

Et studie av reguleringsmekanismen for replikasjon av  
mitokondrielt DNA i *Saccharomyces cerevisiae*

**Katrin Abrahamian**



Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

November 2010

## Forord

Denne oppgaven ble utført som et ledd i mastergraden i farmasi ved Farmasøytisk institutt, og har et omfang på 45 studiepoeng. Oppgaven ble gjennomført ved Institutt for klinisk biokjemi (IKB), Rikshospitalet, i perioden fra august 2009 til november 2010.

Gjennomføringsperioden har vært veldig lærerik for meg, spesielt innefor molekylær biologi. Først og fremst vil jeg rette en stor takk til min internveileder professor II ved Farmasøytisk instituttet og avdelingsleder, avdeling for farmakologi, Rikshospitalet, Stein Bergan og eksternveileder og forskningssjef ved Institutt for klinisk biokjemi Magnar Bjørås som gjorde det mulig for meg å gjennomføre denne oppgaven. Så vil jeg takke min veileder ved IKB postdoktor Paul H. Backe som med sin faglige tyngde har bidratt til å få prosjektet i havn. Fra starten av har han bidratt til opplæring, planlegging og gjennomføring av laboratoriearbeidet og ikke minst i skriveprosessen hvor han har bidratt i lesing og retting av språkrelaterte feil. Jeg vil også rette stor takk til postdoktor Mingyi Yang som har vært sentral i siste delen av dette prosjektet. Han har alltid vært positiv og hyggelig, og med sin faglige tyngde har han bidratt til både praktisk og faglig veiledning.

Så vil jeg rette en veldig stor takk til Mari Ytre-Arne som har bidratt aktivt i skriveprosessen, til retting av både faglig og språkrelaterte feil. Hjertelig takk Mari.

Jeg vil takke også Sigrid Kilde som med sin bakgrunn som norsk språklærer har bidratt til lesing og retting av oppgaven.

Jeg vil også takke alle på laben ved klinisk biokjemi og spesielt Janne Strand for hyggelig hjelp og samarbeid ved gjennomføring av laboratoriearbeidet.

Helt til slutt vil jeg takke min mann Fredrik som har vært en stor inspirasjon for meg i hele studie perioden, og mine to døtre som har vært ekstremt tålmodige med meg.

Oslo, 15.november 2010

Katrin Abrahamian

---

## Sammendrag

Det mitokondrielle transkripsjonsapparatet (mitokondriell RNAPolymerase (mtRNAP)) i *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, (sc)) gjærtype, består av subenheten "core" RNAPolymerase (scRpo41) og en transkripsjonsfaktor Mtf1. I mitokondriene danner scRpo41 og Mtf1 et holoenzym (holo-RNAP) ved initiering av mitokondriell DNA (mtDNA) transkripsjon på et dobbeltrådet DNA templat. Studier på aminosyresekvensen til scRpo41 proteinet har avdekket et forlenget N-terminalt domene på ~ 400 aminosyrer og et C-terminalt domene på ~ 75 aminosyrer, sammenlignet med RNA polymerasen fra bakteriofag T3/T7. Funksjonen til proteinets N-terminal, utover de 29 første aminosyrene som lokaliserer proteinet til mitokondriene, er fortsatt uklar. Vi har konstruert en rekke DNA plasmider som uttrykker trunkerte versjoner av scRpo41, for å undersøke hvorvidt den N-terminalen i scRpo41 er involvert i enzymaktiviteten til dette proteinet. Våre resultater viser at én av de trunkerte scRpo41 proteinene, scRpo41-D1 som er forkortet med 313 aminosyrer, fortsatt har full RNA polymeraseaktivitet. Til sammenligning med scRpo41-D1, har det trunkerte proteinet scRpo41-D6 som er forkortet med 385 aminosyrer, dramatisk redusert sin enzymaktivitet.

Tidligere studier har foreslått at Oxr1 (Oxidation Resistance) induseres ved oksidative stress og kan være involvert i regulering av replikasjon og transkripsjon av mtDNA i *S. cerevisiae*. Tidligere *in-vitro* transkripsjonsassay forsøk utført av postdoktor Mingyi Yang tyder på at enzymaktiviteten til scRpo41-WT (villtype) proteinet hindres av scOxr1-WT muligens ved interaksjoner mellom disse to proteinene. Blokkering av enzymaktiviteten til scRpo41 ved Oxr1 vil føre til midlertidig stopp i replikasjonen av mtDNA under oksidativt stress, dette vil gi cellene tid til å igangsette reparasjonsmekanismene for å reparere DNA skadene, slik at mitokondriell genoms integritet opprettholdes og cellenes normal funksjon oppbevares (upublisert data, Rikshospitalet). Vi har uttrykket 3 trunkerte versjoner av scOxr1. Disse ble brukt sammen med de trunkerte versjonene av scRpo41 til å undersøke hvilke deler av disse to proteinene som er nødvendig for en eventuell interaksjoner mellom de som fører til blokkering av enzymaktiviten til scRpo41. Vi har funnet at enzymaktiviteten til scRpo41-D1

og -D6 blokkeres av scOxr1-D6 (trunkert med 73 aminosyrer fra N-terminale enden). Resultatene indikerer at de første 385 aminosyrene fra N-terminale enden til scRpo41 og de første 73 aminosyrene fra den N-terminale enden til scOxr1 proteinet ikke påvirker replikasjonen av mtDNA i *S. cerevisiae*.

Av disse resultatene konkluderer vi med at initiering av replikasjon av mtDNA (dannelsen av RNA primer) blokkeres av en mulig interaksjon mellom scRpo41 og scOxr1 i områder nærmere C-terminale enden til begge proteinene, og at aminosyrene mellom 313-385 er essensielle for RNA polymerase aktivitet i scRpo41.

---

**Innholdsfortegnelse:**

<b>Forord</b> .....	<b>2</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Utstyr og apparaturliste</b> .....	<b>10</b>
<b>Kjemikaler og biologiske produkter benyttet i oppgaven</b> .....	<b>13</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>16</b>
<b>Benevninger</b> .....	<b>18</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>19</b>
1.1 Skader på DNA.....	19
1.2 ROS kilder .....	20
1.3 Forsvarsmekanismer mot skader på DNA molekylet .....	21
1.4 Konsekvenser av oksidative DNA skader .....	22
1.5 Opprinnelsen til eukaryote celler.....	22
1.6 Mitokondrier.....	23
1.6.1 Mitokondrielle sykdommer.....	24
1.7 Transkripsjonsapparatet i gjærsoppen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
1.7.1 Karboksyl og aminoterminal domenet til mtRNA polymerasen....	25
1.8 Oxr1-genet og dens produkt.....	26
1.9 Formålet med oppgaven .....	26
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>29</b>
2.1 Del oppgave 1.....	29
2.1.1 Tilberedning av egne glycerolstocker av OXR1-D6, -D7 og -D8....	29
2.1.1.1 Dag 1: Tilberedning av overnattekultur (ONK) .....	29

---

2.1.1.2	Dag 2: Tilberedning av egen glycerolstock .....	30
<b>2.1.2</b>	<b>Proteinekspressjon .....</b>	<b>30</b>
2.1.2.1	Dag 1: Tilberedning av ONK .....	31
2.1.2.2	Dag 2: Tilberedning av vekstkultur (GC) .....	32
2.1.2.3	Dag 3: Høsting av celler .....	33
<b>2.1.3</b>	<b>Rensing av proteiner .....</b>	<b>34</b>
2.1.3.1	Rensing av proteiner med Ni-NTA agarose affinitetskromatografi.....	34
2.1.3.1.1	Resuspendering av pelletter fra punkt 2.1.2.3 .....	34
2.1.3.1.2	Sonikering av resuspenderte pelletter (cellesuspansjonen) .....	35
2.1.3.2	SDS-PAGE (Natrium Dodekylsulfat Polyakrylamid Gelelektroforese) .....	37
2.1.3.3	(His <sub>6</sub> )-tag kutting av proteinet med proteaseenzymet trombin .....	39
2.1.3.4	Proteindialyse .....	40
2.1.3.5	Rensing av proteiner ved bruk av Resource Q 6 ml kolonne i FPLC .....	41
2.1.3.6	Oppkonsentrering av proteinet med Amicon® Ultra Centrifugal Filters ..	42
2.1.3.7	Rensing av proteiner ved bruk av Superdex 75 2 ml kolonne i FPLC.....	43
2.1.3.8	Måling av proteinkonsentrasjon med spektrofotometer .....	45
<b>2.2</b>	<b>Deloppgave 2 .....</b>	<b>46</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Kloning av DNA fragmentene .....</b>	<b>46</b>
2.2.1.1	Frambringe det aktuelle gen (DNA) .....	46
2.2.1.1.1	PCR av hvert enkelt insert (2.2.1).....	46
2.2.1.1.2	Agarose gelelektroforese.....	49
2.2.1.1.3	Isolering og rensing av PCR-produktene.....	51
2.2.1.1.4	Restriksjonskutting av DNA produktene og vektoren.....	53
2.2.1.1.5	Ligering av restriksjonskuttet og rensset PCR produkt og pET28b <sup>+</sup> .....	56
2.2.1.1.5.1	<i>Metode 1: Ligering av PCR produktene RPO41-D1, -D2 og -D3.....</i>	<i>57</i>
2.2.1.1.5.2	<i>Metode 2: Ligering av PCR prouduktene RPO41-D5 og -D6.....</i>	<i>58</i>

---

2.2.1.1.6	Transformering av rekombinant DNA inn i ER2566 celler .....	60
2.2.1.1.7	Minipreparering av plasmid DNA .....	61
2.2.1.1.8	Kontroll av isolert plasmid fra ER2566 celler ved gelelektroforese .....	63
2.2.1.1.8.1	<b>Metode 1:</b> Koloni-PCR-reaksjon med MiniPrep-produktene .....	63
2.2.1.1.8.2	<b>Metode 2:</b> Restriksjonskutting av Miniprep-produktene.....	64
2.2.1.1.9	Sekvensering .....	64
2.2.1.1.10	Transformasjon av Rpo41-konstruktene inn i E.coli BL-21 celler.....	65
<b>2.2.4</b>	<b>Ekspresjonstest av Rpo41 konstruktene.....</b>	<b>66</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Uttrykk av Rpo41 proteinene i stor skala .....</b>	<b>68</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Westernanalyse av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6.....</b>	<b>68</b>
2.2.6.1	SDS-PAGE (Natrium dodecyl sulfat-polyakrylamid gelelektroforese) .....	68
2.2.6.2	Blotting av gel over til en membran.....	69
2.2.6.3	Blokkering av membran.....	70
2.2.6.4	Tilsetting av primærantistoff .....	70
2.2.6.5	Tilsetting av sekundærantistoff.....	71
2.2.6.6	Fremkalling.....	71
<b>2.2.7</b>	<b>Massespektrometri (MS) av Rpo41-D1 .....</b>	<b>72</b>
<b>2.3</b>	<b>Deloppgave 3.....</b>	<b>73</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>In vitro</i> transkripsjonsassay .....</b>	<b>73</b>
2.3.1.1	Tilberedning av 20 % LR/ 8 M Ureagel (tabell 3.1).....	75
2.3.1.2	Tilberedning av MM reaksjonsløsning.....	76
2.3.1.3	Tørrking av gelen ved 80 °C .....	79
2.3.1.4	Filmeksponering og skanning.....	80
<b>3</b>	<b>Resultater og diskusjon .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1</b>	<b>Deloppgave1.....</b>	<b>81</b>

---

<b>3.1.1</b>	<b>Ekspresjon og rensing av Oxr1-D6, -D7 og -D8 proteinene .....</b>	<b>81</b>
3.1.1.1	<b>Rensing av Oxr1-D6.....</b>	<b>81</b>
3.1.1.1.1	<i>Isolering og rensing av Oxr1-D6 med Ni-NTA agarosekolonne.....</i>	<i>81</i>
3.1.1.1.2	<i>Oxr1-D6 (His<sub>6</sub>)-tag kutting med proteaseenzymet trombin.....</i>	<i>82</i>
3.1.1.1.3	<i>Oxr1-D6 rensing med resource Q kolonne .....</i>	<i>82</i>
3.1.1.1.4	<i>Oxr1-D6 rensing med superdex 75 kolonne.....</i>	<i>83</i>
3.1.1.2	<b>Rensing av Oxr1-D7 .....</b>	<b>85</b>
3.1.1.2.1	<i>Isolering og rensing av Oxr1-D7 med Ni-NTA agarosekolonne.....</i>	<i>85</i>
3.1.1.2.2	<i>Oxr1-D7 (His<sub>6</sub>)-tag kutting med proteaseenzymet trombin.....</i>	<i>85</i>
3.1.1.3	<b>Rensing av Oxr1-D8.....</b>	<b>86</b>
3.1.1.3.1	<i>Isolering og rensing av Oxr1-D8 med Ni-NTA agarosekolonne.....</i>	<i>86</i>
<b>3.2</b>	<b>Deloppgave 2.....</b>	<b>88</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Kloning av Rpo41 trunkerte versjoner.....</b>	<b>88</b>
3.2.1.1	<b>PCR amplifisering av DNA fragmentene .....</b>	<b>88</b>
3.2.1.2	<b>Isolering og rensing av PCR produktene med GFX kit .....</b>	<b>89</b>
3.2.1.3	<b>Restriksjonskutting og ligering .....</b>	<b>90</b>
3.2.1.4	<b>Påvisning av PCR produkt i plasmid.....</b>	<b>92</b>
3.2.1.5	<b>Sekvensering av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6 .....</b>	<b>94</b>
3.2.1.6	<b>Transformering av plasmidene i BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL celler .....</b>	<b>94</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Ekspresjonstest av Rpo41 konstruktene.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Ekspresjon av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6 i stor skala .....</b>	<b>96</b>
3.2.3.1	<b>Isolering og rensing av Rpo41-D1 proteinet med Ni-NTA kolonne .....</b>	<b>96</b>
3.2.3.1.1	<i>Rpo41-D1 (His<sub>6</sub>)-tag kutting med proteaseenzymet trombin .....</i>	<i>96</i>
3.2.3.2	<b>Isolering og rensing av Rpo41-D2 proteinet med Ni-NTA kolonne .....</b>	<b>98</b>
3.2.3.3	<b>Isolering og rensing av Rpo41-D3 proteinet med Ni-NTA kolonne .....</b>	<b>99</b>
3.2.3.4	<b>Isolering og rensing av Rpo41-D5 proteinet med Ni-NTA kolonne .....</b>	<b>100</b>



---

3.2.3.5	Isolering og rensing av Rpo41-D6 proteinet med Ni-NTA kolonne .....	101
3.2.3.5.1	<i>Rpo41-D6 rensing med resource Q kolonne</i> .....	102
3.2.4	Resultater for Westernanalyse .....	103
3.3	Del oppgave 3 .....	105
3.3.1	<i>In vitro</i> transkripsjons assay .....	105
4	Konklusjon .....	108
4.1	Oxr1 konstruktene .....	108
4.2	Kloning av Rpo41 .....	108
4.3	Rpo41 konstruktene .....	109
4.4	Transkripsjonsassay .....	109
5	Fremtidig arbeid .....	111
	Kildeliste .....	112
	Bilagsliste .....	116

**Utstyr og apparatursliste:**

<b>Utstyr/ apparatur</b>	<b>Leverandør</b>
Avtrekks-skap	System PEGASUS
Blotteapparat	Semi-dry Blot, Bio-Rad
Destillasjonsapparat til vann	Automatic Sanitization Module, Millipore
Dialyseslange	Spectra/Por®Dialysis membrane MWCO: 12-14 000
Elektroforeseapparat	Power Ease 500, Invitrogen
Elektroporeringsapparat	ECM 830, Electro Square Porator™ BTX
Sterilfilter for filtrering av løsninger	Millipore
Filterpapir til Westernblotting	Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad
Filter for proteinoppkonsentrering i plastrør	Amicon® Ultra Centrifugal Filters, 10.000 MWCO, Millipore
FPLC	ÄKTA Purifier Amersham Bioscience
FPLC skriver	HP
FPLC kolonne	Resource Q, 6 ml (ion exchange column), GE Healthcare
FPLC kolonne	Superdex 75, 2 ml (gel filtration column), AmershamPharmacia biotech
“Screenplate” (Fremkallingsfilm <sup>32</sup> P)	GE HealthCare
Fremkallingsmaskin PCR-geler	Kodak Gel Logic 200 Imaging System
Fremkallingsmaskin radioaktivegeler	Typhoon skanner, 9410 Variable Mode Imager, Amersham Bioscience
Fremkallingsmaskin Westerngeler	Kodak Image Station 4000 MM og MolecularImager®Systems, BioRad
Inkubatorskap (Refrigated Incubator Shaker)	Inn Ova 4230, Edison NJ USA, NEW BRUNSWICK SCEINTIFIC
Inkubatorskap	GFL 3031
Inkubatorskap	Binder

Kjøreoppsats for agarosegeler	Mini Horizontal Submarine Unit
Kjøreoppsats til proteiner	Novex Mini-Cell, Invitrogen
Kjøreoppsats til transkripsjons protein	Mini-Protean®, Bio-Rad
Kyvetter til spectrometer	Polystyrene 10x4x45, Sarstad
Kyvetter til transformasjon av <i>E.coli</i> celler (Electroporation Cuvettes Plus™)	BTX
Kyvetter til DNA måling	PCR UVette®, Eppendorf AG
Magnettrører	RCT basic, IKA laboratories
Membran til westernanalyse	Hybond™-P, Phamashia
MQ- vann apparat	Milli-Q Water Purification System, Millipore
NUNC rør	CRYOTUBE: 1,8 ml SI, Nunc A/S
PCR maksin	DNA engine MJ Research, DTC- 200 Peltier Therna Cyclor
PCR maskin	Eppendorf
PCR reagensrør	BIO plastic EU thinwall 8-tube, 0,5 ml / 0,2 ml Thermo-tube, Thermo Scientific
Pipetter	0,2 – 2 µl, 1-10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, Thermo Lab systems
Pipettespisser med filter	ART
Pipettespisser uten filter	Bioclean
Pipette (elektrisk)	Pipetboy Comfort, IBS INTEGRA Biosciences
Pipettespiser for elektrisk pipette	10 ml /25 ml sterile SARSTAD
Reagensrør (plast)	30 ml, 50 ml SARSTAD
Resource Q kolonne for FPLC	GE Healthcare
Ristebrett	Multi-shaker, BioSan

Rullebrett	Roller mixer SRT2, Stuart Science
Sentrifuge med kjøleelement	-Biofuge Primo R, Heraeus Instruments/ -Bioguge Fresco, Heraeus Instruments/ -SORVA II, RC5C PLUS / -BECKMAN COULTER™
Sentrifuge uten kjøleelement	-Biofuge pico, Heraeus Instruments / -Megafuge 1,0, Heraeus Instruments
Sonikeringsapparat	Vibra Cell™, Sonics & Materials Inc.
Spectrometer	BioPhotometer, Eppendorf
Superdex 75, 2ml FPLC kolonne	AmershamPharmacia biotech
Syber®Safe DNA gel strain, 10.000 x concentration in DMSO	Invitrogen
Tørkepapir for radioaktiv gel (Whatman CHR paper)	Whatman (part of GE HealthCare)
Vakumtørker til radioaktivegeler	Bio-Rad
Vannbad	SUB Aqua 12, Grant
Varmeblokk	KEBO Lab AS, Grant
Varmeblokk med rister	Thermomixer Comfort, VWR
Vekt	-Capacity 3000gx0,1g UWE NJW-3000 / -Mettler Toledo max 310g / -Sartorius LE 42025
Vippebrett	ROCK-N-ROLLER, Labinco
Vorteksmikser	MS2 Minishaker, IKA Labortechnik
UV apparat for synliggjøring av DNA (UV Transilluminator)	UVP,INC.

**Kjemikaler og biologiske produkter benyttet i oppgaven:**

<b>Produkt</b>	<b>Leverandør</b>
Agarskåler	LB/Kan. Rikshospitalet
10% APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad
BI21-Codon Plus® (DE3)-RIL Competentcells	Agilent Technologies
BamHI retsriksjonsenzym	BioLabs
Betain	Sigma
β-Merkaptoetanol	Sigma
Bradford assay reagens	Bio-Rad laboratories
<sup>32</sup> P- UTP (Uridine 5`-triphosphate [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P])	PerkinElmer
PFU DNA polymerase	Fermetas
DNA rense kit: QIAprep® Miniprep	QIAGEN
DNA størrelsesmarkør (1kb DNA Ladder)	BioLabs Inc
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich
EDTA (etlendiamintetraeddiksyre) 0,5M	Sigma
ER 2566 celler	Har på egen laboratoriebiblioteket
Fremkallingsvæske western: Immun-Star™, Western CTM, kjemiluminescent kit	Bio-Rad
Geler til protein analyse	Clear PAGE™ SDS gel, 12% TEO-CI SDS, C:B:S. Scientific
Geler til western	NuPAGE® 10 % Bis-Tris Mini Gels 1 mm tykke, 10 brønner, Invitrogen
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Imidazol	MERCK
Luminol/Enhacer løsning	Immun-Star™WesternC™

Peroksid løsning	Immun-Star <sup>TM</sup> WesternC <sup>TM</sup>
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thio Galactopyranoside (Dioxanfri) >99%	Apollo Scientific Limited
Kanamycin sulfat	Sigma- Aldrich
Ligase T4	Fermentas
6 X Loading Dye Solution	BioLabs Inc
LongRanger Gel Solution 50 %	Lonza, Rockland, USA
Melkepulver, skummet	Fluka, Steinheim, Sveits
20 X MOPS 3-(N-morfolino) propansulfonsyre	Invitrogen
NheI restriksjonsenzym	BioLabs
Ni-NTA agarose med etanol	QIAGEN
NuPAGE <sup>®</sup> LDS sample buffer 4 X	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE <sup>®</sup> SDS MOPS running buffer 20X	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuSieve <sup>®</sup> GTG <sup>®</sup> Agarose Low melting temperature agarose	Lanzo
pET28b+	Novagen
Primere for Rpo41- D1/-D2/-D3/-D5/-D6	Operon, Ebersberg, Tyskland
Primær antistoff: anti-mus Penta- His antistoff	QIAGEN
RNA Decade marker 10-100nt	Ambion
RNA Gel Loading buffer II	Ambion
RNA gel loading buffer	Ambion
SDS (natriumlaurylsulfat)	Bio-Rad, Hercules, USA
Seakem <sup>®</sup> LE-agarose	Lonza, Rockland, USA

---

SeaBlue® Plus2 proteinstandard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundær antistoff: Geit anti- mus IgG/IgM HRP (1: 10000)	Jackson imunoresearch
SOC løsning	Percoll Pharmacia
Syber®Safe DNA gel stain	Invitrogen, Carlsbad, USA
50 X TAE	Eget lab
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamid)	Bio-Rad, Hercules, USA
Transkripsjonsassay kit: MAXIscrip® Kit	Ambion, Inc.
Urea	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

---

**Forkortelser**

AP	Apurin/apyrimidin
APE	AP endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintrifosfat
BER	Base utkuttingsreparasjon
Bp	Basepar
DDT	Dithiothreitol
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNTP	Deoksynukleotidtrifosfat
EDTA	Etylendiaminotetraeddiksyre
(F) primer	Forward primer
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Hhv	Henholdsvis
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoksid
HRP	Horse Reddish Peroxidase
IPTG	Isoprpyl-β-D-Thiogalaktopyronosid
LB	Luria-Bertani
LMP	Lavt smeltepunkt
β- ME	β-merkapttoetanol
MCS	Multi Cloning Site



mtDNA	Mitokondrielt DNA
Mtf1	Mitokondriell transkripsjonsfaktor i <i>S.cervisiae</i>
mtRNA	Mitokondrielt RNA
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonsyre
MQ	Destillert vann
NER	Nukleotid utkuttingsreparasjon
Ni-NTA	Nikkel-nitrilotrieddiksyre
OD	Optisk tetthet
ONK	Overnattskultur
Osv	Også videre
OXPPOS	Oksydativefosforlyering
Oxr1-protein	Oxidation Resistense protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PAGE	Polyakrylamid gelelektroforese
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNAP	RNA polymerase
(R) primer	Riverse primer
ROS	Reactive oksygenforbindelser
RNA	Ribonukleinsyre
Rpm	Rotasjoner per minutt
scRpo41-protein	Mitokondriell RNA polymerase i <i>S.cervisiae</i>

SDS	Natrium dodekylsulfat
SOC	Super optimal broth
<i>S.cervisiae</i> / eller (sc)	<i>Saccharomyces cervisiae</i>
TAE	Tris/acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'- tetrametylendiamid
Tris	Trisi(hydroksymetyl)aminometan
UV	Ultraviolet
WT	Villtype

### **Benevninger**

°C	Grader Celsius
G	Gram
Kb	Kilobaser ( $10^3$ b)
kDa	kilo Dalton ( $10^3$ Da)
L	Liter (1000ml)
µl	Mikroliter
M	Molar
Pmole	Picomole (1 pmole = $1 \cdot 10^{-12}$ mole)

# 1 Innledning

## 1.1 Skader på DNA

Arvestoffet i alle levende celler består av DNA (deoksyribonukleinsyre). DNA består av et deoksyribose, fosfat og en av de fire basene A (adenin), T (tymidin), G (guanin) og C (cytosin) i lange sekvenser. Rekkefølgen til disse basene utgjør den genetiske koden.

Daglig oppstår tusenvis av DNA skader per celle forårsaket av replikasjonsfeil, eller av forskjellige forbindelser dannet gjennom cellemetabolismen. Dersom skadene ikke repareres, oppstår mutasjoner.

Mutasjoner foregår spontant, naturlig og kontinuerlig, og er forutsetningen for evolusjonen. Mutasjoner i DNA molekylet kan oppstå blant annet når reparasjonsmekanismer i cellene verken oppdager eller retter på feil som oppsto under DNA-replikasjonen. Mutasjoner kan også oppstå ved påvirkning av mutagener. Baseanaloger, basereaktivemolekyler, interkalerendemolekyler er eksempler på eksogene mutagener som gir kjemiske forandringer i DNA molekylet og påfølgende mutasjoner [1], [42].

ROS (Reaktive Oksygenforbindelser) er eksempel på endogene mutagener [2]. De er mellomprodukter som dannes fra oksygenreduksjonen i cellemetabolismen, og regnes som noen av de viktigste endogene mutagenene [1, 3]. DNA skades ved at ROS enten reagerer direkte med DNA, eller ved indirekte reaksjon med andre cellekomponenter som lipider og proteiner. En slik reaksjon mellom ROS og lipider eller proteiner vil medføre til oksidasjon av disse molekylene. Det gir flere mellomprodukter som igjen reagerer med DNA molekylet og gir skader, mutasjoner eller apoptose [4, 5].

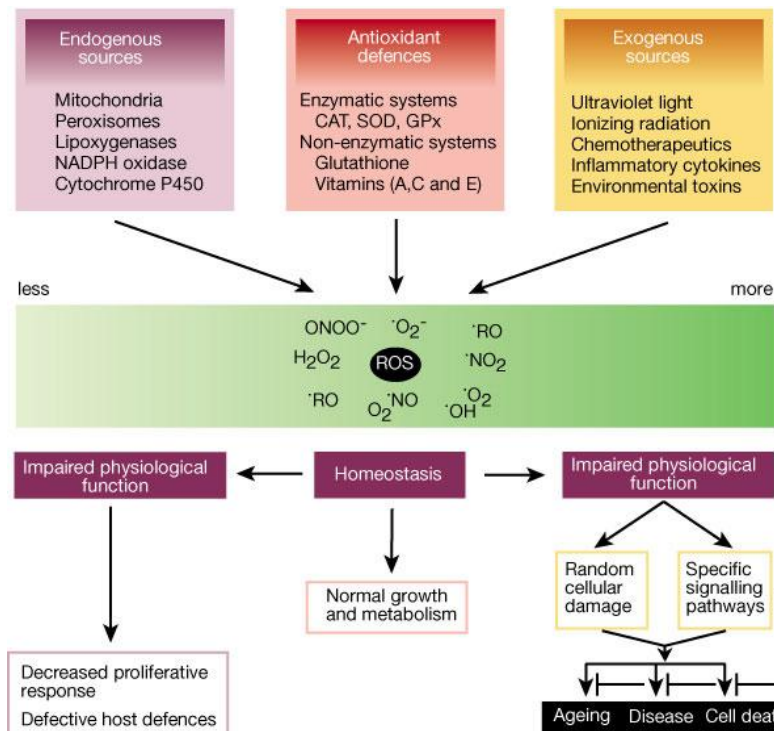
Varme og stråling regnes som både eksogen og endogen mutagener. Høy temperatur kan bryte ned N-glykosidbindingen mellom ribosen og nitrogenbase ved hydrolyse [1],[42], mens UV-lys ved bølgelengde 260nm kan absorberes av DNA basene og føre til brudd i DNA-tråden. Både høy temperatur og UV-stråling fører til økt produksjon av ROS i celler [1, 3, 5].

ROS er ikke bare skadelig for cellene, de brukes også som signalmolekyler ”second messengers” ved både fysiologiske og patofysiologiske tilstander (figur 1.1). De er viktige faktorer for å opprettholde homeostase og normal cellevekst og metabolisme. I tillegg superoksid radikaler ( $\dot{O}_2$ ) og hydrogenperoksider ( $H_2O_2$ ) er viktige stoffer i neutrofiler for bekjempelse av infeksjoner [6-8].

## 1.2 ROS kilder

$O_2$  er nødvendig for aerobe livet. Den inngår i elektrontransportkjeden for å danne ATP som cellene bruker som energikilde [2]. Fri radikaler er molekyler som har uparede elektronorbitaler. De er ustabile og veldig reaktive molekyler. ROS er et eksempel på slik fri radikal stoffer og omfatter superoksid radikal ( $\dot{O}_2$ ), hydrogenperoksider ( $H_2O_2$ ), hydroksyl radikal ( $OH\cdot$ ). Disse molekylene dannes av de uparede elektronorbitalene i  $O_2$ . I tillegg til ROS finnes andre kjemiske forbindelser som regnes som fri radikaler, som eksempel kan nevnes peroksyd ( $RO_2\cdot$ ), alkoksyd ( $RO\cdot$ ) og hydroperoksyd ( $HO_2\cdot$ ) [7, 9].

Det meste av ROS produksjonen dannes i mitokondriene hvor det foregår elektrontransportkjeden foregår [1].



Figur 1.1: Figuren viser kildene til ROS produksjonen i celler, og de ulike cellulære responser som kan skje som følge av ROS dannelsen.

ROS dannes blant annet fra cellemetabolismen, i mitokondrier, peroxisomer og andre enzymsystemer som finnes i cytosolen. I tillegg kan en rekke eksogene forbindelser utløse ROS produksjon.

I cellene finnes både enzymatisk og ikke-enzymatisk antioksidant forsvarsmekanismer som motvirker og regulerer ROS nivåene for å opprettholde fysiologisk homeostase. Redusert ROS nivåer, kan redusere cellenes forsvarsmekanismer mot bakterier og infeksjoner. Mens økning i ROS kan også være skadelig, og føre til celledød eller forgang i aldring og aldersrelaterte sykdommer og til slutt celledød [3].

### 1.3 Forsvarsmekanismer mot skader på DNA molekylet

Selv om mutasjoner i DNA oppstår kontinuerlig, gir de sjelden opphav til sykdommer. Det skyldes at cellene har mange forsvarsmekanismer som begrenser mengden av ROS og de påfølgende skadenevirkningene som ROS kan forårsake. SOD (superoksid dismutase), CAT (catalase) og Gpx (glutation peroksid) er eksempler på slike enzymatiske skavangere. SOD katalyserer omdanningen av superoksid til hydrogenperoksid, mens katalase og glutatation peroksid omdanner hydrogenperoksid til vann.

I cellene finnes også skavangere som ikke har enzym-aktivitet, og som nøytraliserer ROS.

Askorbinsyre, pyruvat, flavonider, karotenoider og glutatation er eksempel på slike skavangere. [1, 3, 7, 9].

I cellene finnes det reparasjonsmekanismer som reparerer DNA-skader. Eksempler på slike mekanismer er baseutkuttingsreparasjon (Base Excision Repair, BER), nukleotidutkuttingsreparasjon (Nucleotid Excision Repair, NER), Ap-Endonukleaser (APE) [1, 5, 10].

Det vil alltid være en balanse mellom ROS produksjon og antioksidantforsvar i cellene, og det er denne balansen som alltid vil utgjøre graden av oksidativt stress. Forskyvninger i denne balansen kan føre til opphoping av oksidative skader [3].

#### **1.4 Konsekvenser av oksidative DNA skader**

Oksidative DNA-skader har konsekvenser for cellen og kan føre til kreft, aldring og neurologiske sykdommer [2, 11, 12]. Studier har sammenlignet normale vev fra tarm, magesekk, eggstokker, hjerne og lunger med kreftvev fra de samme organene, og har påvist betydelig høyere nivåer av oksidativt DNA-skader i de respektive kreftvevene [13]. Andre studier har påvist at kreftrisikoen øker med alderen hos mennesker [12], og at opphoping av DNA-skader i hjernen er årsaken til Alzheimer sykdommen (AD) [2, 14].

Det finnes mange studier som har undersøkt sammenhengen mellom oksidative DNA-skader og blant annet kreft, aldring, nevrodegenerative lidelser, noe som viser hvor viktig det er å kjenne til de forskjellige mekanismene som kan redusere skadevirkningene av ROS.

#### **1.5 Opprinnelsen til eukaryote celler**

Det antas at mitokondriene stammer fra prokaryote celler som var aerobe og innholdt gener for oksidativfosforylering. For ca 1,5 milliarder år siden ble denne aerobe prokaryote cellen tatt opp ved endocytose av en anaerob "protoeukaryot" celle. Fusjonen mellom den anaerobe og aerobe cellen var hensiktsmessig på grunn av økt oksygen innhold i atmosfæren. Gjennom utviklingen antas at det meste av det prokaryote genomet ble overført til cellens kjerne (nukleært DNA), og resten av cellen ble til en mitokondrie med noen få gener (mt-DNA) [2],[41].

