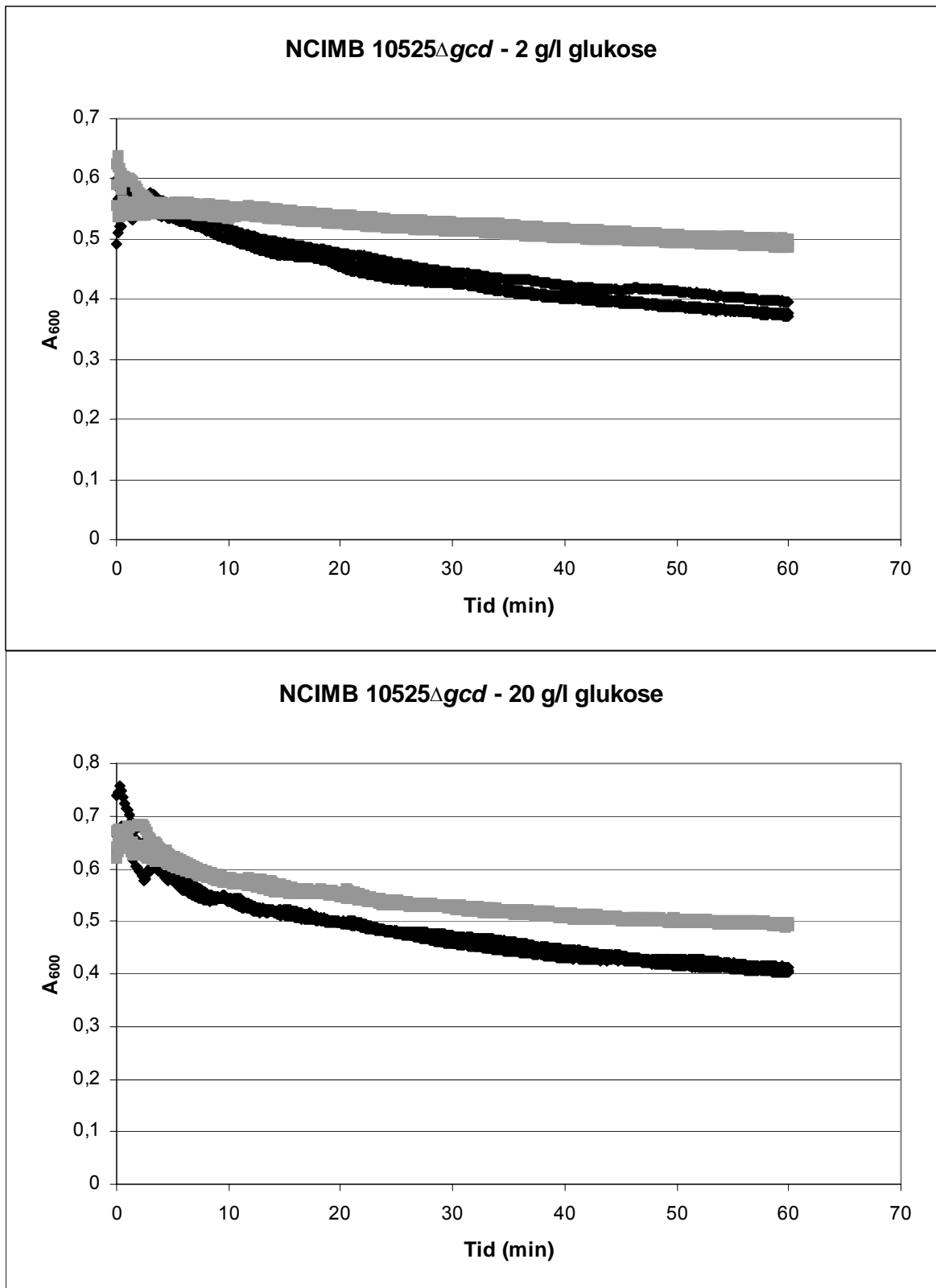


a)



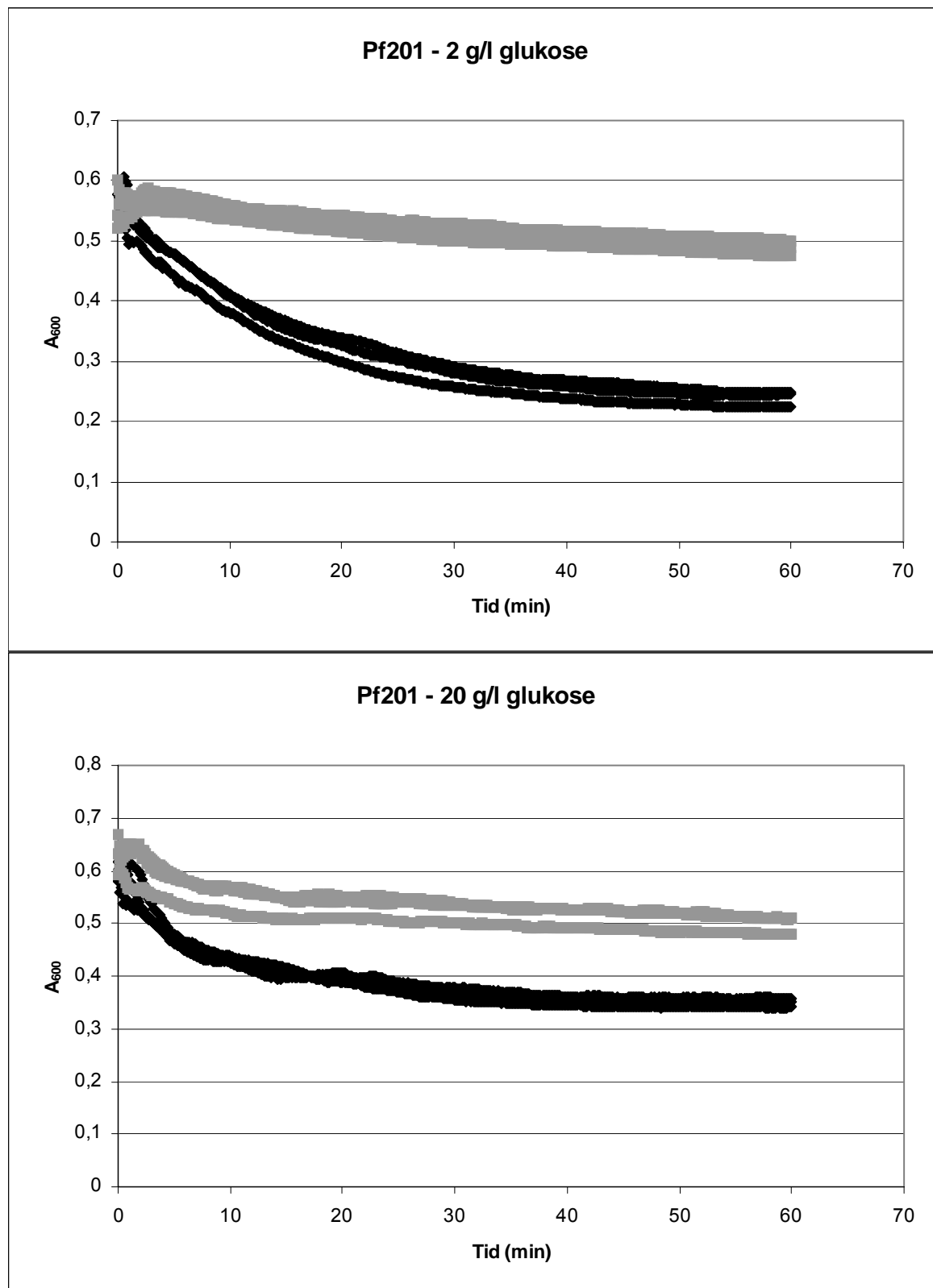
**Figur B8.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose dehydrogenase (målt som DCIP-reduksjon ved 600 nm) i vaskede celsuspensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose. Grå kurver: Assayblanding uten glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ *gcd*, **c)** Pf201, og **d)** Pf201 $\Delta$ *gcd*.

b)



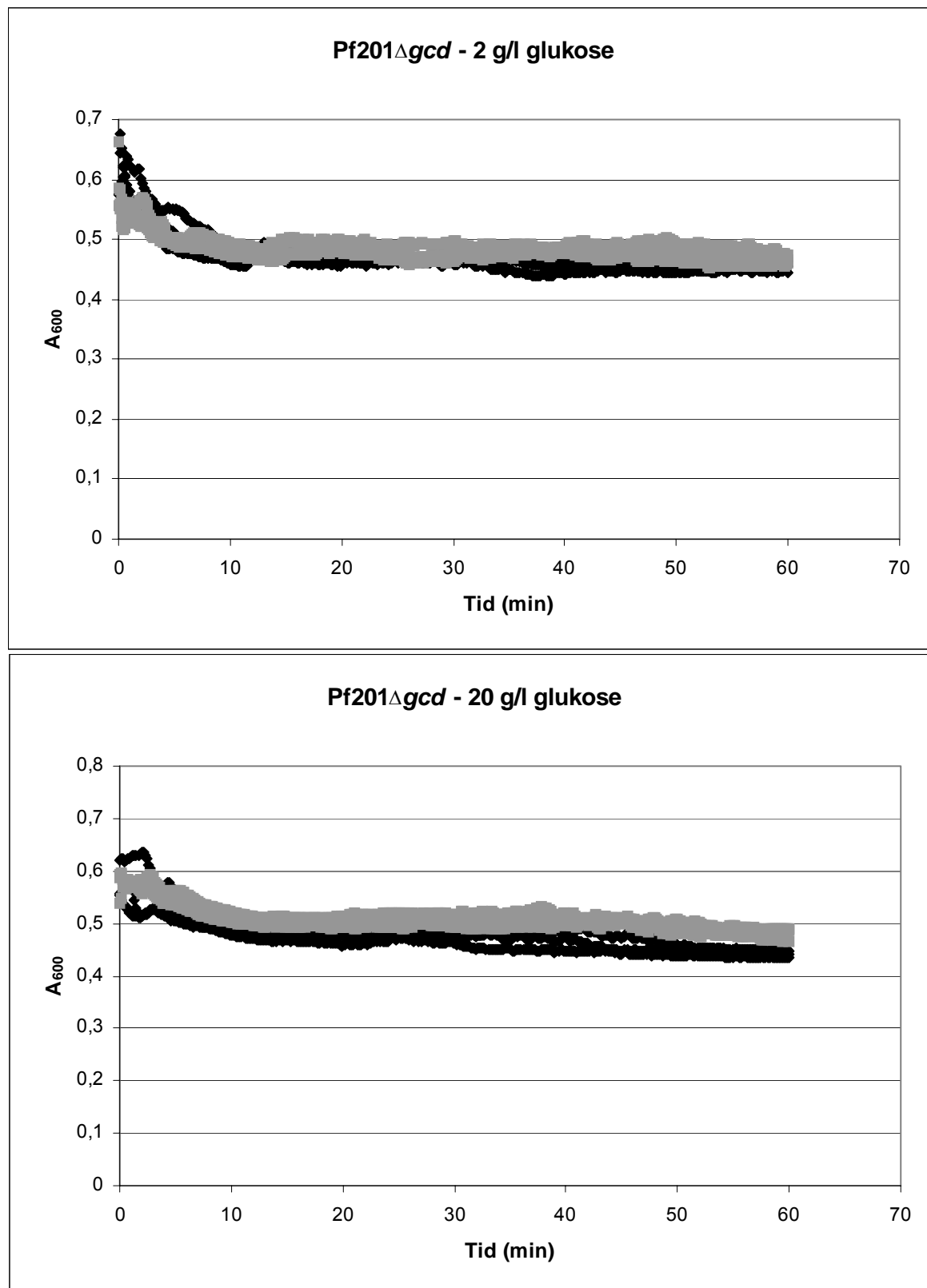
**Figur B8.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose dehydrogenase (målt som DCIP-reduksjon ved 600 nm) i vaskede celledensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose. Grå kurver: Assayblanding uten glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ gcd, **c)** Pf201, og **d)** Pf201 $\Delta$ gcd.

c)



