

Transkripsjonsanalyser av det repeterte elementet *bcr1* i *Bacillus cereus* ATCC 10987 og *Bacillus cereus* ATCC 14579

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Eirik Rødseth Bakka



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2009

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Laboratory for Microbial Dynamics (LaMDa), Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, fra august 2008 til mai 2009, under veiledning av Førsteamanuensis Ole Andreas Løchen Økstad og Stipendiat Simen Martens Kristoffersen. Det har vært et veldig interessant og spennende år, og jeg har lært svært mye om mikro- og molekylærbiologi.

Jeg ønsker å takke alle ved *Bacillus*-gruppen for all tålmodighet og hjelp med laboratoriearbeidet. Gruppen har et svært godt miljø, og menneskene der har virkelig vært inkluderende og hjelpsomme.

Tusen takk til Førsteamanuensis Ole Andreas Løchen Økstad for svært god veiledning og oppfølging under hele arbeidsperioden, og for all hjelp og støtte under arbeidet med oppgaven.

Tusen takk til Stipendiat Simen Martens Kristoffersen for samarbeidet og all støtte og veiledning jeg har fått under arbeidet med oppgaven. Du har vært til stor hjelp, og jeg håper at du får brukt noen av disse resultatene videre.

Til slutt vil jeg takke min kjæreste og samboer Karianne, som har vært så snill, tålmodig og interessert under hele arbeidet med masteroppgaven.

Oslo, 15. mai 2009

Eirik Rødseth Bakka

Forkortelser

5-HT	5-hydroksytryptamin (serotonin)
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosine triphosphate (adenosintrifosfat)
bcr	Bacillus cereus repeat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basepar
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (syklisk adenosinmonofosfat)
cDNA	Complementary DNA (komplementært DNA)
ces	Cereulide syntetase
cRT-PCR	Syklisk revers transkriptase-polymerasekjederaksjon
C _t	Cycle threshold (terskelsyklus)
DEPC	Diethyl pyrocarbonate (dietylpyokarbonat)
dATP	Deoksiadenosintrifosfat
dCTP	Deoksicytidintrifosfat
dGTP	Deoksiguanosintrifosfat
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoksyribonukleinsyre)
DNase	Deoksyribinuklease
dNTP	Deoksiribonukleotidtrifosfat
dTTP	Deoksitymidintrifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (etylendiamintetraacetatsyre)
EF	Edema factor (ødemfaktor)
ERIC	Enterobacterial repetitive intergenic consensus
gDNA	Genomisk DNA
IHF	Integration host factor
IRU	Intergenic repeat units
IS	Insertion sequence
kbp	Kilobasepar
LB	Luria-Bertani
LF	Letal faktor
MITE	Miniature inverted repeat transposable elements
MQ-H ₂ O	Milli-Q-H ₂ O
mRNA	Messenger RNA
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
OD	Optisk tetthet
PA	Protektivt antigen
PCR	Polymerase chain reaction (polymerasekjedereaksjon)
PE	Primer extension
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
REP	Repetitive extragenic palindromic
RNA	Ribonucleic acid (ribonukleinsyre)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotasjoner per minutt

rRNA	Ribosomal RNA
RT	Revers transkriptase
RT-PCR	Revers transkriptase-polymerasekjedereaksjon
RUP	Repeat unit of pneumococcus
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
TAE	Tris-acetat EDTA
TAP	Tobacco acid pyrophosphatase (tobakksyrepolyfosfatase)
TBE	Tris-borat EDTA
Temed	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TIR	Terminal inverted repeat
UTR	Untranslated region (ikke-translatert region)
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-idolyl- β -galaktosidase

Sammendrag

bcr1 er et ~155 bp repetert element funnet i *B. cereus*-gruppen av bakterier som viser tydelige tegn på mobilitet. Det har blitt foreslått flere mulige mekanismer for hvordan *bcr1* kan tenkes å påvirke genekspressjon av nærliggende gener, deriblant promoteraktivitet, terminering av transkripter og stabilisering av mRNA. Mobile repeterte elementer som NEMIS, funnet i *Neisseria*-slekten, og ERIC, funnet i *Enterobacteriaceae*, er foreslått å kunne regulere uttrykk av gener på RNA-nivå. Alle disse elementene danner stabile sekundærstrukturer med hårnållformer ved kotranskripsjon med nærliggende gener. *bcr1*-RNA er *in silico* predikert å danne stabile sekundærstrukturer med et dobbel-hårnållignende mønster.

Det ble i denne studien undersøkt ved revers transkriptase-PCR om *bcr1* kunne kotranskribes med nabogen i *B. cereus*-gruppen av bakterier. Det ble i tillegg benyttet cRT-PCR og primer extension for å bestemme nøyaktig transkripsjonsstart for gener med *bcr1* lokalisert oppstrøms.

Transkripsjonsstart for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og for det ortologe genet BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579, ble ved cRT-PCR og primer extension beregnet til å være i samme lokasjon, henholdsvis 195 og 45 nukleotider oppstrøms for translasjonsstart. Forskjellen på 150 nukleotider er forårsaket av at *bcr1_22R* er lokalisert oppstrøms for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. Sekvenseringsprodukter fra cRT-PCR ga preliminær informasjon om mulige degraderingsmønstre for mRNA med *bcr1* i 5'-ende. Det ble videre vist at *bcr1_22R* kotranskribes i sin helhet med, og utgjør 5'-ende av mRNA-transkriptet av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. Dette er første gang et *bcr1*-element er konklusivt vist å i sin helhet kunne være til stede i 5'-UTR av et mRNA i *B. cereus*-gruppen, og viser at de to ortologe genene BCE_1421 og BC1308 har ulik 5'-UTR for sine respektive transkripter (+/- *bcr1*) i henholdsvis *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579. Resultatene fra denne oppgaven utgjør et godt grunnlag for videre undersøkelser av en eventuell effekt av *bcr1_22R* på mRNA-stabilitet for nedstrøms gen i de to stammene.

Innhold

FORORD	2
FORKORTELSER	3
SAMMENDRAG.....	5
INNHold	6
1. INNLEDNING	9
1.1 <i>BACILLUS</i>	9
1.2 <i>BACILLUS CEREUS</i> -GRUPPEN.....	10
1.2.1 <i>Bacillus cereus</i>	10
1.2.2 <i>Bacillus anthracis</i>	11
1.2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
1.2.4 <i>Sekvenserte genomer av stammer i B. cereus-gruppen</i>	13
1.3 MOBILE ELEMENTER	14
1.4 REPETERTE ELEMENTER	16
1.4.1 <i>Correia/NEMIS</i>	16
1.4.2 <i>ERIC/IRU/RU-1</i>	17
1.4.3 <i>REP</i>	17
1.4.4 <i>RUP</i>	18
1.4.5 <i>BOX</i>	18
1.4.6 <i>Repeterte elementer i Bacillus cereus-gruppen</i>	18
1.4.7 <i>Bacillus cereus repeat 1</i>	18
1.5 AKTUELLE GENLOCI.....	20
1.6 PROBLEMSTILLING	21
2. MATERIALER.....	22
2.1 BAKTERIESTAMMER.....	22
2.2 REAGENSER.....	22
2.3 ENZYMER OG ENZYMLØSNINGER.....	23
2.4 KITS	24
2.5 LØSNINGER	24

2.6	DYRKINGSMEDIER.....	26
3.	METODER	27
3.1	VEKSTKURVE.....	27
3.2	RNA-ISOLERING	28
3.3	DNASE-BEHANDLING.....	30
3.4	REVERS TRANSKRIPSJON.....	30
3.5	POLYMERASEKJEDEREAKSJON (PCR).....	31
3.6	REAL TIME PCR.....	32
3.7	TAP-BEHANDLING.....	33
3.8	LIGERINGSREAKSJON.....	34
3.9	FENOLRENSING AV RNA.....	34
3.10	GELELEKTROFORESE	36
3.11	GELRENSING	37
3.12	KLONING	37
3.13	PLASMIDISOLERING	39
3.14	SIRKULÆR RT-PCR.....	39
3.15	SEKVENSERING.....	40
3.16	PRIMER EXTENSION.....	41
3.17	BIOINFORMATIKK	43
4.	RESULTATER.....	44
4.1	VEKSTKURVE FOR <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987 OG <i>B. CEREUS</i> ATCC 14579.....	44
4.2	ISOLERING AV RNA FRA <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987	45
4.3	TRANSKRIPSJONSANALYSE AV BCE_1118, BCE_1174 OG BCE_1421 I <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987 VED KONVENSJONELL RT-PCR.....	46
4.4	ISOLERING AV RNA FRA <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987	48
4.5	TRANSKRIPSJONSANALYSE AV BCE_1118, BCE_1174 OG BCE_1421 I <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987 VED KONVENSJONELL RT-PCR.....	49
4.6	TRANSKRIPSJONSANALYSE AV BCR1_22R OG BCE_1421 I <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987 VED CRT-PCR 51	
4.7	ISOLERING AV RNA FRA <i>B. CEREUS</i> ATCC 14579	58
4.8	TRANSKRIPSJONSANALYSE AV BC1308 I <i>B. CEREUS</i> ATCC 14579 VED CRT-PCR.....	59

4.9	ISOLERING AV RNA FRA <i>B. CEREUS</i> ATCC 10987 OG <i>B. CEREUS</i> ATCC 14579 TIL REAL TIME RT-PCR OG PRIMER EXTENSION	62
4.10	TRANSKRIPSJONSANALYSE AV BCE_1421 I <i>B. CERUS</i> ATCC 10987 OG BC1308 I <i>B. CEREUS</i> ATCC 14579 VED PRIMER EXTENSION.....	64
5.	DISKUSJON	69
5.1	METODER	69
5.1.1	<i>Konvensjonell RT-PCR</i>	69
5.1.2	<i>Real time RT-PCR</i>	69
5.1.3	<i>Sirkulær RT-PCR</i>	70
5.1.4	<i>Primer extension</i>	70
5.2	GENERELL DISKUSJON	71
5.2.1	<i>Transkripsjonsstart for BCE_1421 i B. cereus ATCC 10987 og BC1308 i B. cereus ATCC 14579</i>	71
5.2.2	<i>Kotranskripsjon av bcr1 i 5'-ende av transkripter</i>	71
5.2.3	<i>Prosessering og degradering av mRNA i B. cereus</i>	72
5.2.4	<i>bcr1 som mulig stabilisator i 5'-ende av mRNA</i>	73
5.3	VIDERE STUDIER	74
KILDELISTE	75	

1. Innledning

1.1 *Bacillus*

Bacillus-slekten består av Gram-negative eller Gram-variable stavbakterier. De er fakultativt eller obligat aerobe sporedannere som ofte er å finne i jord. Slekten er svært heterogen, og GC-ratio kan variere fra 32 til 69 % (Priest 1993). Den inkluderer blant annet *Bacillus anthracis*, årsaken til miltbrann, den insektpatogene *Bacillus thuringiensis*, den opportunistisk patogene *Bacillus cereus* og modellorganismen *Bacillus subtilis* (Drobniewski 1993; Madigan, Brock et al. 2006). Artene i slekten har svært ulike egenskaper og er i stand til å leve i et bredt spekter av omgivelser. Psykrofile og termofile arter kan leve ned mot 3°C og opp mot 75°C. Andre arter vokser under ekstreme pH-betingelser, fra pH 2 for de mest acidofile, til pH 10 for de mest alkalifile (Drobniewski 1993).

Universelt for *Bacillus* er evnen til å danne endosporer. Denne egenskapen deler de med bakteriearter fra blant annet slektene *Clostridium*, *Sporosarcina* og *Heliobacterium* (Madigan, Brock et al. 2006). Endosporer er svært hardføre differensierte celler, og deres resistens mot ytre påkjenninger gjør bakteriene i stand til å overleve under ekstreme forhold. Sporulering initieres ved mangel på essensielle næringsstoffer og gir beskyttelse mot blant annet varme, tørke, stråling, pH-variasjoner og cytotoxiske kjemikalier. Endosporen er en dormant utgave av den vegetative cellen, med svært lav eller ingen metabolisme. Den er omgitt av flere lag som ikke er til stede i vegetativ tilstand, deriblant enkelte proteinlag. Disse faktorene kombinert med blant annet et svært høyt innhold av dipikolinsyre-kalsiumkomplekser og et vannfritt indre bidrar til endosporens overlevelsessevne (Madigan, Brock et al. 2006; Setlow 2007). Bakterien er foreslått å kunne overleve i denne formen i over 300 år (Kennedy, Reader et al. 1994). Endosporen kan germinere og returnere til sin vegetative form i nærvær av gitte næringsstoffer (Madigan, Brock et al. 2006).

1.2 *Bacillus cereus*-gruppen

Seks arter omfattes i denne undergruppen av *Bacillus*; *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* og *B. weihenstephanensis* (Jensen, Hansen et al. 2003). Det foreligger lite forskningsdata for de tre sistnevnte artene, men forskning gjort på *B. cereus*, *B. anthracis* og *B. thuringiensis* indikerer at dette er en gruppe av beslektede organismer (Helgason, Økstad et al. 2000; Rasko, Altherr et al. 2005). *B. cereus*, *B. anthracis* og *B. thuringiensis* er av medisinsk, militær og økonomisk interesse, og har blitt studert grundig. *B. cereus* er en opportunistisk patogen bakterie, og kan blant annet forårsake matforgiftning og en rekke opportunistiske infeksjoner (Drobniewski 1993). *B. anthracis* er kjent som årsaken bak miltbrann. Den har lenge vært et viktig patogen i veterinærmedisin, men har i de senere år fått mye medieoppmerksomhet som biologisk våpen og har vært involvert i terrorvirksomhet (Salyers and Whitt 2002). *B. thuringiensis* er en insektpatogen bakterie som blir brukt som biologisk sprøytemiddel (Jensen, Hansen et al. 2003).

Plasmider er genetiske elementer som replikerer uavhengig av kromosomet. Disse bærer gener som er ikke-essensielle, men som ofte kan være av nytte for mikroorganismen ved gitte vekstbetingelser. Mange plasmider kan overføres horisontalt mellom bakterier ved konjugasjon (Madigan, Brock et al. 2006). De spesifikke virulensfaktorene til både *B. anthracis* og *B. thuringiensis* mot henholdsvis pattedyr og insekter er plasmidbårne. Ved tap av disse plasmidene, vil de også tape de fleste egenskapene som skiller dem fra *B. cereus* (Rasko, Altherr et al. 2005).

Genomanalyser viser at de tre artenes kromosom er svært høyt konserverv, og det er foreslått at de rent genetisk burde klassifiseres som en og samme art (Helgason, Økstad et al. 2000; Rasko, Altherr et al. 2005).

1.2.1 *Bacillus cereus*

B. cereus hører naturlig hjemme i jord og som symbiont i insekttarm (Jensen, Hansen et al. 2003), men er å finne i mange nisjer i naturen. Endosporens hardførhet, og det faktum at bakterien er frekvent tilstedeværende, gjør *B. cereus* til en vanlig forurensner i mat og kosmetiske og farmasøytiske produkter (Rasko, Altherr et al. 2005). Den er

opportunistisk patogen, og har vært forbundet med flere infeksjonssykdommer, i hovedsak gastrointestinale (Drobniewski 1993).

Matforgiftning forårsaket av *B. cereus* kan gi to ulike sykdomsforløp. Hvert av disse er forbundet med toksinproduserende stammer. Kvalme og oppkast etter inntak av mat kontaminert med *B. cereus* inntreffer allerede etter 0,5 til 6 timer. Dette kan tyde på at det emetiske toksinet cereulide, som forårsaker disse symptomene, dannes av bakterien i mat og ikke gastrointestinalt (Stenfors Arnesen, Fagerlund et al. 2008). Genene som koder for proteinene bak cereulidesyntesen er betegnet som cereulide synthetase (*ces*), og er å finne på et plasmid omtalt som pBECE4810 (Ehling-Schulz, Fricker et al. 2006) eller pCER270 (Rasko, Rosovitz et al. 2007). Virkningsmekanismen bak de emetiske symptomene er antatt å være stimulering av afferente vagusnerver i duodenum ved binding til 5-HT₃-reseptor (Agata, Ohta et al. 1995). Det andre mulige utfallet av matforgiftning med *B. cereus* er diaré og magesmerter. Mindre er kjent om mekanismene bak disse symptomene, men det antas at de tre cytotoxinene HBL, NHE og CytK kan være involvert (Stenfors Arnesen, Fagerlund et al. 2008). Genene som koder for disse toksinene er kromosomale, i motsetning til *ces*, og er positivt regulert av transkripsjonsregulatoren PlcR (Gohar, Økstad et al. 2002).

Foruten matforgiftning har *B. cereus* vært forbundet med både lokale og systemiske infeksjoner. Av lokale infeksjoner er okulære og kutane de hyppigst rapporterte. Systemiske infeksjoner med *B. cereus* er mindre vanlig, men kan omhandle blant annet endokarditt, meningitt, encefalitt og sepsis (Drobniewski 1993; Kotiranta, Lounatmaa et al. 2000). *B. cereus* er resistent mot enkelte antibiotika. Den er β -laktamaseproduserende, men vanligvis sensitiv for aminoglykosider, klindamycin, vankomycin, kloramfenikol og erytromycin (Drobniewski 1993).

1.2.2 *Bacillus anthracis*

Miltbrann er en sykdom som hovedsaklig rammer husdyr. Sykdomsutbrudd hos mennesker har derfor primært vært registrert hos personer som arbeider med ull, skinn og andre dyreprodukter. Sykdommen forekommer i tre ulike former; kutan,

gastrointestinal og inhalasjonsmiltbrann. Bakterien inntar verten som endosporer før disse germinerer og formerer seg. Når bakteriene etter å ha forlatt verten kommer i kontakt med luft, dannes nye endosporer som kan infisere nye verter. De infeksjøsne sporene har vært benyttet som biologisk våpen (Salyers and Whitt 2002).

Kutan miltbrann er den vanligste og minst alvorlige typen infeksjon. Den oppstår når sporer kommer inn i kutt eller rifter i huden og gir lokal nekrose. Gastrointestinal miltbrann er svært uvanlig og forekommer ved inntak av kontaminert kjøtt (Salyers and Whitt 2002). Den mest alvorlige form av sykdommen kalles inhalasjonsmiltbrann. Inhalerte sporer tas opp av lungemakrofager og germinerer intracellulært i disse (Guidi-Rontani, Pereira et al. 1999; Guidi-Rontani, Weber-Levy et al. 1999). Makrofager som migrerer til lymfeknuter sprer deretter bakteriene til blodbanen og gir den dødelige, systemiske utgaven av sykdommen. Død ved septisk sjokk som følge av *B. anthracis* i blodbanen kan komme få dager etter inhalasjon av endosporer (Salyers and Whitt 2002).

Fullvirulent *B. anthracis* innehar to plasmider som koder de toksiske egenskapene som skiller den fra andre bakterier i *B. cereus*-gruppen. pXO1 koder for produksjon av to ulike toksiner; ødemtoksin og letalt toksin, samt regulatorgener for disse (Rasko, Altherr et al. 2005). Begge er AB-toksiner og har felles membranbindende B-domene; protektivt antigen (PA). Ødemtoksins A-komponent kalles ødem faktor (edema factor, EF) og virker ved å stimulere produksjon av det intracellulære signalmolekylet cAMP. Toksinet har effekt på de fleste celler, og det høye nivået av cAMP gjør at de mister vann og ioner (Abrami, Reig et al. 2005). Letalt toksin (LT) er derimot mer spesifikt. Dets A-domene, letal faktor (LF), er en protease som kløyver mitogenaktiverede proteinkinaser i makrofager. Dette er antatt å gi septisk sjokk etter cytokinfrigjøring fra de angrepne immuncellene (Abrami, Reig et al. 2005). pXO2 er det andre særegne plasmidet for *B. anthracis*. Det inneholder gener for en beskyttende kapsel bestående av en polymer av aminosyren D-glutamat (Salyers and Whitt 2002; Rasko, Altherr et al. 2005).

1.2.3 *Bacillus thuringiensis*

Ettersom den er en svært spesifikk insektpatogen bakterie, er sporene til *B. thuringiensis* godt egnet som insektmiddel. Ved sporulering produserer *B. thuringiensis* proteinkrystaller som kløyves til δ -endotoksiner i fordøyelsessystemet til larven hos flere insektarter. Bakteriens høye spesifisitet gjør den til et relativt miljøvennlig sprøytemiddel av stor økonomisk betydning (Jensen, Hansen et al. 2003; Rasko, Altherr et al. 2005).

Som for *B. anthracis* er egenskapene som skiller *B. thuringiensis* fra *B. cereus* (insektstoksinene) plasmidbårne. pBtoxis inneholder eksempelvis gener som koder for ulike δ -endotoksiner. Plasmidet bærer også gener involvert i krystalliseringen av disse proteinene (Rasko, Altherr et al. 2005). Slike plasmider kan mistes og overføres mellom stammer (Burrus, Pavlovic et al. 2002). Kromosomet er prinsipielt det samme som hos *B. cereus*, inkludert gener for toksinene NHE, HBL og CytK (Rasko, Altherr et al. 2005).