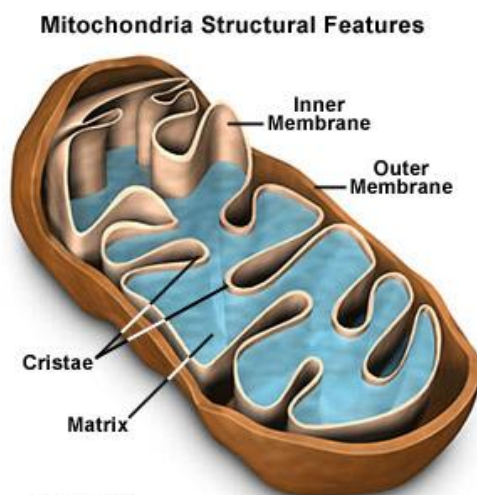
## 1.6 Mitokondrier

Alle eukaryote celler har mitokondrier. De er små organeller i cytoplasma, og har et dobbelt membranlag bestående av en indre og en ytre membran.

Den ytre membranen er organellens vegg mot cytosol og har mye mindre overflate enn den indre membranen. Ytermembranen er permeabel for alle molekyler som er mindre enn 5000 Dalton. Innermembranen har stor overflate fordi den danner folder; så kalte *cristae*.

Innermembranen omringer matrix (figur 1.2) og er impermeabel for ioner, men tillater selektiv passage av små molekyler som er nødvendig for de mitokondrielle enzymene i matrixen.

Mitokondrier har en diameter på ca 0,5-1  $\mu\text{m}$ . De er dynamiske organeller som forandrer form kontinuerlig.



**Figure 1**

Figur 1.2: Oppbygning av mitokondrie.

I mitokondrienes matrix finnes enzymer som inngår i elektrontransportkjeden og er viktige for den oksidative fosforyleringen (OXPHOS) som danner det meste av cellenes energi i form av ATP. I matrix finnes det også mitokondrielle DNA (mtDNA). For at mtDNA skal uttrykkes og replikeres, er det behov for RNA polymerase og en del andre transkripsjonsfaktorer. Disse kodes i cellekjernen og importeres til mitokondriene. I matrix finnes også mitokondrielle

ribosomer, tRNA-er, og forskjellige enzymer som er nødvendig for mitokondriell genekspressjon. [2], [41].

### **1.6.1 Mitokondrielle sykdommer**

Mutasjoner i mtDNA forårsaker en rekke sykdommer i mennesker. Selv om de kun koder for noen få enzymer og RNA komponenter, er det viktig at mutasjoner ikke skjer i mtDNA.

Mutasjoner i mtDNA vil gi endringer i cellenes energimetabolisme som følge av endringer i enzymaktiviteten til enzymene som inngår OXPHOS reaksjonen, og dermed en lang rekke andre skader som økt ROS produksjon, oksidativt stress, celledød og/eller sykdom.

Mitokondrier arves fra moren, av den grunn vil genmutasjoner i mtDNA gi opphav til sykdommer som arves fra moren. Siden mye av det mitokondriell proteomet (ca.1500 proteiner) kodes i cellekjernen, vil genmutasjoner i genene som koder for mitokondrielle proteiner fra cellekjernen, også føre til mitokondrielle sykdommer. Slike mutasjoner arves etter Mendelske regler. Eksempel på mitokondrielle sykdommer forårsaket av mutasjoner i mtDNA, er nevrologisk degenerasjon, muskel dysfunksjon og mosjonutoleranse, døvhet, blindhet, diabetes og kardiomyopati [2, 15-19].

### **1.7 Transkripsjonsapparatet i gjærsoppen *Saccharomyces cerevisiae***

En av de enkleste representanter for eukaryote organismer er den éncellede gjærsoppen, *Saccharomyces cerevisiae*. Studier av denne encellede soppen har lært oss mye om hvordan våre egne eukaryote celler fungerer [42].

Det mitokondrielle transkripsjonsapparatet (mtRNAP) i *S. cerevisiae* består av subenheten ”core” RNAPolymerase (scRpo41) og en transkripsjonsfaktor Mtf1. Begge proteinene kodes av cellekjernen og transporteres til mitokondriene for å utøve sin funksjon og opprettholde det mitokondrielle genomet [20-23].

Like før transkripsjon initiering dannes en holoenzym mellom scRpo41 og Mtf1 (holo-RNAP). Dette holoenzymkomplekset har evnen til spesifikt å lokalisere promotorer på dobbelttrådet DNA og initiere transkripsjonen. Etter dannelsen av et kort transkript Mtf1



---

frigjøres. scRpo41 gjenkjenner promotorsekvensen [5`-ATATAAGTA(+1)], mens Mtf1 separerer de to DNA-trådene slik at scRpo41 kan starte transkripsjonen. Dersom promotoren enten er ”pre-meltet”, inneholder en mismatch-boble eller dersom DNA templatet er ”supercoilet” kan scRpo41 initiere transkripsjon *uten* transkripsjonsfaktoren Mtf1. Dette kommer av at energibarrieren for åpning av promotorområdet er lavere. Dermed har det blitt foreslått at behovet for transkripsjonsfaktoren Mtf1 bare gjelder på ”skadefritt” dobbeltrådet DNA. Mtf1 er altså ikke involvert i gjenkjennelse av promotorer. Verken Rpo41 eller Mtf1 kan åpne promotor for å initiere transkripsjonen fra skadefritt, dobbeltrådet DNA alene [24-31].

### 1.7.1 Karboksyl og aminoterminal domenet til mtRNA polymerasen

Studier på mitokondriell RNA polymerase (mtRNAP) fra *S. cerevisiae* har avdekket et forlenget N-terminalt domene på ~ 400 aminosyrer i aminosyresekvensen og et forlenget C-terminalt domene på ~ 75 aminosyrer sammenlignet med T3/T7 bakteriofag RNA polymerasene [32].

Søk i tilgjengelige aminosyresekvensdatabaser for å sammenligne aminosyresekvensen fra RNA polymerasen til *Saccharomyces cerevisiae* med RNA polymerasen fra bakteriofagene T3, T7 og SP6 har funnet stor sekvenslikhet mellom disse 4 proteinene. Likheten mellom scRNA polymerasen (scRpo41) og T3/T7 bakteriofag RNA polymerasen er lokalisert i 8 høykonserverte områder fordelt på 2/3 av Rpo41 proteinets C-terminal, mens disse likhetene er spredt over den totale lengden til bakteriofag proteinet [32].

Strukturanalyser og mutasjonsanalyser av den C-terminale enden til T7 RNA polymerase enzymet har vist katalyserende aktivitet samtidig som den har en viktig funksjon for gjenkjennelse av promotorer [33, 34]. Den N-terminale enden i T7 polymerasen er foreslått å være involvert i å opprettholde stabilitet i polymerase-promotor kompleksene [35].

Funksjonen til den N-terminale enden i mtRNA polymerasen (scRpo41), utover de første omtrent 29 aminosyrene som har mitokondriell lokalisasjonsoppgave, er fortsatt uklar. Det

har blitt foreslått at den N-terminale enden i scRpo41 kan være nødvendig for mtDNA replikasjon og/eller til å stabilisere mtDNA ved replikasjonen [36].

### **1.8 Oxr1-genet og dens produkt**

Replikasjonen av mtDNA reguleres ved oksidativt stress, og denne reguleringen er viktig for å opprettholde genomets integritet og cellenes funksjon. Både human "Oxidation resistens" OXR1 (hOXR1) og *S. cerevisiae* OXR1 (scOXR1) induseres av oksidative skader og er involvert i å reparere skadene og dermed beskytte cellens DNA mot disse skadene. Den biokjemiske mekanismen for denne beskyttelsen er ukjent. OXR1 genet i de ulike eukaryote cellene koder for proteiner med ulike størrelser, men likevel inneholder alle et konservert domene på ~ 300 aminosyrer i proteinets C-terminale ende. Dette konserverte domene tilsvarer hele Oxr1 proteinet i *Saccharomyces cerevisiae*. Basert på resultater fra tidligere studier utført på scOxr1 proteinet kan det tenkes at disse ~ 300 aminosyrene er et unikt funksjonelt domene. Det antas at scOxr1 proteinet er lokalisert i mitokondriene. [37, 38].

### **1.9 Formålet med oppgaven**

På Rikshospitalet, ved Institutt for klinisk biokjemi, arbeides det med funksjonsanalyser av Oxr1 proteinet. Tidligere studier på Rikshospitalet har foreslått at scOxr1 binder seg spesifikt til scRpo41 RNA polymerasen og hindrer transkripsjon av mtDNA, dermed kan Oxr1 proteinet være involvert i regulering av replikasjon og transkripsjon av mtDNA i *S. cerevisiae* (upublisert data, Rikshospitalet).

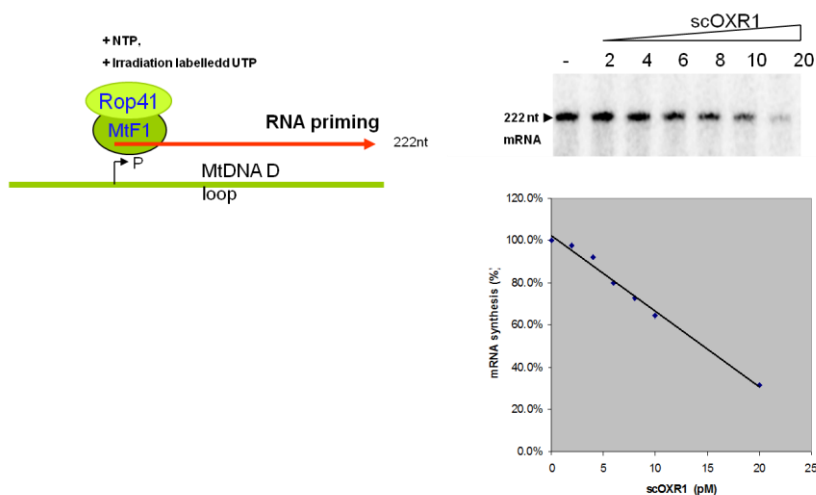
Det mitokondrielle transkripsjonsapparatet (mtRNAP) i *S. cerevisiae* består av subenheten "core" RNAPolymerase (scRpo41) og en transkripsjonsfaktor Mtf1, begge proteinene kodes av cellekjernen og transporteres til mitokondriene, hvor de sammen danner et holoenzym (holo-RNAP) ved initiering av mtDNA transkripsjonen, dermed kan de to sammen spesifikt lokalisere og binde seg til promotor på et dobbeltrådig DNA templat.

Tidligere forsøk utført av post.doc. Mingyi Yang ved Rikshospitalet har avdekket redusert enzymaktivitet for scRpo41-WT som følge av en mulig interaksjon mellom scOxr1 og scRpo41. Det har blitt foreslått at under oksidativt stress hvor det er observert økt induksjon

av Oxr1 proteinet, vil interaksjoner mellom Rpo41 og Oxr1 føre til blokkering av replikasjon initiering, dette i sin tur vil føre til midlertidig stopp i replikasjonen av mtDNA. Dette vil gi cellene tid til å igangsette reparasjonsmekanismene for å reparere DNA skader påført av ROS. På den måten opprettholdes mitokondriell genomets integritet og cellenes normal funksjon oppbevares (figur 1.3, Rikshospitalet).

### Transkripsjonsassay

*In vitro*: scOxr1 hemmer RNA replikasjonen ved å hindre dannelsen av RNA primer



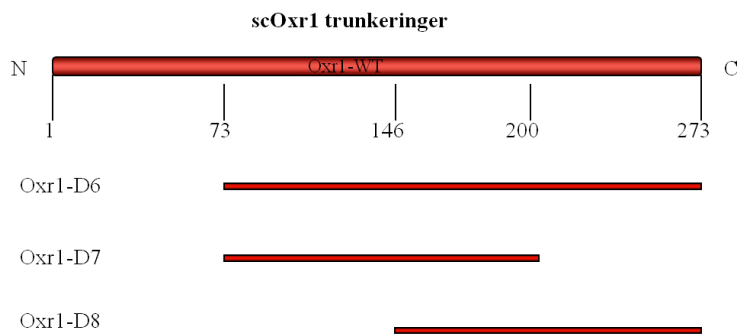
Figur 1.3: Figuren til venstre viser skjematisert fremstilling av dannelsen av holoenzymet (Rpo41 og Mtf1) for å initiere transkripsjonen av mt-DNA templatet.

Figuren til høyre viser et *in-vitro* RNA transkripsjonsassay hvor transkripsjonsaktiviteten til Rpo41-WT blokkeres ved tilsetning av Oxr1-WT. En mulig forklaring på blokkeringen av transkripsjonsaktiviteten kan skyldes en interaksjon mellom disse to proteinene [Rikshospitalet].

I denne oppgaven har vi gjort biokjemisk karakterisering av proteinene scRpo41 og scOxr1, med fokus på å undersøke det biokjemisk aktive domenet i scRpo41 og proteinets mulige interaksjon med scOxr1.

### **Oppgaven består av tre deler:**

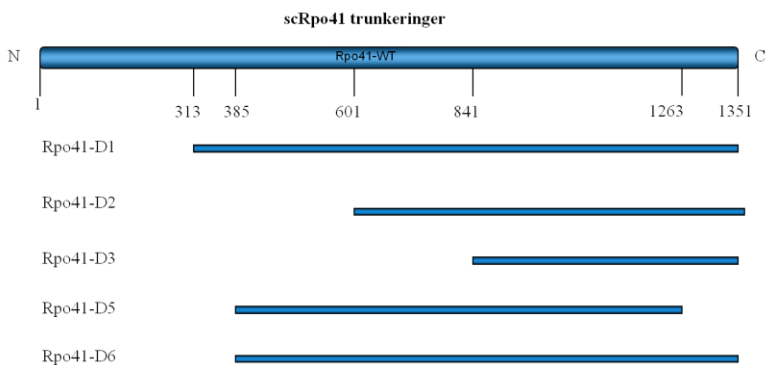
**Del oppgave 1:** Her skal de ulike trunkeringene til scOxr1-proteinet (Oxr1-D6, -D7 og -D8), uttrykkes i *E. coli* bakterier, renses og brukes i videre arbeidet med oppgaven når interaksjoner mellom scOxr1 og scRpo41 undersøkes.



Figur 1.4: Skjematisk fremstilling av de ulike trunkeringene til scOxr1 proteinet.

Oxr1-D6: Forkortet med 73 aminosyrer fra N-terminalen til proteinet, Oxr1-D7: Forkortet med 73 aminosyrer fra N-terminalen og 88 aminosyrer fra C-terminalen til proteinet og Oxr1-D8: Forkortet med 146 aminosyrer fra N-terminalen til proteinet [Rikshospitalet].

**Del oppgave 2:** De ulike trunkeringer av RNA polymerasen til gjæren *S. cerevisiae* (scRpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6) skal klones, uttrykkes i *E. coli* bakterier, renses og brukes i videre arbeidet med oppgaven, når interaksjoner mellom scOxr1 og scRpo41 undersøkes.



Figur 1.5: Skjematisk fremstilling av de ulike trunkeringene til scRpo41 proteinet.

Rpo41-D1: Forkortet med 313 aminosyrer fra N-terminalen til proteinet, Rpo41-D2: Forkortet med 601 aminosyrer fra N-terminalen til proteinet, Rpo41-D3: Forkortet med 841 aminosyrer fra N-terminalen til proteinet, Rpo41-D5: Forkortet med 385 aminosyrer fra N-terminalen og 88 aminosyrer fra C-terminalen til proteinet og Rpo41-D6: Forkortet med 385 aminosyrer fra N-terminalen til proteinet [Rikshospitalet].

**Del oppgave 3:** Her skal det undersøkes (*in vitro*) hvilken del av N-terminalen i scRpo41 proteinet som er viktig for enzymsaktiviteten, og om eventuelle interaksjoner mellom scRpo41 og scOxr1 proteinene er knyttet til proteinets N-terminal.

---

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Del oppgave 1

#### Forarbeid som var utført av andre ansatte ved rikshospitalet:

Vektoren pET28b<sup>+</sup> ble benyttet for å klonе de 3 forskjellige trunkerte *S. cerevisiae* OXR1 genene. De trunkerte OXR1 genene er OXR1-D6, OXR1-D7 og OXR1-D8. Disse genene koder for de respektive trunkerte proteinene (figur 1.4). Vektoren med DNA-insertet ble transformert inn i *E. coli* ER2566 celler. Cellene ble platet ut på agarskåler. De positive koloniene ble plukket ut, og plasmidet med DNA-insert ble isolert og transformert inn i BL21 CodonPlus celler (Agilent technologies). Til slutt ble en overnattskultur tilberedt, og denne ble brukt til å lage glyserolstocker (20 % glyserol).

Det ble utlevert tre forskjellige glyserolstocker; én for hvert av de trunkerte genkonstruktene. Disse glyserolstockene ble brukt for å utrykke og rense de respektive proteinene.

#### 2.1.1 Tilberedning av egne glycerolstocker av OXR1-D6, -D7 og -D8

##### 2.1.1.1 Dag 1: Tilberedning av overnattskultur (ONK)

Det blir tilberedt tre forskjellige ONK for hver av de ulike OXR1 konstruktene ved å blande komponentene som beskrevet i tabell 1.1, i en 250 ml erlenmeyerkolbe.

**Tabell 1.1: Tilberedning av overnattskultur (ONK) for OXR1-D6, -D7 og -D8**

Komponent	Mengde
Autoklavert LB medium	100 ml
Kanamycin 100 mg/ml	100 µl
Utlevert glyserolstock (1 glyserolstock for hvert konstrukt)	Skrapte litt

---

Alle tre blandingene merkes med eget navn og settes i inkubator (GFL3031) ved 37 °C og røring ved 180 rpm til neste dag, for å lage egen glycerolstock (tabell 1.2) for hvert av de tre konstruktene.

### **2.1.1.2 Dag 2: Tilberedning av egen glycerolstock**

Komponentene i tabell 1.2 blandes i 1,8 ml Nuncrør, for hvert konstrukt.

**Tabell 1.2: Tilberedning av egen glycerolstock fra ONK i tabell 1.1**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
ONK fra dag 1 (tabell 1.1)	0,5 ml
Glyserol 60 % (autoklavert)	1 ml

De 3 glycerolstockene merkes med:

- *scOXR1-D6*, pET 28b+, ER2566, dato
- *scOXR1-D7*, pET 28b+, ER2566, dato
- *scOXR1-D8*, pET 28b+, ER2566, dato

og lagres i fryser ved minus 40 °C for eget bruk.

### **2.1.2 Proteinekspresjon**

Glycerolstocker fra hvert av de respektive konstruktene (punkt 2.1.1.2) ble brukt for å utrykke de respektive proteinene.

pET- systemet inneholder en T7 promotor. Når vertscellene induseres med IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactoside) (bilag A, tabell A.1), vil vertscellenes T7-RNA-polymerasen starte transkripsjon av rekombinert insertet. Dette vil i sin tur føre til at ønsket protein overuttrykkes.

---

Faktorer som påvirker vertscellenes voksehastighet og dermed ekspresjon av ønsket protein kan nevnes:

- Antall bakterier som blir inokulert i vekstkulturen.
- Induksjonstidspunktet, dvs hvor lenge vertscellene fikk tid til å vokse før cellene ble induisert med IPTG.
- Celletettheten hvor cellene vokser etter induksjonen med IPTG.
- Temperaturen i mediumet hvor bakteriene vokser.
- Riktig konsentrasjon av IPTG.

Det er viktig å være ekstra nøye med disse faktorene mens man jobber med cellekulturen. Uoverensstemmelser i disse faktorene kan ha negative konsekvenser for proteinsyntese i vertscellene, som eksempel kan nevnes overbelastning av proteinsynteseapparatet i vertscellene [39].

Som en rutine på Rikshospitalet induseres BL21 Codon Plus cellene med 0,5 M IPTG når celletettheten har nådd 0,5- 0,6 OD. Cellene induseres ved 37 °C, og temperaturen senkes til 18 °C umiddelbart etter induksjonen.

Utførelse:

#### **2.1.2.1 Dag 1:Tilberedning av ONK:**

Det blir tilberedt 1x 100 ml ONK for hvert konstrukt.

- 100 ml ONK tilberedes på slutten av dagen, som beskrevet i tabell 1.3.

**Tabell 1.3: Tilberedning av Overnattskultur (ONK)**

Komponent	Oppmålt mengder
Autoklavert LB medium	100 ml
Kanamycin 100 mg/ml	100 µl
Glycerolstock for det respektive genet	Skrapet litt

- Blandingen inkuberes i inkubatorskap (GFL 3031) over natten (12-16 timer), ved 37 °C og 180 rpm.

I løpet av natten vil *E. coli* bakteriecellene vokse til en bestemt tetthet. Det er viktig at ONK som brukes for å tilberede vekstkulturen ikke har gått over 16 timer, for da har cellene begynt å lysere.

Disse ONK-ene brukes dag to for å tilberede vekstkultur (GC) (punkt 2.1.2.2).

#### **2.1.2.2 Dag 2: Tilberedning av vekstkultur (GC):**

Det tilberedes 6 X 1L vekstkultur for hvert enkelt gen konstrukt

- Til hver liter ferdig autoklavert og romtemperert LB medium (tabell 1.4), tilsettes Kanamycin 100 mg/ml og ONK som beskrevet i tabell 1.5.
- Blandingen (tabell 1.5) inkuberes i inkubator (Inn Ova 4230) ved 37 °C og roteres ved 180 rpm.
- Med jevne mellomrom tas en prøve av kulturen for å bestemme celledettheten (optisk tetthet/OD).

1 ml tas i en kyvette (polysterene, Sarstad). Celledettheten måles med spektrofotometer (Eppendorf) ved optisk tetthet ( $OD_{600}$ ).



- Proteinproduksjonen induseres ved å tilsette 1 ml 0,5 M IPTG til hver liter vekstkultur (GC) når OD måles til ca over 0,5.
- Umiddelbart etter induksjonen senkes temperaturen ned til 18 °C og inkuberes over natten.

**Tabell 1.4: Tilberedning av autoklavert LB- medium.**

Komponent	Mengde
LB pulver	25 g
D-Sorbitol	91 g
Betain Hydrocholrid	0,348 g
Destillert vann	ad 1 L

\* Dette lages i 2 liters erlenmeyerkolbe og autoklaveres

**Tabell 1.5: Tilberedning Vekstkultur (Growth culture) for å produsere cellepelleter**

Komponent	Mengde
Autoklavert LB-medium (tabell 1.4)	1 L
Kanamycin 100 mg/ml	1000 µl
ONK (tabell 1.3)	10 ml

### **2.1.2.3 Dag 3: Høsting av celler**

- Vekstkulturen fra dag 2 sentrifugeres (Beckman Coulter™) ved 18 °C, 6000 rpm i 30 minutter.
- Supernatanten helles ut, cellepelleter fra de 6 X 1liter kulturene skrapes av og samles inn i 50 ml reagensrør (Sarstad) med lokk, merkes med riktig konstrukt og lagres i fryser ved minus 20 °C.

### 2.1.3 Rensing av proteiner

Vektoren pET28b<sup>+</sup> muliggjør fusjon av en 6 X Histidin-tag ((His)<sub>6</sub>- tag) N- terminalt til proteinet. (His)<sub>6</sub>- tagene gjør at amplifisering av fusjonsproteinene kan enkelt isoleres, renses og detekteres.

I denne oppgaven renses proteiner først med Ni-NTA agarose kolonne (affinitetskromatografi), deretter med resource Q kolonne (ionbytter kromatografi) og til slutt med superdex 75 kolonne (gelfiltreringskromatografi).

#### 2.1.3.1 Rensing av proteiner med Ni-NTA agarose affinitetskromatografi

Dette er en separasjonsmetode for separasjon av fusjonsproteiner (ønsket protein+ (His)<sub>6</sub> tag). Separasjons metoden er basert på reversible interaksjoner av type elektrostatiske, van der Waalske, hydrofobe eller hydrogenbindinger, mellom nikkeldivalente ionene som er kovalent bundet til NTA og proteinets His-tag.

Metoden går ut på først å fjerne de ubundne proteinene (*E. coli* proteiner) fra Ni-NTA agarosen ved å vaske kolonnen med sonikeringsbuffer (tabell 1.6) som inneholder 10 mM imidazol. Deretter elueres fusjonsproteinene med elueringsbuffer (tabell 1.8) som har høy konsentrasjon av imidazol, 300 mM.

Imidazol som finnes i bufferløsningene, vil konkurrere med proteinets His-tag for bindingen med Ni divalent ionene i NTA agarose kolonnen [39-41].

Utførelse:

##### 2.1.3.1.1 *Resuspendering av pelletene fra punkt 2.1.2.3*

- Resuspendering av pelletene gjøres på is. Pelletene fra de 6 X 1 L kulturene (2.1.2.3) resuspenderes (løses opp) i kald sonikeringsbuffer (tabell 1.6).
- β-ME tilsettes til sonikeringsbufferet rett før resuspenderingen (pga β-ME degraderes over tid).

Til hver pellet fra 1 liter kultur brukes ca 15 ml sonikeringsbuffer. Det ble brukt 80 ml sonikeringsbuffer tilsatt 56  $\mu$ l  $\beta$ -ME.

- Pelletene røres med spalte og vorteksmikser (MS2 Miniskaker) til en jevn løsning.

**Tabell 1.6: Sonikeringsbuffer med 10 mM imidazol**

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
5 M NaCl	300 mM NaCl	30 ml
1 M Tris pH 8	20 mM Tris pH 8	10 ml
14,3 mM $\beta$ -Merkaptoetanol	10 mM $\beta$ -Merkaptoetanol	350 $\mu$ l
1M imidazol løsning	10 mM imidazol	5 ml
MQ vann		ad 500 ml

#### 2.1.3.1.2 Sonikering av resuspenderte pelleter (cellesuspansjonen)

Til sonikering brukes sonikeringsapparatet (Sonics & Materials Inc, Vibra cell, Tamro Lab), amplituden er justert på 60 og sonikeringen utføres på is for å unngå varmeutvikling i cellesuspansjonen, som kan forårsake degradering av proteiner på grunn av proteaseenzymer som befinner seg i cellesuspansjonen etter at cellene er lysert [39].

- Resuspenderte pelleter sonikeres i 3 x 30 sekunder, med 1 minutters pause mellom hver operasjon for å avkjøle cellesuspansjonen på is.
- Cellesuspansjonen fordeles i 4 x 20 ml sentrifugrør og sentrifugeres (Sorva II, RC5c Plus) ved 13000 rpm i 30 minutter ved 4 °C.
- Cellepelletene kastes mens supernatanten brukes videre. Alle proteiner som er løselig i cytoplasma, befinner seg i supernatanten, inkludert vårt His-tag protein.

- Supernatanten blandes med ferdig ekvilibert kolonnemateriale (tabell 1.7), plasseres på vippebrett i 30- 60 minutter ved 4 °C. I dette steget vil vårt trunkerte protein som har en His-tag knyttet til seg, binde seg Ni materialet.
- Blandingen overføres til en kolonne med et filter nederst. Dette filteret vil hindre at Ni materialet med fusjonsproteinene og andre ubundet proteiner å komme ut fra kolonnen. Oppsamlet løsning kalles for flowthrough (F.T), og hele volumet samles opp i én fraksjon.
- For å vaske bort andre proteiner som er ubundet til Ni-kolonnen, tilsettes 100 ml sonikeringsbuffer (tabell 1.6), (tilsatt  $\beta$ -ME 70  $\mu$ l). Tilsettingen av sonikeringsbufferen gjøres med forsiktighet fra kolonne kantene, for å unngå at Ni materialet pakkes ut. Oppsamlet løsning kalles for vask, og alt samles i én fraksjon.
- For å eluere vårt fusjonsprotein tilsettes 50 ml elueringsbuffer (tabell 1.8) (tilsatt  $\beta$ -ME 35  $\mu$ l). Eluatet samles opp i ca 20 eppendorfrør ad 1 ml eluat i hver. Proteinene våre vil mest sannsynlig bli eluert ut i de første 3-15 fraksjonene.

**Tabell 1.7: Ekvilibrering av kolonnematerialet (klargjøring av Ni-NTA agarose)**

Komponent	Mengde
Ni-NTA agarose i etanol, oppbevart i kjøleskap, ristes til jevn suspensjon	10 ml

\*Prosedyre: 10 ml Ni material i etanol tas i 50 ml plastrør med lokk, sentrifugeres i 3 minutter på 300 rpm, etanolen suges opp med en pipette og helles ut. Sonikeringsbuffer (tabell 1.6) tilsettes til ca 30 ml, sentrifugeres i 3 minutter og 300 rpm, sonikeringsbuffer suges opp og helles ut.

**Tabell 1.8: Elueringsbuffer med 300 mM imidazol**

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
5 M NaCl	300 mM NaCl	30 ml
1 M Tris pH 8	20 mM Tris pH 8	10 ml
14,3 M $\beta$ -Merkaptoetanol	10 mM $\beta$ -Merkaptoetanol	350 $\mu$ l
1 M imidazol løsning	300 mM imidazol	150 ml
MQ vann		ad 500 ml

### **2.1.3.2 SDS-PAGE (Natrium Dodekylsulfat Polyakrylamid Gelelektroforese)**

SDS-PAGE benyttes for å separere, påvise og undersøke renheten av proteiner.

SDS er et stoff med en hydrofil og hydrofob del. Den hydrofobe delen binder seg til proteinets hydrofobe grupper, slik hydrofobe bindinger fører til at proteinet denatureres. Den hydrofile delen av SDS som har negativ ladning, binder seg til proteinets hydrofile del. Dette fører til at proteinet får en jevn negativ ladning rundt hele molekylet. Når denne blandingen appliseres på SDS-PAGE gelen og et elektrisk felt kobles til, vil de negativ ladede proteinene vandre mot (+) polen.

PAGE (Poly-Akrylamid Gel Eleltroforese), brukes for å bestemme proteinets størrelse. PAGE består av et tett nettverk av vannløselig polymerer. Tettheten i nettverket kan justeres ved å variere konsentrasjonen av akrylamidene (polymerene).

Separasjons metode er basert på at de små proteinene vil vandre raskest, dvs lengst i gelen, mens de store molekylene vil vandre sakte og dermed (kortest) i gelen. Vandringsforskjellen mellom de ulike molekylene i gelen er avhengig av nettverkets tetthet, og påfølgende motstand i gelen som molekylene møter mens de vandrer i gelen [39, 42].

I tillegg brukes SeaBlue® Plus 2 proteinstandard fra Invitrogen som er en blanding av kjente proteiner/polypeptider som molekylvektsmarkør.

Utførelse:

Det benyttes ferdiglagde geler fra C:B:S. Scientific: Clear PAGE™ SDS gel, 12 % TEO-CI SDS med 12 eller 17 brønner

1. 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer 4 X (Invitrogen) + 5 µl proteineluat fra de aktuelle eluatfraksjonene (punkt 2.1.3.1.2), blandes individuelt og inkuberes ved 70 °C (Theromixer Comfort) i 10 minutter.
2. Gel med plater tas ut av plastforpakningen, gelen monteres i oppsats Novex Mini-Cell, fra Invitrogen
3. Karet fylles opp med 1 X NuPAGE® SDS MOPS Running buffer (kjørebuffer, bilag A, tabell A.2).
4. Brønnene vaskes 2 X med MOPS kjørebuffer med en sprøyte (montert kanyle på).
5. 10 µl av hver prøve appliseres i hver sin brønn på polyakrylamid gelen (Clear PAGE™ 12 % TEO-CI SDS).
6. 10 µl molekylvektsmarkør (SeaBlue®) appliseres i første brønn på en 12 % polyakrylamidgel.
7. For kontroll appliseres også en prøve av Flowthrough og vasken fra Ni-kolonnen i punkt (2.1.3.1.2), som er tilberedt på forhånd ved å blande 5 µl F.T + 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer 4 X, og 5 µl vask + 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer 4 X i hvert sitt eppendorfrør.
8. Elektroforese kjøres ved 200 V i 35 minutter med 1 X MOPS kjørebuffer.

9. Etter avsluttet elektroforese tas gelen ut fra plastbeholderen og overføres til et kar med fargeløsning (bilag A, tabell A.3). Karet med gelen i legges på ristebrett (Multi shaker) i ca 30 minutter.
10. Gelen avfarges med avfargingsløsning (Bilag A, tabell A.4) i ca 30 minutter eller lenger ved behov.

### **2.1.3.3 (His<sub>6</sub>)-tag kutting av proteinet med proteaseenzymet trombin**

Etter rensing av proteinet med Ni-NTA agarose, ønskes det å bli kvitt His-taggen på den N-terminale enden til proteinet for å få ”native” protein. I vektoren finnes det et såkalt ”*protein cleavage site*”, som er en sekvens mellom N-terminalt His-taggen og MCS (Multi Cloning Site) og som koder for proteasespaltingenzymer som trombin. Det er denne sekvensen som blir gjenkjent av trombin, og som fjerner His-tagene fra proteinets N-terminale enden [39, 42].

Gelelektroforesen fra punkt (2.1.3.2), viser hvilke eluatfraksjoner som inneholder ønsket protein.

- De aktuelle fraksjonene (ca 8- 15 ml) samles opp og slås sammen i et 50 ml plastrør med lokk.
- En prøve på 20 µl tas for senere applikasjon på SDS-PAGE gelen som en kontroll på ukuttet His-tag protein.
- Til resten av proteinet i plastrøret tilsettes 20 µl trombin (10 U/µl).
- Blandingen settes i kjøleskap for His-tag-kutting over natt.
- Dagen etter tas en 20µl prøve av det kuttete proteinet.
- For å kontrollere at kutting av His-tagene har vært vellykket, kjøres en SDS-PAGE på den kuttete og ukuttete prøven.
  - 5 µl av kuttet og 5 µl av ukuttet proteinet tas i hvert sitt eppendorfrør.

- 5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer 4 X, tilsettes til hver prøve og inkuberes (Theromixer Comfort) ved 70 °C i 10 minutter.
- Forskjellige mengder av prøvene (4 µl, 2 µl og 1 µl) appliseres på SDS-PAGE gel sammen med 10 µl molekylvektsmarkør, hver i sin brønn.
- SDS-PAGE gelelektroforese kjøres som beskrevet i punkt 2.1.3.2 (punkt 8-10).

