



**U i T**

**NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET**

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi – Norges Fiskerihøgskole

## **Rekombinant produksjon og protease-avhengig *in vitro* modning av det antimikrobielle peptidet Centrocin**

- Et system som kan anvendes til å isolere proteaser

—

**Unni Louise Lande**

*Masteroppgave i Akvamedisin (60 stp)*

*Mai 2018*





## **Forord**

Denne masteroppgaven ble utført ved Fakultetet for biologi, fiskeri og økonomi, ved Norges Fiskerihøgskole, UiT - Norges arktiske universitet.

Først vil jeg takke min hovedveileder, Hans-Matti Blencke og min biveileder Chun Li for at dere introduserte meg for dette spennende prosjektet, og for ypperlig og entusiastisk veiledning. Det har vært en svært variert og interessant oppgave, og jeg er veldig glad for at jeg fikk mulighet til å gå i dybden på dette feltet. Jeg må rette en ekstra takk til Hans-Matti Blencke som guidet meg gjennom lab-arbeidet, og som alltid kom med nye forslag til metoder og ideer når ulike utfordringer dukket opp på veien. Denne oppgaven har gitt meg enda mer utvikling og kunnskap enn jeg hadde ventet.

Jeg har hatt noen veldig fine år ved UiT i Tromsø, og vil savne denne fine og spesielle byen her i Nord-Norge.

Til slutt en stor takk til mine foreldre, og alle mine nære og kjære, for all støtte.

Unni Louise Lande

Tromsø, mai 2018

## Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven var å lage og evaluere et system for å isolere og identifisere proteaser som er involvert i å modne marine antimikrobielle peptider (AMPer).

Bioaktive substanser fra marine organismer er lovende for utvikling av terapeutiske midler. Siden marine organismer lever tett på mengder av patogene mikroorganismer, har de utviklet et robust og effektivt immunsystem, der iblant AMPer. Mange AMPer er avledet fra inaktive forløper molekyler, og blir prosessert av proteaser for å frigjøre den aktive formen. Proteaser er viktige molekylære verktøy innenfor ulike industrier og bioteknologi, og marine proteaser har flere egenskaper som er ønskelige for ulike anvendelser, slik som aktivitet ved lav temperatur.

Den metodiske tilnærmingen i denne oppgaven bestod av å konstruere og produsere en proteinkonstruksjon med innhold av et marint AMP og andre utvalgte domener, for å kunne benytte denne som et agn for protease(r). Domenene i konstruktet bestod av fluorescerende proteiner, affinitetstagger, AMPet og kommersielle protease-kløyvesteder.

Proteinanalyser gav resultater som bekreftet rekombinant produksjon av proteinkonstruksjonen. Videre ble det rekombinante proteinet rensset ved å bruke affinitetsrensing, og det ble da avdekket at noe av proteinet trolig var degradert til mindre proteinfragmenter. For å undersøke om proteinet kunne kløyves ved de inkluderte kløyvesteder i proteinet, ble kommersiell protease benyttet og resultatet viste at proteinet trolig ble kløyd ved ett eller ved flere av kløyvestedene, og dette resultatet gav grunnlag for å utføre forsøk av krysslanking av mål-protein med den kommersielle proteasen. Det ble et interessant resultat av krysslanking, og det viste at et kompleks av protease og protein trolig var forekommet, men ikke med det fullstendige mål-protein, men sannsynligvis med en fragmentert del av proteinet. Dette viste likevel at det var mulig å oppnå pulldown, det å fange et protein-protease kompleks.

## Forkortelser

|      |  |
|------|--|
| AMP  | antimikrobiell peptid                        |
| ELIC | Exonuclease and Ligation-Independent Cloning |
| Em   | emisjon                                      |
| Ex   | eksitasjon                                   |
| FP   | fluorescerende protein                       |
| FRET | förster resonance energy transfer            |
| GFP  | green fluorescent protein                    |
| HRP  | horseradish peroxidase                       |
| IPTG | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside        |
| ONK  | over natt kultur                             |
| PCR  | polymerase chain reaction                    |
| PVDF | polyvinylidene difluoride                    |
| RFP  | red fluorescent protein                      |
| RFU  | relative fluorescence units                  |
| RT   | romtemperatur                                |

# Innhold

|   |            |
|---|------------|
| <b>Forord</b>   | <b>II</b>  |
| <b>Sammendrag</b>   | <b>III</b> |
| <b>Forkortelser</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>1 Innledning</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 Introduksjon  | 1          |
| 1.2 Biologisk aktivitet i havet   | 1          |
| 1.3 Antimikrobielle peptider – lovende terapeutiske midler                  | 2          |
| 1.3.1 Antimikrobielle mekanismer hos AMPer                                  | 4          |
| 1.3.2 Marine AMPer  | 5          |
| 1.3.3 Centrocin: marine AMPer fra grønn kråkebolle                          | 6          |
| 1.4 Proteaser – viktige enzymer og molekylære verktøy                       | 8          |
| 1.4.1 Marine proteaser  | 9          |
| 1.4.2 Kuldeadapterte marine proteaser                                       | 10         |
| 1.5 FRET – et bevis på tilstedeværelse av molekylære komplekser             | 12         |
| 1.6 Affinitetsrensing og pulldown av protein                                | 14         |
| 1.7 Oppgavens mål og delmål   | 15         |
| 1.7.1 Hovedmål: «Proof of concept»  | 16         |
| 1.7.2 Delmål  | 16         |
| <b>2 Materiale og metode</b>  | <b>17</b>  |
| 2.1 Proteinkonstruksjonen   | 17         |
| 2.2 Kloning   | 19         |
| 2.2.1 Dyrking av bakterier  | 19         |
| 2.2.2 Transformasjon av kompetente celler                                   | 21         |
| 2.2.3 Agarose gel elektroforese av DNA                                      | 22         |
| 2.2.4 Plasmid isolering   | 23         |
| 2.2.5 Restriksjonskutting   | 23         |
| 2.2.6 PCR – polymerase kjedereaksjon  | 24         |
| 2.2.7 Homolog rekombinatorisk kloning (ELIC) for å fremstille plasmidvektor | 26         |
| 2.2.8 Sekvensering av positive plasmider etter ELIC                         | 28         |
| 2.2.9 Måling av fluorescens hos transformerte celler                        | 30         |
| 2.3 Produksjon, analyse av proteinkonstrukt og pulldown                     | 30         |
| 2.3.1 Vekst og induksjon med IPTG   | 30         |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.3.2      | French press   | 31        |
| 2.3.3      | Affinitetsrensing av protein: Strep-tag & His-tag  | 32        |
| 2.3.4      | Måling av proteinkonsentrasjon   | 34        |
| 2.3.5      | SDS-PAGE   | 35        |
| 2.3.6      | Western blot   | 35        |
| <b>2.4</b> | <b>Inkubasjon av proteinkonstrukt med 3C PreScission protease</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Krysslinking ved bruk av formaldehyd</b>  | <b>38</b> |
| <b>2.6</b> | <b>Statistikk</b>  | <b>39</b> |
| <b>3</b>   | <b><u>Resultater</u></b>   | <b>40</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Kodende sekvens for proteinkonstruksjonen</b>   | <b>40</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Kloning av konstrukt-plasmid pULL02</b>   | <b>41</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Fluorescens som indikator for proteinuttrykk</b>  | <b>42</b> |
| 3.3.1      | <i>In vivo</i> fluorescens hos bakteriekolonier  | 43        |
| 3.3.2      | <i>In vivo</i> fluorescens i flytende medium   | 46        |
| <b>3.4</b> | <b>Proteinanalyse og affinitetsrensing</b>   | <b>49</b> |
| 3.4.1      | Kontroll av proteinuttrykk ved hjelp av Western blot   | 50        |
| 3.4.2      | Strep-tag affinitetsrensing  | 51        |
| 3.4.3      | His-tag affinitetsrensing  | 52        |
| <b>3.5</b> | <b>Effekt av PreScission Protease på proteinkonstruktet</b>  | <b>53</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Pulldown etter krysslinking med formaldehyd</b>   | <b>55</b> |
| <b>4</b>   | <b><u>Diskusjon</u></b>  | <b>57</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Rekombinant kloning av proteinkonstruksjonen</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Indikatorer for rekombinant ekspresjon</b>  | <b>59</b> |
| 4.2.1      | Fluorescens som <i>in vivo</i> ekspresjonsindikator i kolonier   | 59        |
| 4.2.2      | Fluorescens som <i>in vivo</i> ekspresjonsindikator i flytende cellekulturer, og vurdering av relativ fluorescens hos pULL02-transformanter <i>versus</i> kontroller (pULL03-05) | 60        |
| 4.2.3      | Western blot - immunologisk assay som ekspresjonsanalyse   | 61        |
| 4.2.4      | Western blot <i>versus</i> fluorescerende proteiner  | 62        |
| <b>4.3</b> | <b>FRET som indikator for proteinets kvalitet</b>  | <b>63</b> |
| 4.3.1      | FRET som indikator for enzymatisk proteinmodning   | 66        |
| <b>4.4</b> | <b>Lekkasje fra <i>lac</i> operator</b>  | <b>66</b> |
| <b>4.5</b> | <b>French press som alternativ lyseringsmetode</b>   | <b>66</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Utfordringer ved rekombinant produksjon og mulig proteolytisk følsomhet hos produsert protein</b>   | <b>67</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Proteinet inkubert med PreScission Protease – lav effekt</b>  | <b>69</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Pulldown av agn-protease-kompleks – proof of concept</b>  | <b>70</b> |

|                              |                  |
|------------------------------|------------------|
| <b>4.9 Fremtidig arbeid</b>  | <b>71</b>        |
| <b><u>5 Konklusjoner</u></b> | <b><u>73</u></b> |
| <b><u>6 Referanser</u></b>   | <b><u>75</u></b> |
| <b><u>Appendiks I</u></b>    | <b><u>81</u></b> |
| <b><u>Appendiks II</u></b>   | <b><u>84</u></b> |
| <b><u>Appendiks III</u></b>  | <b><u>85</u></b> |
| <b><u>Appendiks IV</u></b>   | <b><u>86</u></b> |
| <b><u>Appendiks V</u></b>    | <b><u>87</u></b> |
| <b><u>Appendiks VI</u></b>   | <b><u>88</u></b> |
| <b><u>Appendiks VII</u></b>  | <b><u>89</u></b> |
| <b><u>Appendiks VIII</u></b> | <b><u>91</u></b> |



# 1 Innledning

## 1.1 Introduksjon

Fremveksten av multiresistente patogene bakterier kombinert med en minkende tilførsel av nye antibiotika, utgjør et hastende behov for å utvikle nye klasser av antimikrobielle midler. Dette har motivert forskere til å finne nye metoder for å bekjempe patogene mikroorganismer, og har resultert i en bølge av forskning på antimikrobielle peptider (AMPer) (Haney et al., 2017). For AMPer har et lovende potensial som terapeutisk middel da de har et bredt spekter av aktivitet mot bakterier, sopp og virale patogener (Brøgden og Brøgden, 2011).

AMPer blir ofte syntetisert som større inaktive forløper-proteiner og senere prosessert av bestemte proteaser for å frigjøre den aktive antimikrobielle formen (Haney et al., 2017). Proteaser er enzymer som kløyver peptidbindinger i proteiner, hvor de spesifikt kløyver i forhold til bestemte aminosyrer (Lehninger et al., 2013). Proteaser benyttes som molekyllære verktøy i ulike industrier, og mer effektive og fleksible proteaser er derfor ettertraktet, hvor proteaser avledet fra marine organismer tilknyttet kalde miljøforhold, har vist seg å kunne være gode kandidater (Fornbacke og Clarsund, 2013).

## 1.2 Biologisk aktivitet i havet

Mer enn 70% av jordas overflate er dekket av hav, og mellom 50 og 80% av alle livsformer er kun tilstede i havet, noe som derfor utgjør et svært innholdsrikt biomangfold. Det marine miljøet er også en rik kilde på mikroorganismer, hvor det per ml av sjøvann kan finnes en million ( $10^6$ ) bakterier og en milliard ( $10^9$ ) virus, og blant disse er noen patogene. I tillegg til å inneholde et bredt spekter av mikroorganismer, er det marine miljøet ekstremt hydrofilt og har også et høyt saltinnhold. Havmiljøet som altså består av et stort kjemisk- og biomangfold representere derfor en enorm ressurs for oppdagelse av potensielle terapeutiske midler (Falanga et al., 2016).

Til forskjell fra det terrestriske habitat, er det marine i større grad preget av farer og konkurranse, og marine organismer lever altså tett på patogene mikrober. Derfor har utvikling av beskyttende biologiske stoffer i marine organismer foregått under et sterkt miljøpress, og er derfor videre en rik kilde på naturlige bioaktive molekyler (Cheung et al., 2015).

Et eksempel på bioaktive molekyler er marine peptider, som har vist seg å kunne ha effektivitet både i forebygging og behandling av diverse sykdommer. Deres strukturer, opprinnelige eller i modifiserte form, kan utnyttes til potensielle farmasøytiske midler og «nutraceuticals». «Nutraceuticals», som det i de senere årene er blitt større forskning rundt, er helsefremmende produkter, hvor de i tillegg til å ha en næringsverdi også utøver en fysiologisk effekt i kroppen, slik som å kunne forbedre immunsystemet og å forebygge kroniske sykdommer (Cheung et al., 2015).

Fra havmiljøet er altså flere bioaktive forbindelser med attraktive farmasøytiske aktiviteter blitt avledet, og det er videre derfor en potensiell kilde til nye oppdagelser (Falanga et al., 2016).

### **1.3 Antimikrobielle peptider – lovende terapeutiske midler**

Antimikrobielle peptider (AMPer) finnes og produseres hos nesten alle levende organismer, og mer enn 2000 AMPer er blitt identifisert fra en diverse rekke av organismer, både fra dyr, sopp, planter og bakterier (Haney et al., 2017). «ADP3» er en database over AMPer hvor en kan finne 2619 naturlige AMPer med kjent sekvens og aktivitet. Databasen inkluderer da AMPer fra bakterier, archaea, protister, sopp, planter og dyr, hvor 2169 er antibakterielle, 172 antivirale, 105 anti-HIV, 959 antimykotisk, 80 antiparasitiske og 185 har antikreft egenskap (Wang et al., 2016). AMPer betraktes som en viktig del av den første forsvarslinjen mot invaderende patogener, og hos pattedyr blir for eksempel AMPer produsert av epitel celler, hvor de da finnes i vev, væske og kroppsflater, slik som i mucosa (slimhinnen). Dette er da ikke tilfeldig siden disse stedene i kroppen er områder som stadig utsettes for en rekke bakterier, både kommensale og patogene bakterier. De produseres også av diverse celler av immunsystemet, slik som fagocytter. På infeksjons eller betennelses-sted frigjør derfor fagocytter AMPer som forsvar mot bakterieceller som finnes ved infeksjonen (Haney et al., 2017).

Antimikrobielle peptider har vist seg å ha flere biologiske aktiviteter, som inkluderer antimikrobiell aktivitet, antikreft, anti-biofilm og immunomodulerende aktiviteter (Haney et al., 2017). De har også blitt påvist i å ha egenskaper som høy spesifisitet, høy potens og

minimale bieffekter hos pasienter, og på grunn av disse attraktive egenskapene har den farmasøytiske industrien vist en voksende interesse for AMPer (Li et al., 2015).

Aminosyre komposisjonen som definerer strukturen til AMPer varierer, men det er noen grunnleggende egenskaper som har vist seg å være vanlige. AMPer er relativt korte aminosyre sekvenser, vanligvis mindre enn 100 aminosyrer, hvor gjennomsnittlig lengde av alle registrerte peptider er rundt 32 aminosyrer (Li et al., 2015). AMPer består ofte av en høy andel kationiske aminosyrer slik som arginin (Arg) og lysin (Lys), og dette gir derfor en positiv ladning til disse molekylene ved nøytral pH (Haney et al., 2017), og den gjennomsnittlig netto positiv ladning av alle registrerte peptider er på 3,18 (Li et al., 2015). Generelt har også AMPer en høy andel hydrofobiske aminosyrer, opp mot 50% eller mer. Disse egenskapene, at de er kationiske og hydrofobiske, gjør at AMPer kan folde seg til amfipatiske sekundære strukturer. Dette på grunn av at den hydrofobiske delen er lokalisert på den ene side av molekylet, og den kationiske og polare delen som oppstår på motsatt side. I vandig løsning er AMPer vanligvis ustrukturerte, men adopterer den amfipatiske konformasjon i nærvær av en biologisk membran (Haney et al., 2017).

Mange AMPer er avledet fra et inaktivt forløpermolekyl, som da inkluderer en moden aktiv form, en presekvens (signalpeptid) og/eller en prosekvens (Li et al., 2010b). I organismer blir derfor AMPer ofte først produsert som inaktive pro-peptider, og senere prosessert til aktive antibakterielle former (Haney et al., 2017). De blir altså biologisk aktive modne molekyler etter en eller flere posttranslasjonelle modifikasjonstrinn. Disse trinnene inkluderer da fjerning av presekvens (signal-sekvens) og/eller prosekvenser, hydroksylering, halogenering (vanligvis brominering), og glykosylering (Li et al., 2015). Noen AMPer er stabilisert av intramolekylære disulfid-bindinger, dette forårsaker at den strukturelle fleksibiliteten begrenses, og at peptidene opprettholdes i en relativt begrenset konformasjon (Haney et al., 2017).

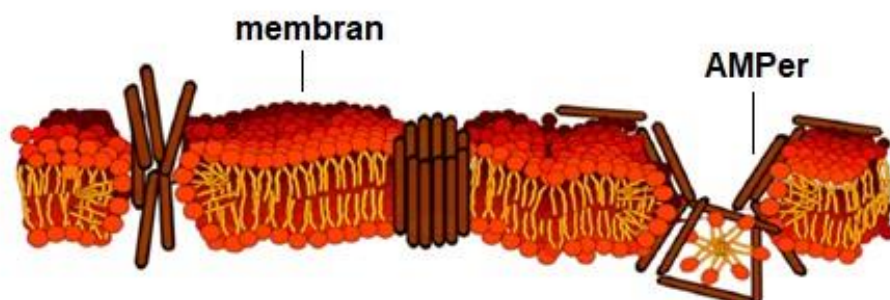
Et eksempel på et naturlig AMP er det humane cathelicidin hCAP-18. Dette peptidet blir syntetisert og lagret intracellulært som et større preprotein og blir prosessert av protease-3 under sekresjon for å frigjøre den aktive formen LL-37. LL-37 kan også bli aktivert av proteaser ved andre steder i kroppen for å danne alternative former av peptidet. Denne posttranslasjonelle prosesseringen av AMPer gjør det derfor svært vanskelig å rense disse peptidene i ønsket aktiv form fra naturlige kilder. Det å rense peptider fra naturlige kilder har

også den ulempen at det krever store mengder med rått biologisk materiale, og en oppnår kun relativt små mengder (Haney et al., 2017).

Siden det er vanskelig å rense ut AMPer fra naturlige kilder, så er kjemisk syntese av peptider foretrukket metode. Det gir da et høyt utbytte og høy renhet, og syntetiske derivater av AMPer kan i tillegg fremstilles med mye høyere potens (Haney et al., 2017).

### 1.3.1 Antimikrobielle mekanismer hos AMPer

Den første kontakten mellom AMPer og bakterier er avhengig av en elektrostatisk tiltrekning mellom de anioniske molekylene på celleoverflaten og de kationiske aminosyre-delene i AMPer. AMPer er spesielt tiltrukket av LPS som finnes på den ytre membranen av gram-negative bakterier, og lipoteikoinisyre i celleveggen hos gram-positive bakterier. AMPene forårsaker endringer i membranstrukturen, slik som fortynning av membranen, endringer i krumming og forstyrrelse av permeabilitets-barriere i membranens dobbelt-lag. Membranen er stedet for viktige biologiske hendelser, slik som cellevegg biosyntese og celledeling, og AMPers forstyrrelser i membranen kan derfor ha betydelig konsekvens for bakteriecellene, og derfor resultere i bakteriedrepende effekt (Haney et al., 2017). Figur 1 viser hvordan AMPers interaksjon med cellemembran kan forårsake endringer i membranstrukturen.

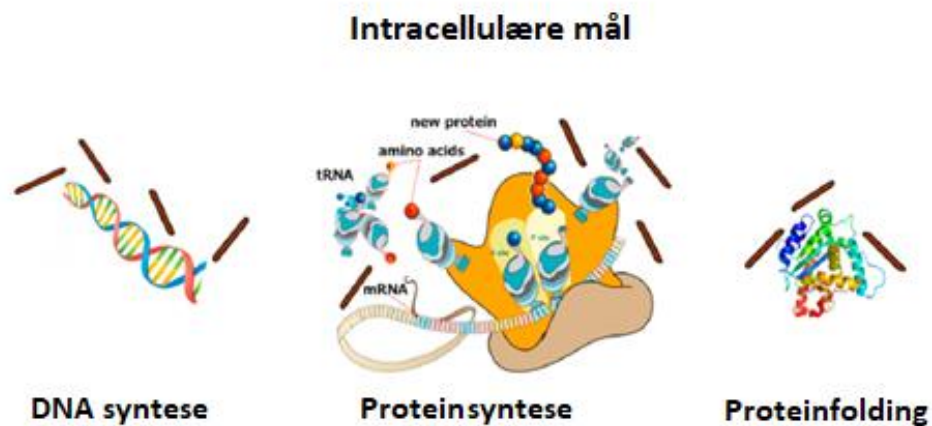


**Figur 1: Mekanismer av interaksjon av AMPer med cellemembran.** Kilde: Modifisert figur fra Falanga et al. (2016).

Via biofysiske studier er det blitt gitt modeller for mekanismer på hvordan AMPer «angriper» membraner, og de viktigste foreslåtte virkningsmekanismer er teppemodellen, tønne-stav modellen, og «torodial-pore model» (Falanga et al., 2016).

AMPers virkningsmekanismer gjør utvikling av resistens mot AMPer mindre sannsynlig, til forskjell fra konvensjonell antibiotika, fordi det vil kreve en forandring i den bakterielle membranen (Falanga et al., 2016).

AMPer kan også translokere på tvers av membranlaget til bakteriecellen, og når AMPene er inni bakteriene kan de interagere med intracellulære mål, som derfor kan forårsake forstyrrelser for viktige cellulære og metabolske prosesser, slik som hemming av DNA- og proteinsyntese, som vist i figur 2 (Haney et al., 2017).



**Figur 2: AMPers intracellulære mål inkluderer DNA-syntese, proteinsyntese og proteinfolding.**  
Kilde: Modifisert figur fra Falanga et al. (2016).

### 1.3.2 Marine AMPer

Siden marine organismer lever tett på mengder av patogene mikroorganismer, har de utviklet et robust og effektivt immunsystem, hvor AMPer er en del av den første forsvarslinje mot invaderende mikrober (Falanga et al., 2016).

Det har vist seg å være strukturelle forskjeller mellom marine AMPer og AMPer avledet fra terrestriske organismer, og marine AMPer består derfor ofte av nye strukturer. Slik som at marine AMPer er tilpasset høy saltkonsentrasjon i sjøvann, og at dette sannsynligvis er grunnet substitusjon av lysiner med argininer (Falanga et al., 2016).

Siden AMPer sin antimikrobielle aktivitet er basert på elektrostatisk interaksjon med den negativt ladde overflaten til bakterier, kan frie ioner produsert som følge av sykdom/sår, redusere interaksjonen og antimikrobiell aktivitet (Falanga et al., 2016). For eksempel blir effekten til AMPet humant  $\beta$ -defensin-1 sterkt redusert av saltkonsentrasjonen som finnes i brokopulmonal væske hos cystisk fibrose pasienter, og peptidet får et sterkt aktivitetstap i saltkonsentrasjoner over 50 mM (Goldman et al., 1997). Den høye saltholdigheten til marint miljø, opp mot 600 mM, gjør derfor at marine AMPer trolig har større saltresistens enn AMPer avledet fra andre kilder. Som derfor gjør det mulig for dem å beholde biologiske aktiviteter ved relativt høy saltholdighet, slik som i spytt, gastrointestinal-væske, serum eller andre kroppsvæsker. AMPer avledet fra marine peptider vil altså kunne tåle fysiologiske saltkonsentrasjoner (Falanga et al., 2016).

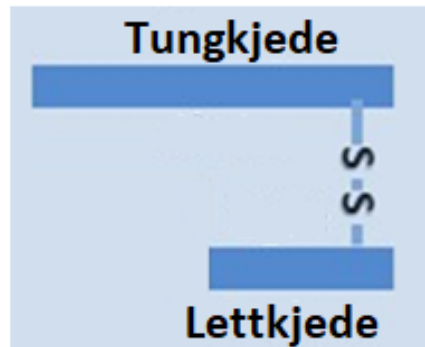
På bakgrunn av dette er bioaktive substanser fra marine organismer lovende for utvikling av terapeutiske midler, og marine AMPer kan derfor bidra i design av AMPer med forbedret stabilitet og effekt, for å videre kunne brukes i terapeutisk anvendelse hos mennesker og dyr (Falanga et al., 2016).

### **1.3.3 Centrocin: marine AMPer fra grønn kråkebolle**

Fylum echinodermata består av en gruppe marine virvelløse dyr, hvor vi blant annet finner klassen sjøpiggsvin, med flere arter av kråkeboller. Siden echinodermer lever i et mikrobe-rikt miljø er antimikrobielle peptider viktige molekyler i deres medfødte immunforsvar og derfor et viktig førstelinje-forsvar mot invaderende patogener. Echinodermer er derfor kjent for å uttrykke et bredt utvalg av AMPer (Li et al., 2015).

Centrociner er antimikrobielle peptider isolert fra coelomocytter ifra grønn kråkebolle, *Strongylocentrotus droebachiensis*. De har en heterodimerisk struktur, er kationiske og viser potent aktivitet mot gram-positive og gram-negative bakterier (Li et al., 2010b).

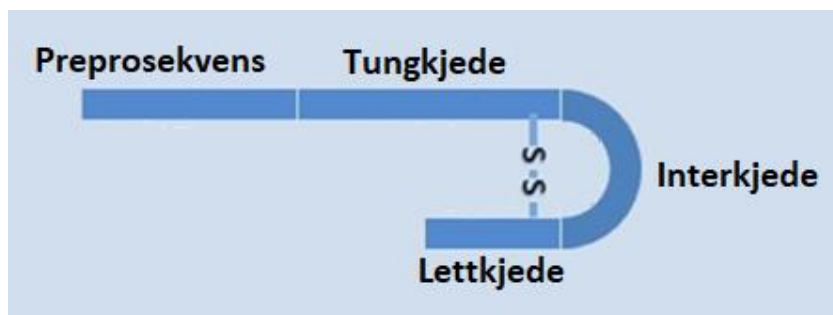
Den intramolekylære heterodimeriske strukturen består av en tungkjede på 30 aminosyrer, og en lettkjede på 12 aminosyrer, hvor begge peptidkjedene inneholder en cystein-aminosyre. Dette indikerer at de er forbundet med en disulfidbro, noe som derfor fører til den heterodimerisk strukturen peptidet har i moden tilstand, som vist i figur 3 (Li et al., 2010b).