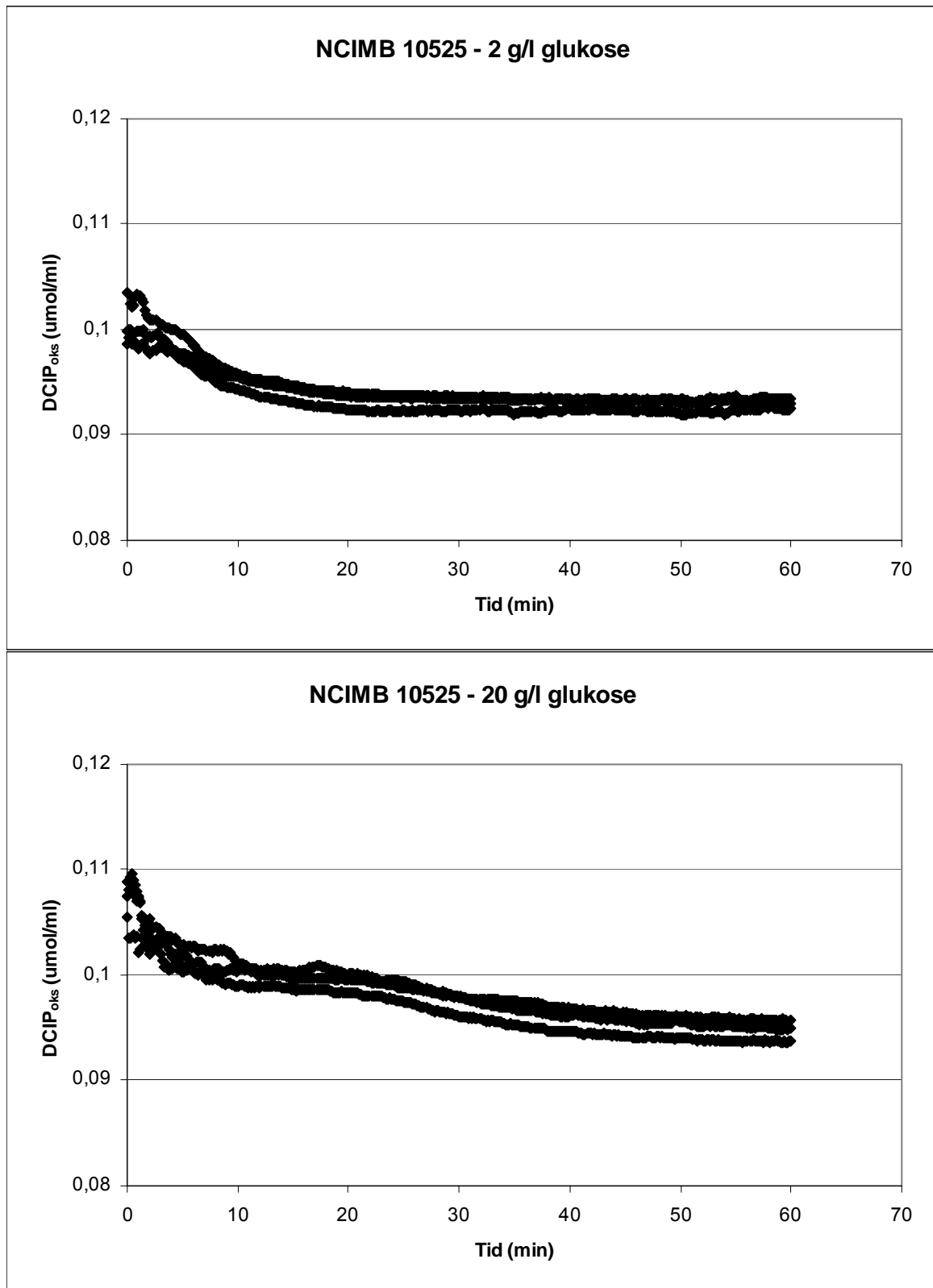
**Figur B8.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose dehydrogenase (målt som DCIP-reduksjon ved 600 nm) i vaskede celledensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose. Grå kurver: Assayblanding uten glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ gcd, **c)** Pf201, og **d)** Pf201 $\Delta$ gcd.

d)



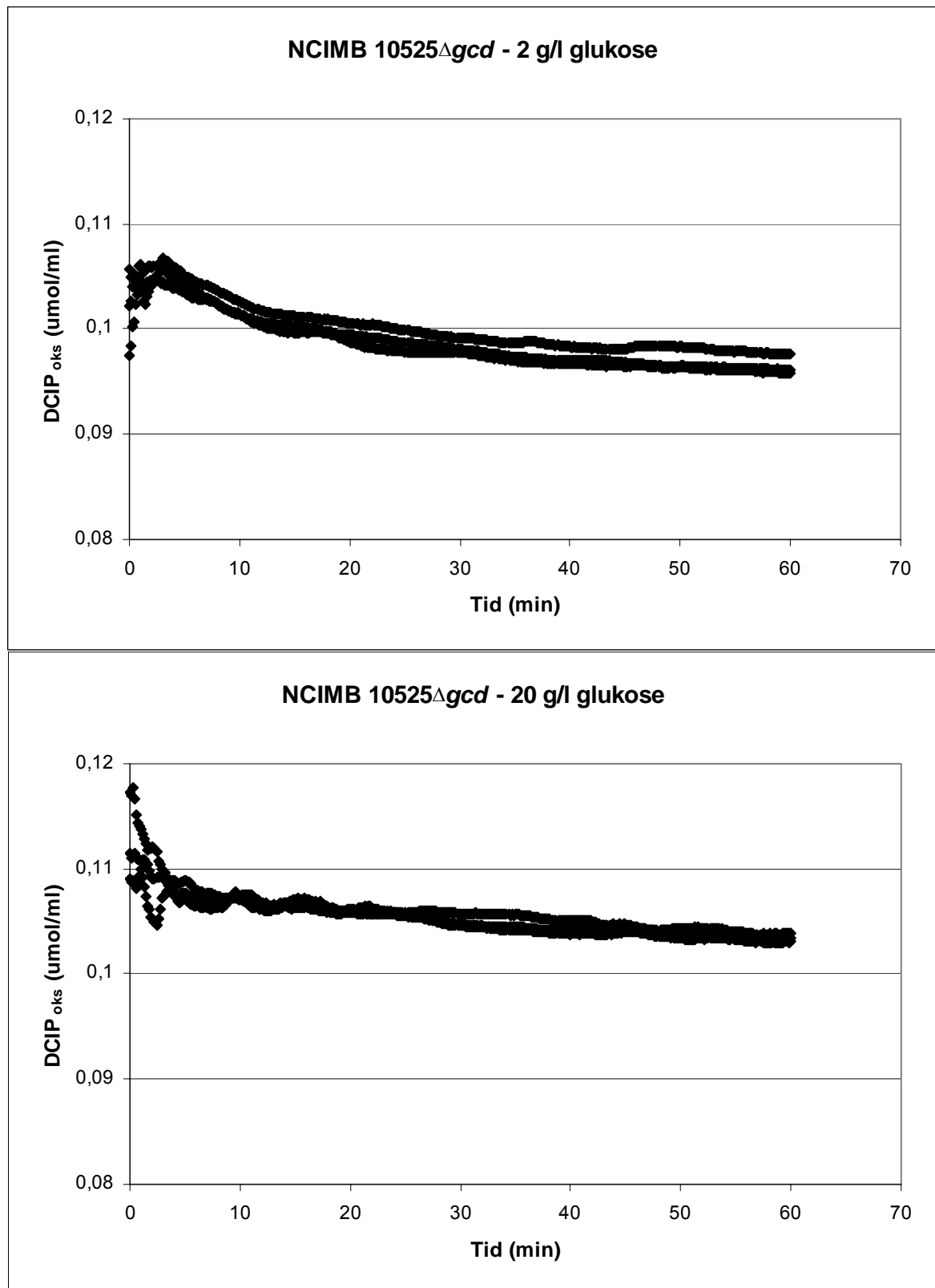
**Figur B8.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose dehydrogenase (målt som DCIP-reduksjon ved 600 nm) i vaskede celleduspensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose. Grå kurver: Assayblanding uten glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δgcd, **c)** Pfl201, og **d)** Pfl201Δgcd.

a)



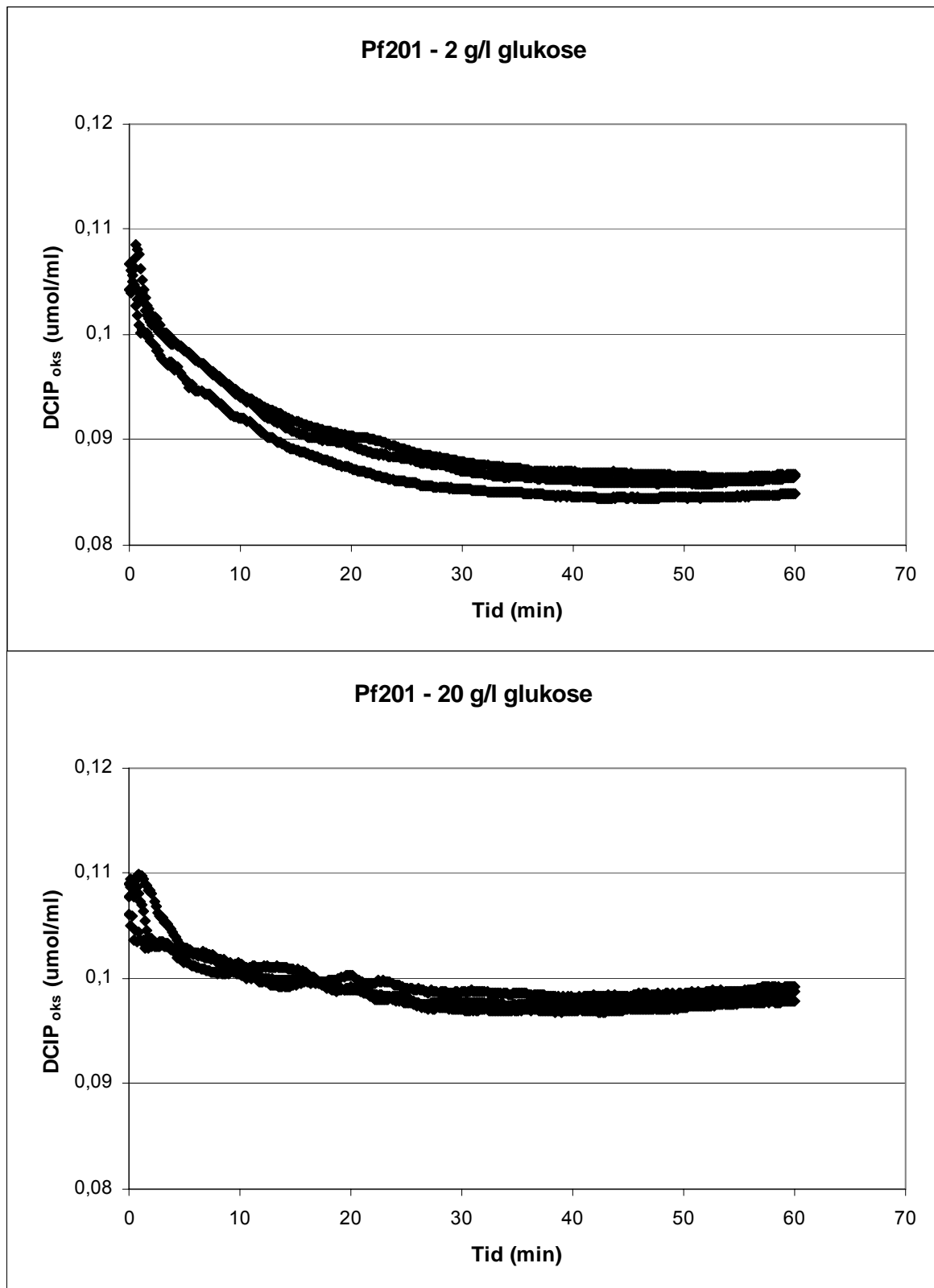
**Figur B8.2:** Aktivitet av glukose dehydrogenase som plott av DCIP<sub>oks</sub> (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av DCIP er trukket fra.) Basert på A<sub>600</sub>-målinger i vaskede celleduspensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δ*gcd*, **c)** Pf201, og **d)** Pf201Δ*gcd*.

b)