1.2.4 Sekvenserte genomer av stammer i *B. cereus*-gruppen

Det første genomet som ble sekvensert var fra *Haemophilus influenzae* i 1995 (Fleischmann, Adams et al. 1995). Etter dette har totalgenomet fra 994 ulike organismer blitt sekvensert og gjort tilgjengelig for offentligheten, pr mai 2009 (Liolios, Mavrommatis et al. 2008). Sekvenseringsprosjekter som omfatter stammer fra *B. cereus*-gruppen ble påbegynt i etterkant av hendelsene høsten 2001, hvor sporer av *B. anthracis* ble brukt i bioterrorisme (Ivanova, Sorokin et al. 2003; Read, Peterson et al. 2003; Rasko, Ravel et al. 2004). Resultatene fra disse prosjektene har gitt verdifull informasjon om disse stammenes egenskaper og slektskap (Rasko, Rosovitz et al. 2007). Til nå har genomet av 18 stammer i *B. cereus*-gruppen blitt sekvensert og gjort offentlig tilgjengelig (Liolios, Mavrommatis et al. 2008), deriblant *B. cereus* ATCC 10987 (Rasko, Ravel et al. 2004) og *B. cereus* ATCC 14579 (typestamme) (Ivanova, Sorokin et al. 2003), som har blitt studert i arbeidet med denne oppgaven.

1.3 Mobile elementer

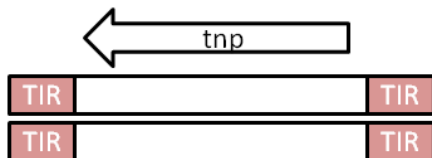
Bakteriekromosomet gjennomgår til enhver tid endringer som følge av opptak, tap, rekombinasjon og mutasjon av gener. Horisontal genoverføring er spesielt viktig i evolusjon av patogene bakterier, ettersom virulensmekanismer og antibiotikaresistens kan overføres ved en enkeltstående hendelse (Hacker, Hentschel et al. 2003). Det foreligger tre kjente mekanismer for horisontal genoverføring mellom prokaryote kromosomer; transformasjon, transduksjon og konjugasjon. Transformasjon er opptak av fritt DNA til en celle hvor dette DNA tidligere er frigitt fra en annen, transduksjon innebærer DNA-overføring via virus (bakteriofager) (Madigan, Brock et al. 2006), mens konjugasjon er direkte celle-til-celle-overføring av plasmid-DNA eller konjugative transposons (Burrus, Pavlovic et al. 2002).

Rearrangering av DNA kan skje ved genetisk rekombinasjon og er en essensiell mekanisme for evolusjon i mange organismer. Det skilles mellom generell rekombinasjon med homologe DNA-sekvenser og setespesifikk rekombinasjon med mobile genetiske elementer (Alberts 2002). Ved setespesifikk rekombinasjon beveger det mobile elementet seg enten innad i eller mellom kromosomer. Denne mekanismen er i motsetning til homolog rekombinasjon styrt av rekombinatoriske enzymer (transposaser) som gjenkjenner korte, spesifikke nukleotidsekvenser (Alberts 2002). Det finnes mange typer mobile elementer og mange mekanismer for seteseleksjon og innsetting (Craig 1997). Flytting av genssekvenser kalles transposisjon og er en viktig evolusjonær, men sjelden hendelse med en frekvens på mellom 10^{-5} og 10^{-7} per generasjon. Mobile elementer kan ha gener som koder for enzymene nødvendig for transposisjon, eller de kan mobiliseres av andre transposaser (Madigan, Brock et al. 2006).

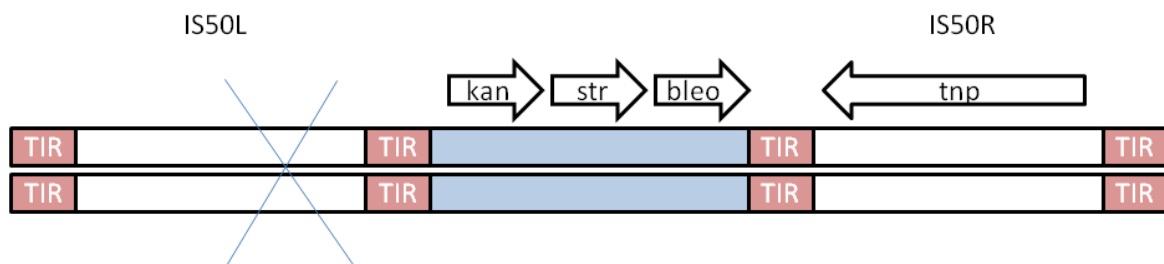
Transposoner og "insertion sequences" (IS-elementer) er to ulike grupper av mobile elementer, og Figur 1-1 og Figur 1-2 illustrerer noe av forskjellen mellom disse. IS er enklere elementer som ikke inneholder annet enn gjenkjennings-domener i hver ende, i tillegg til genet som koder for transposase (Mahillon and Chandler 1998).

Transposoner er større og bærer gjerne flere gener i tillegg til *tra*-gener nødvendig i

transposisjon, for eksempel gener relatert til virulensmekanismer og antibiotikaresistens. Felles for IS-elementer og transposoner er en invertert repetert nukleotidsekvens i hver ende, også kjent som terminal invertert repetert sekvens (TIR) (Madigan, Brock et al. 2006). Disse sekvensene er essensielle for transposisjon, og tydelige kjennetegn for mobile elementer (Madigan, Brock et al. 2006; Delihias 2008).

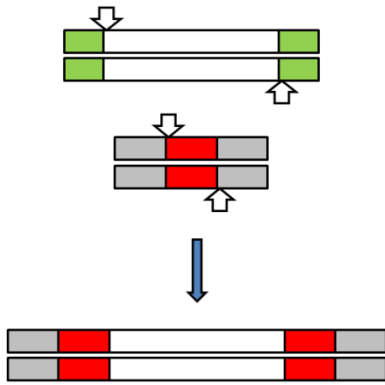


Figur 1-1 IS2 er et IS-element på 1327 bp med terminal invertert repetert sekvens (TIR) på 41 bp. Genet *tnp* koder for transposase (Madigan, Brock et al. 2006).



Figur 1-2 *Tn5* er et sammensatt transposon på 5,7 kbp. Resistensgenene *kan*, *str* og *bleo* gir resistens mot henholdsvis kanamycin, streptomycin og bleomycin. Disse er flankert av de to IS-elementene IS50R og IS50L, hvor IS50L har mutasjon som gjør det avhengig av IS50R for transposisjon. IS50R innehar genet *tnp* som koder for transposase (Madigan, Brock et al. 2006).

Det skiller mellom konservative og replikative transposons. For konservative transposons er antallet kopier i genomet konstant ettersom de fjernes fra et locus før de settes inn i et nytt. Replikative transposons blir derimot, som navnet indikerer, kopiert fra et locus til et annet (Madigan, Brock et al. 2006). Mekanismen er settespesifikk ettersom en gjenkjenningssekvens i DNA er nødvendig for innsetting. Transposasen gjenkjenner og kutter denne sekvensen ved et staggered cut, deretter innsettes transposonet før den kuttete målsekvensen, som nå befinner seg i hver ende av transposonet, og kuttene repareres (Figur 1-3) (Madigan, Brock et al. 2006).



Figur 1-3 Staggered cuts i transposon (hvit boks) og målsekvens (rød boks). Sistnevnte dupliseres ved innsetting av transposon (nederst).

1.4 Repeterte elementer

Bakteriegenomer inneholder ofte repeterte DNA-sekvenser som ikke koder for proteiner, og utgjør ikke-autonome mobile elementer. Mobiliteten er med andre ord styrt av andre transposaser, kodet for på andre steder i genomet (Delihias 2008). Deres rolle er i de fleste tilfeller ukjent, men stadig flere av disse repeterte elementene har blitt assosiert med ulike funksjoner, deriblant promoteraktivitet, regulering av mRNA-stabilitet, terminering av transkripsjon, metyleringssteder og flere egenskaper relatert til genregulering og DNA-opptak og -integrering (Versalovic and Lupski 1998; Hofnung and Shapiro 1999). De er gjerne under 200 baser lange AT-rike elementer. De fleste innehar TIR, som man også finner i transposoner og IS, og har ofte en $5'TA^3'$ -sekvens i både 5'- og 3'-ende (Delihias 2008). De er svært like MITE, en klasse transposable elementer på under 400 bp funnet i eukaryote og archaea (Siguier, Filee et al. 2006). De finnes intragenetisk, men de aller fleste elementene har en intergenetisk lokalisering i kromosomet. En rekke typer elementer fra både Gram-positive og Gram-negative bakterier er karakterisert siden første halvdel av 1980-tallet (Delihias 2008).

1.4.1 Correia/NEMIS

Bakterier i *Neisseria*-slekten innehar fire typer mobile repeterte elementer som kalles Correia eller *Neisseria* miniature insertion sequences (NEMIS). Disse ble oppdaget i de humanpatogene *N. meningitidis* og *N. gonorrhoeae* (Correia, Inouye et al. 1986;

Correia, Inouye et al. 1988). Elementene innehar TIR og flankerende TATA-sekvenser, hvor TA er vist å dupliseres ved innsetting (Mazzone, De Gregorio et al. 2001). Flere genregulatoriske mekanismer har blitt assosiert med disse elementene. NEMIS har åpne leserammer som kan "legge på" ekstra aminosyrer i 5'- eller 3'-ende ved fusjon til eksisterende gener. Det har også blitt oppdaget et bindingssete for integration host factor (IHF) inne i elementet og det er predikert divergente promotere i begge ender (Buisine, Tang et al. 2002). Kotranskribert NEMIS er dessuten antatt å delta i regulering av mRNA-transkript av nabogener. Denne reguleringen foregår ved at elementene danner sekundærstrukturer med hårnåler som kan interagere med RNase III (De Gregorio, Abrescia et al. 2003; Delihis 2008).

1.4.2 ERIC/IRU/RU-1

Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC), også kjent som intergenic repeat units (IRU), ble først oppdaget i *Escherichia coli* og *Salmonella typhimurium* (Sharples and Lloyd 1990). Disse elementene er funnet i flere enterobakterier, innehar åpne leserammer, TIR og flankerende TA-sekvenser. ERIC er predikert å danne sekundærstrukturer med hårnåler *in silico*, og på den måten bidra til regulering av mRNA-stabilitet ved kotranskripsjon. Elementet kotranskriberes med gener både oppstrøms og nedstrøms, men man har observert en destabiliserende effekt for transkripter med ERIC i 3'-ende, og en stabiliserende effekt for transkripter med elementet i 5'-ende. Det er foreslått en mekanisme for dette via interaksjoner med RNase E (De Gregorio, Silvestro et al. 2005).

1.4.3 REP

Repetitive extragenic palindromic (REP), er et annet element funnet i *E. coli* og *S. typhimurium* (Gilson, Clement et al. 1984; Stern, Ames et al. 1984). Elementet er betydelig kortere enn NEMIS og ERIC, og består kun av 35 nukleotider. Likevel kan det utgjøre opptil 1 % av genomet (Stern, Ames et al. 1984). Elementet er vist å regulere nærliggende gener ved kotranskripsjon. Dette foregår ved hjelp av elementets stabile sekundærstrukturer som kan forhindre eksonukleolytisk angrep fra ribonukleaser fra 3'-enden (Newbury, Smith et al. 1987).

1.4.4 RUP

Det er i stammer av *Streptococcus pneumoniae* funnet 108 eksemplarer av repeat unit of pneumococcus (RUP). RUP er 107 bp og lokalisert intergenetisk, og også dette elementet innehar TIR og flankerende TA-sekvenser. RUP er foreslått å være en rest av en insertion sequence (IS) kalt IS630-spn1 og å kunne regulere IS-transposasegener (Oggioni and Claverys 1999).

1.4.5 BOX

BOX er et repetert, mobilt element funnet i intergenetiske regioner i kromosomet til *S. pneumoniae*. Elementet er bygget opp av tre subenheter i ulike kombinasjoner; boxA, boxB og boxC, på henholdsvis 59, 45 og 50 bp (Martin, Humbert et al. 1992). Det er vist at BOX ved kotranskripsjon i 5'-ende kan stimulere uttrykk av nedstrøms gener ved å stabilisere mRNA-transkripter (Knutsen, Johnsborg et al. 2006).

1.4.6 Repeterte elementer i *Bacillus cereus*-gruppen

Bacillus cereus-gruppen av bakterier innehar 18 identifiserte grupper av repeterte elementer, hvorav 14 kun er lokalisert kromosomalt (Tourasse, Helgason et al. 2006). Disse repeterte elementene kan igjen deles inn i to hovedgrupper. Den første av disse er sekvenser som er til stede i flere kopier i hver stamme, men i varierende genomiske loci (*bcr1-bcr6* og *bcr12*). Den andre gruppen utgjør homologe intergenetiske regioner lokalisert i konserverte loci (*bcr7-bcr11*, *bcr13-bcr18*). *bcr1*, beskrevet i 1.4.7, er ~155 bp (Tourasse, Helgason et al. 2006), og er til nå funnet i mellom 17 (*B. anthracis* Ames Ancestor) og 116 (*B. weihenstephanensis* KBAB4) kopier i ulike stammer, *bcr2* er et element på 134 bp funnet i fra 14 til 51 kopier og *bcr3* er 140 bp og funnet i fra 12 til 23 kopier. De resterende elementene er til stede i lavere antall.

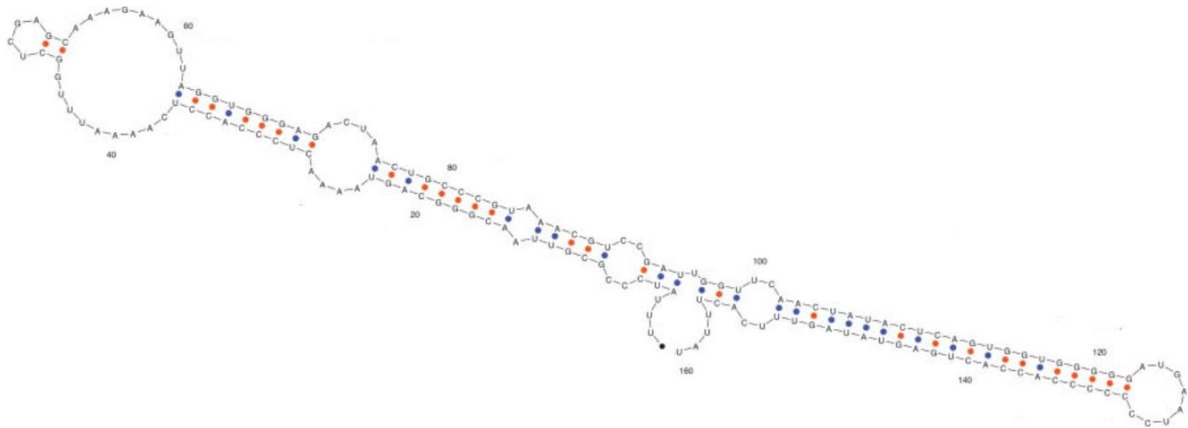
1.4.7 *Bacillus cereus* repeat 1

bcr1 er et ~155 bp repetert element oppdaget ved sekvensanalyse (Økstad, Hegna et al. 1999). Det er til stede i kromosomet til alle bakterier i *Bacillus cereus*-gruppen, men har til nå ikke vært detektert utenom denne gruppen (Klevan, Tourasse et al.

2007). Den viser en ulik fordeling og plassering mellom stammer, et typisk tegn på mobilitet. Elementet er lokalisert hovedsakelig inter-, men også i enkelte tilfeller intragenetisk på kromosomet. Det er til nå ikke funnet på plasmider (Økstad, Tourasse et al. 2004).

Den kromosomale fordelingen mellom stammer er heterogen, og det finnes kun ett felles *bcrI*-locus mellom *B. cereus* ATCC 10987, *B. cereus* ATCC 14579 og *B. anthracis* Ames (Økstad, Tourasse et al. 2004). Elementet er flankert av en direkte repetert TTTAT-sekvens i hver ende. En TTTAT-sekvens er også til stede i korresponderende loci uten det aktuelle *bcrI*-elementet i andre stammer, noe som indikerer at TTTAT kan være et innsetningssete for *bcrI*. Det har vært foreslått en transposonlignende integreringsmekanisme på grunnlag av de flankerende TTTAT-sekvensene, hvor denne sekvensen kan kopieres ved staggered cuts som beskrevet for transposons (Figur 1-3). Eventuelt kan den bevegelige formen av *bcrI*-elementet inneha en kopi av TTTAT og settes inn i kromosomet ved setespesifikk rekombinasjon (Økstad, Tourasse et al. 2004).

Flere mulige funksjoner har vært foreslått for *bcrI*, deriblant stabilisering av mRNA, promoteraktivitet og terminering av transkripsjon (Økstad, Tourasse et al. 2004). *bcrI*-transkripter er påvist ved Northern blot, og *in silico*-undersøkelser av mRNA-folding av *bcrI* har predikert en sekundærstruktur formet som en dobbel hårnål med høy predikert stabilitet (Figur 1-4). Man har også observert kompensatoriske mutasjoner som kan bidra til å opprettholde sekundærstrukturen, en indikasjon på at denne er viktig for elementets funksjon og/eller mobilitet (Klevan, Tourasse et al. 2007).



Figur 1-4 Predikert RNA-sekundærstruktur av *bcr1_77R* fra *B. cereus* ATCC 10987. Figuren er hentet fra (Klevan, Tourasse et al. 2007)

1.5 Aktuelle genloci

bcr1 er lokalisert intragenetisk, i større intergenetiske regioner, mellom gener i operons, rett nedstrøms, og rett oppstrøms for gener. *bcr1*-loci kan være variable eller i enkelte tilfeller konserverte mellom stammer. Det var i arbeidet med denne oppgaven først og fremst relevant å studere loci hvor *bcr1* er plassert rett oppstrøms for et nærliggende gen.

Følgende genloci har blitt studert i denne oppgaven:

bcr1_18F er lokalisert 87 bp oppstrøms for BCE_1118 i *B. cereus* ATCC 10987, et gen som koder for RNA-polymerase faktor σ^{70} . Elementet er ikke konserverte i *B. cereus* ATCC 14579.

BCE_1174 i *B. cereus* ATCC 10987 koder for et hypotetisk protein, og har *bcr1_20R* lokalisert 9 bp oppstrøms.

BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 er ortolog til BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579, og koder for en putativ nitrittransporter. *bcr1_22R* er lokalisert 30 bp oppstrøms for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987, men er ikke konserverte i *B. cereus* ATCC 14579.

1.6 Problemstilling

De mobile repeterte elementene NEMIS, ERIC, REP og BOX er foreslått å kunne regulere uttrykk av nærliggende gener på RNA-nivå. Alle disse elementene danner stabile sekundærstrukturer med hårnålformer ved kotranskripsjon med nærliggende gener.

bcr1 er *in silico* predikert å danne stabile sekundærstrukturer med et dobbel-hårnållignende mønster (Klevan, Tourasse et al. 2007). Det er mulig å fremsette en hypotese om at *bcr1* kan regulere genekspresjon ved en mekanisme lignende den funnet for NEMIS og ERIC, dersom elementet kan kotranskriberes med nabogener.

Målet for denne oppgaven var derfor å undersøke ved revers transkriptase-PCR om *bcr1* kunne kotranskriberes med nabogen i *B. cereus*-gruppen av bakterier, og ved cRT-PCR og primer extension å bestemme nøyaktig transkripsjonsstart for gener med *bcr1* lokalisert oppstrøms, for dermed å påvise kotranskripsjon av *bcr1* i sin helhet med nabogener. Vi ønsket også å studere om cRT-PCR kunne identifisere mulige mRNA-degraderingsprodukter fra de korresponderende loci.

2. Materialer

2.1 Bakteriestammer

Bacillus cereus ATCC 10987

AH 75. Isolert fra bedervet ost i Canada i 1930 (Rasko, Ravel et al. 2004).

Bacillus cereus ATCC 14579

AH 1448. Typestammen for *B. cereus*.

E. coli XL1-Blue MRF' strain^a

Elektrokompetente celler (Stratagene).

Genotype: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96relA1 lac [F' proAB lacI}_{\Delta}Z\Delta\text{M15 Tn10 (Tet.)}]$

2.2 Reagenser

Akrylamid/N,N'-metylen-bis-akrylamid 19:1 40 %	Bio-Rad
Agar nr 11	Oxoid
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
dATP 100 mM	Promega
dCTP 100 mM	Promega
DEPC	Sigma
DEPC-behandlet vann	Ambion
dGTP 100 mM	Promega
dTTP 100 mM	Promega
Dimetylformamid	Sigma
Etanol Absolutt alkohol prima	Arcus kjemi
Etidiumbromid	Sigma
Fenol:kloroform (pH 4,5)	Ambion
Ficoll	Calbiochem
Gel loading buffer II	Ambion
Gjærekstrakt	Oxoid
Glukose	Merck
HCl 5,8 M	J. T. Baker
Isopropanol prima	Arcus kjemi
Kaliumklorid	BDH Prolabo
Kanamycin 50 mg/ml	Sigma
Lineær akrylamid 5 mg/ml	Ambion

Magnesiumklorid	Merck
β -Merkaptoetanol	Sigma
Metanol	Merck
Na EDTA	M & B
NaOH	Merck
Natriumklorid	J. T. Baker
Natriumacetat 3 M pH 5,5	Ambion
NuSieve GTG Agarose	Cambrex
Orange G	Merck
pBR322 DNA MspI Digest	New England Biolabs
Tetrametyletylendiamin	Sigma
Tris-base	Sigma
Trypton	Oxoid
Urea	Invitrogen
X-gal	Saveen Werner

2.3 Enzymer og enzymløsninger

DNase I	Amersham Biosciences
Buffer RDD	Qiagen
DyNAzyme II DNA polymerase	Finnzymes
10X buffer for DyNAzyme	Finnzymes
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	Roche
PFU TURBO DNA polymerase	Stratagene
10X PFU-buffer	Stratagene
Super RNase Inhibitor	Ambion
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen
5X First Strand buffer	Invitrogen
DTT	Invitrogen
T4 RNA-ligase	New England Biolabs
10X T4-buffer	New England Biolabs
TAP	Epicentre
10X TAP-buffer	Epicentre

2.4 Kits

fmol DNA cycle Sequencing System	Promega
Qiaquick Gel Extraction kit	Qiagen
Qiaprep Spin Miniprep kit	Qiagen
RNeasy Mini kit	Qiagen
TOPO TA Cloning kit	Invitrogen

2.5 Løsninger

Ampicillin 100 mg/ml

2 mg Ampicillin
19 ml Milli-Q H₂O (MQ-H₂O)
Ble alikvotert i sterile 1,5 ml eppendorfrør. Ble oppbevart ved -20°C.