**Figur 3: Tung- og lettkjede av Centrocin, hvor figuren viser peptidet i sin modne (aktive) form, og disulfidbroen som holder kjedene sammen (Li et al., 2010b).**

Den intramolekylære disulfid-broen, kan ha stabiliserende effekt på peptidets tertiære struktur og beskytte peptidet fra proteolyse under translasjon og translokasjon innenfor coelomocytene (Li et al., 2010b).

Forløperpeptidet til Centrocin (umodent peptid) består av et signal-peptid, en prosekvens, etterfulgt av tungkjeden, videre en interkjede (prosekvens) og deretter lettkjeden, som vist i figur 4 (Li et al., 2010b).



**Figur 4: Forløperpeptid av Centrocin, som består av preprosekvens (signal-peptid og prosekvens), tungkjede, interkjede og lett kjede.**

## 1.4 Proteaser – viktige enzymer og molekylære verktøy

Enzymer er biologiske katalysatorer, som da øker hastigheten til spesifikke biologiske reaksjoner. Dette skjer uten at enzymene selv gjennomgår endring. Reaktantene som enzymer katalyserer kalles substrater, og hvert enzym har sin spesifikke karakter som gjør det i stand til handle på et bestemt substrat eller bestemte substrater, dette da for å produsere et bestemt produkt (Palmer, 2001).

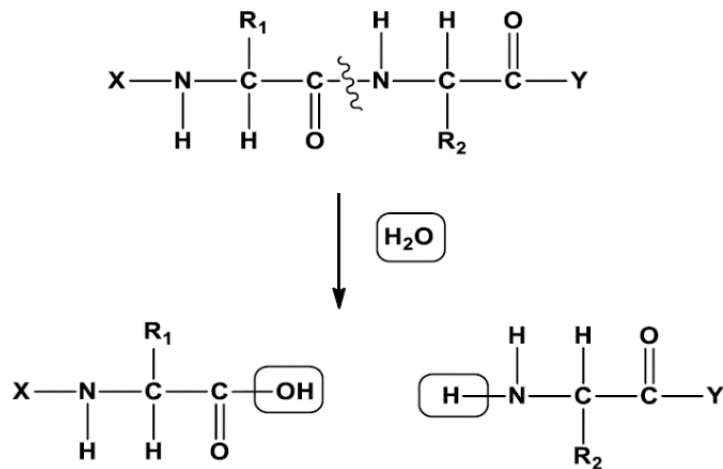
Monomere proteiner består av kun en enkel polypeptidkjede, og kan ikke bli dissosiert til mindre enheter. Det er få kjente monomere enzymer, og de kjente monomere enzymene katalyserer hydrolytiske reaksjoner, og disse enzymene inneholder generelt mellom 100 og 300 aminosyrer, og har molekylvekt i området fra 13.000 til 35.000 (Palmer, 2001).

Flere monomere enzymer er proteaser og disse enzymene katalyserer hydrolyse av peptidbindinger i proteiner. Proteaser er ofte syntetisert i en inaktiv form, som er kjent som et proenzym eller zymogen, og blir aktivert ved behov (Palmer, 2001).

Proteaser katalyserer altså den hydrolytiske spaltingen av peptid-bindinger, hvor de spalter bindinger i tilknytting til bestemte aminosyrer, og dermed fragmenterer en polypeptidkjede til kortere fragmenter på en forutsigbar måte (Lehninger et al., 2013), som vist i figur 5.

Proteaser er også kjent som proteinaser, peptidaser eller proteolytiske enzymer (Fornbacke og Clarsund, 2013).





**Figur 5: Generell mekanisme til et protease enzym, hvor protein kløyves ved en hydrolyse reaksjon, og det adderes et vann-molekyl til peptidbindingen. Kilde: Homaei et al. (2016).**

I henhold til deres virkemåte deles proteaser inn i to grupper, som består av endopeptidaser og exopeptidaser. Hvor endopeptidaser kløyver peptid-bindinger i midten av polypeptidkjeder, mens exopeptidaser fjerner terminale aminosyrer fra peptidkjeder (Homaei et al., 2016).

Alternativt kan proteaser klassifiseres etter den optimale pH, som nøytral, sur eller alkalisk. De kan også klassifiseres etter hensyn til deres aktive senter, da som cystein-, serin-, metallo-, og aspartyl-proteaser (Homaei et al., 2016).

Gruppen av hydrolytiske enzymer utgjør rundt 75% av industrielle enzymer, og proteaser benyttes innen en rekke av industrier, innen lærbehandling, detergenter, sølvgjenvinning, medisinske formål, matvarebehandling og kjemikalie- og avfallsbehandling. I den industrielle anvendelse av proteaser må det tas hensyn til ulike faktorer, slik som temperatur, saltkonsentrasjon, optimal pH, type media og inkubasjonsperiode (Homaei et al., 2016).

### 1.4.1 Marine proteaser

Havet er en kilde til nye enzymer som kan ha potensial som biokatalysatorer for anvendelse innen forskning og industrielle prosesser (Muffler et al., 2015). Optimal aktivitet hos enzymer

hos ulike organismer står i forhold til miljøfaktorer slik som salt-konsentrasjon, pH, temperatur og interaksjon mellom disse faktorene. Derfor kan enzymer avledet fra marine kilder ha andre kjemiske og stereokjemiske egenskaper, enn enzymer fra ikke-marine kilder. Proteaser som er tilpasset fisk og akvatiske invertebrater har altså deres optimale betingelser, stabilitet og funksjon tilpasset til marine forhold, og vil derfor være unike i sammenligningen med proteaser fra pattedyr. Forskjellene er derfor hovedsakelig relatert til det store omfang av miljøforhold de omgis av marint (Homaei et al., 2016).

Proteaser brukes innen bioteknologi, og marine mikrobielle proteaser har fått mye oppmerksomhet, da de har ekstremofile egenskaper og stabilitet i nærvær av mange typer kjemikalier. Dette gjør at marine proteaser har flere egenskaper som er ønskelig for ulike bioteknologiske anvendelser (Muffler et al., 2015).

Marine proteaser har evnen til å opprettholde enzymatisk aktivitet ved lav temperatur, og gjør seg derfor nyttige i prosesser som angår prosessering av matvarer, da bakteriell kontaminering og uønskede kjemiske reaksjoner kan reduseres under behandling ved lavere temperaturer (Homaei et al., 2016). En annen egenskap hos marine proteaser, er at enzymer som er tilpasset høy saltkonsentrasjon kan være en fordel innen industriell bioteknologi da den katalytiske reaksjonen kan bli utført i uforynnnet løsning (Muffler et al., 2015).

#### **1.4.2 Kuldeadapterte marine proteaser**

Til forskjell fra proteaser adaptert til moderate temperaturer (mesofile), har kuldeadapterte proteaser (psykrofile), som er avledet fra organismer fra kaldt miljø, generelt høy spesifikk aktivitet, lav substrat affinitet, og høy katalytisk hastighet ved lave og moderate temperaturer. Dette utgjør mer effektive og fleksible proteaser, som interagerer med, og transformerer substratet ved lavere energikostnad (Fornbacke og Clarsund, 2013).

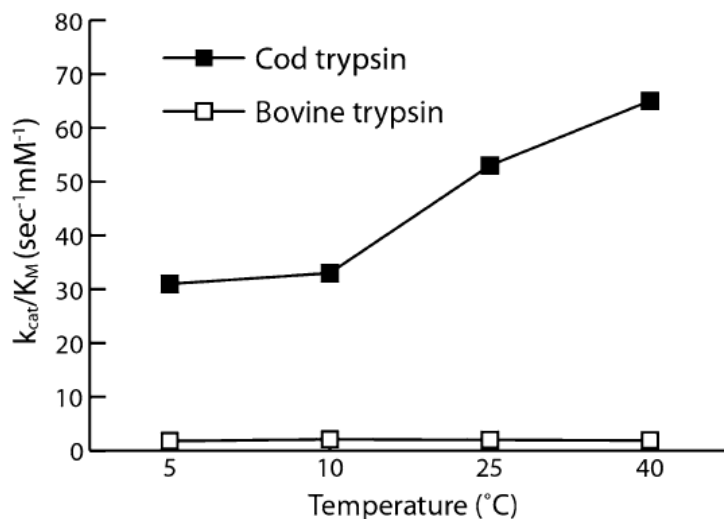
Denne fleksibiliteten består av at det katalytiske sete hos proteasene lettere kan ta inn substratet, og danne kompleks. Men denne økte fleksibiliteten kommer ofte på bekostning av stabilitet, altså det blir en «trade-off» i stabilitet. Og i kontrast til analoge proteaser avledet fra pattedyr er derfor psykrofile proteaser mer sensitive til inaktivering av varme, lav pH og autolyse (Fornbacke og Clarsund, 2013).

Katalytisk aktivitet eller enzym effektivitet kan uttrykkes som  $k_{cat}/K_M$ , som er spesifisitetetskonstanten. Her representerer  $k_{cat}$  den katalytiske produksjon av et produkt under ideelle forhold, omsetningsnummer («turnover number»), og  $K_M$  representerer Michaelis konstanten, som er affiniteten hos proteasen for substratet (Fornbacke og Clarsund, 2013).

Den høye katalytiske hastigheten som generelt er observert i kulde-adapterte proteaser er et resultat av modifikasjoner i entalpi som favoriserer høyere omsetningsnummer. Ved å se på proteaser som er tilpasset gjennom sterk  $K_M$  forbedring, slik som trypsin, som øker  $k_{cat}$  men også katalytisk effektivitet ved å senke dens  $K_M$ , så ses det et uttalt skille mellom mesofile og psykrofile proteaser (Fornbacke og Clarsund, 2013).

I en undersøkelse av katalytisk aktivitet i forhold til temperatur, som ble gjort av proteasene trypsin fra Atlantisk torsk og trypsin fra storfe, ble det demonstrert at torske-avledet protease viste en doblet økning i  $k_{cat}$  (omsetningsnummer) og en mer enn åtte ganger forbedring (reduksjon) i  $K_M$ . Dette resulterte i en 17 ganger større katalytisk effektivitet med trypsin fra Atlantisk torsk, i sammenligning med trypsin fra storfe. Som følge av en senket  $K_M$  kreves det derfor mindre mengde enzym for å få en høy katalytisk effektivitet (Fornbacke og Clarsund, 2013).

Videre i studien, av sammenligning av trypsin fra torsk med trypsin fra storfe, så kløyvde trypsin fra torsk proteiner mer effektivt over en rekke av temperaturer (Fornbacke og Clarsund, 2013), som vist i figur 6.



**Figur 6: Atlantisk-torske-trypsin (kulde-adapter protease) versus storfe-trypsin (mesofil protease), hvor trypsin fra torsk kløyver proteiner mer effektivt over en rekke av temperaturer.** Kilde: Fornbacke og Clarsund (2013).

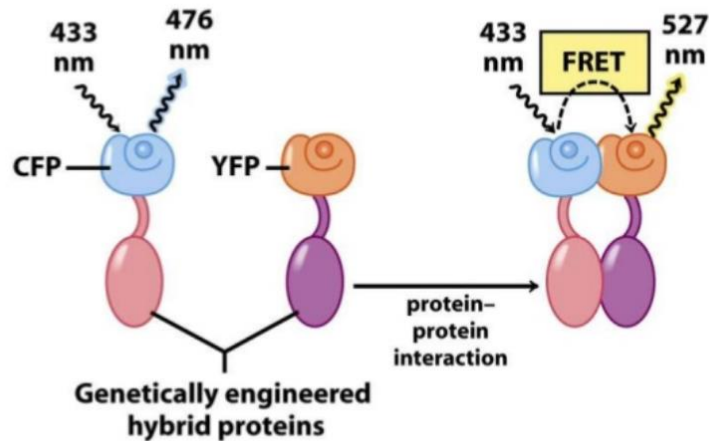
På grunn av enten forbedret  $k_{cat}$  eller  $K_M$ , er verdier av katalytisk aktivitet ( $k_{cat}/K_M$ ), i et temperatur-område fra 0°C til minst 30°C, høyere for psykrofile proteaser enn mesofile. Kulde-adapterte proteaser har altså evne i å katalysere biologiske prosesser mer effektivt enn mesofile analoger (Fornbacke og Clarsund, 2013).

## 1.5 FRET – et bevis på tilstedeværelse av molekulære komplekser

Når et molekyl absorberer et foton kommer det i en eksitert tilstand, hvor et elektron i det absorberende molekylet blir løftet til et høyere energi nivå. Molekylet er da generelt ustabil, og elektronet som er løftet til et høyere-energi nivå (orbital) returnerer vanligvis raskt igjen til det/sitt lavere-energi nivå (orbital). Det eksiterte molekylet henfaller da til den stabile grunntilstand igjen og frigir det absorberte kvantum, som er den mengden energi som fotonet inneholder. Det absorberte kvantum frigis da som lys, varme eller så brukes det til å gjøre kjemisk arbeid. Frigjøringen av lys kalles fluorescens, (emisjon av lys), og lys-emisjonen består alltid av lengre bølgelengde, som er av lavere energi, enn det til det absorberte lyset (Lehninger et al., 2013).

Hvis det fluorescerende protein-molekylet GFP (green fluorescent protein) blir eksitert kan energien av det absorberte foton frigis/disponeres på to måter. Enten ved fluorescens, hvor energien emitteres som et foton av litt lengre bølgelengde enn det eksiterende lys, eller ved ikke-strålende fluorescens resonans energi overføring, ofte kalt FRET (förster resonance energy transfer). Ved FRET går energien av det eksiterte molekylet direkte til et nærliggende molekyl, uten emisjon av et foton. Det eksiterte molekylet fungerer derfor som en donor, og det nærliggende molekyl som akseptor. Akseptoren blir derfor eksitert, og faller videre til sin grunntilstand ved fluorescens, hvor det emitterte foton har lengre bølgelengde enn både det originale eksiterende lys, og fluorescens emisjon som donor molekyl ville ha fremkalt. FRET er bare mulig når donor og akseptor er nære nok, innenfor området 0,1 nm til 5 nm. Svært små endringer i avstand mellom donor og akseptor registreres som svært store endringer i FRET, og måles dermed som fluorescens fra akseptor molekyl (Lehninger et al., 2013).

Figur 7 viser at når et protein, med fusjon til det fluorescerende proteinet CFP, blir eksitert med lys av bølgelengde av 433 nm, så emitterer den fluorescens ved 476 nm, men hvis proteinet er nært nok et annet protein i fusjon med det fluorescerende proteinet YFP, så vil FRET muliggjøres mellom dem. Energien overføres da direkte fra CFP til YFP, hvor YFP da emitterer fluorescens ved 527 nm, som vist i figur 7. Forholdet mellom lys emisjon ved 527 nm og 476 nm er derfor et mål på interaksjon av de to proteinene (Lehninger et al., 2013).



**Figur 7: FRET mellom to proteiner i fusjon med henholdsvis de fluorescerende proteiner CFP og YFP, energien overføres direkte fra CFP til YFP som da emitterer fluorescens ved 527 nm.**  
Kilde: Lehninger et al. (2013).

Det er stor interesse for FRET innenfor bioteknologi, medisin og biofysikk. Hvor FRET kan brukes i molekylstudier, ofte for å bestemme molekylær avstand eller for å vise at molekylære komplekser er tilstede eller ikke (Clegg, 2009).

## 1.6 Affinitetsrensing og pulldown av protein

Affinitetskromatografi er en effektiv metode for å rense ut spesifikke proteiner fra en proteinekstrakt. For å kunne rense et protein med hensyn til affinitet, så må proteinet produseres som et fusjonsprotein. Genet for fusjonsproteinet består da av genet som koder for mål-proteinet fusjonert til et gen som koder for et peptid eller protein som binder med affinitet og spesifisitet under affinitetskromatografi. Dette peptidet eller proteinet kalles da en tag. På denne måten kan en tag-sekvens bli tilført gener slik at resulterende proteiner har en tag ved N- eller C-terminal ende til proteinet (amion- eller karboksyl terminal ende) (Lehninger et al., 2013).

Terminale tagger gir derfor «håndtak» for affinitetsrensingen. På denne måten kan fusjonsproteinet oppnås med god utbytte og med høy renhet, og etter rensing kan taggen fjernes fra fusjonsproteinet ved bruk av protease som kløyver en bestemt aminosyre sekvens mellom mål-proteinet og taggen (Lehninger et al., 2013).

Et eksempel på en slik tag er His-tag. His-tag er en tag som består av en enkel sekvens av seks eller flere histidin aminosyrer, som bindes sterkt og spesifikt til nikkell ioner. Dermed kan en matrix av immobilisert  $\text{Ni}^{2+}$  (nikkel ioner), brukes under affinitetskromatografi for å separere protein som har His-tag, fra andre proteiner i en ekstrakt (Lehninger et al., 2013).

Terminale tagger er derfor praktiske, og er suksessfullt benyttet i tusenvis av publiserte studier, hvor proteinet i mange tilfeller ville ha vært umulig å få rensset uten tag (Lehninger et al., 2013).

Pulldown er en metode for å studere protein-protein interaksjoner, hvor kjemisk krysslanking gjør det mulig å fange disse flyktige interaksjonene (Gong et al., 2006). Under krysslanking dannes kovalente bindinger mellom proteinene som krysslinkes (Klockenbusch et al., 2012), og det er derfor en metode for å danne komplekser av proteiner. Et rekombinant protein med innhold av affinitetstag, kan derfor benyttes, og krysslinkes med et bestemt interagerende protein, og videre kan affinitetsrensing benyttes for å rense ut komplekset.

## **1.7 Oppgavens mål og delmål**

Proteaser er viktige molekylære verktøy, og denne oppgaven har gått ut på å utprøve et system som skal kunne anvendes til å isolere proteaser. Systemet er utarbeidet og utviklet under veiledning av Hans-Matti Blencke og Chun Li ved UiT. Systemet består av å benytte en proteinkonstruksjon med innhold av AMPet Centrocin. Proteinkonstruksjonen skal også inneholde de fluorescerende proteinene emerald GFP og mCherry RFP, og affinitetsrensetagger. Protease(r) som kløyver og aktiverer Centrocin er ukjent(e). Dermed inkluderes kommersielle protease-kløyvesteder innad i Centrocin, for å bruke kommersiell

protease for å modne peptidet etter at det er produsert som en del av proteinkonstruksjonen. Hvis den kommersielle proteasen kløyver Centrocin, kan det dermed utføres et krysslinkingsforsøk for å få dannet et protein-protease kompleks, og proteinkonstruksjonen fungerer derfor som et agn for proteaser.

### **1.7.1 Hovedmål: «Proof of concept»**

Hypotesen for denne oppgaven er at det er mulig å rekombinant produsere Centrocin som en del av en proteinkonstruksjon, videre modne peptidet ved bruk av kommersiell protease, og deretter krysslinke proteinkonstruksjonen og protease. Hovedmålet til oppgaven er derfor å forsøke å bevise dette konseptet. Hvis konseptet bevises kan systemet senere benyttes til å identifisere ukjent(e) protease(er) som modner Centrocin, da ved hjelp av pulldown, hvor krysslinking benyttes for å oppnå et protein-protease kompleks.

### **1.7.2 Delmål**

- 1.** Rekombinant produksjon av proteinkonstruksjonen ved bruk av bakteriell ekspresjonsvert.
- 2.** Kunne bekrefte produsert protein ved å måle fluorescens, hvor tilstedeværelse av FRET vil bekrefte at proteinkonstruksjonen er produsert fullstendig og riktig, ved at begge de fluorescerende proteinene Emerald-GFP og mCherry-RFP er tilstede i proteinet.
- 3.** Rense proteinet ved bruk av Strep-tag og His-tag.
- 4.** Kløyve proteinkonstruksjonen ved bruk av protease, og hvis dette oppnås, forsøke å krysslinke protein og protease.



## 2 Materiale og metode

Lab-arbeidet til denne mastergradsoppgaven kan deles inn i flere etapper. Første etappe av lab-arbeidet bestod av å få fremstilt det riktige plasmidet til bruk under produksjon av proteinkonstruksjonen. Et plasmid ble bestilt bestående av pUC19 vektor med kodende sekvens for proteinkonstruksjonen, konstruert ved å bruke bioinformatiske metoder. Dette plasmidet skulle dermed benyttes får å danne ekspresjons-plasmidet pULL01. Så viste det seg at bestilt plasmid var av varierende størrelse og at restriksjonssteder innenfor genet som skulle brukes ikke var tilstede. Plasmidet som var bestilt fra kommersiell selger oppfylte derfor ikke kravene som behøvdes for å kunne bruke dette videre, og en ny strategi måtte derfor settes opp. Den nye fremgangsmåten gikk ut på å bruke PCR til å amplifisere DNA-fragment fra pUC19 plasmidet, som koder for proteinkonstruksjonen, og videre transformere/klone dette sammen med lineært fragment av pET30 vektor, ved å bruke en metode som kalles exonuclease og ligasjons uavhengig kloning (ELIC).

Den andre delen av lab-arbeidet bestod av å produsere og rense proteinet, deretter å inkubere det med kommersiell protease 3C. Til sist, et forsøk for å krysslinke proteinkonstruksjonen og protease 3C ved bruk av formaldehyd.

«Materiale og metode» er derfor hovedsakelig delt inn i tre deler, som består av bioinformatikk, molekylær kloning og proteinbiologi.

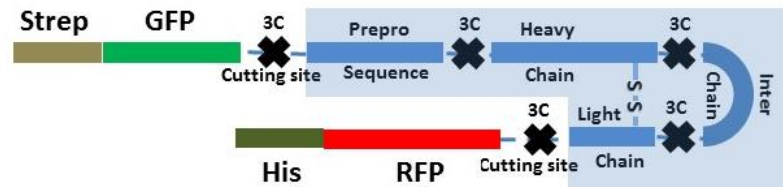
Løsninger, reagenser og programvarer er oppført i appendiks I-VI.

### 2.1 Proteinkonstruksjonen

Proteinkonstruksjonen, vist i figur 8, ble designet med utvalgte domener. Disse domenene bestod av affinitet rense-tagger, fluorescerende proteiner, og hele forløperen av Centrocin i midtre del av proteinkonstruksjonen. Mellom de ulike domene delene ble fem 3C-protease-kløyvesteder inkludert, hvor tre av dem befant seg innenfor Centrocin forløper-sekvensen.

Affinitet rense-tagger bestod av Twin-Strep- og His-tag, for å kunne rense/isolere proteinet etter at det var produsert, og de fluorescerende proteiner bestod av emerald GFP og mCherry RFP, for å bruke disse for å måle fluorescens og undersøke at proteinkonstruksjonen var riktig produsert.

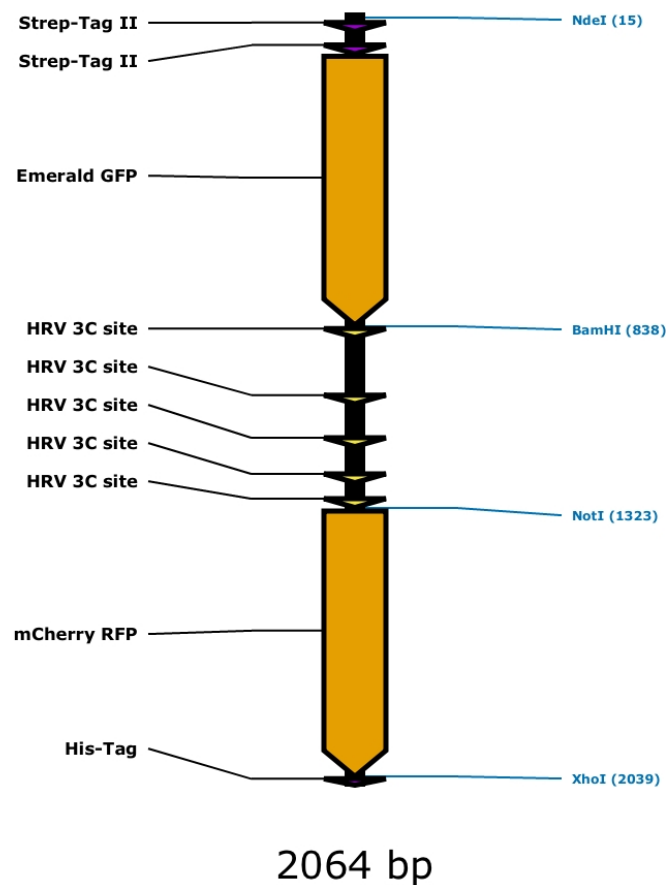
En annen grunn for å bruke fluorescerende proteiner i proteinkonstruksjonen, var for å skjule den antimikrobielle delen (Centrocin) mellom større ufarlige proteiner. Hvor GFP og RFP begge har størrelse på rundt 27 kDa, mens Centrocin har en størrelse på rundt 13 kDa.



**Figur 8: Proteinkonstruksjonens domener**, som består av Strep- og His-tag, GFP, RFP og hele forløper av Centrocin (blåfargede deler). Fem 3C-protease-kløyvesteder er inkludert mellom de ulike domenene. Figuren er designet av Chun Li.

For å konstruere den kodende nukleotidsekvensen, for proteinkonstruksjonen, (for bruk i plasmidvektor), ble det benyttet bioinformatiske metoder. Programvarene plasmaDNA (University of Helsinki, Finland) og SnapGene (GSL Biotech, Chicago, USA) ble da benyttet. Nukleotidsekvensen ble konstruert til å inneholde kodende sekvenser for alle domener beskrevet ovenfor (figur 8), og i tillegg ble restriksjonskuttstedene, *NdeI*, *BamHI*, *NotI* og *XhoI* inkludert i sekvensen, vist i figur 9 (nukleotid- og aminosyresekvens ses i appendiks VII).

Sekvenser for domenene ble hentet fra ulike kilder. For de fluorescerende proteinene, emerald GFP og mCherry RFP, ble sekvensene hentet fra databasen til SnapGene (SnapGene, u.å.-a, SnapGene, u.å.-b). Sekvenser benyttet for protease-3C-kløyvesteder ble valgt i forhold til den kommersielle proteasen som skulle benyttes for å kløyve proteinet (GE Healthcare, 2011). Sekvens for Centrocin ble hentet fra artikkel “Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*” (Li et al., 2010b), hvor sekvensen for Centrocin 1a ble benyttet. Strep- og His-tag er godt etablerte affinitetstagger, hvor Strep-tag består av åtte aminosyrer i følgende sekvens, WSHPQFEK, og His-tag seks histidin aminosyrer (IBA Lifesciences, 2017, Lehninger et al., 2013), respektive nukleotidsekvenser for disse aminosyresekvensene ble derfor benyttet.



**Figur 9: Oversikt over proteinkonstruksjonens domener.** Med innhold av affinitetstagger, fluorescerende protein, 3C-kløyvesteder og sekvens for Centrocin peptidet mellom 3C-kløyvesteder i midtre del av figuren. I tillegg ble restriksjonskuttstedene, *NdeI*, *BamHI*, *NotI* og *XhoI* inkludert i sekvensen. Figur laget i programmet plasmaDNA (University of Helsinki, Finland).