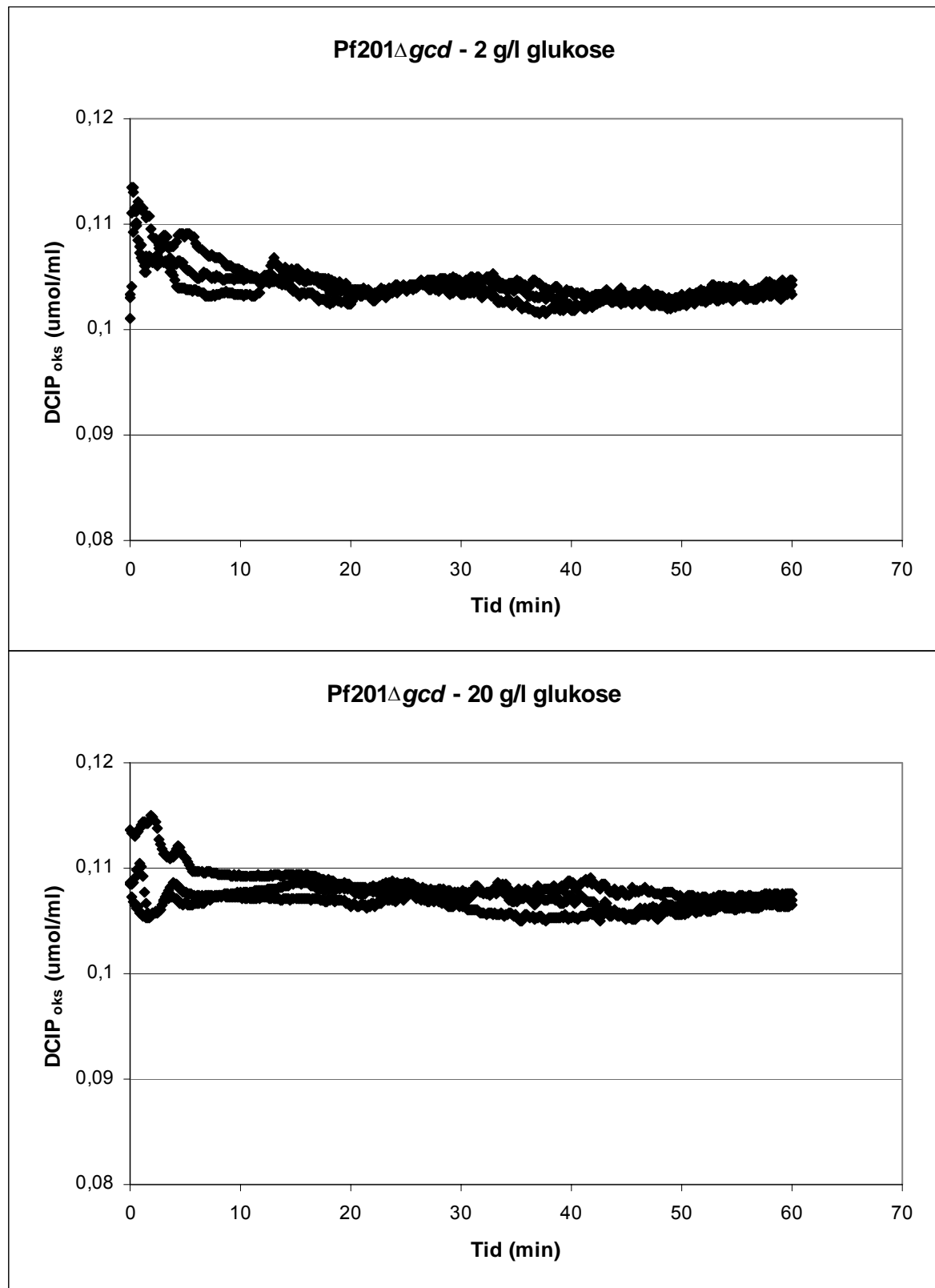
**Figur B8.2:** Aktivitet av glukose dehydrogenase som plott av DCIP<sub>oks</sub> (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av DCIP er trukket fra.) Basert på A<sub>600</sub>-målinger i vaskede celledensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ gcd, **c)** Pf201, og **d)** Pf201 $\Delta$ gcd.

c)



**Figur B8.2:** Aktivitet av glukose dehydrogenase som plott av DCIP<sub>oks</sub> (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av DCIP er trukket fra.) Basert på A<sub>600</sub>-målinger i vaskede celleduspensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δ*gcd*, **c)** Pf201, og **d)** Pf201Δ*gcd*.

d)



**Figur B8.2:** Aktivitet av glukose dehydrogenase som plott av DCIP<sub>oks</sub> (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av DCIP er trukket fra.) Basert på A<sub>600</sub>-målinger i vaskede celleduspensjoner av *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δgcd, **c)** Pf201, og **d)** Pf201Δgcd.



## Bilag 9. Rådata og beregninger for glukose-6-fosfat dehydrogenase assay

Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase ble målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm, i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens* NCIMB, Pf201,  $\Delta zwf-1$ - og  $\Delta zwf-2$ -mutanter.  $A_{340}$  ble målt i assayblanding med og uten glukose-6-fosfat. Det ble målt tre paralleller med glukose-6-fosfat og tre paralleller uten glukose-6-fosfat for hver prøve. Rådata fra målingene er gitt i figur B9.1.

NADPH-konsentrasjon (M) beregnes ved hjelp av likning B8.1. Det ble benyttet en molar ekstinksjonskoeffisient på  $6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for NADPH ved 340 nm (Lessie og Neidhardt, 1967). Ved assayvolum på 200  $\mu\text{l}$  i 96-brønns UV-plate (Costar) ble lysbanens lengde beregnet å være 0,578 cm.

Figur B9.2 viser et plott av NADP<sup>+</sup> redusert ( $\mu\text{mol/ml}$ ) mot tid (min), med uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> trukket fra. En enhet aktivitet (U) gir reduksjon av 1  $\mu\text{mol}$  NADP<sup>+</sup> per minutt ved de aktuelle forholdene. Spesifikk aktivitet (U/mg celleprotein) beregnes ved følgende likning:

$$\text{Spesifikk aktivitet} = \frac{\frac{c_t}{t} \cdot V_{\text{assay}}}{V_{\text{ekstrakt}} \cdot c_{\text{prot}}} \quad (\text{B9.1})$$

$c_t$ : konsentrasjon av NADPH (og dermed redusert NADP<sup>+</sup>) ved tid  $t$  ( $\mu\text{mol/ml}$ )

$t$ : tid (min)

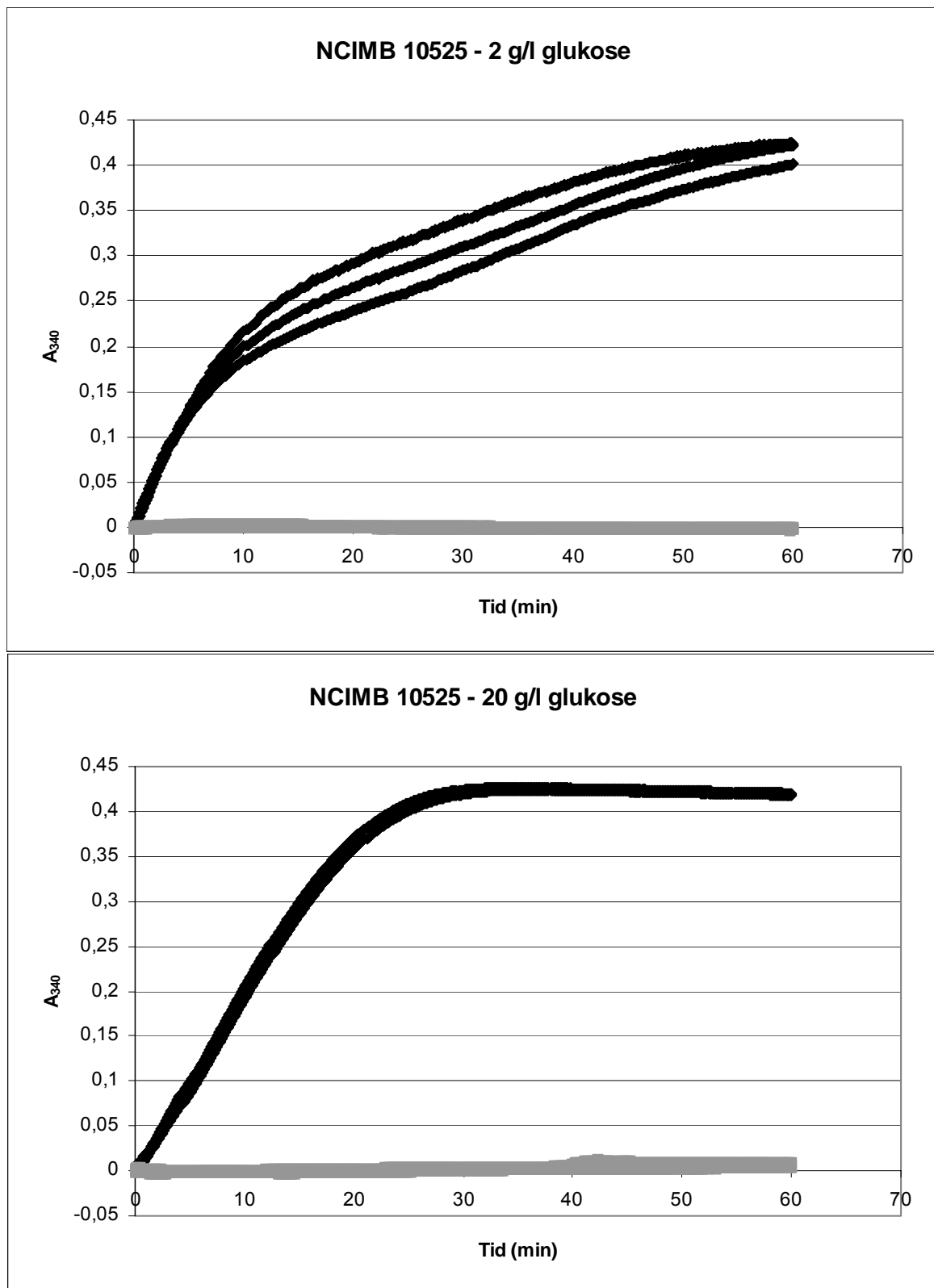
$V_{\text{assay}}$ : totalt assayvolum (ml)

$V_{\text{ekstrakt}}$ : volum ekstrakt tilsatt i assayet (ml)

$c_{\text{prot}}$ : proteinkonsentrasjon i ekstrakt (mg/ml)