DEPC-behandlet H₂O

2,5 ml DEPC
2,5 l MQ-H₂O
Ble stående over natt ved romtemperatur. Ble autoklavert, og lagret ved romtemperatur.

dNTP 10 mM

10 µl dATP (100 µM)
10 µl dCTP (100 µM)
10 µl dGTP (100 µM)
10 µl dTTP (100 µM)
60 µl MQ-H₂O
Ble oppbevart ved -20°C.

EDTA 0,5 M pH 8,0

186,1 g EDTA
800 ml MQ-H₂O
21 g NaOH lutperler
ad 1000 ml MQ-H₂O
Ble blandet godt, og autoklavert.

Etidiumbromid 5 mg/ml

0,5 g Etidiumbromid
100 ml H₂O
Ble blandet med magnetrører i flere timer. Ble lagret beskyttet mot lys ved romtemperatur.

KCl (250 mM)

1,86 g KCl
100 ml MQ-H₂O

MgCl₂ 1 M

203,30 g MgCl₂
ad 1000 ml MQ-H₂O
Ble autoklavert.

Orange Mix

20 g Ficoll
0,25 g Orange G
4 ml EDTA 0,5 M
100 ml MQ-H₂O

Stock ble oppbevart ved -20°C. Bruksløsninger ble oppbevart ved romtemperatur.

pBR

50 µl pBR322 DNA MspI Digest
125 µl Orange Mix
325 µl MQ-H₂O
Ble oppbevart ved romtemperatur.

Primerløsninger

q.s. Primer
ad 100 µM MQ-H₂O
Ble oppbevart ved -20°C.

50X TAE

242,0 g Tris-base
57,1 ml cons.acetic acid.ised
100 ml EDTA
ad 1000 ml MQ-H₂O
Ble ikke autoklavert. Ble oppbevart ved romtemperatur.

10X TBE

108,0 g Tris-base
55,0 g Borsyre
9,3 g EDTA
ad 1000 ml MQ-H₂O
Ble ikke autoklavert. Ble oppbevart ved romtemperatur.

X-gal (20 mg/ml)

600 mg 5-bromo-4-kloro-3-idolyl-β-galaktosidase
ad 30 ml Dimetylformamid
Ble oppbevart beskyttet mot lys ved -20°C.

2.6 Dyrkingsmedier

LB-agar (flasker)

3,14 g Agar nr 11
250 ml LB-medium

Løsningen ble autoklavert, og blandet godt. Oppbevares ved 4°C.

LB-agar (skåler)

10 g Trypton
5 g Gjærekstrakt
10 g NaCl
ad 1000 ml MQ-H₂O
pH ble justert til 7,0 med ca 3 dråper 5,8 M HCl
12,5 g Agar nr 11
Løsningen ble autoklavert.

LB-medium

10 g Trypton
5 g Gjærekstrakt
10 g NaCl
ad 1000 ml MQ-H₂O
pH ble justert til 7,0 med ca 3 dråper 5,8 M HCl
Løsningen ble autoklavert.

SOC-medium

20 g Trypton
5 g Gjærekstrakt
0,5 g NaCl
990 ml MQ-H₂O
10 ml KCl 250 mM
pH justeres til 7,1 med 5,8 M HCl
Løsningen ble autoklavert, følgende ble tilsatt sterilt:
10 ml MgCl₂ (1 M)
20 ml Glukose (1 M)

3. Metoder

3.1 Vekstkurve

I en isolert batch vil en bakteriekultur følge en gitt vekstsyklus. Etter en kortere lagfase følger en fase med eksponentiell vekst. Under eksponentiell fase er det overskudd av medium og antall bakterier i mediet dobles for hver generasjonstid. Etter at tilgang til essensielle næringsstoffer begrenses eller at avfallstoffer akkumuleres til et visst punkt, vil veksten stabiliseres. Kulturen når da stasjonær fase, og antall celler er konstant ettersom vekstraten utliknes av dødsraten. Ved vedvarende inkubering, vil kulturen til slutt gå tom for næringsstoffer og nå en dødsfase (Madigan, Brock et al. 2006). Gener uttrykkes i ulik grad avhengig av vekstfase. I analytisk arbeid med bakterier generelt og ved transkripsjonsanalyse spesielt er det viktig å vite ved hvilket punkt i vekstkurven ulike prøver er isolert fra. Det ble beregnet en vekstkurve basert på målinger under standardiserte vekstbetingelser.

1. Frysekultur lagret ved -80°C ble strøket ut med steril øse på skåler med LB-agar.
2. Skålene ble inkubert i Termaks varmeskap ved 30°C over natt.
3. Enkeltkolonier fra punkt 2 ble overført med steril øse til 50 ml sterilinrør med 5 ml LB-medium.
4. Sterilinrør med bakteriekultur ble inkubert i Inova 4200 incubator shaker (New Brunswick Science) ved 30°C , 250 rpm over natt.
5. Overnattkultur (250 μl) ble overført til 2,8 l erlenmeyerkolbe med spor (Bellco Biotechnology) med 250 ml LB-medium forhåndsvarmet til 30°C .
6. Erlenmeyerkolbe med bakteriekultur ble inkubert i Inova 4330 refrigerated incubator shaker ved 30°C , 250 rpm.

7. OD₆₀₀-målinger ble utført (Eppendorf Bio Photometer) etter 60, 90 og 150 minutter. Deretter ble det gjort målinger hvert kvarter. Prøvene ble også undersøkt ved mikroskopering.

3.2 RNA-isolering

RNA-isolering ble utført med RNeasy Mini RNA-isoleringskit fra Qiagen.

Prosedyren er basert på selektiv binding til en silikabasert membran. Dette muliggjør isolering av opptil 100 µg RNA av lengde over 200 nukleotider. Bakterieprøvene ble lysert mekanisk ved hjelp av Precellys 24 lysis & homogenization-apparat (Bertin Technologies), i nærvær av denaturerende RLT-buffer tilsatt 1 % v/v β-merkaptoetanol for å hindre RNase-aktivitet og bedre kvaliteten på sluttproduktet. Den lyserte prøven ble deretter blandet med 70 % etanol og overført til kolonne. RNA bindes til kolonnematerialet mens urenheter vaskes bort. Til slutt ble rensset RNA eluert i 100 µl vann i et 1,5 ml RNasefritt eppendorfrør.

1. Bakteriekultur fra frysestock (-80°C) ble sådd ut i 50 ml sterilinrør med 5 ml LB-medium.
2. Sterilinrør med bakteriekultur ble dyrket over natt i Inova 4200 incubator shaker (New Brunswick Science) ved 30°C, 250 rpm.
3. Overnattekultur (250 µl) ble overført til 250 ml LB-medium, ferdig oppvarmet til 30°C, i 2,8 l erlenmeyerkolbe med spor (Bellco Biotechnology).
4. Bakteriekultur ble tatt ut etter 3 timer (20 ml), og etter 8 timer (5 ml), for å få prøver fra eksponentiell og posteksponentiell vekstfase.
5. Iskald metanol (1x volum) ble tilsatt de uttatte prøvene og blandet.
6. Prøvene ble oppbevart ved romtemperatur i 2 min.
7. Prøvene ble sentrifugert i Sorvall RC3C Plus sentrifuge ved 4000x g i 5 min.
8. Supernatant ble fjernet ved dekantering og pipettering.

-
9. Pellet ble oppbevart ved -80°C frem til isoleringen ble gjennomført.
 10. Pellet ble resuspendert i buffer RLT tilsatt 1 % (v/v) β -merkaptoetanol. Pellet fra 3-timerskultur ble resuspendert i 3 ml buffer, pellet fra 8-timerskultur i 9 ml buffer.
 11. Hver prøve (1 ml) ble overført til 3 Precellysrør og lysert med Precellys 24 lysis & homogenization-apparat (Bertin Technologies) i to intervaller, hver ved 6500 rpm i 23 sek med 20 sek pause mellom intervallene.
 12. Lyserte bakterieprøver ble sentrifugert (Biofuge fresco, Heraeus sentrifuges) ved 13000 rpm og 4°C i 30 sek.
 13. Lysert bakterieprøve (925 μl) ble overført til RNasefritt 2 ml eppendorfrør med 925 μl 70 % etanol.
 14. 700 μl suspensjon fra punkt 13 ble overført til RNeasy mini kolonne. Kolonnen ble sentrifugert (Biofuge fresco, Heraeus sentrifuges) ved 13000 rpm og 4°C i 20 sek. Filtrert væske ble kastet.
 15. Nye 700 μl suspensjon fra punkt 13 ble overført til samme kolonne og sentrifugert som i punkt 14.
 16. Resten av suspensjonen fra punkt 13 ble overført og sentrifugert som i punkt 14.
 17. Kolonnen ble vasket med 350 μl buffer RW1 og sentrifugert som i punkt 14.
 18. Løsning av DNase I (10 μl) ble fortynnet i 70 μl buffer RDD. Av denne fortynningen ble 80 μl applisert på kolonnen fra punkt 17.
 19. Prøven ble DNase-behandlet på kolonne ved romtemperatur i 15 min.
 20. RNA-isolering ble utført videre som beskrevet i RNeasy Mini Handbook (Qiagen).
 21. RNA ble eluert i 100 μl DEPC-behandlet vann og alikvotert i 5 ulike 1,5 ml eppendorfrør med 20 μl i hvert og oppbevart ved -80°C .

3.3 DNase-behandling

For å unngå falske positive resultater i metoder som for eksempel RT-PCR er det nødvendig å fjerne DNA-kontaminasjon fra RNA-prøven. TURBO DNA-free DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion) er et kit beregnet for fjerning av DNA i slike prøver. DNase-behandlingen ble utført som beskrevet i TURBO DNA-free protokoll (Ambion).

3.4 Revers transkripsjon

cDNA-syntese er det første trinnet ved RT-PCR. Random Hexamers er en blanding av alle kombinasjoner av mulige hekstranukleotider, bindes molekyluspesifikt til mRNA og vil utgjøre 5'-enden av en cDNA-kopi etter revers transkripsjon. Ønskes en genselektiv syntese brukes genspesifikke primere i stedet for primere med tilfeldige bindingssteder (Sambrook and Russell 2001). Primerne ble etter hybridisering til mRNA elongert av SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen), en RNA-avhengig DNA-polymerase. Inkubering ble foretatt på GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) eller PXE 0,2 Thermal Cycler (Thermo Electron Company).

1. Følgende ble blandet i et 0,2 ml RNasefritt rør:

- 1 µl Random Hexamer (Invitrogen)
- 1 µg DNasebehandlet RNA
- 1 µl dNTP-løsning
- ad 13 µl med DEPC-behandlet vann

2. Blandingen ble denatureert ved 65°C i 5 min, og deretter inkubert ved 4°C i 1 min.

3. Masterløsning ble tilsatt. Kontrollprøver ble tilsatt masterløsning med DEPC-behandlet vann i stedet for revers transkriptase:

- 4 µl 5X SuperScript buffer
- 1 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl Super RNase Inhibitor (2 U/µl)
- 1 µl SuperScript Reverse Transcriptase III/DEPC-behandlet vann

-
4. Prøvene ble blandet forsiktig ved pippettering.
 5. 25°C i 5 min.
 6. Reaksjonen ble gjennomført ved 50°C i 50 min.
 7. Enzymet ble inaktivert ved å heve temperaturen til 70°C i 15 min.

3.5 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

PCR er en effektiv metode for amplifisering av en gitt DNA-sekvens. Et sett av to oligonukleotider komplementære til 3'-enden på leading og lagging strand, bindes til templatet og virker som primere for det nye transkriptet. Enzymet DyNAzyme II DNA Polymerase syntetiserer DNA fra primerne. Denaturering av DNA, binding av primere (annealing) og syntetisering av DNA (polymerisering) bringes frem ved temperaturjusteringer. Disse reaksjonene ble utført syklisk på GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) eller PXE 0,2 Thermal Cycler (Thermo Electron Company). Hver syklus gir en dobling av antall templat. Siden hvert PCR-produkt igjen fungerer som templat i neste syklus skjer en eksponentiell oppformering av den gitte DNA-sekvensen (Sambrook and Russell 2001; Alberts 2002). cDNA-syntese er beskrevet i 3.4.

1. Følgende reagenser ble tilsatt til 0,2 ml PCR-rør i angitt rekkefølge:

- 2 µl cDNA
- 5 µl forwardprimer (2 µM)
- 5 µl reversprimer (2 µM)

2. Følgende reagenser i angitt rekkefølge og mengdeforhold ble blandet som masterløsning i 1,5 µl eppendorffrør:

- 1 µl dNTP
- 5 µl 10X buffer for DyNAzyme
- ad 49 µl MQ-vann
- 1 µl 2 U/µl DyNAzyme II DNA Polymerase

3. Masterløsning (38 µl) fra punkt 2 ble tilsatt PCR-rør fra punkt 1.

4. Polymerasen ble varmeaktivert ved å øke temperaturen i reaksjonsløsningen til 95°C i 5 min.
5. DNA ble denaturert ved å holde reaksjonsløsningen på 95°C i 30 sek.
6. For å muliggjøre binding av primere til templat ble temperaturen senket i 30 sek. til 50-65°C.
7. Optimal elongeringstemperatur for denne polymerasen er 72°C. Den syntetiserer DNA med en hastighet på 1,3-1,5 kbp i minuttet. Lengden på den aktuelle sekvensen avgjorde derfor hvor lenge reaksjonsløsningen ble holdt ved 72°C.
8. Trinn 5-7 ble gjentatt syklisk 20-35 ganger.
9. Reaksjonsløsningen ble deretter holdt på 72°C i 7 min for å sørge for elongering av alt enkelttrådet DNA i løsningen.

3.6 Real time PCR

Real time PCR følger samme prinsipp som konvensjonell PCR. Den relative mengden templat i løsning før reaksjonsstart og under reaksjonen kan beregnes ved hjelp av SYBR Green, et cyaninfargestoff som bindes til dobbeltrådet DNA. Komplekset av fargestoff og DNA absorberer blått lys ($\lambda_{\text{maks}} = 488 \text{ nm}$) og emitterer grønt lys ($\lambda_{\text{maks}} = 522 \text{ nm}$). Dette kan måles med LightCycler 480 (Roche). Antall sykluser som behøves for å gi nok dobbeltrådet DNA til å gi et detekterbart signal (C_t), er omvendt proporsjonalt med mengden av det aktuelle templatet i løsning før reaksjonsstart (Zipper, Brunner et al. 2004). cDNA-syntese er beskrevet i 3.4.

1. cDNA (2 μl) fortynnet 1:5 ble påført i en 96-brønnsplate (Bioplastics)
2. Primerløsning ble laget med følgende reagenser i angitt mengdeforhold:

- 1,5 μl forwardprimer (5 μM)
- 1,5 μl reversprimer (5 μM)
- 7,5 μl SYBR Green masterløsning
- 0,5 μl MQ-vann

-
3. Primerløsning (18 μ l) fra punkt 2 ble tilsatt cDNA fra punkt 1.
 4. PCR-reaksjonen angitt i 3.3 ble utført med følgende innstillinger:
 - 4a. Polymerasen ble varmeaktivert ved å øke temperaturen i reaksjonsløsningen til 95°C i 5 min.
 - 4b. DNA ble denaturert ved å holde reaksjonsløsningen på 95°C i 10 sek.
 - 4c. For å muliggjøre binding av primere til templat ble temperaturen senket i 10 sek til 50-65°C avhengig av primernes smeltetemperatur.
 - 4d. Optimal elongeringstemperatur for denne polymerasen er 72°C. Den syntetiserer DNA med en hastighet på 25 baser i sekundet. Lengden på den aktuelle sekvensen avgjorde derfor hvor lenge reaksjonsløsningen ble holdt på 72°C.
 - 4e. Trinn 5-7 ble gjentatt syklisk 45 ganger.
 - 4f. Smeltepunktsmålinger for primerne ble utført

3.7 TAP-behandling

Uprosessert mRNA har trifosfat bundet til 5'-enden. Tobakksyrepyrofosfatase (TAP) er et enzym som kan konvertere trifosfat i 5'-enden av mRNA til monofosfat. Dette muliggjør senere liggering av 5'- og 3'-ende av mRNA (Bensing, Meyer et al. 1996).

1. Følgende reagenser ble blandet i 0,5 ml RNase-fritt rør på is i angitt rekkefølge. Negativ kontrollprøve tilsettes 2,5 μ l DEPC-behandlet vann i stedet for enzym:

- 30 μ l DEPC-behandlet vann
- 10 μ g RNA
- 2,5 μ l Super RNase Inhibitor (2 U/ μ l)
- 5 μ l 10X TAP reaksjonsbuffer
- 2,5 μ l TAP (1 U/ μ l)

2. Reaksjonsløsningen ble inkubert ved 37°C i 1 time.

3.8 Ligeringsreaksjon

T4 RNA-ligase er en ATP-avhengig ligase som katalyserer dannelsen av en fosfodiesterbinding mellom 5' og 3'-ende av RNA. Ved å tilsette T4 RNA ligase til en løsning med tilstrekkelig lav RNA-konsentrasjon, kan man sirkularisere RNA-molekylene ved intramolekylær binding av 5'- og 3'-ende. Lav konsentrasjon favoriserer intramolekylær binding.

1. RNA (4 µl) ble overført til 1,5 ml RNase-fritt eppendorffrør.
2. Følgende reagenser i angitt mengdeforhold ble blandet som masterløsning. Negativ kontrollprøve tilsettes 1 µl DEPC-behandlet vann i stedet for enzym:

2 µl Super RNase Inhibitor (20 U/µl)
40 µl 10X T4 RNA ligasebuffer
1 µl T4 RNA ligase (20 U/µl)
353 µl DEPC-behandlet vann

3. Masterløsning (396 µl) fra punkt 2 ble tilsatt RNA i rør fra punkt 1.
4. Ligeringsreaksjonen ble inkubert ved 16°C over natt.

3.9 Fenolrensing av RNA

I en rekke av reaksjoner vil reagenser fra en foregående reaksjon kunne forstyrre senere reaksjoner. Det kan derfor være nødvendig å rense RNA-løsningen mellom ulike trinn i reaksjonsrekken ved ekstraksjon med sur fenol:kloroform (pH 4,5). Mange av forurensningene vil gå over i den organiske fasen mens RNA blir værende i vannfasen. RNA-løsningene som ble rensset med sur fenol:kloroform hadde et volum på 100 µl eller 400 µl.

- 1.1x volum fenol:kloroform ble tilsatt den aktuelle løsningen.
2. Reagensene ble vortexet i 10 sek.

-
3. Blandingen ble sentrifugert (Biofuge fresco, Heraeus sentrifuges) ved 10000 rpm og 4°C i 10 min.
 4. Vannfasen ble ekstrahert og overført til et nytt RNase-fritt eppendorffrør.
 5. Lineær akrylamid (1 µl) ble tilsatt løsningen.
 6. 0,1x av utgangsløsning med Natriumacetat (3 M, pH 5,2) ble tilsatt vannfasen for å felle ut RNA.
 7. 3x volum 100% etanol ble tilsatt løsningen.
 8. Løsningen ble oppbevart ved -20°C i 15-30 min.
 9. Løsningen ble sentrifugert (Biofuge fresco, Heraeus sentrifuges) ved 13000 rpm og 4°C i 15 min.
 10. Supernatant ble pipettert bort.
 11. 70% etanol (500 µl) ble tilsatt pellet.
 12. Pellet ble vasket godt ved vortexing til den løsnet.
 13. Pellet ble sentrifugert som i punkt 3.
 14. Supernatant ble pipettert bort.
 15. Pellet ble sentrifugert (Biofuge fresco, Heraeus sentrifuges) ved 13000 rpm og 4°C i 30 sek
 16. Siste rest av supernatant ble pipettert bort.
 17. Pellet ble lufttørket i ~5 min til all etanol var fordampet.
 18. DEPC-behandlet vann (10 µl) ble tilsatt for å løse opp pellet.
 19. Ligering eller revers transkriptase ble påbegynt umiddelbart etter fenolrensing.

3.10 Gelelektroforese

Elektroforese gjennom agarose eller polyakrylamid kan brukes til å separere, identifisere og rense DNA- og RNA-fragmenter. Polynukleotider er negativt ladd og vil migrere mot katoden om de utsettes for elektromotorisk spenning. Appliseres molekylene på en porøs gelmatriks, vil denne separere dem etter molekylstørrelse i det de vandrer mot katoden. Etidiumbromid er et fluorescerende fargestoff som bindes til DNA og RNA, men som fluorescerer mye sterkere med dobbeltrådet enn enkeltrådet DNA. Dette gjør molekylene synlige under UV-bestråling (Sambrook and Russell 2001). I dette arbeidet har agarose blitt brukt til identifikasjon, separasjon og rensing av DNA, og kvalitetsvurdering av RNA. Polyakrylamid har blitt brukt til primer extension. Agarosegelene har blitt støpt med konsentrasjoner fra 0,8 – 3,0 % (w/v), avhengig av størrelsen på de aktuelle fragmentene som skulle separeres. Agarose har blitt løst i TBE-buffer ved DNA-analyse og TAE-buffer ved RNA-analyse. Bio-Rad Power Pack 300 har blitt brukt som spenningskilde. Agarosegeler ble laget som beskrevet under.