## 2.2 Kloning

### 2.2.1 Dyrking av bakterier

Under dyrking av bakterier ble det benyttet flytene og fast LB medium, med innhold av antibiotika for seleksjon. Flytende LB medium og LA-plater ble benyttet direkte fra lageret ved instituttet. Andre kombinasjoner ble laget som beskrevet videre i kapittelet. Oppskrift for flytende og fast LB medium er oppført i appendiks II.

### 2.2.1.1 Antibiotika

Antibiotika ble alltid tilført dyrkningsmedier i forholdet 1:1000 fra stock-løsning. Tabell 1 viser stock-løsning og arbeidskonsentrasjon for ampicillin og kanamycin.

**Tabell 1: Antibiotika, stock-løsning og arbeidskonsentrasjon.**

|            | Stock-løsning | Arbeidskonsentrasjon |
|------------|---------------|----------------------|
| Ampicillin | 100 mg/ml     | 100 µg/ml            |
| Kanamycin  | 50 mg/ml      | 50 µg/ml             |

### 2.2.1.2 Tillaging av kanamycin-løsning til bruk i dyrkingsmedier

For å lage kanamycin-løsning ble 250 mg kanamycin-pulver (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), veid inn i et falcon-rør (50 ml) (Corning, Corning, NY, USA). Deretter ble 5 ml Ultra pure H<sub>2</sub>O (Biochrom GmbH (Merck), Berlin, Tyskland) tilsatt, for å oppnå en konsentrasjon på 50 mg/ml. Kanamycin-løsning ble lagret i fryser ved -18 °C.

### 2.2.1.3 Tillaging av LA-plater, med kanamycin (50 µg/ml)

Under tillaging av LA-plater ble det benyttet følgende ingredienser, pepton (Merck, Dramstadt, Tyskland), gjær ekstrakt (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), dH<sub>2</sub>O (NFH, UiT, Tromsø, Norge) og agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), i gitt rekkefølge. Alle ingrediensene ble veid inn og tilført en kolbe. Det ble benyttet en røremagnet for å blande innholdet med magnetrører. Ferdigblandede ingredienser ble plassert i autoklav, VAPOUR-Line *Lite* (VWR International, Radnor, PA, USA), og autoklavert i 2 timer, hvor 20 min ved 121°C. Medium ble avkjølt til 60°C før kanamycin ble tilsatt. Kanamycin ble rørt inn, og LA-mediet ble overført til petriskåler (VWR International, Radnor, PA, USA). Tabell over mengder benyttet under tillagingen er oppført i appendiks II.

## 2.2.2 Transformasjon av kompetente celler

Kompatibel bakteriell vert, TOP10 eller BL21(DE3) ble benyttet for transformasjon med plasmidvektorer, se tabell 2. Rør med kompetente celler ble holdt på is under hele transformasjonen. Fra fryser, -80 °C, ble 1,5 ml rør med kompetente celler (50 µl) plassert direkte på is og tint, (10 minutter for BL21(DE3) Competent *E. coli*). Videre ble plasmid (1-2 µl) tilsatt, og rør inkubert på is i 30 minutter. Som negativ kontroll ble alltid et rør med kompetente celler uten tilført plasmid benyttet og behandlet ved samme metode som plasmidprøve-rør. Etter inkubasjon på is, ble rørene inkubert 30 sekunder ved 42°C i vannbad, og igjen oppbevart på is. Pre-varmet (romtemperatur) LB-medium (NFH, UiT, Tromsø, Norge/New England Biolabs, Ipswich, USA) ble tilsatt rørene, og inkubert i varmeskap ved 37°C i ristemaskin (225 rpm), i 1 time. Henholdsvis 50 µl, 100 µl og resterende mengde av vekstmediet, ble overført til LA-plater med innhold av spesifikt antibiotikum for seleksjon, ampicillin (100 µg/ml) eller kanamycin (50 µg/ml), og spredt jevnt utover, med sterilisert glasstav.

Under transformasjon av *E. coli* BL21(DE3) celler ble High Efficiency Transformation Protocol (New England Biolabs) fulgt.

**Tabell 2: Kompetente celler og plasmider benyttet under transformasjon og kloning.**

| Kompetent celle/stamme og plasmid                   | Bruksområde/egenskaper   | Produsent                              |
|---|--|--|
| One Shot™ TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> | Rutine kloning/subkloning. Kompetente celler med høy transformasjons effektivitet. | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| BL21(DE3) Competent <i>E. coli</i>                  | Optimalisert for proteinekspresjon fra T7 promoter                                 | New England Biolabs, Ipswich, USA      |
| pUC19   | Plasmidvektor. Ampicillin resistens.   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| pET30   | Plasmidvektor. Kanamycin resistens.  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

### **2.2.3 Agarose gel elektroforese av DNA**

Isolert plasmid, restriksjonskuttet plasmid og PCR-produkter, ble analysert/separert ved bruk av agarose gel elektroforese for å kontrollere riktig DNA størrelse. 5 µl plasmid/DNA ble tilsatt 1 µl loading dye (Gel Loading Dye, Blue (6X) (New England Biolabs, Ipswich, USA). For størrelsesmarkør ble det benyttet 1 µl Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) blandet med 1 µl loading dye og 4 µl H<sub>2</sub>O. Prøvene ble kjørt på 1 % agarosegel (se tabell i appendiks II), med 2,5 µl ethidiumbromid (10mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), og gelkammer Liberty 4 (Neuvitro, Vancouver, USA) ble benyttet. Før kjøring av gel ble sidekamrene fylt med TAE buffer (NFH, UiT, Tromsø, Norge), og gel dekket av dH<sub>2</sub>O (NFH, UiT, Tromsø, Norge). Deretter ble gel kjørt ved 200 V i 20 min. Etter endt kjøring, ble gelen avlest ved bruk av GeneGenius bio-imaging system (Syngene, Bangalore, India).

#### **2.2.3.1 Preparativ gel elektroforese av restriksjonskuttet plasmid (størrelsesavhengig isolering av DNA)**

Under preparativ gel elektroforese ble gel kjørt ved 80 Volt i 40 minutter. Ved endt kjøring ble DNA-fragment, (bånd på gel), registrert ved kort bruk av UV-lys i mørkerom. Bånd med DNA-fragment av interesse ble kuttet ut med et sterilt skalpellblad og tilført et rent eppendorfrør (BRAND, Wertheim, Tyskland). For å ekstrahere DNA fra gel ble QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Nederland) benyttet og tilhørende protokoll fulgt.

Etter rensing ble plasmid-fragment analysert med agarose-gel elektroforese for å kontrollere størrelse og renhet, og konsentrasjon av DNA ble målt ved bruk av NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

#### **2.2.3.2 E-gel elektroforese (størrelsesavhengig isolering av DNA)**

Som et alternativ til tradisjonell preparativ gel elektroforese ble en mer effektiv metode tatt i bruk, som bestod av E-Gel® Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), hvor gel-kassetten E-Gel CloneWell II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), ble benyttet. Brukerguide E-Gel® Technical Guide, (s. 62-66), ble fulgt under utførelse.

#### 2.2.4 Plasmid isolering

Enkeltkolonier av transformerte celler ble inokulert for videre å isolere plasmid. Til kulturrør med 5 ml LB-medium (NFH, UiT, Tromsø, Norge) ble det tilsatt antibiotika for seleksjon, i forholdet 1:1000. En koloni ble overført til kulturrør ved bruk av en steril podenål. Kulturrør ble inkubert i ristemaskin (225 rpm) ved 37°C over natt.

For å isolere plasmid ble ONK overført til 1,5 ml eppendorfrør (BRAND, Wertheim, Tyskland) og spunnet ned med sentrifuge for å samle pellet. Plasmid ble isolert ved å bruke kitt, QIAprer Spin Miniprep Kit (Qiagen, Venlo, Nederland) eller plasmid Miniprep kit (Macherey-Nagel, Düren, Tyskland), og tilhørende protokoll ble fulgt og metode utført i henhold til produsent. Kitt QIAprer Spin Miniprep Kit (Qiagen, Venlo, Nederland) ble benyttet under de første plasmidisoleringer, og senere ble plasmid Miniprep kit (Macherey-Nagel, Düren, Tyskland) benyttet for å oppnå høyere konsentrasjon av plasmid. Ved endt isolasjon ble eluert plasmid oppbevart på is eller lagret i fryser ved -18 °C til senere bruk.

Renhet og konsentrasjon av DNA ble kontrollert/målt ved bruk av NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

#### 2.2.5 Restriksjonskutting

For å undersøke kvaliteten til pUC19 ble det utført restriksjonskutting. Under utførelsen ble enzymer, *NotI* (New England Biolabs, Ipswich, USA) og *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, USA), valgt i forhold til hvilke kuttsteder som det var forventet at plasmidet skulle inneholde, og som da ville resultere i ønsket DNA-sekvens. Buffer, NEBuffer™ 3.1/ CutSmart (New England Biolabs, Ipswich, USA), ble videre utvalgt i henhold til enzymene.

Prøver for restriksjonskuttingene inneholdt et totalt volum på 50 µl, som bestod av plasmid, buffer, vann, og enzymer for å kunne oppnå den ønskede sekvensen, hvor enzymer alltid ble tilsatt sist. Se tabeller under appendiks III for reagenser og mengder for restriksjonskutting. Etter tillaging av løsninger for restriksjonskutting-reaksjoner ble løsningene sentrifugert kort og inkubert ved 37°C i 2 timer. Prøvene ble deretter analysert med agarose gel elektroforese.

### 2.2.6 PCR – polymerase kjedereaksjon

For å amplifisere og modifisere sekvenser ble PCR benyttet.

Under tillaging av PCR-prøver ble det benyttet PCR-rør, 0.2 ml Thin-walled 8 Tube & Domed Cap Strips (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), hvor rør og reagenser ble holdt på is under tilsetting av alle stoffer og frem til plassering i thermocycler (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ved tilsettelse av stoffer, ble det alltid startet med Ultra pure H<sub>2</sub>O (Biochrom GmbH (Merck), Berlin, Tyskland), deretter buffer, primere, templat og DNA-polymerase. Ved bruk av mastermix, slik som DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), ble denne tilsatt til sist etter H<sub>2</sub>O, primere og templat. Før tilsettelse av primere ble disse mikset i vortex-mikser og spunnet ned med sentrifuge. Etter tilsettelse av alle stoffer, ble tilhørende strips-lokk satt på PCR-rør og blandingen i rørene ble mikset og sentrifugert i ca. 3 sekunder. Deretter ble rørene plassert i PCR-maskin, thermocycler, og spesifikt PCR-program startet.

Flere PCR-forsøk ble utført, hvor ulike PCR-program og forskjellige DNA-polymeraser ble utprøvd. Under ulike PCR-forsøk ble Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) og Taq-polymerase benyttet, og endringer i annealing temperaturer i henhold til dette. Hvor annealingtemperaturer ble valgt ved bruk av T<sub>m</sub> (melting temperature) kalkulator (Thermo Fisher Scientific, u.å.-b). Eksempler på PCR-programmer vises i tabell 3. Primerer benyttet ses i tabell 4. Reagenser ses i appendiks I og løsninger benyttet under PCR ved bruk av ulike DNA-polymeraser er oppført i appendiks IV.

For videre bruk, ble PCR-produkter rensset ved bruk av kitt QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Venlo, Nederland) og tilhørende protokoll ble fulgt og metode utført i henhold til produsent.



### 2.2.6.1 Eksempler på PCR programmer benyttet under forsøk

**Tabell 3: PCR programmer endres med hensyn til DNA polymerase benyttet:** A) ved bruk av Phusion polymerase og B) ved bruk av Taq polymerase.

|    | STEG                    | TEMPERATUR (°C) | VARIGHET<br>(MIN:SEK) | ANTALL SYKLUSER |
|----|-------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| A) | Initialisering          | 98,0            | 00:30                 | 1               |
|    | Denaturering            | 98,0            | 00:10                 | 30              |
|    | Annealing/hybridisering | 65,0            | 00:30                 | 30              |
|    | Elongering/ekstensjon   | 72,0            | 00:30                 | 30              |
|    | Siste elongering        | 72,0            | 10:00                 | 1               |
|    | «Hold»                  | 4,0             | ∞                     |                 |
| B) | Initialisering          | 95,0            | 05:00                 | 1               |
|    | Denaturering            | 95,0            | 00:30                 | 30              |
|    | Annealing               | 49,0            | 00:30                 | 30              |
|    | Elongering              | 72,0            | 06:30                 | 30              |
|    | Siste elongering        | 72,0            | 07:00                 | 1               |
|    | «Hold»                  | 4,0             | ∞                     |                 |

### 2.2.6.2 Primerdesign og primere

Primere ble designet for å omfatte sekvenser av varierende lengde, med innhold av ekstra 5' sekvens, restriksjons seter, annealing sekvens og med homologe sekvenser til mottakervektor ved 5' ender.



Prøve med mikset DNA fragmenter og kontroller ble videre transformert inn i bakteriell vert, i to omganger, hvor først kloningsstammen *E. coli* TOP10 ble benyttet og deretter, etter plasmid isolering, ekspresjonsstammen *E. coli* BL21(DE3).

### 2.2.7.1 Restriksjonskutting for å verifisere resultat etter ELIC

Koloni-PCR ble forsøkt benyttet for å verifisere resultat etter ELIC, men siden dette resulterte i uriktige resultater (falsk negative), ble plasmidisolasjon og restriksjonskutting benyttet.

Samme metode beskrevet under avsnitt 2.2.5, ble benyttet under restriksjonskutting, for å verifisere resultatet etter fremstilling av plasmid pULL02. Da ble enzymer *Xba*I og *Xho*I benyttet, og FastDigest Green Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Se tabell i appendiks III for reagenser og mengder. Restriksjonskuttet plasmid ble analysert på agarose gel elektroforese for å bekrefte størrelse til DNA-fragmenter.

### 2.2.7.2 Kontrollplasmider

For å kunne vurdere fluorescensintensitet til pULL02-protein, ble tre kontrollplasmider fremstilt. Plasmidene ble kalt pULL03, pULL04 og pULL05, og koder for henholdsvis frie FPer (emGFP og mCherry), kun emGFP, og kun mCherry, se tabell 5. De ble fremstilt ved å bruke PCR hvor ønsket målsekvens ble modifisert og amplifisert fra templat pULL02, og ved å bruke ELIC, hvor PCR-genererte insert og lineær pET30 vektor, ble klonet inn i ekspresjonsvektor.

**Tabell 5: Kontrollplasmider**

| Plasmidnavn | Protein som uttrykkes                         |
|-------------|---|
| pULL03      | Emerald GFP og mCherry RFP som frie proteiner |
| pULL04      | Emerald GFP                                   |
| pULL05      | mCherry RFP                                   |

## 2.2.8 Sekvensering av positive plasmider etter ELIC

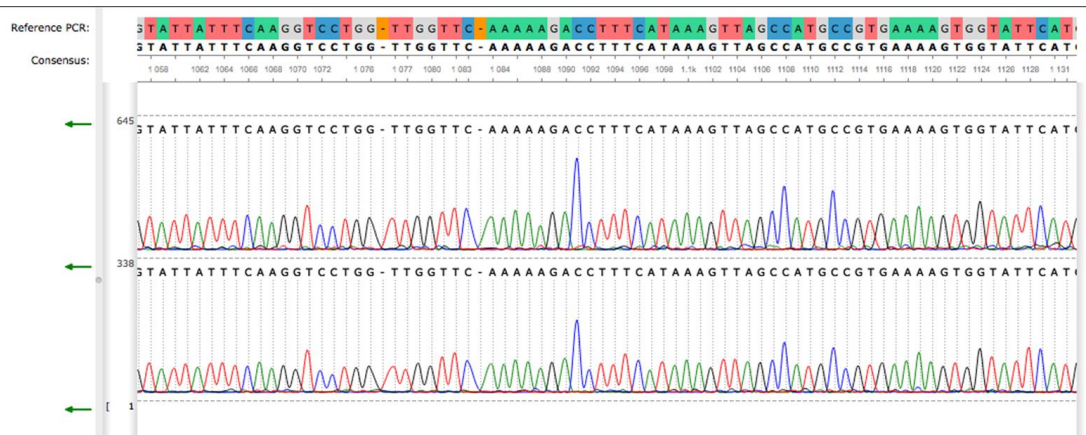
Plasmid isolert fra tre uavhengige kolonier etter verifisering med restriksjonskutting, ble benyttet under sekvensering. For å sekvensere plasmidene ble 12 primere benyttet i PCR, vist i tabell 7. En mastermiks ble tillaget, se tabell 6, som ble fordelt på alle 36 reaksjoner.

Fra mastermiksen ble 7 µl overført til 36 PCR-microrør. Deretter ble 2 µl fra hver av tre plasmider overført til henholdsvis rør 1-12, 13-24 og 25-36. Videre ble 1 µl av primer tilsatt til hver av de 12 rør i de tre paralleller, hvor kun en primer av hver av primere vist i tabell 7 ble benyttet per reaksjon. Sekvenseringsreaksjoner ble levert til MH-fakultetet (UiT, Tromsø, Norge), for Sanger-sekvensering. Sekvenssammenstilling ble foretatt i programmet Unipro UGENE (Integrated Bioinformatics Tools) (Unipro LLC, Novosibirsk, Russland), se figur 10. Reagenser med produsent er oppført i appendiks I.

**Tabell 6: Reaksjonsløsning for sekvensering**

| Reaktanter for PCR og sekvensering        |                              |        | Mengde |
|---|------------------------------|--------|--------|
| Mastermiks                                | Ultra pure H <sub>2</sub> O  | 160 µl | 7 µl   |
|   | BigDye 3.1 Sequencing buffer | 80 µl  |        |
|   | BigDye 3.1 Terminator Mix    | 40 µl  |        |
| Primer                                    |                              |        | 1 µl   |
| Templat*                                  |                              |        | 2 µl   |
| Totalt reaksjonsvolum (per 36 reaksjoner) |                              |        | 10 µl  |

\*Tre plasmid isolert fra uavhengige kolonier etter ELIC.



**Figur 10: Eksempel på sekvenssammenstilling** i programmet Unipro UGENE (Integrated Bioinformatics Tools).

### 2.2.8.1 Primere for sekvensering

**Tabell 7: Primersekvenser**, for 12 primere benyttet under sekvensering.

| OLIGO NAVN | SEKVENS (5-3')   |
|------------|--|
| pULL01_F   | CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAAGC   |
| pULL01_R   | GATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGCTTGTATAATTCATCCATGCC |
| pULL_FOR_1 | GGTGTTTCAGTGTTCCTGCACG                                   |
| pULL_FOR_2 | TATCTGAGCACCCAGAGCG                                      |
| pULL_FOR_3 | GTTGTAGCGCACTGGGTTTT                                     |
| pULL_FOR_4 | ATGGGATATTCTGTCACCGC                                     |
| pULL_FOR_5 | GCAATATAATGTTAATATCAAACCTGGA                             |
| pULL_REV_1 | CTTGAACATAACCTTCCGGC                                     |
| pULL_REV_2 | CCTGCTGCGGTAACAAATTC                                     |
| pULL_REV_3 | ATTCAGGAATTGCGGTCAG                                      |
| pULL_REV_4 | CCTCCGGAAAGCTCAGTT                                       |
| pULL_REV_5 | CTATGACGACCTTCTGCACG                                     |

## 2.2.9 Måling av fluorescens hos transformerte celler

For å undersøke om transformerte celler produserte proteinkonstruksjonen, ble koloniene testet for fluorescens. Fire kolonier ble re-utstrøket på to nye kanamycin-plater, hvor den ene platen ble tilsatt 30 µl IPTG (100 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for å indusere FP produksjon. Samme koloni ble derfor først overført til plate uten IPTG og deretter til plate med IPTG. Plater ble så inkubert i varmeskap ved 37°C over natt, og deretter ble plater med kolonier undersøkt for tilstedeværelse av fluorescens ved bruk av Kodak Image Station (Molecular Bioimaging) (Carestream Health, Rochester, NY, USA), ved å benytte innstillinger av bølgelengder vist i tabell 8.

**Tabell 8: Bølgelengder (nm)** benyttet under eksitasjon og deteksjon av emisjon, under måling av fluorescensintensitet hos induserte celler.

| FPer       | Eksitasjon (nm) | Emisjon (nm) |
|------------|-----------------|--------------|
| emeraldGFP | 450             | 550          |
| mCherry    | 550             | 650          |
| FRET       | 450             | 650          |

## 2.3 Produksjon, analyse av proteinkonstrukt og pulldown

### 2.3.1 Vekst og induksjon med IPTG

IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ble benyttet for å indusere ekspresjon av proteinkonstruksjonen i cellene, hvor det respektive genet er under kontroll av *lac* operator.

Ved å lage IPTG fortyningsserie og dermed indusere ekspresjon i celler ved ulike IPTG konsentrasjoner, ble IPTG konsentrasjon ned mot 0,30 mM funnet i å indusere ekspresjon i celler. Konsentrasjon benyttet under videre forsøk var 0,75 mM.

For å oppnå celler i logaritmisk vekstfase, måtte konsentrasjon i OD<sub>600</sub> (optisk tetthet målt ved bølgelengde 600 nm) hos ONK justeres til 0,1 ved start av vekst. Ved start av forsøk ble dermed OD<sub>600</sub> hos ONK (inkubert ved RT) målt, for å bestemme mengde prøve (x) som skulle fortynnes, for å oppnå OD<sub>600</sub> = 0,1, og følgende formel ( $V_1 = C_2 V_2 / C_1$ ) ble benyttet:

$$x \text{ (ml)} = \frac{0,1 \text{ (OD}_{600})}{\text{ONK (OD}_{600})} \times \text{totalmengde (ml)}$$

Hvor x = mengde ONK (ml)

Antibiotika (kanamycin, 50 mg/ml) for seleksjon ble tilført, og fortynnet kultur ble dyrket i kulturkolbe under roterende risting. Fra vekst-start ble OD<sub>600</sub> målt hver halvtime for å oppnå en OD<sub>600</sub> på rundt 0,4 (når cellen er mest aktiv i delingen). Ved OD<sub>600</sub> på rundt 0,4 ble derfor cellekultur induisert med IPTG (0,75 mM), og inkubert i 2-4 timer på ristemaskin.

Etter IPTG induksjon ble fluorescens målt, ved å overføre prøver (100 µl per prøve) til mikroplate (Nunc™ 96-Well) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), og avleste med Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA).

Ved endt inkubasjonstid, etter induksjon, ble pelleter høstet, ved at cellekultur ble overført til falcon-rør (50 ml) (Corning, Corning, NY, USA), og sentrifugert ved 4500 rpm, 4°C, i 10 min. Anbringende pelleter ble oppbevart i fryser ved -18 °C til senere bruk.

### 2.3.2 French press

Sonikator med ultralyd for å lysere celler fungerte ikke optimalt (lavt protein utbytte), så french press som en alternativ lyserings-metode, ble tatt i bruk for å lysere cellene.

Utstyr benyttet under french press bestod av en trykkbombe (AMINCO, Maryland, USA) fra en orginal french press, mens resten av systemet bestod av en konstruksjon for å lage trykket, med en manuell betjenbar hydraulisk jekk, se figur 11. Før french press ble utført ble stål-utstyret (trykkbomben) nedkjølt med is, og stampelet justert og innstilt i sylindere for å utføre lysering ved trykk 40,000 PSI. Pellet(er) ble resuspendert i 20ml lysis buffer (TBS) og løsning tilført stål-sylindere, og pumpet gjennom systemet 3-4 ganger til løsningen klarer.

Lysat ble sentrifugert ved 4700 rpm, 4°C, i 10 min for å anbringe supernatant. Supernatanten ble videre rensset med Strep-tag eller His-tag proteinrensing. Figur 11 viser french press systemet under bruk.



**Figur 11: French press system** i bruk for lysering av celler. Foto: Unni L. Lande.

### 2.3.3 Affinitetsrensing av protein: Strep-tag & His-tag

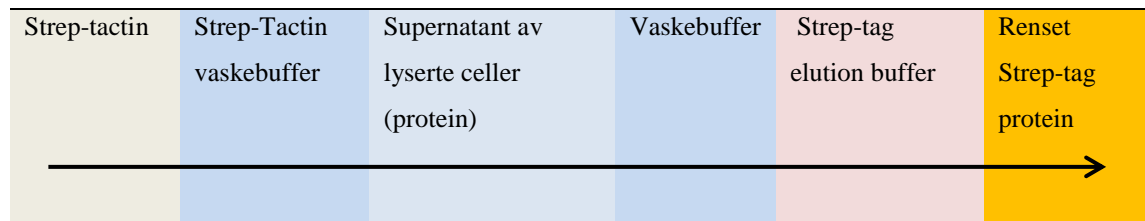
Proteinkonstruksjonen er et fusjonsprotein som inneholder en Strep- og His-tag ved de terminale ender. Proteinene kan dermed renses ved bruk av kolonne-affinitetsrensing og kompetitiv elusjon.

For å filtrere bort protein under 30 kDa før proteinrensing ble filtersystem Millipore Centrifugal Filtration (Amicon Ultra centrifugal filter units Ultra-15, MWCO 30 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)) benyttet. Millipore-filtersystem med protein ble sentrifugert ved 2700 g, og vaskebuffer (se appendix V) ble tilført for å justere konsentrasjon.

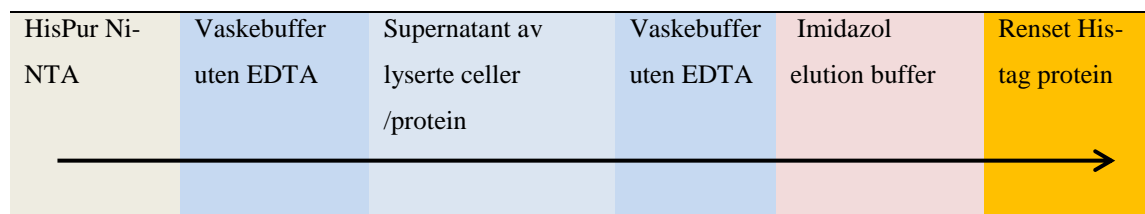
Kolonnerør, Poly-Prep® Column 10 ml (Bio-Rad, Hercules, USA) ble benyttet under alle proteinrensinger.



Strep-tag proteinrensing ble utført ved bruk av Strep-Tactin® og Strep-Tactin®XT rensesystem (IBA Lifesciences, Göttingen, Tyskland) og med metode utført i henhold til produsent. Strep-Tactin®XT ble tatt i bruk for å forbedre rensingen da dette systemet hadde bedre funksjon i forhold til proteinutbytte. His-tag proteinrensing ble utført ved bruk av HisPur™ Ni-NTA Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Figur 12 og 13 viser gjennomføringsprosess og reagenser benyttet under proteinrensinger. Bufferer er oppført i appendiks V.