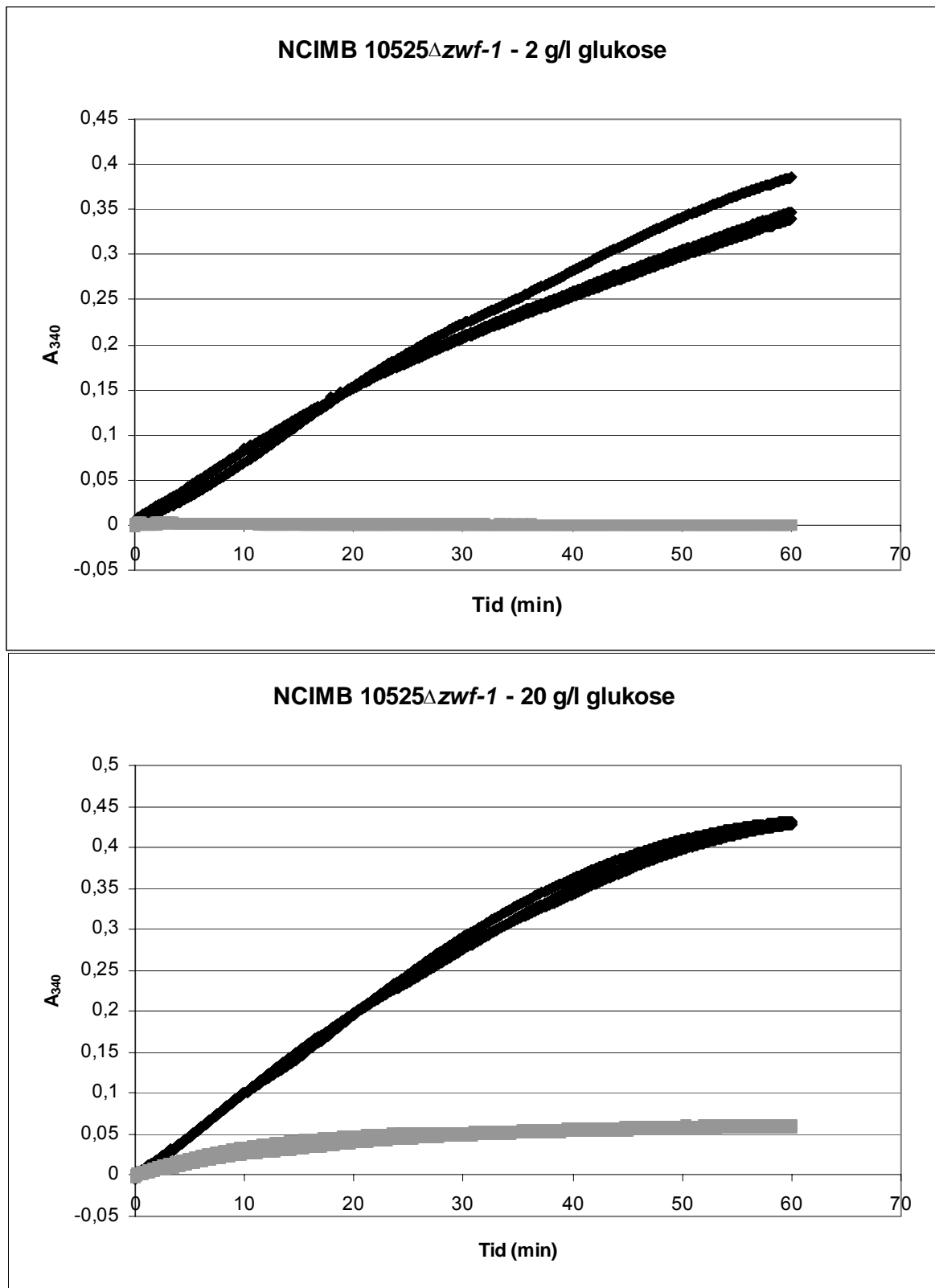
$c_t$  og  $t$  leses av fra det lineære området (initiell reaksjonshastighet) i kurvene i figur B9.2.

a)



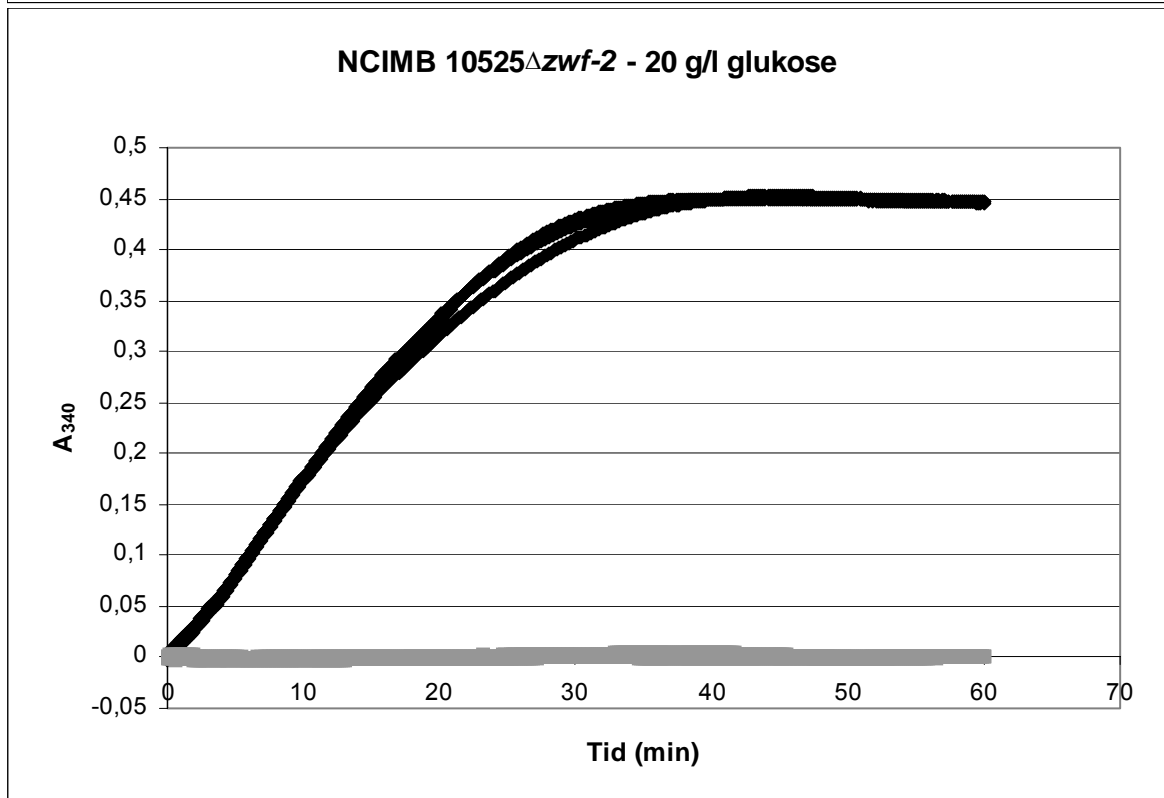
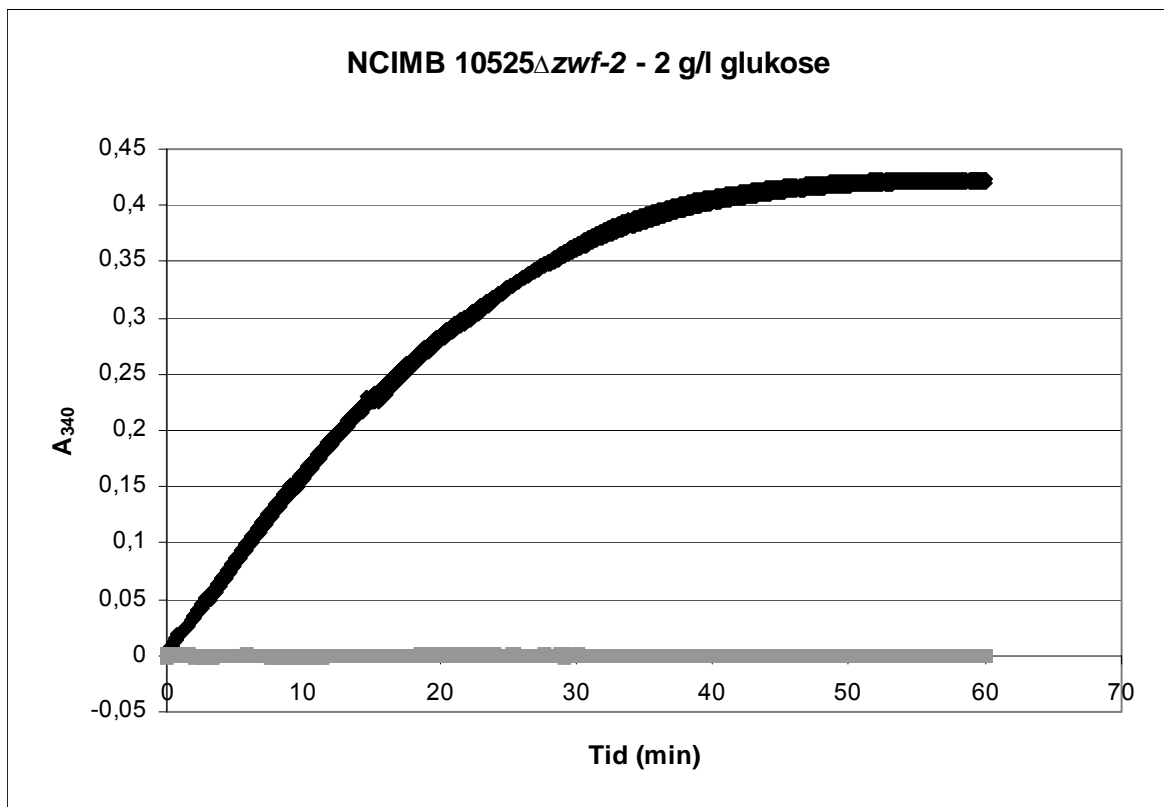
**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, **c)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, **d)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201 $\Delta$ zwf-1, og **g)** Pf201 $\Delta$ zwf-2.

b)



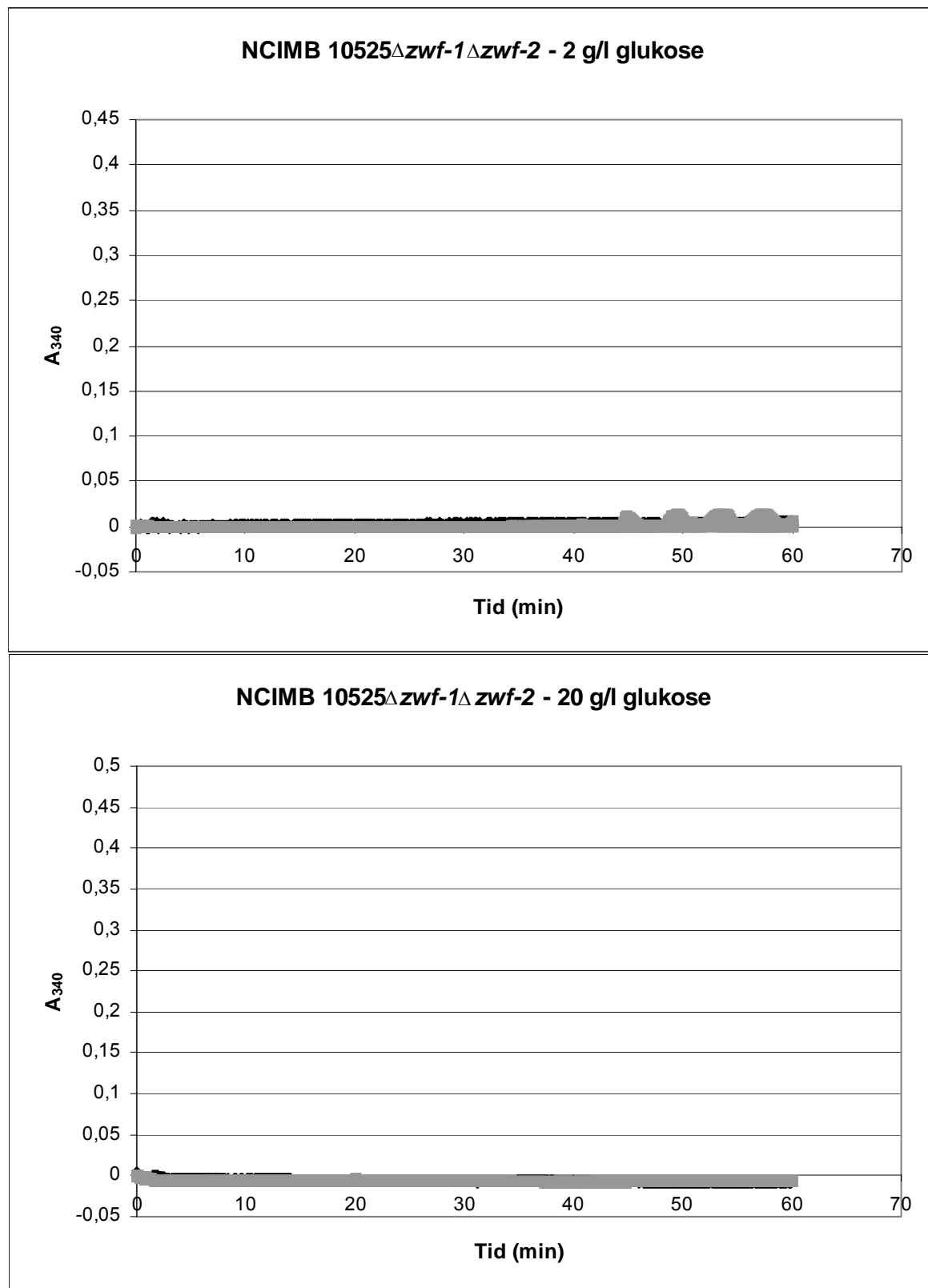
**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: a) NCIMB 10525, b) NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, c) NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, d) NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, e) Pf201, f) Pf201 $\Delta$ zwf-1, og g) Pf201 $\Delta$ zwf-2.