#### **2.1.3.4 Proteindialyse**

Dialyse er en metode som benyttes for å fjerne høye konsentrasjoner av små molekyler (salt ioner og imidazol) fra proteinfraksjoner, ved å skifte buffer. Proteinfraksjonene overføres i en semi-permiabelmembran som tillater små molekyler å diffundere gjennom membranen fra løsninger med høy konsentrasjon (elueringsbuffer, tabell 1.8) til løsninger med lav konsentrasjon (lavsaltbuffer, tabell 1.9). Slik semi-permiabelmembraner kan skaffes med ulike porstørrelser. Det er porstørrelsen i membran som avgjør hvilke molekyler som slippes gjennom. Store molekyler som proteiner vil ikke kunne passere membranens porer, mens små molekyler vil passere membranen, og dermed vil proteinløsningen etter hvert få høyere konsentrasjon av proteiner, og mindre konsentrasjon av ioner og imidazol.

Dialyse effektiviteten er avhengig av dialysebufferens sammensetting og volum, antall bufferendringer, dialyse tid og porstørrelsen i semi-permiabelmembranen.

Som ulemper med dialyse kan nevnes; blant annet er det en tidkrevende teknikk, som krever store mengder bufferløsning. Antall bufferendringer er en viktig faktor for å få effektiv dialyse. I tillegg finnes det alltid en risiko for å miste proteinet ved håndtering, eller nedbrytning med proteolytisk enzymer som kan føre til utfelling av proteinet [39].



**Tabell 1.9: Lavsaltbuffer**

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
5 M NaCl	50 mM NaCl	20 ml
1 M Tris pH 7,5	10 mM Tris pH 7,5	20ml
14,3 mM $\beta$ -merkaptoetanol	10 mM $\beta$ - merkaptoetanol	1,4 ml
MQ vann		ad 2000 ml

Utførelse:

- Membranen (Spectra/Por®, MW 12-14 000), fuktes i dialysebuffer.
- En klemme settes på den ene enden av membranen, oppsamlet protein fra punkt 2.1.3.3 overføres i membranen og enden tettes med annen klemme.

Dialyse utføres to ganger med 1 liter dialysebuffer i 1 time, og røring ved 4 °C.

### **2.1.3.5 Rensing av proteiner ved bruk av Resource Q 6 ml kolonne i FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)**

Resource Q er en ionebyttekolonne. Stasjonærfasen består av polysterene/-divinybenzen bundet til liganden kvartær ammonium,  $\text{NH}_4^+$ , som er en sterk anionbytter. Denne teknikken kalles for ionebytterkromatografi. Separasjons metode er basert på at interaksjoner mellom den positivt ladede liganden ( $\text{NH}_4^+$ ), på stasjonærfasen (matrisen), og de negativladede sidekjedene i proteinet som befinner seg i bufferløsningen og som passerer gjennom kolonnen, vil hemme bevegelsen av proteinet. Slike interaksjoner er avhengig av ionestyrken mellom de positive og negative ladningene, og av pH i bufferløsningen som proteinet befinner seg i. Valget av pH i bufferløsningen gjøres basert på proteinets pI, for å sikre at proteinet er tilstrekkelig negativt ladet i bufferen som kjøres gjennom kolonnen [41].

Utførelse:

Proteinløsningen fra punkt 2.1.3.4 (ca 8- 15 ml), blir rensset videre med resource Q kolonne.

Til dette brukes to typer bufferløsninger.

- Kolonnen ekvilibrerer først med høysaltbuffer (tabell 1.10), deretter med lavsaltbuffer (tabell 1.9).
- Proteinløsningen som er på ca 8- 15 ml appliseres på kolonnen.
- Proteinet elueres fra kolonnen ved gradvis økning av salt konsentrasjonen som går gjennom kolonnen (gradient eluering). Til det brukes først kun lavsaltbuffer, deretter blandes lavsalt og høysalt for å bygge opp gradient, og til slutt kun høysalt. Eluatet samles opp inn i eppendorfrør i 1 ml fraksjoner.
- De aktuelle eppendorfrørene velges bort og analyseres med SDS-PAGE (2.1.3.2) for å se på renheten av det eluerte proteinet. Hvis det fortsatt er behov for videre rensing, utføres det ved å velge en annen type kolonne (punkt 2.1.3.7).

**Tabell 1.10: Høysaltbuffer**

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
5 M NaCl	1 M NaCl	100 ml
1 M Tris pH 7,5	10 mM Tris pH 8	5 ml
14,3 mM $\beta$ -Merkaptoetanol	10 mM $\beta$ -Merkaptoetanol	350 $\mu$ l
MQ vann		ad 500 ml

### **2.1.3.6 Oppkonsentrering av proteinet med Amicon® Ultra Centrifugal Filters**

Til oppkonsentrering av proteinet brukes Amicon® Ultra Centrifugal Filters som har en bestemt cut-off verdi. Det består av et plastrør med lokk og en semipermeabel membran med en bestemt pore- størrelse (i vårt tilfelle 10 kDa) plassert i plast røret.

---

Oppkonsentrering av proteiner (ultrafiltrering, UF) er en teknikk hvor overskudd av bufferløsninger som proteinet befinner seg i, presses ut. Teknikken går ut på at proteinløsningen som befinner seg på indre siden av membranen presses ut ved å utsette løsningen i membranen til hydrostatisktrykk krefter ved å bruke sentrifugemaskin (Biofuge Primo R). Ved å variere på sentrifugeringshastigheten (omdreininger pr. minutt, rpm) og sentrifugeringstiden kan man oppnå ønsket proteinkonsentrasjon. Proteiner som har høye molekylær vekt vil ikke kunne passere membranen, og vil derfor befinne seg i innerste delen av semi-permiabelmembranen, mens bufferløsning som inneholder små oppløste molekyler presses ut fra membranen og vil befinne seg på utsiden av filteret, i plast røret.

Oppkonsentrering er nødvendig for å oppnå en viss konsentrasjon av proteinet som er akseptabelt for videre arbeid.

Utførelse:

- Proteinløsningen (ca 10- 15ml) fra punkt 2.1.3.5 overføres i Amicon® Ultra Centrifugal Filter.
- Sentrifugeres ved 4 °C, 2000- 4000 rpm i 10 minutter til ønsket proteinkonsentrasjon er oppnådd. Man kan også oppkonsentrere proteinløsningen til et bestemt volum (ca. 500– 1000 µl) dersom hensikten kun er å redusere volumet for videre arbeid.

#### **2.1.3.7 Rensing av proteiner ved bruk av Superdex 75 2 ml kolonne i FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)**

Superdex 75 er en gelfiltreringskolonne. Stasjonærfasen består av krysslinket inert, porøs agarose som er bundet til Dextran med kovalente bindinger. Dette er en metode som brukes for å rense proteinløsninger, separere molekyler etter størrelse, bestemme størrelsen av molekylene og til avsalting av proteinløsninger og metoden kalles for gelfiltrering kromatografi.

Separasjonsegenskapene til kolonnen er bestemt av Dextraninnholdet. Separasjonens metode er basert på porestørrelsen til stasjonærfasen og molekylstørrelsen til proteinet (ene) som befinner seg mobilfasen. Små molekyler vil kunne trenge gjennom porene til stasjonærfasen mens de passerer kolonnen nedover, og dermed får de lengre retensjonstid enn større molekyler som ikke klarer å trenge gjennom porene og dermed elueres tidligere [41].

I vårt tilfelle hensynet med gelfiltrering er å rense og avsalte proteinløsningen så godt det går, Avsalting av proteinløsningen gjør at vi kan fryse ned proteinet og samtidig unngå at den feller ut.

Utførelse:

Den oppkonsentrerte proteinløsningen fra punkt 2.1.3.6 er mellom ca 500- 1000 µl, og superdex 75- kolonne brukes til å avsalte proteinløsningen. Siden dette er en teknikk hvor proteinet elueres etter molekylstørrelse, benyttes kun elueringsbuffer.

- Kolonnen ekvilibrerer med lavsaltbuffer (tabell 1.9).
- Oppkonsentrert proteinløsning fra punkt 2.1.3.6 som er på ca 500- 1000 µl appliseres på kolonnen.
- Protein elueres fra kolonnen etter en viss tid, avhengig av retensjonen i porene til stasjonærfasen. Eluatet samles opp i eppendorfrør med 1 ml fraksjoner.
- Utvalgte fraksjoner analyseres med SDS-PAGE (punkt 2.1.3.2), for å se på renheten av proteinet. Etter rensing/avsaltning på superdex pleier proteinet å være tilfredsstillende rent.
- Proteinkonsentrasjonen måles med spektrofotometer (BioPhotometer, Eppendorf), fylles i rent eppendorfrør og lagres i fryser ved – 20 °C.

---

### **2.1.3.8 Måling av proteinkonsentrasjon med spektrofotometer**

Bio-Rad® Bradford assay reagens (Bio-Rad laboratories) inneholder fargestoffet Cossmassesie Brilliant, dette stoffet har rød farge og en absorbans på 470 nm. Når proteinløsninger tilsettes til bradfordreagens, fargestoffet (Cossmassesie Brilliant) vil binde seg til proteinene i løsningen og danner et kompleks som har blåfarge. Fargeendringen i Cossmassesie Brilliant vil føre til endring i absorbansen fra 470 til 595 nm. Det er denne endringen i absorbansen som måles med spektrofotometer og er et mål for proteinkonsentrasjonen i prøven.

Et spektrofotometer må alltid nullstilles med en blindprøve som inneholder den samme løsningen som prøven, bortsett fra den komponenten som skal bestemmes.

Utførelse:

- Bio-Rad® Bradford assay reagens (Bio-Rad laboratories) blandes med MQ vann i 1:4 forhold.
- 1 ml ferdigblandet Bradfordreagens overføres til engangskyvette (polystyrene, Sarstad) og 1 µl proteinløsning tilsettes. En kyvette med 1 ml ferdigblandet Bradfordreagens brukes til blankprøve for å nullstille spektrofotometeret.
- Kyvetten med oppblandet Bradfordreagens og protein dekkes med en parafilm og kyvetten vendes opp og ned for å blande løsningen.
- Apparatet nullstilles med blindprøven, deretter måles proteinkonsentrasjonen i den andre kyvetten ved 595 nm.
- Protein konsentrasjonen noteres både på eppendorfrøret som proteinet lagres i og i loggboken.
- Protein lagres ved – 20 °C i fryser til videre arbeid.

## 2.2 Deloppgave 2

I denne deloppgaven skal det jobbes med molekylær kloning. De utvalgte DNA fragmentene, Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6 genene (figur 1.5, side 28), skal først amplifiseres ved hjelp av PCR. Deretter skal DNA-fragmentene settes inn i en passende vektor (pET28b<sup>+</sup>, bilag D). Den rekombinerte vektoren skal transformeres inn i *E. coli* celler. pET28b<sup>+</sup> inneholder en seleksjonsmarkør for kanamycin. Derfor er celler som inneholder vektoren, resistente mot kanamycin og kan selekteres. Cellene dyrkes og induseres for å overuttrykke det innsatte genet. Resultatet er masseproduksjon av genproduktet som til slutt renses for videre arbeid [42].

### 2.2.1 Kloning av DNA fragmentene:

Prosedyrene som omtales her, ble utført for hvert enkelt DNA-fragment. De forskjellige DNA-fragmentene består av:

- **RPO41-D1:** består av 3120 bp, 1039 aa, og har Mw på 118025,16 Da
- **RPO41-D2:** består av 2256 bp, 751 aa, og har Mw på 84987,15 Da
- **RPO41-D3:** består av 1536 bp, 511 aa, og har Mw på 58081,29 Da
- **RPO41-D5:** består av 2634 bp, 878 aa, og har Mw på 99855,6 Da
- **RPO41-D6:** består av 2898 bp, 966 aa, og har Mw på 109815,8 Da

#### 2.2.1.1 Frambringe det aktuelle gen (DNA):

Det ble utlevert en pPre Ex HTb vektor med RPO41full lengde insert (pPre Ex HTb- RPO41 5ng/μl).

##### 2.2.1.1.1 PCR av hvert enkelt insert (2.2.1)

PCR (Polymerase Chain Reaction) er en metode for *in vitro* amplifisering av DNA molekyler.

---

Til PCR må det lages en reaksjonsblanding som består av DNA-templat som inneholder fullengdesekvensen til RPO41 som vi ønsker å amplifisere (pPre Ex HTb- RPO41 5ng/μl), to primere (Forward og Reverse) spesielt designet for de trunkerte genene, en DNA polymerase som forlenger primerne, dNTP (N= A, T, G, C), og bufferløsning [42].

Design av primerene ble utført av veileder. Prinsippet for å designe primere til PCR er at man må kjenne DNA-sekvensen på hver side (flankerende DNA) av det DNA området som skal amplifiseres (mål DNA). Én av de to primere brukes for hybridisere til flankerende DNA på den éne siden, og den andre primeren skal hybridisere til flankerende DNA på den andre siden av mål-DNA.

En primer er en kort DNA-tråd med fri 3'-OH-ende. Størrelsen på en primer er normalt 20-30 baser. Primeren fester seg til DNA templatet når hybridiseringstrinnets temperatur har nådd en temperatur som er under smeltepunktet ( $t_m$ ) for primerne. Smeltepunktet for en primer øker med lengden og mengden G/C par. Derfor er det viktig å tilpasse temperaturen i hybridiseringstrinnet på hvert enkelt forsøk [42].

Utførelse:

- Det lages 5 reaksjonsblandinger til PCR (tabell 2.1) i små PCR plastrør; ett for hvert av RPO41 konstruktene.

Standard PCR gjennomføres i 3 trinn:

1. Denaturering ved 95 °C
2. Hybridisering ved 50 °C
3. Polymerisering ved 70 °C

PCR apparatet (Eppendorf) har en termosyklus og en varmeblokk av metall, hvor temperaturen og tiden på hvert trinn, samt antall sykluser, kan programmeres.

Reaksjonsblandingene settes opp i henhold til tabell 2.1 med primerne fra de 5 primersettene

fra tabell 2.2. Prøvene settes i varmeblokken, og termosyklusen programmeres med ønsket temperatur og lengde på hvert trinn.

Det er utviklet en egen prosedyre for dette ved Rikshospitalet som ble benyttet:

Trinn 1: Denaturering blir utført ved 94 °C i 45 sekunder, da vil reaksjonsblandingen i PCR plastrøret varmes opp raskt. Dette resulterer i at DNA tråden smeltes og blir enkelttrådet.

Trinn 2: Hybridisering blir utført ved 66 °C i 1 minutt. Reaksjonsblandingen avkjøles slik at primer DNA, som er enkelttrådet, vil binde seg til den komplementære templat-DNA-sekvensen.

Trinn 3: Polymerisering blir utført ved 72 °C i 6 minutter. Forward og revers primere som er bundet til hver sin templattråd, brukes som utgangspunktet for DNA syntesen. DNA polymerase vil syntetisere DNA fra den frie 3'-OH- enden på begge primerne, med dNTP. Det blir benyttet PFU turbo DNA polymerasen som er en varmestabil polymerase.

1 PCR syklus består av alle de 3 trinnene nevnt ovenfor. Det ble gjennomført 30 PCR sykluser.

Antall DNA tråder vil dobles for hver PCR syklus, og etter 30 sykluser skal man ha teoretisk fått ca  $2 \times 10^9$  DNA tråder. Hele PCR reaksjonen tok ca 4 timer. Den ble satt i gang mot slutten av dagen, og PCR apparatet ble programmert for å senke temperaturen til 4 °C når alle 30 syklusene var avsluttet. Produktet ble brukt dagen etter.



**Tabell 2.1: Reaksjonsblanding til PCR**

Komponent	Mengde
MQ vann	ad 100 $\mu$ l (tilsatt 49 $\mu$ l)
10 X PFU buffer	10 $\mu$ l
dNTP 2,5 med mer	6 $\mu$ l
Forward primer(F-primer), tabell 2.2	2 $\mu$ l
Reverse primer (R-primer), tabell 2.2	2 $\mu$ l
DNA templat (pPre Ex HTb- Rpo41 5 ng/ $\mu$ l)	30 $\mu$ l (total konsentrasjon = 0,15 $\mu$ g/ $\mu$ l)
PFU turbo DNA polymerase 1000U 2,5 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l

**Tabell 2.2: Primere brukt for hvert enkelt insert i PCR reaksjonsblandingen**

RPO41 konstrukt	Primer
RPO41- D1	P8842F/p8845R (bilag F)
RPO41- D2	P8843F/p8845R (bilag F)
RPO41- D3	P8844F/p8845R (bilag F)
RPO41- D5	PHBfRpo385/PHBrRpo1263 (bilag F)
RPO41- D6	PHBfRpo385/PHBrRpo1351 (bilag F)

### 2.2.1.1.2 Agarose gelelektroforese

Dagen etter ble PCR-produktene analysert på agarosegel 1 % (tabell 2.3) ved elektroforese. Til det blir det brukt størrelsesmarkør (DNA-standard 1 kbp ladder, BioLabs, Bilag C, figur C.1). Etter elektroforesen kan man se et klart bånd (DNA produkt) for hvert DNA-insert med en gitt størrelse ved å bruke spesial designet kamera med UV-lys.

Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. Agarosegeler brukes for å separere DNA-fragmenter. Separasjonsprinsippet er basert på konsentrasjonen av agarose i gelen. Med lav konsentrasjon av agarose kan man separere store DNA fragmenter, og omvendt. Det ble brukt 1 % agarosegel, som muliggjør separasjon av DNA fragmenter mellom 500 og 6000 bp [42].

Agarose gelelektroforese metoden er basert på at gelen danner et nettverk av polymerer. Nettverket hindrer at DNA fragmentene beveger seg fritt. Store DNA-fragmenter vil bevege seg langsommere, fordi de blir bremsset sterkere av nettverket i gelen enn de små DNA-fragmentene.

DNA molekylene med sine fosfatgruppene har en jevn negativ elektrisk ladning på sin overflate, og de vil da vandre mot den positive polen når et elektrisk felt kobles til.

SYBR Safe tilsettes prøven. SYBR®Safe er et stoff som binder seg til dsDNA, og blir til fluorescerende stoff etter at den har bundet til ”dobbelstranded” DNA (dsDNA). Deretter kan man synliggjøre DNA som er bundet til SYBR®Safe ved å utsette DNA fragmentene til UV-lys [42].

Utførelse:

- Agarosegelen tilberedes ved å blande komponentene nevnt i tabell 2.3
  1. Komponent 1 og 2 tilsettes, blandes og varmes i mikrobølgeovn til pulveret har løst seg.
  2. Blandingen avkjøles til ca 40 °C, SYBR®Safe (Invitrogen) tilsettes, og blandingen helles i spesielle kar (horizontal kar). En kam legges på toppen av karet i gelen for å danne brønner til applisering av prøvene.
  3. Etter at gelen er stivnet, tas kammen forsiktig ut, karet med gelen i overføres til kjøreoppsats for agarosegeler (Mini Horizontal Submarine Unit) og fylles med 1 X TAE løsning (bilag A, tabell A.6) til toppen av gelen er dekket med løsningen.

4. Prøvene klargjøres ved å blande 10 µl av hvert PCR produkt med 2 µl 6 X Loading Dye solution (BioLabs Inc.), i hvert sitt eppendorfrør.
5. 12 µl prøve appliseres i hver brønn. DNAstørrelsesmarkør (1 kb DNA ladder, Bilag C, figur C.1) appliseres i første brønn.
6. Elektroforese utføres ved 120V, 220mA i 40 minutter.
7. Gelen overføres til Kodak Gel Logic 200 Imaging System for å synliggjøre DNA-produktene. Et bilde tas som dokumentasjon.

**Tabell 2.3: Tilberedning av agarose gel 1 %**

Komponent	Mengde
Agarose gel (SeaKem)	1 g
1 X TAE buffer løsning (bilag A, tabell A.6)	ad 100 ml
SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)	4 µl

### **2.2.1.1.3 Isolering og rensing av PCR-produktene:**

PCR produktene fra (2.2.1.1.1) ble isolert med GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). GFX Kittet består av 4 forskjellige buffere, GFX Microspin kolonner og oppsamlingstuber.

Det ble brukt bare 3 forskjellige buffere av de 4 bufferene som følger med kittet:

1. "Capture" buffer type 3: Når denne bufferen tilsettes DNA prøven, vil proteiner som finnes i prøven bli denaturert. Dersom agarose er tilstede i prøven, vil den løses opp. I tillegg inneholder denne bufferen en pH indikator som indikerer om pH til "Capture" bufferen med DNA-prøven ligger i riktig område.

pH i blandingen er en viktig faktor for at DNA skal binde seg til silika-membranen i kolonne.

2. "Wash" buffer type 1: Denne buffer vasker bort andre forurensninger som er tilstede i prøven, mens DNA dobbeltråden sitter fast på kolonnen.
3. "Elution" buffer type 6: Denne buffer inneholder sterilt nukleasefritt vann og brukes for å eluere DNA fra Silica membranen. Eluatet samles opp i ren oppsamlingtube.

Utførelse:

Prosedyrene beskrevet nedenfor utføres for hvert enkelt RPO41 DNA konstrukt (RPO41-D1, -D2, -D3, -D5, -D6)

- 500 µl "Capture" buffer type 3 tilsettes til hele volumet (90 µl) PCR produkt (2.2.1.1.1) og blandes godt.
- GFX kolonnen settes i en oppsamlingstube og blandingen fra første punkt overføres til kolonnen.
- Kolonnen med blandingen i sentrifugeres (Biouge Fresco, Heraus) ved 13000 rpm i 1 minutt. Flowthrough (F.T.) kastes.
- 500 µl "wash" buffer type 1 tilsettes til kolonnen, etterfulgt av sentrifugering ved 13000 rpm i 1 minutt. Flowthrough kastes. Dette trinnet gjentas 2 ganger.
- Kolonnen overføres til et nytt sterilt eppendorfrør.
- 50 µl "elution" buffer type 6 tilsettes til kolonnen, etterfulgt av inkubering ved romtemperatur i 1 minutt og sentrifugering ved 13000 rpm i 1 minutt. 50 µl rensset DNA befinner seg nå i eppendorfrøret.
- For å kontrollere at rensingen av PCR-produktet var vellykket kjøres en agarosegel (1 %) elektroforese.

- 
- 1 % agarosegelen tilberedes som nevnt i punkt 2.2.1.1.2 fra 1-3.
  - Prøvene klargjøres ved å blande 5 µl av hvert PCR produkt med 1 µl 6 X Loading Dye solution (BioLabs), i hvert sitt eppendorfrør.
  - 6 µl prøve appliseres i hver sin brønn. DNA størrelsesmarkør (DNA-standard 1 kb ladder, bilag C, figur C.1) appliseres i første brønn.
  - Elektroforese utføres ved 120V, 220mA i 40 minutter.
  - Gelen overføres til Kodak Gel Logic 200 Imaging System for å synliggjøre DNA produktene. Et bilde tas som dokumentasjon.

#### **2.2.1.1.4 Restriksjonskutting av DNA produktene og vektoren**

Isolert DNA produkt (2.2.1.1.3) inneholder to restriksjonsseter; ett for BamHI og ett for NheI. Det samme gjør pET28b<sup>+</sup> vektoren i sitt polykloningssete. Restriksjonsenzymene BamHI og NheI brukes for kutte i både vektoren og DNA fragmentene. De restriksjonskuttete PCR-produktene og den restriksjonskuttete vektoren vil ha komplementære ”sticky ends”. Dermed kan de liggeres sammen (2.2.1.1.5) [42].

Utførelse:

Hvert PCR produkt (2.2.1.1.3) og vektoren pET28b<sup>+</sup> kuttes med 2 restriksjonszymer; BamHI og NheI.

Det tilberedes 5 restriksjonskuttingsløsninger, én løsning for hvert DNA konstrukt (tabell 2.4), og én restriksjonskuttingsløsning for pET28b<sup>+</sup> vektoren (tabell 2.5).

- Restriksjonskuttingløsningene ble laget i henhold til tabell 2.4 og 2.5, blandet og inkubert ved 37 °C i 2 timer.

- Etter avsluttet kuttreaksjon, den ferdig restriksjonskuttet PCR produkt renses med GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), hver for seg. Til det benyttes samme prosedyre som nevnt i (2.2.1.1.3).
- Ferdig restriksjonskuttet pET28b<sup>+</sup> vektor renses med GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

#### Utførelse:

- Hele volumet av ferdig restriksjonskuttet vektor (50 µl), (tabell 2.5) overføres til et rent eppendorfrør.
- 10 µl, 6 X loading dye solution (BioLabs) tilsettes eppendorfrøret med vektoren.
- Hele volumet appliseres på 0,8 % agarosegel (tabell 2.6) som var laget på forhånd. Agarosegelen ble laget med store brønner for at det skulle være mulig å applisere hele den restriksjonskuttete prøven med 6 X loading dye solution (totalt 60 µl) i en brønn.
- DNA størrelsesmarkør (1 kb DNA ladder) appliseres i første brønn.
- Elektroforese kjøres ved 120V, 220 mA og i 40 minutter i 1 X TAE buffer (bilag A, tabell A.6).
- Etter avsluttet elektroforese overføres gelen til fremkallingsmaskinen for PCR geler (Kodak Gel Logic 200 Imaging System), og et bilde tas som dokumentasjon.
- Gelen visualiseres med UV-lys (i kort periode), skjæres ut med en ren skalpell og overføres til et på forhånd oppveid eppendorfrør (vekten noteres). Eppendorfrøret med gelen i veies opp, og vekten noteres igjen.
- Til 10 mg gel tilsettes 10 µl capture buffer type 3 (det ble tilsatt 250 µl buffer til 250 mg gel)
- Blandingen inkuberes på varmeblokk ved 60 °C i 15 minutter til all gelen er løst opp.

- Hele blandingens volum overføres til en GFX kolonne, inkuberes ved romtemperatur i 1 minutt og sentrifugeres (Biofuge Fresco) ved 13000 rpm i 1 minutt. Flowthrough kastes.
- 500 µl wash buffer type 1 tilsettes til kolonnen, etterfulgt av sentrifugering ved 13000 rpm i 1 minutt. Flowthrough kastes. Dette trinnet gjentas 2 ganger.
- GFX kolonnen overføres til et eppendorfrør og 30 µl elution buffer type 4 tilsettes. Løsningen inkuberes i 1 minutt i romtemperatur og sentrifugeres. Løsningen i eppendorfrøret er den rensede vektoren (30 µl).

Renset produkt (både vektoren og ”insert”) analyseres på agarosegel 1 % elektroforese (2.2.1.1.2), for å kontrollere produktene, og et bilde tas med Kodak Gel Logic 200 Imaging System som dokumentasjon.

**Tabell 2.4: Restriksjonskuttingsløsning for hvert insert**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
PCR produkt (”insert”)fra (2.2.1.1.3)	45 µl
10 X NEBuffer 2	6 µl
100 X BSA	0,6 µl
BamHI (20 000 U/ml)	2 µl
NheI (10 000 U/ml)	2 µl
MQ vann	ad 60 µl (4,4 µl)

**Tabell 2.5: Restriksjonskuttingsløsning for pET28b<sup>+</sup> vektoren**

Komponent	Mengde
pET28b <sup>+</sup> vektor 340ng/μl	2 μg (5,9 μl)
10 X NEBuffer 2	5 μl
100 X BSA	0,5 μl
BamHI (20 000 U/ml)	2 μl
NheI (10 000 U/ml)	2 μl
MQ vann	ad 50 μl (34,6 μl)

**Tabell 2.6: Tilberedning av agarosegel 0,8 %**

Komponent	Mengde
Agarose gel (SeaKam)	0,8 g
1 X TAE buffer løsning (bilag A, tabell A.6)	ad 100 ml
SYBR®Safe DNA gel stain	4 μl

#### ***2.2.1.1.5 Ligering av restriksjonskuttet og rensset PCR produkt og pET28b<sup>+</sup>***

Hvert PCR produkt og vektoren som er kuttet med samme restriksjonsenzymene (2.2.1.1.4), blir ligert sammen. Til ligeringen brukes DNA ligase. Sammenkoblingen av to fragmenter kalles ligering, og resultatet blir rekombinant DNA.

Ligeringen ble utført med 2 forskjellige metoder:



2.2.1.1.5.1 **Metode 1:** Ligering av PCR produktene RPO41-D1, -D2 og -D3 med vektoren:

Utførelse:

Det ble laget to forskjellige ligeringsreaksjonsløsninger for hvert PCR produkt.

Ligeringsreaksjon 1 inneholder en blanding av vektor og PCR produkt i forhold 1:2, og ligeringsreaksjon 2 har et forhold 1:1 (tabell 2.7).

- Blandingene tilberedes som beskrevet i tabell 2.7 for hvert PCR konstrukt.
- Blandingene vortexes og spinnes i 1 minutt.
- Inkuberes i 1 time ved romtemperatur.
- Ligeringsreaksjonen kontrolleres ved å analysere på 0,8 % agarosegel (tabell 2.6). Til det benyttes samme prosedyrer som beskrevet i punkt 2.2.1.1.2.

**Tabell 2.7: Ligeringsreaksjoner for ligering av PCR produktene RPO41-D1, -D2, -D3 med vektor**

Komponent	Ligeringsreaksjon 1	Ligeringsreaksjon 2
	Mengde	Mengde
MQ vann	ad 20 µl (6,5 µl)	ad 20 µl (11,5 µl)
10 X T4 buffer	2 µl	2 µl
T4 DNA ligase (Fermentas)	0,5 µl	0,5 µl
Kuttet, rensset vektor (2.2.1.1.4)	4 µl	3 µl
Kuttet, rensset DNA produkt (2.2.1.1.4)	7 µl	3 µl

#### 2.2.1.1.5.2 **Metode 2:** Ligering av PCR prouduktene RPO41-D5 og -D6

Ligeringen ble foretatt i LMP 0,8 % agarosegel (tabell 2.9). Dette er en veldig myk gel og bør håndteres med forsiktighet. Agarosegelen ble laget med dobbelt store brønner for å ha tilstrekkelig plass for applisering av totalvolumet til ligeringsløsningen.

Utførelse:

- Totalvolumet av ferdig restriksjonskuttet vektor (45 µl, tabell 2.5) og hvert PCR produkt (55 µl hver, tabell 2.4) overføres til hvert sitt eppendorfrør.
- 10 µl 6 X loading dye solution (BioLabs) tilsettes til eppendorfrøret med restriksjonskuttet vektor og 12 µl 6 X loading dye solution tilsettes til hvert av eppendorfrørene med 55 µl PCR produkt.
- Totalvolumet av vektoren (55 µl) og PCR produktene (67 µl) appliseres på LMP 0,8 % agarosegel (tabell 2.9) som ble tilberedt på forhånd. Mengdene kan fordeles i 2 brønner.
- DNA størrelsesmarkør (1 kb DNA ladder) appliseres i første brønn.
- Elektroforese kjøres ved 50V, 220 mA og i 2 timer i 1 X TAE buffer (bilag A, tabell A.6).
- Etter avsluttet elektroforese overføres gelen til fremkallingsmaskinen til PCR geler, Kodak Gel Logic 200 Imaging System, og et bilde tas som dokumentasjon.
- Gelen visualiseres med UV-lys (i kort periode). Hvert produkt skjæres ut med en ren skalpell og overføres til et rent eppendorfrør.
- Eppendorfrørene med kuttete gelfragmentene i oppvarmes til 70 °C til all gelen er oppløst og lagres ved 37 °C.

- Ligeringsløsning tilberedes for hvert PCR-produkt som beskrevet i tabell 2.8. MQ vann og 10 X T4 buffer inkuberes i varmeinkubator i 37 °C, deretter blandes alle komponentene sammen som beskrevet i tabell 2.8, og til slutt tilsettes DNA ligase (kald).
- En ligeringsløsning uten PCR-produkt tilberedes for applisering på agarosegelen. Dette brukes som negativ kontroll på ligeringsreaksjonen.
- Blandingen inkuberes over natten i romtemperatur. Etter kort tid vil blandingen stivne til gel.
- Dagen etter oppvarmes gelen til 70 °C. 5 µl fra hver reaksjon overføres til egne eppendorfrør og tilsettes 1µl 6 X loading dye (BioLabs).
- Prøvene appliseres på agarosegel 1 % og elektroforese kjøres ved 120V, 220 mA i 40 minutter, for å kontrollere ligeringsreaksjonen.
- Etter avsluttet elektroforese overføres gelen til en fremkallingsmaskin (Kodak Gel Logic 200 Imaging System), og et bilde tas som dokumentasjon.

**Tabell 2.8: Ligeringsløsning for ligering av PCR produktene RPO41-D5 og -D6 med vektor**

Komponent	Mengde
MQ vann	ad 30 µl (5 µl)
10 X T4 Buffer	3 µl
T4 DNA ligase	2 µl
Kuttet og rensset Vektor (2.2.1.1.4)	5 µl
Kuttet og rensset PCR produkt (2.2.1.1.4)	15 µl

**Tabell 2.9: Tilberedning av LMP agarosegel 0,8 %**

Komponent	Mengde
Nu Sieve® GTG® Agarose Low melting temperature agarose	0,8 g
1 X TAE buffer (bilag A, tabell A.6)	ad 100 ml
SYBR®Safe DNA gel stain	4 µl

#### **2.2.1.1.6 Transformering av rekombinant DNA inn i ER2566 celler ved elektroporering**

Ved transformasjon blir plasmid DNA (rekombinant DNA) overført i elektrokompetente *E.coli* (ER2566) celler. Disse cellene er spesielt behandlet slik at de er i stand til å ta opp DNA ved elektroporering.

Elektroporerings metoden er en metode som brukes for å transformere plasmid DNA inn i kompetente celler. Transformasjonen skjer ved å utsette disse cellene for elektrisk sjokk med høyspenning, slik at det dannes porer i cellemembranen som muliggjør at plasmid DNA kan trenge inn i cellene [42].

Utførelse:

Prosedyren som beskrives her, ble utført for hvert RPO41 konstrukt. Totalt 5 konstrukter, RPO41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6

- Et eppendorfrør med 50 µl *E. coli* ER2566 celler tines på is.
- 1 µl plasmid med DNA-insert (2.2.1.1.5) tilsettes til eppendorfrøret, og innholdet blandes ved lett knipsing.
- Blandingen overføres til spesielle elektroporeringskvyetter og elektroporeres med elektroporeringsapparatet (Electro Square Porator™) ved 200 omh, 2500 V, 99 µsek pulslengde og 10 pulser.