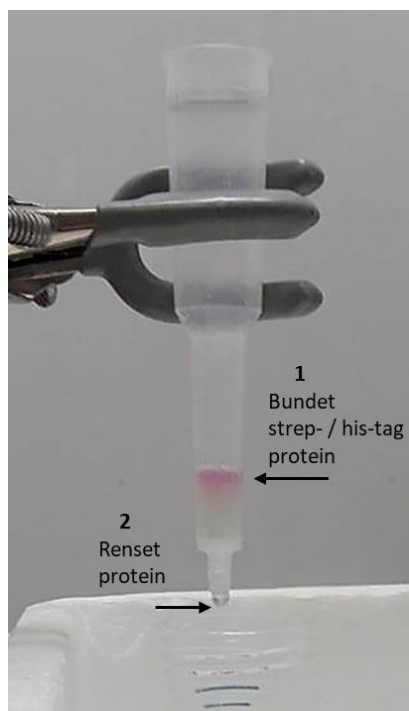


**Figur 12: Flytskjema over affinitetsrensing av Strep-tag protein.** Reagenser og forløp av tilsettelse til kolonnerør.



**Figur 13: Flytskjema over affinitetsrensing av His-tag protein.** Reagenser og forløp av tilsettelse til kolonnerør.

Figur 14 viser bilde av proteinrensing i kolonnerør. Proteineluat ble samlet opp i fraksjoner på 0,5-1,0 ml per eppendorfrør (BRAND, Wertheim, Tyskland). Renset protein ble lagret ved 4°C i kjøleskap. Renset protein ble videre kjørt på proteingel (SDS-PAGE) for å undersøke resultat etter rensing.



**Figur 14: Affinitetsrensing i kolonnerør.** Mål-proteinet (Strep-/His-tag protein) binder seg til kolonnen og uspesifikke proteiner vaskes ut (1). Elusjonsbuffer tilsettes kolonne og rensset protein elueres ut (2). Foto: Unni L. Lande.

### 2.3.4 Måling av proteinkonsentrasjon

For å bestemme protein konsentrasjon ble Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) benyttet, og prosedyre i henhold til produsent ble fulgt. For å lage en standardkurve ble en fortynningsrekke med kjent utgangskonsentrasjon benyttet.

I en microplate, ViewPlate-384 TC (PerkinElmer, Waltham, USA), ble prøvene tillaget. 10 µl prøve ble tilsatt 60 µl WR (working reagent). Platen ble tildekket av plastfilm, ristet i 30 sekunder og inkubert ved 37°C i 30 minutter. Absorbansen ble avlest ved 562 nm i Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA) og konsentrasjon bestemt.

### **2.3.5 SDS-PAGE**

For å denaturer proteinet ble NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) blandet med protein-prøve, og varmet i Heat Block ved 95°C i 5 minutter. Proteinprøvene ble separert ved bruk av en 10-brønners NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel, 1,0 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) og ytre og indre kar ble fylt med NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Markør benyttet var SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Gelen ble kjørt ved 200 Volt i 30-35 minutter i XCell SureLock™ Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

#### **2.3.5.1 Farging av SDS-PAGE gel**

Ved endt polyacrylamid elektroforese, ble gelen tatt ut av kassetten og farget. Gelen ble overført til en plastbeholder med 100 ml MilliQ vann (NFH, UiT, Tromsø, Norge). Dette ble varmet i mikrobølgeovn i 1 min til den nesten kokte, deretter ble gelen ristet i 1 min, og vannet fjernet. Nye 100 ml vann ble tilført, og oppvarming, risting og utskifting av vann ble repetert 2 ganger. Deretter ble 20 ml av SimplyBlue™ SafeStain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) tilført beholder med gel og varmet i mikrobølgeovn i 1 min og videre ristet på ristemaskin i 5 minutter. Deretter ble gel vasket i 100 ml av MilliQ vann i 10 min på ristemaskin.

### **2.3.6 Western blot**

For å påvise tilstedeværelse av proteinkonstruksjonen ble Western blot analyse utført. For å undersøke virkning av induksjonstid, ble prøver tatt ut hver time etter tilsetting av IPTG, for å oppnå prøver med IPTG induksjon etter 0, 1, 2 og 3 timer. Etter protein-seperasjon med SDS-PAGE ble proteinet overført til PVDF membran.

Buffere er oppført i appendiks VI.

### **2.3.6.1 Blotting**

Blottemodulen bestod av blottesvamper, filterpapir, proteingel og PVDF-membran (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), i et system mettet med buffer.

Blottesvamper ble dynket i transferbuffer til de var mettet. PVDF membranen ble fuktet i 30 sekunder i metanol, så ble den kort skyllet i deionisert vann og plassert i et grunt kar inneholdende 50-100 ml av transferbuffer i noen minutter ved risting. Filterpapir ble kort dynket i transferbuffer like før bruk. Gelen ble benyttet like etter elektroforesen var avsluttet og vasket i 5 minutter i MilliQ vann under risting. Overflaten av gelen ble fuktet med transferbuffer og den pre-fuktede PVDF-membran ble plassert på gelen. Pre-fuktet filterpapir ble plassert på toppen av membranen. To gjennomvåte blottesvamper ble plassert inntil katode-del (-) av blot modulen. Gel og membran-sammenstillingen ble videre plassert på blottesvamp i samme modul slik at gelen var nærmest til katoden. Videre ble det tilført tilstrekkelig fuktede blottesvamper, og anodedelen (+) plassert på toppen av blottesvampene. Alle komponentene i blottmodul var i fullstendig kontakt.

Blottmodulen ble så videre plassert i en XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Så ble blotmodulen fylt med transferbuffer til gel/membran sandwich var dekket. Det ytre buffer kammer ble fylt med deionisert vann og systemet ble kjørt ved 30 Volt i 1 time.

### **2.3.6.2 Blokking**

Etter elektroblotting av proteingelen til PDVF-membranen, ble membranen overført til en generøs mengde av TBS, og membranen ble vasket i 2 minutter. Deretter ble membranen inkubert i 25 ml av blocking buffer ved lett risting i 60 minutter ved romtemperatur. Etter blokking ble membranen vasket med TBS.

### **2.3.6.3 Immunoblotting**

Primært antistoff, anti-His antistoff (Rabbit  $\alpha$ -His) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ble tilført membran, og membran ble inkubert ved 4°C over natt. Buffer og antistoff løsning ble så fjernet og membranen ble skylt med TTBS 3x 5 minutter. Deretter ble

membranen resuspendert i et minimalt volum av TTBS (3-5 ml). HRP konjugert sekundært antistoff (Goat  $\alpha$ -rabbit HRP conjugated) (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) ble tilført beholder med membran, og videre inkubert i 60 minutter ved kraftig risting. Deretter ble TTBS og overflødig antistoff fjernet og membran ble skylt med TTBS 3x 5 minutter. Membranen ble så vasket med en generøs mengde av PBS i 5 minutter ved RT under lett risting. Membranen ble deretter plassert på et lag av plastfolie og HRP substrat, SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ble tilført protein-siden av membran, og dette ble inkubert i 5 minutter.

Overflødig HRP-substrat ble fjernet og trekkpapiret ble pakket inn i plastfolie. Så ble trekkpapiret eksponert for film (chemiluminescence detection film) i 5 minutter, ved bruk av Kodak Image Station (Molecular Bioimaging) (Carestream Health, Rochester, NY, USA), for å fremkalle bilde.

## 2.4 Inkubasjon av proteinkonstrukt med 3C PreScission protease

Renset protein ble inkubert med protease, 3C PreScission enzyme (GE Healthcare, Chicago, USA) for å kløyve proteinet ved 3C kløyvesteder. Til tre parallelle prøver ble følgende reagenser benyttet, protein, DTT (0,1 mM) (Novagen/Merck, Darmstadt, Tyskland) og protease (3C PreScission enzyme), se tabell 9 for mengder benyttet. Tre parallelle prøver uten tilsatt protease ble benyttet som kontrollprøver, og prøver med og uten protease hadde lik total mengde. Alle prøver ble inkubert ved RT over natt, og etter endt inkubasjon ble SDS-PAGE kjørt for å undersøke om proteinet var kløyvd.

**Tabell 9: Reagenser og mengder benyttet under inkubasjon av protein med protease.**

| Reagenser             | Mengder ( $\mu$ l) |
|-----------------------|--------------------|
| Protein-ekstrakt      | 50                 |
| DTT (100 mM)          | 0,5                |
| 3C PreScission enzyme | 0,5                |

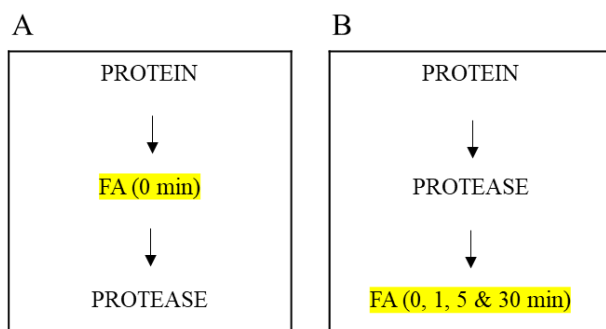
## 2.5 Krysslinking ved bruk av formaldehyd

Proteinekstrakt ble før krysslinking-forsøket filtrert med Corning® Spin-X® UF Concentrator (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), for å fjern høyest mulig andel av proteinmolekyler under 50 kDa.

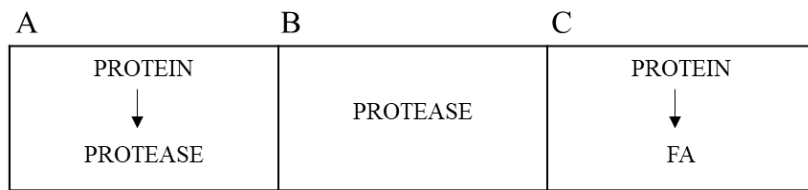
Formaldehyd konsentrasjon benyttet under krysslinking-forsøk var 0,6%, i henhold til tidligere utført krysslinking mellom proteiner (Herzberg et al., 2007). En 37% formaldehydløsning i metanol (VWR International, Radnor, PA, USA) ble derfor fortynnet i buffer (vaskebuffer (IBA Lifesciences, Göttingen, Tyskland)) til en stock-løsning med konsentrasjon 3,6%.

Til prøver for krysslinking ble det benyttet 45 µl proteinekstrakt, 5 µl protease, 0,6 µl DTT (0,1 mM) og 10 µl formaldehyd 3,6 %.

Det ble utført fem krysslinking-forsøk. Hvor ulike tider for tilsettelse av formaldehyd etter protease ble testet. Direkte etter tilsettelse, 1 min etter, 5 min etter og 30 min etter. I tillegg ble formaldehyd tilsatt før protease i en forsøksprøve. Det ble benyttet tre ulike kontroller. En med kun protein og protease, en med kun protein og formaldehyd, og en med kun protease. Buffer (samme vaskebuffer som benyttet under Strep-tag rensing) ble benyttet for å juster total mengde hos kontrollene, slik at alle prøver hadde lik total mengde. Se figurer 15 og 16 for oversikt over prøveoppsettet. Alle prøver ble inkubert ved RT i 30 min, og deretter analysert med SDS-PAGE.



**Figur 15: Flytskjemaer over krysslinkings-forsøk, med ulikt tilsetningsforløp (A og B) til prøve med protein.** Formaldehyd (FA) tilsettes før protease (A). Formaldehyd tilsette etter protease (B), ved fire ulike tider, etter 0, 1, 5 og 30 minutter.



**Figur 16: Kontrollprøver (A-C) for krysslinkingsforsøk.** Kun protein og protease (A), kun protease (B) og kun protein og formaldehyd (C).

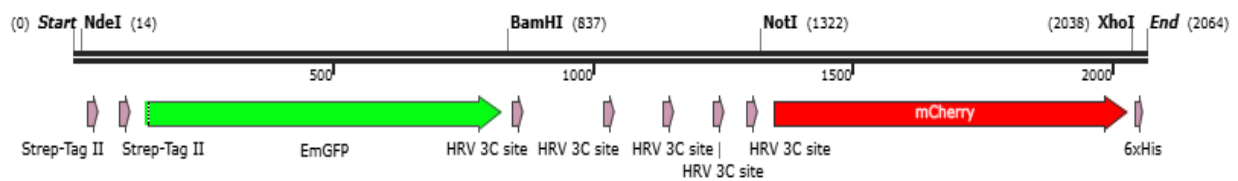
## 2.6 Statistikk

All statistikk over data ble utført i Microsoft Excel 2016.

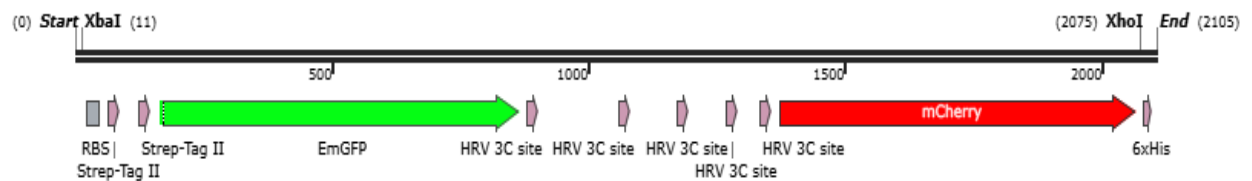
## 3 Resultater

### 3.1 Kodende sekvens for proteinkonstruksjonen

For å konstruere den kodende sekvensen for proteinkonstruksjonen ble det benyttet bioinformatiske metoder, hvor programvarene plasmaDNA og SnapGene ble benyttet. Som en ser av resultatet, figur 17, ble sekvensen konstruert til å inneholde kodende sekvenser for alle de spesifikke domener (se figur 8) og i tillegg ble restriksjonskuttstedene, *NdeI*, *BamHI*, *NotI* og *XhoI* inkludert i sekvensen, se appendiks VII for oppført nukleotid- og aminosyresekvens. Sekvensen skulle fungere som insert i den planlagte pULL01 plasmidvektor. I figur 18 vises resultat av sekvens som ble benyttet som insert i endelig pULL02 plasmidvektor. Denne sekvensen inneholdt da restriksjonskuttstedene *XbaI* og *XhoI*, som kunne benyttes om ikke ELIC metoden fungerte.



**Figur 17: Sekvens kodende for proteinkonstruksjonen med 2064 bp.** Hvor sekvensen skulle fungere som pULL01-insert, og inneholdt restriksjonskuttstedene, *NdeI*, *BamHI*, *NotI* og *XhoI* inkludert i sekvensen. Figur laget i SnapGene.



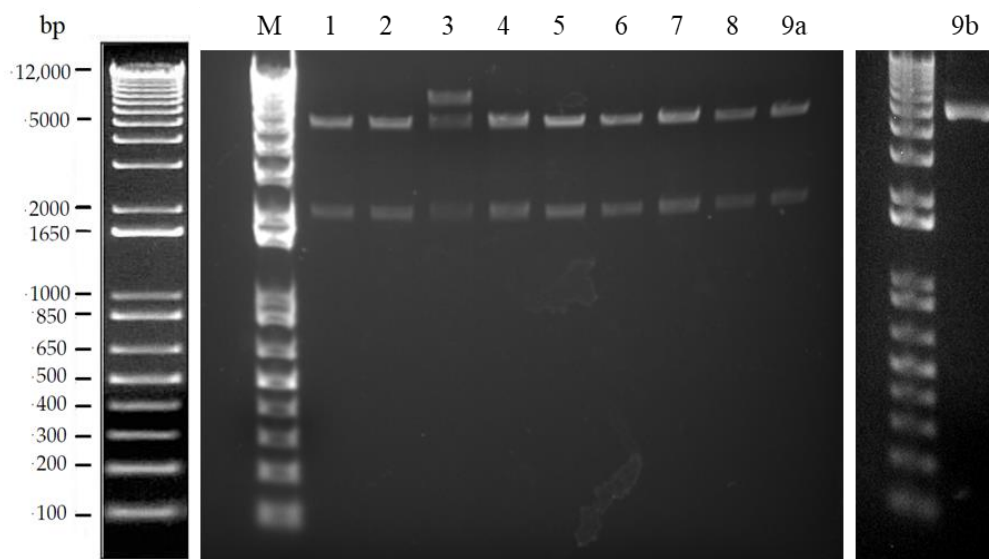
**Figur 18: Sekvens kodende for proteinkonstruksjonen, med 2105 bp.** Hvor sekvensen fungerte som pULL02-insert, og inneholdt restriksjonskuttstedene, *XbaI* og *XhoI* inkludert i sekvensen. Figur laget i SnapGene.



### 3.2 Kloning av konstrukt-plasmid pULL02

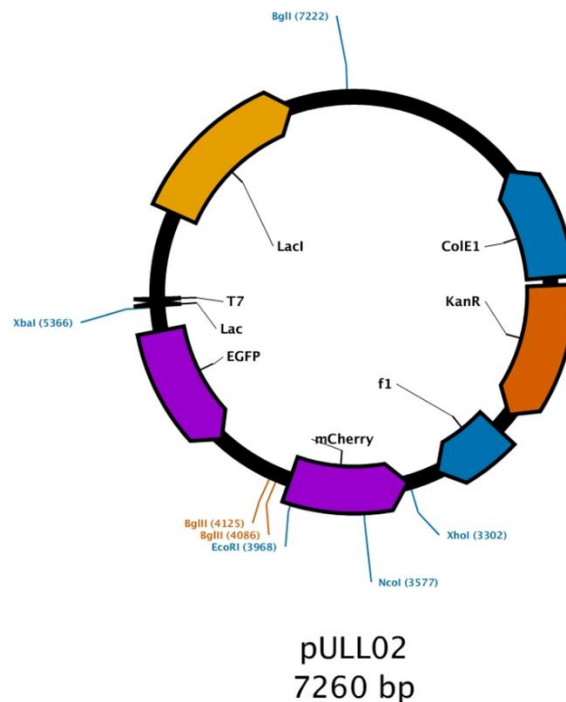
For å få fremstilt ekspresjonsplasmid til bruk under produksjon av proteinkonstruksjonen, ble PCR benyttet for å modifisere det syntetiserte DNA-fragmentet som ble tilsendt av ThermoFisher i pUC19. Videre ble PCR-fragmentet transformert/klonet med/i et *XbaI/XhoI* lineært fragment av pET30 vektor, ved å bruke ELIC. Etter transformasjon (ELIC), ble det utført plasmid isolasjon og restriksjonskutting med enzymene *XbaI* og *XhoI*, for å verifisere resultatet.

Figur 19 viser at alle testede kloner (1-9) har et insert av forventet lengde. Bånd-størrelser er på rundt 2000 bp og 5000 bp, noe som stemmer overens med størrelser til vektor-fragment og insert-fragment (se appendiks VIII). Dette bekrefter vellykket kloning ved bruk av metoden ELIC. Prøve nr. 3, var av uvisse grunner ikke fullstendig kuttet og en ser derfor her et ekstra bånd mellom 5000 og 12000 bp, som trolig er ukuttet plasmid. Kolonne 9b i figuren viser ukuttet plasmid som har en størrelse på rundt 7000 bp.



**Figur 19: Restriksjonskuttet plasmid analysert på agarose gel elektroforese.** TAE-Gelen ble kjørt på 200 V i 20 minutt. I lommene til kolonne 1-9 ble det tilsatt 10  $\mu$ l restriksjonsløsning. Kolonne 9a og 9b inneholdt begge plasmid nr.9 hvor 9a er restriksjonskuttet mens 9b viser ukuttet plasmid. Størrelsesmarkør (M) til venstre: 1  $\mu$ l 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Illustrasjon fra Invitrogen katalogen med størrelse av bånd til venstre.

Plasmid nr. 5, 8 og 9 ble videre sekvensert, og etter sekvensering fremkom det at sekvensen til plasmid nr. 9 var 100% korrekt. Ikke alle sekvensreaksjonene til plasmidene 5 og 8 var like vellykket, derfor var disse ikke 100% verifiserbare, men heller ingen sekvensavvik ble påvist hos disse. Plasmid nr. 9 ble brukt for å transformere *E. coli* BL21 (DE3) kompetente celler for å lage ekspresjonsstammen. Figur 20 viser da det resulterende plasmid pULL02, konstruert i programmet plasmaDNA (University of Helsinki, Finland) (Angers-Loustau et al., 2007).



**Figur 20: Plasmid pULL02 konstruert i programmet plasmaDNA.**

### 3.3 Fluorescens som indikator for proteinuttrykk

For å undersøke kvalitativ og kvantitativ tilstedeværelse av de fluorescerende proteinene emerald GFP, mCherry RFP og muligheten for FRET, ble fluorescensintensitet målt. Fluorescens ble derfor benyttet som indikator for proteinuttrykk av mål-protein. Målinger ble gjort av både kolonier og flytende cellekultur etter induksjon med IPTG. Hvor protein ble uttrykt i *E. coli* BL21 (DE3) kompetente celler, ved vekst i kulturkolbe eller på LA-plate.

### 3.3.1 *In vivo* fluorescens hos bakteriekolonier

Ved å undersøke tilstedeværelse av fluorescens hos bakteriekolonier, gir det muligheten til å verifisere positive kandidater *in vivo*. Fluorescensintensitet mellom induerte og uinduserte kolonier ble derfor sammenlignet. Fire enkeltkolonier av pULL02-transformanter, ble strøket ut på to LA-plater (A og B), hvor den ene platen (B) ble tilsatt IPTG for å induere produksjon av proteinkonstruksjonen. Etter 18 timer inkubasjon på 37 °C var det mer vekst på kontrollplate (A) med uinduserte kolonier, vist i figurer 21A-23A, enn på plate (B) med induerte kolonier, vist i figur 21B-23B, dette trolig på grunn av at induksjon av proteinuttrykk kan hemme veksten i noen grad.

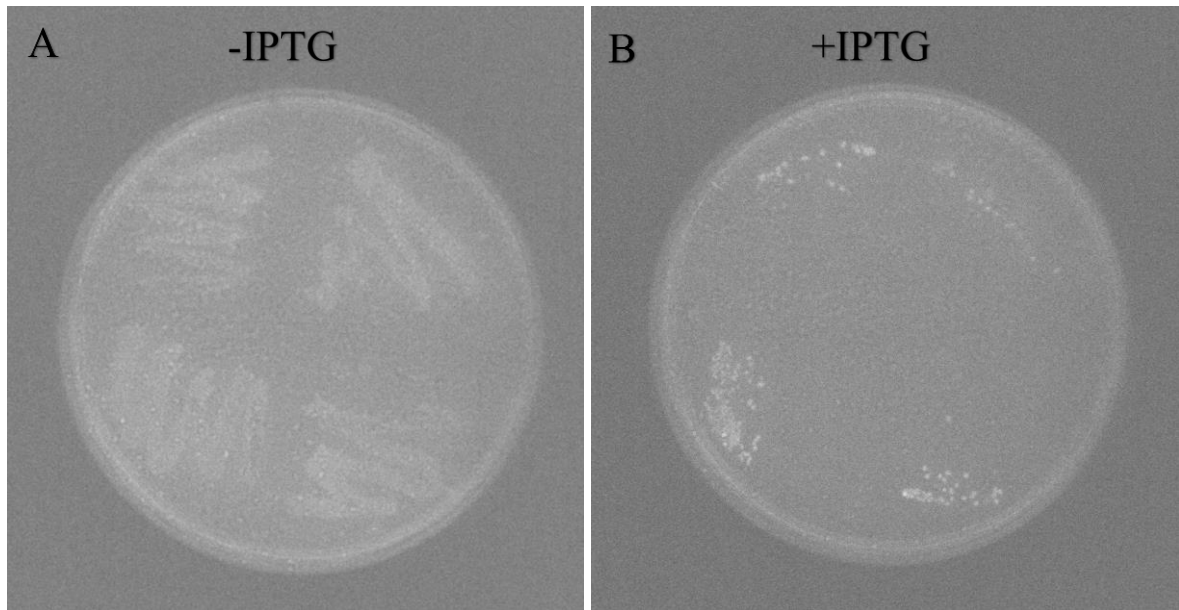
Molecular Imaging system (Carestream Health inc.), ble brukt for å granske platene for fluorescerende kolonier, ved kvalitativ visualisering. I imaging-systemet ble koloniene med fluorescerende proteiner, emerald GFP og mCherry RFP, eksitert med henholdsvis bølgelengde på 450 og 550 nm. Videre ble fluorescens-emisjon detektert med henholdsvis 550 og 650 nm. For å evaluere mulig FRET ble eksitasjons-bølgelengden til emGFP (450 nm) kombinert med emisjons-bølgelengden til mCherry (650 nm).

I figur 21 vises platene etter eksitasjon ved 450 nm og emisjon detektert ved 550 nm, for å undersøke tilstedeværelse av emerald GFP hos induerte kolonier. I figur 22 vises platene etter eksitasjon ved 550 nm, og emisjon detektert ved 650 nm, for å undersøke tilstedeværelse av mCherry RFP.

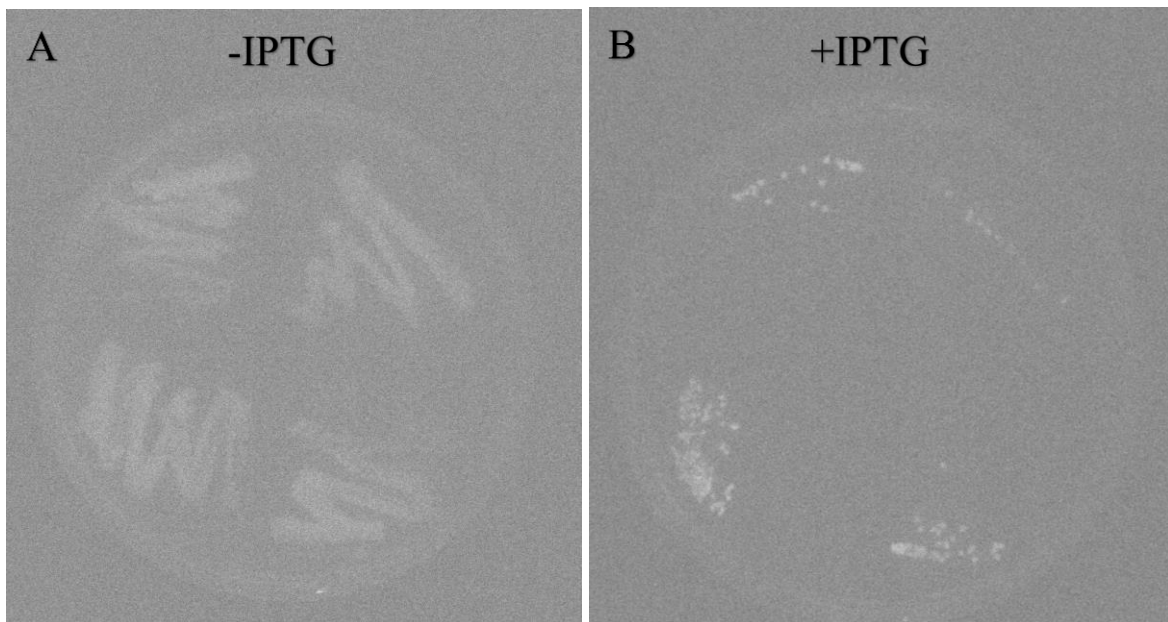
Resultat av plate med induerte kolonier, vist i figur 21B og 22B, viser at disse koloniene har en skarpere fremtoning, hvor det derfor fremstår sterkere fluorescensintensitet her i sammenligning med kontrollplate, vist i figur 21A og 22A.