1. Agarose ble løst i 1X buffer (TAE eller TBE).
2. Løsningen ble varmet til kokepunktet i mikrobølgeovn, avbrutt av omrøring, inntil all agarose var løst.
3. Løsningen ble nedkjølt til 50°C på vannbad.
4. Etidiumbromid (5 mg/ml) ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,5 µg/ml.
5. Agaroseløsningen ble støpt i GNA-200 Gel electrophoresis apparatus eller Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad).

6 % polyakrylamidgel ble laget som beskrevet under.

1. Følgende ble blandet i angitt mengdeforhold:

126 g urea
30 ml TBE (10X)
45 ml 40 % akrylamid
ad 300 ml MQ-H₂O

2. Akrylamid ble polymerisert ved å tilsette Temed og APS til sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 0,08 % og 0,8 %.

3. Polyakrylamidgel ble støpt i Horizon 58 (Life technologies).

3.11 Gelrensing

Før sekvensering eller kloning ble DNA-fragmenter separert ved agarose-gelelektroforese, skåret ut med steril skalpell og gelrenset ved hjelp av Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen). Metoden ble utført som beskrevet i Qiaquick Spin handbook. Prøven ble eluert i 25 µl elueringsbuffer som fulgte med kitet.

3.12 Kloning

Kloning brukes for å amplifisere DNA-sekvenser. DNA-fragment kan liggeres til en plasmidvektor som senere transformeres inn i en celle. Deretter følger en screening for å selektere ut celler hvor transformasjonen har vært vellykket. I arbeidet med denne oppgaven ble TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) benyttet. Gelrenset PCR-produkt (3.11) ble ligert til pCRII-TOPO kloningsvektor. PCR-produktet har etter avsluttet elongering fått et deoksyadenosin i 3'-endene. Denne basen bindes til et overheng av deoksytymidin på plasmidvektoren. Etter at PCR-produktet var integrert i plasmidet, ble det transformert i *E.coli* XL1-Blue MRF['] strain^a (Stratagene) ved hjelp av elektroporering. Cellemembranes permeabilitet økes da ved å utsette cellene for en elektrisk puls. Dette muliggjør opptak i cellen av større molekyler som det aktuelle plasmidet. Kloningsvektoren inneholdt gener for resistens mot ampicillin og

kanamycin. Ved dyrking på medium tilsatt disse antibiotika, selekteres kun celler som har tatt opp plasmid og dermed blitt resistente. Dersom ligeringen har vært vellykket, vil PCR-produktet ha blitt inkorporert i genet *lacZ*. *lacZ*-genet blir dermed brutt opp og bakterien vil ikke uttrykke genproduktet β -galaktosidase. Dette enzymet kløyver X-gal på skålen og gir et uløselig blått produkt. Ved å velge kolonier uten den karakteristiske blåfargen selekterer man bakterier hvor kloningen har vært vellykket (Sambrook and Russell 2001).

1. Ligeringsreaksjonen ble utført som beskrevet i TOPO TA Cloning User Manual.
2. Reaksjonsløsningen ble dialysert i 30 min ved hjelp av Membrane Filters fra Millipore: Reaksjonsløsningen ble applisert på Membrane Filters i et lite kar med MQ-vann.
3. Dialysert løsning (2 μ l) ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør med elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' strain^a (Stratagene).
4. Eppendorfrør med celler og kloningsvektor ble oppbevart på is i 1 min.
5. Reaksjonsløsningen ble overført til Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad) og elektroporert ved hjelp av Bio-Rad Gene pulser II ved 2,5 V.
6. Elektroporert bakteriekultur ble overført til 1,5 ml eppendorfrør med 800 μ l SOC-medium.
7. Kulturen ble inkubert i Innova 4200 incubator shaker ved 37°C, 250 rpm i 1 time.
8. Kulturen ble sentrifugert (Biofuge fresco, Heraeus sentrifuges) ved 7000 rpm i 2 min.
9. Supernatant ble dekantert. Pellet ble løst i resterende medium ved pipettering.
10. Bakteriekultur ble platet ut på LB-skåler støpt med 100 μ g/ml ampicillin og 50 μ g/ml kanamycin, og tilsatt 80 μ l X-gal.
11. Kulturene ble inkubert i Innova 4200 incubator shaker ved 37°C over natt.

-
12. Hvite kolonier ble høstet og sådd ut på LB-skåler og i 50 ml sterilinrør med 8 ml LB-medium.
 13. Kulturene ble inkubert i Innova 4200 inubator shaker ved 37°C, 250 rpm over natt.
 14. Bakteriekultur (800 µl) fra 50 ml sterilinrør ble blandet i 1,5 ml eppendorfrør med 200 µl steril glyserol og oppbevart ved -80°C som frysestock.
 15. Resterende 7,2 ml bakteriekultur ble sentrifugert med Beckman J-6M/E Centrifuge ved 3000 rpm (Rotor: JS-4.2) og 4°C i 10 min.
 16. Supernatant ble fjernet ved dekantering og pipettering. Pellet ble oppbevart ved -80°C.

3.13 Plasmidisolering

Isolering av plasmider fra kloner ble utført ved hjelp av Qiaprep Spin Miniprep (Qiagen) som beskrevet i Qiaprep Miniprep handbook.

3.14 Sirkulær RT-PCR

Konvensjonell RT-PCR vil ikke amplifisere annet enn sekvensen mellom de valgte primerne. Man kan ved konvensjonell RT-PCR ikke bestemme 5'- og 3'-ende av et mRNA. Om mRNA sirkulariseres ved ligering av 5'- og 3'-ende før cDNA-syntese, kan også endene av transkriptet amplifiseres. Revers transkripsjon gjennomføres da med en primer spesifikk for genet som skal undersøkes. Etter RT-reaksjonen kjøres to PCR-reaksjoner med overlappende primersett. Produktene fra "nested-PCR" separeres ved elektroforese, renses, liggeres til kloningsvektor og transformeres inn i *E. coli*. Transformantene dyrkes opp, plasmid-DNA isoleres og sekvenseres. Metoden har også vært omtalt som sirkulært RACE eller 5'-/3'-RACE (Britton, Wen et al. 2007; Bechhofer, Oussenko et al. 2008).

1. RNA ble isolert som beskrevet i 3.2.

2. Isolert RNA ble TAP-behandlet som beskrevet i 3.7 for å konvertere trifosfat i 5'-enden til monofosfat og muliggjøre lisering av fullengdetranskriptet.
3. Volumet ble økt til 100 µl med DEPC-behandlet vann.
4. TAP-behandlet RNA ble rensset med sur fenol:kloroform som beskrevet i 3.9.
5. Fenolrenset RNA ble sirkularisert ved lisering som beskrevet i 3.8.
6. Ligert RNA ble rensset med sur fenol:kloroform som beskrevet i 3.9.
7. cDNA ble syntetisert ved revers transkriptase med genspesifikk primer som beskrevet i 3.4, men reaksjonen ble gjennomført ved 55°C.
8. PCR ble gjennomført med 20 sykler som beskrevet i 3.5.
9. Nested PCR ble gjennomført på 2 µl PCR-produkt fra punkt 8 som beskrevet i 3.5 med 35 sykler og primere som overlappet primerne brukt i punkt 8. Reaksjonen ble holdt på 72°C i 20 minutter for å fullføre all elongering.
10. PCR-produktet ble separert ved agarosegelelektroforese som beskrevet i 3.10.
11. Gelfragmentene ble kuttet ut og rensset som beskrevet i 3.11.
12. Rensset PCR produkt ble klonet som beskrevet i 3.12.
13. Plasmider ble isolert som beskrevet i 3.13.
14. Plasmider ble sekvensert som beskrevet i 3.15.

3.15 Sekvensering

De opprinnelige DNA-sekvenseringsteknikkene er Sanger-metoden og Maxam-Gilbert-metoden. Sanger-metoden, oppkalt etter dens utvikler, Frederick Sanger, har blitt brukt til sekvensering i dette arbeidet. Metoden bygger på DNA-polymerisering med bruk av dideoksinukleotider. Dideoksinukleotider er identiske med deoksinukleotidene, med unntak av at de ikke har 3'-OH som er nødvendig for

adhesjon av nye nukleotider. Dette stopper polymerasereaksjonen når et dideoksinukleotid blir inkorporert i DNA. Fire separate reaksjoner gjennomføres, en for hver av de fire nukleotidene. I hver av disse reaksjonene brukes en nukleotidløsning hvor en liten andel av den aktuelle nukleotiden er blitt erstattet med dideoksiutgaven. Etter polymerasereaksjonen vil reaksjonsløsningen i tillegg til fullengdeproduktet, inneholde kortere produkter hvor reaksjonen har blitt terminert der den aktuelle dideoksinukleotiden er inkorporert. Disse terminerte produktene kan senere analyseres ved polyakrylamid-gelelektroforese eller andre deteksjonsmetoder (Sambrook and Russell 2001).

Sekvenseringsreaksjon for primer extension (3.16) ble gjennomført som beskrevet i fmol DNA cycle Sequencing System Technical Manual. All annen sekvensering ble foretatt av ABI-lab ved Biologisk institutt, UiO.

3.16 Primer extension

Primer extension kan brukes for å kartlegge 5'-enden av mRNA-molekyler. Revers transkripsjon blir utført med en radioaktivt merket primer som bindes til transkriptet noen hundre baser nedstrøms for den antatte transkripsjonsstarten. I tillegg til cDNA-syntese gjennomføres også en sekvenseringsreaksjon på et DNA-templat av det samme genet. Her brukes den tilsvarende radiomerkede primeren. Fragmentene fra cDNA-syntesen og sekvenseringsreaksjonen separeres ved gelelektroforese i polyakrylamid. Gelen tørkes og radioaktiviteten kan deretter leses ved eksponering i en Storm Scanner (Molecular Dynamics).

Alt arbeid med radioaktivitet ble gjort i egnet lokale. Det ble arbeidet med β -emittere, og pleksiglass ble derfor til enhver tid brukt som beskyttelse mot strålingskilden.

1. DNA-templat til sekvenseringsreaksjon ble syntetisert ved PCR av gDNA med genspesifikke primere. PCR ble gjennomført som beskrevet i 3.5, men PFU Turbo Polymerase ble benyttet i stedet for DyNAzyme grunnet proofreadingegenskaper som gir høyere nøyaktighet. 10X First Strand Buffer ble også erstattet med 10X PFU-buffer.

2. Radiomerking av primere ble utført som beskrevet i fmol DNA Cycle Sequencing System Technical Manual. Inkuberingene ble utført på Digital dry bath varmeblokker (Labnet). Prøvene ble spunnet ved hjelp av C1301 (Labnet).

3. Revers transkriptase ble utført som følger, temperaturjusteringer ble foretatt på Digital dry bath varmeblokker fra Labnet:

3a. Følgende reagenser ble blandet i 0,5 ml RNasefritt rør:

1 µl radiomerket primer (1 µM)
5 µl RNA (~1 µg/µl)

3b. Reaksjonsløsningen ble inkubert ved 85°C i 10 min, og 55°C i 10 min.

3c. Følgende reagenser ble blandet som masterløsning i angitt mengdeforhold og rekkefølge:

2 µl 5X SuperScript Buffer
0,5 µl Super Rnase Inhibitor (2 U/µl)
0,5 µl DTT (Invitrogen)
0,5 µl dNTP
0,5 µl RT

3d. Masterløsning (4 µl) fra 3c ble tilsatt reaksjonsløsningen fra punkt 3.3.

Kontrollprøver ble tilsatt masterløsning med 0,5 µl DEPC-behandlet vann i stedet for RT.

3e. Reaksjonsløsningen ble inkubert ved 55°C i 35 min, og deretter ved 70°C i 10 min.

3f. Gel loading buffer II (10 µl) ble tilsatt reaksjonsløsningen, som deretter ble inkubert ved 95°C i 2 min.

3g. Prøvene ble spunnet med C1301 (Labnet).

4. Sekvenseringsreaksjon ble utført på PTC-100 programmable thermal controller (M. J. Research) ved hjelp av fmol DNA cycle Sequencing System. Reaksjonen ble utført som beskrevet i fmol DNA cycle Sequencing System Technical Manual.

-
5. cDNA (10 μ l) fra punkt 3 og sekvenseringsprodukt (3,5 μ l) fra punkt 4 ble lastet på 6% polyakrylamidgel.
 6. Polyakrylamid-gelelektroforese ble utført med Model S2 (Bethesda Research Laboratories). Model 3000Xi (Bio-Rad) ble brukt som spenningskilde. Elektroforesen ble utført ved 1900 V og 42 mA i 1,5 time.
 7. Etter gjennomført gelelektroforese ble polyakrylamidgel overført til hvite papplater og dekket med plasfolie.
 8. Polyakrylamidgel ble tørket ved hjelp av Model 483 SLAB Dryer (Bio-Rad) i 2 timer.
 9. Tørket polyakrylamidgel ble overført til eksponeringskassett til Storm Scanner (Molecular Dynamics) for eksponering over natt.
 10. Film fra punkt 9, utsatt for radioaktivitet over natt, ble fremkalt ved hjelp av Storm Scanner 860 (Molecular Dynamics).
 11. Fremkalte bilder ble analysert ved hjelp av ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics).

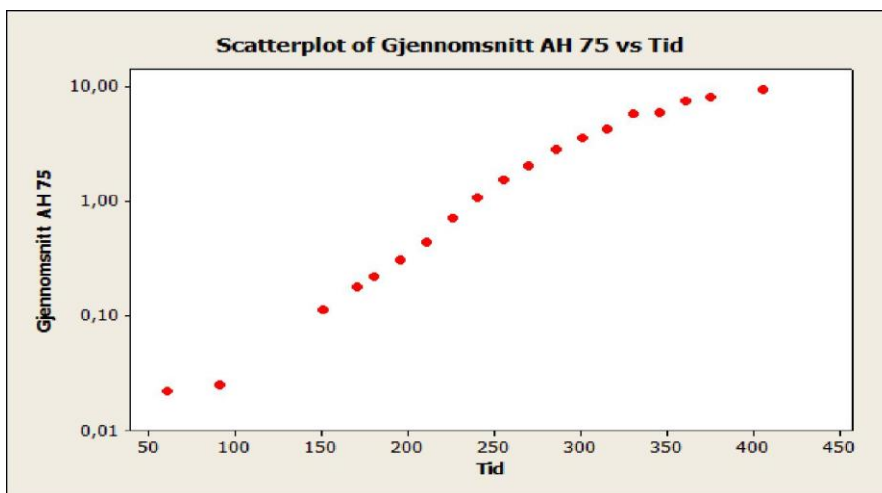
3.17 Bioinformatikk

The National Center for Biotechnology Information (NCBI) er underlagt det amerikanske National Institute of Health. Deres sekvensdatabase inneholder gendata fra 1603 bakterier, 61 archaea og 230 eukaryote organismer (mai 2009), og er åpen for søk blant annet ved hjelp av Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). I arbeidet med denne oppgaven ble BLAST brukt til analyse av sekvenser fra *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579 (tpepestamme). Sekvensdata mottatt fra ABI-lab ved Biologisk Institutt, UiO ble lest ved hjelp av Sequence Scanner (Applied Biosystems) og analysert mot det aktuelle genomet ved hjelp av BLAST. I etterkant har dataene blitt analysert med Artemis DNA Sequence Viewer & Annotation Tool.

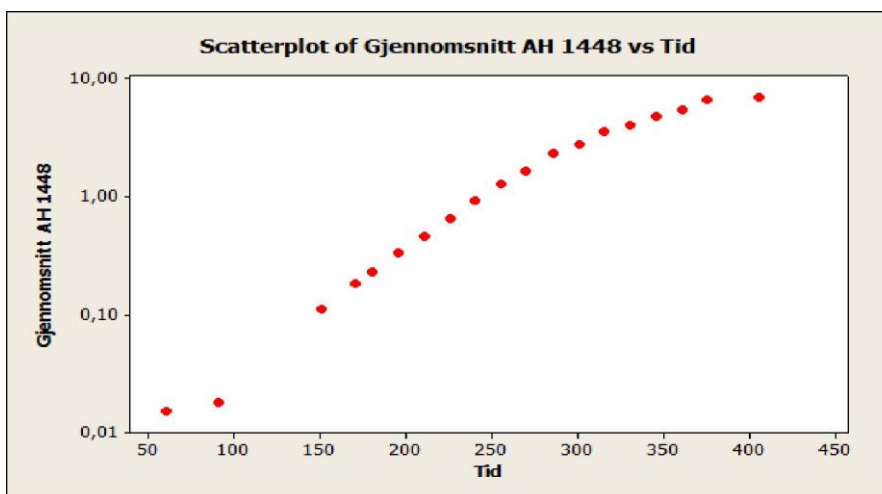
4. Resultater

4.1 Vekstkurve for *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579

For å kunne bestemme egnet tidspunkt for RNA-isolering, ble det gjennomført vekstkurveforsøk for de to stammene som senere skulle bli brukt til transkripsjonsanalyser. Forsøket ble utført med to parallelle prøver av både *B. cereus* ATCC 10987 (AH 75) og *B. cereus* ATCC 14579 (AH 1448). Det ble utført som beskrevet i 3.1. Det ble utført målinger av optisk tetthet ved $\lambda = 600$ nm.



Figur 4-1 Vekstkurve av *B. cereus* ATCC 10987. Gjennomsnitt av to parallelle prøver, med OD₆₀₀-verdier på logaritmisk skala plottet mot tid på lineær skala.



Figur 4-2 Vekstkurve av *B. cereus* ATCC 14579. Gjennomsnitt av to parallelle prøver med OD₆₀₀-verdier på logaritmisk skala plottet mot tid på lineær skala.

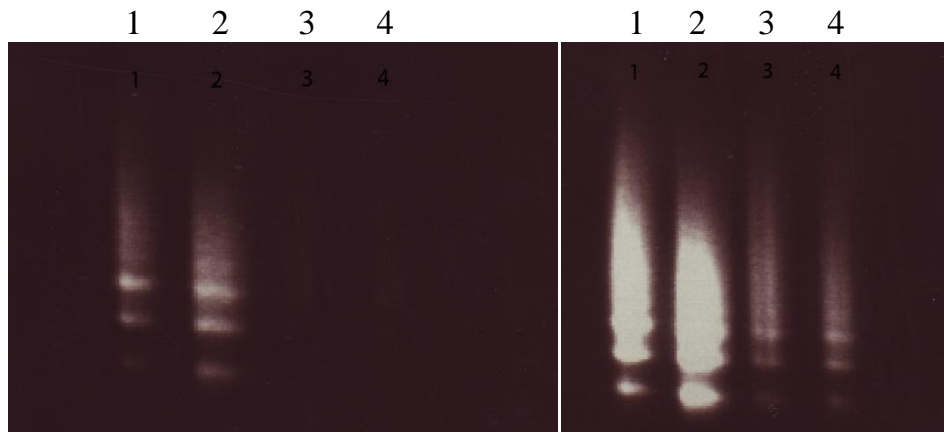
Kurvene ga et dårlig bilde av lag-fasen og initieringen av eksponentiell fase på grunn av få målepunkter, men det lineære området viser i hvilket område de to stammene er i eksponentiell vekst. *B. cereus* ATCC 10987 er i eksponentiell fase fra noe før 2,5 timer til ca. 5 timer. *B. cereus* ATCC 14579 er i eksponentiell fase fra noe før 2,5 timer til ca. 4 timer og 45 min.

4.2 Isolering av RNA fra *B. cereus* ATCC 10987

RNA ble isolert fra *B. cereus* ATCC 10987 for å bli benyttet til transkripsjonsanalyse ved konvensjonell RT-PCR. Isoleringen ble utført som beskrevet i 3.2, men med følgende endringer: Bakteriekultur ble tatt ut etter 3 timer (20 ml), og etter 8 timer (5 ml), for å få RNA-prøver fra eksponentiell og posteksponentiell vekstfase. Pellet fra 3-timers kultur ble resuspendert i 1 ml buffer RLT og pellet fra 8-timers kultur ble resuspendert i 3 ml buffer RLT. Suspensjon fra 8-timerskultur ble deretter alikvotert og isolert som 3 parallelle prøver. Isolert RNA ble eluert i 100 µl DEPC-behandlet H₂O og alikvotert i fem 1,5 ml RNase-frie eppendorfrør. Kvalitet og konsentrasjon ble i etterkant kontrollert ved agarose-gelelektroforese (Figur 4-3) og måling av absorbans (A) med Eppendorf Biophotometer (Tabell 4-1). RNA kvantifiseres ut fra absorpsjon ved $\lambda = 260$ nm (A_{260}). Kontaminasjoner som proteiner absorberer lys ved $\lambda = 280$. Ratio mellom A_{260} og A_{280} er derfor en god indikator på RNA-kvalitet, og bør ifølge RNeasy Mini Handbook (Qiagen) være mellom 1,9 og 2,1.

Tabell 4-1 Absorbansmålinger av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987.

	Kons.	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
3 t	3,85 µg/µl	0,182	0,481	0,261	0,001	1,84	2,65
8 t I	3,10 µg/µl	0,196	0,516	0,272	0	1,90	2,63
8 t II	2,73 µg/µl	0,213	0,455	0,241	0	1,89	2,14
8 t III	2,69 µg/µl	0,239	0,449	0,218	0,009	2,06	1,88



*Figur 4-3 Agarose-gelelektroforese av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987. Prøvene ble separert på 0,8% agarosegel ved 55 V i ca 1,5 time. Bildene viser 4 brønner ved to ulike eksponeringer. Brønn 1 er lastet med RNA fra 3 timerskultur, brønn 2-4 med de 3 prøvene fra 8-timerskultur. Ratio mellom 23S- og 16S-rRNA ble fra visuell inspeksjon omtrentlig beregnet til 2:1. Prøvene ble ikke denaturert før applisering på gel, noe som ga "smear" ved separasjon pga sekundærstrukturer i RNA.*

Ratio mellom 23S- og 16S-rRNA og A_{260}/A_{280} indikerte brukbar kvalitet på isolert RNA, selv om ratio A_{260}/A_{280} var litt lav for RNA fra 3-timersprøven, men likevel akseptabel. Det har blitt isolert inntil 385 μg RNA på hver kolonne. Disse er imidlertid ikke beregnet for å isolere mer enn 100 μg . Det er derfor mulig denne overbelastningen kan ha forringet RNA-kvaliteten noe.