c)



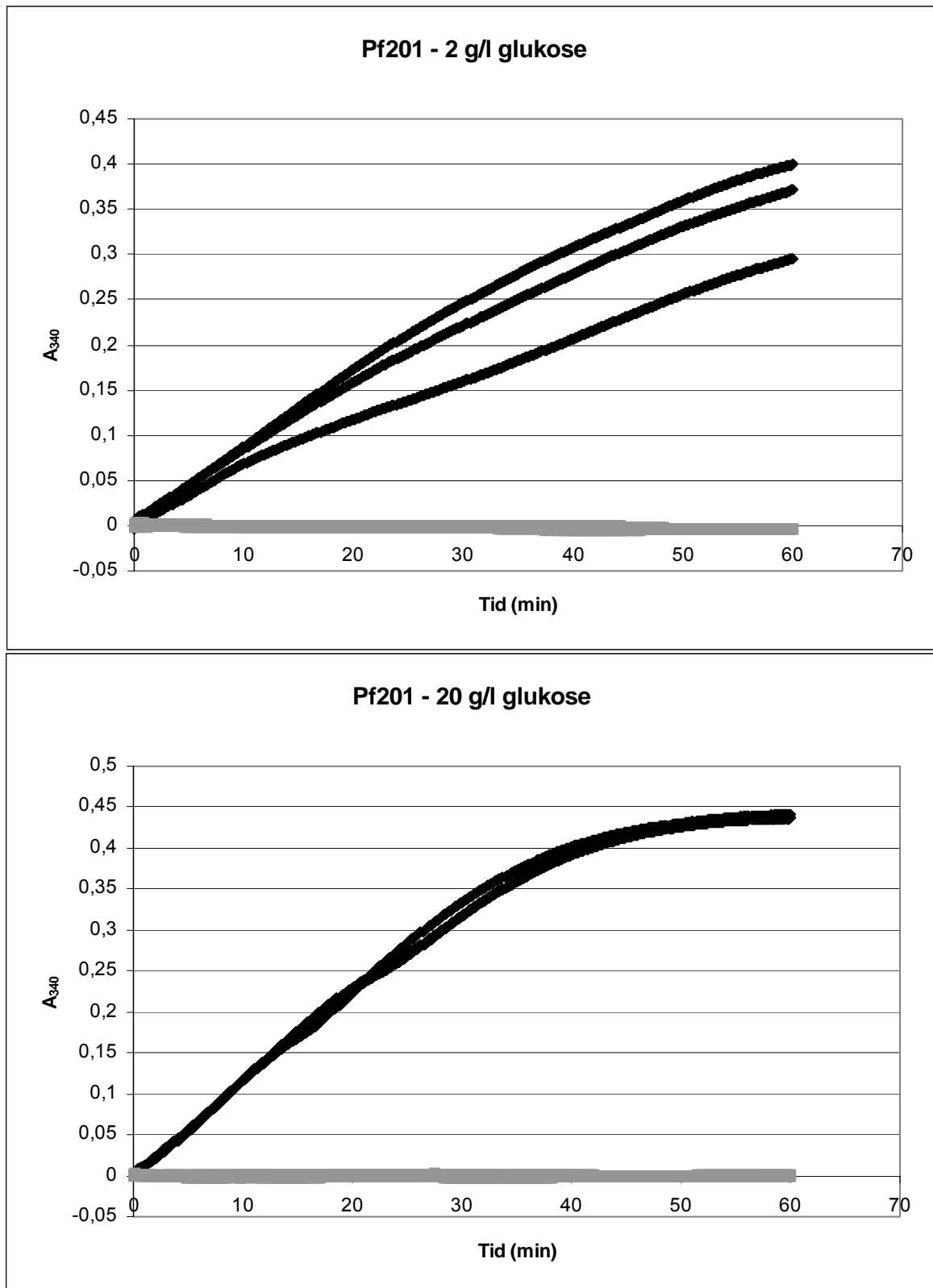
**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, **c)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, **d)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201 $\Delta$ zwf-1, og **g)** Pf201 $\Delta$ zwf-2.

d)



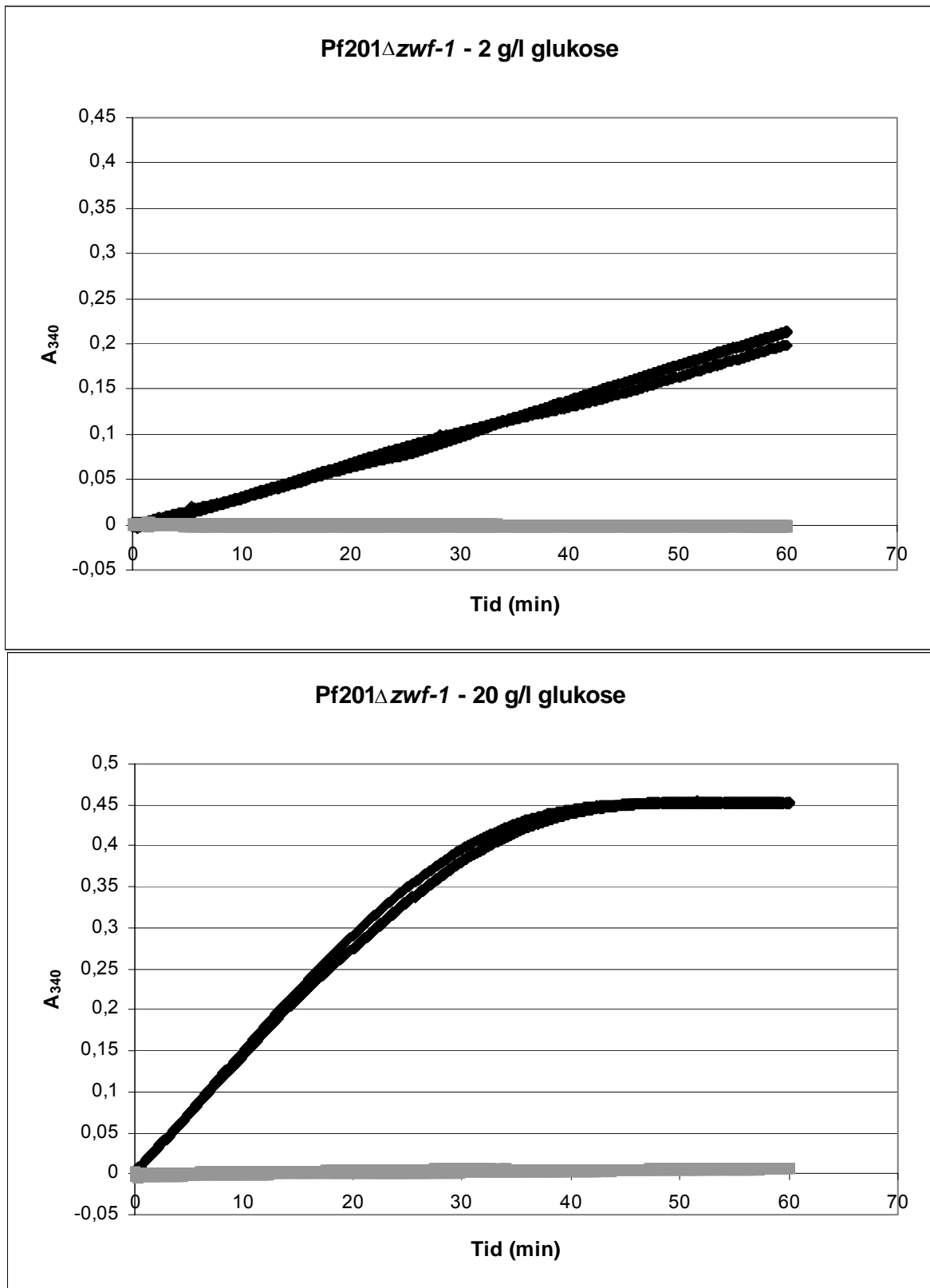
**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δzwf-1, **c)** NCIMB 10525Δzwf-2, **d)** NCIMB 10525Δzwf-1Δzwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201Δzwf-1, og **g)** Pf201Δzwf-2.

e)



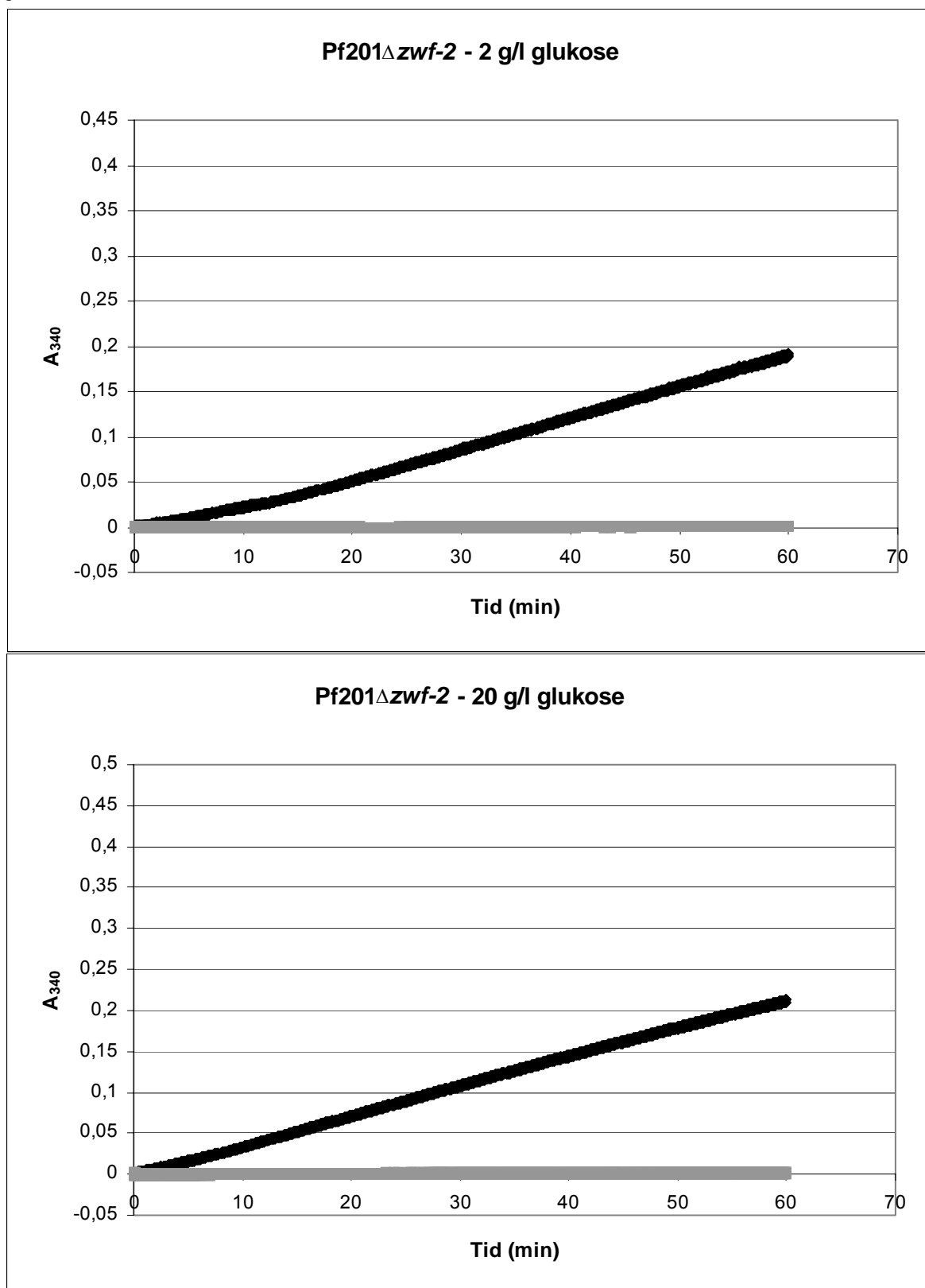
**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, **c)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, **d)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201 $\Delta$ zwf-1, og **g)** Pf201 $\Delta$ zwf-2.

f)



**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, **c)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, **d)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201 $\Delta$ zwf-1, og **g)** Pf201 $\Delta$ zwf-2.