I figur 23, ser man platene etter eksitasjon ved 450 nm, og emisjon detektert ved 650 nm, for å undersøke FRET, og dermed interaksjon mellom FPer. De induerte koloniene viser her noe lavere fluorescensintensitet enn ved de andre eksitasjon/emisjon resultater (figur 21-22), som derfor gjør det noe usikkert om FRET foregår eller ikke.

Resultatet av *in vivo* fluorescens hos bakteriekolonier indikerer altså at proteinkonstruksjonen med FPer uttrykkes, men det bevises ikke at konstruktet muliggjør FRET.

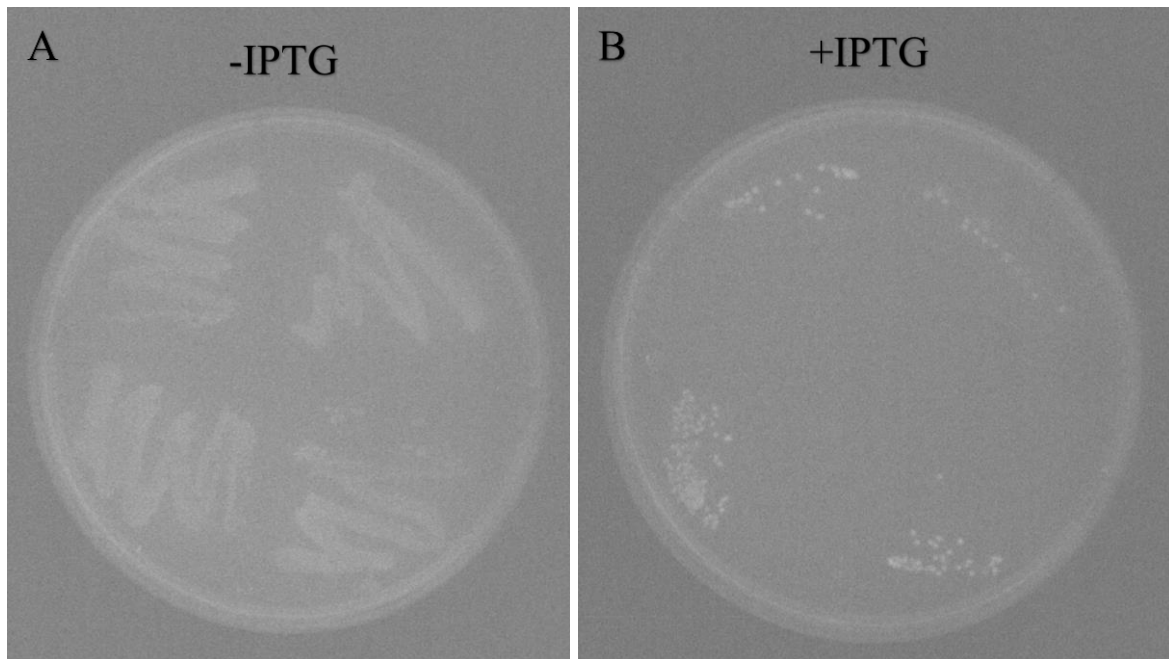


**Figur 21: Plater undersøkt for fluorescens som viser kvalitativ tilstedeværelse av emerald GFP (Ex: 450, Em: 550).** Fire enkeltkolonier av pULL02-transformanter ble re-utstrøket på to nye LA-plater (kanamycin, 50  $\mu\text{g/ml}$ ), hvor plate B ble tilsatt 30  $\mu\text{l}$  IPTG (100 mM) for å indusere protein ekspresjon. Kolonier ble først overført til plate A uten IPTG og deretter til plate B. Plater ble inkubert ved 37°C over natt. Kolonier ble undersøkt for tilstedeværelse av fluorescens ved bruk av Kodak Image Station, og Molecular Imaging system.



**Figur 22: Plater undersøkt for fluorescens, som viser tilstedeværelse av mCherry (Ex: 550, Em: 650).** Fire enkeltkolonier av pULL02-transformanter ble re-utstrøket på to nye LA-plater (kanamycin, 50  $\mu\text{g/ml}$ ), hvor plate B ble tilsatt 30  $\mu\text{l}$  IPTG (100 mM) for å indusere protein ekspresjon. Kolonier ble først overført til plate A uten IPTG og deretter til plate B. Plater ble inkubert ved 37°C over natt.

Kolonier ble undersøkt for tilstedeværelse av fluorescens ved bruk av Kodak Image Station, og Molecular Imaging system.



**Figur 23: Plater undersøkt for fluorescens som kan vitne om FRET (Ex: 450, Em: 650).** Fire enkeltkolonier av pULL02-transformanter ble re-utstrøket på to nye LA-plater (kanamycin, 50 µg/ml), hvor plate B ble tilsatt 30 µl IPTG (100 mM) for å inducere protein ekspresjon. Kolonier ble først overført til plate A uten IPTG og deretter til plate B. Plater ble inkubert ved 37°C over natt. Kolonier ble undersøkt for tilstedeværelse av fluorescens ved bruk av Kodak Image Station, og Molecular Imaging system.

### 3.3.2 *In vivo* fluorescens i flytende medium

For å kunne vurdere fluorescensintensitet til pULL02-protein, ble tre kontrollplasmider fremstilt. Plasmidene ble kalt pULL03, pULL04 og pULL05, og koder for henholdsvis frie FPer (emGFP og mCherry), kun emGFP, og kun mCherry.

*E. coli* BL21 (DE3) kompetente celler ble transformert med plasmid pULL02 og kontrollplasmider (pULL03-05), og induisert med IPTG for genuttrykk av proteiner. Som negativ kontroll ble plasmid pET30 uten genuttrykk for FPer benyttet. Celler ble dyrket i vekstkolber med flytende medium. Etter vekst og induksjon ble prøver (100 µl per kultur) tatt fra vekstkolbene og fluorescens målt.

Resultater av fluorescensmålinger er vist i tabeller 10-12, hvor målinger ble gjort i tre omganger. Det ble gjort målinger før og etter IPTG induksjon for å kunne sammenligne relativ fluorescens hos uindusert prøve med induert prøve, og da eventuelt avdekke bakgrunn av fluorescens. To målinger ble gjort etter induksjon, første etter 2 timer og deretter etter inkubasjon over natt ved 12°C, for å se endringer i fluorescens fra kort induksjonstid mot lang. Inkubasjon over natt ble gjort ved 12°C for modning av proteiner, og for å bremse vekst av celler.

#### 3.3.2.1 Evaluering av emerald GFP relativ fluorescens

I tabell 10, ses verdier av relativ fluorescens, før og etter IPTG induksjon, hvor prøver i mikropalte ble eksitert ved bølgelengde 450 nm, og emisjon detektert ved 550 nm. Dette for å undersøke kvalitativ og kvantitativ tilstedeværelse av emerald GFP.

Resultater i tabell 10 viser at pULL03 hadde de høyeste verdier av relativ fluorescens både etter to timer inkubasjon og over natt (overflow, <99999). Hvor pULL02 i sammenligning hadde en verdi på 33446 RFU etter inkubering over natt, som da er betydelig lavere.

Av å sammenligne verdier til pULL02 og pULL04, ser man at disse hadde lignende tendens i økning i RFU, men at pULL02 hadde noe større økning etter inkubasjon over natt. Siden både pULL02 og pULL04, uttrykker GFP, var det forventet økning av RFU her, men tabellen viser altså at det er tydelig lavere økning hos pULL02 og pULL04, enn ved pULL03.

Ved å sammenligne resultatet til pULL05, opp mot kontrollplasmid pET30, ser en at de relative fluorescens verdiene har lignende tendenser hos disse, hvor det ikke resulterte i betydelig økning av relativ fluorescens etter induksjon. Dette var forventet og samsvarer med at pULL05 ikke uttrykker emerald GFP.

**Tabell 10: Endring i RFU (Ex/Em = 450/550) etter genuttrykk av FPer i ekspresjonsvert.**

Tabellen viser endring i RFU etter genuttrykk fra plasmid pULL02, pULL03, pULL04 og pULL05. ONKer (5 ml LB-medium tilsatt kanamycin for seleksjon (50 µg/ml)) ble inkubert i ristemaskin (225 rpm) ved RT. OD<sub>600</sub> hos ONK ble justert til 0,1 ved start av vekst. Celler (ekspresjonsverter) ble dyrket i kulturkolbe under roterende risting ved RT. Ved OD<sub>600</sub> på 0,4 ble celler indusert med IPTG (0,75 mM). Ikke-induserbar pET30 vektor ble benyttet som kontroll. For å se endringer i fluorescens, ble det gjort målinger før og etter IPTG induksjon, og for å se endringer i fluorescens fra kort induksjonstid mot lang, ble det gjort måling etter 2 timer og etter inkubasjon over natt ved 12°C. Ved 12°C for å bremse vekst av celler og la proteinet modnes. RFU: relativ fluorescens units.

| <b>Emerald GFP relativ fluorescens, RFU (Ex/Em = 450/550 nm)</b> |                    |                    |                        |                               |
|--|--------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|
| Plasmid i BL21   | FPer som uttrykkes | Før IPTG induksjon | 2 timer IPTG induksjon | Inkubasjon over natt ved 12°C |
| pET30  | Ingen              | 13525 ± 494        | 12373 ± 575            | 15176 ± 262                   |
| pULL02   | Fusjonsprotein     | 18810 ± 107        | 22852 ± 1072           | 33446 ± 147                   |
| pULL03   | Frie FPer          | 19420 ± 681        | 46511 ± 551            | Overflow                      |
| pULL04   | GFP                | 19330 ± 280        | 21605 ± 708            | 24622 ± 212                   |
| pULL05   | RFP                | 13676 ± 1382       | 13046 ± 504            | 13926 ± 379                   |

Merk: Verdier er gitt som et gjennomsnitt av 3 prøveverdier ± SD (standardavvik) og verdiene er rundet opp eller ned til nærmeste hele tall.

**3.3.2.2 Evaluering av mCherry RFP relativ fluorescens**

I tabell 11 vises relativ fluorescens før og etter IPTG induksjon, hvor alle prøver i mikropalte ble eksitert ved bølgelengde 550 nm, og emittert lys detektert ved 650 nm, for å undersøke kvalitativ og kvantitativ tilstedeværelse av mCherry RFP.

Resultat for pULL02 i tabell 11, viser at det var noe økning i relativ fluorescens, fra verdi 61 før induksjon til verdi 722 etter induksjon og inkubasjon over natt, men at dette var en lav økning i sammenligning med økningen for pULL03 og pULL05, med henholdsvis RFU-

verdier på 6510 og 10122. En ser da at pULL03 og pULL05 viser tydelig økning av relativ fluorescens etter induksjon, dette stemmer overens med at begge plasmider uttrykker mCherry RFP. Resultatet til pULL04 viser ingen økning av relativ fluorescens og dette samsvarer med at pULL04 ikke uttrykker mCherry.

**Tabell 11: Endring i RFU (Ex/Em = 550/650) etter genuttrykk av FPer i ekspresjonsvert.**

Tabellen viser endring i RFU etter genuttrykk fra plasmid pULL02, pULL03, pULL04 og pULL05. ONKer (5 ml LB-medium tilsatt kanamycin for seleksjon (50 µg/ml)) ble inkubert i ristemaskin (225 rpm) ved RT. OD<sub>600</sub> hos ONK ble justert til 0,1 ved start av vekst. Celler (ekspresjonsverter) ble dyrket i kulturkolbe under roterende risting ved RT. Ved OD<sub>600</sub> på 0,4 ble celler indusert med IPTG (0,75 mM). Ikke-induserbar pET30 vektor ble benyttet som kontroll. For å se endringer i fluorescens, ble det gjort målinger før og etter IPTG induksjon, og for å se endringer i fluorescens fra kort induksjonstid mot lang, ble det gjort måling etter 2 timer og etter inkubasjon over natt ved 12°C. Ved 12°C for å bremse cellevekst og la proteinet modnes. RFU: relativ fluorescens units.

| mCherry relativ fluorescens, RFU (Ex/Em = 550/650 nm) |                    |                    |                        |                               |
|---|--------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|
| Plasmid i BL21  | FPer som uttrykkes | Før IPTG induksjon | 2 timer IPTG induksjon | Inkubasjon over natt ved 12°C |
| pET30   | Ingen              | 30 ± 2             | 29 ± 8                 | 41 ± 9                        |
| pULL02  | Fusjonsprotein     | 61 ± 9             | 220 ± 27               | 722 ± 15                      |
| pULL03  | Frie FPer          | 210 ± 18           | 1524 ± 16              | 6510 ± 128                    |
| pULL04  | GFP                | 35 ± 4             | 32 ± 3                 | 31 ± 1                        |
| pULL05  | RFP                | 224 ± 12           | 1385 ± 72              | 10122 ± 385                   |

Merk: Verdier er gitt som et gjennomsnitt av 3 prøveverdier ± SD (standardavvik) og verdiene er rundet opp eller ned til nærmeste hele tall.

### 3.3.2.3 Undersøkelse av FRET

I tabell 12 vises relativ fluorescens før og etter IPTG induksjon, hvor alle prøver i mikroplate ble eksitert ved bølgelengde 450 nm, og emittert lys detektert ved 650 nm, for å undersøke om FRET effekt var observerbar.

Resultater i tabell 12 viser at det var lav respons i form av FRET, unntatt for pULL03. Relativ fluorescens verdier for pULL02 og pULL03 var henholdsvis 705 og 2540, som derfor viser en



tydelig forskjell. At det ved pULL04 og pULL05, ikke resulterte i noen betydelig økning i fluorescens stemmer overens med at disse plasmidene kun uttrykker et FP (GFP eller RFP). For pULL02, som uttrykker mål-proteinet med innhold av både emerald GFP og mCherry RFP, var det forventet å se høyere FRET respons, enn for samtlige kontrollplasmider.

**Tabell 12: Endring i RFU (Ex/Em = 450/650) etter genuttrykk av FPer i ekspresjonsvert.**

Tabellen viser endring i RFU etter genuttrykk fra plasmid pULL02, pULL03, pULL04 og pULL05. ONKer (5 ml LB-medium tilsatt kanamycin for seleksjon (50 µg/ml)) ble inkubert i ristemaskin (225 rpm) ved RT. OD<sub>600</sub> hos ONK ble justert til 0,1 ved start av vekst. Celler (ekspresjonsverter) ble dyrket i kulturkolbe under roterende resting ved RT. Ved OD<sub>600</sub> på 0,4 ble celler induert med IPTG (0,75 mM). Ikke-induserbar pET30 vektor ble benyttet som kontroll. For å se endringer i fluorescens, ble det gjort målinger før og etter IPTG induksjon, og for å se endringer i fluorescens fra kort induksjonstid mot lang, ble det gjort måling etter 2 timer og etter inkubasjon over natt ved 12°C. Ved 12°C for å bremse cellevekst og la proteinet modnes. RFU: relativ fluorescens units.

| FRET relativ fluorescens, RFU (Ex/Em = 450/650 nm) |                    |                    |                        |                               |
|--|--------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|
| Plasmid i BL21                                     | FPer som uttrykkes | Før IPTG induksjon | 2 timer IPTG induksjon | Inkubasjon over natt ved 12°C |
| pET30  | Ingen              | 394 ± 23           | 380 ± 15               | 452 ± 7                       |
| pULL02   | Fusjonsprotein     | 512 ± 12           | 560 ± 39               | 705 ± 18                      |
| pULL03   | Frie FPer          | 530 ± 18           | 760 ± 4                | 2540 ± 22                     |
| pULL04   | GFP                | 516 ± 12           | 546 ± 30               | 555 ± 10                      |
| pULL05   | RFP                | 404 ± 31           | 419 ± 15               | 623 ± 15                      |

Merk: Verdier er gitt som et gjennomsnitt av 3 prøveverdier ± SD (standardavvik) og verdiene er rundet opp eller ned til nærmeste hele tall.

### 3.4 Proteinanalyse og affinitetsrensing

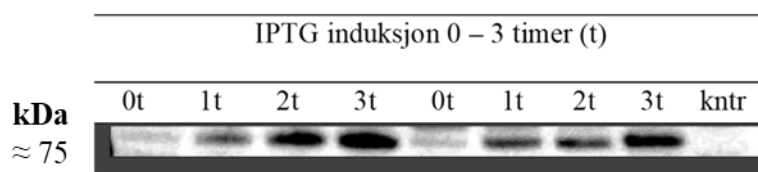
Etter produksjon av mål-proteinet i ekspresjonsvert ble celler lysert. Først ble ultralyd sonde benyttet, men denne metoden viste seg å ikke fungere optimalt, med lavt proteinutbyttet og lav effektivitet. Men resultat fra Western blot viste likevel at protein med His-tag kunne detekteres. French press ble videre tatt i bruk som lysesmetode, og affinitetsrensing ble

benyttet for å isolere mål-proteinet. Både Strep- og His-tag på proteinkonstruksjonen ble utnyttet ved å bruke henholdsvis Strep- og His-tag affinitetsrensing.

### 3.4.1 Kontroll av proteinuttrykk ved hjelp av Western blot

For å kontrollere proteinuttrykk etter induksjon med IPTG, ble Western blot analyse benyttet. Virkning av induksjonstid ble også undersøkt. Under analysen ble det benyttet anti-His antistoff (Rabbit  $\alpha$ -His), deretter HRP konjugert sekundært antistoff (Goat  $\alpha$ -rabbit HRP conjugated), og videre HRP substrat, (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate). Protein ble bekreftet produsert etter chemiluminescence deteksjonsfilm, ved å bruke Kodak Image Station for å fremkalle bilde.

Ved å bruke anti-His antistoff ble det derfor bevist at protein med innhold av His-tag ble uttrykket. Av resultatet, figur 24, kan en derfor se kvalitativ og kvantitativ tilstedeværelse av protein med His-tag, og styrken på bånd økte med induksjonstid (0-3 timer), noe som representerer økt mengde av proteinet. En ser at negativ kontrollprøve (kntr) bekrefter resultatet.



**Figur 24: His-tag protein bekreftet tilstede ved Western Blot analyse.** Celler (ekspresjonsvert) ble dyrket i kulturkolbe med LB-medium tilsatt kanamycin for seleksjon (50  $\mu$ g/ml), under roterende risting. Ved  $OD_{600}$  på 0,4 ble celler indusert med IPTG (0,75 mM). To paralleller av fire prøver av 0-3 timer induksjon ble benyttet, og kontroll prøve (kntr) uten induserbar ekspresjonsvert. Celler ble lysert med sonikator med ultralyd, og lysat ble sentrifugert ved 4700 rpm, 4°C, i 10 min for å anbringe supernatant. Fra supernatant ble 90  $\mu$ l tilført 30  $\mu$ l NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) og varmet i Heat Block ved 95°C i 5 minutter. Prøvene ble separert ved å bruke proteingel, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, og kjørt i NuPAGE™ MES SDS Running Buffer, ved 200 V i 35 minutter. MagicMark™ XP Western Protein Standard ble brukt som størrelsesmarkør, men siden denne ikke var synlig/fullstendig etter Western Blot analysene vises ikke denne på figuren. Antatt størrelse vises i kDa til venstre i figuren.

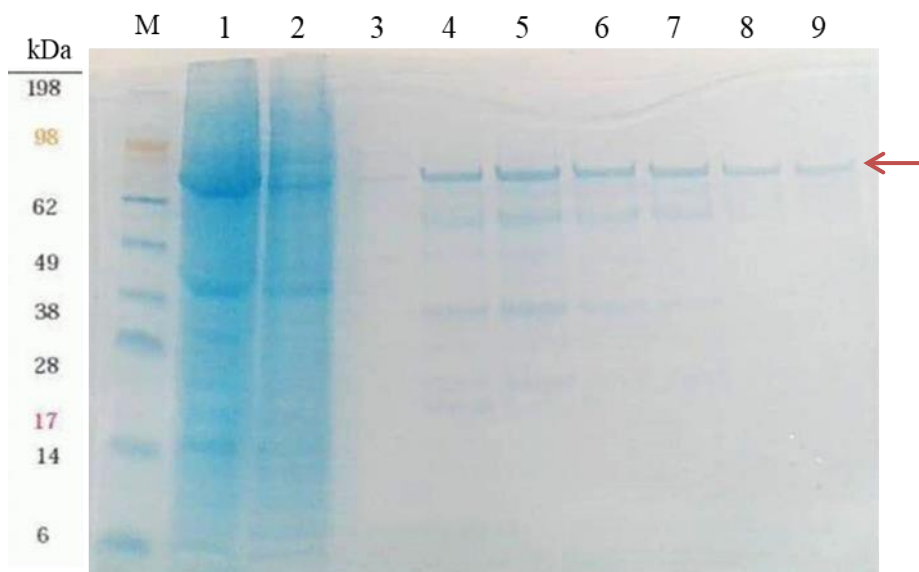
### 3.4.2 Strep-tag affinitetsrensing

Strep-tag er en affinitetstag som består av et kort peptid på åtte aminosyrer, og denne binder med høy selektivitet til Strep-Tactin. På grunn av dette kan Strep-Tactin benyttes under affinitetsrensing av et fusjonsprotein med Strep-tag (IBA Lifesciences, u.å.).

Proteinkonstruksjonen, benyttet i denne oppgaven, har Twin-Strep-tag ved N-terminal ende av proteinet, altså hvor aminosyrekjeden er terminert ved en fri aminogruppe.

ONKer (5 ml LB-medium tilsatt kanamycin for seleksjon (50 µg/ml)) ble inkubert i ristemaskin (225 rpm) ved RT. OD<sub>600</sub> hos ONK ble justert til 0,1 ved start av vekst. Celler ble dyrket i kulturkolbe under roterende risting ved RT, og ved OD<sub>600</sub> på 0,4 ble celler induisert med IPTG (0,75 mM). Ved endt inkubasjonstid ble pelletter høstet, ved at cellekultur ble sentrifugert ved 4500 rpm, 4°C, i 10 min, for å anbringe pellet. Pellet(er) ble resuspendert i 20 ml lysis buffer (TBS) og celler lysert ved french press. Lysat ble sentrifugert ved 4700 rpm, 4°C, i 10 min, for å anbringe supernatant, og supernatanten ble videre rensset ved Strep-tag affinitetsrensing.

Figur 25 viser gel med separert protein etter Strep-tag affinitetsrensing. Hvor rensset protein, kolonne 4-9 på gelen, er tydelig renere enn råekstrakt før affinitetsrensing i kolonne 1 på gelen. I fraksjonene etter opprensning (4-9) fremkom et tydelig proteinbånd mellom 62 og 98 kDa, vist med rød pil på figuren. Dette samsvarer med proteinkonstruksjonens størrelse på rundt 75 kDa.



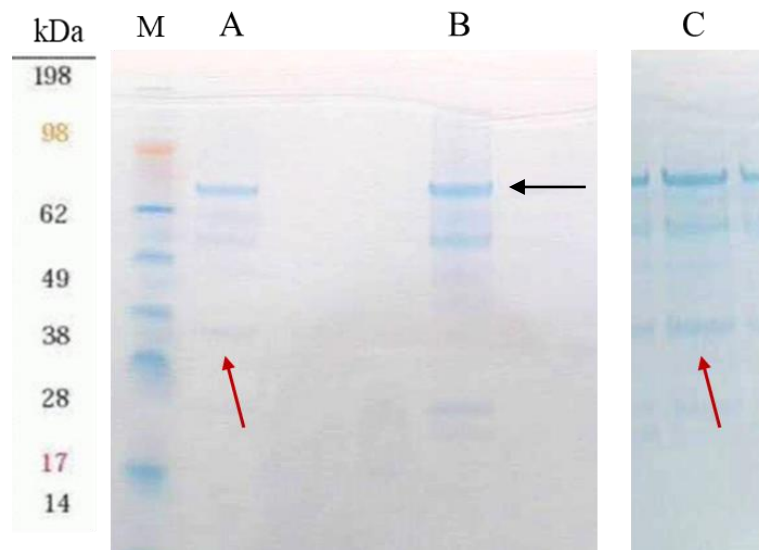
**Figur 25: Strep-tag rensed protein separert ved gel elektroforese (SDS-PAGE).** Fra proteinprøver etter rensing ble 75  $\mu$ l tilført 25  $\mu$ l NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) og varmet i Heat Block ved 95°C i 5 minutter. Prøvene ble separert ved å bruke proteingel, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, kjørt i NuPAGE™ MES SDS Running Buffer, ved 200 V i 35 minutter. Rekkefølge på gel (1-9) består av protein-råekstrakt før affinitetsrensing (1), protein uten affinitet til kolonnen (2), kolonne vasket med buffer (3), og Strep-tag protein samlet opp i fraksjoner etter affinitetsrensing (4-9). Størrelsesmarkør (M) var SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific), hvor størrelse i kDa er vist til venstre.

### 3.4.3 His-tag affinitetsrensing

Proteinkonstruksjonen, benyttet i denne oppgaven, er et fusjonsprotein som inneholder Strep- og His-tag ved de terminale ender. Mens proteinkonstruksjonen har Strep-tag ved N-terminal, så har den en His-tag ved C-terminal ende av proteinet, altså hvor aminosyrekjeden er terminert ved en fri karboksylgruppe. His-tag består av en sekvens av seks histidin aminosyrer, og disse aminosyrene har affinitet til immobiliserte metallioner slik som nikkell, dette utnyttet derfor i affinitetsrensing av et fusjonsprotein med His-tag (Thermo Fisher Scientific, u.å.-a).

Strep-tag-rensed protein ble dermed videre rensed med His-tag, for å fjerne eventuelle protein/proteinfragmenter som ikke hadde både Strep-tag og His-tag inkludert i molekylet. Som resultatet i figur 26 viser, kolonne B, var det fortsatt flere bånd tilstede etter His-tag rensing, men det var tydelig at ett bånd rundt 38 kDa forsvant, og at proteinet (ansvarlig for

dette båndet) derfor antagelig ikke inneholdt His-tag, men kun Strep-tag. Resultatet viser at dette båndet er tilstede før His-tag rensing, vist i kolonne A og C (røde piler), mens det altså er fraværende ved kolonne B. Resultatet viser derfor at resterende protein etter både Strep- og His-tag affinitetsrensing, resulterte i båndstørrelser på henholdsvis omtrent 75, 55 og 20 kDa, vist i kolonne B i figuren.



**Figur 26: His-tag rensed protein separert ved gel elektroforese (SDS-PAGE).** Fra proteinprøver etter rensing ble 75  $\mu$ l tilført 25  $\mu$ l NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) og varmet i Heat Block ved 95°C i 5 minutter. Prøvene ble separert ved å bruke proteingel, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, og kjørt i NuPAGE™ MES SDS Running Buffer, ved 200 V i 35 minutter. Kolonne A og C viser Strep-tag rensed protein, og B viser His-tag rensed protein. Røde piler viser bånd på gel som ser ut til å forsvinne etter His-tag affinitetsrensing, og svart pil viser antatt proteinbånd for proteinkonstruksjonen. Størrelsesmarkør (M) var SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific), hvor størrelser i kDa er vist til venstre.