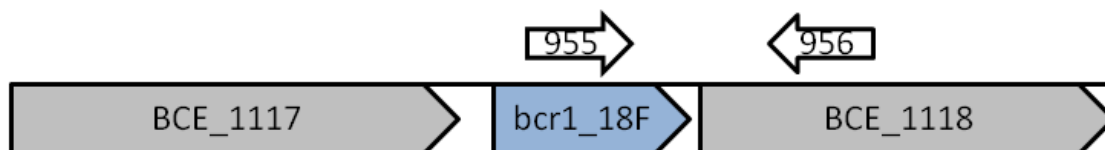
4.3 Transkripsjonsanalyse av BCE_1118, BCE_1174 og BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 ved konvensjonell RT-PCR

Konvensjonell RT-PCR ble brukt for å analysere hvorvidt bcr1_18F, bcr1_20R og bcr1_22R er kotranskribert med henholdsvis BCE_1118, BCE_1174 og BCE_1421 (Figur 4-4, Figur 4-5 og Figur 4-6). RNA fra 4.2 ble DNase-behandlet som beskrevet i 3.3. Deretter ble cDNA syntetisert med randomhexamers (3.4), før dette ble benyttet i PCR som beskrevet i 3.5 med henholdsvis 30 og 35 syklar. Binding av primer til templat ble foretatt ved 58°C og elongeringstid ble satt til 30 sekunder. Prøvene ble i etterkant analysert ved agarose-gelelektroforese (3.10). Primersettet 955+956 ble brukt for å påvise kotranskripsjon av bcr1_18F med genet BCE_1118 (Figur 4-4), 982+957 for å påvise kotranskripsjon av bcr1_20R med BCE_1174 (Figur 4-5) og

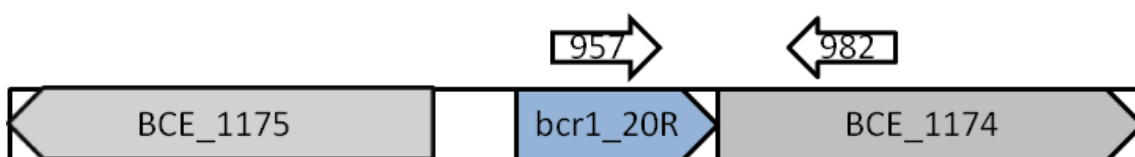
980+957 for å påvise kotranskripsjon av *bcr1_22R* med BCE_1421 (Figur 4-6). Forsøkene ga ingen resultater. Det ble antatt at årsaken kunne være at kvaliteten på isolert RNA ikke var god nok, og RNA ble isolert på nytt.

Tabell 4-2 Primere brukt ved transkripsjonsanalyse i *B. cereus* ATCC 10987 ved konvensjonell RT-PCR

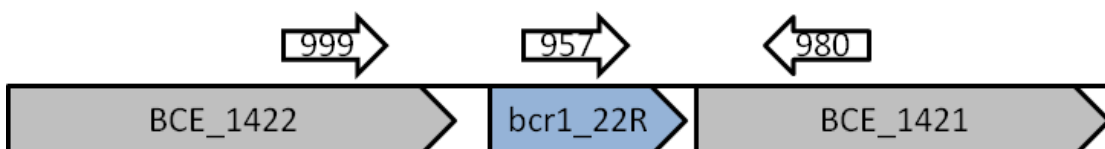
	Sekvens	Bindingssted	t_m	G+C %
955	gcagtaagacccccatctca	<i>bcr1</i> ->3'	60,07°C	50,00
956	tcattttcaagcgtgctttt	5'<-BCE_1118	59,88°C	33,33
957	cagtaagacccccacctcaa	<i>bcr1</i> ->3'	59,96°C	55,00
980	tgctggtgaatctgcaatgt	5'<-BCE_1421	60,27°C	45,00
982	tggcattaataataataaacatcca	5'<-BCE_1174	58,04°C	23,08
999	tgtagggtgggttggtgtga	BCE_1422->3'	59,85°C	50,00



Figur 4-4 Primerne 955 og 956 brukt ved transkripsjonsanalyse av BCE_1118 og *bcr1_18F*.



Figur 4-5 Primerne 957 og 982 brukt ved transkripsjonsanalyse av BCE_1174 og *bcr1_20R*.



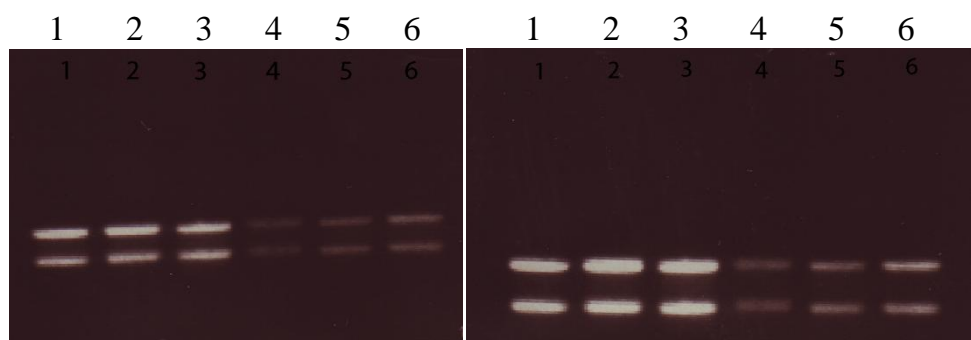
Figur 4-6 Primerne 957, 980 og 999 brukt ved transkripsjonsanalyse av BCE_1421, BCE_1422 og *bcr1_22R*.

4.4 Isolering av RNA fra *B. cereus* ATCC 10987

RNA fra *B. cereus* ATCC 10987 ble isolert som beskrevet i 3.2. Isolert RNA ble eluert i 100 μl DEPC-behandlet H_2O og alikvotert i fem 1,5 ml RNase-frie eppendorfrør. Kvaliteten ble i etterkant kontrollert ved agarose-gelelektroforese og måling av absorbans som i seksjon 4.2 (Figur 4-7, Tabell 4-3).

Tabell 4-3 Absorbansmålinger av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987

	Kons.	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
3 t I	1,2475 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,305	0,624	0,323	0	1,93	2,05
3 t II	1,7614 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,338	0,881	0,437	0	2,02	2,60
3 t III	1,5223 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,354	0,761	0,381	0	2,00	2,15
8 t I	803,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,218	0,402	0,211	0	1,90	1,84
8 t II	637,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,136	0,319	0,166	0	1,92	2,33
8 t III	963,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,202	0,482	0,251	0,002	1,92	2,39



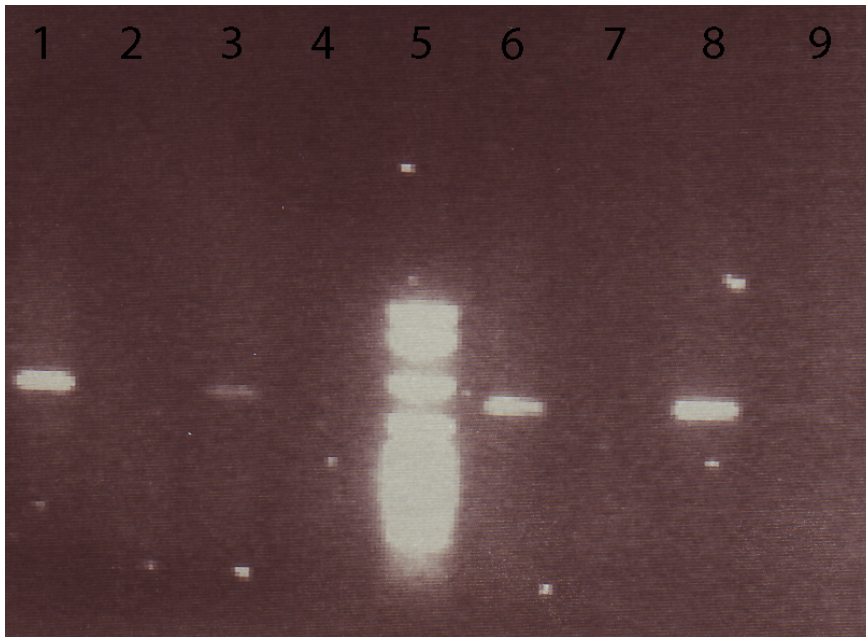
Figur 4-7 Agarose-gelelektroforese av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987. Prøvene ble separert på 0,8% agarosegel ved 55 V i ca 1,5 time. Bildene viser 6 brønner ved to ulike eksponeringer. Brønn 1-3 er lastet med RNA fra 3-timerskultur, brønn 4-6 med RNA fra 8-timerskultur. Ratio mellom 23S- og 16S-rRNA ble ved visuell inspeksjon omtrentlig beregnet til 2:1. Prøvene ble denaturert ved oppvarming til 65°C i 5 min før de ble lastet på gel.

A₂₆₀/A₂₈₀-ratio var over 1,9 for alle prøvene. Agarose-gelelektroforese av isolert RNA tyder på at det er av god kvalitet, særlig RNA isolert fra 3-timerskultur, hvor bånd fra 23S- er tydelig sterkere enn fra 16S-rRNA (Figur 4-7). Man kunne heller ikke observere noen degraderingsprodukter. Av 8-timersprøvene var det 8 t III fra Tabell 4-3, applisert i brønn 6 ved agarose-gelelektroforese vist i Figur 4-7, som hadde best

ratio mellom 23S- og 16S-rRNA. Denne prøven ble derfor senere benyttet til transkripsjonsanalyse.

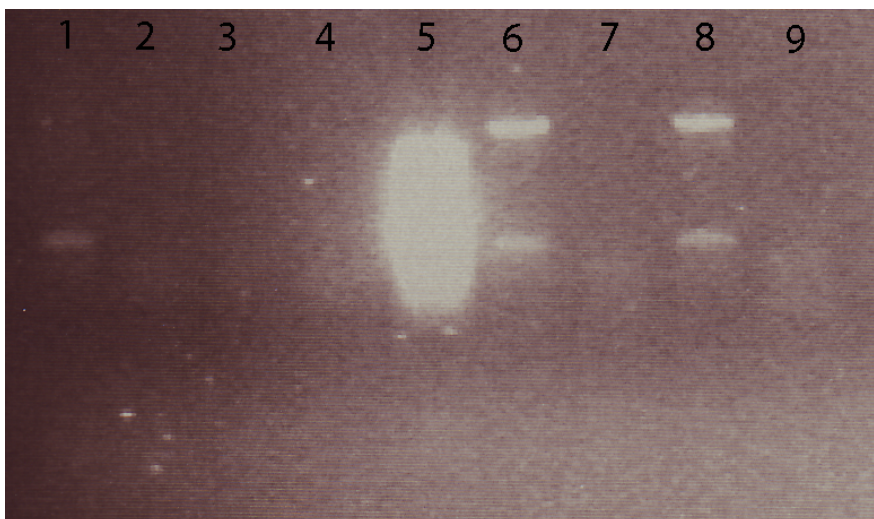
4.5 Transkripsjonsanalyse av BCE_1118, BCE_1174 og BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 ved konvensjonell RT-PCR

Konvensjonell RT-PCR ble utført som beskrevet i 4.3, men RNA fra 4.4 ble benyttet. Det ble også undersøkt om BCE_1421 og BCE_1422 kan være til stede på samme transkript, noe som ville bety at bcr1_22R kan være del av et operon. RNA ble DNase-behandlet som beskrevet i 3.3, og cDNA syntetisert med random hexamers (3.4). Deretter ble PCR gjennomført med 35 sykler (3.5) med følgende spesifikasjoner; binding av primer til templat ble foretatt ved 58°C og elongeringstid ble satt til 30 sekunder. Primerne er beskrevet i Tabell 4-2. Negativ kontrollprøve uten revers transkriptase (RT) ble utført parallelt, i disse ble det tilsatt 1 µl DEPC-behandlet vann i stedet for RT. Det ble gjort tre PCR-reaksjoner med de tre samme primersettene som i 4.3, og i tillegg ble primersettet 999+980 brukt for å undersøke om BCE_1421 og BCE_1422 var til stede på samme transkript (Figur 4-6). PCR-produktene ble separert ved agarose-gelelektroforese (Figur 4-8 og Figur 4-9).



Figur 4-8 Agarose-gelelektroforese av PCR-produkter. Reaksjoner med primerne 955+956 er vist i brønn 1-4. pBR322 MspI-størrelsesmarkør i brønn 5. Reaksjoner med primerne 980+957 er vist i brønn 6-9. RNA fra 3-timerskultur ble benyttet i brønn 1,2,6 og 7. RNA fra 8-timerskultur i brønn 3,4,8 og 9. Negative kontrollprøver er i brønn 2,4,7 og 9.

Agarose-gelelektroforese av PCR-produkter med primerne 955+956 og 980+957 (Figur 4-8) påviste kotranskripsjon av *bcr1_18F* og *bcr1_22R* med henholdsvis BCE_1118 og BCE_1421, kontrollprøver var negative både i 3t- og 8t-kulturen.



Figur 4-9 Agarose-gelelektroforese av PCR-produkter. Reaksjoner med primerne 999+980 er vist i brønn 1-4, pBR322 MspI-størrelsesmarkør i brønn 5. Reaksjoner med primerne 982+957 er vist i brønn 6-9. RNA fra 3-timerskultur ble benyttet i brønn 1,2,6 og 7, RNA fra 8-timerskultur i brønn 3,4,8 og 9. Negative kontrollprøver er i brønn 2,4,7 og 9.

Agarose-gelelektroforese av PCR-produkter med primerne 982+957 påviste kotranskripsjon av *bcr1_20R* med *BCE_1174* (Brønn 6-9, Figur 4-9) i både 3t- og 8t-kultur. I brønn 1-4 i Figur 4-9 ble det brukt primere internt i *BCE_1421* og *BCE_1422*. Det positive resultatet fra denne reaksjonen indikerte at *bcr1_22R* kunne være del av et operon. Konvensjonell RT-PCR er imidlertid en svært sensitiv og lite diskriminerende metode. Dersom ett av transkriptene er forlenget eller på annen måte avviker fra resten av populasjonen, kan dette transkriptet gi et feilaktig bilde av den reelle transkripsjonen. For å få riktigere informasjon om transkripsjon av *bcr1_22R* og *BCE_1421* var det nødvendig å gå videre med andre og mer beskrivende metoder.

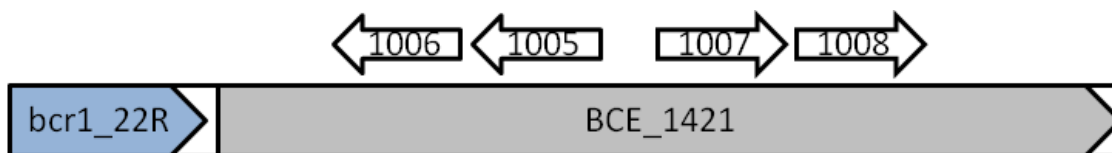
4.6 Transkripsjonsanalyse av *bcr1_22R* og *BCE_1421* i *B. cereus* ATCC 10987 ved cRT-PCR

cRT-PCR, også beskrevet som 5'/3' rapid amplification of cDNA ends (5'/3' RACE) (Britton, Wen et al. 2007; Bechhofer, Oussenko et al. 2008), innebærer sirkularisering av RNA før RT-PCR og sekvensering av PCR-produktene. For å kartlegge hele transkriptet av *BCE_1421*, inkludert 5'- og 3'-ende, ble RNA fra 4.4 sirkularisert og cRT-PCR gjennomført som beskrevet i 3.14. 3 t I RNA (4.4) ble valgt grunnet gode resultater fra kvalitetskontroll ved absorbansmålinger og agarose-gelelektroforese (Figur 4-7, Tabell 4-3). Kontrollprøver ble gjennomført i alle trinn av reaksjonen, både for TAP-behandling, ligering og revers transkriptase. Protokollen for TAP-behandling ble fulgt som beskrevet i 3.7 for to reaksjoner, hvorav den negative kontrollprøven ble tilsatt 2,5 µl DEPC-behandlet vann i stedet for TAP. Deretter ble prøver med og uten TAP-behandling tilsatt ligase som beskrevet i 3.8, negative kontrollprøver ble tilsatt 1 µl DEPC-behandlet vann i stedet for T4 RNA ligase. De fire reaksjonsløsningene med og uten TAP-behandling og +/-ligering ble deretter brukt til cDNA-syntese. Her ble negative kontrollprøver tilsatt 1 µl DEPC-behandlet vann i stedet for SuperScript III Reverse Transcriptase. Etter cDNA-syntese var det dermed åtte reaksjonsløsninger i alle kombinasjoner; med og uten TAP-behandling, +/-ligase og +/-RT. Primerne for cRT-PCR er beskrevet i

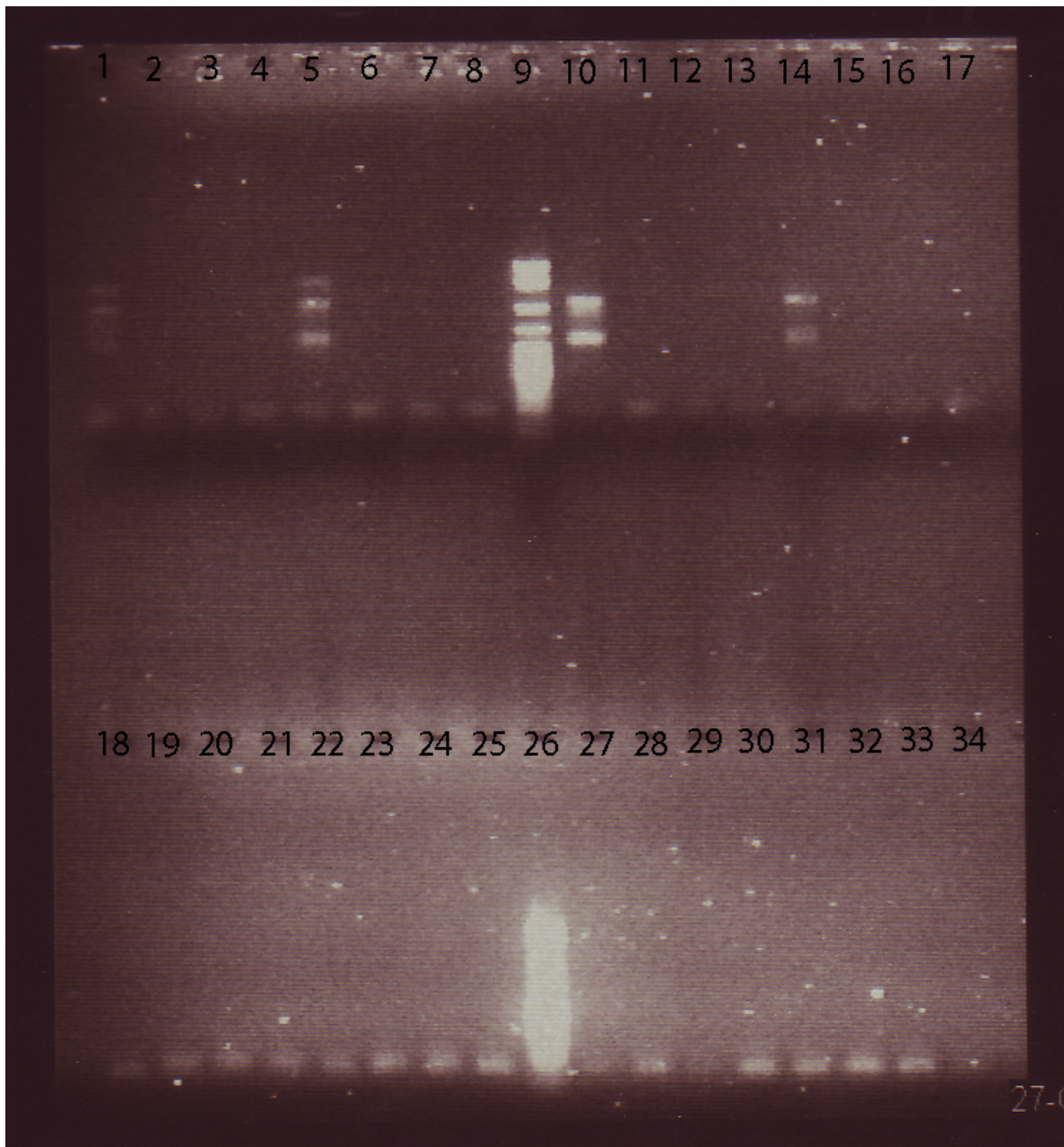
Tabell 4-4, og plassering er vist i Figur 4-10. Primer 1005 ble benyttet til cDNA-syntese. To PCR-reaksjoner ble gjennomført. I den første reaksjonen ble primerne 1005+1007 brukt til amplifisering av cDNA ved 20 sykler med bindingstemperatur på 58°C og elongeringstid på 30 sekunder. I den påfølgende reaksjonen (nested PCR) ble PCR-produkt fra den første reaksjonen amplifisert ved 35 sykler med primerne 1006+1008. Det ble satt opp reaksjoner med ufortynnet templat og templat fortynnet i MQ-H₂O (1:10). Denne reaksjonen ble også gjennomført med cDNA som templat. Produktene ble analysert ved agarose-gelelektroforese (Figur 4-11) som beskrevet i 3.10.