- 
- 950 µl ferdig laget SOC-medium, oppvarmet til 37 °C på forhånd, tilsettes til blandingen i kyvetten, blandes forsiktig ved å suge løsningen opp og ned med pipette.
  - Blandingens overføres til et nytt eppendorfrør og inkuberes ved 37 °C og risting ved 400 rpm i 30- 60 minutter.
  - Cellene dyrkes ved å spre dem over LB-plater <sup>m</sup>/kanamycin, og inkuberes i romtemperatur i omtrent 2 døgn eller ved 37 °C over natt. De cellene som har mottatt plasmid med DNA-insert inneholder et gen for kanamycinresistens som tillater cellene å vokse på LB-platene.

#### ***2.2.1.1.7 Minipreparering av plasmid DNA***

Plasmidene fra punkt 2.2.1.1.6 isoleres ved hjelp av QIAprep® Miniprep kit I. QIAprep Miniprep isoleringsprosedyrer er basert på først alkalisk lysing av bakteriecellene, så adsorpsjon av plasmid DNA til silikakolonnen ved bruk av høysaltbuffer, deretter vask av kolonnen, og til slutt eluering av plasmid DNA fra kolonnen.

QIAprep® kittet inneholder:

1. Buffer P1: Resuspansjonsbuffer for cellepelletene.
2. Buffer P2: Inneholder NaOH/ SDS tilsatt RNase på forhånd. SDS løser opp fosfolipider og proteinkomponenter i cellemembranen. Det fører til cellelysering slik at celleinnholdet lekker ut, mens de alkaliske omgivelsene denaturerer proteiner, kromosomalt og plasmid DNA.
3. Buffer N3: Er en nøytral løsning og inneholder høy konsentrasjon av salt. Dette gjør at proteiner, SDS og kromosomalt DNA denatureres og tilslutt felles ut, mens plasmid DNA, som er mindre enn kromosomalt DNA, renatureres og forblir i løsningen (supernatanten).
4. Buffer PB: Fjerner endonukleaser for å beskytte plasmid DNA fra degradering.
5. Buffer PE: Er en vaskebuffer som vasker salter ut fra kolonnen.

6. Buffer EB: Er en elueringsbuffer som eluerer plasmidet effektivt fra kolonnen.

Annet tilbehør: oppsamlingsrør og HiBind® kolonner.

Utførelse:

Prosedyrene utføres for hver enkelt Rpo41 konstrukt

- I et 50 ml plastrør med lokk tilsettes 5 ml LB-medium, 5 µl kanamycin og 1 koloni fra LB-platene (2.2.1.1.6)
- Blandingen inkuberes ved 37 °C og 200 rpm over natt (12-16 timer).
- Plastrøret med inokulatet sentrifugeres (Megafuge, Heraus Ins.) ved romtemperatur, 3000 rpm i 1 minutt.
- Pelletene resuspanderes i 250 µl Buffer P1/ <sup>m</sup> RNase og blandes godt ved vortexing.
- Blandingen overføres til et nytt eppendorfrør, og 250 µl buffer P2 tilsettes. Løsningen blandes forsiktig ved å vende røret opp og ned til løsningen er viskøs og klar.
- 350 µl buffer N3 tilsettes og blandes forsiktig ved å vende røret opp og ned til et hvitt bunnfall dannes.
- Røret sentrifugeres (Biofuge, Heraus Ins.) i 10 minutter ved 13000 rpm ved romtemperatur.
- Supernatanten overføres til en HiBind® kolonne. Kolonnen settes i et nytt oppsamlingsrør og sentrifugeres ved 13000 i 1 minutt ved rom temperatur. Flowthrough kastes.
- 0,5 ml buffer PB tilsettes til kolonnen som sentrifugeres (Biofuge, Heraus Ins.) ved 13000 rpm i 1 minutt ved romtemperatur for å vaske bort salter. Flowthrough kastes. Dette trinnet gjentas 2 ganger.

- 
- Kolonnen sentrifugeres (Biofuge) ved 13000 rpm i 1 minutt ved romtemperatur for å kvitte seg med eventuelle rester av vaskebufferen.
  - Kolonnen overføres til et nytt eppendorfrør og 50 µl buffer EB tilsettes for å eluere plasmid DNAet. Røret sentrifugeres ved 13000 rpm i 1 minutt ved romtemperatur.
  - Utbytte og kvalitet på eluatet bestemmes ved spektrofotometrisk måling av  $A_{260}$ .

#### ***2.2.1.1.8 Kontroll av isolert og rensset plasmid fra ER2566 celler ved agarose-gelelektroforese***

Dette er en metode for å kontrollere at ER2566 cellene som ble plukket ut etter dyrking på LB-platene (2.2.1.1.6), inneholder ønsket plasmid med DNA-insert.

Kontrollen ble utført med 2 forskjellige metoder:

##### ***2.2.1.1.8.1 Metode 1: Koloni-PCR-reaksjon med MiniPrep-produktene***

Denne metoden blir benyttet for Rpo41-D1, -D2 og -D3 konstruktene.

Dette er en metode for å finne ut om transformanter har fått rekombinant DNA i seg. I tillegg kan man bruke denne metoden for å finne ut størrelsen til insertet. I denne oppgaven var hensikten med å bruke denne teknikken å påvise rekombinant DNA.

Reaksjonsløsningene for koloni-PCR blir tilberedt i henhold til tabell 2.1 (side 49), med unntak av DNA templatet som blir erstattet med 2µl av plasmidene som var isolert fra ER2566 ved miniprep (2.2.1.1.7). PCR blir utført med de samme betingelsene som nevnt i punkt 2.2.1.1.1.

Deretter blir PCR produktene analysert på 0,8 % agarosegel ved gelelektroforese (2.2.1.1.2).

#### 2.2.1.1.8.2 **Metode 2**: Restriksjonskutting av Miniprep-produktene

Denne metoden blir benyttet for Rpo41-D5 og -D6 konstruktene. Renset og isolert plasmid (2.2.1.1.7) ble restriksjonskuttet med restriksjonskutteenzymene BamHI og NheI som beskrevet i tabell 2.4 (side 55), unntatt PCR produktet som ble erstattet med rensset og isolert plasmid fra punkt 2.2.1.1.7.

Deretter blir de restriksjonskuttete produktene analysert på 1 % agarosegel ved elektroforese (2.2.1.1.2).

#### 2.2.1.1.9 **Sekvensering**

Isolert plasmid fra punkt 2.2.1.1.7 sendes til sekvensering for å undersøke om de forskjellige DNA-insertene inneholder riktig sekvens, og at ingen mutasjon har forekommet underveies i kloningsprosessen.

På grunn av lengden til Rpo41 konstruktene ble det designet flere primere for å dekke hele proteinsekvensen ved sekvensering (bilag F og G).

Renset plasmid fra hvert konstrukt plukkes ut etter å ha studert gelelektroforesefigurene fra punkt 2.2.1.1.8. DNA konsentrasjonen måles og sekvenseringsløsningene tilberedes.

Utførelse:

- Løsninger for sekvensering tilberedes i henhold til tabell 2.8 for hvert av konstruktene. Komponentene i tabell 2.8 ble tilsatt i eget eppendorfrør for hvert konstrukt og hver primer.



**Tabell 2.8: Tilberedning av sekvenseringsløsning til Rpo41 konstruktene**

Komponent	Mengde
Plasmid med DNA insert (2.2.1.1.7)	150-300 ng
Primer (bilag F og G)	3,2 pmole
MQ vann	ad 15 µl

#### **2.2.1.1.10 Transformasjon av Rpo41-konstruktene inn i *E.coli* BL-21 CodonPlus® (DE3)-RIL celler**

Til transformasjon av Rpo41 konstruktene blir *E. Coli* BL21 CodonPlus celler brukt. Disse cellene er en spesielt velegnet vert for ekspresjon av rekombinant protein.

Renset plasmid (2.2.1.1.7) transformeres inn i BL21 CodonPlus celler etter å ha sekvensert konstruktet og sikret at det ikke har forekommet mutasjoner under PCR arbeidet.

Utførelse:

Prosedyren utføres for hvert av de 5 RPO41 konstruktene; RPO41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6.

- Et eppendorfrør med 50 µl BL21- Codon Plus®- RIL celler tines på is.
- 1 µl renset plasmid tilsettes til eppendorfrøret. Suspensjonen blandes ved lett knipsing.
- Blandingen inkuberes på is i 30 minutter.
- Blandingen inkuberes i 42 °C vannbad i nøyaktig 20 sekunder for varmesjokkbehandling, deretter inkuberes på is i 2 minutter.
- 900 µl ferdig laget SOC-medium, oppvarmet til 42 °C på forhånd, tilsettes til blandingen i hvert rør. Suspensjonen blandes ved forsiktig pipettering.
- Blandingen inkuberes ved 37 °C og røring ved 400 rpm i 1 time.

- Cellene selekteres ved å spre dem over LB- plater<sup>m</sup>/kanamycin, og platene inkuberes i romtemperatur i omtrent 2 døgn eller ved 37 °C over natt.

#### 2.2.4 Ekspresjonstest av Rpo41 konstruktene

Rpo41 konstruktene prøveinduseres i liten skala. Dette steget er hensiktsmessig å gjennomføre av økonomiske grunner. Det kjøres gelelektroforese på gen-produktet hvor vi kan bekrefte visuelt at det innsatte genet fungerer, og at vertscellene klarer å uttrykke genet. Mengde uttrykt protein (intensiteten på gelbåndet) og lokalisering av proteinbåndet i gelen kan nå bestemmes.

Utførelse:

Tilberedning av ONK

- 100 ml LB-medium overføres til en 250 ml erlenmeyerkolbe. 100 µl 100 mg/ml kanamycin tilsettes og 1 koloni av de selekterte cellene på LB-platen fra punkt 2.2.1.1.10 inokuleres i LB-mediet.
- Blandingen inkuberes ved 37 °C, 180 rpm i 12-16 timer.
- Av dette ONK tilberedes glycerolstock for hvert konstrukt som beskrevet i 2.1.1.2.

Tilberedning av vekstkultur

- 1 ml av overnattskulturen overføres til en ny 250 ml erlenmeyerkolbe som allerede inneholder 100 ml LB- medium og 100 µl 100 mg/ml kanamycin.
- Inkuberes ved 37 °C og 180 rpm.
- Med jevne mellomrom tas en prøve av kulturen for å bestemme den optiske tettheten.

1 ml tas i en kyvette (polysterene, Sarstad)). Celletettheten måles med spektrofotometer (eppendorf) ved OD600.

- Proteinproduksjonen induseres ved å tilsette 100 µl 0,5 M IPTG, når OD måles til ca 0,5. Kulturene inkuberes videre ved 37 °C og 180 rpm røring i 2 timer. **For å undersøke ekspresjonen av de ulike konstruktene ble det tatt ut 1 ml cellekultur (for hvert konstrukt) før og 2 timer etter induksjon (tabell 2.9 og 2.10).**
- Cellekulturpøvene overføres til et eppendorfrør, sentrifugeres og cellepelletene brukes for å applisere på Neu-PAGE gel.
- Tre forskjellige fortynninger tilberedes av cellepelletene for hvert konstrukt med protein crack (tabell 2.9 og 2.10).
- Fortynningene varmes opp på varmeblokk til 95 °C i 5 minutter og 10 µl av hver prøve appliseres i hver sin brønn på polyakrylamid gelen (Clear PAGE™ 12 % TEO-CI SDS).
- 10 µl molekylvektsmarkør (SeaBlue®) appliseres i første brønn på en 12 % polyakrylamidgelen.
- Elektroforese kjøres ved 200 V i 35 minutter med 1 X MOPS kjørebuffer som beskrevet i 2.1.3.2 fra 9-10.

**Tabell 2.9: Fortynning av cellepelleter fra før induksjon for hvert DNA-insert**

<b>Litt cellepelleter <u>før</u> induksjon skrapes av</b>	<b>Litt cellepelleter <u>før</u> induksjon skrapes av</b>	<b>Litt cellepelleter <u>før</u> induksjon skrapes av</b>
20 µl protein crack tilsatt β-ME	50 µl protein crack tilsatt β-ME	100 µl protein crack tilsatt β-ME

**Tabell 2.10: Fortynning av cellepelletter fra etter induksjon for hvert DNA-insert**

<b>Litt cellepelletter <u>etter</u> induksjon skrapes av</b>	<b>Litt cellepelletter <u>etter</u> induksjon skrapes av</b>	<b>Litt cellepelletter <u>etter</u> induksjon skrapes av</b>
20 µl protein crack tilsatt β-ME	50 µl protein crack tilsatt β-ME	100 µl protein crack tilsatt β-ME

### 2.2.5 Uttrykk av Rpo41 proteinene i stor skala:

Det ble fulgt opp samme prosedyre for ekspresjon, uttrykk og rensing av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6 proteinene som beskrevet i deloppgave 1 punkt 2.1.3. Figur 1.5 (side 28) viser disse trunkeringene.

### 2.2.6 Westernanalyse av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6

Westernanalyse er en analysemetode som brukes for identifikasjon av et spesifikt protein. Det spesifikke proteinet (ene) kan identifiseres ved først å separere dem på en én eller to dimensjonalgel ved gelelektroforese, deretter overføres de separerte protein (ene) til en PVDF membran, såkalt blotting. Deretter kan ønskete protein(er) detekteres ved å tilsette et spesifikt antistoff som er koblet til radioaktiv isotop, et detekterbart enzym eller en fluorescerende farge [41, 42].

Utførelse:

#### 2.2.6.1 SDS-PAGE (Natrium dodecyl sulfat-polyakrylamid gelelektroforese)

Før gelelektroforese må proteinene (Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6) fortynnes til en konsentrasjon på ca 2 µg/µl.

Det ble tilberedt 5 proteinløsninger (1 løsning til hvert trunkert protein) på forhånd ved å blande komponentene i tabell 2.11 i hver sitt eppendorfrør, og hele volumet (40 µl) ble applisert på NuPAGE® 10 % Bis-Tris Mini Gel. Om SDS-PAGE teknikken og metoden henvises til punkt 2.1.3.2 (2-10). Det kjøres 2 geler.

**Tabell 2.11: Tilberedning av proteinprøver til applisering på NuPAGE® 10 % Bis-Tris Mini Gel**

Komponent	Mengde
Rpo41-protein 2 µg/µl	1 µl
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 X) fra Invitrogen®	10 µl
MQ vann	ad 40 µl

### **2.2.6.2 Blotting av gel over til en membran**

Til blotting benyttes 2 stk ferdigklippede 3mm tykke filterpapir, av type Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad, og en membran av type Hybond<sup>TM</sup>-P, som er en Hydrophobic polyvinylidene difluoride (PVDF) membran med porestørrelse 0,45 µm.

Utførelse:

- Gelene fra punkt 2.2.6.1 tas ut og overføres til et kar med 1 X Transfer buffer (bilag A, tabell A.7) i 20 minutter til ekvilibrerings.
- Membranen og filterpapirene klippes til gelstørrelse.
- Membranen aktiveres ved å ligge i metanol i 10 sekunder, så flyttes den over til MQ vann i 5 minutter, og tilslutt flyttes membranene over til et nytt kar med 1 X Transfer buffer i 20 minutter.
- Semi-Dry Blot fra Bio-Rad® brukes som blotteapparat. Nederst på platen i blotteapparatet legges et 3 mm filter, på filteret legges membranene, så overføres gelen på membranene og til slutt legges et nytt filterpapir på toppen. Eventuell luft fra mellomlagene fjernes ved å rulle med et plastrør over siste filteret.
- Det samme gjøres med gel nr 2.

- Toppen av blotteoppsatsen settes på, lukkes og blotting gjøres ved 20 V, 200 mA i 90 minutter (for 2 geler).
- Etter avsluttet blotting, kontrolleres det at standarden er overført til membranen. Hvis ikke, kan blottingen fortsettes noe lengre.

### **2.2.6.3 Blokking av membran**

Membran blokking kan gjøres ved 2 alternativer:

1. Blokking i 1 time på ristebord i romtemperatur.
  2. Blokking over natten på ristebord og i kjøleskap ved 4 °C.
- Membranen tas ut av blotteapparatet og overføres først til et kar med PBS-T (bilag A, tabell A.8) for vasking. Deretter flyttes den over til et nytt kar med 5 % tørrmelk i PBS-T (tabell 2.12). Det er viktig at membranen er godt dekket over med tørrmelk/PBS-T blandingen.
  - Karet med 5 % tørrmelk/PBS- T legges i kjøleskap til neste dag.

**Tabell 2.12: 5 % tørrmelk i PBS-T**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Skummet melkepulver	5 g
PBS-T	ad 100 ml

\*PBS-T tilsettes porsjonsvis og blandes. Kan oppbevares i kjøleskap og brukes innen 3 dager.

### **2.2.6.4 Tilsetting av primærantistoff**

Dagen etter fortsetter arbeidet

- 
- Membranen overføres til et nytt kar med PBS-T (bilag A, tabell A.8) og vaskes i 5 minutter. Denne prosedyren gjentas 5 ganger, og PBS-T skiftes mellom hvert vasketrinn. På denne måten kan tørrmelkrester fjernes effektivt.
  - Primærantistoffet, Musantistoffer, (bilag A, tabell A.10), blandes med PBS-T i 1:1000 forhold i et 50ml plastrør med lokk, og membranen overføres i plastrøret.
  - Plastrøret med membranen inkuberes på romtemperatur i 1 time med rotering. I løpet av denne tiden vil museantistoffene i PBS-T gjenkjenne proteinets His-tag på N-terminalen, og binde seg spesifikt til proteinet som vi ønsker å detektere.

#### **2.2.6.5 Tilsetting av sekundærantistoff**

- Membranen overføres til et nytt kar med PBS-T og vaskes i 5 minutter. Denne prosedyren gjentas 5 ganger, og PBS-T skiftes mellom hvert vasketrinn.
- Sekundærantistoffet, geit-antimusantistoff, (bilag A, tabell A.10) blandes med PBS-T i 1: 1000 forhold i et 50 ml plastrør med lokk, og membranen overføres i plastrøret.
- Plastrøret med membranen inkuberes på romtemperatur i 1 time med rotering. I løpet av denne tiden vil sekundærantistoffene i PBS-T gjenkjenne og binde seg til primærantistoffene som allerede er bundet til proteinet med sin His-tag. Sekundærantistoffene er i tillegg bundet til HRP (Horse Raddish Peroxidase).
- Etter 1 time tas membranen ut og settes i et kar med PBS-T og vaskes i 5 minutter. Dette gjentas 5 ganger, og PBS-T skiftes mellom hvert vasketrinn.

#### **2.2.6.6 Fremkalling**

HRP-enzymet er et peroksidaseenzym som er konjugert til sekundærantistoffet. Dette enzymet kan med hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) tilstede oksidere Luminol (substratet) til eksitert form som er et ustabil mellomprodukt. Dette mellomproduktet vil avgi lysenergi når det går over til et

stabilt produkt. Lyset har en bølgelengde på 420 nm og kan detekteres av et kamera. Dette kalles kjemiluminescens [39].

Kjemiluminescence betyr at energien fra en kjemisk reaksjon blir avgitt i form av lys som kan detekteres med spesielle kameraer.

Sammen med substratet Luminol blir det brukt signalforsterker ("enhancer") som øker kvantiteten og lengden til emisjonslyset som dannes i reaksjonen.

Utførelse:

- Membranen vaskes med 10 ml saltbuffer (bilag A, tabell A.11) i 10 minutter.
- Ca 300 µl fremkallingsvæske (bilag A, tabell A.12) dryppes på en plastfilm. Membranen legges over fremkallingsvæsken og strykes forsiktig over for å fordele væsken jevnt over membranen. Eksponeres i 5 minutter.
- Overskuddsvæske suges opp med pipette. En ny plast film legges over membranen.
- Det hele overføres til fremkallingsapparatet (MolecularImager®systems, Bio-Rad) og fremkalles. Tas et bilde som dokumentasjon.

### **2.2.7 Massespektrometri (MS) av Rpo41-D1**

MS er en metode som brukes blant annet for å identifisere organiske forbindelser. Metoden bruker massespektrometer hvor den ukjente organiske forbindelses ioniseres ved å bombardere molekylene med elektroner i vakuum. Ioniseringen gir enten positive eller negative molekylioner. Når molekylionene treffer detektoren, registreres massen med hensyn på masse ( $m$ ) og ladning ( $z$ ), ( $m/z$ ). Deretter utsettes molekylionene for kollisjonsenergi som fører til fragmentering. Hvert fragment vil danne et mønster som tilsvarer kun et gitt molekyl. Ved å sammenligne fragmentmønsteret med en database med kjente analytter, vil en kunne identifisere molekylionet.



---

Med massespektrometri kan man finne informasjon om den ukjente organisk forbindelsesmolekylvekt, hvilken atomer og grupper den består av, hvilken bruttoformel den har, og til slutt strukturen kan avsløres [40].

Utførelse:

- Rpo41-D1 appliseres på Clear PAGE<sup>TM</sup> SDS 12 % gel, elektroforese kjøres og gelen settes opp til farging med påfølgende avfarging (2.1.3.2).

Ønsket bånd kjøres bort med en ren skalpell. Gel biten kjøres til små biter og overføres til en ren eppendorfrør og sendes til MS.

## 2.3 Deloppgave 3

### 2.3.1 *In vitro* transkripsjonsassay

Dette er en *in vitro* metode for syntesen av RNA transkript fra en DNA templat ved hjelp av RNA polymerase.

Til *in vitro* transkripsjon kreves et lineært DNA templat med en eller flere promotor sekvenser, ribonukleotid trifosfater, et buffersystem og en fag RNA polymerase.

Det ble benyttet protokollen fra MAXIscript kit fra Ambion med eventuelt modifikasjoner for å tilpasse vårt eget forsøksdesign.

Følgende komponenter fra MAXIscript kitet ble benyttet i forsøket:

1. Nuklease fri vann
2. 10 x transkripsjons buffer (med DTT)
3. 10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP og 10 mM UTP

4. Mitokondrielt DNA (mtDNA) fra *S. cerevisiae* (gjær): Normalt skjer RNA transkripsjonen i *S. cerevisiae* fra dobbeltrådig DNA templatet, ved at RNA polymerase (scRpo41) og transkripsjonsfaktoren Mtf1 går sammen. Funksjonen til Mtf1 er å åpne dobbeltrådig DNA templatet ved promotorregionen etter å ha dannet holoenzym med Rpo41. I vårt forsøk ble mtDNA sekvensen i promotor regionen modifisert slik at den inneholder en kunstig åpning (en boble), slik at vi ikke lenger hadde behov for transkripsjonsfaktoren Mtf1 [26, 30].
5. RNA polymerase: Våre egne trunkerte versjoner Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6. Rpo41-WT var tidligere tilberedt på laben av andre ansatte.
6.  $^{32}\text{P}$ -UTP (Uridine 5'-triphosphate [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]) fra PerkinElmer.

Komponentene i MAXIscript kitet blandes sammen i henhold til tabell 3.2 og en "master mixture" reaksjonsløsning tilberedes (heretter master mixture erstattes med MM),  $^{32}\text{P}$ -UTP tilsettes til MM reaksjonsløsningen på hotlaben.

To problemstillinger ble undersøkt:

- **Transkripsjonsaktiviteten til de ulike trunkeringene til Rpo41:**

Dette kan undersøkes ved å tilsette den trunkerte scRNA polymerasen (Rpo41) til MM reaksjonsløsningen. Når Rpo41 tilsettes til MM reaksjonsløsningen, vil den binde seg til promotoren i det modifiserte mtDNA og starte syntese av den komplementær  $5' \rightarrow 3'$  RNA tråden, ved å inkorporere dNTP og  $^{32}\text{P}$ -UTP i den nylig transkriberte RNA transkribtet. 10  $\mu\text{l}$  av denne MM reaksjonsløsningen blir applisert på 20 % Long Ranger (LR)/ 8 M UREA og gelelektroforese kjøres. Etter avsluttet elektroforese blir gelen overført til "screenplate" (Storage Phosphor Screen) etter tørking. Gelen blir lagt opp til eksponering i 1-3 døgn. Etter endt eksponering blir "screenplaten" skannet på et fosfat imager (Typhoon, 9410 Variable Mode Imager) for å visualisere transkripsjonsaktiviteten til de ulike trunkeringene til scRpo41.

- **Hvorvidt Oxr1 proteinet er i stand til å blokkere transkripsjonsaktiviteten til Rpo41:**

Dette kan undersøkes ved å tilsette Oxr1 proteinet i ulike konsentrasjoner til MM reaksjonsløsningen som inneholder trunkert Rpo41. Igjen ble 10 µl av MM reaksjonsløsningen blir applisert på 20 % Long Ranger (LR)/ 8 M UREA, og prosedyrene nevnt ovenfor gjentas.

Long Ranger® (LR) 50 % Gel Solutions produsert av Lonza Rockland, Inc., består av polyakrylamid gel løsning.

Separasjonsmetoden med LR geler er som andre polyakrylamidgeler punkt 2.1.3.2 (SDS-PAGE).

Urea tilsettes for å danne denaturerende forhold for proteinet i gelen, og dermed hindre at RNA danner sekundærstrukturer med seg selv [39].

TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamid) katalyserer polyakrylamid polymeriseringsreaksjonen ved å katalysere dannelsen av frie radikaler fra APS (Ammonium PerSulfate) [39].

Utførelse:

- Elektroforese cell (Mini Protean®) med tilbehøret (bilag C, figur C.2) monteres.

#### **2.3.1.1 Tilberedning av 20 % LR/ 8 M Ureagel (tabell 3.1)**

- Til 7 ml MQ vann tilsettes 9,6 g urea, blandes ved vortexing. Urea er tungt løselig i vann, derfor blandes det til det løser seg så godt som mulig.
- 20 X Taurinbuffer og Long Range gelløsning tilsettes blandingen. Blandes ved vortexing til alt urea er løst opp, og løsningen er klar.
- 10 % APS og TEMED tilsettes til blandingen og blandes godt.

- Med en 10 ml pipette fylles blandingen mellom 2 ferdig monterte glassplater fra Mini PROTEAN 3. Kammene settes på. Gelen stivner etter noen timer. I mellom- tiden tilberedes MM reaksjonsløsningen.

**Tabell 3.1: 20 % LR/ 8 M UREA elektroforesegelløsning**

Komponent	Mengder
MQ vann	7 ml
20 X Taurinbuffer (bilag B, B.4, eget lab)	1 ml
Long Range Gel Solution 50% (Lonza, USA)	6,3 ml
Urea (Sigma-Aldrich, USA)	9,6 g
10 % APS (BioRad)	100 µl
TEMED (BioRad,USA)	15 µl

### **2.3.1.2 Tilberedning av MM reaksjonsløsning:**

Tabell 3.2 viser komponentene i MM reaksjonsløsning beregnet for 1 prøve.

Hvor mye MM reaksjonsløsning man trenger, kommer an på antall prøver som designes for hvert enkelt forsøk. Et eksempel på en slik design beskrives i tabell 3.3 hvor man har behov for en MM reaksjonsløsning for 14 prøver, dvs ca 112 µl MM reaksjonsløsning. MM reaksjonsløsningen tilberedes alltid med litt overskudd.

- Komponentene fra 1 til 7 i tabell 3.2 tas i en eppendorfrør og blandes godt.

#### **Arbeid i HotLab:**

- Ferdig tilberedet MM reaksjonsløsningen for 15 prøver (ca 120 µl) blandes godt.
- <sup>32</sup>P-UTP (komponent nr. 8 i tabell 3.2) tilsettes til MM reaksjonsløsningen og blandes.
- MM reaksjonsløsningen fordeles i 14 eppendorfrør, 8 µl i hvert rør.

- 
- Komponentene i tabell 3.3 tilsettes i samme rekkefølge til hvert eppendorfrør med MM reaksjonsløsning.
  - Løsningen blandes godt med vortex, spinnes ned og inkuberes på varmeblokk (KEBO Lab AS) ved 37 °C i 1 time.
  - 0,5 µl 0,5 M EDTA tilsettes til hver eppendorfrør med MM reaksjonsløsning, blandes ved vortexing og spinnes ned. EDTA vil stoppe RNA transkripsjonen.
  - 6 µl fra hver MM reaksjonsløsning overføres til nye eppendorfrør, 18 µl RNA Loading buffer (Ambion) tilsettes til hvert eppendorfrør. Dette blandes godt med vortexing og spinnes ned.
  - Blandingen inkuberes på varmeblokk ved 95 °C i 3 minutter.
  - Ferdig stivnet gel fra 2.3.1.1 legges i egen beholder og overføres til kjøreoppsatsen. 1 X Taurinbuffer (kald) (bilag A, tabell A.13) fylles i kjøreoppsatsen til det dekker over gel-brønnene.
  - 10 µl fra hvert eppendorfrør med MM reaksjonsløsning appliseres på 20 % LR/ 8 M urea gel, etter å ha skylt brønnene med 1 X Taurin buffer ved hjelp av en kanylemontert sprøyte.
  - Elektroforese kjøres ved 200V, 250mA i ca 1 time, på is.

**Tabell 3.2: "Master mixture" (MM) reaksjonsløsning for *in vitro* transkripsjonsassay.**

	<b>Komponent</b>	<b>Mengde for 1 MM reaksjonsløsning</b>
1	Nuklease fri vann	Totalt 8 µl (5,9 µl)
2	10 X transkripsjons buffer	1 µl
3	ATP 10mM	0,1 µl
4	GTP 10mM	0,1 µl
5	CTP 10mM	0,1 µl
6	UTP 10mM	0,05 µl
7	DNA templat	0,5 µl
8	<sup>32</sup> P- UTP	0,25 µl

\*For 1 reaksjon trengs 8µl MM

**Tabell 3.3: Design på et forsøk hvor Oxr1 ble tilsatt til Rpo41 for å undersøke intraksjoner mellom de to proteinene.**

Rør nr.	Komponent	Mengde
1	Lavsaltbuffer (negativ kontroll)	2 $\mu$ l
2	Lavsaltbuffer (tabell 1.9)	1 $\mu$ l
3	Oxr1-D6 10 pmole	1 $\mu$ l
4	Oxr1-D6 20 pmole	1 $\mu$ l
5	Lavsaltbuffer	1 $\mu$ l
6	Oxr1-D6 10 pmole	1 $\mu$ l
7	Oxr1-D6 20 pmole	1 $\mu$ l
8	Lavsaltbuffer (negativ kontroll)	2 $\mu$ l
9	Lavsaltbuffer	1 $\mu$ l
10	Oxr1-WT 5 pmole	1 $\mu$ l
11	Oxr1-WT 10 pmole	1 $\mu$ l
12	Lavsaltbuffer	1 $\mu$ l
13	Oxr1-WT 5 pmole	1 $\mu$ l
14	Oxr1-WT 10 pmole	1 $\mu$ l

### **2.3.1.3 Tørring av gelen ved 80 °C**

- Gelen tas ut fra glassplatene og settes over på tørkepapir for radioaktive geler som har en tykkelse på 2-3 mm (Whatman, GE HealthCare).
- Gelen dekkes med plastfolie og overføres sammen med tørkepapiret til en vakumtørker (Bio-Rad), der den tørkes i 30 minutter ved 80 °C.

**2.3.1.4 Filmeksponering og skanning**

- Gelen med tørkepapiret pakkes inn i plastfolie og overføres til ”screenplate” (Storage Phosphor Screen fra GE HealthCare) for radioaktivstråling eksponering i ca 1-3 døgn.
- Deretter tas ”screenplaten” ut og overføres til skanner apparatet fosfat imager (Typhoon 9410 Variable Mode Imager fra Amersham Bioscience), skannes og et bilde tas fra resultatene som dokumentasjon.



### 3 Resultater og diskusjon

#### 3.1 Deloppgave1

##### 3.1.1 Ekspresjon og rensing av Oxr1-D6, -D7 og -D8 proteinene

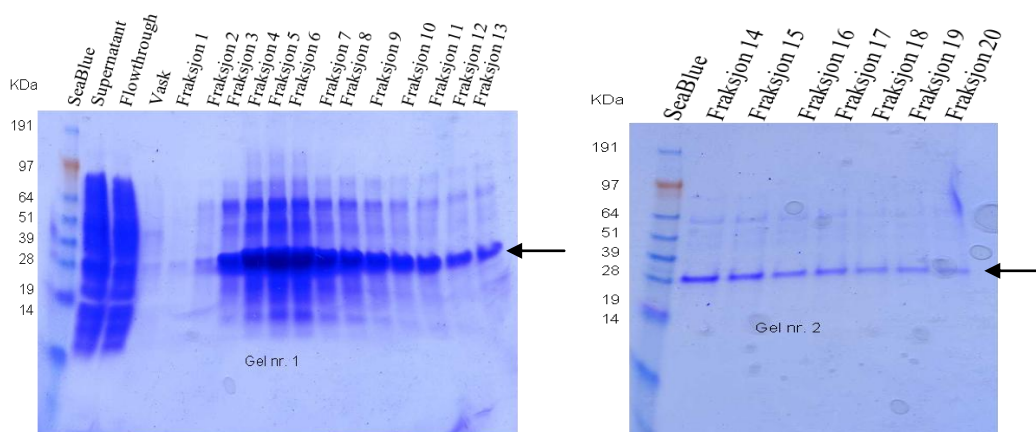
En protokoll for rensing av proteinene var allerede utarbeidet på laboratoriet, og samme protokoll ble benyttet i arbeidet med denne oppgaven.

###### 3.1.1.1 Rensing av Oxr1-D6

###### 3.1.1.1.1 *Isolering og rensing av Oxr1-D6 med Ni-NTA agarosekolonne*

De ubundne proteinene blir vasket bort med sonikeringsbuffer, og proteinet blir eluert fra Ni-NTA agarosekolonnen med 300 mM imidazol (2.1.3.1). Utvalgte fraksjoner analyseres på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.1 viser Oxr1-D6 analysert på SDS-PAGE gel. De sterke båndene på gelen representerer Oxr1-D6 proteinet som består av 200 aminosyrer og har en molekylvekt på omtrent 23 kDa. Som figuren viser blir Oxr1-D6 proteinet sterkt uttrykt. Proteinfraksjoner 2-20 blir slått sammen og trombinkuttet over natten.