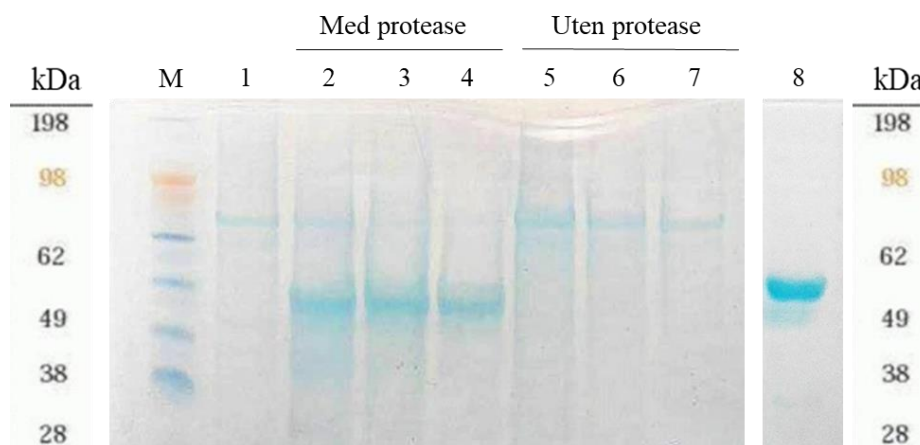
### 3.5 Effekt av PreScission Protease på proteinkonstruktet

Renset protein ble inkubert med proteasen 3C PreScission enzyme, for å kløyve proteinet ved de fem 3C kløyvesteder tilstede i proteinkonstruksjonens aminosyresekvens. Hvor kløyvestedene var designet til å finnes mellom de ulike delene av Centrocin forløper-peptid (se figur 8).

Som vist i figur 27 var det en endring i sammensetning av proteinbånd etter inkubasjon av protease, kolonne 2-4 på gelen. Selv om noe bånd på rundt 75 kDa er synlig ved kolonne 2, er bånd ved 75 kDa i kolonne 2-4, tydelig redusert, i sammenligning med kontroller inkubert uten protease (5-7), og det vitner antagelig om at proteinet ble kløyyvd ved et eller flere av kløyvestedene.

Det fremkom kun et tydelig proteinbånd ved størrelse rundt 40 kDa, etter inkubasjon med protease. Noe som derfor kan indikere at proteinet kun ble kløyyvd ved et av kløyvestedene innenfor proteinet. Men proteasen som ble benyttet, PreScission Protease, hadde en størrelse på omtrent 46 kDa (GE Healthcare, 2011), og det er derfor sannsynlig at dette proteinbåndet også inneholder protease. Noe som tydelig fremkommer ved å sammenligne proteinbånd i kolonne 2-4 med kolonne 8 i figuren, hvor kolonne 8 viser størrelsen til proteasen.

I forhold til antallet kløyvesteder som var inkludert i proteinkonstruksjonen (se figur 8) var det forventet at proteinet skulle fragmenteres og resulterer i to synlige bånd bestående av emGFP og mCherry, og fire mindre deler som ville være usynlige på gelen, på grunn av lav størrelse. Resultatet vist i figur 27 kan derfor ikke bekreftet at dette forekom.



**Figur 27: Protein inkubert med protease separert ved PAA gel elektroforese, for å observere kløyving av proteinet.** Fra proteinprøver etter rensing ble 75 µl tilført 25 µl NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) og varmet i Heat Block ved 95°C i 5 minutter. Prøvene ble separert ved å bruke proteingel, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, og kjørt i NuPAGE™ MES SDS Running Buffer, ved 200 V i 35 minutter. Rekkefølge på gel består av kontroll av ubehandlet protein (1), protein inkubert med protease (2-4) og protein inkubert uten protease (5-7). Kontrollprøve med kun protease lengst til høyre (8). Størrelsesmarkør (M) var SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific), hvor størrelser i kDa er vist ytterst til venstre og høyre.

### 3.6 Pulldown etter krysslinking med formaldehyd

Siden proteinet antakelig ble kløyvd av proteasen, ble forsøk av krysslinking utført, for å forsøke å danne et kompleks av protein og protease. Formaldehyd ble benyttet siden denne reaktanten kjemisk krysslinker proteiner ved å danne kovalente bindinger mellom dem, og derfor gjør det mulig å fange disse flyktige interaksjonene (pulldown).

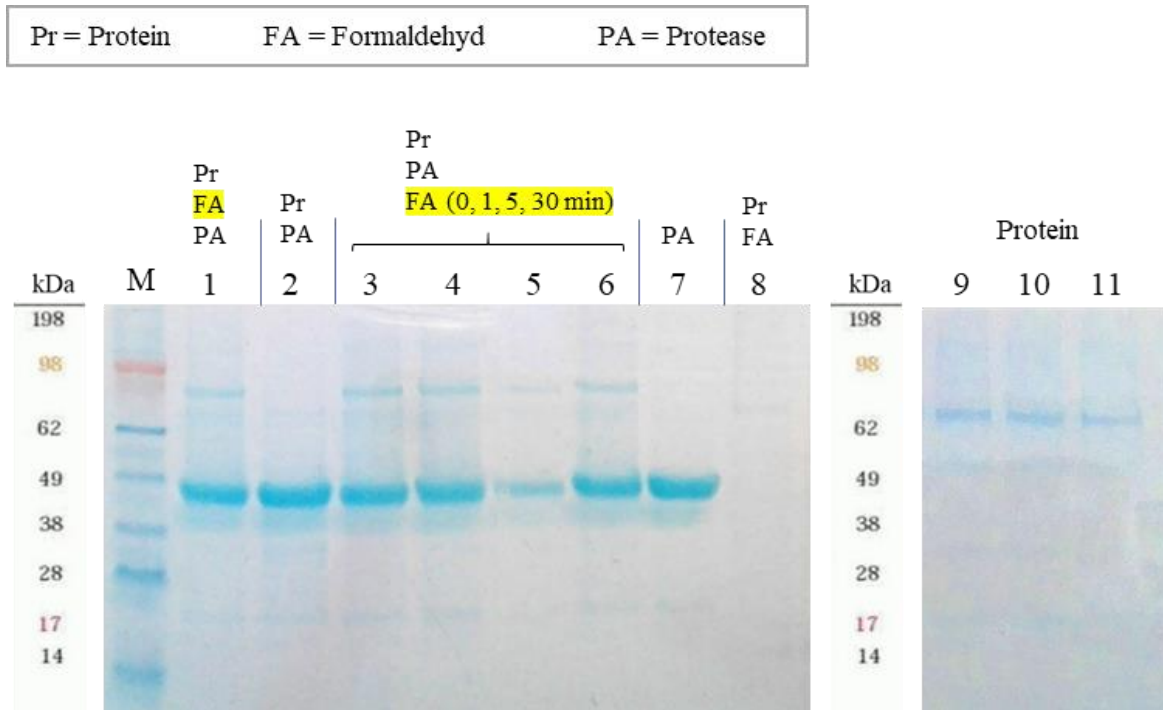
Proteinekstrakt var Strep-tag-renset før bruk i forsøket. Under forsøket ble det benyttet ulike tilsetningstider av formaldehyd, siden det var uvisst ved hvilken hastighet proteasen og målprotein dannet kompleks. Tre kontrollprøver ble laget. En med protein og protease, en med protein og formaldehyd, og en med kun protease. Dette for å kontrollere og sammenligne reaksjon mellom protein og protease uten tilsatt formaldehyd, og undersøke om det ville skje noen reaksjon i prøve med kun protein og formaldehyd. Prøve med kun protease var for å kontrollere størrelsen til proteasen, i sammenligning med de andre prøvene.

Figur 28 viser resultatene på proteingel etter gjennomført krysslinking-forsøk. Hvor det ved kolonnen 1 og 3-6, ble benyttet ulike tilsetningstider av formaldehyd. Hvor kolonne 1 viser resultatet til prøve hvor det først ble tilsatt formaldehyd, til proteinprøven, og deretter protease. Mens det ved kolonne 3-6, først ble tilsatt protease og deretter formaldehyd, men etter ulike inkubasjonstider som var henholdsvis 0, 1, 5 og 30 minutter etter protease. Resultatet viser dermed ved å sammenligne disse kolonnene i figuren, at tilsetningstid av formaldehyd ikke hadde noen betydning for resultatet.

Kolonne 2 i figuren viser resultat av protein inkubert med protease, og en ser at kløyvning av protease trolig er forekommet da bånd på rundt 75 kDa er redusert. Ved kolonne 7 viser kontroll bestående av kun protease på rundt 46 kDa. Kolonne 8 viser protein kun tilført formaldehyd, hvor et svakt bånd er tilstede og formaldehyd ser derfor ikke ut til å påvirke proteinet. Kolonne 9-11 er ubehandlet protein og representerer derfor kontroll over proteinkonstruksjonens størrelse på omtrent 75 kDa, i ubehandlet tilstand.

Resultatet viser at det oppstod en endring hos protein som ble behandlet med protease og formaldehyd ved å se på kolonner 1 og 3-6 i figuren. Proteinbånd ved høyere kDa opptrer ved disse kolonnene, og disse båndene er da nærmere 98 kDa, mens bånd i kolonne 8 og 9-11 er nærmere 62 kDa, i forhold til størrelsesmarkør. Resultatet tyder derfor på at en reaksjon

oppstod i prøvene med protein, protease og formaldehyd, siden det her oppstod bånd av høyere kDa størrelse.



**Figur 28: Bilder i figuren viser proteingeler, hvor nr. 1-8 er prøver fra kryssligningsforsøk og nr. 9-11 er ubehandlet protein (Strep-tag renset).** Fra prøver etter kryssligningsforsøk ble 30  $\mu$ l tilført 10  $\mu$ l NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X). Prøvene ble separert ved å bruke proteingel, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, og kjørt i NuPAGE™ MES SDS Running Buffer, ved 200 V i 35 minutter. På gelen vises resultatet av kryssligning-prøver i kolonner 1, 3, 4, 5 og 6. Hvor ulike tider for tilsettelse av protease og FA til proteinprøve ble benyttet. Kolonne 1 viser proteinprøve hvor FA ble tilsatt først og deretter protease. Kolonne 3 viser proteinprøve hvor protease ble tilsatt først og deretter FA direkte etter. Kolonne 4 viser proteinprøve hvor protease ble tilsatt først og deretter FA 1 min etter. Kolonne 5 viser proteinprøve hvor protease ble tilsatt først og deretter FA 5 min etter (feil ved gel-brønnlomme førte til at denne inneholdt lavere innhold av prøve). Kolonne 6 viser proteinprøve hvor protease ble tilsatt først og deretter FA etter 30 min. På gelen vises resultater av kontrollprøver i kolonne 2, 7 og 8. Kolonne 2 viser kontrollprøve bestående av protein og protease. Kolonne 7 viser kontrollprøve med kun protease. Kolonne 8 viser kontrollprøve med protein og FA. Kolonner 9-11 på figuren er ubehandlet protein (Strep-tag renset). Størrelsesmarkør (M) var SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific), hvor størrelser i kDa er vist til venstre og høyre. FA: formaldehyd.



## 4 Diskusjon

Proteaser er viktige molekylære verktøy blant annet innenfor bioteknologi. Denne oppgaven er en del av et prosjekt som har som mål å identifisere og kommersialisere proteaser som er involvert i modning av antimikrobielle peptider. Hensikten med oppgaven var å lage og evaluere et system for å identifisere proteaser som er involvert i å modne antimikrobielle peptider.

Målene/arbeidet til denne oppgaven har derfor gått ut på å produsere en rekombinant proteinkonstruksjon, med innhold av Centrocin og kløyvesteder for kommersiell protease. Dette for å undersøke om en slik proteinkonstruksjon lar seg vellykket rekombinant produsere, og dermed gjøre et forsøk på å bevise at konseptet om at en slik proteinkonstruksjonen kan benyttes som et «agn» for nedtrekk av proteaser. Hovedmålet var derfor å bevise at det er mulig å fange (pulldown) en protease når den kløyver proteinet, dette ved å stabilisere denne interaksjonen gjennom krysslanking.

### 4.1 Rekombinant kloning av proteinkonstruksjonen

Masterprosjektet startet ved å fremstille det riktige plasmidet, for anvendelse under produksjon av proteinkonstruksjonen. Det ble bestilt et plasmid bestående av pUC19 vektor med kodende sekvens for proteinkonstruksjonen, som videre skulle fungere som det planlagte/designede plasmidet pULL01. Men bestilt plasmid var av varierende størrelse, og sekvensen samsvarte ikke med det designede plasmidet. Kodon-bruk for genet var ved en feil blitt optimalisert og restriksjonskuttsteder som var innenfor genet forsvant. Det bestilte plasmidet oppfylte derfor ikke kravene, og en ny strategi måtte settes opp. Den ny fremgangsmåte gikk ut på å bruke PCR til å amplifisere DNA-fragment (mål-genet), fra pUC19 plasmidet og videre rekombinant klone dette insert-DNAet sammen med lineært fragment av pET30 vektor, ved å bruke metoden «exonuclease og ligasjons uavhengig kloning» (ELIC), en metode publisert av Koskela og Frey (2015).

Koloni-PCR ble først benyttet for å verifiser resultat etter kloning, men resulterte i falsk-negativt svar for flere av de testende koloniene. Noe som fremkom etter restriksjonskutting og

sekvensering. Derfor ble plasmid-isolering og restriksjonskutting senere benyttet når det skulle verifiseres at insert var rekombinant klonet med lineær pET30 vektor.

Koloni-PCR er en etablert metode for kunne utføre rask screening av bakteriekolonier, for å verifisere at ønsket genetisk konstrukt er tilstede (etter selektiv vekst av transformanter). Men siden PCR er så sensitiv i å detektere svært små mengder av DNA, er det også mulig for DNA fra døde celler (som har mislykkes i å vokse på selektivt medium) i å bli amplifisert i koloni-PCR. Noe som kan føre til falske bånd når PCR-koloni-produkt analyseres på gel elektroforese (Bergkessel og Guthrie, 2013). Siden metoden utføres ved direkte PCR av DNA i celler uten først å måtte rense DNA, er metoden svært effektiv. Men bra resultater kan hindres av vanskeligheten ved å frigjøre DNA i PCR miksen, og/eller tilstedeværelse av PCR-inhibitorer. Vekstmediet til cellene, eller cellene selv, kan presenterer PCR-inhibering og forhindrer PCR-amplifikasjon (Azevedo et al., 2017). Inhibitorer kan stamme fra mange kilder, og utbredte inhibitorer inkluderer bestanddeler av bakterieceller, ikke-mål DNA og forurensninger fra omgivende miljø (Wilson, 1997).

Koloni-PCR er derfor en metode som er svært sensitiv og tidssparende, men ved å benytte denne metoden i denne oppgaven resulterte koloni-PCR i falsk-negative resultater hos rundt 50% av koloniene, som etter isolering og restriksjonskutting viste seg å være positive kolonier. Årsaken til falsk-negativt resultat kan altså være PCR-inhibering.

Ut ifra resultater etter restriksjonskutting av det rekombinante plasmidet, fremkom det at ELIC metode fungerte, i samsvar med beskrivelse i publikasjonen (Koskela og Frey, 2015). Positive plasmider etter restriksjonskutting ble videre sekvensert, og plasmid med riktig sekvens ble dermed benyttet videre i arbeidet og fikk plasmidnavn pULL02. Senere i arbeidsforløpet ble kontroll-plasmidene pULL03-05 fremstilt ved bruk av samme metode, med positivt resultat. Noe som vitner om at ELIC er en svært effektiv og godt fungerende metode.

Selv om metoden ELIC ble beskrevet allerede i 1993 (Bubeck et al., 1993, Oliner et al., 1993), er det fortsatt utbredt å bruke tradisjonell kloning ved bruk av restriksjonsenzymmer, ligase og kommersielle kit. ELIC, som altså går ut på å direkte mikse DNA-fragmenter og transformere celler med miksen, er en metode som er tidsbesparende, og hvor man samtidig

unngår å måtte bruke kostbare restriksjonsenzymmer og ligaser. Dette er derfor en metode som bør få større oppmerksomhet, da man både sparer tid og penger ved å benytte denne.

Plasmid pULL02 ble videre klonet inn i *E. coli* BL21 (DE3) kompetente celler for å produsere proteinet i ekspresjonsvert.

## 4.2 Indikatorer for rekombinant ekspresjon

I denne oppgaven ble både Western blot og de fluorescerende proteinene (emGFP og mCherry) benyttet for å evaluere ekspresjon av mål-protein (proteinkonstruksjonen). Hvor metoden ved å bruke de fluorescerende proteinene, bestod av fluorescens-måling av celler i kolonier og i flytende medium.

### 4.2.1 Fluorescens som *in vivo* ekspresjonsindikator i kolonier

Fluorescerende proteiner hos kolonier er i tidligere studie blitt påvist etter induksjon og eksitasjon, hvor GFP ble benytte som en markør for genekspresjon (Chalfie et al., 1994).

I denne oppgaven ble fluorescensintensitet visuelt målt hos IPTG induserte pULL02-transformanter i koloni. Da ved å benytte emerald GFP og mCherry RFP som markører for ekspresjon. Fluorescensintensitet ble derfor sammenlignet mellom induserte og uinduserte kolonier på LA-plater.

Celler vil fluorescere hvis de inneholder fluorescerende substans, slik som FPer, (Madigan, 2015). Men egenfluorescens eller autofluorescens, på grunn av andre fluorescerende deler forekommer også hos celler, hvor det er vist at *E.coli* har en intrinsisk grønn fluorescens, hvor denne autofluorescensen hovedsakelig stammer fra at cellene utskiller flaviner (Mihalcescu et al., 2015).

Resultatet i denne oppgaven viste at det var tydelig forskjell mellom induserte og uindusert kolonier. Selv om vekst på plate uten tilsatt IPTG viste noe bakgrunns-fluorescens, som derfor kan skyldes flaviner. Målingene avdekket derfor fluorescens hos induserte kolonier, og

denne observasjonen bekreftet derfor, med ganske stor sikkerhet, ekspresjon av emerald GFP og mCherry RFP, og videre indikerer derfor dette uttrykk av proteinkonstruksjonen.

#### **4.2.2 Fluorescens som *in vivo* ekspresjonsindikator i flytende cellekulturer, og vurdering av relativ fluorescens hos pULL02-transformanter *versus* kontroller (pULL03-05)**

For å videre vurdere rekombinant uttrykk av proteinkonstruksjonen ble også relativ fluorescens målt og undersøkt hos flytende cellekultur av pULL02-transformanter, samtidig som kontroller av pULL03-05-transformanter ble benyttet. Etter inokulering av kolonier ble ONKer justert til OD<sub>600</sub> 0,1 og kultivert i vekstkolber for å oppnå logaritmisk vekstfase. Cellekulturer ble deretter induert, og videre ble prøver tatt fra kolber, overført til brønner i mikroplate og fluorescens målt. Det ble tatt ut prøver før induksjon, 2 timer etter induksjon og omtrent 16 timer etter induksjon, etter at kolber var inkubert ved 12°C over natt. Det ble ikke målt OD<sub>600</sub> etter tilsatt IPTG, og det er derfor ikke mulig å normere/fastsette forholdet mellom fluorescens og celletetthet. Derfor kan deler av resultatet være påvirket av veksthastigheten til de forskjellige kulturere.

I sammenligning av relativ fluorescens (RFU) verdier etter målinger av pULL02-celler med pULL03-celler, hadde pULL03 betydelig høyere relativ fluorescens både under eksitasjon av GFP og RFP. I tillegg var fluorescens intensitet under FRET undersøkelsen tydelig høyere. I motsetning til pULL03, uttrykker pULL02 et fusjonsprotein, og det er kjent at dårlig folding hos et fusjonsprotein resulterer i tap av fluorescens (Miyawaki, 2011). For når fusjonsproteiner med FPer produseres i en ekspresjonsvert og er ferdig syntetisert må proteinet modne riktig før utslipp/emisjon av fluorescens. Modningsprosessen innebærer da følgende to trinn, folding og kromofor dannelse (Nagai et al., 2002). Noe som derfor kan være årsak til at pULL02 resulterte i lavere verdi av relativ fluorescens i sammenligning med pULL03 (hvor FPer var produsert som frie proteiner). I tillegg viste resultatet av fluorescens måling av pULL03-celler at det her fremkom mye høyere relativ fluorescens allerede etter 2 timer induksjonstid, noe som indikerer at disse FPerne kan modne og fluorescere mer effektivt. At modningstid har betydning for fluorescens, er noe som også vises i resultatene i form av at relativ fluorescens generelt øker betydelig etter inkubasjon over natt.

Fordi proteinkonstruksjonen består av flere domener, kan altså proteinfolding bli et problem og derfor videre føre til problemer med å oppnå fluorescens (Bajar et al., 2016). I sammenligning av pULL02-celler med pULL05-celler etter eksitasjon av mCherry RFP, var relativ fluorescens betydelig høyere for pULL05-celler. Noe som kan tyde på at mCherry RFP, som også her er produsert som et enkelt FP, er utslagsgivende bedre uttrykt i pULL05-celler.

I motsetning til RFP-måling, viste GFP-måling (eksitasjon av emGFP) at verdier av relativ fluorescens for pULL02-celler hadde lignende tendens som hos pULL04-celler. Disse resultatene kan kanskje forklares med at pULL02- og pULL04-protein hadde både His- og Strep-tag fusjonert til proteinenes terminale ender, mens pULL03- og pULL05-proteiner, kun hadde en tag per protein, hvor GFP var i fusjon med Strep-tag og RFP med His-tag. Dette kan indikere at protein med tagger ved begge terminale ender av proteinet, både Strep- og His-tag, resulterer i lave verdier av relativ fluorescens, mens proteiner med kun en tag er mer funksjonelt uttrykket og derfor resulterte i høyere verdier av relativ fluorescens. Det er derfor mulig at taggene påvirker proteinenes fluorescens-evne negativt.

Selv om verdier av relativ fluorescens var tydelig lavere hos pULL02-celler enn ved flere av kontrollene (pULL03 og pULL05), viste målingen likevel tydelig forskjell fra negativ kontroll (pET30), og resultatet tyder derfor på tilstedeværelse av emerald GFP og mCherry RFP, noe som indikerer uttrykk av proteinkonstruksjonen.

### **4.2.3 Western blot - immunologisk assay som ekspresjonsanalyse**

Immunologiske assayer er basert på at et antistoff gjenkjenner og binder seg til bestemte antigener, som ofte er proteiner, og kan derfor brukes til å bestemme forekomst av et protein i en løsning. Dette gjøres ved at et merke eller en reaktant er kovalent feste til et valgt antistoff, hvor merket/reaktanten avslører tilstedeværelse av det bestemte mål-proteinene som antistoffet er bundet til (Lehninger et al., 2013).

Det finnes flere metoder innenfor immunologisk assay, slik som Western blot, ELISA-test og immunofluorescens. I likhet med Western blot er også ELISA (enzym-linked immunosorbent assay) en type immunologisk assay hvor det brukes et enzym linket til et antistoff for å detektere antigener. ELISA-test er rask å utføre, sensitiv og har relativ høy spesifisitet. Til

forskjell er Western blot analyse en relativ kompleks metode og tidskrevende utføre, men den er enda mer spesifikk, siden protein er separert ved elektroforese og overført til en membran, før det merkede antistoffet brukes for å detektere spesifikke proteiner. Dette gjør at metoden både kan gi kvalitativ og kvantitativ informasjon (Madigan, 2015).

En annen antistoffbasert metode er immunofluorescens, hvor antistoffer er konjugert med fluorescerende fargestoffer, som derfor er synlig under UV-lys, og som da kan brukes til å detektere antigener (Madigan, 2015). Mens metoder som ELISA og immunofluorescens identifiserer proteiner ved kun antistoff spesifisitet, er altså Western blot mer spesifikk og identifiserer proteiner ved både antistoff spesifisitet og størrelse.

Denne sammenligningen av Western blot med andre antistoffbaserte metoder, viser derfor at Western blot var det beste valget for å evaluere proteinekspresjon under denne oppgaven. For i tillegg til å påvise mål-proteinet kunne også størrelse og mengde til proteinet observeres ved at elektroforese først var benyttet. Tilstedeværelse av His-tag protein ble påvist, og det ble også bekreftet at mengde av proteinet økte i respons til økt induksjonstid. Dette viser derfor at det er en metode som virker, men at det er en tidkrevende metode.

#### **4.2.4 Western blot *versus* fluorescerende proteiner**

Både Western blot og fluorescerende proteiner ble altså benyttet som metode for å evaluere ekspresjon av proteinkonstruksjonen.

Ved Western blot ble tilstedeværelse av His-tag påvist og da C-terminal ende av proteinet, men det gav ingen videre informasjon om de resterende deler av proteinkonstruksjonen. Mens ved bruk av fluorescens måling kunne begge FPer i fusjonsproteinet påvises, noe som bekrefter uttrykk av begge terminale ender av fusjonsproteinet. Dette gjør fluorescens måling til en metode som mer spesifikt bekrefter tilstedeværelse av proteinet.

For å kunne utføre Western blot, må cellene etter induksjon lyses, slik at rekombinat protein gjøres tilgjengelig, og det er også en tidkrevende analysemetode, med omfattende trinn i prosessen, samt krav til mange reaktanter. Ved å derimot dra nytte av de fluorescerende proteinene i fusjonsproteinet, og måle fluorescens for å evaluere uttrykk, kan dette utføres *in*

*vivo*, direkte av koloni eller flytende cellemedium, og krever kun induksjon av celler og fluorescensavlesende maskinvare.

Det var nyttig å bruke både Western blot og fluorescens-måling, da det er to ulike metoder som derfor kan gi utfyllende svar, og i tillegg gir bruk av flere metoder sikrere bekreftelse på proteinekspresjon. Men å bruke fluorescerende proteiner i å evaluere ekspresjon, i denne oppgaven, viser at det er en enklere og mer effektiv metode i sammenligning med Western blot. I tillegg kan fluorescens-måling vitne om at proteinet er riktig foldet, og ved hvilken kvalitet, ved å undersøke tilstedeværelse av FRET-effekt mellom de fluorescerende proteinene.

### **4.3 FRET som indikator for proteinets kvalitet**

FRET betyr at energien fra et eksitert FP (donor), overføres direkte til et nærliggende FP (akseptor), hvor dette FP emitterer fluorescens. Måling av fluorescens fra akseptor kan dermed avdekke FRET, og derfor bekrefte tilstedeværelse av et molekylært kompleks.

Styrken til et FRET signal er avhengig av valget av FPer, hvor overlapping av donors emisjons spektrum med akseptors eksitasjons spektrum bestemmer styrken til FRET (f.eks. effektiviteten) med hensyn til avstand mellom donor og akseptor. I tillegg til spekter overlapp, kan fotostabilitet (det vil si hvor fort FP fotobleker) og modning være betydningsfullt for signalstyrken i FRET eksperimenter (Scott og Hoppe, 2015). I proteinkonstruksjonen ble GFP benyttet som donor og RFP som akseptor, og dette er et FRET-par som er attraktive i levende celler på grunn av fordeler som blant annet at eksitasjon av dette FRET-paret inducerer mindre autofluorescens fra flavoproteiner og at det er relativt større skille mellom spektrum, til forskjell fra andre FRET-par, slik som CFP og YFP (cyanFP-yellowFP) (Bajar et al., 2016).