Tabell 4-4 Primere benyttet ved transkripsjonsanalyse av *BCE_1421*-locus ved cRT-PCR

	Sekvens	Bindingssted	t_m	G+C %
1005	tggatgaatctgcaatgtgaaa	5'←-BCE_1421	60,10°C	38,10
1006	ccgatataaatacccgcaagtg	5'←-BCE_1421	60,56°C	45,45
1007	atctttagtttcaccgcatcc	BCE_1421->3'	58,20°C	42,86
1008	caggtgctattcataacttaattcc	BCE_1421->3'	57,54°C	36,00



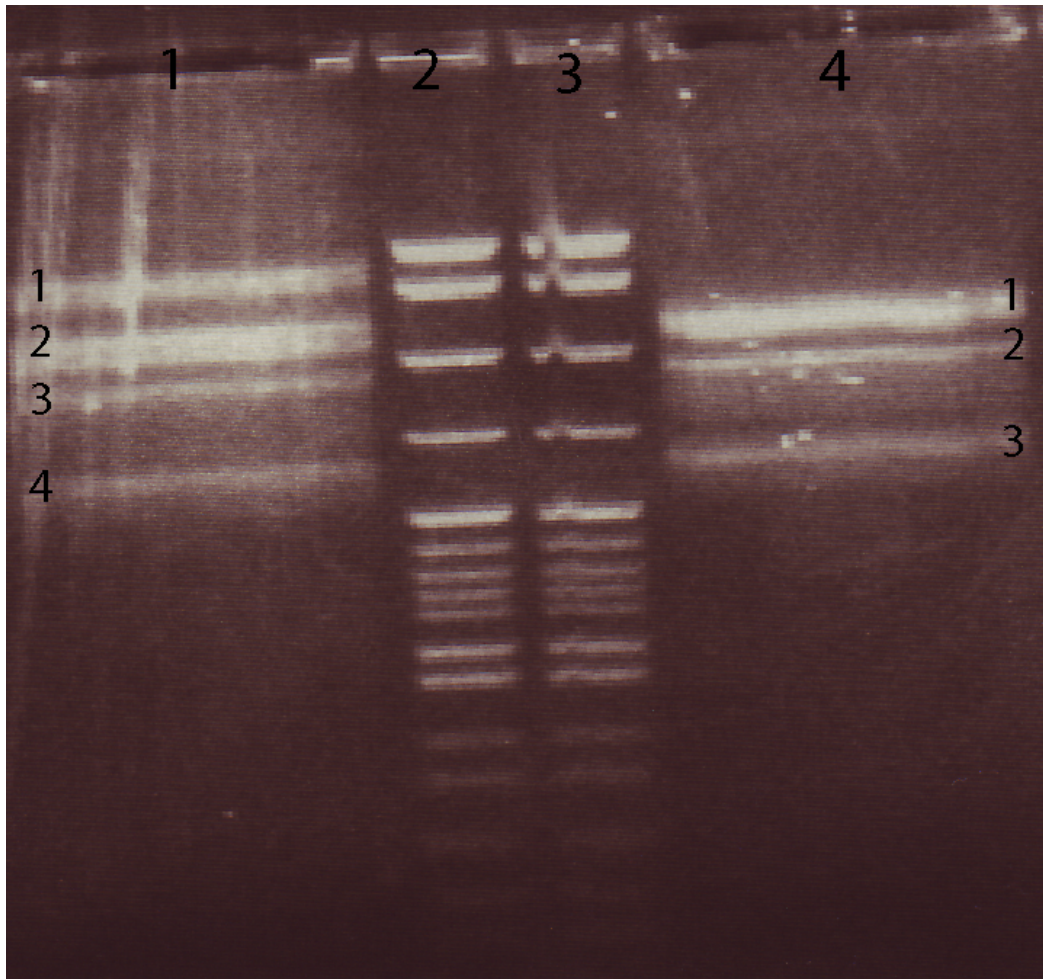
Figur 4-10 Primer 1005 brukt ved RT. Primerne 1005+1007 brukt ved første PCR-reaksjon og 1006+1008 brukt ved andre PCR-reaksjon (nested) til transkripsjonsanalyse av *BCE_1421* i *B. cereus* ATCC 10987 ved cRT-PCR.



Figur 4-11 Agarose-gelelektroforese (1,2 % agarosegel, separasjon ved 120 V i ca 1 time) av cRT-PCR-produkt. Størrelsesmarkør pBR322 MspI i brønn 9 og 26. Produkt fra nested PCR (To PCR-reaksjoner med overlappende primere) i brønn 1-8 og 10-17, PCR på cDNA i brønn 18-25 og 27-34. TAP-behandlede prøver i brønn 1-8 og 18-25, prøver uten TAP-behandling i brønn 10-17 og 27-34. Templat i brønn 5-8, 14-17, 22-25 og 31-34 er fortynnet 1:10 før nested-PCR. RNA uten ligasebehandling er lastet i brønn 3,4,7,8,12,13,16,17,20,21,24,25,29,30,33 og 34. RT-negative kontrollprøver er lastet i brønn 2,4,6,8,11,13,15,17,19,21,23,25, 28,30,32 og 34.

Agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-produkter (Figur 4-11), viste positivt resultat for nested-PCR både for prøver med og uten TAP-behandling (henholdsvis brønn 1, 5, 10 og 14). Både ufortynnede og fortynnede (1:10) prøver ga positivt resultat. Prøver uten tilsatt ligase og/eller uten tilsatt RT var alle negative. Det kunne ikke observeres produkt for prøver hvor det kun var blitt gjennomført én PCR-amplifisering (brønn 18-25 og 27-34, Figur 4-11). Av figuren kunne det observeres et bånd som kun var til stede i TAP-behandlet prøve (brønn 1 og 5). Dette båndet var et produkt fra fullengdetranskriptet, siden det kun var til stede i denne prøven. De resterende båndene korresponderte til båndene i prøven uten TAP-behandling og var sannsynligvis produkter av prosessert eller degradert mRNA, hvor det ikke er trifosfat bundet i 5'-ende.

Forsøket ble gjentatt for å gi et større volum av sluttproduktet. Denne gangen ble den første av de to PCR-reaksjonene gjennomført med 25 syklar. Den andre reaksjonen ble utført med 8 parallelle nested-reaksjoner. I begge reaksjonene ble bindingstemperaturen for primerne (annealing) senket til 56°C, ettersom den ble vurdert til å være for høy ved første gjennomføring. Dette produktet ble deretter separert ved agarose-gelelektroforese i 3 % NuSieve agarose ved 60 V i Mini-sub cell GT (Bio-Rad), for å sikre separasjon før kutting av bånd (Figur 4-12). Templat ble ikke fortynnet før nested PCR, siden ufortynnet templat allerede hadde vist å gi produkt (Figur 4-11). Ettersom kontrollprøver uten ligase og/eller RT var negative ved første cRT-PCR, og det ble benyttet samme RNA-prøver, ble disse kontrollene utelatt i andre kjøring av plass- og tidshensyn.



Figur 4-12 Agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-produkt i 3% NuSieve agarosegel, separert ved 60 V i Mini-sub cell GT (Bio-Rad). Størrelsesmarkør pBR322 MspI er lastet i brønn 2 og 3. TAP-behandlet prøve er lastet i brønn 1. Prøve uten TAP-behandling i brønn 4.

Agarose-gelelektroforese med 3 % NuSieve agarosegel, (Figur 4-12), ga et tydeligere bilde av resultatene enn de med 1,2 % agarose (Figur 4-11). Bånd 1 i den TAP-behandlede prøven (brønn 1, Figur 4-12) er igjen sannsynligvis fullengdetranskriptet av BCE_1421, siden TAP-enzymet her skal ha fjernet trifosfat fra 5'-ende av transkriptet og muliggjort limering av fullengdeproduktet. Figuren viser tydelig hvordan produktene fra prøven uten TAP-behandling (brønn 4, Figur 4-12) korresponderer med bånd 2-4 fra prøve med TAP-behandling (brønn 1, Figur 4-12). Disse tilsvarer mest sannsynlig prosessert eller degradert mRNA uten trifosfat i 5'-ende.

PCR-produktene ble rensert fra gel og sekvensert for å kartlegge 5'- og 3'-ende av BCE_1421-transkriptet. Bånd 1-3 av TAP-behandlet prøve (brønn 1, Figur 4-12) og

bånd 1-3 av prøve uten TAP-behandling (brønn 4, Figur 4-12) ble skåret ut med skalpell og gelrenset (3.11). Renset DNA ble deretter ligert til pCRII-TOPO kloningsvektor ved hjelp av TOPO TA Cloning Kit fra Invitrogen (3.12), og reaksjonsblandingen ble transformert i *E.coli* XL1-Blue MRF' strain^a (Stratagene). Etter screening for antibiotikaresistens og defekt *lacZ* (hvite kolonier), ble plasmid-DNA isolert (3.13), og sekvensert ved ABI-lab, Biologisk Institutt, UiO. Dette ble gjort for flere parallelle prøver av de tre øverste båndene fra den TAP-behandlede prøven og bånd 1-3 fra prøven uten TAP-behandling, og resultatene er vist i Figur 4-13. De resterende båndene ble ikke sekvensert, fordi fullengdeproduktene var hovedfokus for studiet.

```

5' tattatttgtaagcggttttctccgtctatgtatgtcctttttgt
gaaacattgcacaaacttattgaaactatgacagaatcgatgtact
ttatt1ca1t12a111111111taaggagca1tttatcccgcctttaatgggcagt
aagacccccacctcaaaattcagcga1aaacaagaagttagggtggg
gatcaactgc1ccataaaagcccg1a1ttgggt1tcaNa2ctaataatca
gtgggagatgaagaacccccccactgattaaagtttcattttatag
atgatgtactaaaggagNcgtattactcatgctagaacaaggattag
attatg1ttgtcaaactgg1ctaagagcaa3aaaacaaatg3tt33aNNg13
33NnatacaaaccgatNgcaatat3tt3cattcgtgNccg<>agttaca
attggtaacattattggcgggtctg1tatttgtcgggtatgggtatacc
attactt3aacaaagaagtagctgacgtgaaa111caagaaga3a2ac1
tgaattaggagcagctcaacaagaagaatcattccg1ttgca12agc
gcatatgaacat2taaaaa1ctccaaagtttactttggag13tttt13t
33agc111Nt3333Nc1111NNc11ccacNNa1ta13Ntt1taacaacaagattaggat
taatctctccttcttcccttcccttatccattctctg1tttcatctt
atgcataccgatgacat3'

```

Figur 4-13 Sekvensdata for *BCE_1421-locus* (grå bakgrunn) i *B. cereus* ATCC 10987 med *bcr1_22R* (lyseblå bakgrunn) oppstrøms og predikert terminator (grønn bakgrunn) lokalisert nedstrøms for genet. Sekvensen mellom bindingssetene for primerne er ikke inkludert i figuren (erstattet med <>). 1,2 og 3 indikerer ende av sekvens for henholdsvis bånd 1, 2 og 3 fra TAP-behandlet prøve. N indikerer ende av sekvens fra prøve uten TAP-behandling.

5'-ende for en rekke transkripter ble kartlagt oppstrøms for *bcr1*, og 3'-ende tilsvarende rett nedstrøms for den predikerte terminatoren (Tabell 4-5, Tabell 4-6).

Enkelte sekvenser fra bånd 1 var ikke fullengde, muligens forårsaket av krysskontaminasjon ved isolering av båndene i den TAP-behandlede prøven (brønn 1,

Figur 4-12). Det faktum at ingen sekvenser av bånd fra prøven uten TAP-behandling (brønn 4, Figur 4-12) var fullengde, støtter også denne teorien.

5'-ende fra prosessert og degradert mRNA i Figur 4-13 hadde en spredt fordeling. Dette kunne indikere at de er rester etter prosessering av eksoribonuklaser i tillegg til endoribonukleaseaktivitet. Eksonukleolytisk degradering av mRNA fra 5'-ende har vært foreslått for enzymet RNase J funnet i *B. subtilis* (Mathy, Benard et al. 2007).

Det ble observert at sekvensene fra bånd 2 som var fullengde i 5'-ende (TAP-behandlet prøve), hadde en 3'-ende internt i BCE_1421 (Figur 4-13), hvilket kunne indikere bidrag fra mRNA-degradering også fra 3'-ende for dette locuset.

Tabell 4-5 Kartlegging av 5'-ende av transkripter fra bånd 1 og 2 i TAP-behandlet prøve (brønn 1, Figur 4-12) relativt til translasjonsstart av BCE_1421. I enkelte av sekvensene overlappet 5'- og 3'-ende. To av disse kan ha transkripsjonsstart 195 nukleotider oppstrøms for translasjonsstart, disse sekvensene er ikke inkludert i Figur 4-13.

	Internt i BCE_1421	Mellom BCE_1421 og bcr1	Internt i bcr1	-195	-196	-197	-199	Kan være -195
Antall	2	1	5	7	2	1	1	2

*Tabell 4-6 Kartlegging av 3'-ende av transkripter fra bånd 1-3 i prøve med og uten TAP-behandling (brønn 1 og 4, Figur 4-12) fra agarosegelelektroforese av cRT-PCR-produkter av BCE_1421 i *B. cereus* 10987.*

	Internt i BCE_1421	Nedstrøms for terminator
Antall	11	29

Transkripsjonsstart for BCE_1421 så av Figur 4-13 og Tabell 4-5 ut til å være 195 nukleotider oppstrøms for genets translasjonsstart for de fleste sekvensene. Enkelte transkripter kunne se ut til å ha transkripsjonsstart 1-4 nukleotider oppstrøms for denne lokasjonen, og det er mulig transkripsjon av genet kan starte ved flere punkt. Disse resultatene antyder at bcr1_22R er kotranskribert i 5'-ende av BCE_1421, og ikke som del av et operon med BCE_1421 og BCE_1422.

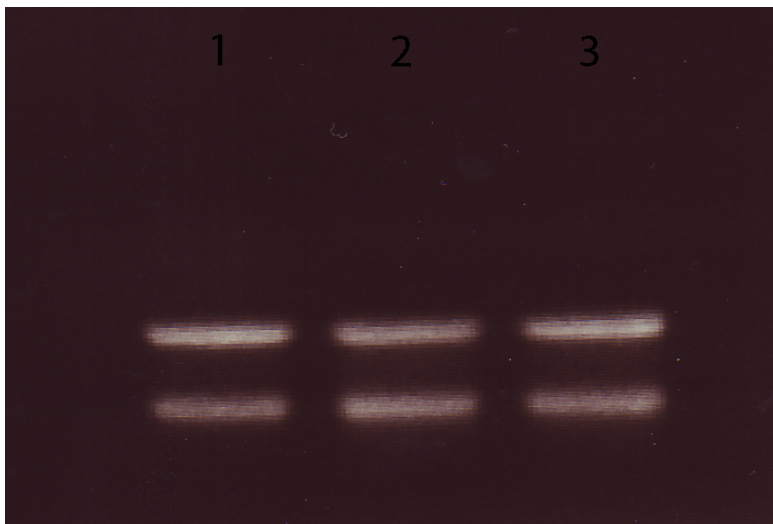
4.7 Isolering av RNA fra *B. cereus* ATCC 14579

BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 er ortolog til BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. *bcr1_22R* er imidlertid ikke til stede oppstrøms for BC1308, men det finnes en TTTAT-sekvens ved samme lokasjon (tomt locus). TTTAT har vært foreslått som innsetningssete for *bcr1* (Økstad, Tourasse et al. 2004). Det var derfor naturlig å gjøre transkripsjonsanalyse av BC1308 ved cRT-PCR for å forstå hvordan gener eventuelt påvirkes av *bcr1*-element lokalisert oppstrøms.

RNA fra 3-timerskultur av *B. cereus* ATCC 14579 ble isolert (3.2). Kvalitet og konsentrasjon ble i etterkant kontrollert ved agarose-gelelektroforese og måling av absorbans (A). Absorbansmålinger ble utført med Eppendorf Biophotometer.

Tabell 4-7 Absorbansmålinger av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 14579

	kons.	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A _{260/280}	A _{260/230}
3 t I	1,4527 µg/µl	0,287	0,726	0,380	0,014	1,91	2,53
3 t II	1,4005 µg/µl	0,270	0,700	0,358	0,004	1,96	2,60
3 t III	1,3398 µg/µl	0,256	0,670	0,342	0,004	1,96	2,61

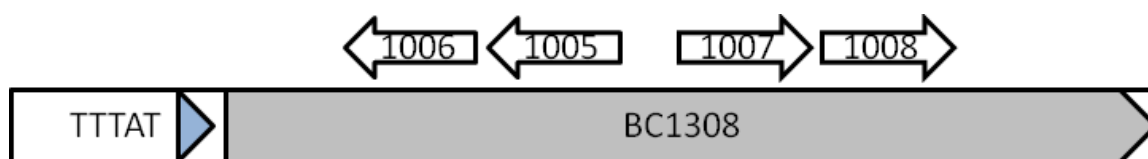


Figur 4-14 Agarose-gelelektroforese av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 14579. Prøvene ble separert på 0,8% agarosegel ved 55 V i ca 1,5 time. RNA-prøve 3t I ble lastet i brønn 1, 3t II i brønn 2 og 3t III i brønn 3. Ratio mellom 23S- og 16S-rRNA ble ved visuell inspeksjon omtrentlig beregnet til 2:1. Prøvene var denaturert ved oppvarming til 65°C i 5 min før de ble applisert på gel.

Ratio mellom bånd fra 23S- og 16S-rRNA fra agarose-gelelektroforese (Figur 4-14), og A_{260}/A_{280} -forhold (Tabell 4-7) tydet på at isolert RNA holdt tilfredsstillende kvalitet til transkripsjonsanalyse ved cRT-PCR (A_{260}/A_{280} var over 1,9 for alle tre prøver). Agarose-gelelektroforese viste ingen tegn til degradering av RNA.

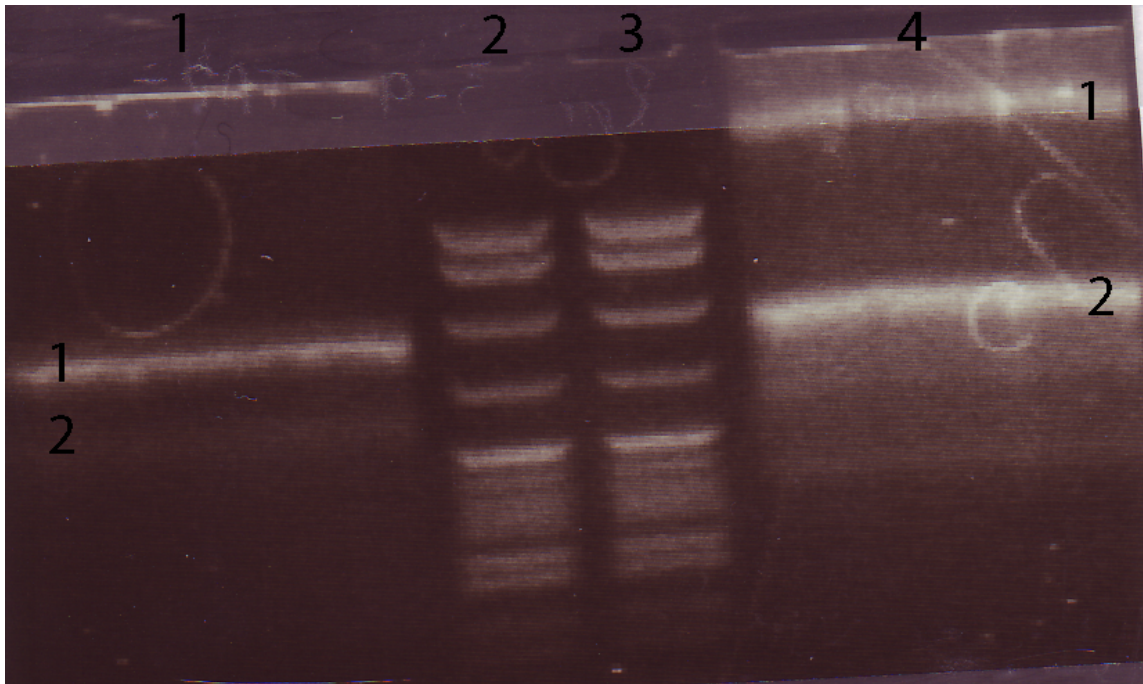
4.8 Transkripsjonsanalyse av BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 ved cRT-PCR

Det var interessant å sammenligne transkripsjonsstart for BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 med BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. cRT-PCR ble utført med RNA-prøve I fra 3-timerskultur av *B. cereus* ATCC 14579 som templat (3.14). Primerne var de samme som ble brukt for *B. cereus* ATCC 10987 i seksjon 4.6.



Figur 4-15 Primer 1005 brukt ved RT. Primerne 1005+1007 brukt ved første PCR-reaksjon og 1006+1008 brukt ved andre PCR-reaksjon (nested) til transkripsjonsanalyse av BCE1308 i *B. cereus* ATCC 14579 ved cRT-PCR.

Primernes bindingssteder er beskrevet i Figur 4-15. Etter ligering ble primer 1005 brukt til cDNA-syntese. Deretter fulgte to PCR-reaksjoner. I den første ble templatet amplifisert i 25 syklene, med primerne 1005+1007 bundet til cDNA ved 56°C, med elongeringstid på 30 sekunder. Den påfølgende PCR-reaksjonen ble utført med 35 syklene, med primerne 1006+1008 bundet til PCR-produktet fra den foregående reaksjonen ved 56°C, og elongeringstid på 30 sekunder. Etter amplifisering ble cRT-PCR-produkt separert ved agarose-gelelektroforese i NuSieve 3 % agarosegel (Figur 4-16).