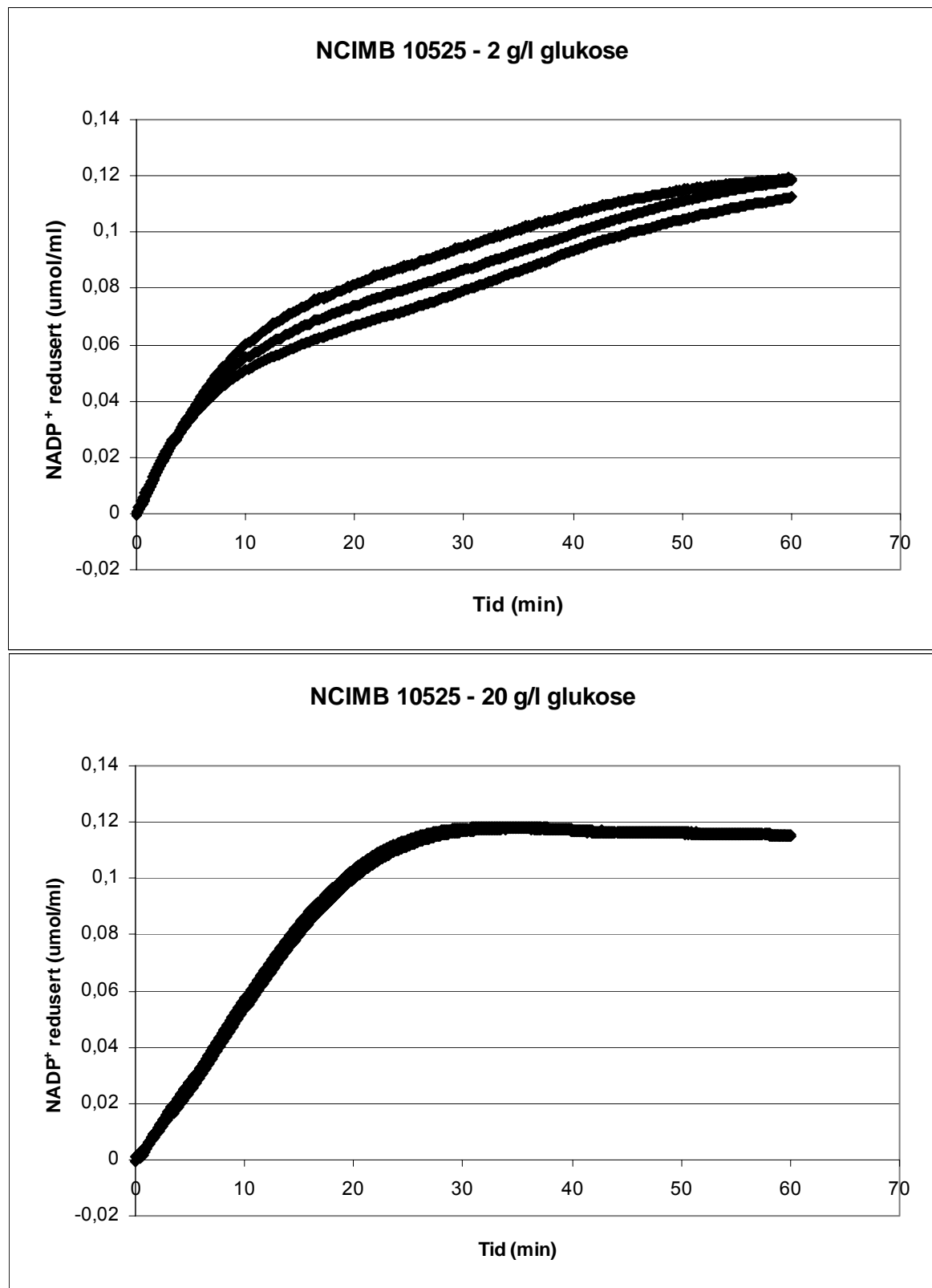
g)



**Figur B9.1:** Rådata fra måling av aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase (målt som NADP<sup>+</sup>-reduksjon ved 340 nm) i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Sorte kurver: Assayblanding med glukose-6-fosfat. Grå kurver: Assayblanding uten glukose-6-fosfat. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, **c)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, **d)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201 $\Delta$ zwf-1, og **g)** Pf201 $\Delta$ zwf-2.

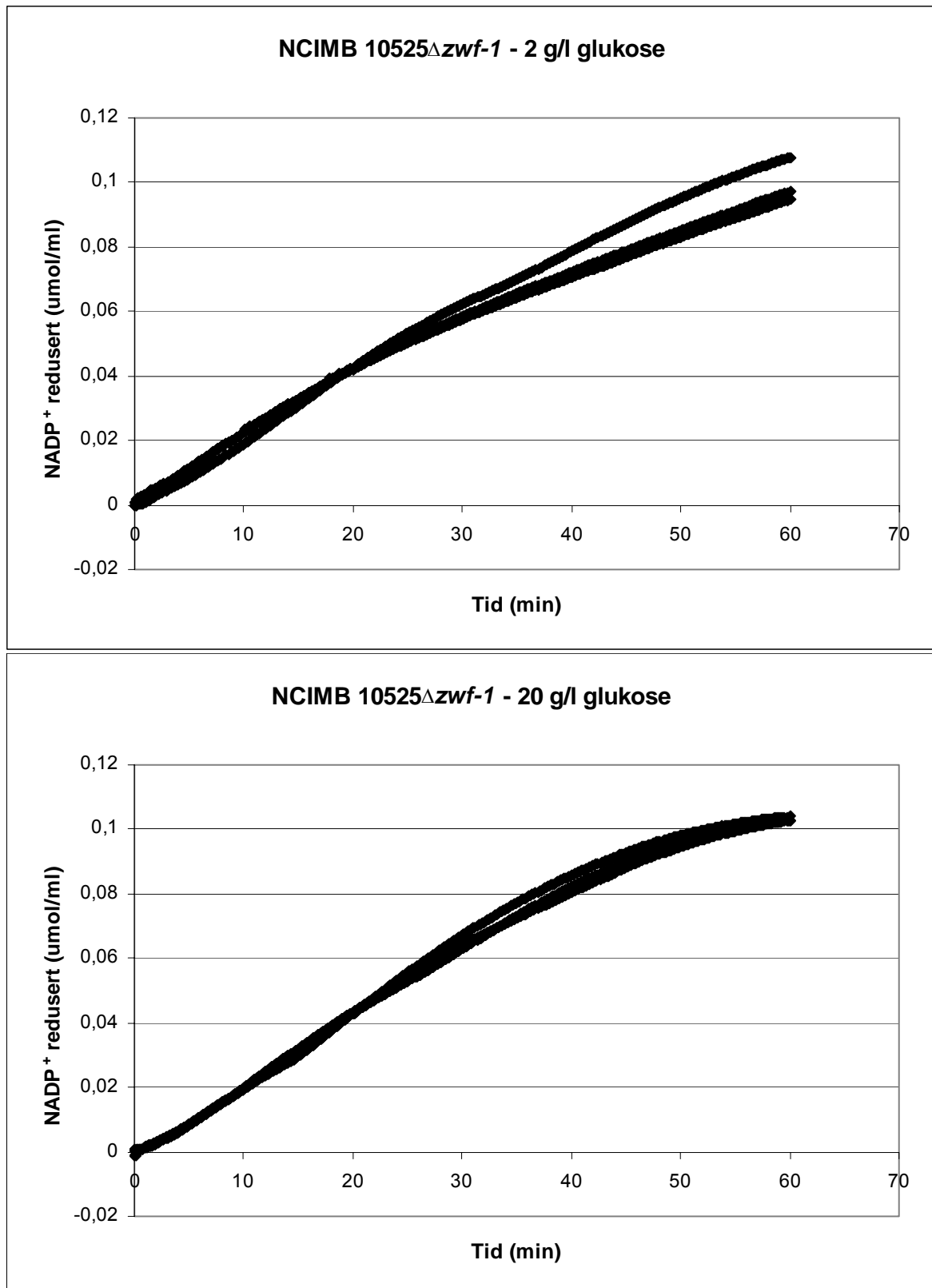


a)



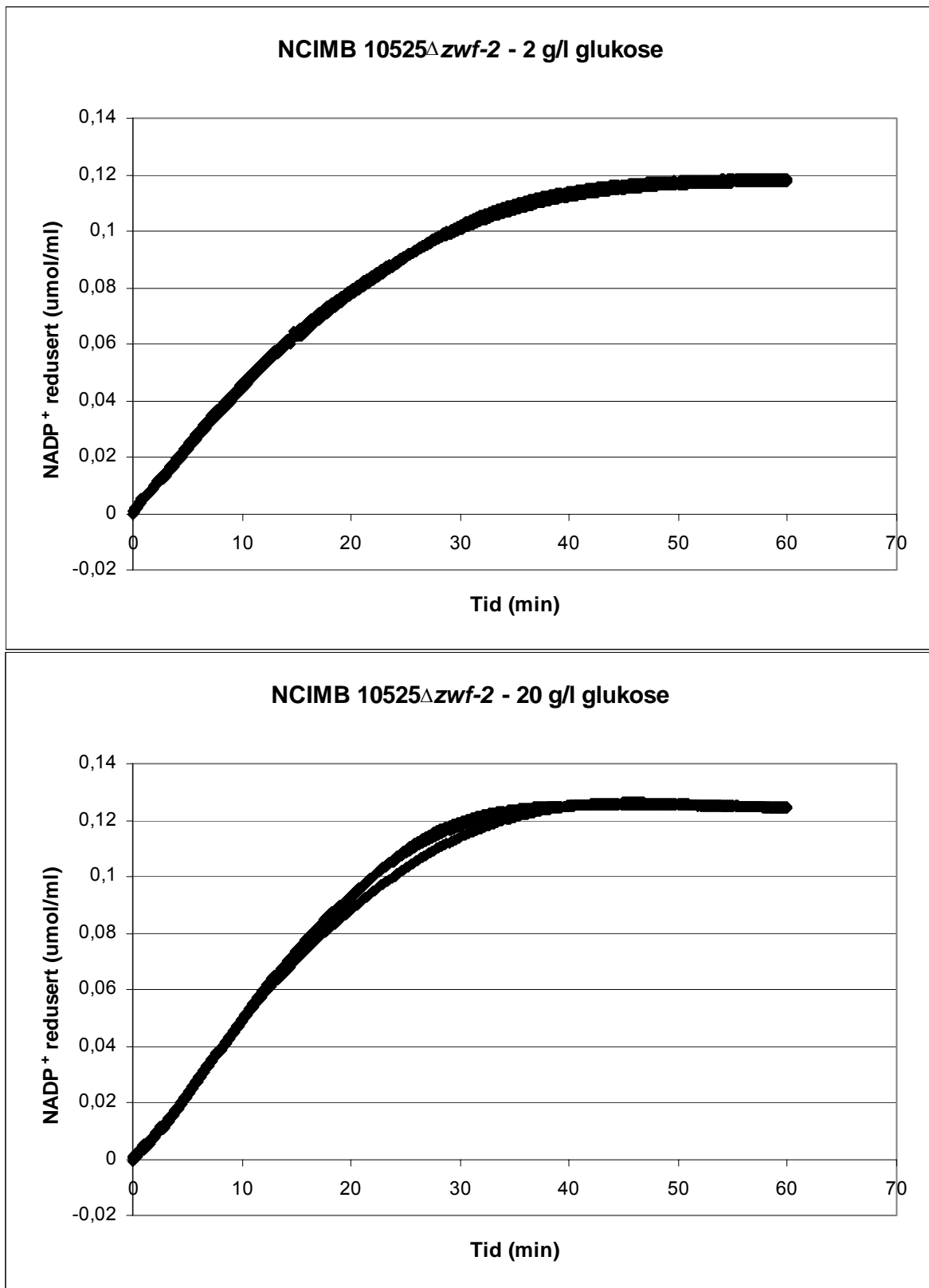
**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på A<sub>340</sub>-målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δ<sub>zwf-1</sub>, **c)** NCIMB 10525Δ<sub>zwf-2</sub>, **d)** NCIMB 10525Δ<sub>zwf-1</sub>Δ<sub>zwf-2</sub>, **e)** Pf201, **f)** Pf201Δ<sub>zwf-1</sub>, og **g)** Pf201Δ<sub>zwf-2</sub>.

b)