Resultater i denne oppgaven viser at FRET-effekt, mellom FPer i proteinkonstruksjonen, er noe usikkert. Etter visuell måling av fluorescensintensitet av kolonier på LA-plate, viste FRET-måling at det var liten forskjell mellom induisert og uindusert plate. Verdier av relativ fluorescens etter undersøkelse av FRET hos flytende kultur av pULL02-celler, var også relativt lave. Men pULL02-cellers relativ fluorescens verdi på 705, etter induksjon og inkubasjon over natt, var noe høyere enn for pULL04 (555 RFU) og pULL05 (623 RFU).

Dette viser derfor at det for pULL02 kan ha oppstått noe FRET-effekt, siden pULL04 og pULL05 har lavere verdier til tross for at pULL05-protein genererte mye høyere fluorescens under eksitasjon av mCherry (10122 RFU), enn pULL02 (722 RFU), som dermed understreker at når et protein med kun ett FP alene blir eksitert ved 450 nm, klarer det ikke å oppnå fluorescens (emisjon) ved 650 nm.

Samtidig var det under FRET-måling en distinkt mye lavere verdi hos pULL02 (705 RFU) ved å sammenligne med pULL03 (2540 RFU), men FRET hos pULL03 kan ikke være ekte positiv, da FPer ikke er i fusjon.

Det er rapportert flere årsaker til at det oppstår problemer med FRET mellom et FP-par. FRET mellom et par av fluoriserende proteiner kan påvirkes av folding og modningstid. Hvor rekkefølgen av FP kan ha betydning på kvaliteten av proteinfoldingen og modning, i forhold til hvilket FP som er ved N-terminal og hvilket som er ved C-terminal ende i fusjonsproteinene, og dette kan da igjen påvirke fluorescensstyrke og videre FRET hos de fluorescerende proteinene (Palmer et al., 2011). Proteinkonstruksjonen (pULL02-protein) benyttet i denne oppgaven har emerald GFP ved N-terminal og mCherry ved C-terminal. Siden resultatet viser at lave fluorescens verdier oppstår i sammenligning med FPer produsert som frie proteiner, (pULL03-protein), kunne et mulig forsøk i å forbedre FRET være å ombytte på plasseringer av emerald GFP og mCherry RFP, og derfor kontrollere om rekkefølgen er av betydning.

Modningshastighet spiller også en rolle, fordi FPer med raskere modningshastighet har vist seg å ha tendens til å ha bedre FRET opptreden (Scott og Hoppe, 2015). Videre er det tidligere vist at det er avgjørende å ha FRET-partnere med samsvarende modningshastighet, siden dette påvirker forholdet mellom akseptor og donor og derfor videre FRET effektivitet. Hvor forholdet av tilstedeværelse av donor og akseptor (donor : akseptor) skal være 1:1, men dette er noe som ikke oppnås hvis det er store forskjeller i modningshastigheter (Scott og Hoppe, 2015). Modningshastighet for mCherry, ved 37°C, er rundt 15 min (Shaner et al., 2004), og modningshastighet for emerald GFP, ved 37°C, er rundt 12 min (Iizuka et al., 2011). Dermed er FPene benyttet i proteinkonstruksjonen nære i modningshastighet, og derfor er det sannsynligvis ikke her problemene ligger.

FRET fallgruver er kjent fra tidligere forskning (Broussard et al., 2013), både falsk-negative og falsk-positive resultater kan oppstå. Når det gjelder falsk-negativ FRET, for et



intramolekylært FP-par, så kan årsaker bestå av at fluorophorene ikke er nære nok til å interagere, eller at deres dipoler ikke er riktig justert i forhold til hverandre, og hvis de er perpendikulære til hverandre vil ikke energioverføring oppstå (Broussard et al., 2013). På grunn av disulfid-broen mellom tung- og lettkjede i Centrocin peptidet, vil det antas at FPene i proteinkonstruksjonen er i umiddelbar nærhet, men om ikke foldingen er forekommet riktig kan dette gjøre FPene i for stor avstand og forhindre at FRET oppstår.

Endringer i konstruktdesignet for proteinkonstruksjonen, kunne være å bruke fleksible linker, for å tilpasse avstanden mellom domenene av de fluorescerende proteinene, som da kunne forbedre muligheten for FRET. For fleksible linker er korte aminosyrekjeder som kan brukes mellom domener i et protein, og de forbinder de ulike domenene uten å påvirke domenenes funksjoner, da linkene er uavhengige enheter (Reddy Chichili et al., 2013). Fleksible linker er generelt sammensatt av aminosyrer med lav størrelse slik som glysin. Lav størrelse hos disse aminosyrene gir fleksibilitet, og muliggjør mobilitet hos de tilkoblede funksjonelle domener. Ved å justere lengde av de fleksible linkene oppnås passende avstand mellom de funksjonelle domenene. Linker kan i tillegg gi fordeler under produksjon av fusjonsproteiner, slik som forbedring av folding, stabilitet, biologisk aktivitet og økt ekspresjonsutbytte (Chen et al., 2013).

Falsk-positiv FRET kan oppstå ved at det er høy proteinkonsentrasjon innenfor et lokalisert område, hvor FRET da forekommer mellom tilstøtende fluorophorer, som da kan gi opphav til falsk-positive FRET signaler (Broussard et al., 2013). Ved bruk av pULL03-celler viste verdiene i resultatet at det her oppstod en form for FRET, men siden FPene her bestod av frie proteiner, er det sannsynligvis ikke ekte FRET som oppstår, og mulig årsak kan derfor være at dette er et resultat av falsk-positiv FRET.

På bakgrunn av dette kan derfor økningen av relativ fluorescens som ses hos pULL02 også være falsk-positiv FRET. Samtidig, som omtalt ovenfor i teksten, kan årsaken til lavt FRET-signal være et resultat av falsk-negativ FRET. FRET mellom FPer i proteinkonstruksjonen bekreftes dermed ikke i denne oppgaven, og designet for konstruktet må derfor optimaliseres.

### 4.3.1 FRET som indikator for enzymatisk proteinmodning

Hvis FRET hadde fungert kunne dette fenomenet blitt benyttet til å bedømme enzymatisk proteinmodning. Hvor da det ville oppstått tydelig endring av FRET-signal etter kløyvning av proteinet. Det ble utført forsøk med å undersøke FRET-signal hos protein, før og etter inkubasjon med protease, men det viste ingen betydelig endring.

## 4.4 Lekkasje fra *lac* operator

Det er kjent fra svært tidlige studier at *lac*-operonet viser noe «lekkende» ekspresjon selv i nærvær av glukose og fravær av inducer. Noe som betyr at kontroll av transkripsjon hos operonet ikke er 100% effektiv, og at transkripsjon fra promoter aldri er helt avslått (Nielsen et al., 2007, Jacob og Monod, 1961).

Ved å se på Western blot resultatet i denne oppgaven vises noen svake bånd hos analysert prøve som ikke var induert med IPTG (0 t), og verdier av relativ fluorescens hos uinduserte celler var gjennomgående høyere i sammenligning med negativ kontroll pET30 (tabeller 10-12). Dette tyder derfor på bakgrunns-ekspresjon, og viser at *lac* operator antakelig ikke er tett, som fører til noe produksjon av T7 polymerase uten tilstedeværelse av IPTG, og derfor videre at protein produseres i et lavt bakgrunns nivå.

## 4.5 French press som alternativ lyseringsmetode

For å frigjøre intracellulære produkter, som proteiner, er det viktig å bruke en effektiv metode for å lysere cellene. I tidligere studier er det vist at sonikering og french press er effektive metoder for å lysere celler, hvor french press er noe mer effektiv (Singh, 2013, Benov og Al-Ibraheem, 2002).

Proteinekstrakten benyttet under Western blot analysen i denne oppgaven, var anbrakt ved å lysere cellene med ultralyd-sonde-sonikator og sentrifugering. Selv om resultatet til Western blot viste at bånd øket i styrke etter IPTG induksjon, så kunne ikke tydelige sterke proteinbånd observeres direkte på polyacrylamid-gel, dette er uvanlig og viser til at det var lavt proteinutbytte av mål-protein i proteinekstrakten. Dette kan derfor tyde på at sonikerings-utstyret som ble benyttet ikke var i optimal fungerende tilstand. På grunnlag av

dette ble french press tatt i bruk for å lysere celler, for å videre bruke proteinekstrakten i affinitetsrensing.

I tillegg til at lyserings metoden må være effektiv, må metoden samtidig ikke forårsake denaturering av proteinene. Denaturering av protein kan oppstå ved ultralyd sonikering, på grunn av at varme kan genereres under utførelsen. Andre fordeler med french press er derfor at celledøsningen holdes kald under utførelse, og at en kan behandle store volum med relativt høy konsentrasjon av bakterieceller (Singh, 2013).

#### **4.6 utfordringer ved rekombinant produksjon og mulig proteolytisk følsomhet hos produsert protein**

Etter Strep-tag rensing ble proteinet analysert med SDS-PAGE, for å bekrefte produksjon av proteinkonstruksjonen. Det var da forventet at kun et proteinbånd skulle oppstå på gelen, med størrelse på rundt 75 kDa. Men det fremkom imidlertid flere proteinbånd på gelen, med lavere størrelser, enn proteinkonstruksjonen.

Resultatet viser altså at flere proteinbånd er tilstede etter rensingen, noe som tyder på at dette er fragmentert protein med Strep-tag tilstede i molekylet. Videre ble Strep-tag-renset protein, renet ved bruk av His-tag rensing, og resultatet viser da at ett av proteinbåndene av fragmentert protein forsvant, noe som tyder på at dette proteinet ikke hadde affinitet til HisPur Ni-NTA kolonnen.

Etter at proteinet var renet med både Strep-tag og His-tag var det altså, i tillegg til den antagelige intakte proteinkonstruksjonen, også minst to andre proteinbånd av lavere størrelse tilstede på proteingelen.

En mulig årsak for problemet kan være at det oppstår proteolyse av proteinkonstruksjonen. Proteolyse av rekombinante proteiner i *E. coli* er et kjent problem fra tidligere studier (Narayanan og Chou, 2009). For nedbrytning av intracellulære proteiner modulerer nivået av metabolske enzymer og fjerner skadde og unormale proteiner fra cellen (Gottesman og Maurizi, 1992). *E. coli* har proteaser lokalisert i cellens forskjellige intracellulære rom, slik som cytoplasma, periplasma, indre membran og ytre membran (Maurizi, 1992). Siden disse

proteasene spiller en viktig rolle i å fjerne unormale proteiner, kan disse proteasene derfor potensielt degradere rekombinante proteiner (Gottesman, 1996). Videre kan proteaser lokalisert i ytre membran kløyve cytoplasmiske proteiner etter at celler er lysert (Gottesman, 1996).

Selv om *E. coli* BL21 (DE3), som er ekspresjonsstamme benyttet i dette prosjektet, er en stamme som er optimalisert for protein produksjon og hvor proteaser er fjernet (New England BioLabs, u.å.), så er det vist i tidligere studie (Narayanan og Chou, 2009) at rekombinant protein likevel kan bli degradert i denne.

Fusjonsdelene i proteinkonstruksjonen, GFP, RFP og Centrocin, stammer alle fra eukaryote organismer, mens *E. coli*, som er ekspresjonsverten for proteinet, er en prokaryot. Eukaryote proteiner kan derfor bli gjenkjent som fremmede objekt når uttrykt i *E. coli*, som videre kan føre til protease-mediert degradering av protein (Narayanan og Chou, 2009).

Andre studier har vist at konsekvenser kan oppstå om et kuldeadaptert protein uttrykkes av en mesofil vert (Xu et al., 2008). Proteinkonstruksjonen har innhold av kuldeadapterte proteiner som er tilpasset produksjon i en psykrofil marin eukaryot. Dette kan derfor gi konsekvenser og hindre at proteinkonstruksjonen blir strukturelt adaptert til det mesofile ekspresjonssystemet til *E. coli*, som videre kan resulterer i misfolding av proteinet, og at den intramolekulære disulfid-bindingen ikke dannes riktig (Xu et al., 2008). Den manglende evnen til å folde seg riktig kan videre utsette proteinet for nedbrytning (Maurizi, 1992).

Selv om bruk av terminale tagger, slik som Strep- og His-tag, i proteinkonstruksjonene er svært praktisk, kan også disse innebære noen ulemper, hvor de kan påvirke egenskaper til proteinet de er fusjonert med, og videre påvirke proteinfoldingen (Lehninger et al., 2013). Mangel på riktig konformasjon hos proteiner vil også kunne resulterer i intracellulær akkumulering av inaktive eller uløselige proteiner («inclusion bodies») og kunne indusere fysiologisk stress hos cellen, og dermed påvirke proteinuttrykket (Chou, 2007). Det totale proteinuttrykk, av proteinkonstruksjonen, kan altså ha blitt begrenset av posttranslasjonelle trinn slik som translokasjon, folding eller dannelse av disulfide-binding, og videre kan proteinet derfor ha blitt utsatt for degradering.

Rekombinant produksjon av protein kan altså være en utfordring, slik som ved å uttrykke et AMP som en del av en proteinkonstruksjon. Men SpStongylociner, som er andre AMPer som

tidligere er isolert fra kråkebolle (*Strongylocnietrotus purpuratus*), ble i en tidligere studie vellykket rekombinante uttrykt, i moden form (Li et al., 2010a). I studien ble cDNA, kodende for modent peptid, klonet inn i et ekspresjonssystem (pET30-EK/LIC), som sammenføyet protease-kløyvesteder og to affinitets-tagger til det rekombinantet peptidet. Fusjonspeptidet ble uttrykket i løselig form, og etter kløyving av affinitets-tagger, viste de rekombinante peptidene antibakteriell aktivitet (Li et al., 2010a). I en tidligere bacheloroppgave, veiledet av Chun Li (UiT), ble også et fusjonsprotein bestående av Centrocin pre-pro-protein fusjonert med His-tag, vellykket rekombinant produsert. Disse tidligere prosjekter viser altså at det er mulig å rekombinant produsere AMPer i fusjon med affinitets-tagger, men siden fusjonsproteinet benyttet i denne oppgaven, proteinkonstruksjonen, består av en mer kompleks sammensetning, av forskjellige domener, kan altså dette gi større utfordringer.

#### **4.7 Proteinet inkubert med PreScission Protease – lav effekt**

Proteinkonstruksjonen ble designet med flere kløyvesteder innad i aminosyresekvensen som skiller de ulike domenene hos proteinkonstruksjonen, og de ulike deler av forløper Centrocin. Disse kløyvestedene skulle brukes for å kunne krysslinke protein og protease. Under forsøk med å kløyve proteinet med PreScission protease, fremkom et uforventet resultat på proteingel, hvor kun bånd på rundt 40 kDa fremkom etter inkubasjon med protease. Resultatet av dette proteinbåndet kan derfor muligens bestå av både proteasen og kløyvd protein. Hvor proteinet da antagelig kun er kløyvd ved et kløyvested, som er mellom preprosekvens og tungkjeden, som da gir to deler på størrelse rundt 35-40 kDa. Mulig grunn for at kløyvningen ikke fungerte som forventet, er at kløyvesteder kan være skjult innenfor proteinets tertiære struktur og dermed være utilgjengelig for proteasen (Hammond, 2008). Som nevnt tidligere i teksten, kan ulike faktorer påvirke proteinfoldingen negativt, og det er mulig at proteinkonstruksjonen foldes på en måte som skjuler 3C kløyvesteder.

En annen mulighet er at proteinet kløyves ved flere steder, men at de resulterende fragmentene er i så lav konsentrasjon at de ikke vises på gelen, etter gel elektroforese. Men dette ble ikke vurdert som et problem da hovedfokuset var å krysslinke protease med proteinkonstruksjonen.

## 4.8 Pulldown av agn-protease-kompleks – proof of concept

For å stabilisere interaksjonen mellom proteinkonstruktet og proteasen ble disse krysslinket ved hjelp av formaldehyd. Krysslinking betyr at det dannes kovalente bindinger mellom proteiner. Under krysslinking angriper formaldehyd nukleofile grupper slik som aminogruener funnet ved N-terminal og i sidekjeder av aminosyrer (Klockenbusch et al., 2012). Hvor formaldehyd er funnet i å reagere med sidekjeder av cystein, histidin, lysin, tryptofan og argining (Metz et al., 2004). Formaldehyd er et relativt lite molekyl med kun fire atomer, dette gjør at de reaktive aminosyrene som skal krysslinkes må være i umiddelbar nærhet, og bindinger mellom grupper blir rundt 2 Å fra hverandre (Sutherland et al., 2008). Grupper må altså være nære nok for å kunne krysslinkes.

Proteinkonstruksjonen og protease er i direkte nærhet av hverandre når de danner et enzym-substrat kompleks, men komplekset er flyktig, og krysslinkings reagent til bruk under dette forsøket var derfor nødt for å ha en rask reaktivitet. Formaldehyd som er en fikserings reagent er kjent for å ha relativt rask reaktivitet (Klockenbusch et al., 2012).

Det er ved tidligere forskning vist at det oppstår krysslinking mellom regulator proteiner *in vivo* i *Bacillus subtilis* ved bruk av formaldehyd. Hvor formaldehyd entrer cellen og krysslinker proteiner som er i nær kontakt med hverandre, rundt 2 Å (0,2 nm) (Herzberg et al., 2007). Krysslinking ved formaldehyd ble derfor forsøkt benyttet i dette prosjektet, for å forsøke å danne et protease-protein kompleks.

Bruk av formaldehyd-krysslinking mellom proteiner er foreløpig ikke blitt standardisert (Klockenbusch et al., 2012), og derfor ble modifisert metode fra Herzberg et al. (2007) benyttet under krysslinkingsforsøket.

Resultatet etter krysslinkings-forsøket viste at ved å sammenligne ubehandlet protein med størrelse på omtrent 75 kDa, med protein behandlet med protease og formaldehyd, så oppstod det en endring i sammensetningen av proteinbånd på gel, ved at ett bånd ved høyere kDa her var tilstede, og da nærmere 90 kDa. Dette kan derfor bety at det oppstår et kompleks av protease og proteinfragment, da proteinbånd av denne størrelsen ikke er tilstedeværende hos ubehandlet protein, eller ved protease inkubert protein. Men siden proteasen har en størrelse på 46 kDa, og proteinets størrelse er på rundt 75 kDa, tyder det på at det ikke er et fullstendig kompleks av protease og proteinkonstruksjonen, hvor bånd da burde ha vært rundt 120 kDa.

Men en mulighet kan være at komplekst består av protease og en fragmentert del av proteinkonstruksjonen.

Fordeler ved å bruke formaldehyd er at det raskt inaktiverer proteiner i flyktige komplekser og danner sterke kovalente bindinger mellom proteinene (Sutherland et al., 2008). Etter krysslinking, og analyse på proteingel, var det tydelig å se at ulike tilsettingstider av formaldehyd ikke var av betydning. Hvor det verken ved å tilsette formaldehyd før protease, direkte etter protease, eller 30 min etter protease hadde noen betydning for resultatet. Noe som samsvarer med at formaldehyd raskt inaktiverer proteiner.

Resultatet viser derfor at krysslinking mellom protease og deler av proteinet kan ha oppstått, under bruk av formaldehyd.

## **4.9 Fremtidig arbeid**

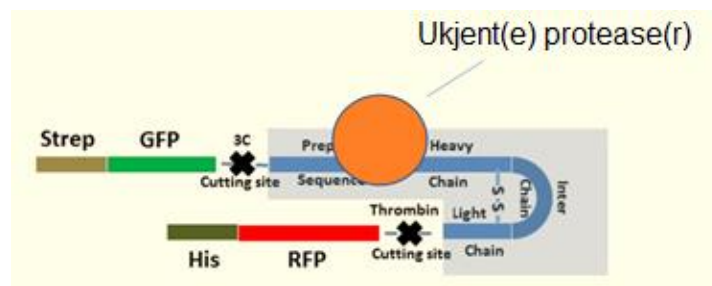
I forhold til usikkerheten rundt resultatet av krysslinkingsforsøket i denne oppgaven, er det mulig at formaldehyd ikke er den ideelle krysslinkings reaktant for dannelsen av det ønskelige protein-protease komplekset.

Som et alternativ kan transglutaminase være en mulighet, siden transglutaminaser er en familie av enzymer som katalyserer krysslinking mellom proteiner, da gjennom danning av kovalente bindinger mellom lysin og glutamin (Ichinose et al., 1990). Fordelen ved bruk av et krysslinkende enzym ville være at krysslinkingsprosessen ville foregå fortløpende og ikke inaktiveres. Det kunne teoretisk gi mulighet for isolering av større mengder kompleks.

Videre arbeid etter gjennomføring av krysslinking, vil gå ut på å rense komplekset og identifisere det ved bruk av massespektrometri analyse. Om dette er vellykket er dermed konseptet bevist og metoden kan benyttes for å isolere ukjent(e) protease(r) som er ansvarlig for modning av Centrocin.

Den rekombinante proteinkonstruksjonen, med den naturlige Centrocin sekvens, brukes deretter for å isolere de intrinsiske proteasene som er ansvarlig for modning av Centrocin i grønn kråkebolle. På denne måten vil da proteinet benyttes som «agn» for nedtrekk av

proteasene som er av interesse. Dette er fordi disse proteasene gjenkjenner spesifikke aminosyre-sekvenser på det umodne prepro-peptidet og utfører kløyving for å danne den posttranslasjonale modifikasjonen, altså det modne peptidet. Til slutt kan dette føre til identifisering og kommersialisering av disse kulde adapterte proteasene. Videre kan derfor de isolerte proteasene fremtidig produseres som molekylære verktøy, for å blant annet kunne modne antimikrobielle peptider, og på denne måten kanskje muliggjøre enklere og billigere produksjon av AMPer.



**Figur 29: Illustrasjon som viser proteinkonstruksjon** fungerer som et "agn" for å fiske ut protease(r).



## 5 Konklusjoner

- Etter vellykket kloning med metoden ELIC, ble proteinekspresjon evaluert ved å bruke både Western blot og måling av fluorescens. Hvor sistnevnte var en svært god metode for å raskt kunne evaluere ekspresjon. Men det var nyttig å bruke begge metoder da de utfyller hverandre, og i tillegg gir bruk av flere metoder sikrere bekreftelse på proteinekspresjon. Rekombinant produksjon av proteinkonstruksjonen ved hjelp av bakteriell ekspresjonsvert ble dermed bekreftet.
- Det ble utført fluorescens-måling hos både kolonier og flytende cellemedium, og begge de fluorescerende proteinene, emerald-GFP og mCherry-RFP, ble da bekreftet tilstede.
- Resultatene av fluorescens målinger av pULL02-transformanter i sammenligninger med kontroller (pULL03-05), viser at designet av proteinkonstruksjonen må optimaliseres for å kunne oppnå FRET. Dette kan mulig gjøres ved å blant annet bruke fleksible linker.
- Proteinkonstruksjonen (pULL02-protein) oppnår kanskje ikke den riktige konformasjonen, og preges mulig av at FPer er fusjonert til affinitetstagger, som kan påvirker evne til fluorescens negativt.
- Det kan være flere grunner for at rekombinant produksjon av et fusjonsprotein med ulike domener kan være utfordrende. Affinitetsrensing viste at det var mulig å rense ut mål-proteinet, men at proteinet trolig ble nedbrutt til fragmenter, da flere proteinbånd viste seg etter polyakrylamid-gel elektroforese. Proteinkonstruksjonens sammensetning ser derfor ut til å kreve videre vurdering, slik som konsekvens av å benytte to terminale tagger.
- Kløyving av proteinet ved å bruke kommersiell protease så ut til å fungere, men det var ikke mulig å avdekke ved hvilke kløyvesteder konstruktet ble kløyvd, eller om det

ble kløyd ved bare ett eller ved flere steder. Resultatet gav likevel grunnlag for å utføre forsøk av krysslinking av mål-protein med protease.

- Det var spesielt interessant at pulldown ved bruk av krysslinking med formaldehyd, antakelig fungerte til en viss grad. Men siden formaldehyd er en fikseringsreaktant, er det mulig at den ikke er optimal for krysslinking av protein og protease, og videre forsøk ved å bruke krysslinkende enzym vil fremtidig kunne bli et interessant prosjekt.
- Deler av hovedmålet for denne oppgaven ble dermed besvart. Hvor Centrocin ble rekombinant produsert som en del av en proteinkonstruksjon, men at proteinfolding og degradering av proteinet kan være et problem. Videre var det sannsynlig at kommersiell protease ved ett eller flere steder kløyvde proteinet, og at det ble et produkt etter krysslinking.
- Denne oppgaven har gitt informasjon som kan være nyttig i fremtidig arbeid, og har vist en begynnelse på utvikling av et system som kan anvendes til å isolere proteaser.

## 6 Referanser

- Angers-Loustau, A., Rainy, J. & Wartiovaara, K. 2007. PlasmaDNA: a free, cross-platform plasmid manipulation program for molecular biology laboratories. *BMC Mol Biol*, 8, s. 77. doi: 10.1186/1471-2199-8-77.
- Azevedo, F., Pereira, H. & Johansson, B. 2017. Colony PCR. *I: Domingues, L. (red.) PCR: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, s. 129-139.
- Bajar, B. T., Wang, E. S., Zhang, S., Lin, M. Z. & Chu, J. 2016. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel)*, 16(9). doi: 10.3390/s16091488.
- Benov, L. & Al-Ibraheem, J. 2002. Disrupting Escherichia coli: a comparison of methods. *J Biochem Mol Biol*, 35(4), s. 428-31.
- Bergkessel, M. & Guthrie, C. 2013. Chapter Twenty Five - Colony PCR. *I: Lorsch, J. (red.) Methods in Enzymology*. Academic Press, s. 299-309.
- Brogden, N. K. & Brogden, K. A. 2011. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(3), s. 217-225. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.05.004.
- Broussard, J. A., Rappaz, B., Webb, D. J. & Brown, C. M. 2013. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat Protoc*, 8(2), s. 265-81. doi: 10.1038/nprot.2012.147.
- Bubeck, P., Winkler, M. & Bautsch, W. 1993. Rapid cloning by homologous recombination in vivo. *Nucleic Acids Research*, 21(15), s. 3601-3602.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), s. 802-5.
- Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. 2013. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), s. 1357-1369. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>.
- Cheung, R. C. F., Ng, T. B. & Wong, J. H. 2015. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Marine Drugs*, 13(7), s. 4006-4043. doi: 10.3390/md13074006.
- Chou, C. P. 2007. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in Escherichia coli. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76(3), s. 521-32. doi: 10.1007/s00253-007-1039-0.