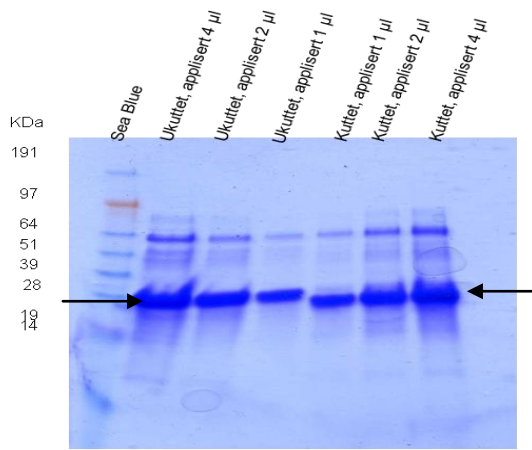


Figur G3.1: 12 % SDS-PAGE gel for Oxr1-D6 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Båndet merket med pil på begge gelene representerer Oxr1-D6 proteinet som er rundt 23 kDa og befinner seg i fraksjon 2-20.

### 3.1.1.1.2 *Oxr1-D6 (His<sub>6</sub>)-tag kutting med proteaseenzymet trombin*

Trombin ukuttet og kuttet Oxr1-D6 (2.1.3.3) blir analysert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.2 viser at det trombinkuttede proteinet har vandret noe lengre i gelen enn det ukuttede; med andre ord var trombinkuttingen vellykket.



Figur G3.2: 12 % SDS-PAGE gel for trombin ukuttet og kuttet Oxr1-D6.

Siden det er flere bånd på gelen enn det som tilsvarer Oxr1-D6 er ytterligere rensing nødvendig. Etter dialysering av proteinløsningen mot lavsaltbuffer (2.1.3.4), blir proteinløsningen applisert på en resource Q ionebyttekolonne.

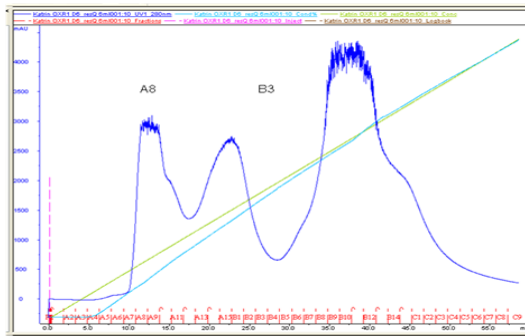
### 3.1.1.1.3 *Oxr1-D6 rensing med resource Q kolonne*

Proteinet elueres ved gradienteluering hvor konsentrasjonen av NaCl gradvis økes fra 50 mM til 1 M (2.1.3.5). Utifra kromatogrammet velger man ut fraksjoner som appliseres på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

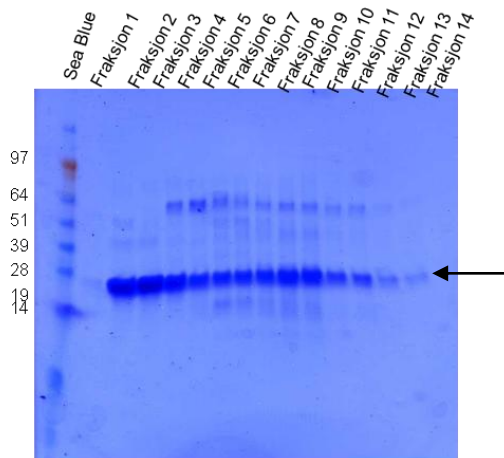
FPLC kromatogrammet, figur K3.3, inneholder 3 toppene. Det er vanskelig å si hvilke av de 3 toppene som tilsvarer Oxr1-D6. Alle fraksjonene som inkluderer alle tre toppene blir applisert på SDS-PAGE gel.

Figur G3.3 viser at fraksjoner 2-14 (som tilsvarende fraksjoner A9- B6 på figur K3.3) inneholder Oxr1-D6. Renseprosessen har vært vellykket.

Fraksjoner 2-14 på figur G3.3 blir slått sammen og oppkonsentreres for videre rensing med superdex 75 kolonne.



Figur K3.3: Kromatogram fra rensing av Oxr1-D6 med resource Q kolonne. Proteinet elueres mellom fraksjoner A8-B3.

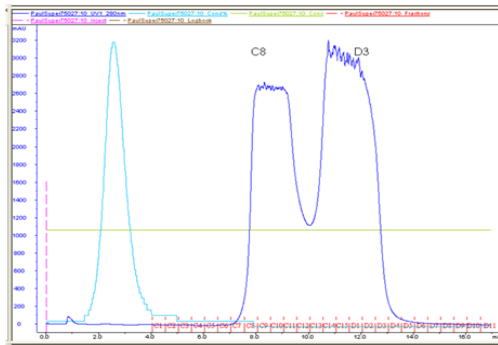


Figur G3.3: 12 % SDS-PAGE gel for Oxr1-D6 fraksjoner eluert fra resource Q kolonne. Oxr1-D6 befinner seg i fraksjon 2-14. Fraksjoner fra 15-24 som tilsvarende topp nr.3 på figur K3.3 vises ikke, fordi gelen viste ingen klare proteinbånd.

#### 3.1.1.1.4 Oxr1-D6 rensing med superdex 75 kolonne

Fraksjoner 2-14 fra resource Q rensetrinnet blir slått sammen til en, og oppkonsentrert for å redusere volumet før applisering på gelfiltreringskolonnen superdex 75 (2.1.3.7). Oxr1-D6 elueres med lavsaltbuffer.

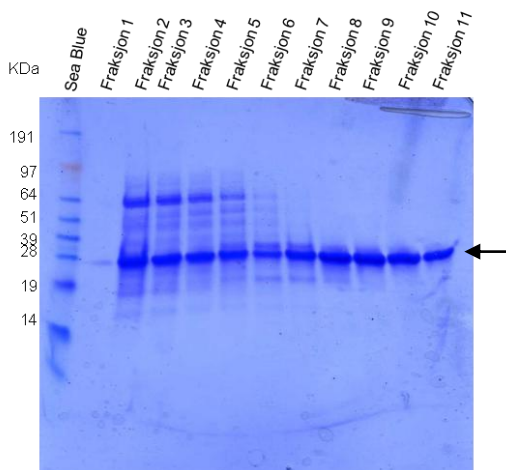
Fra FPLC kromatogrammet, figur K3.4, ser vi 2 like topper som kommer rett etter hverandre. Fraksjoner C8- D3 appliseres på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).



Figur K3.4: Kromatogram fra rensing av Oxr1-D6 med superdex 75kolonne. Proteinet elueres mellom fraksjoner C8- D3.

Figur G3.4 viser at alle fraksjonene fra figur K3.4 inneholder Oxr1-D6. Rense prosessen har vært vellykket. Fraksjoner 7-11 (C14-D3) blir slått sammen og oppkonsentrert.

Proteinkonsentrasjonen blir målt, notert i logg boken og frosset ved -20 °C.



Figur G3.4: 12 % SDS-PAGE gel for Oxr1-D6 fraksjoner eluert fra superdex 75 kolonne. Oxr1-D6 befinner seg i fraksjon 2-11 på gelen.

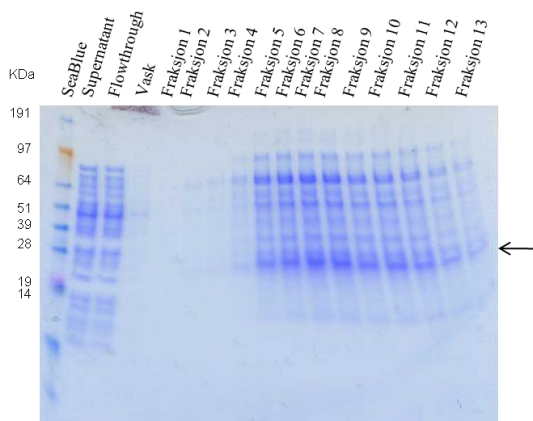
### 3.1.1.2 Rensing av Oxr1-D7

#### 3.1.1.2.1 Isolering og rensing av Oxr1-D7 med Ni-NTA agarosekolonne

De ubundne proteinene blir vasket bort med sonikeringsbuffer og proteinet blir eluert fra Ni-NTA agarosekolonnen med 300 mM imidazol (2.1.3.1). Utvalgte fraksjoner analyseres på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.5 viser Oxr1-D7 analysert på SDS-PAGE gel. Oxr1-D7 proteinet består av 127 aminosyrer og har en molekylevekt på omtrent 15 kDa. Proteinets størrelse samsvarer med båndet på gelen

Av gelen (figur G3.5) ser vi at proteinet er svakt uttrykt. Proteinfraksjoner 5-13 blir slått sammen og trombinkuttet over natten.



Figur G3.5: 12 % SDS-PAGE gel for Oxr1-D7 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Båndet merket med pil på gelen representerer Oxr1-D7 proteinet som er rundt 15 kDa og befinner seg i fraksjoner 5-13.

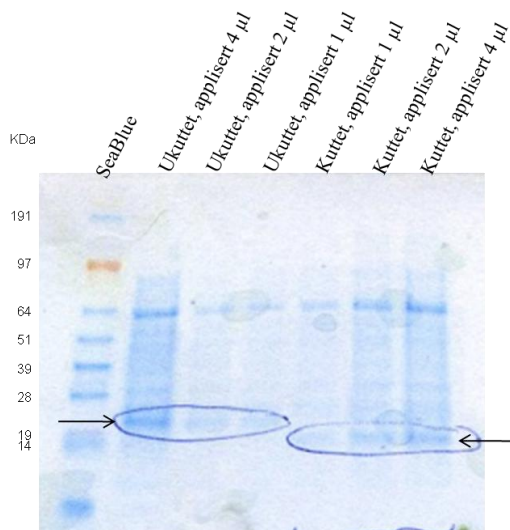
#### 3.1.1.2.2 Oxr1-D7 (His<sub>6</sub>)-tag kutting med proteaseenzymet trombin

Trombin ukuttet og kuttet Oxr1-D6 (2.1.3.3) blir analysert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel.

Figur G3.6 viser at det trombinkuttede proteinet har vandret noe lengre i gelen enn det ukuttede; med andre ord var trombinkuttingen vellykket. Men siden uttrykket av proteinet var dårlig fra utgangspunktet, ble det ikke rensed videre ved flere metoder.

Det ble forsøkt å uttrykke Oxr-D7 på nytt igjen med samme metoden som ble benyttet ved første rensing, uten å gi noe særlig bedre resultater.

Oxr1-D7 som er trunkert med 146 aminosyrer (73 aminosyrer fra den C-terminale enden og 73 aminosyrer fra den N-terminale enden, figur 1.4, side 28) har gjort proteinet ustabil og vanskelig å uttrykke. Vi tror at denne trunkerte versjonen som har mistet deler av sin tredimensjonale struktur kan ha endret sine fysiske egenskaper. Dette kan igjen ha ført til at proteinet har endret løselighetsegenskapen sin, slik at den har havnet i pelleten etter sentrifugering av sonikeringsløsningen (2.1.3.1.2). I dette tilfellet er det mulig å utarbeide en ny renseprotokoll hvor proteinet kan isoleres fra pelleten. En slik mulighet ble diskutert men ikke utført.



Figur G3.6:12 % SDS-PAGE gel for trombin ukuttet og kuttet Oxr1-D7.

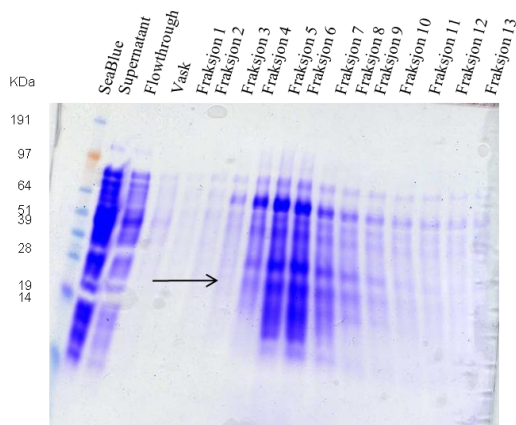
### **3.1.1.3 Rensing av Oxr1-D8**

#### **3.1.1.3.1 Isolering og rensing av Oxr1-D8 med Ni-NTA agarosekolonne**

De ubundne proteinene blir vasket bort med sonikeringsbuffer og proteinet blir eluert fra Ni-NTA agarosekolonnen med 300 mM imidazol (2.1.3.1). Utvalgte fraksjoner analyseres på Clear PAGE<sup>TM</sup> SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.7 viser Oxr1-D8 analysert på SDS-PAGE gel. Oxr1-D8 proteinet består av 127 aminosyrer og har en molekylevekt på omtrent 15 kDa. Ingen tydelige bånd ses på gelen i det aktuelle området, men et svakt bånd med ”riktig” størrelse kan skimtes i fraksjon 4-6.

Igjen ble forsøkt å uttrykke proteinet på nytt, men dette gav heller ikke noe bedre resultater.



Figur G3.7: 12 % SDS-PAGE gel for Oxr1-D8 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Båndet merket med pil på gelen muligens representerer Oxr1-D8 proteinet som er rundt 15 kDa og befinner seg i fraksjon 4-6.

Proteinet ble verken His-tag kuttet eller renset videre med andre metoder, grunnet dårlig uttrykt protein.

Vi tror at en mulig årsak til at vi ikke lyktes med å isolere dette proteinet, kan være at denne varianten som er trunkert med 146 aminosyrer fra N-terminalen (figur 1.4, side 28), kan ha mistet en viktig del av strukturen, som har ført til at proteinet har mistet sin naturlige konformasjon. Dermed ser ut til at denne versjonen av proteinet ikke er mulig å isolere.

## 3.2 Deloppgave 2

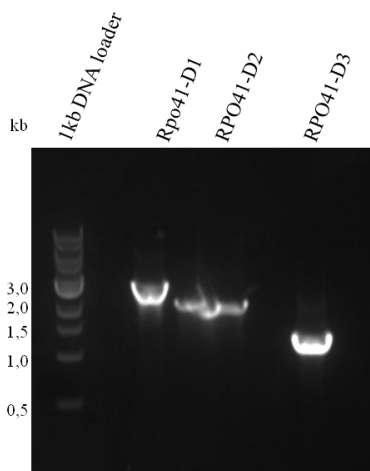
### 3.2.1 Kloning av Rpo41 trunkerte versjoner

#### 3.2.1.1 PCR amplifisering av DNA fragmentene

Sekvensen på den trunkerte RPO41-D1 som består av 3120 bp, blir amplifisert ved PCR (2.2.1.1.1). En liten mengde av PCR produktet analyseres på 1 % agarosegel (2.2.1.1.2), og visualiseres under UV-lys med fremkallingsmaskin (figur 3.8).

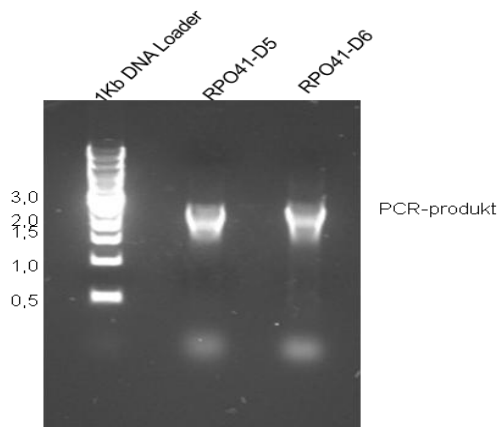
Samme prosedyre som nevnt ovenfor blir utført for RPO41-D2 som består av 2256 bp (figur 3.8), RPO41-D3 som består av 1536 bp (figur 3.8), RPO41-D5 som består av 2634 bp (figur 3.9) og RPO41-D6 som består av 2634 bp (Figur 3.9).

De tre båndene som observeres på gelen i figur 3.8 for Rpo41-D1, -D2 og -D3, og de to båndene på figur 3.9 for Rpo41-D5 og -D6, samsvarer godt med det teoretiske området hvor de fem ulike PCR produktene er forventet å se. Resultatene viser at amplifiseringsreaksjon på alle Rpo41konstruktene var vellykket.



Figur 3.8: PCR produkt analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør (DNA-standard 1kb ladder) applisert i første brønn. Brønn nr. 3 er punktert.



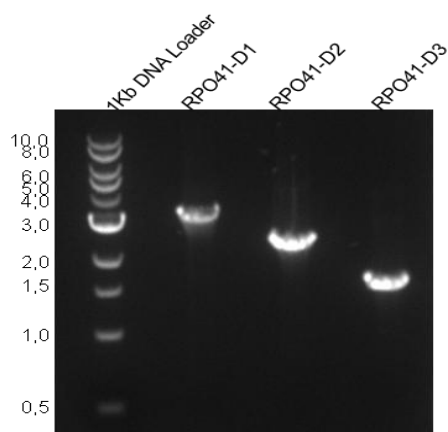


Figur 3.9: PCR produkt analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør (DNA-standard 1kb ladder) applisert i brønn 1. PCR produktet RPO41-D5 vises i brønn 2 og RPO41-D6 vises i brønn 3.

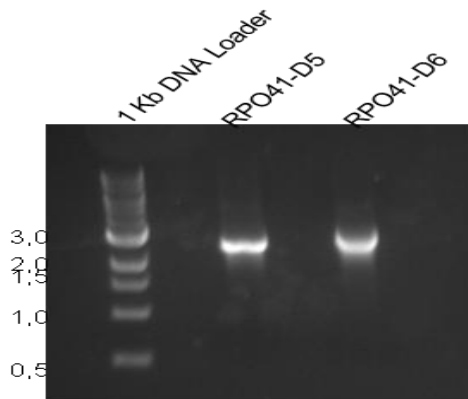
### **3.2.1.2 Isolering og rensing av PCR produktene med GFX kit**

Alle de 5 PCR produktene blir analysert på agarosegel 1 % etter rensing med GFX kit (2.2.1.1.3).

Figur 3.10 og 3.11 viser isolering av alle de fem ulike PCR produktene etter rensingen med GFX-kittet var vellykket.



Figur 3.10: PCR produktene etter rensing med GFX kit analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør (DNA-standard 1kb ladder), applisert i brønn 1. PCR produktene er merket på figuren.

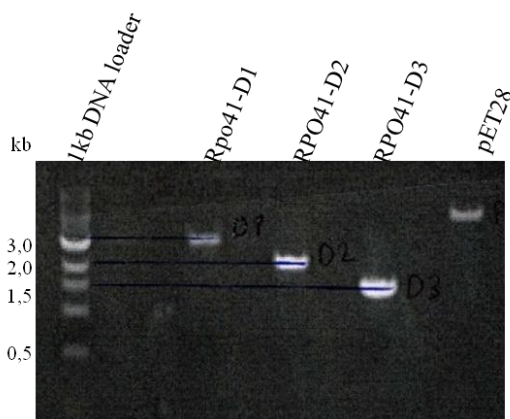


Figur 3.11: PCR produktene etter rensing med GFX kit analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør (DNA-standard 1kb ladder), applisert i brønn 1. PCR produktene er merket på figuren.

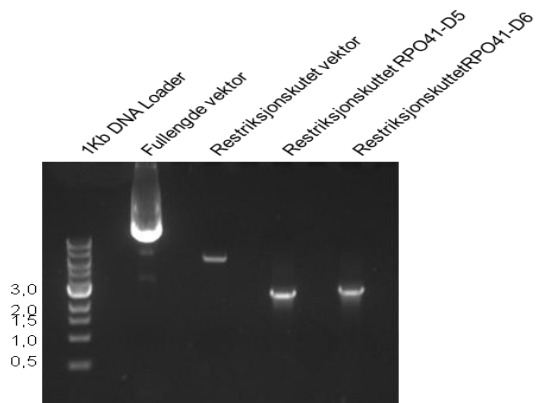
### 3.2.1.3 Restriksjonskutting og ligering

Hvert PCR produkt og vektor blir restriksjonskuttet med restriksjonsenzymene BamHI og NheI (2.2.1.1.4), og renses med GFX kit (2.2.1.1.3). Resultatene blir analysert på 0,8 % agarosegel. DNA fragmentene blir visualisert under UV-lys.

Begge figurene 3.12 og 3.13 viser båndene til de fem ulike PCR produktene og pET28 vektoren etter restriksjonskutting og rensing med GFX kittet. Også i dette tilfelle var restriksjonskuttingen vellykket, og arbeidet med ligering kunne startes.

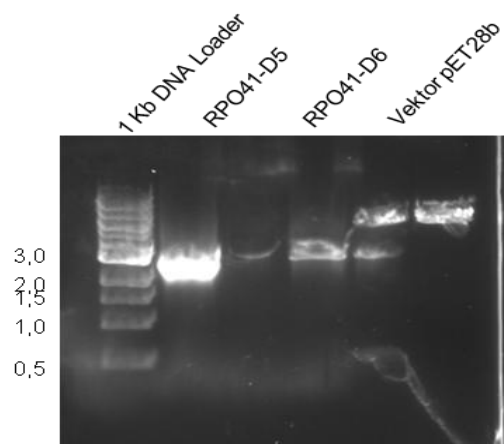


Figur 3.12: Restriksjonskuttet PCR produkt analysert på 0,8 % agarosegel. Molekylvektsmarkør applisert i brønn nr. 1. Restriksjonskuttet Rpo41-D1, -D2 og -D3 og vektoren pET28b vises som merket på figuren.



Figur 3.13: Restriksjonskuttet PCR produkt analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør applisert i brønn 1. Ikke restriksjonskuttet pET28b applisert i brønn 2. Restriksjonskuttet Rpo41-D5 og -D6 og vektoren pET28b vises som merket på figuren.

PCR produktene (RPO41-D1, -D2 og -D3) blir satt inn i vektoren ved ligering (2.2.1.1.5.1), deretter innkuberes i 1 time ved romtemperatur. Figur 3.14 viser RPO41-D5 og RPO41-D6 kjørt på 0,8 % LMP agarosegelelektroforese før ligering ved metode 2 (2.2.1.1.5.2).



Figur 3.14: Restriksjonskuttet og GFX rensset Rpo41- D5 og -D6 og vektor pET28b applisert på 0,8 % LMP agarosegel før ligering. Molekylvektsmarkør applisert i brønn 1.

Ferdig ligert PCR-produktene blir transformert i *E. coli* ER2566 celler ved elektroporering, cellene dyrkes på LB-plater (2.2.1.1.6). Dagen etter 1 koloni plukkes, og ONC tilberedes for hvert konstrukt. Neste dag sentrifugeres inokulatet, og pelletene renses med MiniprepKit (2.2.1.1.7).

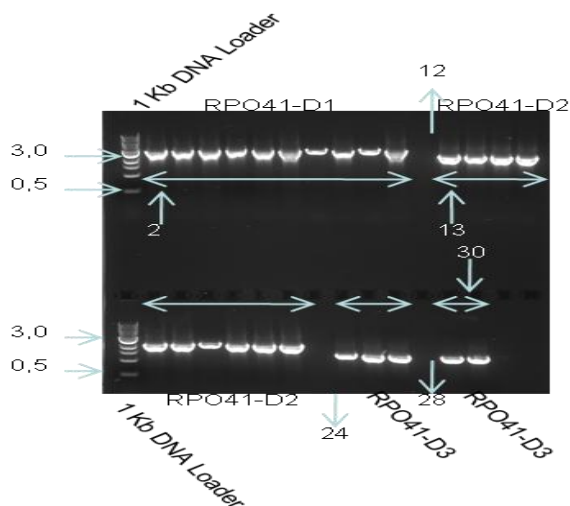
### 3.2.1.4 Påvisning av PCR produkt i plasmid

#### For RPO41-D1, -D2 og -D3

Plasmidene med de aktuelle DNA fragmentet (RPO41-D1, -D2 og -D3) ble isolert fra ER2566 cellene ved å bruke E.Z.N.A<sup>TM</sup> plasmid Miniprep Kit (2.2.1.1.7). Deretter ble det utført koloni PCR reaksjon med de tre ulike miniprep-produktene (Rpo41-D1, -D2 og -D3), (2.2.1.1.8.1). Resultatene fra PCR reaksjonen ble applisert og analysert på 1 % agarosegel (2.2.1.1.2).

Figur 3.15 viser at de tre PCR produktene (Rpo41-D1, -D2 og -D3) ble påvist i plasmidet og dermed var liggeringene vellykket. Alle de analyserte plasmidene hadde fått satt inn et insert i seg.

En prøve for hvert konstrukt ble valgt ut for sekvensering. Disse prøvene tilsvarer prøven som var applisert i brønn nr 2 for RPO41-D1, brønn nr 13 for RPO41-D2 og brønn nr 30 for RPO41-D3. Etter sekvensering ble de rekombinante plasmidene transformert inn i BL21 celler.



Figur 3.15: Koloni PCR reaksjon med miniprep-produktene analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør applisert i brønn 1 og 17. Rpo41-D1, -D2 og -D3 insertene vises som merket på figuren. Ingen produkt ble applisert i brønn nr. 12, 24 og 28.

### For RPO41-D5 og -D6

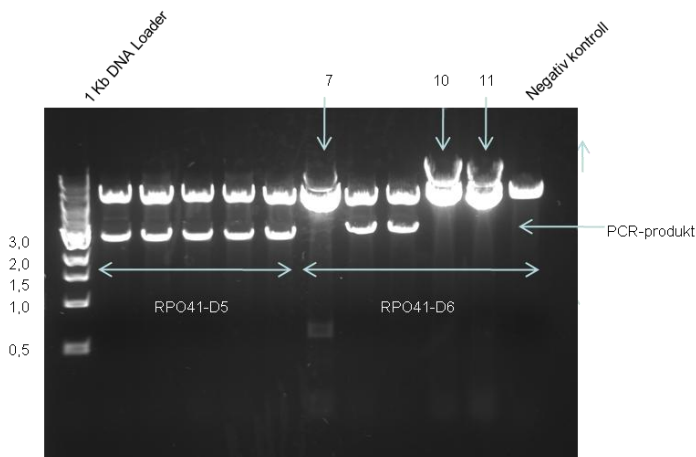
Plasmidene med det aktuelle DNA fragmentet (RPO41-D5 og -D6) blir isolert ved å bruke E.Z.N.A<sup>TM</sup> plasmid Miniprep Kit (2.2.1.1.7), deretter blir de restriksjonskuttet med restriksjonsenzymene BamHI og NheI (2.2.1.1.8.2), og analysert på 1 % agarosegel (2.2.1.1.2).

Fra figur 3.16 kan observeres at ligeringen var vellykket i form av to bånd, hvor det øverste båndet representerer vektoren pET28, og det nederste båndet representerer DNA-fragmentene.

Figur 3.16 viser at alle plasmidene med Rpo41-D5 insertet er positive.

Samme figuren viser to av fem plasmidene med insertet Rpo41-D6 er positive. Brønn nr 7, 10 og 11 er negative.

Ved hjelp av denne figuren, plasmidene som tilsvarer prøver fra RPO41-D5 og -D6 applisert henholdsvis i brønn nr 5 og 8 ble valgt, en sekvenseringsløsning blir tilberedt og sendt for sekvensering. Etter sekvensering blir plasmidene med insertet transformert inn i BL21 celler.



Figur 3.16: Isolert plasmid restriksjonskuttet med restriksjonsenzymmer og analysert på 1 % agarosegel. Molekylvektsmarkør applisert i brønn 1. Restriksjonskuttet vektor med Rpo41-D5 vises i brønn 2-6, vektor med RPO41-D6 vises i brønn 7-11. Bare PCR produkt (negativ kontroll) applisert i brønn 12.

### **3.2.1.5 Sekvensering av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6**

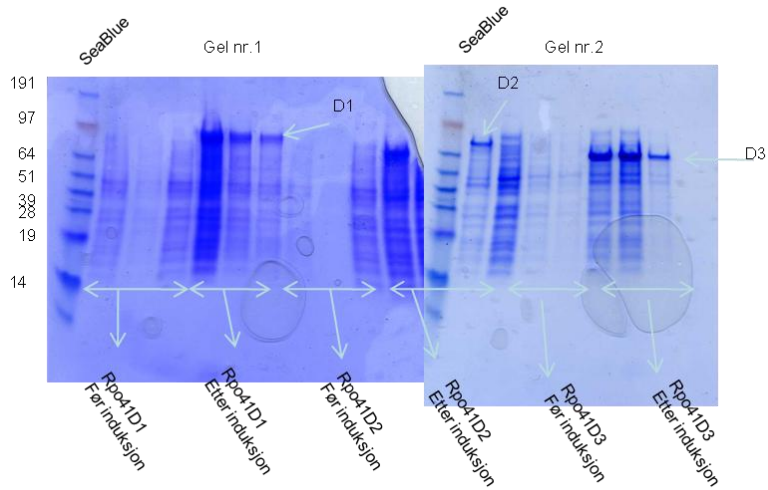
For å utelukke at det har forekommet mutasjoner, blir Rpo41 konstruktene sendt til sekvensering (2.2.1.1.9). Etter sekvensering må hver sekvens sammenlignes med villtypesekvensen til Rpo41. Dette ble ikke gjort på grunn av begrenset tid.

### **3.2.1.6 Transformering av plasmidene i BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL celler**

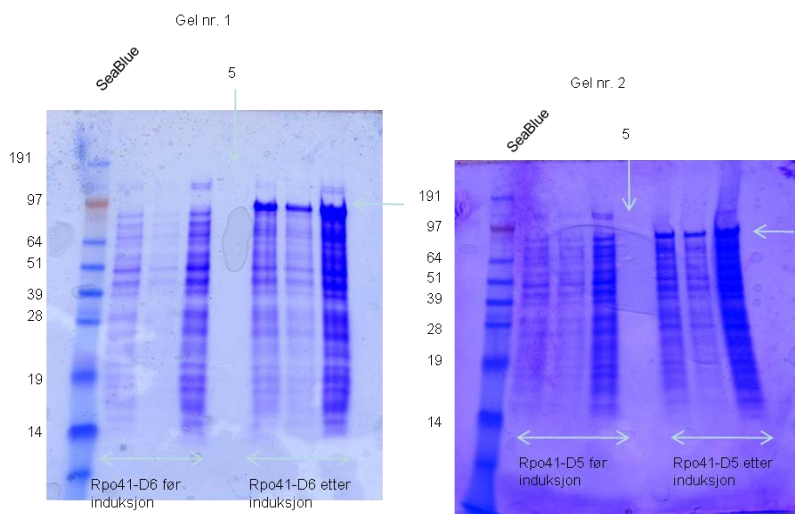
De utvalgte plasmidene med påvist trunkert RPO41 fra figur 3.15 og 3.16 fra punkt 3.2.1.4 blir transformert i BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL celler (2.2.1.1.10) for å få uttrykt proteinene.

## **3.2.2 Ekspresjonstest av Rpo41 konstruktene**

Rpo41 konstruktene blir indusert i liten skala (2.2.4) og SDS-PAGE gelelektroforese blir utført. De sterke båndene på figur G3.17 og G3.18 viser indusert protein av interesse, størrelsen på båndet samsvarer med størrelsen til Rpo41-D1 (~ 118kDa), -D2 (~ 85kDa), -D3 (~ 58 kDa), -D5 (~ 100 kDa) og -D6 (~ 110 kDa). Med andre ord induksjon av cellene var vellykket og proteinet kan produseres i stor skala.



Figur G3.17: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D1, -D2 og -D3 fraksjoner fra ekspresjonstest. Molekylvektsmarkør (SeaBlue® Plus 2) applisert i brønn 1 på begge gelene.



Figur G3.18: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D5 og -D6 fraksjoner fra ekspresjonstest. Molekylvektsmarkør (SeaBlue® Plus 2) applisert i brønn 1 på begge gelene. De sterke båndene på gelene (etter induksjon, merket med piler) viser proteinet av interesse. Brønn merket nr. 5 ikke noe produkt ble applisert på begge gelene.

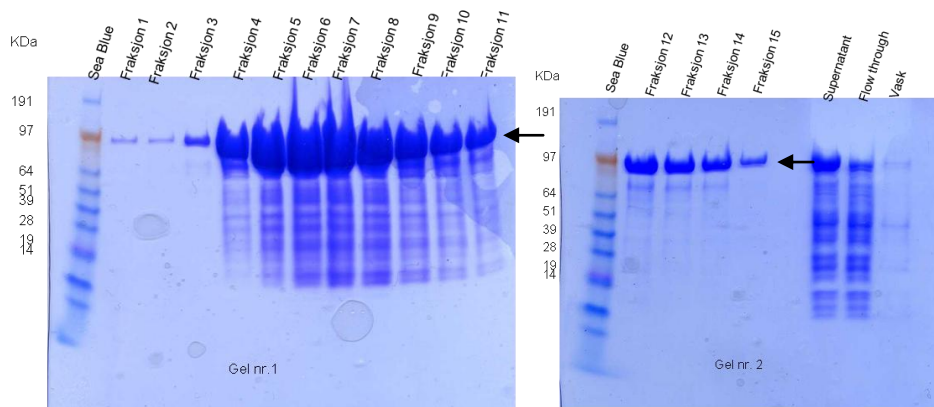
### 3.2.3 Ekspresjon og rensing av Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6 i stor skala

Det benyttes samme metode for ekspresjon og rensing av Rpo41 trunkeringene, som nevnt tidligere i punkt 2.1.3.

#### 3.2.3.1 Isolering og rensing av Rpo41-D1 proteinet med Ni-NTA agarosekolonne

De ubundende proteinene blir vasket bort med sonikeringsbuffer, og proteinet blir eluert med 300 mM imidazol (2.1.3.1). Utvalgte fraksjoner analyseres på Clear PAGE™ SDS 12 % gel og (2.1.3.2).

Figur G3.19 viser Rpo41-D1 analysert på SDS-PAGE gel. De sterke båndene merket med pil på begge gelene representerer Rpo41-D1 proteinet som består av 1039 aminosyrer og har en molekylvekt på omtrent 118 kDa. Dette samsvarer med båndet på gelen. Figuren viser sterk ekspresjon av Rpo41-D1. Protein fraksjoner fra 2-15 blir slått sammen og settes til His-tag kutting.



Figur G3.19: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D1 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Båndet merket med pil representerer Rpo41-D1 proteinet som er rundt 118 kDa og befinner seg i fraksjoner 2-15.