Figur 4-16 NuSieve (3%) agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-produkt fra BC1308 fra *B. cereus* ATCC 14579, separert ved 60 V i Mini-sub cell GT (Bio-Rad). pBR322 MspI ble lastet i brønn 2 og 3, TAP-behandlet prøve i brønn 1, og prøve uten TAP-behandling i brønn 4.

Agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-produkter fra BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 (Figur 4-16) ga et uventet resultat, siden bånd 1 i prøven uten TAP-behandling var større enn noe bånd i TAP-behandlet prøve. Det var derfor interessant å sekvensere disse gelfragmentene.

Bånd 2 i den TAP-behandlede prøven kommer ikke tydelig frem i Figur 4-16, men var tydelig ved visuell inspeksjon under UV-bestråling. Bånd 1 og 2 fra den TAP-behandlede prøven og bånd 1 fra prøven uten TAP-behandling ble skåret ut med skalpell og gelrenset (3.11). Renset DNA ble deretter ligert til pCRII-TOPO kloningsvektor ved hjelp av TOPO TA Cloning Kit fra Invitrogen (3.12), og transformert i *E. coli* XL1-Blue MRF' strain^a (Stratagene). Etter screening for antibiotikaresistens og defekt *lacZ* (hvite kolonier), ble plasmider isolert (3.13), og deretter sekvensert ved ABI-lab, Biologisk Institutt, UiO. Dette ble gjort for flere parallelle prøver av bånd 1 og 2 fra den TAP-behandlede prøven og bånd 1 fra prøven uten TAP-behandling. Resultatene er vist i Figur 4-17 og oppsummert i Tabell 4-8 og Tabell 4-9.

5' acttattgaaagtgagaacaattccatgta₁₁ctttat₁tca₁t₁a₁₁
₁₁₁₁₁₁₂₂₂taa_Ng_{NNN}gagta₁₁ttat₁₁agaagatttactaaaggagc₁gtatt
actcatgctagaacaaggactagattatggttgtcaaactggc₁taaa
agcaaaa_{NN}agaaaata_c₁₁tag_{NN}atacaaacc_Naatg_{1N}c₂aa_{1N}t_{NNNN}a
tttcattcgtgctg_{<>}₁₁tgttacaat₁₁cggtaa₁₁₁₂c₁attat₁tggc₁
ggatca₁₁gtattt₁g₁tcgg₁tatgg₁tata₁ccactacttaacaaagaa
aacacctgaagttcaa₁cagga₁ag_Naaactgaaatcgcagcagctca
acaagaag₁agattattcctttacaagcacatatgaaacatta₁aaaa
ctccaaagttttactttgga₁gtttt_{NN}ta_{2NNNN}g_Nc_{1111NNN}t_{1N}t_Nc₁ccac
gtattta_Nacaacaaggtgaggattaatttctccttcttcttttccc
ttatccattctctgtttcatcttgtgcata3'

Figur 4-17 Sekvensdata for BC1308-locus (grå bakgrunn) i *B.cereus* ATCC 14579 med TTTAT (lyseblå bakgrunn) oppstrøms for og predikert terminator (grønn bakgrunn) nedstrøms for genet. Sekvensen mellom bindingssetene for primerne er ikke inkludert i figuren (erstattet med <>). 1 og 2 indikerer ende av sekvens for henholdsvis bånd 1 og 2 fra TAP-behandlet prøve. N indikerer ende av sekvens fra prøve uten TAP-behandling.

På samme måte som ved isolering av gelfragmenter etter cRT-PCR av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987, kan det ha forekommet krysskontaminasjon mellom båndene i den TAP-behandlede prøven.

Tabell 4-8 Kartlegging av 5'-ende av transkripter fra bånd 1 og 2 fra TAP-behandlet prøve (brønn 1, Figur 4-16), relativt til translasjonsstart av BC1308. I enkelte av sekvensene har 5'- og 3'-ende identiske sekvenser, noe som gjør det vanskelig å finne nøyaktig transkripsjonsstart for dem. Fem av disse kan ha transkripsjonsstart 45 nukleotider oppstrøms for translasjonsstart. Disse sekvensene er ikke inkludert i Figur 4-17.

	Internt i BC1308	Mellom gen og TTTAT	-44	-45	-46	-47	-49	-50	-56	Kan være -45
Antall	6	1	1	11	1	1	0	1	2	5

Tabell 4-9 Kartlegging av 3'-ende av transkripter fra bånd 1 og 2 fra den TAP-behandlede prøven (brønn 1, Figur 4-17) og bånd 1 fra prøven uten TAP-behandling (brønn 4, Figur 4-17) fra agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-produkter av BC1308 i *B. cereus* 14579.

	Internt i BC1308	Internt i terminator	Nedstrøms for terminator
Antall	19	1	20

Det fremkommer av Tabell 4-8 at de aller fleste sekvensene har transkripsjonsstart 45 nukleotider oppstrøms for translasjonsstarten av BC1308. Posisjon -45 for BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 svarer til samme genlokasjon som -195 for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. Forskjellen i nummer mellom de to er forårsaket av nærvær av *bcrI* (150 bp) oppstrøms for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. Transkripsjonsstart av dette genet er med andre ord på samme sted uavhengig av om *bcrI* er lokalisert i 5'-UTR eller ikke.

Det er bemerkelsesverdig at nesten samtlige 3'-ender av sekvensene fra prøven uten TAP-behandling var nedstrøms for terminatoren, mens svært mange fra den TAP-behandlede prøven var internt i BC1308.

4.9 Isolering av RNA fra *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579 til real time RT-PCR og primer extension

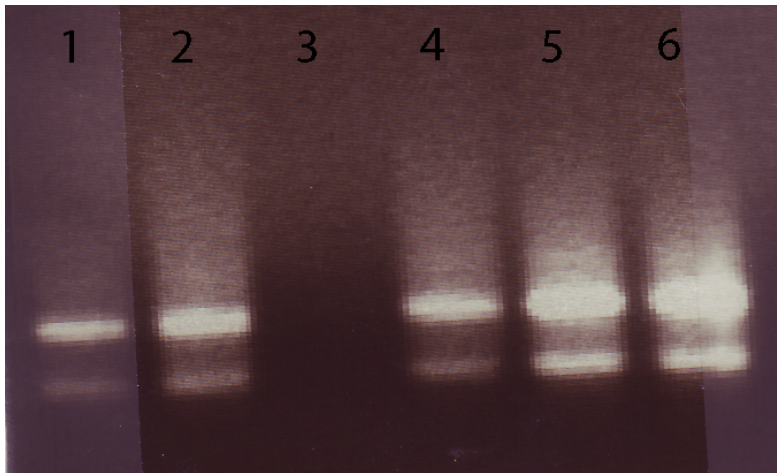
Det var ønskelig å gjøre videre transkripsjonsanalyser ved real time RT-PCR og primer extension. Ved real time RT-PCR kan flere genloci undersøkes for kotranskripsjon av *bcrI* raskt og kvantitativt. Primer extension ble valgt for å bekrefte resultatene fra cRT-PCR av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579, og for nøyaktig bestemmelse av transkripsjonsstart.

Ettersom mye av tidligere isolert RNA var brukt opp, og det var ønskelig å gjøre real time RT-PCR og primer extension med flere biologiske replikater, var det nødvendig å isolere nytt RNA.

RNA ble isolert fra tre biologiske replikater av *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579. Isolering av RNA ble gjennomført som beskrevet i 3.2, men ble grunnet mangel på store kolber dyrket i 1 l erlenmeyerkolbe med spor (Bellco Biotechnology). Volum av medium og tilsatt overnattkultur ble nedjustert til henholdsvis 100 ml og 100 μ l. Prøver ble isolert ved OD \approx 0,6. RNA-konsentrasjon og -kvalitet ble som tidligere målt ved A₂₆₀ og agarose-gelelektroforese (Tabell 4-10, Figur 4-18).

Tabell 4-10 Absorbansmålinger av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579

	Kons.	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
10987A	0,9430 µg/µl	0,184	0,472	0,268	0,009	1,76	2,56
10987B	0,8825 µg/µl	0,222	0,441	0,244	0,011	1,81	1,99
10987C	0,07 µg/µl	0,019	0,037	0,021	0	1,72	1,96
14579A	1,2236 µg/µl	0,276	0,612	0,338	0,003	1,81	2,22
14579B	1,2935 µg/µl	0,269	0,647	0,361	0,002	1,79	2,41
14579C	1,3184 µg/µl	0,256	0,659	0,369	0,004	1,79	2,58



Figur 4-18 Agarose-gelelektroforese av RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579. RNA-prøver 10987A, B og C ble lastet i henholdsvis brønn 1, 2 og 3, 14579A, B og C ble lastet i henholdsvis brønn 4, 5 og 6. Prøvene ble separert i 0,8% agarose ved 55 V i ca 1,5 time. Ratio mellom 23S- og 16S-rRNA ble ved visuell inspeksjon omtrentlig beregnet til 2:1. Prøvene ble ikke denaturert ved oppvarming før applikasjon på gel.

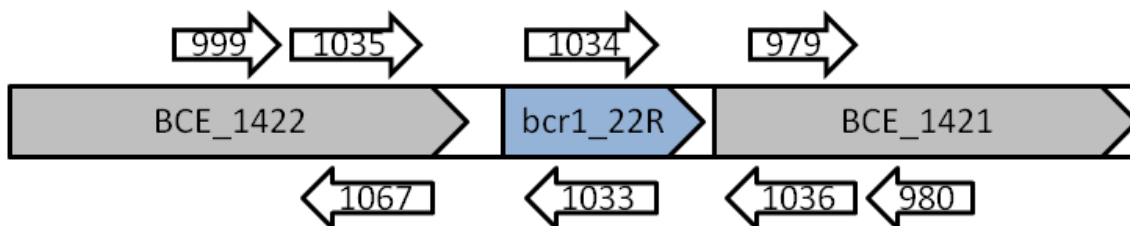
Av Tabell 4-10 og Figur 4-18 fremkom det at isoleringen av RNA fra prøve 10987C ikke ga positivt resultat. Figur 4-18 viser god ratio mellom 23S- og 16S-rRNA for de resterende prøvene, et tegn på tilfredsstillende kvalitet. Ratio mellom A₂₆₀ og A₂₈₀ var imidlertid noe lav, og kunne tyde på at isolert RNA ikke var rent.

RNA ble benyttet i real time RT-PCR med primeresettene 979+980, 1034+1036, 1033+1035 og 999+1067 (Tabell 4-11, Figur 4-19) for å undersøke RNA-kvalitet. Det kunne påvises transkripsjon av BCE_1422 og BCE_1421, men ingen produkter for kotranskripsjon av bcr1_22R med BCE_1421 (resultater ikke vist). RNA ga heller ikke resultater fra real time RT-PCR med primere for 5S-rRNA. Det ble mistenkt at

RNA-kvalitet var for lav. Det ble derfor valgt å benytte RNA isolert av Simen Kristoffersen i PE-analyser.

Tabell 4-11 Primere brukt ved real time RT-PCR

	Sekvens	Bindingssted	t_m	G+C %
979	ttgcggttatttatatcggttt	BCE_1421/BC1308->3'	59,62 °C	36,36
980	tgctggtgaatctgcaatgt	5'<-BCE_1421/BC1308	60,27 °C	45,00
981	aaagcaagctttttgtaatcgtg	5'<-BCE_1174	59,85 °C	34,78
999	tgtaggttgggttggtgtga	BCE_1422/bC1309->3'	59,85 °C	50,00
1033	gaattttgaggtgggggtct	3'<-bcr1_22	60,17 °C	50,00
1034	agacccccacctcaaaattc	bcr1_22R->3'	60,17 °C	50,00
1035	tggtggttggttcttctcaa	BCE_1422/BC1309->3'	59,11 °C	45,00
1036	ccgatataaatacccgaagtg	5'<-BCE_1421/BC1308	60,56 °C	45,45
1067	ttgagaagaaccaaccacca	BCE_1422/BC1309->3'	59,11 °C	45,00



Figur 4-19 Primerne 979, 980, 999, 1033, 1034, 1035, 1036 og 1067 brukt ved transkripsjonsanalyse av *bcr1_22R* i *B. cereus* ATCC 10987 ved real time RT-PCR

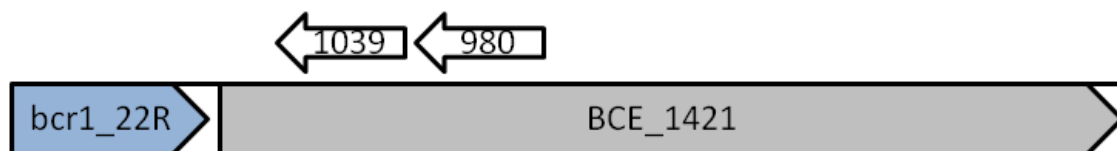
4.10 Transkripsjonsanalyse av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 ved primer extension

Primer extension brukes for å kartlegge 5'-enden av mRNA-molekyler, og skulle benyttes for å bekrefte transkripsjonsstarten for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579, funnet ved cRT-PCR. Ved denne metoden foregår ingen amplifisering, og det analyseres på en populasjon av molekyler direkte isolert fra cellen, noe som gir et riktigere bilde av mRNA-transkriptene i løsningen

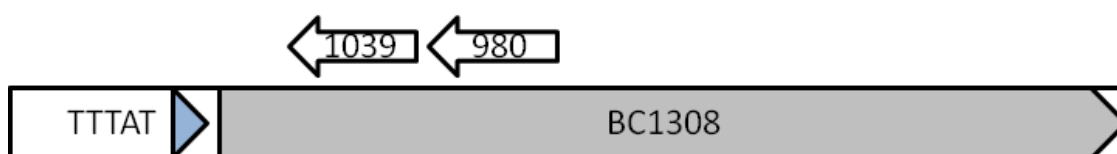
enn metoder som cRT-PCR. Primer extension ble gjennomført som beskrevet i 3.16, med RNA tidligere isolert av Simen Kristoffersen i forskningsgruppen. Primerne er beskrevet i Tabell 4-12, Figur 4-20 og Figur 4-21, og resultatene fra PE-analysen er vist i Figur 4-22.

Tabell 4-12 Primere som binder internt i BCE_1421/BC1308 brukt ved primer extension.

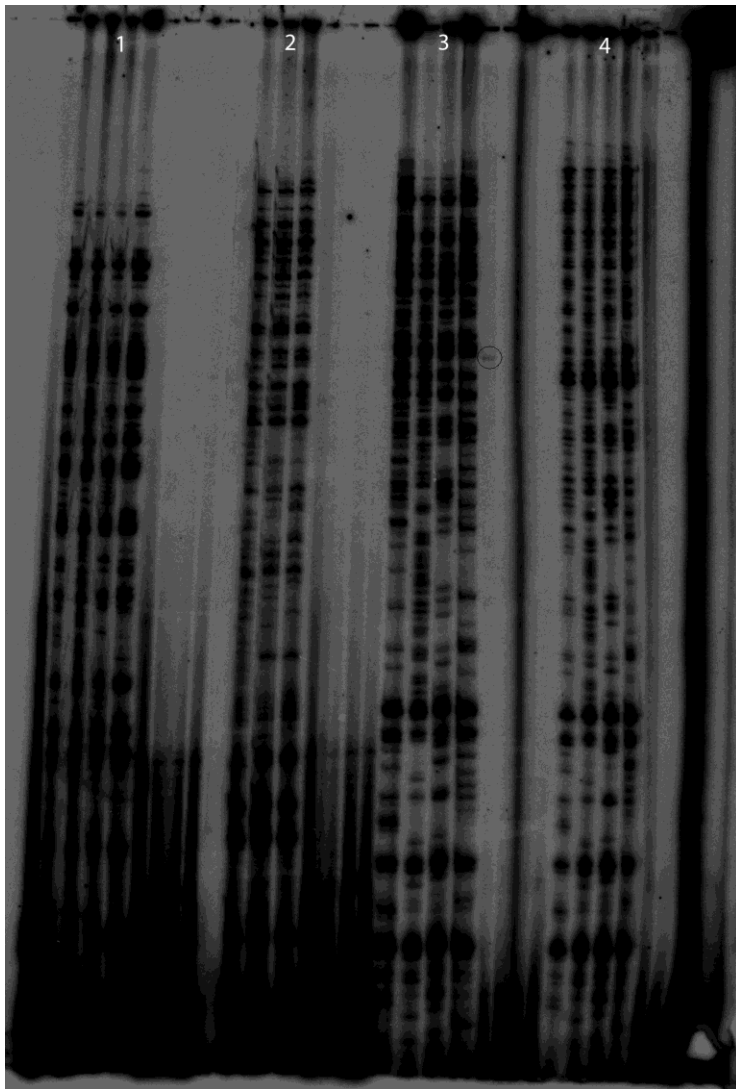
	Sekvens	Bindingssted	t_m	G+C %
980	tgctggtgaatctgcaatgt	5'<-I BCE_1421/BC1308	60,27°C	45,00
1039	ttagccagtttgacaacataatcta	5'<-I BCE_1421/BC1308	57,25°C	32,00



Figur 4-20 Lokalisering av primerne 980 og 1039 brukt ved transkripsjonsanalyse av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 ved primer extension.



Figur 4-21 Lokalisering av primerne 980 og 1039 brukt ved transkripsjonsanalyse av BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 ved primer extension.



Figur 4-22 Polyakrylamid-gelelektroforese av primer extension-produkter. Primer 1039 ble benyttet i de to sekvenseringsreaksjonene 1 og 2, og primer 980 i 3 og 4. RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 10987 ble benyttet i reaksjon 2 og 4, og RNA isolert fra *B. cereus* ATCC 14579 ble benyttet i reaksjon 1 og 3.

Polyakrylamid-gelelektroforese av PE-produkter (Figur 4-22) viste et tydelig bånd fra prøven med primer 980 og RNA fra *B. cereus* ATCC 14579. Det komprimerte båndet indikerte at transkripsjonsstarten hovedsakelig er konsentrert til ett punkt. Prøven med den samme primeren og RNA fra *B. cereus* ATCC 10987 ga ingen resultater. Det gjorde heller ikke prøvene med primer 1039. Ettersom sekvensen var tilnærmet uleselig i området rundt det aktuelle båndet, ble polyakrylamid-gelelektroforesen gjentatt med de samme PE-produktene, men separert over lengre tid. Denne gang ble kun prøvene med primer 980 lastet på gel (Figur 4-23). Denne polyakrylamid-gelelektroforesen ble gjennomført av Simen Kristoffersen i forskningsgruppen.



Figur 4-23 Ny polyakrylamidgelelektroforese av de samme primer extension-produktene som i Figur 4-22, gjennomført av Simen Kristoffersen. *B. cereus* ATCC 10987 i reaksjon 1, *B. cereus* ATCC 14579 i reaksjon 2.

Av Figur 4-23 fremkom at primer extension-reaksjonen ga resultat både for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987, og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579.

Sekvensen nedenfor transkripsjonsstart i BC1308 var lesbar, men mindre tydelig i Figur 4-23 enn den var ved analyse direkte på skjerm med programmet ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics). Følgende sekvens ble avlest fra området nedenfor primer extension-båndet fra BC1308 (*B. cereus* ATCC 14579):

ataaggagta...agaaga...taaaggagcgta. Denne sekvensen tilsvarte sekvensen for 5'-ende av BC1308 funnet ved cRT-PCR (Figur 4-17). Ut fra sekvenser og primer extension-produkter ble transkripsjonsstart, som ved cRT-PCR, beregnet til -45 eller en nukleotid oppstrøms. Eksperimentet bør gjentas for å bestemme dette entydig.

Sekvensen for BCE_1421 (*B. cereus* ATCC 10987) var ikke tolkbar, likevel kunne størrelsesforskjellen på primer extension-produktet i forhold til BC1308 omtrentlig tilsvare størrelsen av bcr1_22R.

5. Diskusjon

5.1 Metoder

5.1.1 Konvensjonell RT-PCR

Konvensjonell RT-PCR er en svært effektiv metode for deteksjon av kjente RNA-sekvenser. Ett eneste mRNA-molekyl i utgangsløsningen kan amplifiseres opp til millioner av kopier og dermed være mulig å detektere ved gelelektroforese. Denne sensitiviteten er både metodens styrke og svakhet. Den er dårligere egnet til transkripsjonsanalyser som gjøres på RNA isolert fra store bakteriepopulasjoner enn kvantitative metoder. Dersom ett av transkriptene i én av bakteriene i denne populasjonen er forlenget, for eksempel ved transkripsjonell gjennomlesning av en funksjonell terminator, kan dette transkriptet i prinsippet gi opphav til PCR-produkt og dermed gi et feilaktig bilde av det reelle transkripsjonsmønsteret.

Resultatene fra konvensjonell RT-PCR viste kotranskripsjon av *bcr1_18F*, *bcr1_20R* og *bcr1_22R* med henholdsvis *BCE_1118*, *BCE_1174* og *BCE_1421*. Disse resultatene viste også et kotranskript for *BCE_1421* og *BCE_1422*, noe som indikerte at *bcr1_22R* kunne bli transkribert som del av et operon. Metoden er imidlertid ikke kvantitativ, og disse resultatene bør vurderes som preliminaire. Metoden gir heller ikke noe bilde av start- og stoppsted for transkriptet, siden man kun amplifiserer området mellom de valgte oligonukleotidprimerne.