- Clegg, R. M. 2009. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, 33(C), s. 1-57. doi: 10.1016/S0075-7535(08)00001-6.
- Falanga, A., Lombardi, L., Franci, G., Vitiello, M., Iovene, M. R., Morelli, G., Galdiero, M. & Galdiero, S. 2016. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. *Int J Mol Sci*, 17(5). doi: 10.3390/ijms17050785.
- Fornbacke, M. & Clarsund, M. 2013. Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infect Dis Ther*, 2(1), s. 15-26. doi: 10.1007/s40121-013-0002-x.
- GE Healthcare. 2011. *PreScission Protease*. Tilgjengelig fra: [https://us.vwr.com/store/asset?assetURI=https://us.vwr.com/stibo/hi\\_res/std.lang.all/74/65/15167465.pdf](https://us.vwr.com/store/asset?assetURI=https://us.vwr.com/stibo/hi_res/std.lang.all/74/65/15167465.pdf).
- Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M. & Wilson, J. M. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88(4), s. 553-60.
- Gong, F., Fahy, D. & Smerdon, M. J. 2006. Combination of chemical cross-linking and pull-down assay to study transient protein-protein interactions. doi: 10.1038/nprot.2006.297.
- Gottesman, S. 1996. *Proteases and Their Targets in Escherichia Coli*. *Annu. Rev. Genet.* 30: 465-506.
- Gottesman, S. & Maurizi, M. R. 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev*, 56(4), s. 592-621.
- Hammond, B. G. 2008. *Food safety of proteins in agricultural biotechnology*. 1. utg. Serie: Food science and technology (Taylor & Francis), b. 172. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Haney, E. F., Mansour, S. C. & Hancock, R. E. W. 2017. *Antimicrobial peptides: An introduction*.
- Herzberg, C., Weidinger, L. A., Dorrbecker, B., Hubner, S., Stulke, J. & Commichau, F. M. 2007. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics*, 7(22), s. 4032-5. doi: 10.1002/pmic.200700491.
- Homaei, A., Lavajoo, F. & Sariri, R. 2016. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *Int J Biol Macromol*, 88, s. 542-52. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.023.

- IBA Lifesciences. 2017. *Expression and purification of proteins using Strep-tag®II or Twin-Strep-tag® - A comprehensive manual*. Tilgjengelig fra: [https://www.iba-lifesciences.com/isotope/2/2-1000-002-Manual\\_Strep-Tactin-Purification.pdf](https://www.iba-lifesciences.com/isotope/2/2-1000-002-Manual_Strep-Tactin-Purification.pdf).
- IBA Lifesciences. u.å. *Strep-tag®: The leading affinity tag in recombinant protein technology*. Tilgjengelig fra: <https://www.iba-lifesciences.com/strep-tactin-system-technology.html>.
- Ichinose, A., Bottenus, R. E. & Davie, E. W. 1990. Structure of transglutaminases. *J Biol Chem*, 265(23), s. 13411-4.
- Iizuka, R., Yamagishi-Shirasaki, M. & Funatsu, T. 2011. Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Anal Biochem*, 414(2), s. 173-8. doi: 10.1016/j.ab.2011.03.036.
- Jacob, F. & Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3), s. 318-356. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7).
- Klockenbusch, C., O'Hara, J. E. & Kast, J. 2012. Advancing formaldehyde cross-linking towards quantitative proteomic applications. *Anal Bioanal Chem*, 404(4), s. 1057-67. doi: 10.1007/s00216-012-6065-9.
- Koskela, E. V. & Frey, A. D. 2015. Homologous recombinatorial cloning without the creation of single-stranded ends: exonuclease and ligation-independent cloning (ELIC). *Mol Biotechnol*, 57(3), s. 233-40. doi: 10.1007/s12033-014-9817-2.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2013. *Lehninger principles of biochemistry*. 6th. utg. New York: W.H. Freeman.
- Li, C., Blencke, H.-M., Haug, T. & Stensvåg, K. 2015. Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), s. 190-197. doi: 10.1016/j.dci.2014.11.002.
- Li, C., Blencke, H.-M., Smith, L. C., Karp, M. T. & Stensvåg, K. 2010a. Two recombinant peptides, SpStrongylocins 1 and 2, from *Strongylocentrotus purpuratus*, show antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(3), s. 286-292. doi: 10.1016/j.dci.2009.10.006.
- Li, C., Haug, T., Moe, M. K., Styrvold, O. B. & Stensvåg, K. 2010b. Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea

- urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(9), s. 959-968. doi: 10.1016/j.dci.2010.04.004.
- Madigan, M. T. 2015. *Brock biology of microorganisms*. Fourteenth edition. utg. Boston: Pearson.
- Maurizi, M. R. 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia*, 48(2), s. 178-201.
- Metz, B., Kersten, G. F., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F., Timmermans, H. A., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. & Jiskoot, W. 2004. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem*, 279(8), s. 6235-43. doi: 10.1074/jbc.M310752200.
- Mihalcescu, I., Van-Melle Gateau, M., Chelli, B., Pinel, C. & Ravanat, J. L. 2015. Green autofluorescence, a double edged monitoring tool for bacterial growth and activity in micro-plates. *Phys Biol*, 12(6), s. 066016. doi: 10.1088/1478-3975/12/6/066016.
- Miyawaki, A. 2011. Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annu Rev Biochem*, 80, s. 357-73. doi: 10.1146/annurev-biochem-072909-094736.
- Muffler, K., Sana, B., Mukherjee, J. & Ulber, R. 2015. Marine Enzymes – Production & Applications. I: Kim, S.-K. (red.) *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 413-429.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 20(1), s. 87-90. doi: 10.1038/nbt0102-87.
- Narayanan, N. & Chou, C. P. 2009. Alleviation of proteolytic sensitivity to enhance recombinant lipase production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 75(16), s. 5424-7. doi: 10.1128/AEM.00740-09.
- New England BioLabs. u.å. *BL21(DE3) Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: [https://www.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli#Product%20Information\\_Related%20Products](https://www.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli#Product%20Information_Related%20Products).
- Nielsen, B. L., Willis, V. C. & Lin, C.-Y. 2007. Western blot analysis to illustrate relative control levels of the lac and ara promoters in *Escherichia coli*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35(2), s. 133-137. doi: doi:10.1002/bmb.25.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1993. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 21(22), s. 5192-5197.

- Palmer, A. E., Qin, Y., Park, J. G. & McCombs, J. E. 2011. Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends Biotechnol*, 29(3), s. 144-52. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.12.004.
- Palmer, T. 2001. *Enzymes : biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*. Serie: Horwood series in chemical science.
- Reddy Chichili, V. P., Kumar, V. & Sivaraman, J. 2013. Linkers in the structural biology of protein–protein interactions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 22(2), s. 153-167. doi: 10.1002/pro.2206.
- Scott, B. L. & Hoppe, A. D. 2015. Optimizing fluorescent protein trios for 3-Way FRET imaging of protein interactions in living cells. *Sci Rep*, 5, s. 10270. doi: 10.1038/srep10270.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. & Tsien, R. Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22(12), s. 1567-72. doi: 10.1038/nbt1037.
- Singh, R. S. 2013. A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *E. coli* K-12. *Indian J Exp Biol*, 51(11), s. 997-1003.
- SnapGene. u.å.-a. *Emerald GFP*. Tilgjengelig fra: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/fluorescent\\_protein\\_genes\\_and\\_plasmids/Emerald\\_GFP/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/fluorescent_protein_genes_and_plasmids/Emerald_GFP/).
- SnapGene. u.å.-b. *mCherry*. Tilgjengelig fra: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/fluorescent\\_protein\\_genes\\_and\\_plasmids/mCherry/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/fluorescent_protein_genes_and_plasmids/mCherry/).
- Sutherland, B. W., Toews, J. & Kast, J. 2008. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom*, 43(6), s. 699-715. doi: 10.1002/jms.1415.
- Thermo Fisher Scientific. u.å.-a. *His-tagged Proteins – Production and Purification*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/his-tagged-proteins-production-purification.html>.
- Thermo Fisher Scientific. u.å.-b. *Tm Calculator*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/brands/thermo-scientific/molecular->

[biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html](http://biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html).

Wang, G., Li, X. & Wang, Z. 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), s. D1087-D1093. doi: 10.1093/nar/gkv1278.

Wilson, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63(10), s. 3741-51.

Xu, Y., Yasin, A., Tang, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M. & Chou, C. P. 2008. Heterologous expression of lipase in *Escherichia coli* is limited by folding and disulfide bond formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(1), s. 79. doi: 10.1007/s00253-008-1644-6.



# Appendiks I

## Reagenser

| <b>Reagenser</b>  | <b>Produsent</b>                            |
|---|---|
| 3C PreScission enzyme   | GE Healthcare (Sigma-Aldrich), Chicago, USA |
| Agar  | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA               |
| Agarose   | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA               |
| BamHI (Restriksjonsenzym)   | New England Biolabs, Ipswich, USA           |
| BigDye 3.1 Terminator Kit   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| CutSmart® Buffer  | New England Biolabs, Ipswich, USA           |
| DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)                                  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| DTT   | Novagen/Merck, Darmstadt, Tyskland          |
| FastDigest Green Buffer (10X)                                       | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| Gel Loading Dye, Blue (6X)  | New England Biolabs, Ipswich, USA           |
| Gjær ekstrakt   | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA               |
| HRP subtrat, SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder                                     | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside)                                | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA               |
| Kanamycin   | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA               |
| MagicMark™ XP Western Protein Standard                              | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| MilliQ vann   | NFH, UiT, Tromsø, Norge                     |
| NaCl  | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA               |
| NEBuffer™ 3.1   | New England Biolabs, Ipswich, USA           |
| NotI (Restriksjonsenzym)  | New England Biolabs, Ipswich, USA           |
| Pepton (Trypton)  | Merck, Dramstadt, Tyskland                  |
| Phusion buffer HF (5x)  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |
| Phusion buffer GC (5x)  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA      |

|  |  |
|--|--|
| Phusion DNA polymerase                                       | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA             |
| Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA             |
| Primært antistoff, - Rabbit $\alpha$ -His                    | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA      |
| Primere  | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA                      |
| Sekundært antistoff, - Goat $\alpha$ -rabbit HRP conjugated  | EMD Millipore/Merck Millipore, Burlington, MA, USA |
| SimplyBlue™ SafeStain  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA             |
| TAE buffer (Tris base, Acetic acid, EDTA) (TAE), 1x          | NFH, UiT, Tromsø, Norge                            |
| Ultra pure H <sub>2</sub> O                                  | Biochrom GmbH (Merck), Berlin, Tyskland            |
| XbaI (Restriksjonsenzym)                                     | New England Biolabs, Ipswich, USA                  |
| XhoI (Restriksjonsenzym)                                     | New England Biolabs, Ipswich, USA                  |

### Kit med reagenser og protokoll

| <b>Kit</b>                                | <b>Produsent</b>                       |
|---|--|
| NucleoSpin Plasmid - plasmid Miniprep kit | Macherey-Nagel, Düren, Tyskland        |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit             | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| QIAquick Gel Extraction Kit               | Qiagen, Venlo, Nederland               |
| QIAprep Spin Miniprep Kit                 | Qiagen, Venlo, Nederland               |
| QIAquick PCR purification Kit             | Qiagen, Venlo, Nederland               |

## Programvarer

---

| <b>Programvare</b>     | <b>Produsent</b>                                  |
|------------------------|---|
| Carestream MI Software | Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT, USA |
| GeneSnap               | Syngene, Cambridge, England                       |
| plasmaDNA              | University of Helsinki, Finland                   |
| SnapGene               | GSL Biotech, Chicago, USA                         |
| Unipro UGENE           | Unipro LLC, Novosibirsk, Russland                 |

---

## Appendiks II

### Oppskrift for flytende og fast\* LB medium - reagenser og mengder

| Ingredienser for LB medium<br>m/kanamycin | Mengder (gram, ml, liter) |
|---|---------------------------|
| Pepton                                    | 5 g                       |
| Gjær                                      | 2,5 g                     |
| NaCl                                      | 5 g                       |
| dH <sub>2</sub> O (destillert vann)       | 500 ml                    |
| Kanamycin (50mg/ml)                       | 500 µl                    |
| <b>Totalt volum</b>                       | <b>0,5 liter</b>          |

\* For fast LB-medium ble det tilsatt 15% agar (15 g/L).

### Agarose gel elektroforese - Reagenser

| 1 % Agarosegel            |        |
|---------------------------|--------|
| Agarose                   | 0,5 g  |
| TAE buffer, 1x            | 50 ml  |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml) | 2,5 µl |

| TAE buffer, 1x, reagenser og konsentrasjoner |       |
|--|-------|
| Tris   | 40 mM |
| Acetate                                      | 20 mM |
| EDTA   | 1 mM  |

## Appendiks III

### Løsninger benyttet under restriksjonskutting

---

| <b>Reagenser for restriksjonskutting av pUC19</b> |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Templat: plasmid pUC19 (pULL01)                   | 30-42 $\mu$ l (varierende mengde) |
| Buffer (NEBuffer™ 3.1/ CutSmart)                  | 5 $\mu$ l                         |
| H <sub>2</sub> O                                  | 0-12 $\mu$ l (varierende mengde)  |
| Enzym: NotI                                       | 1,5 $\mu$ l                       |
| Enzym: BamHI                                      | 1,5 $\mu$ l                       |

---

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Totalt reaksjonsvolum | 50 $\mu$ l |
|-----------------------|------------|

---

---

| <b>Reagenser for kontrollprøver* av restriksjonskutting av pUC19</b> |                                 |
|--|---------------------------------|
| Templat: plasmid pUC19 (pULL01)                                      | 3-5 $\mu$ l (varierende mengde) |
| H <sub>2</sub> O   | 2-4 $\mu$ l (varierende mengde) |
| Buffer (NEBuffer™ 3.1/ CutSmart)                                     | 2 $\mu$ l                       |
| Enzym: NotI/ BamHI*  | 1 $\mu$ l                       |

---

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Totalt reaksjonsvolum | 10 $\mu$ l |
|-----------------------|------------|

---

\*To kontroller ble tillaget, en med enzym *NotI* og en med *BamHI*

### Restriksjonskutting for å verifisere resultat

---

| <b>Reagenser for restriksjonskutting for å verifisere resultatet etter fremstilling av pULL02</b> |            |
|---|------------|
| Templat: plasmid pULL02   | 5 $\mu$ l  |
| Buffer (FastDigest Green Buffer (10X))  | 3 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O  | 20 $\mu$ l |
| Enzym: XbaI   | 1 $\mu$ l  |
| Enzym: XhoI   | 1 $\mu$ l  |

---

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Totalt reaksjonsvolum | 30 $\mu$ l |
|-----------------------|------------|

---

## Appendiks IV

### Løsninger benyttet under PCR ved bruk av ulike DNA-polymeraser

---

| <b>Reaksjonsløsning ved bruk av Phusion DNA polymerase</b> |                           |
|--|---------------------------|
| Ultra pure H <sub>2</sub> O                                | 75 µl (varierende mengde) |
| 5x phusion buffer HF                                       | 20 µl                     |
| dNTP (25mM)  | 1 µl                      |
| F-primer (forward)   | 1 µl (varierende mengde)  |
| R-primer (reverse)   | 1 µl (varierende mengde)  |
| Templat (plasmid pULL01/pULL02)                            | 1 µl (varierende mengde)  |
| Phusion DNA polymerase                                     | 1 µl                      |

---

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Totalt reaksjonsvolum | 100 µl |
|-----------------------|--------|

---

---

| <b>Reaksjonsløsning ved bruk av Taq DNA polymerase</b> |       |
|--|-------|
| Ultra pure H <sub>2</sub> O                            | 18 µl |
| F-primer (forward) (1:10 fortykning)                   | 1 µl  |
| R-primer (reverse) (1:10 fortykning)                   | 1 µl  |
| Templat, pULL02 (1:20 fortykning)                      | 5 µl  |
| DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)                     | 25 µl |

---

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Totalt reaksjonsvolum | 50 µl |
|-----------------------|-------|

---

---

| <b>Reaksjonsløsning ved bruk av Phusion Green Hot Start DNA polymerase</b> |       |
|--|-------|
| Ultra pure H <sub>2</sub> O  | 18 µl |
| F-primer (forward) (1:10 fortykning)                                       | 1 µl  |
| R-primer (reverse) (1:10 fortykning)                                       | 1 µl  |
| Templat, pULL02 (1:20 fortykning)  | 5 µl  |
| Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (2x)               | 25 µl |

---

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Totalt reaksjonsvolum | 50 µl |
|-----------------------|-------|

---

# Appendiks V

## Buffere benyttet under affinitetsrensing

---

| <b>Vaskebuffer (50 ml) med EDTA</b> |               |
|-------------------------------------|---------------|
| NaCl (5 M)                          | 1,5 ml        |
| Tris HCl (1M)                       | 5 ml          |
| EDTA (0,5 M)*                       | 0,1 ml        |
| MilliQ H <sub>2</sub> O             | opp til 50 ml |

---

\*Vaskebuffer til bruk under His-tag rensing var uten EDTA

---

| <b>Strep-tag elution buffer – Ingredienser og konsentrasjoner<br/>(IBA Lifesciences, Göttingen, Tyskland)</b> |        |
|---|--------|
| NaCl  | 150 mM |
| Tris/HCl pH 8,0   | 150 mM |
| EDTA  | 1 mM   |
| desthiobiotin   | 2,5 mM |

---

---

| <b>His-tag elution buffer – Ingredienser og konsentrasjoner</b> |        |
|---|--------|
| NaCl  | 300 mM |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O              | 50 mM  |
| Imidazole   | 250 mM |
| (pH justert til 8,0 med NaOH)                                   |        |

---

## Appendiks VI

### Buffere benyttet under Western blot

---

| <b>1X Transfer buffer</b> |        |
|---------------------------|--------|
| 10X Transfer buffer       | 100 ml |
| MilliQ water              | 800 ml |
| Methanol                  | 100 ml |

---

---

| <b>10X TBS</b> |                             |
|----------------|-----------------------------|
| Tris base      | 24,2 g                      |
| NaCl           | 80 g                        |
| MilliQ vann    | Til 1000 ml<br>(pH til 7,6) |

---

---

| <b>Blocking buffer</b> |        |
|------------------------|--------|
| TTBS                   | 100 ml |
| Fettfri tørrmelk       | 5 g    |

---

---

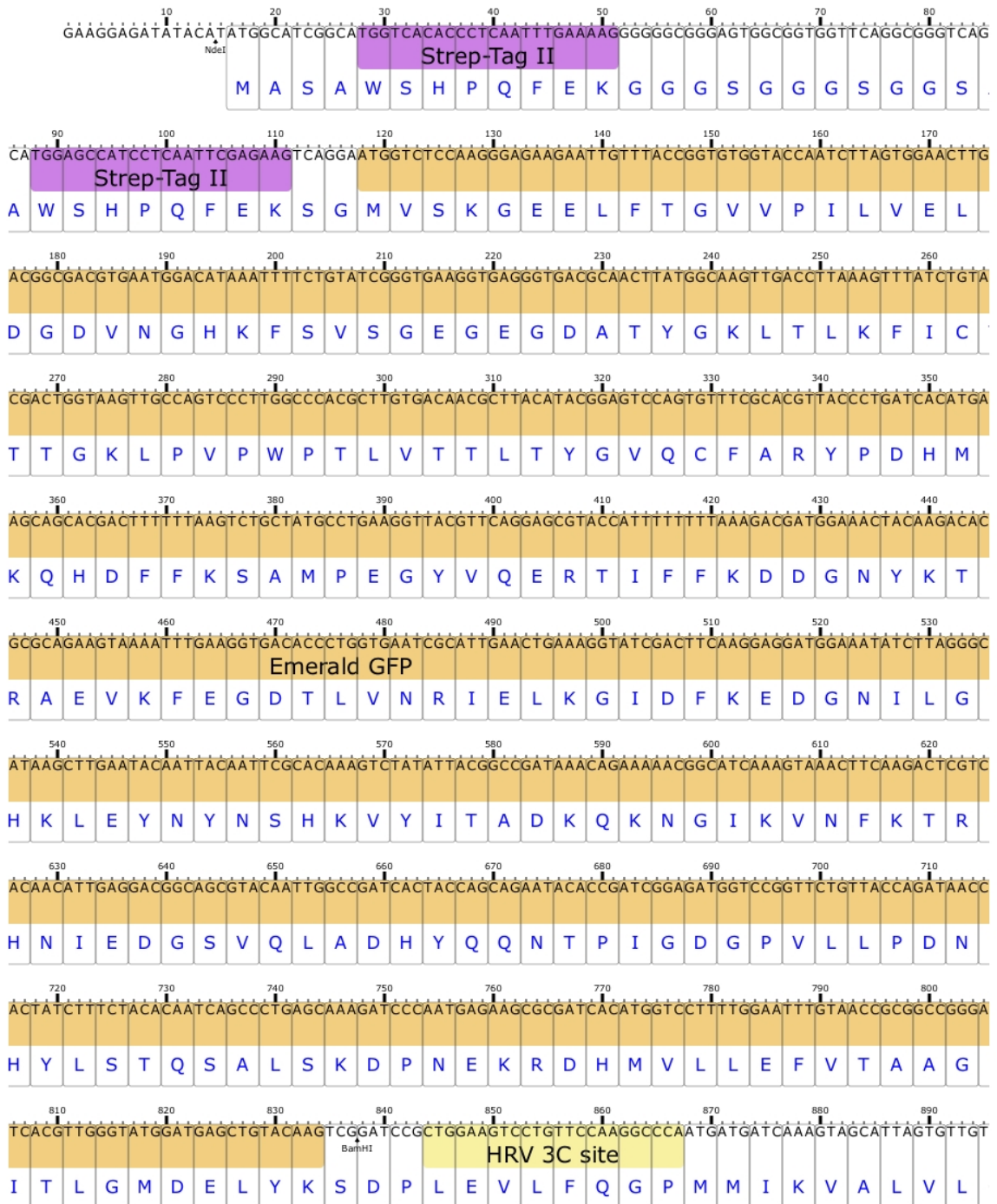
| <b>TTBS</b> |                 |
|-------------|-----------------|
| 10X TBS     | 100 ml          |
| Tween 20    | 1 ml            |
| MilliQ vann | Opp til 1 liter |

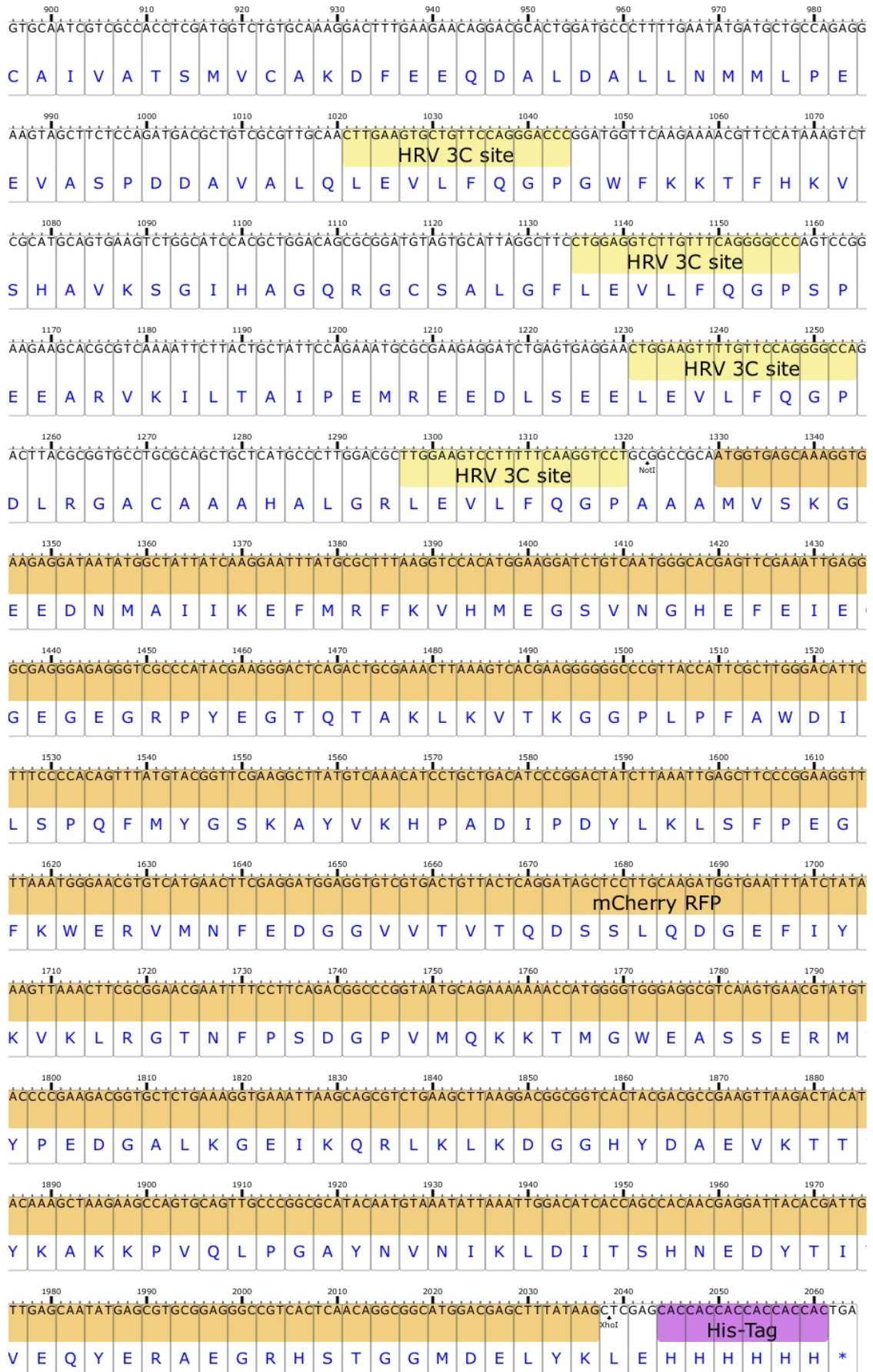
---



# Appendiks VII

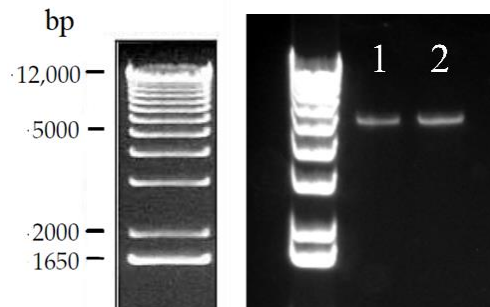
Nukleotid- og aminosyresekvens for proteinkonstruksjonen, laget i programmet plasmaDNA. Hvor øverste sekvens er nukleotidsekvens og nederste (blå bokstaver) er aminosyresekvens.



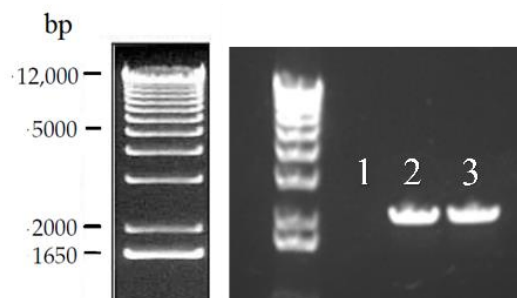


## Appendiks VIII

### Agarose gel elektroforese av pET30 vektor og PCR-generert insert



Restriksjonskuttet pET30 vektor, analysert med agarose gel elektroforese. Hvor 1 og 2 er pET30 plasmid kuttet med enzymene *XhoI* og *XbaI*, og viser DNA-fragmenter på rundt 5000 bp.



PCR-generert insert (2 og 3) analysert med agarose gel elektroforese, og viser DNA fragmenter på rundt 2000 bp.