#### 3.2.3.1.1 *Rpo41-D1 (His<sub>6</sub>)-tag kutting med proteaseenzymet trombin*

Rpo41-D1 ble satt opp til His-tag kutting (2.1.3.3). Ukuttet og kuttet proteinet blir analysert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2)



---

Figur G3.20 viser forekomst av flere nye bånd (merket med piler på figuren), enn det forventede Rpo41-D1 båndet på det trombin kuttete protein fraksjonen. Det ble undersøkt om proteinet inneholder et internt trombinkuttsete, men resultatet var negativt. Derfor antas at de nye båndene må være degraderingsprodukter av Rpo41-D1.

Samme forsøk ble utført for Rpo41-D2 og -D3. Resultatene fra SDS gel (figurene vises ikke) viste flere bånd på gelen, noe som tyder på at proteinet er degradert.

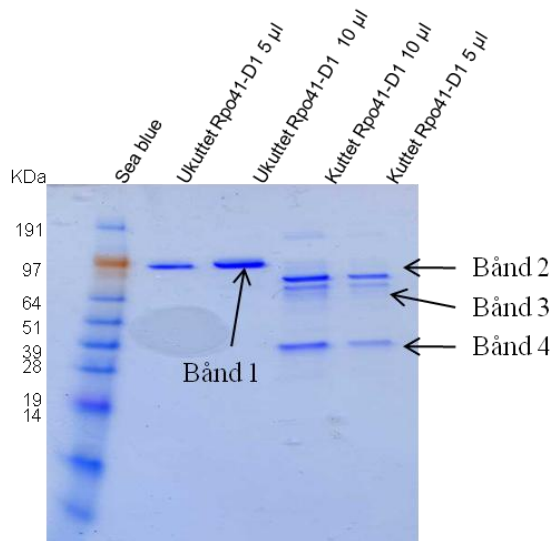
De observerte fire båndene på figur G3.20 som tilsvarer et bånd på ~ 100 kDa (bånd 1), et på ~ 85 kDa (bånd 2), et på ~ 64 kDa (bånd 3) og et på ~ 30 kDa (bånd 4), blir sendt til massespektrometri (MS) for identifikasjon.

Resultatene fra MS (bilag H) viser båndet merket 1 er RNA polymerasen fra gjæren *S. cerevisiae* (scRpo41-D1), mens de andre tre båndene stammer fra Rpo41 og de er identifisert som ulike trunkeringer av samme proteinet.

Vi konkluderer med at Rpo41-D1, -D2, -D3 konstruktene er ustabile og lett degraderes.

Ut i fra disse resultatene det ble bestemt at de ulike trunkeringene av Rpo41 verken trombinkuttes eller renses videre ved flere metoder.

Det ble utført et nytt ekspressjon av Rpo41-D1, renses med Ni-NTA agarosegel, dialysert i 1 time mot lavsaltbuffer (2.1.3.4), fordelt i flere porsjoner og frosset ned til -20 °C.

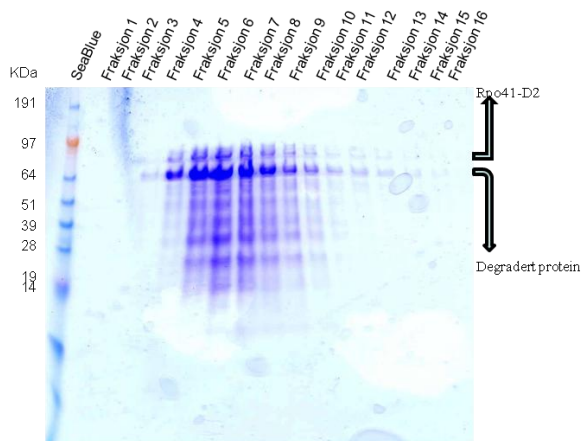


Figur G3.20: 12 % SDS-PAGE gel for ukuttet og trombinkuttet Rpo41-D1. Molekylvektsmarkør (SeaBlue® Plus 2) applisert i brønn 1. Båndene merket med 2,3 og 4 viser degraderings produkter fra Rpo41-D1.

### **3.2.3.2 Isolering og rensing av Rpo41-D2 proteinet med Ni-NTA agarosekolonne**

Rpo41-D2 blir rensert med Ni-NTA kolonne(2.1.3.1) og utvalgte fraksjoner blir analysert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.21 viser Rpo41-D2 analysert på SDS-PAGE gel. Rpo41-D2 proteinet består av 752 aminosyrer og har en molekyl vekt på 85 kDa. Første båndet på gelen samsvarer Rpo41-D2s molekylvekt og viser svakt proteinekspresjon. Båndet under som er på ~ 64 kDa viser degradert produkt av Rpo41-D2. Proteinfraksjon fra 4-8 blir slått sammen, dialysert i 1 time (2.1.3.4) mot lavsaltbuffer, oppkonsentrert (2.1.3.6), fordelt i flere porsjoner og frosset ned ved – 20 °C for bruk i videre arbeid i transkripsjonsassay.

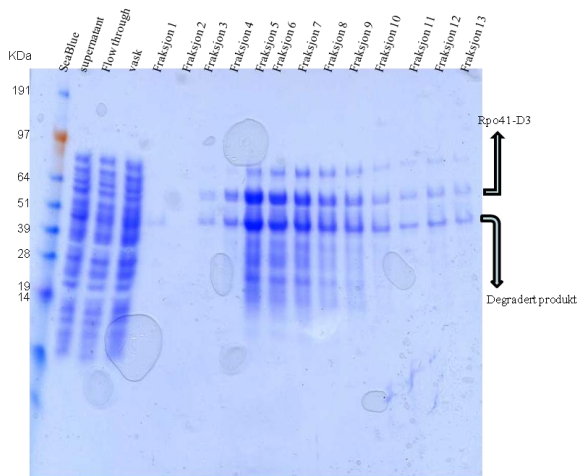


Figur G3.21: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D2 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarosekolonne. Båndet merket med pil på gelen representerer Rpo41-D2 proteinet som er rundt 85 kDa og befinner seg i fraksjoner fra 4- 8.

### **3.2.3.3 Isolering og rensing av Rpo41-D3 proteinet med Ni-NTA agarosekolonne**

Rpo41-D3 blir rensert med Ni-NTA kolonne etter ekspresjonen (2.1.3.1) og utvalgte fraksjoner blir analysert på Clear PAGE<sup>TM</sup> SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.22 viser Rpo41-D3 analysert på SDS-PAGE gel. Rpo41-D3 proteinet består av 511 aminosyrer og har en molekyl vekt på omtrent 58 kDa. Gelfiguret viser et bånd som samsvarer riktig molekylvekt, det antas at dette er Rpo41-D3, men som figuren viser, har ekspresjonen vært veldig svak. På samme figuren observeres et nytt bånd som er ~ 45 kDa og antas at det er degradert produkt av Rpo41-D3. Fraksjoner fra fraksjon 3-13 blir slått sammen til 1 fraksjon, dialysert i 1 time (2.1.3.4) mot lavsaltbuffer, oppkonsentrert (2.1.3.6), fordelt i flere porsjoner og frosset ned ved – 20 °C for bruk i videre arbeid i transkripsjonsassay.



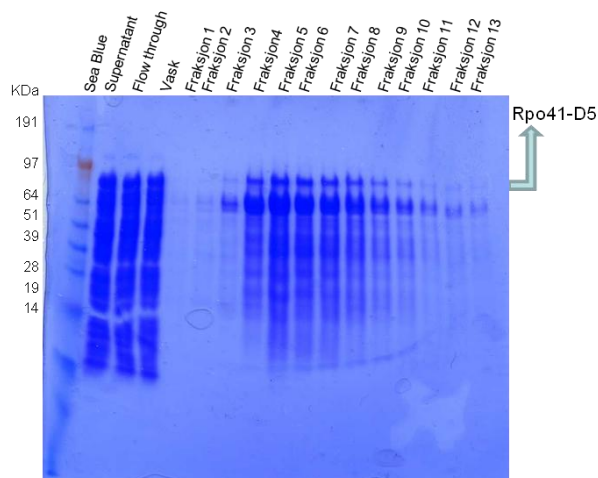
Figur G3.22: 12 % SDS- PAGE gel for Rpo41-D3 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Molekylvektsmarkør (SeaBlue® Plus 2) applisert i brønn 1. Båndet merket med pil på gelen representerer Rpo41-D3 proteinet som er rundt 58 kDa og befinner i fraksjoner fra 3-13.

### **3.2.3.4 Isolering og rensing av Rpo41-D5 proteinet med Ni-NTA agarosekolonne**

Rpo41-D5 blir renset med Ni-NTA kolonne (2.1.3.1) og utvalgte fraksjoner blir analysert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.23 viser Rpo41-D5 analysert på SDS-PAGE gel. Rpo41-D5 proteinet består av 878 aminosyrer og har en molekyl vekt på omtrent 100 kDa. Dette samsvarer med båndet på gelen. Figuren viser svak ekspresjon av Rpo41-D5. På samme figuren ses et nytt og sterkt bånd rett under båndet til Rpo41-D5. Det ”nye” båndet er ~ 64 kDa og er et degraderingsprodukt av Rpo41-D5. Siden Rpo41-D5 konstruktet viser seg å være ustabil, blir det ikke renset videre med resourceQ og superdex 75 kolonnene.

Proteinfraksjoner fra 3-10 blir slått sammen til 1 fraksjon, dialysert i 1 time mot lavsaltbuffer (2.1.3.4) og oppkonsentrert. For å unngå utfelling, blir det oppkonsentrerte proteinet blandet med 60 % glycerolløsning til en sluttkonsentrasjon på 10 % glycerol. Dette blir deretter fordelt i flere porsjoner og frosset ned ved -20 °C.

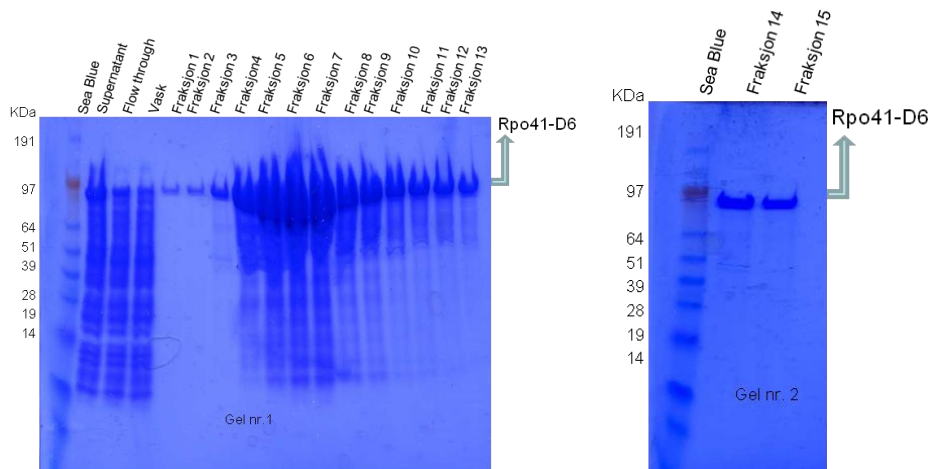


Figur G.3.23: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D5 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Båndet merket med pil på gelen representerer Rpo41-D5 proteinet som er rundt 100 kDa og befinner seg i fraksjon fra 3-10.

### **3.2.3.5 Isolering og rensing av Rpo41-D6 proteinet med Ni-NTA agarosekolonne**

Rpo41-D6 blir rensert med Ni-NTA kolonne (2.1.3.1) og utvalgte fraksjoner blir analysert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Figur G3.24 viser Rpo41-D6 fraksjoner analysert på SDS-PAGE gel. Rpo41-D6 proteinet består av 966 aminosyrer og har en molekyl vekt på omtrent 110 kDa. Dette samsvarer med båndet på gelen. Figuren viser sterk ekspresjon av Rpo41-D6, noe som vil si at ekspresjon av Rpo41-D6 har vært vellykket. Fraksjon 2-15 blir slått sammen til 1 fraksjon og settes direkte opp til dialyse i 1 time mot lavsaltbuffer (2.1.3.4), før proteinet renses videre med resource Q kolonne.



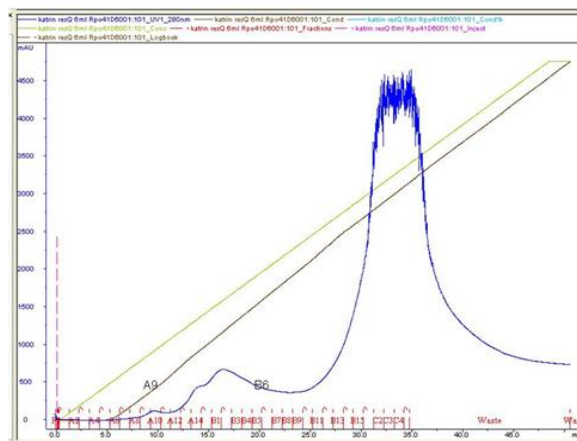
Figur G3.24: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D6 fraksjoner eluert fra Ni-NTA agarose kolonne. Båndet merket med pil på gelen representerer Rpo41-D6 proteinet som er rundt 100 kDa og befinner seg i fraksjoner fra 2-15.

### 3.2.3.5.1 *Rpo41-D6* rensing med resource *Q* kolonne

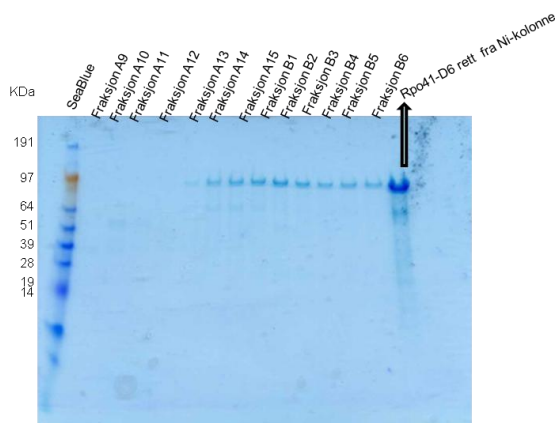
Rpo41-D6 renses med resource Q kolonne med gradienteluering (2.1.3.5) og utifra kromatogrammet (figur K3.25) blir det valgt ut fraksjoner (A9-B6) som blir applisert på Clear PAGE™ SDS 12 % gel (2.1.3.2).

Som man ser av SDS gel bildet (figur G3.26) observeres et svakt bånd som antas å tilsvare båndet til Rpo41-D6. Fraksjon A14-B6 (figur G3.26) blir slått sammen, oppkonsentrert, blandet med 60 % glycerolløsning til en sluttkonsentrasjon på 10% glycerol, fordelt i flere porsjoner og frosset ned ved -20 °C.

Figur G3.26 viser at rens prosessen med resource Q kolonne. På figuren observeres ikke noen andre bånd enn Rpo41-D6 båndet, men båndintensiteten er svak.



Figur K3.25: Kromatogram fra renging av Rpo41-D6 med resource Q kolonne. Fraksjoner A9-B6 analyseres videre op SDS-PAGE gel..



Figur G3.26: 12 % SDS-PAGE gel for Rpo41-D6 fraksjoner eluert fra resource Q kolonne. Fraksjon A9- B6 applisert på gelen. Fraksjon A14-B6 blir slått sammen og frosset ned.

### 3.2.4 Resultater for Westernanalyse

Denne metoden blir brukt for å identifisere Rpo41 protein konstruktene som en del av kvalitetssikringsarbeidet (2.2.6). Etter gelelektroforese (SDS-PAGE) overføres de separerte proteinene til en membran. Etter overføring til membranen ble proteinene merket med antistoff spesifikt for His-tag, og deretter detektert vha sekundærtantistoff et enzymkompleks og et substrat som gir kjemiluminescens..

Figur 3.27 viser resultatene fra westernblotting for Rpo41-D1, -D2, -D3, -D5 og -D6.

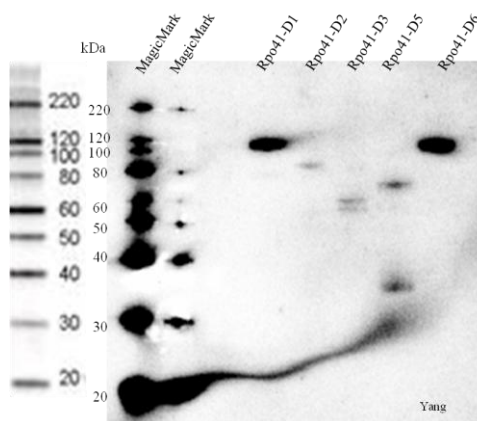
Figuren som blir vist i denne oppgaven er tatt i fra et forsøk som var utført av Mingyi Yang (post.doc. ved Rikshospitalet).

Hvert Bånd på figuren samsvarer med molekylvekten til hvert konstrukt, med unntak av Rpo41-D5 som viser en langt lavere molekylvekt enn den teoretiske.

Vi får svært svake signaler fra Rpo41-D2 og -D3. Dette samsvarer godt med resultatene fra proteinkspresjon og rensing. Vi har vist at vi kan isolere disse to proteinene men at begge proteinene er ustabile og har tendens til å bli degradert (3.2.3.2 og 3.2.3.3).

Vi får sterke signaler for Rpo41-D1 og -D6. Dette igjen samsvarer godt med resultatene fra proteinkspresjon og rensing, hvor det ble vist at begge proteinene hadde god ekspresjon og så ut til å være stabile (3.2.3.1 og 3.2.3.5).

Signalet fra forsøket med Rpo41-D5 er svakt og har molekylvekt som er langt lavere enn den teoretiske molekylvekten til konstruktet. Dette er også med på å bekrefte erfaringene fra ekspresjonen og rensingen av dette proteinet. Det meste av Rpo41-D5 har vært degradert allerede rett etter Ni-NTA rensingen, og det er sannsynlig at proteinet allerede var fullstendig degradert på det tidspunktet westernanalyse ble utført (3.2.3.4).



Figur 3.27: Resultater fra westernanalyse for Rpo41-D1 (~118 kDa), -D2 (~85 kDa), -D3 (~58 kDa), -D5 (~100 kDa) og -D6 (~110kDa).



### 3.3 Del oppgave 3

#### 3.3.1 *In vitro* transkripsjons assay:

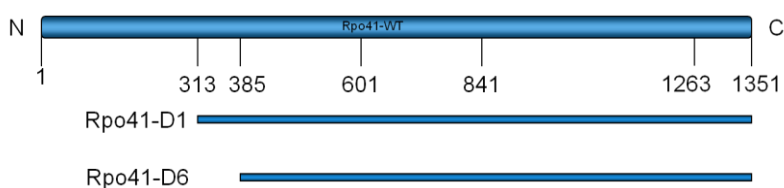
Ferdig laget ”Master Mixture” reaksjonsløsningen (2.3.1.2) appliseres på en 20 % Long Ranger/ 8 M ureagel. Gelen vakumtørkes og overføres til screenplate (Storage Phosphor Screen). Gelen legges til eksponering i 1-3 døgn. Etter endt eksponering blir screenplaten skannet på et fosfat imager (Typhoon 9410 Variable Mode Imager). ImageQuant TL Versjon 2003.02 ble brukt til å analysere resultatene.

Det blir forsøkt å undersøke to problemstillinger (2.3.1):

- Analysere transkripsjonsaktiviteten til de ulike trunkeringene av RNA polymerasen Rpo41.
- Undersøke hvorvidt Oxr1 proteinet er i stand til å blokkere transkripsjonsaktiviteten til ulike trunkeringene av Rpo41.

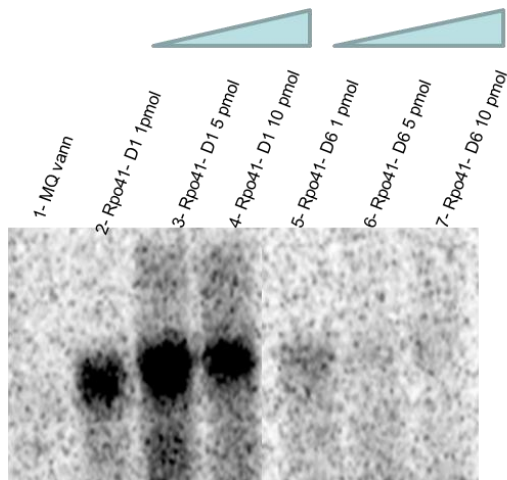
#### 1. Undersøke transkripsjonsaktiviteten av de ulike trunkeringene av Rpo41:

Figur 3.29 viser forsøk utført for å undersøke transkripsjonsaktiviteten til Rpo41-D1 og -D6. Disse to konstruktene ble applisert på ureagelen i 3 ulike mengder.



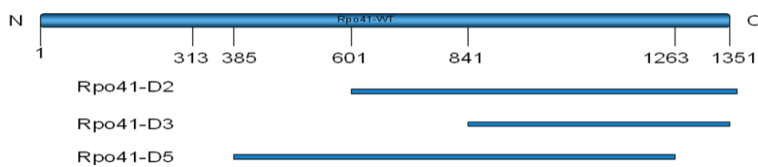
Figur 3.28: Grafisk fremstilling av proteinet Rpo41-WT og de trunkerte versjonene av -D1 og -D6.

Resultatene fra dette forsøket (figur 3.29) viser at begge proteinene Rpo41-D1 og -D6 fortsatt er aktive, men mens Rpo41-D1 har sterk aktivitet, så har Rpo41-D6 mistet det meste av transkripsjonsaktiviteten. Dette tyder på at aminosyrene som ligger mellom aminosyre 313 og 385 ved N-terminale enden til proteinet er viktig for enzymaktiviteten til Rpo41.



Figur 3.29: Rpo41-D1 og -D6 i ulike konsentrasjoner analysert på 20 % LR/8 M ureagel. MQ vann applisert i brønn 1 som negativ kontroll på transkripsjonen.

Det ble også utført forsøk for å bekrefte eller avkrefte transkripsjonsaktiviteten til trunkeringene Rpo41-D2, -D3 og -D5 av Rpo41 proteinet. Resultatene viste ingen aktivitet for disse proteinene. Disse resultatene var ikke uventet, siden proteinene har vist seg å være veldig ustabile, muligens fordi viktige deler av proteinet er trunkert bort, noe som har ført til raskt degradering av at disse proteinene. Figur 3.30 viser Rpo41-D2, -D3 og -D5 trunkeringene grafisk.

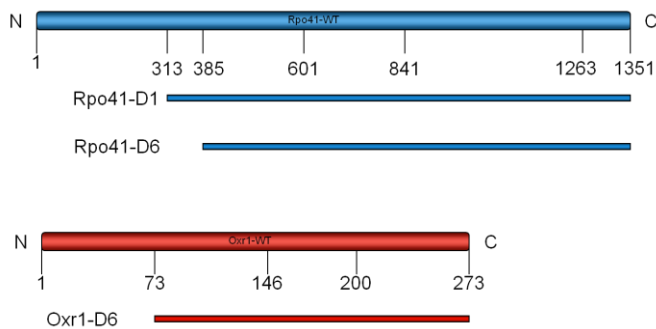


Figur 3.30: Grafisk fremstilling av Rpo41-D2, -D3 og -D5.

## 2. Undersøke blokkering av de ulike trunkeringene av Rpo41 når Oxr1 tilsettes:

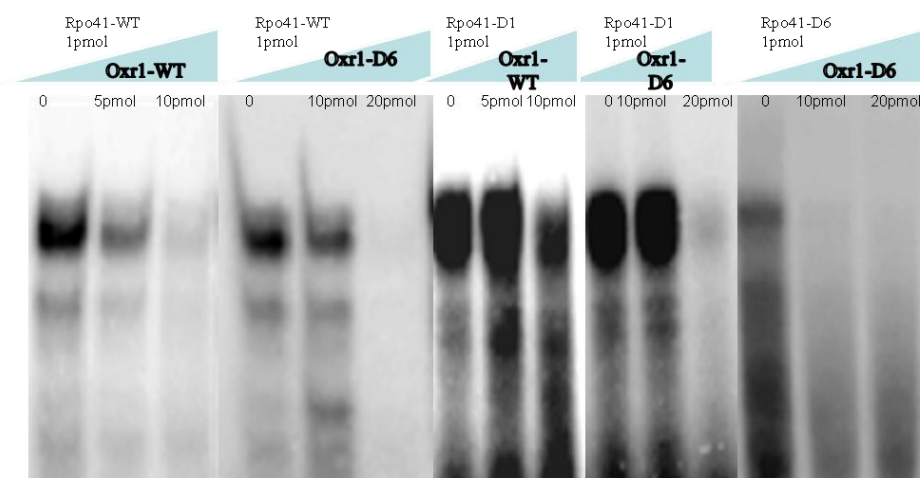
Det ble utført forsøk for å undersøke hvorvidt Oxr1 er i stand til å blokkere transkripsjonsaktiviteten til Rpo41-D1 og -D6. Tidligere forsøk utført av post.doc. Mingyi Yang tyder på at transkripsjonsaktiviteten hindres (blokkeres) når Oxr1-WT tilsettes til reaksjonsløsning med Rpo41-WT. En mulig forklaring på denne blokkeringen av transkripsjonsaktiviteten er at Oxr1 intragerer med Rpo41 og derved hindrer transkripsjon

(upublisert data). Figur 3.31 viser de ulike trunkeringene av Rpo41 og Oxr1 som ble brukt for å undersøke blokkering av transkripsjonsaktiviteten til Rpo41.



Figur 3.31 Grafisk fremstilling av proteinene Rpo41-WT, -D1 og -D6 og Oxr1-WT og -D6.

Figur 3.32 viser resultater av transkripsjonsassayet. Rpo41-WT og Oxr1-WT ble brukt som positiv kontroll på transkripsjons blokkering. Dette blir sammenlignet med resultater fra transkripsjonsblokkering av hhv. Rpo41-D1 og Rpo41-D6 med Oxr1-WT og OXR1-D6.



Figur 3.32: Transkripsjonsassay analysert på 20 % LR/8 M ureagel. Resultatene viser Rpo41-WT, -D1 og -D6 tilsatt Oxr1-WT og -D6 i økende konsentrasjoner.

Resultatene fra dette forsøket (figur 3.32) viser at transkripsjonsaktiviteten til både Rpo41-D1 og -D6, blokkeres av både Oxr1-WT og -D6.

## 4 Konklusjon

### 4.1 Oxr1 konstruktene

Resultatene fra rensarbeidet med de 3 ulike Oxr1 konstruktene viser at Oxr1-D6 konstruktet som er forkortet med 73 aminosyrer, er det mest stabile konstruktet og er lett å uttrykke, isolere og rense. På SDS gel figuren etter rensing på Ni-NTA kolonne (figur G3.1, side 81) ser vi sterk ekspresjon av proteinet. Fra resultatene til de forskjellige rensetrinnene konkluderte vi at fraksjonene fra de siste 7-8 fraksjonene er veldig rene, og ytterligere rensing av disse fraksjonene er ikke nødvendig hvis formålet er å bruke proteinet til RNA transkripsjonsassays.

Etter det siste rensetrinnet med superdex75 kolonnen (figur G3.4, side 84) ser vi av SDS-PAGE gelen, at vi har fått et rent produkt. Dermed kan det konkluderes med at metoden vår for å uttrykke, isolere og rense dette proteinet er vellykket og reproducerbart. Dette konstruktet blir brukt i det videre arbeidet med RNA transkripsjonsassay i deloppgave 3.

Når det gjelder Oxr1-D7 som er trunkert med 146 aminosyrer (73 aminosyrer fra N-terminalen og 73 aminosyrer fra C-terminalen), ser ut som om konstruktet er mulig å uttrykke og rense, men ekspresjonen er veldig svak (figur G3.5, side 85).

SDS gel bildet fra Ni-NTA kolonne (figur G3.7, side 87) for Oxr1-D8 konstruktet som er trunkert med 146 aminosyrer fra N-terminalen, viser ingen klare bånd og vi konkluderer med at det ikke er mulig å uttrykke og isolere denne varianten av proteinet. De 146 aminosyrene fra N-terminale enden virker som de er veldig viktige for at proteinet ikke skal degraderes og for å beholde sin naturlige konformasjon.

Vi valgte å vente med videre arbeid med Oxr1-D7 og -D8 og isteden konsentrere oss om Oxr1-D6 konstruktet.

### 4.2 Kloning av Rpo41

Kloning av alle de 5 ulike RPO41 konstruktene har vært vellykket.

---

### 4.3 Rpo41 konstruktene

Resultatene viser at ekspresjon og Ni-NTA agarose kolonne rensingen for Rpo41-D1 og -D6 proteinene, har vært vellykket (figur G3.19, side 96 og G3.24, side 102). Disse to proteinene ser ut til være mer stabile enn de resterende trunkerte versjonene. Et ekstra rensetrinn viste seg å være lite hensiktsmessig, ettersom fraksjonene fra Ni-NTA rensingen ser ut til å være tilstrekkelig rene for å brukes til formål; å utføre en RNA transkripsjonsassay.

Resultatene fra arbeidet med Rpo41-D2 og -D3 og -D5 trunkeringene viser at proteinene er svakt uttrykt og ustabile (figur G3.21, side 99, G3.22, side 100 og G.3.23, side 101). På samme figurene ser vi at rensingen på Ni-NTA agarose kolonne ikke er tilfredsstillende i og med at en del urenheter fortsatt kan observeres på SDS-PAGE gelene. De eluerte fraksjonene fra Ni-NTA kolonne kan brukes til RNA transkripsjonsassay.

I det videre arbeidet blir hovedfokuset å utføre RNA transkripsjonsassay med Rpo41-D1 og -D6.

### 4.4 Transkripsjonsassay

Av resultatene fra forsøket hvor vi undersøker transkripsjonsaktiviteten til Rpo41-D1 og -D6, kan vi konkludere at de første 313 aminosyrene i N-terminalen til Rpo41-WT ikke ser ut til være nødvendig for RNA polymerasens transkripsjonsaktivitet. Området mellom aminosyrene fra 313 til 385 ser derimot ut til å være veldig viktig for transkripsjonsaktiviteten til Rpo41 proteinet.

Av resultatene fra forsøket hvor vi undersøkte blokkering av transkripsjonsaktiviteten til Rpo41-D1 og -D6 når Oxr1-WT og -D6 tilsettes, indikerer en mulig interaksjon mellom Rpo41 og Oxr1, at blokkering av transkripsjonsaktivitet ikke er lokalisert til området mellom de første 385 aminosyrene i den N-terminale enden til Rpo41 proteinet, og heller ikke i området mellom de første 73 aminosyrene i den N-terminale enden til Oxr1-D6. Dette betyr at en mulig interaksjon mellom Rpo41 og Oxr1 må finne sted på områder nærmere den C-terminale enden til begge proteinene.

Siden de resterende konstruktene Rpo41-D2, D3 og D5 viste seg å være ustabile og uten aktivitet ble det ikke utført blokkeringsforsøk med Oxr1 for disse.

## 5 Fremtidig arbeid

For å forsikre oss om at Rpo41-konstruktene vi har brukt til å uttrykke proteinet ikke inneholder mutasjoner, må alle sekvensene gjennomgås og sammenlignes med fullengde Rpo41. I tillegg skal noen av transkripsjonsassay-forsøkene reproduseres.

Så langt er det bare gjort forsøk med *S.cerevisiae* Rpo41, men vi ønsker i tillegg å undersøke om aktiviteten til *human* Rpo41 også kan blokkeres av hOxr1 i humane celler.

Fordi mitokondriene har et genom som er sentralt i deres flersidige funksjoner, er det nødvendig med en bedre forståelse av ekspresjonsmekanismene til mtDNA, og eventuelt hvilken rolle mutasjoner spiller for ekspresjonsmekanismene til mtDNA ved sykdom og aldringsprosesser, for å utvikle nye behandlingsprinsipper som kan redusere forekomst og dødelighet av sykdommer som Alzheimer, demens og andre nevrologiske sykdommer.

---

## Kildeliste

1. Lindahl, T., *Instability and Decay of the primary structure of DNA* Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-715.
2. Wallace, D.C., *A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine*. Annual Review of Genetics, 2005. **39**: p. 359-407.
3. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-247.
4. Esterbauer, H., P. Eckl, and A. Ortner, *Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors*. Mutation Research, 1990. **238**(3): p. 223-233.
5. Slupphaug, G., B. Kavli, and H.E. Krokan, *The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage*. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2003. **531**(1-2): p. 231-251.
6. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Current Opinion in Cell Biology, 1998. **10**(2): p. 248-253.
7. McCord, J.M., *The evolution of free radicals and oxidative stress*. American Journal of Medicine, 2000. **108**(8): p. 652-659.
8. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-790.
9. Fang, Y.Z., S. Yang, and G.Y. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition, 2002. **18**(10): p. 872-879.
10. Croteau, D.L. and V.A. Bohr, *Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(41): p. 25409-25412.
11. Ames, B.N., *Endogenous DNA damage as related to cancer and aging*. Mutation Research, 1989. **214**(1): p. 41-46.
12. Ames, B.N., *Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer*. Free Radical Research Communications, 1989. **7**(3-6): p. 121-128.
13. Olinski, R., et al., *DNA-base modifications in chromatin of human cancerous tissues*. Febs Letters, 1992. **309**(2): p. 193-198.
14. Parshad, R., et al., *Fluorescent light-induced chromatid breaks distinguish Alzheimer disease cells from normal cells in tissue culture*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(10): p. 5146-5150.
15. Giles, R.E., et al., *Maternal inheritance of human mitochondrial-DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1980. **77**(11): p. 6715-6719.