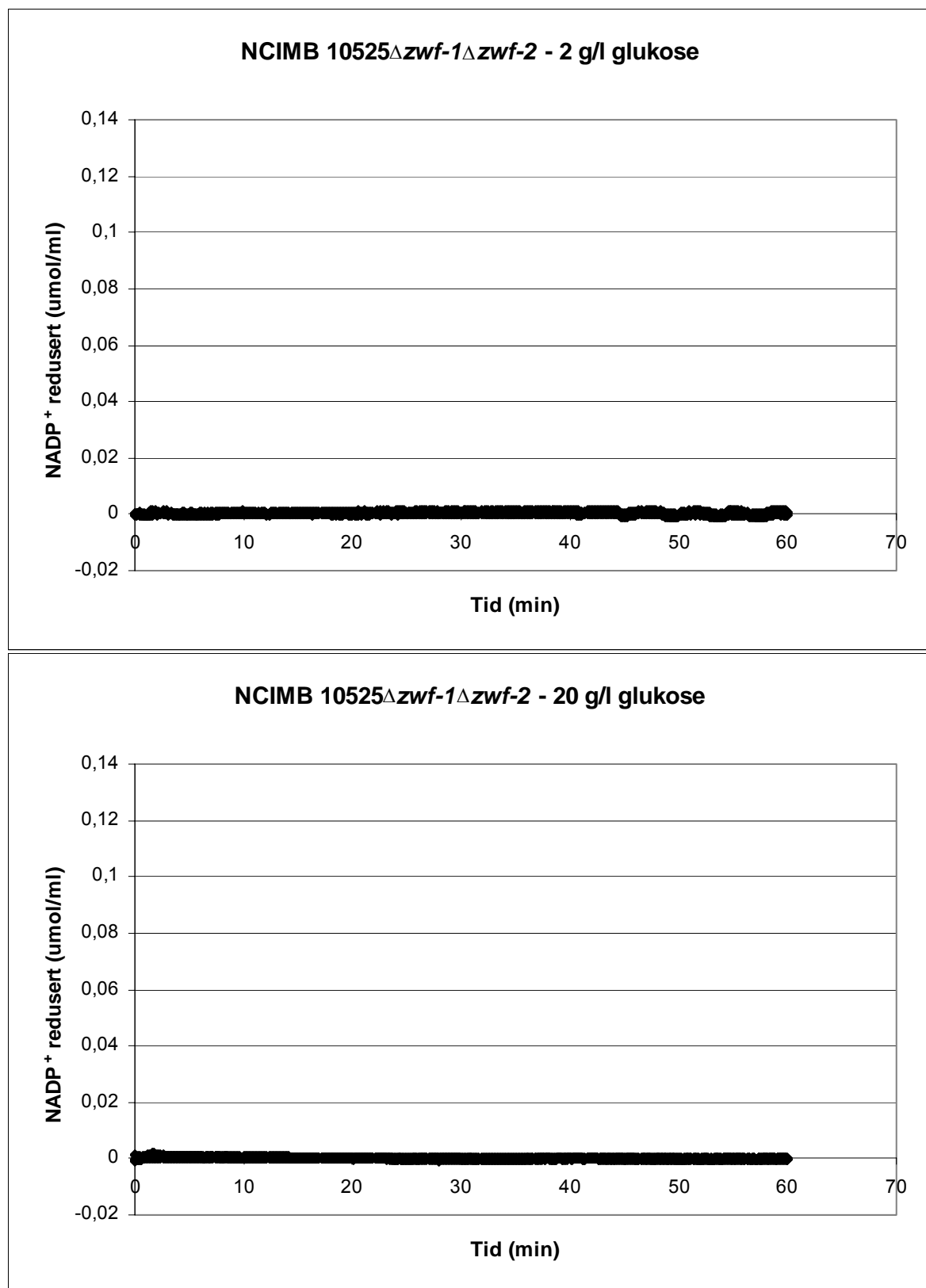
**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på A<sub>340</sub>-målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δzwf-1, **c)** NCIMB 10525Δzwf-2, **d)** NCIMB 10525Δzwf-1Δzwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201Δzwf-1, og **g)** Pf201Δzwf-2.

c)



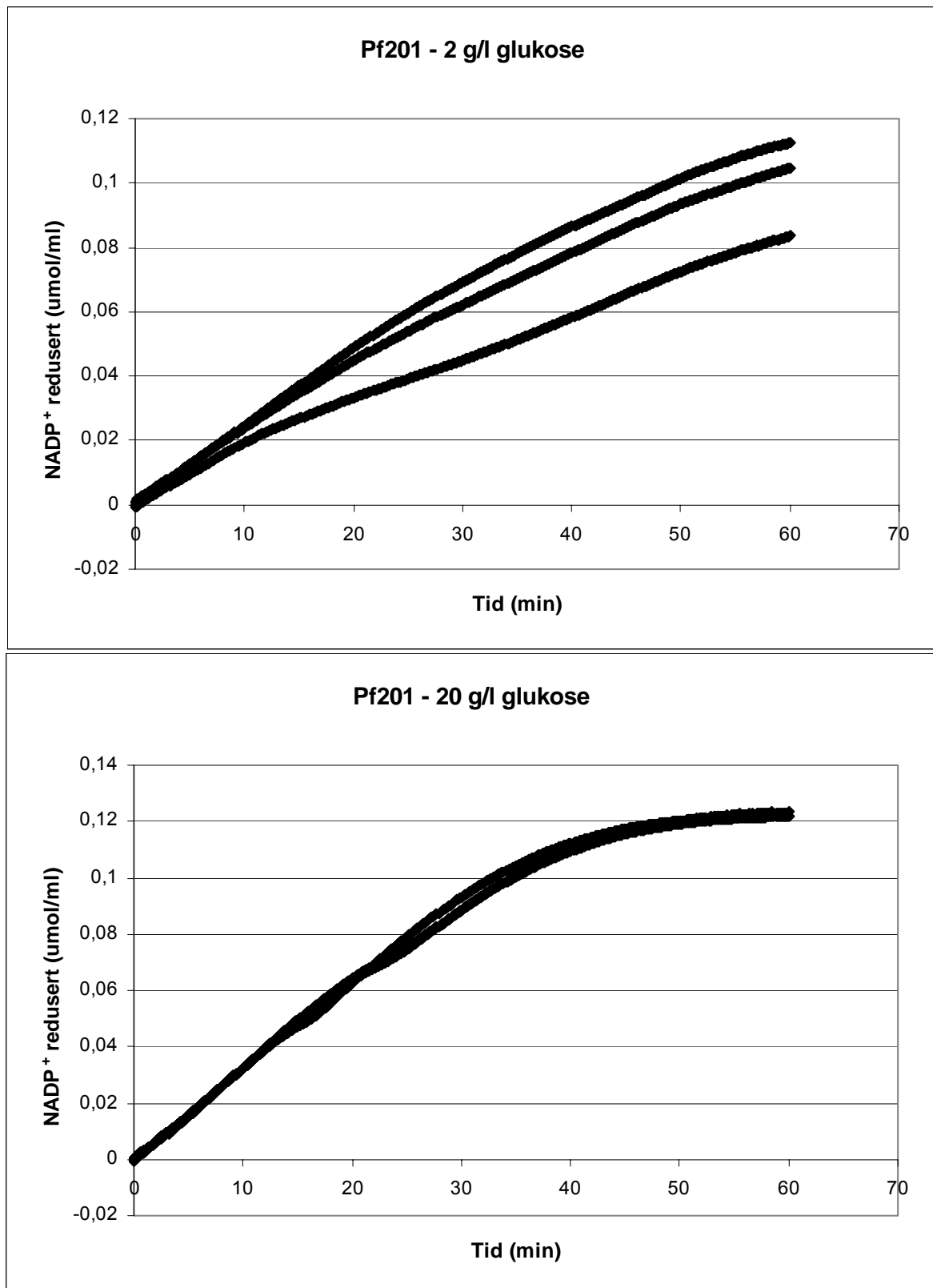
**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på A<sub>340</sub>-målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δzwf-1, **c)** NCIMB 10525Δzwf-2, **d)** NCIMB 10525Δzwf-1Δzwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201Δzwf-1, og **g)** Pf201Δzwf-2.

d)



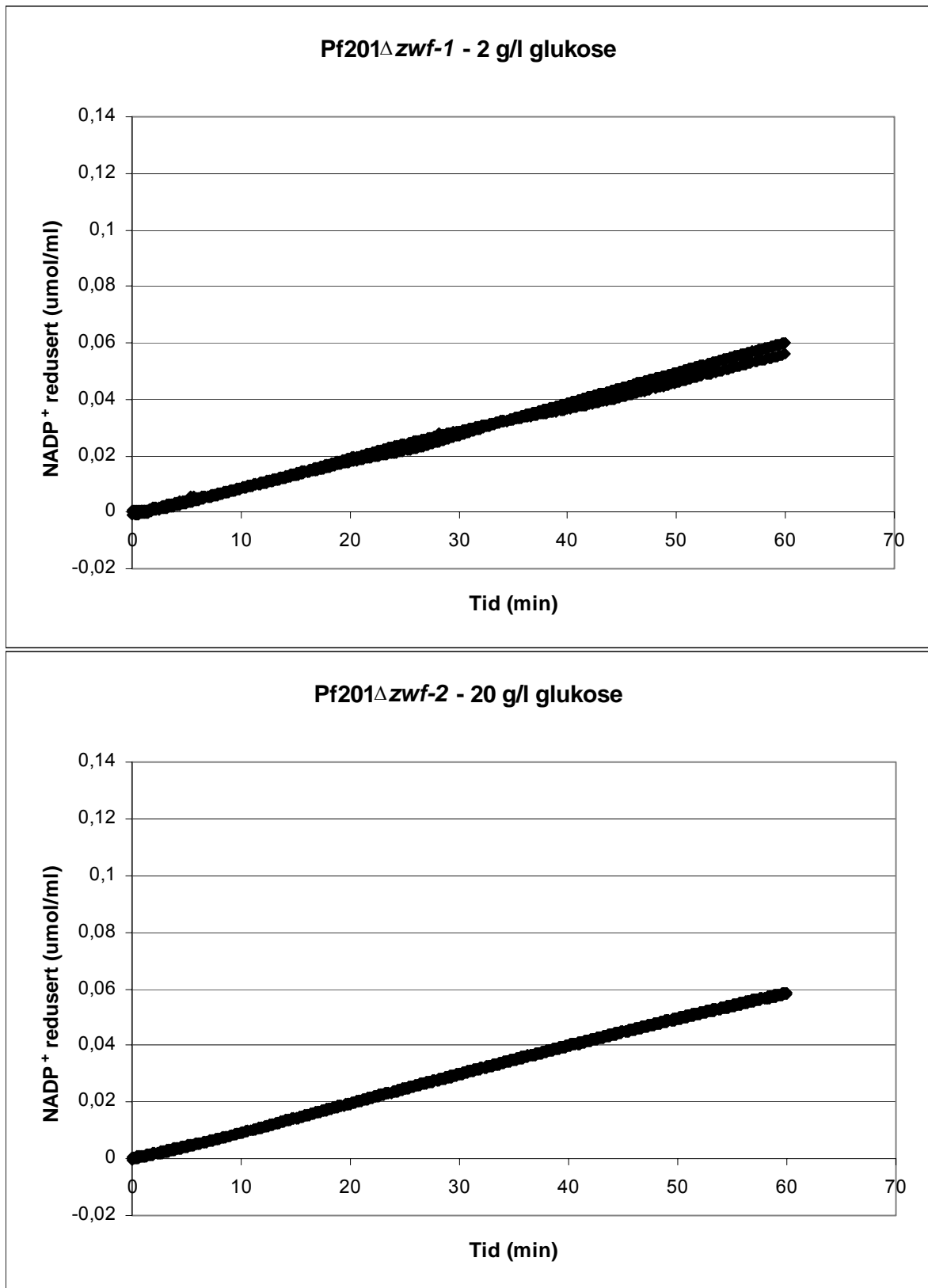
**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på A<sub>340</sub>-målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525Δzwf-1, **c)** NCIMB 10525Δzwf-2, **d)** NCIMB 10525Δzwf-1Δzwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201Δzwf-1, og **g)** Pf201Δzwf-2.

e)