5.1.2 Real time RT-PCR

Real time RT-PCR ble benyttet for å undersøke kotranskripsjon av *bcr1* ved flere loci. Ingen kotranskripsjon ble påvist ved denne metoden, til tross for at det senere ble vist ved både cRT-PCR og primer extension. Årsaken til dette kan tenkes å være at de benyttede oligonukleotidprimerne ikke bandt godt nok og derfor ikke var egnet til disse forsøkene, til tross for at de teoretisk skulle gi en perfekt binding til templat-DNA.

5.1.3 Sirkulær RT-PCR

Sirkularisering av RNA er nødvendig for amplifisering ved cRT-PCR. Trifosfat i 5'-enden av fullengde mRNA i bakterier forhindrer liggering til 3'-enden av transkriptet (Bensing, Meyer et al. 1996). Dette kom tydelig fram ved agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-prøver for BCE_1421 locus fra *B. cereus* ATCC 10987 (Figur 4-12), hvor det antatte fullengdeproduktet kun var til stede i den TAP-behandlede prøven. De resterende båndene fra denne prøven korresponderte med båndene fra prøven uten TAP-behandling. RNA fra disse båndene utgjør sannsynligvis prosesserte eller degraderte transkripter uten trifosfat i 5'-enden. Dette kom også fram av de sekvenserte plasmidene (Figur 4-13), hvor ingen av sekvensene fra prøven uten TAP-behandling var fullengde. Det kan ha forekommet krysskontaminasjon mellom de ulike båndene ved gelelektroforese av den TAP-behandlede prøven, ettersom kloner fra bånd 2 ga fullengdesekvenser og kloner fra det øverste båndet ga sekvenser som tydelig var prosessert eller degradert før liggering.

Resultatene fra agarose-gelelektroforese av cRT-PCR-prøver fra BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 (Figur 4-17), var mer uventet. Et bånd fra prøven uten TAP-behandling tilsvarte et tydelig større amplifisert fragment enn produktene fra den TAP-behandlede prøven. Sekvensering av kloner fra det største båndet fra prøven uten TAP-behandling viste imidlertid ingen sekvenser med transkripsjonsstart lengre oppstrøms enn for hovedandelen av de TAP-behandlede prøvene.

5.1.4 Primer extension

Analyse ved primer extension av BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 bekreftet at transkripsjonsstart predikert ved cRT-PCR var den reelle. Ved primer extension analyseres en populasjon av molekyler, noe som gir det beste bildet av identiteten til 5'-ende av majoriteten av transkripter for locuset. Styrken til cRT-PCR er på den annen side at metoden gir mulighet for å studere identiteten til 5'- og 3'-ende av enkeltranskripter.

Transkripsjonsanalyse av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 ved primer extension ble gjentatt av Simen Kristoffersen i forskningsgruppen. Resultatene beskrevet i denne oppgaven ble da bekreftet.

5.2 Generell diskusjon

5.2.1 Transkripsjonsstart for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579

Transkripsjonsstart for BCE_1421, et predikert format-/nitrittransportprotein i *B. cereus* ATCC 10987, og for det ortologe genet BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579, ble ved cRT-PCR beregnet til å være i tilsvarende lokasjon, 195 (posisjon -195) og 45 (posisjon -45) nukleotider oppstrøms for translasjonsstart av henholdsvis BCE_1421 og BC1308, hvor forskjellen på 150 nukleotider er forårsaket av at *bcr1_22R* er lokalisert oppstrøms for BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. Selv om enkelte transkripter ble funnet å starte noen få nukleotider oppstrøms for denne posisjonen, var 5'-ende for majoriteten av transkripter i denne posisjonen.

Dette ble også støttet av resultatene fra primer extension. DNA-sekvensen for BC1308-reaksjonen kunne ikke leses hele veien, men kunne likevel tolkes med god nok sikkerhet til å finne transkripsjonsstart for genet (lest sekvens: 5'ataaggagta...agaaga...taaaggagcgta3'). DNA-sekvensen for reaksjonen på BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987, var dessverre ikke mulig å lese. Båndets plassering i gelen var imidlertid slik en kunne forvente for et molekyl 150 bp lengre enn transkriptet fra BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579 (Figur 4-23). Disse forsøkene bør gjentas for nøyaktig å bestemme transkripsjonsstart for begge loci.

5.2.2 Kotranskripsjon av *bcr1* i 5'-ende av transkripter

Resultater fra cRT-PCR og primer extension har vist at *bcr1_22R* kotranskriberes med, og utgjør 5'-ende av transkriptet av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987. Transkripsjon initieres 10 bp oppstrøms for *bcr1_22R*, tilsvarende 195 bp oppstrøms for translasjonsstarten av genet. Dette er første gang et *bcr1*-element er konklusivt

vist å i sin helhet kunne utgjøre størstedelen av 5'-UTR av et mRNA i *B. cereus*-gruppen, og viser at de to ortologe genene BCE_1421 og BC1308 har ulik 5'-ende for sine respektive transkripter i henholdsvis *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579.

5.2.3 Prosessering og degradering av mRNA i *B. cereus*

mRNA-transkripter er gjenstand for omfattende prosessering og degradering i alle organismer. Disse mekanismene spiller en viktig rolle i regulering av genekspressjon. I eukaryote celler foregår degradering av RNA hovedsakelig fra 5'- til 3'-ende av transkriptet (Alberts 2002; Nelson, Cox et al. 2005). I *E. coli* degraderes mRNA ved kløyving av endonukleaser, hvorav RNase E er den viktigste (Mudd, Krisch et al. 1990). I tillegg er transkriptene gjenstand for degradering av eksonukleaser som angriper fra 3'- til 5'-ende (Marcaida, DePristo et al. 2006). Det har lenge vært antatt at dette paradigmet har vært generelt gjeldende for prokaryote organismer (Alberts 2002), men oppdagelser i *B. subtilis* har vist en RNA-degradering mer i tråd med den funnet i eukaryote celler (Condon 2003). *B. subtilis* mangler homologe gener for flere av de viktigste enzymene involvert i prosessering og degradering av RNA i *E. coli*, deriblant RNase E (Condon 2007). I *B. subtilis* har man derimot funnet en annen essensiell ribonuklease, RNase J, som er vist å ha eksoribonukleaseaktivitet fra 5'- til 3'-ende av RNA (Mathy, Benard et al. 2007). Ved homologisøk ved hjelp av BLAST, utført av Simen Kristoffersen i forskningsgruppen, ble det funnet at BCE_4026 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC3977 i *B. cereus* ATCC 14579 er henholdsvis 87 % og 86 % identisk med BSU14530 i *B. subtilis*, som koder for RNase J1, og at disse er "bidirectional best hits" i *B. cereus* og *B. subtilis*, en vanlig definisjon på ortologe gener.

Sekvensdata fra cRT-PCR, vist i Figur 4-13 og Figur 4-17 ga en oversikt over 5'- og 3'-ende av transkripter av BCE_1421 i *B. cereus* ATCC 10987 og BC1308 i *B. cereus* ATCC 14579. Fra disse resultatene kunne mRNA se ut til å bli degradert fra begge ender. For å kunne trekke en konklusjon vedrørende dette vil det imidlertid

være nødvendig å undersøke et vesentlig høyere antall klonede transkripter fra cRT-PCR fra en rekke kromosomale loci.

5.2.4 *bcr1* som mulig stabilisator i 5'-ende av mRNA

Det mobile repeterte elementet NEMIS, funnet i *Neisseria*-slekten, er foreslått å kunne regulere uttrykk av nærliggende gener ved å danne sekundærstrukturer som interagerer med RNase III (Mazzone, De Gregorio et al. 2001; De Gregorio, Abrescia et al. 2002; De Gregorio, Abrescia et al. 2003). ERIC, funnet i *E. coli*, *Yersinia* og andre *Enterobacteriaceae* regulerer degradering av mRNA-transkript av nærliggende gener. Ribonukleaser kan hemmes eller rekrutteres avhengig av om elementet kotranskriberes i 5'- eller 3'-ende (De Gregorio, Silvestro et al. 2005). Mekanismer for genregulering på RNA-nivå er også observert for de repeterte elementene RUP og BOX (Newbury, Smith et al. 1987; Knutsen, Johnsborg et al. 2006).

Sekundærstrukturer i 3'-ende er vist å ha en stabiliserende effekt på mRNA i *E. coli*, noe som kan forklares ved at eksoribonukleaser som degraderer fra 3'-ende i *E. coli* hemmes av disse strukturene (McLaren, Newbury et al. 1991). I *B. subtilis* degraderer eksoribonukleaser først og fremst fra 5'-ende (Condon 2003), hvilket forklarer hvorfor mRNA i *B. subtilis* stabiliseres av sekundærstrukturer i 5'-ende. (Sharp and Bechhofer 2005). *bcr1* er på RNA-nivå predikert å danne stabile sekundærstrukturer med doble hårnåler *in silico* (Klevan, Tourasse et al. 2007). I denne oppgaven er det vist at *bcr1* kan kotranskriberes med nedstrøms gen, og i sin helhet utgjøre 5'-UTR av transkriptet. Dette kan muliggjøre en reguleringsmekanisme hvor nærvær av *bcr1* i 5'-UTR kan regulere nedstrøms gener ved kotranskripsjon og påvirkning av mRNA-stabilitet. Hvorvidt *bcr1* kan ha en funksjon i å rekruttere og binde RNA-prosesserende enzymer er ikke kjent. Tidligere forsøk på å isolere *bcr1*-spesifikke DNA-bindende proteiner ga ingen positive kandidater (Stabell, Egge-Jacobsen et al. 2009).

5.3 Videre studier

Denne studien har gitt interessante resultater vedrørende *bcrI* som er verdt å undersøke videre. Det kunne være interessant å foreta kartlegging av transkripsjonsstart for flere loci hvor *bcrI* er lokalisert oppstrøms for gener i *B. cereus* ATCC 10987, men mangler i *B. cereus* ATCC 14579, samt å foreta undersøkelse av mRNA-stabilitet og –degradering, deriblant for BCE_1421 relativt til BC1308. Det kunne også være interessant å gjennomføre globale analyser av mRNA-degradering i *B. cereus* ATCC 10987 og *B. cereus* ATCC 14579 ved RNA-sekvensering. Preliminære resultater fra eksperimenter utført av Simen Kristoffersen i forskningsgruppen antyder at degraderingsraten av mRNA for BCE_1421 er ca. halvparten av den for BC1308. Konstrukt av oppstrøms region for BCE_1421 og BC1308 +/-*bcrI* fusjonert til *lacZ* har videre indikert at nærvær av *bcrI* gir ca. 2 ganger lavere degraderingsrate *in vivo*, og kan antyde at *bcrI* i 5'-ende virker stabiliserende på mRNA-transkripter. I sammenheng med dette ville det være interessant å gjenta proteinbindingsforsøkene med *bcrI* på RNA-nivå. Det kunne i tillegg være interessant å undersøke en eventuell effekt på mRNA-degradering og –abundance for gener i operoner der *bcrI* kan være lokalisert internt i transkriptet (for eksempel NHE-locus), og å undersøke om *bcrI*-elementer plassert i 3'-ende av gener kotranskriberes i sin helhet og kan påvirke mRNA-stabilitet.

Kildeliste

- Abrami, L., N. Reig, et al. (2005). "Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill." Trends Microbiol **13**(2): 72-8.
- Agata, N., M. Ohta, et al. (1995). "A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*." FEMS Microbiol Lett **129**(1): 17-20.
- Alberts, B. (2002). Genetic recombination. Molecular biology of the cell. New York, Garland Science: 275-285.
- Alberts, B. (2002). Isolating, cloning and sequencing DNA. Molecular biology of the cell. New York, Garland Science: 491-513.
- Alberts, B. (2002). Posttranscriptional controls. Molecular biology of the cell. New York, Garland Science: 435-452.
- Alberts, B. (2002). Site-specific recombination. Molecular biology of the cell. New York, Garland Science: 285-298.
- Bechhofer, D. H., I. A. Oussenko, et al. (2008). "Analysis of mRNA decay in *Bacillus subtilis*." Methods Enzymol **447**: 259-76.
- Bensing, B. A., B. J. Meyer, et al. (1996). "Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7794-9.
- Britton, R. A., T. Wen, et al. (2007). "Maturation of the 5' end of *Bacillus subtilis* 16S rRNA by the essential ribonuclease YkqC/RNase J1." Mol Microbiol **63**(1): 127-38.
- Buisine, N., C. M. Tang, et al. (2002). "Transposon-like *Correia* elements: structure, distribution and genetic exchange between pathogenic *Neisseria* sp." FEBS Lett **522**(1-3): 52-8.
- Burrus, V., G. Pavlovic, et al. (2002). "Conjugative transposons: the tip of the iceberg." Mol Microbiol **46**(3): 601-10.
- Condon, C. (2003). "RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 157-74, table of contents.
- Condon, C. (2007). "Maturation and degradation of RNA in bacteria." Curr Opin Microbiol **10**(3): 271-8.
- Correia, F. F., S. Inouye, et al. (1986). "A 26-base-pair repetitive sequence specific for *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* genomic DNA." J Bacteriol **167**(3): 1009-15.
- Correia, F. F., S. Inouye, et al. (1988). "A family of small repeated elements with some transposon-like properties in the genome of *Neisseria gonorrhoeae*." J Biol Chem **263**(25): 12194-8.
- Craig, N. L. (1997). "Target site selection in transposition." Annu Rev Biochem **66**: 437-74.
- De Gregorio, E., C. Abrescia, et al. (2002). "The abundant class of nemis repeats provides RNA substrates for ribonuclease III in *Neisseriae*." Biochim Biophys Acta **1576**(1-2): 39-44.
- De Gregorio, E., C. Abrescia, et al. (2003). "Ribonuclease III-mediated processing of specific *Neisseria meningitidis* mRNAs." Biochem J **374**(Pt 3): 799-805.

- De Gregorio, E., G. Silvestro, et al. (2005). "Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence repeats in yersiniae: genomic organization and functional properties." *J Bacteriol* **187**(23): 7945-54.
- Delilhas, N. (2008). "Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs." *Mol Microbiol* **67**(3): 475-81.
- Drobniewski, F. A. (1993). "Bacillus cereus and related species." *Clin Microbiol Rev* **6**(4): 324-38.
- Ehling-Schulz, M., M. Fricker, et al. (2006). "Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1." *BMC Microbiol* **6**: 20.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, et al. (1995). "Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd." *Science* **269**(5223): 496-512.
- Gilson, E., J. M. Clement, et al. (1984). "A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in E. coli." *EMBO J* **3**(6): 1417-21.
- Gohar, M., O. A. Økstad, et al. (2002). "Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of Bacillus cereus reveals the importance of the PlcR regulon." *Proteomics* **2**(6): 784-91.
- Guidi-Rontani, C., Y. Pereira, et al. (1999). "Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXO1 of Bacillus anthracis." *Mol Microbiol* **33**(2): 407-14.
- Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, et al. (1999). "Germination of Bacillus anthracis spores within alveolar macrophages." *Mol Microbiol* **31**(1): 9-17.
- Hacker, J., U. Hentschel, et al. (2003). "Prokaryotic chromosomes and disease." *Science* **301**(5634): 790-3.
- Helgason, E., O. A. Økstad, et al. (2000). "Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis--one species on the basis of genetic evidence." *Appl Environ Microbiol* **66**(6): 2627-30.
- Hofnung, M. and J. A. Shapiro (1999). "Introduction—special issue on repetitive DNA sequences in microbes." *Res Microbiol* **150**: 577-78.
- Ivanova, N., A. Sorokin, et al. (2003). "Genome sequence of Bacillus cereus and comparative analysis with Bacillus anthracis." *Nature* **423**(6935): 87-91.
- Jensen, G. B., B. M. Hansen, et al. (2003). "The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives." *Environ Microbiol* **5**(8): 631-40.
- Kennedy, M. J., S. L. Reader, et al. (1994). "Preservation records of micro-organisms: evidence of the tenacity of life." *Microbiology* **140** (Pt 10): 2513-29.
- Klevan, A., N. J. Tourasse, et al. (2007). "Exploring the evolution of the Bacillus cereus group repeat element bcr1 by comparative genome analysis of closely related strains." *Microbiology* **153**(Pt 11): 3894-908.
- Knutsen, E., O. Johnsborg, et al. (2006). "BOX elements modulate gene expression in Streptococcus pneumoniae: impact on the fine-tuning of competence development." *J Bacteriol* **188**(23): 8307-12.
- Kotiranta, A., K. Lounatmaa, et al. (2000). "Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections." *Microbes Infect* **2**(2): 189-98.

-
- Liolios, K., K. Mavrommatis, et al. (2008). "The genomes on line database (GOLD) in 2007: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata." Retrieved 12.05.2009, 2009, from <http://www.genomesonline.org>.
- Madigan, M. T., T. D. Brock, et al. (2006). Endospore-forming, low GC, Gram-positive *Bacteria: Bacillus, Clostridium*, and relatives. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall: 379-383.
- Madigan, M. T., T. D. Brock, et al. (2006). Endospores. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall: 87-91.
- Madigan, M. T., T. D. Brock, et al. (2006). Genetic exchange in prokaryotes. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall: 268-287.
- Madigan, M. T., T. D. Brock, et al. (2006). Growth of bacterial populations. Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, N.J., Pearson Prentice Hall: 140-144.
- Mahillon, J. and M. Chandler (1998). "Insertion sequences." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 725-74.
- Marcaida, M. J., M. A. DePristo, et al. (2006). "The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution." Trends Biochem Sci **31**(7): 359-65.
- Martin, B., O. Humbert, et al. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." Nucleic Acids Res **20**(13): 3479-83.
- Mathy, N., L. Benard, et al. (2007). "5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA." Cell **129**(4): 681-92.
- Mazzone, M., E. De Gregorio, et al. (2001). "Whole-genome organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences conserved in pathogenic *Neisseriae*." Gene **278**(1-2): 211-22.
- McLaren, R. S., S. F. Newbury, et al. (1991). "mRNA degradation by processive 3'-5' exoribonucleases in vitro and the implications for prokaryotic mRNA decay in vivo." J Mol Biol **221**(1): 81-95.
- Mudd, E. A., H. M. Krisch, et al. (1990). "RNase E, an endoribonuclease, has a general role in the chemical decay of *Escherichia coli* mRNA: evidence that rne and ams are the same genetic locus." Mol Microbiol **4**(12): 2127-35.
- Nelson, D. L., M. M. Cox, et al. (2005). RNA processing. Lehninger principles of biochemistry. New York, Freeman: 1007-1021.
- Newbury, S. F., N. H. Smith, et al. (1987). "Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences." Cell **48**(2): 297-310.
- Oggioni, M. R. and J. P. Claverys (1999). "Repeated extragenic sequences in prokaryotic genomes: a proposal for the origin and dynamics of the RUP element in *Streptococcus pneumoniae*." Microbiology **145** (Pt 10): 2647-53.
- Priest, F. G. (1993). Systematics and Ecology of *Bacillus*. Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria : biochemistry, physiology, and molecular genetics. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. Washington, American Society for Microbiology: 3-16.
- Rasko, D. A., M. R. Altherr, et al. (2005). "Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 303-29.

-
- Rasko, D. A., J. Ravel, et al. (2004). "The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1." Nucleic Acids Res **32**(3): 977-88.
- Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, et al. (2007). "Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1." J Bacteriol **189**(1): 52-64.
- Read, T. D., S. N. Peterson, et al. (2003). "The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria." Nature **423**(6935): 81-6.
- Salyers, A. A. and D. D. Whitt (2002). *Bacillus anthracis*: the cause of anthrax. Bacterial pathogenesis : a molecular approach. Washington, D.C., ASM Press: 332-338.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Amplification of cDNA generated by reverse transcription of mRNA. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**: 8.46-8.53.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). The basic polymerase chain reaction. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**: 8.18-8.24.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Detection of DNA in agarose gels. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 5.14-5.17.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). DNA-sequencing. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**: 12.1-12.9.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Screening bacterial colonies using X-gal and IPTG: α -complementation. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 1.123-1.125.
- Setlow, P. (2007). "I will survive: DNA protection in bacterial spores." Trends Microbiol **15**(4): 172-80.
- Sharp, J. S. and D. H. Bechhofer (2005). "Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **57**(2): 484-95.
- Sharples, G. J. and R. G. Lloyd (1990). "A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes." Nucleic Acids Res **18**(22): 6503-8.
- Siguiet, P., J. Filee, et al. (2006). "Insertion sequences in prokaryotic genomes." Curr Opin Microbiol **9**(5): 526-31.
- Stabell, F. B., W. Egge-Jacobsen, et al. (2009). "ORF 2 from the *Bacillus cereus* linear plasmid pBClin15 encodes a DNA binding protein." Lett Appl Microbiol **48**(1): 51-7.
- Stenfors Arnesen, L. P., A. Fagerlund, et al. (2008). "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." FEMS Microbiol Rev **32**(4): 579-606.
- Stern, M. J., G. F. Ames, et al. (1984). "Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome." Cell **37**(3): 1015-26.

-
- Tourasse, N. J., E. Helgason, et al. (2006). "The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics." J Appl Microbiol **101**(3): 579-93.
- Versalovic, J. and J. R. Lupski (1998). Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. Bacterial genomes : physical structure and analysis. J. R. Lupski, F. J. de Bruijn and G. Weinstock. New York, Chapman & Hall: 38-48.
- Zipper, H., H. Brunner, et al. (2004). "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications." Nucleic Acids Res **32**(12): e103.
- Økstad, O. A., I. Hegna, et al. (1999). "Genome organization is not conserved between *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*." Microbiology **145** (Pt 3): 621-31.
- Økstad, O. A., N. J. Tourasse, et al. (2004). "The *bcr1* DNA repeat element is specific to the *Bacillus cereus* group and exhibits mobile element characteristics." J Bacteriol **186**(22): 7714-25.