- 
16. Jacobs, H.T. and D.M. Turnbull, *Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease*. Trends in Genetics, 2005. **21**(6): p. 312-314.
  17. Longley, M.J., et al., *Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma*. Gene, 2005. **354**: p. 125-131.
  18. Schon, E.A., *Mitochondrial genetics and disease*. Trends in Biochemical Sciences, 2000. **25**(11): p. 555-560.
  19. Shadel, G.S., *Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease*. Trends in Genetics, 2004. **20**(10): p. 513-519.
  20. Greenleaf, A.L., J.L. Kelly, and I.R. Lehman, *Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3391-4.
  21. Jang, S.H. and J.A. Jaehning, *The yeast mitochondrial RNA-polymerase specificity factor, MTF1, is similar to bacterial sigma-factors*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(33): p. 22671-22677.
  22. Kelly, J.L. and I.R. Lehman, *Yeast mitochondrial RNA-polymerase - purification and properties of the catalytic subunit*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(22): p. 340-347.
  23. Lisowsky, T. and G. Michaelis, *A nuclear gene essential for mitochondrial replication suppresses a defect of mitochondrial transcription in Saccharomyces-cerevisiae*. Molecular & General Genetics, 1988. **214**(2): p. 218-223.
  24. Biswas, T.K., B. Ticho, and G.S. Getz, *Invitro characterization of the yeast mitochondrial promoter using single-base substitution mutants*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(28): p. 13690-13696.
  25. Cliften, P.F., et al., *Identification of three regions essential for interaction between a sigma-like factor and core RNA polymerase*. Genes & Development, 1997. **11**(21): p. 2897-2909.
  26. Karlok, M.A., S.H. Jang, and J.A. Jaehning, *Mutations in the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, Mtf1, verify an essential role in promoter utilization*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(31): p. 28143-28149.
  27. Mangus, D.A., S.H. Jang, and J.A. Jaehning, *Release of the yeast mitochondrial RNA-polymerase specificity factor from transcription complexes*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(42): p. 26568-26574.
  28. Matsunaga, M. and J.A. Jaehning, *A mutation in the yeast mitochondrial core RNA polymerase, Rpo41, confers defects in both specificity factor interaction and promoter utilization*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(3): p. 2012-2019.

- 
29. Matsunaga, M. and J.A. Jaehning, *Intrinsic promoter recognition by a "core" RNA polymerase*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(43): p. 44239-44242.
  30. Paratkar, S. and S.S. Patel, *Mitochondrial Transcription Factor Mtf1 Traps the Unwound Non-template Strand to Facilitate Open Complex Formation*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(6): p. 3949-3956.
  31. Tang, G.Q., S. Paratkar, and S.S. Patel, *Fluorescence Mapping of the Open Complex of Yeast Mitochondrial RNA Polymerase*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(9): p. 5514-5522.
  32. Masters, B.S., L.L. Stohl, and D.A. Clayton, *Yeast mitochondrial RNA-polymerase is homologous to those encoded by bacteriophage-T3 and bacteriophage-T7*. Cell, 1987. **51**(1): p. 89-99.
  33. Bonner, G., et al., *Mutations in T7 RNA-polymerase that support the proposal for a common polymerase active-site structure*. Embo Journal, 1992. **11**(10): p. 3767-3775.
  34. Ikeda, R.A. and C.C. Richardson, *Enzymatic-properties of a proteolytically RNA-Polymerase of bacteriophage-T7*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(8): p. 3790-3799.
  35. Ikeda, R.A. and C.C. Richardson, *Interactions of a proteolytically nicked RNA-polymerase of bacteriophage-T7 with its promoter*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(8): p. 3800-3808.
  36. Wang, Y.H. and G.S. Shadel, *Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(14): p. 8046-8051.
  37. Elliott, N.A. and M.R. Volkert, *Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(8): p. 3180-3187.
  38. Volkert, M.R., N.A. Elliott, and D.E. Housman, *Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(26): p. 14530-14535.
  39. Sambrook, J. and Russell, D.W., *Molecular Cloning, a laboratory manual*, third edition, volum 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
  40. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., *legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS, 2004: side 149-155 og 239-255.
  41. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of THE CELL*, fourth edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, 2002: side 30-31 og 483-484.

- 
42. Sjøberg, N.O., *Molekylær genetikk, Genteknologi-humant DNA*, fjerde utgave, Vett & Viten AS, 2006: side 11-229.

**Bilagsliste:**

<b>Navn til bilaget</b>	<b>Side</b>
Bilag A: Ferdigtilberedt løsninger benyttet i oppgaven.....	117
Bilag B: Løsninger og medier benyttet i oppgaven.....	121
Bilag C: Størrelsesmarkør benyttet i oppgaven og Mini PROTEAN III figur....	123
Bilag D: Vektor benyttet i oppgaven (pET28 <sup>+</sup> a-c).....	124
Bilag E: DNA og proteinsekvenser	
• E.1 Sekvens for OXR1 og Oxr1.....	125
• E.2: Sekvens for RPO41 og Rpo41.....	125
• E.3: Sekvens for RPO41-D1 og Rpo41-D1.....	126
• E.4: Sekvens for RPO41-D2 og Rpo41-D2.....	127
• E.5: Sekvens for RPO41-D3 og Rpo41-D3.....	127
• E.6: Sekvens for RPO41-D5 og Rpo41-D4.....	128
• E.7: Sekvens for RPO41-D6 og Rpo41-D5.....	129
Bilag F: Primere benyttet i oppgaven til kloning og sekvensering.....	130
Bilag G: Primere benyttet i oppgaven for å lage sekvenseringsløsning.....	131
Bilag H: Rpo41-D1 Massespektroskopieresultater.....	133

**Bilag A: Ferdigtilberedet løsninger benyttet i oppgaven****Tabell A.1: Tilberedning av 0,5 M IPTG, 1 ml dispensereres i eppendorfrør og fryses ved minus 20°C**

Komponent	Mengde
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thio Galactopyranoside (Dioxanfri) > 99% (Apllo Scientific Limited)	9,5 g
MQ vann	ad 80 ml

\*Løsningen sterilfiltreres med filter 0,5 $\mu$ m (millipore)

**Tabell A.2: 1 X MOPS Running buffer (kjørebuffer)**

Komponent	Mengde
20 X MOPS fra Invitrogen®	500 ml
Destillert vann	ad 10 L

**Tabell A.3: Fargeløsning for proteingel (tilberedes 10 liter ad gangen)**

40 % metanol
10 % eddiksyre
0,1 % Coomassie Brilliant Blue

**Tabell A.4: Avfargingsløsning for proteingel (tilberedes 10 liter ad gangen)**

40 % metanol
10 % eddiksyre
4 % glyserol

**Tabell A.5 Tilberedning av kanamycinløsning 100 mg/ml: 1ml dispensereres i eppendorfrør og fryses ved -20 °C**

Komponent	Mengde
Kanamycin sulfat (Sigma-Aldrich)	10 g
MQ vann	ad 100 ml

**Tabell A.6: 1 X TAE løsning**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
50 x TAE (eget lab, bilag B,B.2)	200 ml
Destillert vann	ad 10000 ml

**Tabell A.7: 1 X Transferbuffer**

<b>Komponent</b>	<b>Sluttkonsentrasjon</b>	<b>Mengde</b>
Glycin	15 mg/ml	15 g
1 M Tris pH 8	25 mM	25 ml
Metanol	20 %	200 ml
20 % SDS	0,020 %	1 ml
MQ vann		ad 1000 ml

**Tabell A.8: Fosfatbuffer saltvann med 0,1 % Tween 20 (PBS-T)**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
Fosfatbuffer saltvann (PBS, tabell A.9)	ad 1 L
Tween 20	1 ml

**Tabell A.9: Fosfatbufret saltvann (PBS)**

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
NaCl	137 mM	8,0 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM	0,27 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> X 2 H <sub>2</sub> O	6,5 mM	1,44 g
MQ vann		Ad 1000 ml

\*HCl tilsettes for å justere PH til 7,4. deretter autoklaveres.

**Tabell A.10: Oversikt over anvendte antistoffer**

Antistoff	Leverandør
Primærantistoff: anti-mus Penta-His antistoff	QIAGEN
Sekundærantistoff: Geit anti-mus IgG/IgM HRP	Jackson Immunoresearch

**Tabell A.11: Saltbuffer til vask før fremkalling**

Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
5 M NaCl	0,15 M	30 ml
1 M Trisbuffer pH 7,5	0,1 M	100 ml
MQ vann		ad 1000 ml

**Tabell A.12: Fremkallingsvæske: Substrat blanding, tilberedes i 1:1 forhold**

Komponent	Mengde
Immun-Star <sup>TM</sup> WesternC <sup>TM</sup> Luminol/Enhancer løsning	0,5 ml
Immun-Star <sup>TM</sup> WesternC <sup>TM</sup> Peroxid løsning	0,5 ml

**Tabell A.13: 1 X Taurinbuffer**

<b>Komponent</b>	<b>Mengde</b>
20 X Taurin (bilag B, B.4)	500 ml
Destillert vann	ad 10 L



---

**Bilag B: Løsninger og medier benyttet i oppgaven**

B.1: 10 X Pfu buffer	2 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8 330 µl 3 M KCl 500 µl 20% Triton X-100 1 ml 100M BSA 200 µl MgSO <sub>4</sub> MQ vann til 10 ml
B.2: 50 X TAE buffer	242 g Tris 57,1 ml eddiksyre 100 ml 0,5M Na <sub>2</sub> EDTA MQ vann til 1000 ml
B.3: Tris-HCl buffer (10mM, pH7,5)	1,21 g Tris 1 L MQ vann pH justeres til 7,5 med HCl
B.4: 20 X Taurinbuffer (autoklavert, eget lab)	0,57M Taurin  1,78M Tris 0,01M EDTA
B.5: LB-plater med kanamycin	1000ml LB-medium  15g bacto agar  50 mg kanamycin

## B.6: SOC-medium(autoklavert)

20g Bacto Trypton

5g Bacto gjærekstrakt

0,5g NaCl/2 ml 5M NaCl

10 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

20 ml 20% glucose

MQ vann ad 1000ml

## B.7: LB-medium(autoklavert)

5g Bacto Trypton

2,5g Bacto gjærekstrakt

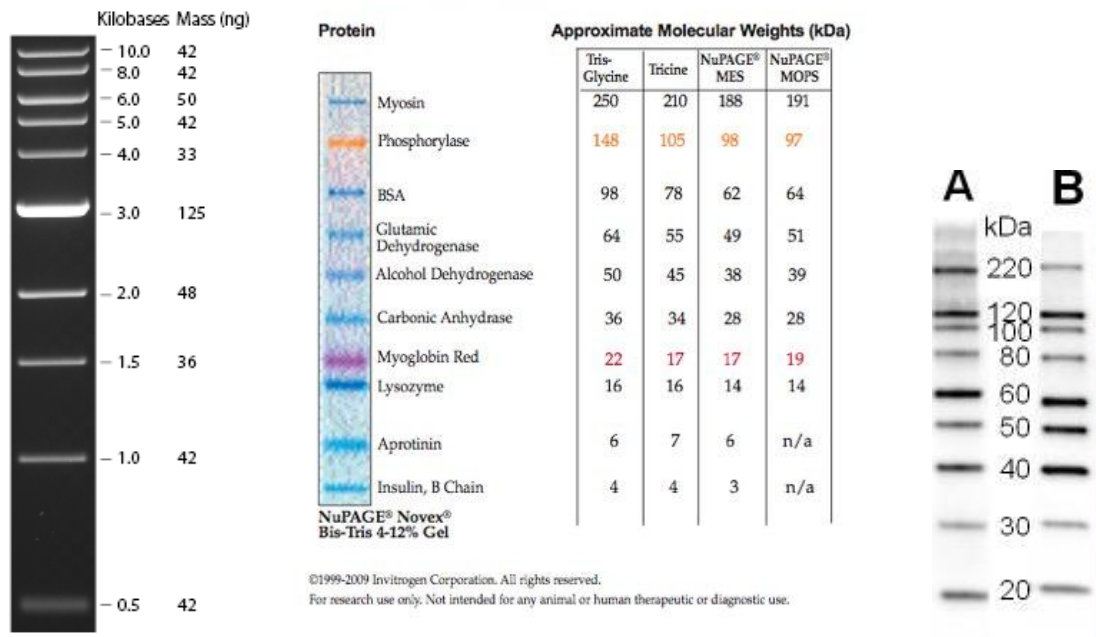
5g NaCl

MQ vann ad 500ml

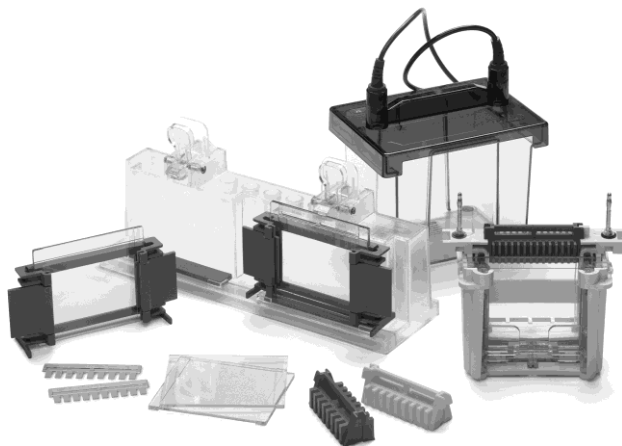
## Bilag C: DNA størrelsesmarkør, 1kbp DNA ladder

### Example

Protein bands have different mobilities depending upon the SDS-PAGE buffer system used. The apparent molecular weights of the protein bands in the SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard are listed below for several buffer systems. For more information on this phenomenon, and molecular weight estimation using SDS-PAGE, contact technical support (see previous page) or refer to the article "Molecular weight estimation of proteins by gel electrophoresis revisited" in the October 2003 issue (volume 25.3) of Focus®, available from www.invitrogen.com.

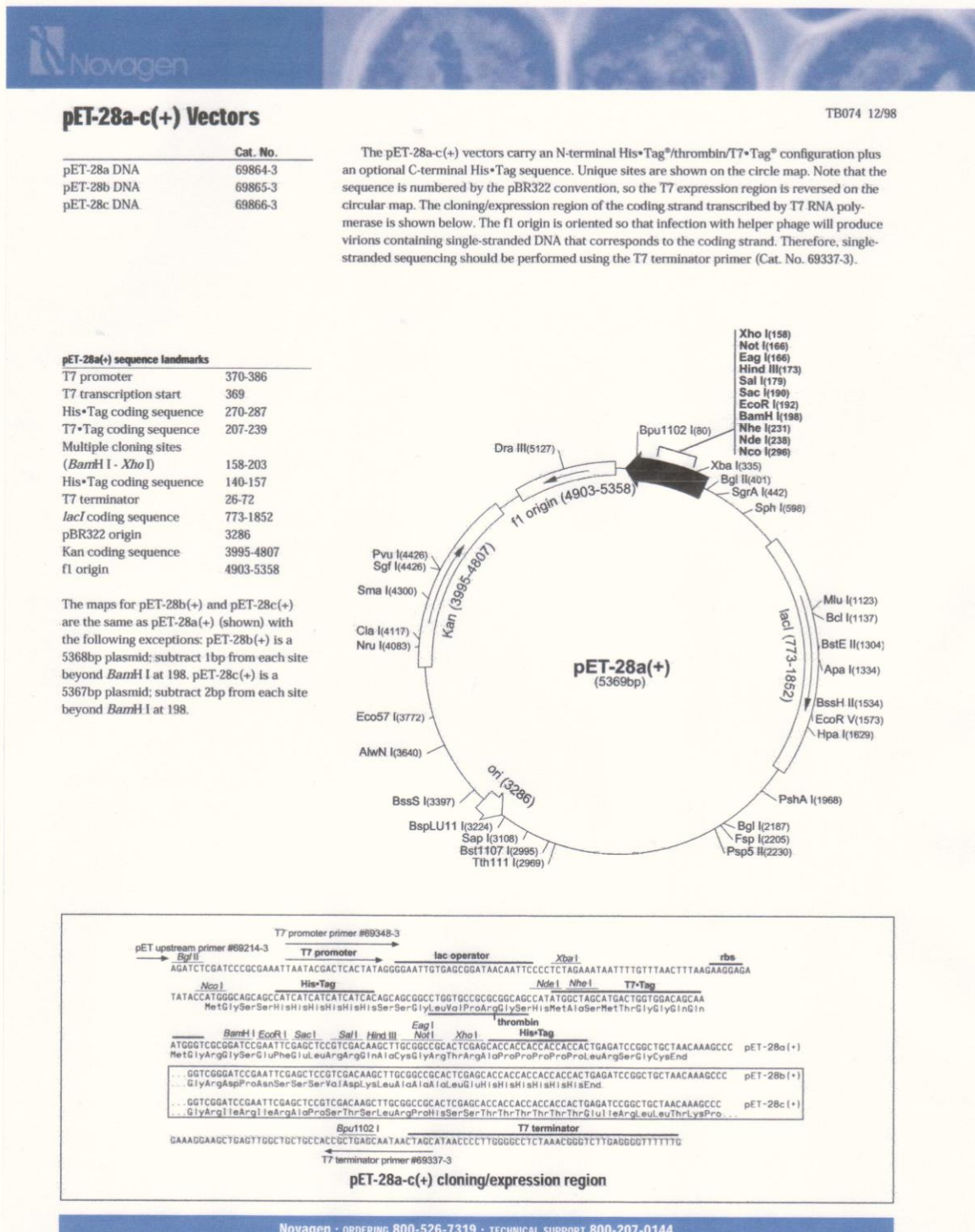


Figur C1: Første figur fra venstre: 1 kb DNA Ladder kjørt på 0,8 % TAE agarosegel (tilsatt ethidium bromide). Andre og tredje figurene representerer henholdsvis SeaBlue og MagicMark molekylvektsmarkør.



Figur C2: Mini PROTEAN III gelelektroforesesett.

**Bilag D: Vektor benyttet i oppgaven**



Figur D.1: Kart over pET28a-c (+) vektor.

## **Bilag E: DNA og proteinsekvenser**

### **E.1: Sekvens for OXR1 og Oxr1**

#### **>scOXR1-DNAsekvens, 819bp**

atggtttggagtcaggatgctatattcaagattaacggttcattgacggcacagattcttctgattccactgcttacacaacggcaagtgaat  
cttcacctcaattaaaagattcccataaccctttcgaataaaaacgacatccgagagaactatagttgaggagggtctctaccaccggtgag  
attgaatggctacttgcctcaactaaaaataaacttcttactcctgaaatgtgcatgaaataagaacattaatgcccacgaggatacagttg  
tacaccgaatggaaccttctataatagccttgagcaacatgggtcttactacactccctgtatagtaacgttgcctccagatagcaaggaat  
gaagagtggggtatgtattagtaataaaaggatcgtaaaaacgggaatccttggagcttacagcaacgaagcttttcatcctaacgaacataggca  
atacacaggaaacggggaatgttttctatggaagctggataaagtacctgatgtaataatccgaaaaagaagaatctgagcaagaaggtaaa  
gaaggttaaggaggaaggggataaagaggagagatggaggttttcaggttatccttacactggagttaacgaatttgctatatactgtacatctg  
aatcttcttcaatgggtgcaggtgatggtcattatggtctttttagcgtgacggcctactccatgggttttcaaaccttctgcaaacatagtg  
caatgaagttttgagtaaggaggcaaaaaatttctatagtagcttttgaagatggcgtgtaggatag

#### **>scOXR1 proteinsekvens, 273 aminosyrer**

MFGVKDAIFKIKRSIAGTDDSDSTAYTTASESSPQLKDSHNPFRNKTTSERTIVEEGSLP  
PVRLNGLYLPSTKKNKLLTPEMCDEIRTLMPTRIQLYTEWNLNLLYSLEQHGSSLSHLYSNVAP  
DSKEFRRVGYVLVIKDRKNGIFGAYSNEAFHPNEHRQYTGNGECLFWLKDVKPVDVNISEK  
EESQEGKEGKEEGDKEERWRFSGYPYTGVNEFAIYCTSEFLSMGAGDGHYGLLCDGGLL  
HGVSNPCQTYGNEVLSKEGKKSIVALEVVRVG-

### **E.2: Sekvens for RPO41 og Rpo41**

#### **>scRpo41-Full sekvens, 4053bp**

ATGCTGAGACCGGCTATAAATCGCTCGTGAAAACATCCCTGTTACAAAGACGGTAAATATCTTCAAAGGGATCTAAGCTGTTTAAACCATCTC  
CGGACTCAACAAGTACAATATTAATATCTGAAGACCCCTTGTAACAGGCTCGTCCCCAACCTCATCTACAACATCAGGTATAATAAGTTCAAA  
TGATTTCCCTTTTTCACAAAAATAGGAAAGACGCCAAGAGCAGCATATCTCTACCAATGGAAAAATCCTTCAGAATTAGAGTTTGACCCCTTTC  
AATAAATCGCATGCCTCAGCAGTAACCTCGATGACAAGAACTAGAGACGTTATGCAATTATGGTCTCTGTTAGAAGCATGCTTGAATCGAATC  
TAATGAAAAGAGCGTCTCTATATTGGAGTCACTGTACCTGGTACCTGAACATAAGCAGCGATTATCGAGGATTATAACATGTACTTGAATTC  
ATTTTCCAAAAATGACCCATAATTTCCCTATTTTAAAAATGAACGAAAAATTAACAAATGATTTGGAGACAAGTTTAAAGACGTTAATTATAAT  
GACAAAACCTTTGGCAATAATGATTCATCAGCTTTGAACTTCCATTCAACGACAAGCTCGATGCTTTTGAAGCCTATAATCTCTGCTACTTGA  
AAATGAGCGTGAATGGTATTAGGGAATTTTCTCTGCCTAGATATTTTGACCATTTTCAGATCGAATAATTTAATGAATGACTTAAAGGTTAT  
AACACCATCGCAACTGCCAATTTCTGTAAGACCAATATTAGAATCACTTACGCTATCTCTACACCTGTAATAATATTGAAAATGAGGAGGGT  
TTGAACAAAGTGAAGCTGAGAACGATTCAAAATTCATAAAGCATCAATGCAAGCTCTGATTTCTATAAAAAACCTTCCCTGGATCCTCTTC  
GGGAAGTTTCATTCACCGTTCAACAGAGTCTTGTCAAAAGACGCTGAAAAGCTTATAGCTGTAGACACTATTGGAATGAGAGTAATCCGGCA  
TACTTTGCTGGGATTATCATTAAACGCCGGAACAGAAAGAGCAAAATTTCTAAATTCAAATTTGATGCCAATGATAATGTTTGAAGATGAAACCT  
ACGAAAAACGACGATAATAATAATTTCTATAAATTTTTTGAATTTACAAATTCACATGCAACATTAGAGGAAAAGAAGGCATTCCGAAAGCGCAT  
TAAATATATTTAACCAAGATAGACAAAAGGTAATGAAAACCGTGCAACGGAAGCCGCAAGAGAGCGTTGGAAGCAGCATTTTGAAGAGGCAAA  
AGCTAGAGGTGACATTTCAATTTGAAAAGAAATTTAAACGTTAAGTTGTGGAATGGTATAATGAAATGTTACCTCTAGTGAAGGAAGAAATTAAT  
CATTTGTAGGTCATTTATGTCAGAAAAGCTATCAGATAAGAAAGGCTTGAAATAAGTTGACACGAAACCGTCTTGGATATGACCATACTTAACCT  
TGATTTGACCCCTGGTAAATGTGTGTCATCACCATTTTGGAACTATTAAGTTAAATTTCTACGGGTGGTGTATTGAAAGTATGAGGACCGCAAG  
AGCGTTATATCAGTGGGTAAGCTATTGAAATGGAATTTAGATCCGAGCAGGTTTGAAGGCAAGTTCGAAAGCAATCTCAAGCGTTACAGAGATGTTAAACAAG  
AAATCACCAGAATTCAAAAACTGGTACAAAATGCTAAATCTGTATTCAGATCATCTCAAATGAGCAGTCGAAAATTTTGTGGCCTCAGAGTA  
TTAGGGCCAGAATCGGTTCCGGTATTAAATCTCAATGTTGATTCAGTCCGATCAAGTATCTGTGCAAGGTTGACCTGTGACAAAAGCTAAGGT  
TCACGGTGAAGCTCCAGCTTTTGGCATGGTTATCAGTACCACAATGGTTCCAAATGGGTGCTCTTGAAGATTCAAGACTTTGATTCGTCAA  
TTGAACGGTGAAGATTGATTGGCCTCTGTTCAACCACAATTAATACCAATTTGGTGGAAACCCAAACCTGGGTTAATTTGGAGATCAGGTGGAT  
ATCATTATACACAATCTACCCCTTTAAGAACAAAAGACTCACCCGAAACAGTAGCATATTTGAAAGCTGCTTCCGATAATGGTGTATATAGACCG  
CGTTTATGATGGTTTGAATGTTCTGGGTAGAACACCGTGGACTGTCAACAGAAAAGTTTTTGTATGGTTTCCAAAGTTTGAATAAAGGTGAA  
GGTTTCTAGATATTCAGGTGCACAAGACGAAATGGTTTTACCACAGCTCCTCCGAAAGAACTCCGACCCCTCCATTTTGAAGACCTGGAAAC  
TTCAAGTCAAACAATTTGCTAATAAATTTCTCTCAGATAGATCAAATAGATGTGATACGAACTACAATTTGGAATTTGCAAGAGCATTTTTGGG  
TGAAAAGCTGTACTTTCCACATAATTTGGACTTTAGGGGACGCTGCTTATCCTTTGTCTCCACATTTCAATCATCTTGGTAAATGATATGAGTCGT  
GGCCTTTTGATTTTTTGGCACGGTAAAAAATTAGGACCTTCTGTGCTCAAGTGGTTAAAGATTCAATTTGTCAAATCTGTTCCGGATTTGATAAGT  
TACCCCTAAAGGATCGTGTGCTATTTACTGAGTCTCATTTGCAGGACATCAAGGATTTCTGCGGAAAATCCCTTAAACGGGAGATCGTTGGTGGAC  
TACTGCTGATAAGCCATGGCAAGCATTGGCCACATGCTTTGAATTTGAATGAAGTTATGAAAATGGATAATCCAGAGGAGTTTATCTCTCATCAA  
CCGTTTCAACAGACGGTACTTGAATGGTTTGAACATTTATGCTGCTTGGTGGTGGACGTTGAAGGGGCTACTCAAGTGAATCTGGTTCCAA  
CGCATAAACCAAGATGTTTATGCTCATGTTTGAAGGTTGGTGCAAAAGATTTAGAATTTGAGCAGAAAAGGAGAGCAAAAACGCCAAAAAT  
TTTGAAGGATAAGATTACCAGAAAGGTTGTCAAGCAACCGCTCATGACAAACGTTTATGGTGTACCTACGTCGGGGCTACTTTTCAAATGCT  
AAACAAATTAAGCCCAATATTTGATGATCGTAAAGAAAGCTTAGACTTTTCTAAATACCTAACCAACATGTTTTTGTAGTGTATCCGCGAGTTAT  
TTCATAGTGGCGCATTTAATTCAGGATTTGGTGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT  
GAACGGTAATAAACCCGACTTTATGTCATCCGTCATATGGACGACACCCTAGGACTACCAATTTGTTACGCCATATCGTGAAGAAAGCAAAAAG  
CAAGTTGAGACCAATTTCAAACCTGCTTTATTAGCGATCCTTTGCTGTCAACCCCTGTTAATGCAAGAGGCAAAAAGGAGGCTTCCACCGA

ACTTCATCCATTGCGTGGATGCTTCACATATGTTGCTAAGTGCAGCAGAATGTGGAAAGCAAGGATTAGATTTTCGCATCAGTTTCATGATTCTTA  
 CTGGACGCATGCATCTGATATAGACACTATGAATGTGGTGTAAAGGGAACAGTTTATCAAACCTCCATGAGGTAGATCTGGTTTTAAGATTGAAG  
 GAGGAGTTTACCAAAGGTATAAGAATTACGTCAAGATGGAAAGTTGAAGAGATCTACGGATTTGGCTCAAAGATTATAGAATCCGTAAG  
 ATTTATCCAGAAAATTAGGAAGAGTACTACATAGCAGATGAAATTTATTTTGAAGAAAAAGCAAGAAATTATTAACAGCCCTCTAATAGA  
 AGATAGAAATGTTGGTGAAGATGTTTACAACGTATCATTATTTGAAGACATCACTGACTTGGACGCCTTGAAGTAGAAAACGGTGGAGAT  
 GAAAATAGCGGTATGAGTGTCTTTTACCGTTGAGATTACCTGAAATCCACCTAAAGGTGATTTTGATGTTACAGTATTGAGAAACAGTCAAT  
 ATTTTTTCTCGTGA

**>scRpo41 Fulllengde translate aa 1351 aa**

MLRPAYKSLVKTSLLQRRLLISSKSGSKLFPSPDSTSTILISEDPLVTGSSPTSSTTSGI ISSNDFPLFNKNRKAASSISYQWKNPSELEFDPF  
 NKSHASAVTSMTRTRDVMQLWSLLEACLQSNLMKRAFSILESLYLVPHEKQRFIEDYNMYLNSFSKNDPNFPILKMKNEKLTNDLET SFKDVNYN  
 DKTLAIMIHHALNFHSTSSMLLKPIISAYLKMSVNGIREIFSCLDILITSDLNILMNDLKVI TPSQLPNSVRP ILESLELTSPTPVNNIENE  
 LNKVEAENDSKLHKASNASSDSIKKPSLDPLREVSFHGSTEVLKSKDAEKLIADVDTIGMRVIRHTLLGLSLTPEQKEQISKFKFDANDNVLKMKP  
 TKNDNNNSINFEIYNSLPTLEEKAFESALNIFNQDRQKVLNRAEAARERWKHDFEEAKARGDISIEKNLNVKLWKYNEMLPLVKEEIN  
 HCRSLLSEKLSDKKGLNKVDTNRLGYGYPYLLIDPGKMCVITILELLKLNSTGGVIEGMRTARAVISVGKAIEMEFRSEQVLKSESQAFRDVVK  
 KSPFVKLVQNAKSVFRSSQIEQSKILWPQSIRARIGSVLISMLIQVAKVSVQGVDPVTKAKVHGEAPAFAHGYQYHNGSKLGLVKIHKTLIRQ  
 LNERLIASVQQLPMLVEPKPWNWRSGGYHYTQSTLLRKTDSPEQVAYLKAASDNGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRKVFVVSQVWNKGE  
 GFLDIPGAQDEMVLPPAPFKNSDPSILRAWKLQVKTIANKFSSDRSNRCDTNYKLEIARAFLEKLYFPHNLDFRGRAYPLSPHNLGNDMSR  
 GLLIFWHGKGLGPSGLKWLKIHLSNLFDFDKLPLKDRVAFTESHLDQIDKSAENPLTGDWRWTTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEEFISHQ  
 PVHQDGTCONGLQHYAALGGDVEGATQVNLVPSDKPQDVYAHVARLVQKRLIEAAEKGDENAKILKDKITRKVVQKQVMTNVYGVTVYGATFQIA  
 KQLSPIFDDRKESLDFSKYLTKHVFSARELHFSAHLIQDHLGCSAKRISKIRLDVDEKSFKNGNKPDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYREESKK  
 QVETNLQTVFISDFAVNPNARRQKAGLPPNFHSLDASHMLLSAAECGKQGLDFASVHDSYWTHASDIDTMNVVLRQFIKLEHVDLVLRLK  
 EEFDQRYKNYVKIGLKRSTDLAQKIIIRKDLRSRKLGRSTTLADEIYFEKKRQELLNSPLIEDRNVGEMVTTVSLFEDI TDLELELENGGD  
 ENSGMSVLLPLRLPEIPKGFDFVTVLRNSQYFFS

**E.3: Sekvens for RPO41-D1 og Rpo41-D1**

**>RPO41-D1 DNA sekvens 3114 bp**

cgcgaaagtgagctttcatggcagcaccgaaagtgctgagcaaatgctgcaaaaaactgattgcggtggataaccattggcatgcgcgctgattcgcc  
 ataccctgctgggctgagcctgaccccggaacagaaagacagattagcaaatttaatttgatgcaaacgataaacgtgctgaaatgaaacc  
 gacaaaaacgatgatacaacaacagcattaactttttgaaatataaacgcctgccgacccctggaagaaaaaaacgctttgaaagcgcg  
 ctgaacattttaaccaggatcgccagaagtgctgaaaaccgcgacccgaagcggcgcgcaacgctggaacatgatattgagaagcgga  
 aagcgcgcgcgatattagcattgaaaaaacctgaaactgaaactggaatggataaacgaaatgctgcccgtggaagaagaatttaa  
 ccattgcccgcagcctgctgagcgaaaaaactgagcgataaaaaaggcctgaacaaagtggataccaaccgctgggctatggcccgtatctgacc  
 ctgattgatccgggcaaaatgtgctgattaccattctggaactgctgaaactgaacagcaccggcgcgctgattgaaagcattgcccaccgcg  
 gcgctgattagcctgggcaaaagcagattgaaatggaatttcgcagcgaacagctgctgaaagcgaagcagcagcagcagcagcagcagc  
 aaaaagcccggaatttaaaaaactggtgcagaacgcgaaaagcgtgttcgcagcagccagattgaaacagagcaaaatctgtggccgcagagc  
 attcgcccgcgcatggcagcgtgctgattagcattgctgattcaggctggcgaagcagcgtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 tgcattggcgaagcgcgctgttcgcatggcctatcagatcataacggcagcaaacctggcgtgctgaaatcataaaaccctgattcgcca  
 gctgaaacggcgaacgcctgattgagcgtgcaagcgcagcgtgctgcccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 taccattataccagagcaccctgctgcccaccaaagatagcccggaaacagctgctgataaacgagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 cgctgattgagcctgaaactgctgggcccacccctggaccgtgaaacgcaaaagtgttgatggtgagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 agccttctggatattccgggcccgcagc  
 ctgcagc  
 gcgaaaaactgtatttcgcgataaacctggattttcgcgcccgcgctacccgctgagcccgcattttaaccatctggcagcagcagcagcagc  
 cggcctgctgatttttggcagc  
 ctgcccgtgaaagatcgcgctggcgttaccgaaagcctctgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 ccaccgagc  
 cccgctgcatcagc  
 agcagcaaacgcagc  
 tctgaaagataaaataccgcagc  
 gaaacagc  
 ttcagagc  
 aaaaagc  
 acagc  
 aacttattcagc  
 attggaacccatgagc  
 agaagaatttgatcagc  
 gatctgagc  
 aagatcgcaacgtggcgcaaaaaatggtgaccacgtgagcctgttgaaagataaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
 tgaaacagc  
 tatttttttagc