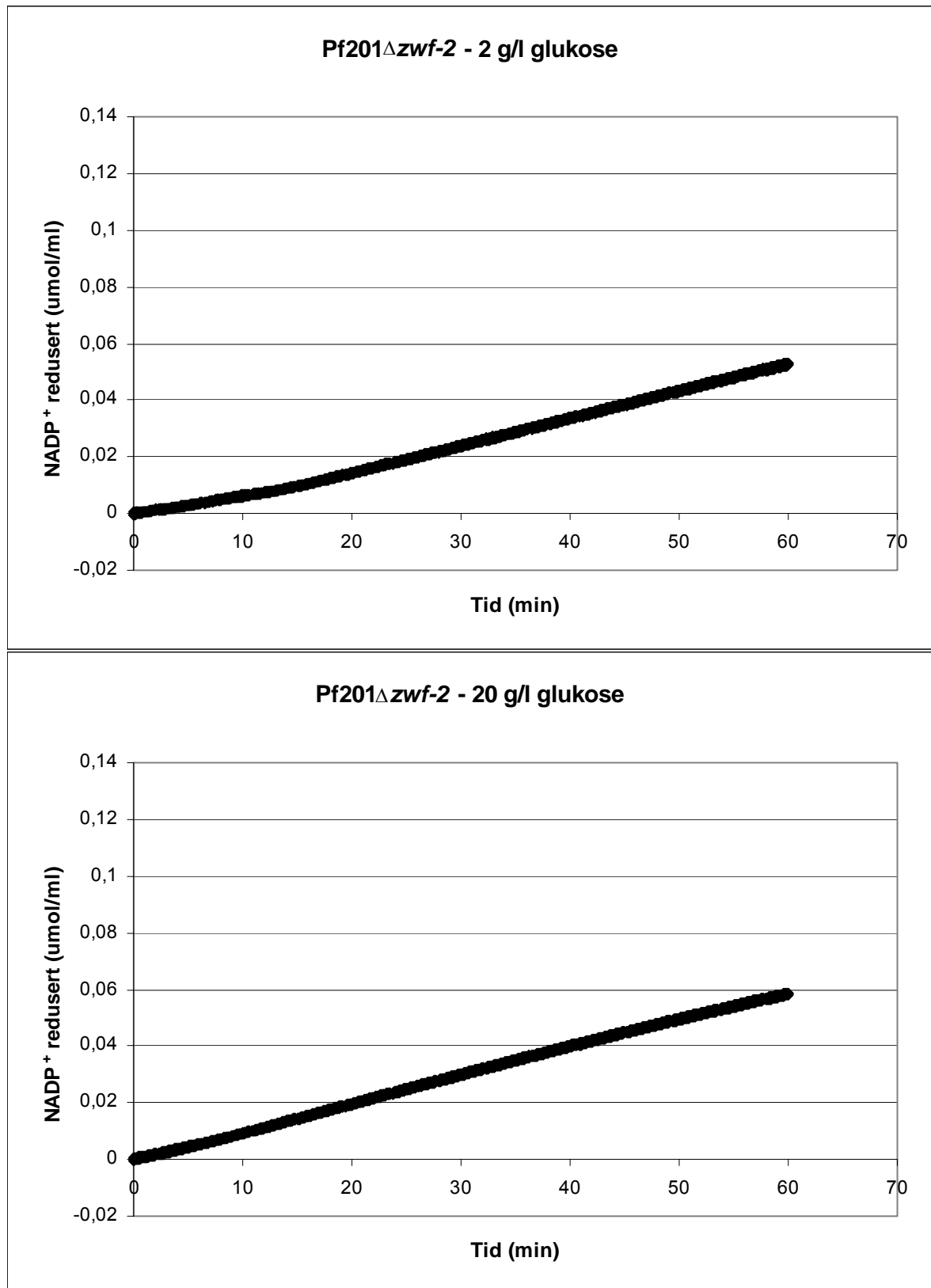
**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på A<sub>340</sub>-målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: a) NCIMB 10525, b) NCIMB 10525Δ*zwf-1*, c) NCIMB 10525Δ*zwf-2*, d) NCIMB 10525Δ*zwf-1*Δ*zwf-2*, e) Pf201, f) Pf201Δ*zwf-1*, og g) Pf201Δ*zwf-2*.

f)



**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert ( $\mu$ mol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på  $A_{340}$ -målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: **a)** NCIMB 10525, **b)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1, **c)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-2, **d)** NCIMB 10525 $\Delta$ zwf-1 $\Delta$ zwf-2, **e)** Pf201, **f)** Pf201 $\Delta$ zwf-1, og **g)** Pf201 $\Delta$ zwf-2.

g)



**Figur B9.2:** Aktivitet av glukose-6-fosfat dehydrogenase som plott av NADP<sup>+</sup> redusert (µmol/ml) mot tid (min). (Uspesifikk reduksjon av NADP<sup>+</sup> er trukket fra.) Basert på A<sub>340</sub>-målinger i cellefri ekstrakter fra *P. fluorescens*-stammer dyrket i DEF3 minimalmedium med 2 og 20 g/l glukose. Stammer: a) NCIMB 10525, b) NCIMB 10525Δzwf-1, c) NCIMB 10525Δzwf-2, d) NCIMB 10525Δzwf-1Δzwf-2, e) Pf201, f) Pf201Δzwf-1, og g) Pf201Δzwf-2.

## Bilag 10. Rådata og standardkurver for enzymatisk alginatanalyse

Alginatproduksjon ble undersøkt kulturer av delesjonsmutantene *P. fluorescens* Pf201 $\Delta$ *gcd*, Pf201 $\Delta$ *zwf-1* og Pf201 $\Delta$ *zwf-2* dyrket i DEF3-minimalmedium med 20 g/l glukose. Utgangstammen Pf201 ble benyttet som referanse. Rådata fra enzymatisk alginatanalyse av prøver fra Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter er gitt i tabell B10.1.

**Tabell B10.1:** A<sub>230</sub>-verdier avlest ved enzymatisk alginatanalyse av prøver fra kulturer av *P. fluorescens* Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter.

Prøver og standarder	A <sub>230</sub> bakgrunn				A <sub>230</sub> etter 3 timer				A <sub>230</sub> etter 4 timer				
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Blank (uten lyase)	0,1198	0,1163	0,1173	0,1153	0,1207	0,1175	0,1186	0,1166	0,1210	0,1178	0,1188	0,1169	
Blank (uten lyase)	0,1166	0,1149	0,1162	0,1165	0,1178	0,1160	0,1175	0,1174	0,1182	0,1165	0,1178	0,1179	
Standarder (LF10/60, g/l)													
0,0	0,1229	0,1202	0,1193	-	0,2378	0,2651	0,2636	-	0,2571	0,2540	0,2553	-	
0,0	0,1203	0,1173	0,1168	-	0,2679	0,2852	0,2783	-	0,2717	0,2771	0,2813	-	
0,1	0,1247	0,1225	-	-	0,4042	0,3512	-	-	0,3729	0,3879	-	-	
0,2	0,1249	0,1237	-	-	0,5058	0,5395	-	-	0,4768	0,5045	-	-	
0,3	0,1317	0,1295	-	-	0,6268	0,6494	-	-	0,6035	0,6380	-	-	
0,4	0,1336	0,1311	-	-	0,6750	0,7541	-	-	0,6980	0,7544	-	-	
0,5	0,1390	0,1364	-	-	0,7779	0,8777	-	-	0,8323	0,8862	-	-	
Stamme	Dyrkingstid (timer)												
Pf201 <sup>a</sup>	24	0,1823	0,1821	0,1790	-	0,4405	0,4070	0,3829	-	0,4198	0,4071	0,4034	-
Pf201 <sup>a</sup>	48	0,1717	0,1736	0,1712	-	0,3910	0,3969	0,3715	-	0,4000	0,3979	0,3684	-
Pf201 <sup>a</sup>	72	0,1838	0,1843	0,1835	-	0,4455	0,4168	0,4092	-	0,4125	0,4200	0,4092	-



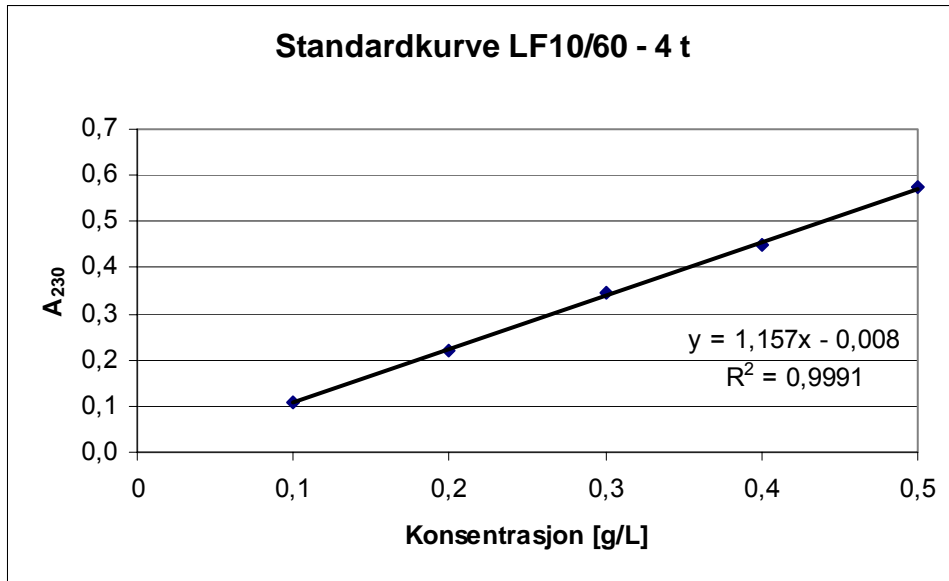
**Tabell B10.1:** A<sub>230</sub>-verdier avlest ved enzymatisk alginatanalyse av prøver fra kulturer av *P. fluorescens* Pf201 og Pf201 delesjonsmutanter.

Prøver og standarder		A <sub>230</sub> bakgrunn				A <sub>230</sub> etter 3 timer				A <sub>230</sub> etter 4 timer			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Pf201Δgcd <sup>b</sup>	24	0,1472	0,1482	0,1450	-	0,3362	0,3209	0,3196	-	0,3339	0,3147	0,3241	-
Pf201Δgcd <sup>a</sup>	48	0,1593	0,1586	0,1565	-	0,3635	0,3687	0,3656	-	0,3668	0,3728	0,3655	-
Pf201Δgcd <sup>a</sup>	72	0,1700	0,1701	0,1674	-	0,3968	0,3922	0,3794	-	0,4024	0,3905	0,3748	-
Pf201Δzwf-1 <sup>b</sup>	24	0,1733	0,1732	0,1704	-	0,3292	0,3289	0,3004	-	0,3249	0,3338	0,2985	-
Pf201Δzwf-1 <sup>b</sup>	48	0,1851	0,1834	0,1827	-	0,3255	0,3332	0,3030	-	0,3283	0,3317	0,3043	-
Pf201Δzwf-1 <sup>b</sup>	72	0,1994	0,1983	0,1978	-	0,3291	0,3344	0,3669	-	0,3286	0,3297	0,3656	-
Pf201Δzwf-2 <sup>a</sup>	24	0,1686	0,1667	0,1664	-	0,3796	0,3872	0,3728	-	0,3796	0,3956	0,3783	-
Pf201Δzwf-2 <sup>a</sup>	48	0,1715	0,1703	0,1696	-	0,3856	0,3876	0,3949	-	0,3884	0,3826	0,3916	-
Pf201Δzwf-2 <sup>a</sup>	72	0,1804	0,1801	0,1794	-	0,4004	0,3907	0,4049	-	0,3964	0,3984	0,4096	-

a. Fortynnet 10x ved prøveuttak.

b. Fortynnet 5x ved prøveuttak.

Standardkurve for bestemmelse av alginatkonsentrasjon (Figur B10.1) er basert på A<sub>230</sub>-verdier avlest etter fire timer, korrigert for blank både uten og med lyase.



**Figur B10.1:** Standardkurver for bestemmelse av alginatkonsentrasjon i ukjente prøver. Kurven er basert på rådataene fra måling etter fire timer (Tabell B10.1). Kurven viser sammenhengen mellom absorbans ved 230 nm og alginatkonsentrasjon (g/l).