**>Rpo41- D1 aminoacid sekvens 1038 aa (starter fra aminosyre 313 til aminoyre 1351)**

REVSFHGSTEVLKSKDAEKLIADVDTIGMRVIRHTLLGLSLTPEQKEQISKFKFDANDNVLMKMKPTKNDNNNSINFFEIYNSLPTLEEKAFESA  
 LNI FNQDRQKVLNENRATAARERWKHDFEEAKARGDISIEKNLNVKLVKWNEMPLVKKEINHCRSLLESEKLSDKKGLNKVDTNRLGYGPLYL  
 LIDPGKMCVITILELLKLNSTGGVIEGMRATARAVISVKGAIEMEFRSEQVLKSESQAFRDVNKKSPEFKKLVQNAKSVFRSSQIEQSKILWPQS  
 IRARIGSVLISMLIQVAKVSVQGVDPVTKAKVHGEAPAFAHGYQYHNGSKLGVLKIHKTLIRQLNGERLIASVQPQLPMLVEPKPWNWRSGG  
 YHYTQSTLLRTKDSPEQVAYLKAASDNGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRKVFVVSQVWNKGEFLDIPGAQDEMVLPPAPPKNSDPSILRAWK  
 LQVKTIANKFSSDRSNRCDTNYKLEIARAFLEKLYFPFNLDLFRGRAYPLSPHFNHLGNDMSRGLLI FWHGKGLGSPGLKWLKIHLNLFQFDK  
 LPLKDRVAFTESHLDIKDSAENPLTGRWWTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEEFISHQPVHQDGTGNGLQHYAALGGDVEGATQVNLVLP  
 SDKPQDVYAHVARLVQKRLEIAAEKGDENAKILKDKITRKVVQTVMTNRYGVTVYVGFQIAKQLSPIFDDRKESLDFSKYLTKHVFSAILREL  
 FHSAPHLIQDWLGEAKRISKSIRLDVDEKSFKNNGKPDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYREESKKQVETNLQTVFISDPFAVNPVNARRQKAGLPP  
 NFHSLDASHMLLSAAECGKQGLDFASVHDSYWTHASDIDTMNVVLRQFIKLEHVDLVRLKEEFDQRYKNYVIGKLRSTDLAQKIRIRK  
 DLSRKLGRSTTLADEIYFEKQRQELLNSPLIEDRNVGEKMTTVSLFEDITDLDALALENGGDENSGMSVLLPLRLPEIPKGDVDTVLRNSQ  
 YFFS

#### **E.4: Sekvens for RPO41-D2 og Rpo41-D2**

##### **>RPO41-D2 DNA sekvens 2250bp**

agcgtgctgattagcatgctgattcaggtggcgaaagtgagcgtgacggcgctggatccgggtgaccaaagcgaaagtgcattggcgaagcgcgg  
 cgtttgcatgcttaccgatacagatcacaacggcagcaaaactggcgctgctgaaaattcataaaaaccctgatcgcagctgaacggcgaaacgcct  
 gattgagcagcgtgagccgagctgctgcccagctgctggtggaaccgaaaccgtgggtgaaactggcgagcggcgctatcattataaccagagc  
 accctgctgagcaccacaaagatagcccggaacaggtggcgtatcctgaaagcgcgagcgaataacggcgatattgatcgcgtgattgatggcctga  
 acgtgctggcgaccaccgctggacgtgaaccgcaaaagtgtttgatgctggtagcagcaggtggaacaaaggcgaaggtttctggatattcc  
 gggcgcgaggatgaaatggtgctgcccggcgccgcaaaaacagcagatccgagcattctgcccggcggaactgaggtgaaaccatt  
 gcaacaaatattagcagcagcagcaaccgctgagcacaactataaaactggaaattgcccggcgctttctggcgcaaaaactgattttc  
 cgataaactggatattctggcgccgctgctgctgagcccagcattttaacatctgggcaacgatagagccggcgctgctgatttttg  
 gcatggcaaaaaactggcgccgagcgcctgaaatggctgaaaacttcattctgagcaaccctgtttggccttgataaactggcctgaaagatgc  
 gtggcgtttaccgaaagcattctgcaggatattaaagatagcgcggaaaaccgctgaccggcgatcgctggtggaaccaccggcgataaaaccg  
 ggcagcgctggcagcctgctttgaaactgaacgaagtgatgaaaatggataaccgggaagaattattagccatcagccgggtgatcaggatgg  
 cactgcaacggcctggcgcaaaagcgcgcaaaacttagcaaaaagcatttcgcccggcgaccaggtgaaactggcgccgagcgaataaaaccg  
 gtgatgagcagcagcgtgctgagcaaaacgctggaaattgcccggcgaaaaaggcgatgaaaacggcaaaaattctgaaagataaaatta  
 ccgcaaaagtgtgaaacagaccgctgagcaaacgctgattgcccggcgaccctttcagattgcaaaacagcgtgagcccgat  
 ttttgatgagcgaagaagcctggattttagcaaatatctgacaaacatgctgttttagcggcatttcgcaactgtttcatagcggcagcagc  
 attttatgagcagcgtgatttgaccacccgctggcctgcccagcattgtgagcagcctatcgcaagaagcaaaaacaggtggaaccaaact  
 cgagaccgtgtttattagcagcagcctttgcccggcgaacccggtgaaacggcgccgcaaaagcggcctgcccggcaactttattcatagcctg  
 gatgagcagccatagcctgctgagcggcggaatgcccgaaaacagggcctgattttgagcagcgtgcatgatagcattggaccatgagcagc  
 atattgataccatgaacgtggtgctgagcgaacagctttataaactgcatgaagtggatctggtgctgagcctgaaagaagaatttgatcagc  
 ctataaaaactatgtgaaaattggcaaaactgaaacgcagcaccgctgagcagcaaaaattattcgatctgcaaaagatctgagccgcaaaactg  
 gggcgagcaccacccctggcgatgaaatattttgaaaaaaacggcaggaactgctgaacagcccctgattgaagatcgcaacgtggcg  
 aaaaaatggtagccaccgctgagcctgtttgaagatattaccgactggtgagcctggaactgaaaacggcgcgatgaaaacagcggcagcag  
 cgtgctgctgcccgtgcccgtgcccgaatccgcccgaaggcagctttgatgtagcctgctgcccgaacagccagcttttttttagc

##### **>Rpo41- D2 aminoacid sekvens750 aa (starter fra aminosyre 601 til aminosyre 1351)**

SVLISMLIQVAKVSVQGVDPVTKAKVHGEAPAFAHGYQYHNGSKLGVLKIHKTLIRQLNGERLIASVQPQLPMLVEPKPWNWRSGGYHYTQS  
 TLLRTKDSPEQVAYLKAASDNGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRKVFVVSQVWNKGEFLDIPGAQDEMVLPPAPPKNSDPSILRAWKLQVKT  
 ANKFSSDRSNRCDTNYKLEIARAFLEKLYFPFNLDLFRGRAYPLSPHFNHLGNDMSRGLLI FWHGKGLGSPGLKWLKIHLNLFQFDKLPKDR  
 VAFTEHSLQDIKDSAENPLTGRWWTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEEFISHQPVHQDGTGNGLQHYAALGGDVEGATQVNLVPSDKPQD  
 VYAHVARLVQKRLEIAAEKGDENAKILKDKITRKVVQTVMTNRYGVTVYVGFQIAKQLSPIFDDRKESLDFSKYLTKHVFSAILRELHSAHL  
 IQDWLGEAKRISKSIRLDVDEKSFKNNGKPDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYREESKKQVETNLQTVFISDPFAVNPVNARRQKAGLPPNFHSL  
 DASHMLLSAAECGKQGLDFASVHDSYWTHASDIDTMNVVLRQFIKLEHVDLVRLKEEFDQRYKNYVIGKLRSTDLAQKIRIRKDLRKL  
 GRSTTLADEIYFEKQRQELLNSPLIEDRNVGEKMTTVSLFEDITDLDALALENGGDENSGMSVLLPLRLPEIPKGDVDTVLRNSQYFFS

#### **E.5: Sekvens for RPO41-D3 og Rpo41-D3**

##### **>Rpo41- D3 DNA sekvens 1530bp**

aacgatagagccggcgctgctgattttttggcattggcaaaaaactggcgccgagcgcctgaaatggctgaaaattcattctgagcaaccctgt  
 ttggctttgataaactggcctgaaagatcgctggcgtttaccgaaagcattctgcaggatattaaagatagcgcgaaaccgctgacgg  
 cgatcgcctggtggaccaccggcgataaaaccgtggcagcctgctttgaaactgaacgaagtgatgaaaatggataaccgggaagaa  
 ttattagccatcagccgggtgatcaggatggcaactgcaacggcctgagcattatcgccgctggcgccgagctgtggaaggcgcgaccagc

tgaacctggtgcccagcgataaaaccgaggatgtgatgcccagcctggtgcagaaacgcctggaaattgcccgggaaaaaggcga  
 tgaaaaacgcgaaaattctgaaagataaaaattaccgccaaagtgtgaaacagaccgctgatgaccaacgctgatggcgtgacctatggtggcgccg  
 acctttcagattgcgaaacagcgtgagccgatttttgatgatcgcaaaagaaagcctggatttttagcaaaaatctgaccaaacatggttttagcg  
 cgattcgcgaactgttcatagcgcgcatctgattcaggattgctggcgcaaaagcgcgaacgcattagcaaaaagcattcgccctggatgtgga  
 tgaaaaaagctttaaaaacggcaacaaaaccgattttatgagcagcgtgatggaccaccccgctggcctgcccattgagccgctatcgc  
 gaagaaaacaaaaacaggtggaaccaacctgcagaccgctgtttattagcgcacgcttggcgtgaaacccggtgaaacgcgcgcgcgcaaaaag  
 cgggctgcccgcgaactttatcatagcctggatgagcgcacatattgctgctgagcgcggcggaatgcccgaacagggcctggattttcgag  
 cgtgcatgatagctattggaccatgagcgcgataattgataccatgaaacgctgctgctgcccgaacagtttataaactgcatgaaaggatctg  
 gtgctgcccctgaaagaagaatttgatcagcgcataaaaaactatgtgaaatggcaaacgaaacgcagcaccgctgcccgcagaaaatta  
 ttgcgattcgcaaaagatctgagccgcaaacctggcgcgaccacccctggcggatgaaatttattttgaaaaaaaacgcccaggaactgctgaa  
 cagcccctgattgaaagatcgcaacgctggcgcaaaaaatgggtaccacgctgagcctgtttgaaagatataccgatctggatgcccctggaactg  
 gaaaacggcggcgatgaaaacagcggcatgagcgtgctgctgcccctgcccggaaattccgcgcgaaagggcgattttgatgtgaccctg  
 tgcgcaacagccagatttttttagc

**>Rpo41- D3 aminoacid sekvens 510 aa (starter fra aminosyre 841 til aminosyre 1351)**

NMSRGLLI FWHGKGLGSPGLKWLKIHLSNLFQDKLPLKDRVAFESHQLQDIKDSAENPLTGDRWWTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEE  
 FISHQPVHQDGTNGLQHYAALGGDVEGATQVNLVPSDKPQDVYAHVARLVQKRLEIAAEKGDENAKILKDKITRKKVVKQTVMTNVYGVTVVGA  
 TFQIAKQLSPIFDDRKESLDFSKYLTKHVFSATRELFHSAHLIQDWLGESAKRISKSIRLDVDEKSFKNKPKDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYR  
 EESKKQVETNLQTVFISDPFAVNPVNARRQKAGLPPNF IHS LDASHMLLSAAECGKQGLDFASVHDSYWTHASDIDTMNVVLRQFQIKLHEVDL  
 VLRLKEEFDRQRYKNYVKI GKLRSTDLAQKI IIRKDLRSKLRSTTLAIDEIYFEKQRQELLNSPLIEDRNVGEMVTTVSLFEDI TDLDLEL  
 ENGGDENSGMSVLLPLRLPEIPPKGDFDVTVLRNSQYFFS

**E.6: Sekvens for RPO41-D5 og Rpo41-D5**

**>Rpo41- D5 DNA sekvens 2634bp**

attaacttttttgaatttataacagcctgcccaccctggaagaaaaaaagcgtttgaaagcgcgctgaaacatttttaaccaggatcgccaga  
 aagtgtgaaaaaccgcccagcaccgaagcggcgcgcaacgctgaaacatgatgttgaagaagcgaagcgcgcggcgatattagcattgaaaa  
 aaacctgaactgtgaaactgtgaaatggtataaacgaaatgctgcccgtggtgaaagaagaaattaacctgcccagcctgctgagcgaaaaa  
 ctgagcgaataaaaagcctgaaacaaagtgataccaaccgctggcctatgcccctgatctgacctgatgacccggcaaaaatgtgctgga  
 ttaccattctggaactgctgaaactgaacagcaccggcggcgtgatgaaagcctgcccaccgcccgcgctgattagcgtggcgaagcgtat  
 tgaatggaattttcgagcgaacaggtgctgaaagcgaagccagcgttttcgagcgtgaaacaaaaaaagcccggaatttaaaaaactggtg  
 cagaacgcgaaaaagcgtgtttcgcagcagccagattgaaacagagcaaaaattctgtggccgagagcattcgcgcgcgcatggcagcgtgctga  
 ttgacatgctgatccaggtggcgaagtgagcgtgagggcgtggatccgggtgacaaaagcgaagtgcatggcgaagcgcgcgctttcgca  
 tggctatcagatcataacggcagcaaaactggcgtgctgaaaattcataaaaccctgatcggcagctgaaacggcgaacgcctgattgcccagc  
 gtcagccgagcagcgtgcccgtgctggggaaccgaaacccgctgggtgaaactggcgcgagcgcgcccgtatcattataccagagcaccctgctgc  
 gcaaaaagatagcccgaacaggtggcgtatctgaaagcggcgaagcgaataacggcgatattgatcgcctgctgatgagcctgaaacgctgctggg  
 ccgaccccgctggaccgtgaaaccgaaaagtggtgatggtgagcaggtggtgaaacaaaggcgaagcctttctggatattccgggcccgcgag  
 gatgaaatggtgctgcccggcgcgcgcaaaaacagcagcagcagcattctgcccgcgctggaactgaggtgaaacacattgcccgaacaaat  
 ttgacagcagcagcaaccgctgagataccaactataaaactggaattgcccgcgctttctggcgcaaaaactgtattttccgcataacct  
 ggattttcgcgcgcccgcgtatccgctgagcccgcattttaaccatctgggcaacgatattgagcgcgcccctgctgattttttgcatggcaaa  
 aaactggcccagcagcgcctgaaatggtgtaaaattcctgagcaaccctggttggctttgataaaactgcccctgaaagatcgcgtggcgtttta  
 ccgaaagcctatgaggatattaaagatagcgcggaaacccgctgacccggcagctgctggtggaccacccgcaataaacccgagcgcct  
 ggcagcctgctttgaaactgaaagagtgatgaaatggataaacccggaagaatttattagccatcagccgggtgcatcaggatggcacctgcaac  
 ggctgagcattatgcccgcctgggcccgcgagtggtgaaagcgcgaccaggtgaaacctggctgcccagcgataaaaccgagcagtgatgagc  
 atgtggcgcgcccgtgagcaaaacgcccggaaattgcccgcgcaaaaagcagatgaaacgcgcaaaaattctgaaagataaaaattaccgcaaaat  
 ggtgaaacagaccgctgatgaccaacgctgattgcccgtgacctatgtggcgcgacctttcagattgcaaaacagcgtgagcccgatttttgatgat  
 cgcaaaagaaagcctggatttttagcaaatctgaccaaacatgctgtagcgcgattcgcgaactgtttcatagcgcgcatctgattcaggatt  
 gctggcgaagcgcgaaacgatttagcaaaagcattcgcctgagtggtgaaaaaagccttataaaacggcaacaaaccggatattttgatgag  
 cagcgtgatttgaccaccccgctgggctgcccattgagcgcctatcgcaagaaagcaaaaaacaggtggaacaaacctgagaccgctg  
 ttattagcagatccgtttgcccgtgaaaccgggtgaaacgcgcgcccagaaagcggcctgcccgcgaaactttatcatagcctggatgagcgc  
 atatgctgctgagcgcggcgaatgcccgaacagggcctggattttgagcgcgctgcatgatagctattggaccatgagcagcagatttgatac  
 catgaaacgctggtgctgcccgaacagtttataaactgcatgaaagtgatctggtgctgcccctgaaagaagaatttgatcagcgcataaaaaac  
 tatgtgaaatggcaaacgcaacgagcaccgctgcccgcagaaaatttctgattcgcgaagatctgagcccgaactggcgcgagca  
 cc

**>Rpo41- D5 aminosyresekvens 878 aa (starter fra aminosyre 385 til aminosyre 1263)**

SINFFEIYNSLPTLEEKAFESALNIFNQDRQKVLNENRATEAARERWKHFEEAKARGDISIEKNLNVKLVKQWYNEMLPVKEEINHCRSLISE  
 KLSDDKGLNKVDNRLGYPYLTLDIPGKMCVITILELLKLNSTGGVIEGMRTRAVISVGKAIEMEFRSEQVLSSESQAFRDVNNKSPPEFKKL  
 VQNAKSVFRSSQIEQSKILNWPQSI RARI GSVL I SMLIQVAKVSVQGVDPVTKAKVHGEAPAFAHGYQYHNGSKLGVLKIHKTLIRQLNGERLIA  
 SVQQLLPMLEPKPWNVNRSGGYHYTQSTLLRTRKDSPEQVAYLKAASDNNGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRKVFVSVQVNNKGGFFLDIPGA  
 QDEMVLPPAPPKNSDPSILRAWLKQVKTIANKFSSDRSNRCDTNYKLEIARAFLEKELYFPHNLDFRGRAYPLSPHFHNLGNDMSRGLLI FWHG



KKLGPSGLKWLKIHLNLFSGFDKLPKDRVAFTEHSLQDIKDSAENPLTGDRWWTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEEFISHQPVHQDGTG  
 NGLQHYAALGGDVEGATQVNLVPSDKPQDVYAHVARLVQKRLEIAAEKGDENAKILKDKITRKKVVKQTVMTNVYGVTVYGATFQIAKQLSPIFD  
 DRKESLDFSKYLTKHVFSARELFSHAHLIQDWLGEKSAKRISKSIRLDVDEKSFKNKPKDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYREESKQVETNLQT  
 VFI SDPFAVNPVNARRQKAGLPPNFIHSLDASHMLLSAAECGKQGLDFASVHDSYWTHASDIDTMNVVLRQFIKLEHVDLVLRLKEEFDQRYK  
 NYVKIGKLRSTDLAQKIRIRDLRSRKLGRST

## E.7: Sekvens for RPO41-D6 og Rpo41-D6

### >Rpo41- D6 DNA sekvens bp 2898bp

attaactttttgaaatttataacagcctgccgaccctggaagaaaaaaagcgtttgaaagcgcgctgaacatttttaaccaggatcgccaga  
 aagtgcctggaaaaccgcgaccgaagcggcgcgcaacgctggaaccatgattttgaaagaagcgaagcgcgcgcgatattagcattgaaaa  
 aaacctgaacgtgaaactgtggaatggtataacgaaatgctgccgctggtgaaagaagaatataccattgccgcagcctgctgagcgaaaaa  
 ctgagcgataaaaaaggcctgaacaaagtggataccaaccgctgggctatggcccgatctgaccctgatgatccgggcaaaatgtcgtga  
 ttaccattctggaactgctgaaactgaacagcaccggcgcgctgattgaaagcatgcccaccgcgcgcggtgatagcgtggcgaacagcgt  
 tgaatggaatctgcagcgaacaggtgctgaaagcgaagcagggcgtttcgcgatgtgaaacaaaaagcccggaatttaaaaaactggtg  
 cagaacgcgaaaaagcgtgtttccgagcagccagatgaaacagagcaaaatctctgtggcgcagagcattcgcgcgcgcatggcagcgtgctga  
 tttagcatgctgatcaggtggcgaagtggcgtgagcgtgagggcgtggatccgggtgacaaagcgaagtgcatggcgaagcggcggtttcgcga  
 tggctatcagatcataacggcagcaaaactggcgctgctgaaatcataaaaacctgattcgcagctgaacggcgaacgcctgattcgcgagc  
 gtcagccgcagctgctgccgatgctggtggaacgcaaacctgggtgaaactggcgcagcggcgctatcattatacccagagcacctgctgc  
 gcaccaagatagcccggaacaggtggcgtatctgaaagcggcgagcgaataacggcgatattgacgcgctgatgatggcctgaaacgtgctggg  
 ccgcaaccgctggaccgtgaaccgcaaaagtgtttgatggtgagccaggtggtgaaacaaagcgaagcctttctggatattccggcgcgagc  
 gatgaaatggtgctgcccggcgccgcaaaaaacagcagatccgagcattctgcgcgctggaaactgcaggtgaaacacattgcgaacaaat  
 tttagcagcagcagcaaacctgctgataccaactataaaactggaaatggcgcgcgctttctggcgcaaaaaactgattttccgcataacct  
 ggattttcggcgccgctgctgctgagcccgattttaaccatctgggcaacgatagagccggcgctgctgattttttggcatggcaaa  
 aaactggcccgagcggcctgaaatggctgaaatcactgagcaacctgtttggccttgataaaactgcccgtgaaagatcggcgtggcgttta  
 ccgaaagcattctgcagatattaaagatagcgcggaacccgctgaccggcgatcgcctggtggaccaaccggaataaacctggcagcgcct  
 ggcgacctgctttgaaactgaacgaagtgatgaaatggataaccgggaagaatttattagccatcagccgggtgcatcaggatggcacctgcaac  
 ggcctgcagcattatgcggcgctggcgcgatgtggaagcgcgaccaggtgaaacctggtgcccagcagataaacccgaggtggtgatgccc  
 atgtggcgccctggtgcagaaacgcctggaaatggcggcggaaaaaggcagatgaaacgcgaaatctgaaagataaaattaccggcaagt  
 ggtgaaacagaccgtgatgaccaacgtgatggcgtgacctatggtggcgcgacctttcagattgcgaaacagcgtgagccgatttttgatgat  
 cgcaagaagcctggattttagcaaatatctgacaaacatggttttagcgcgattcgcgaaactggttcatagcgcgcatgattcaggatt  
 ggcctggcgaaaagcgcgaaacgcttagcaaaaagcattcgcctggatggtgaaacaaagccttaaaaaacggcaacaaacggatttttag  
 cagcgtgatttgaccaccccgctggcgctgctgagcagcctatcgcgaagaagcaaaaaacaggtggaacaaacctgcagaccgtg  
 ttattagcagatccgtttgcggtgaaaccgggtgaaacgcgcgcgcagaaagcggcctgcccgcgaactttattcatagcctggatgagcagcc  
 atatgctgctgagcgcggcggaatgcggcaaacagggcctggattttgcgagcgtgcatgatagctattggacccatgagcagcagatattgatac  
 catgaaactggtgctgcccgaacagtttataaactgcatgaagtggatctggtgctgcccctgaaagaagaatttgatcagcgcataaaaaac  
 tatgtgaaaattggcaaaactgaaacgcagcaccgatctggcgcaaaaattattcgcattcgcgaagatctgagccgcaaacctggcgccagca  
 ccacctggcggatgaaatattttgaaaaaaaacgcgcaagcctgtaacagcagcagcctgattgaaagatcgcaacgtggcgcaaaaaatggt  
 gaccaccgtgagcctggttgaagatattaccgatctggatgctggaactggaactggaacaaacggcgagatgaaacacggcgatgagcgtgctgct  
 ccgctgcccctgcccgaatcccgccgaaagggcattttgatgtagccgtgctgcccgaacagccagatatttttttagc

### >Rpo41- D6 aminosyresekvens 966 aa (starter fra aminosyre 385 til aminosyre 1351)

INFFEIYNSLPTLEEKAFESALNIFNQDRQKVLNENRTEAARERWKHDFEEAKARGDISIEKNLNVKLVKWKYNEMLPLVKEEINHCRSLSEK  
 LSDKKGLNKVDNRLGYGPLYLTLIDPGKMCVITILELKLKLNSTGGVIEGMRTARAVISVGKAIEMEFRSEQVLKSESQAFRDVKNSPEFKKLV  
 QNAKSVFRSSQIEQSKILWVPSIRARIGSVLISMLIQVAKVSVQGVDPVTKAKVHGEAPAFAGHYQYHNGSKLGLVKIHKTLIRQLNGERLIAS  
 VQPQLLPLMVEPKPWNWRSRGGYHYTQSTLLRTRKDSPEQVAYLKAASDNGDIDRVYDGLNVLGRTPWTVNRKVFDDVSVQVWNGEGFLDIPGAQ  
 DEMVLPAPPKNSDPSILRAWLQVKTIANKFSSDRSNRCDTNYKLEIARAFLGKLYFPHNLDFRGRAYPLSPHFNHLGNDMSRGLLI FWHGK  
 KLGPSGLKWLKIHLNLFSGFDKLPKDRVAFTEHSLQDIKDSAENPLTGDRWWTADKPWQALATCFELNEVMKMDNPEEFISHQPVHQDGTGTCN  
 GLQHYAALGGDVEGATQVNLVPSDKPQDVYAHVARLVQKRLEIAAEKGDENAKILKDKITRKKVVKQTVMTNVYGVTVYGATFQIAKQLSPIFD  
 RKESLDFSKYLTKHVFSARELFSHAHLIQDWLGEKSAKRISKSIRLDVDEKSFKNKPKDFMSSVIWTTPLGLPIVQPYREESKQVETNLQTV  
 FISDPFAVNPVNARRQKAGLPPNFIHSLDASHMLLSAAECGKQGLDFASVHDSYWTHASDIDTMNVVLRQFIKLEHVDLVLRLKEEFDQRYKN  
 YVKIGKLRSTDLAQKIRIRDLRSRKLGRSTTLADEIYFEKQRQELLNSPLIEDRNVGKEMVTVSLFEDITDLDALELENGGDENSGMSVLL  
 PLRLPEIPKGFDPVTVLRSQYFFS

---

**Bilag F: Primere benyttet i oppgaven til kloning og sekvensering**

1. **Rpo41-D1-F (P8842F):** 5'-ctagctagc CTTCGGGAAGTTTCATTCCACGGT  
**NheI**
2. **Rpo41-D2-F (P8843F):** 5'-ctagctagc GGTTTCGGTATTAATCTCAATGTTG  
**NheI**
3. **Rpo41-D3-F (P8844F):** 5'-ctagctagc GGTAATGATATGAGTCGTGGCCT  
**NheI**
4. **Rpo41-D5- F (PHBfRpo385):**  
5'-ATATgctagctctataaatttttttgaatttacaattcactg  
**NheI**
5. **Rpo41-D5-R (PHBrRpo1263):**  
5' ATATGGATCCtcaagtacttcttcctaattttctggataaatc  
**BamH1**
6. **Rpo41-D6-F (PHBfRpo385):**  
5' ATATgctagc tctataaatttttttgaatttacaattcactg  
**NheI**
7. **Rro41-R (P8845R):**  
5'-cgcgatcc TCACGAGAAAAATATTGACTGTTTCTC  
**BamH1**
8. **Forward, 650-primer:** 5'-taatacgactcactataggg
9. **Forward, 11939PHB500rpo:** 5'-Ccatacttaaccttgattgacc
10. **Forward, 11940PHB700rpo:** 5'-ccttttaagaacaaaagactcacc
11. **Forward, 11941PHB900rpo:** 5'- gaaaatcccttaacgggagatc
12. **Forward, 11942PHB1100rpo:** 5'-gtaataaacccgactttatgtcatc
13. **Reverse, 2548-primer:** 5'-gctagttattgctcagcgg

---

**Bilag G: Primere benyttet i oppgaven for å lage sekvenseringsløsning****Rpo41-D1**

1. Forward, 650-primer
2. Forward, PHBfRpo385
3. Forward, 11939PHB500rpo
4. Forward, P8843
5. Forward, 11940PHB700rpo
6. Forward, P8844
7. Forward, 11941PHB900rpo
8. Forward, 11942PHB1100rpo
9. Reverse, PHBrRpo1263
10. Reverse, 2548-primer

**Rpo41-D2**

1. Forward, 650-primer
2. Forward, 11940PHB700rpo
3. Forward, P8844
4. Forward, 11941PHB900rpo
5. Forward, 11942PHB1100rpo
6. Reverse, PHBrRpo1263
7. Reverse, 2548-primer

**Rpo41-D3**

1. Forward, 650-primer
2. Forward, 11941PHB900rpo
3. Forward, 11942PHB1100rpo
4. Reverse, PHBrRpo1263
5. Reverse, 2548-primer

**Rpo41-D5**

1. Forward, 650-primer
2. Forward, 11939PHB500rpo
3. Forward, P8843

4. Forward, 11940PHB700rpo
5. Forward, P8844
6. Forward, 11941PHB900rpo
7. Forward, 11942PHB1100rpo
8. Reverse, 2548-primer

**Rpo41-D6**

1. Forward, 650-primer
2. Forward, 11939PHB500rpo
3. Forward, P8843
4. Forward, 11940PHB700rpo
5. Forward, P8844
6. Forward, 11941PHB900rpo
7. Forward, 11942PHB1100rpo
8. Reverse, PHBrRpo1263
9. Reverse, 2548-primer

## Bilag H: Rpo41-D1 masspektroskopieresultatater

### 1. Bånd merket 1 (~ 100 kDa) på figur G3.20 side 98

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Database Accession #	Protein Name
1	126	82	1292.31	43	1.22e+006	153082.1	P13433	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPO41 PE=1 SV=1
Totals:	126	82						

### 2. Bånd merket 2 (~ 85 kDa) på figur G3.20 side 98

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Database Accession #	Protein Name
1	58	43	598.96	28	5.73e+005	153082.1	P13433	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPO41 PE=1 SV=1
2	36	32	485.57	35	2.46e+005	84183.0	P21179	Catalase HPII OS=Escherichia coli (strain K12) GN=katE PE=1 SV=1
3	23	21	312.19	44	1.34e+005	69115.3	P0A6Y8	Chaperone protein dnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2
4	13	12	148.20	22	7.73e+004	74289.3	P77398	Bifunctional polymyxin resistance protein amA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=amA PE=1 SV=1
5	12	10	140.55	27	1.08e+005	46216.5	P77434	Uncharacterized aminotransferase yfdZ OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yfdZ PE=2 SV=1
6	9	9	109.95	13	6.20e+004	87435.6	P23538	Phosphoenolpyruvate synthase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ppsA PE=1 SV=5
7	6	6	86.66	8	7.05e+004	79342.9	P0AG24	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=spoT PE=1 SV=1
8	7	6	79.94	8	6.42e+004	84207.3	P0ABH9	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=clpA PE=1 SV=1
9	8	6	77.68	20	5.30e+004	43313.8	P0A8L1	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=2
10	6	5	49.36	5	5.28e+004	77101.4	P05055	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=pnp PE=1 SV=3
11	5	4	39.65	5	5.08e+004	105062.3	P0AFG3	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sucA PE=1 SV=1
12	2	2	30.41	5	6.15e+004	77581.7	P0A6M8	Elongation factor G OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=2
13	2	2	26.98	4	6.11e+004	66894.7	P17169	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glmS PE=1 SV=4
14	3	2	20.12	2	5.16e+004	102390.7	P27249	[Protein-Pil] uridylyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glnD PE=3 SV=2
15	1	1	11.41	1	1.51e+004	66096.4	P06959	Dihydropolyslysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex OS=Escherichia coli (strain K12) GN=aceF PE=1 SV=3
Totals:	191	161						

### 3. Bånd merket 3 (~ 64 kDa) på figur G3.20 side 98

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Database Accession #	Protein Name
1	89	49	841.71	73	1.40e+006	66894.7	P17169	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glmS PE=1 SV=4
2	93	42	766.20	80	1.08e+006	57329.2	P0A6F5	60 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=groL PE=1 SV=2
3	59	37	647.98	61	1.91e+006	74289.3	P77398	Bifunctional polymyxin resistance protein amA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=amA PE=1 SV=1
4	19	18	276.59	45	2.48e+005	56177.4	P35340	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ahpF PE=1 SV=2
5	11	11	148.42	17	1.64e+005	71422.9	P0A6Z3	Chaperone protein htpG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=htpG PE=1 SV=1
6	10	10	123.58	6	1.48e+005	153082.1	P13433	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPO41 PE=1 SV=1
7	8	7	112.58	13	1.79e+005	64422.2	P0AC41	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1
8	7	7	89.37	14	1.44e+005	67924.1	P23367	DNA mismatch repair protein mutL OS=Escherichia coli (strain K12) GN=mutL PE=1 SV=2
9	5	5	65.17	7	8.17e+004	74014.7	P0A8M3	Threonyl-tRNA synthetase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=thrS PE=1 SV=1
10	1	1	18.75	4	8.48e+004	43313.8	P0A6N1	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=2
11	1	1	14.84	2	2.38e+005	61158.3	P0AG67	30S ribosomal protein S1 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsA PE=1 SV=1
12	1	1	13.35	2	7.31e+004	62984.7	P00893	Acetolactate synthase isozyme 3 large subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ilmI PE=1 SV=2
13	1	1	12.36	2	9.39e+004	64612.7	P06149	D-lactate dehydrogenase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dld PE=1 SV=3
Totals:	305	190						

#### 4. Bånd merket 4 (~ 30 kDa) på figur G3.20 side 98

Group (#)	Spectra (#)	Distinct Peptides (#)	Distinct Summed MS/MS Search Score	% AA Coverage	Mean Peptide Spectral Intensity	Protein MW (Da)	Database Accession #	Protein Name
1	71	45	780.90	62	1.32e+006	74289.3	<a href="#">P77398</a>	Bifunctional polymyxin resistance protein amA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=amA PE=1 SV=1
2	58	43	712.24	70	7.24e+005	66894.7	<a href="#">P17169</a>	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glmS PE=1 SV=4
3	57	38	605.58	63	5.60e+005	57329.2	<a href="#">P046F5</a>	60 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=groL PE=1 SV=2
4	12	11	186.89	34	2.10e+005	43313.8	<a href="#">P046N1</a>	Elongation factor Tu OS=Escherichia coli (strain K12) GN=tufA PE=1 SV=2
5	10	10	127.99	8	1.71e+005	153082.1	<a href="#">P13433</a>	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae GN=RPO41 PE=1 SV=1
6	3	3	38.69	8	9.88e+004	56177.4	<a href="#">P35340</a>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F OS=Escherichia coli (strain K12) GN=ahpF PE=1 SV=2
7	2	2	28.91	4	1.36e+005	71422.9	<a href="#">P046Z3</a>	Chaperone protein htpG OS=Escherichia coli (strain K12) GN=htpG PE=1 SV=1
<b>Totals:</b>	213	152						