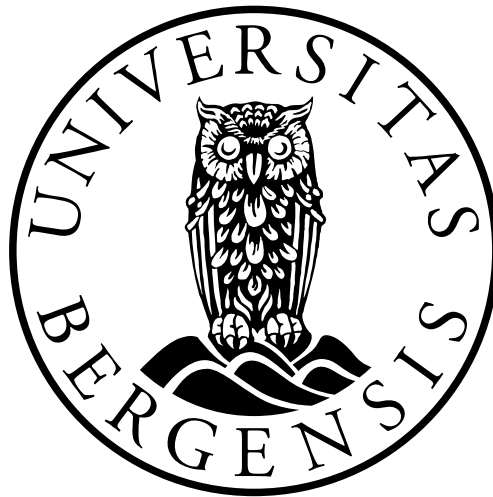


Effekt av baseutkuttingsreparasjon på 5-formyluracil-indusert mutagenese

Martha Østvoll



Masteroppgave i helsefag

Studieretning for RAB - fag

Institutt for samfunnsmedisinske fag

Det medisinsk-odontologiske fakultet

Universitetet i Bergen

Semester: 2008/2010

Høst 2010

Forord

Når jeg begynte på mastergradsstudiet ved Universitetet i Bergen bodde jeg i Stavanger, og var ikke tilknyttet noe fagmiljø som bioingeniør på det tidspunktet. I forbindelse med mastergraden tok jeg 30 studiepoeng ved Universitetet i Stavanger. Professor Svein Bjelland, som er ansatt ved UiS, presenterte sitt forskningsprosjekt på en forelesning jeg var på, og sa at det var mulighet for å ta mastergradsoppgave i det prosjektet. Det omhandlet DNA-reparasjon, og virket interessant. Samtidig så jeg muligheten for at jeg kunne gjøre min mastergradsoppgave i Stavanger. Jeg meldte min interesse hos professor Bjelland. Dermed ble han en av mine veiledere i mastergradsoppgaven, og jeg gjorde laboratorieforskningene i hans laboratorium ved Det teknisk-naturvitenskapelige fakultet, Institutt for matematikk og naturvitenskap ved UiS.

Jeg vil takke mine veiledere professor Svein Bjelland og stipendiat Åshild Lunde ved UiB. Svein for stor tålmodighet i forhold til mine mange faglige spørsmål, og Åshild for et stort engasjement i forhold til den skriftlige oppbyggingen av masteroppgaven. Jeg er sikker på, Åshild, at "øyet ofte ble stort og vått" i forbindelse med de mange gjennomlesningene. Jeg vil også takke postdoktor Kristin Grøsvik og postdoktor Ingeborg Knævelsrud i forskningsgruppen, for mange faglige innspill i forhold til teori knyttet opp til oppgaven. En spesiell takk vil jeg rette til sistnevnte for god og grundig opplæring i laboratoriearbeidet. Til slutt vil jeg takke Eivind Bjørndal i Smi Human AS for en utrettelig oppmuntring, og en uavlatelig tro på at jeg ville få mastergradsoppgaven i havn.

Sandnes, november 2010.

Martha Østvoll

INNHALDSFORTEGNELSE:

| | |
|--|-----------|
| Forord | ii |
| Sammendrag | vi |
| Summary | vii |
| 1. INNLEDNING | 1 |
| 1.1 Bakgrunn | 1 |
| 1.2 DNA-skader | 2 |
| 1.3 Reaktive oksygenderivater danner oksidative skader i DNA..... | 3 |
| 1.4 DNA-baseutkuttingsreparasjon | 7 |
| 1.5 5-Formyluracil er en mutagen DNA-skade | 10 |
| 1.6 Reparasjon av 5-formyluracil i DNA..... | 14 |
| 1.7 Kort presentasjon av prosjektet ” Mutasjonsfremming ved baseutkuttingsreparasjon antyder kreftfremmende mulighet” | 15 |
| 1.8 Hensikt og problemstilling | 16 |
| 2. MATERIALE OG METODE..... | 18 |
| 2.1 Mutagenese ved hjelp av 5-formyldeoksyridin (fdU)..... | 18 |
| 2.1.1 FORMÅL | 18 |
| 2.1.2 BAKTERIESTAMMER | 18 |
| 2.1.3 OPPDYR KING AV BAKTERIER | 18 |
| 2.1.4 MUTAGENESE AV <i>E. coli</i> VED TILSETNING AV fdU..... | 19 |
| 2.1.5 FJERNING AV MUTAGEN FRA BAKTERIENE VED HJELP AV VASKING | 21 |
| 2.1.6 DYRKING AV BAKTERIER PÅ GLUKOSES KÅLER | 21 |
| 2.1.7 DYRKING AV MUTANTER PÅ RIFAMPICINS KÅLER..... | 23 |
| 2.1.8 TELLING AV BAKTERIEKOLONIER PÅ GLUKOSES KÅLENE..... | 23 |
| 2.1.9 TELLING AV MUTANTER PÅ RIFAMPICINS KÅLENE..... | 24 |
| 2.2 Mutantanalyse | 25 |
| 2.2.1 FOREDLING AV MUTANTER | 25 |
| 2.2.2 ISOLERING AV DNA FRA <i>E. coli</i> -MUTANTENE | 25 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.3 PCR (polymerase-chain-reaction)..... | 26 |
| 2.2.4 RENSING AV PCR-PRODUKT..... | 29 |
| 2.2.5 GELELEKTROFORESE | 29 |
| 2.2.6 SEKVENSERING AV PCR-PRODUKTENE | 32 |
| 2.3 Forebygging av feilkilder..... | 32 |
| 3. RESULTATER | 33 |
| 3.1 Kvantitativ bedømmelse av vekst på glukoseplater hos villtype og <i>alkA</i> ⁻ -mutant hos <i>E. coli</i> | 33 |
| 3.2 Resultater av kolonitelling i forsøkene | 35 |
| 3.3 Resultater fra gelelektroforeseforsøkene | 77 |
| 3.4 Resultater fra DNA-sekvensering og fortolkning av mutasjoner ved hjelp av sekvenseringsdata | 81 |
| 3.4.1 FORTOLKNING AV SEKVENSERINGSDATA I FIGUR 12 | 84 |
| 3.4.2 FORTOLKNING AV SEKVENSERINGSDATA I FIGUR 13 | 85 |
| 3.5 Utrekning av mutasjonsrate | 86 |
| 3.6 Identifisering av basesubstitusjoner ved hjelp av DNA-sekvensering, og verifisering av disse ved sammenligning av mutasjonsrater i mutageneprojektet | 88 |
| 3.6.1 SAMMENLIGNING AV MUTASJONSTYPER HOS VILLTYPE OG <i>alkA</i> ⁻ -MUTANT HOS <i>E. coli</i> VED 0,2 mM fdU | 93 |
| 3.6.2 SAMMENLIGNING AV MUTASJONSTYPER HOS VILLTYPE OG <i>alkA</i> ⁻ -MUTANT HOS <i>E. coli</i> VED 0,4 mM fdU | 94 |
| 3.6.3 FORSKJELLER I BASESUBSTITUSJONSTYPER VED 0,2 mM OG 0,4 mM fdU..... | 94 |
| 3.6.4 SAMMENLIGNING AV MUTASJONSHYPPIGHET HOS BASESUBSTITUSJONER OPPSTÅTT UNDER PÅVIRKNING AV fdU MED SAMME BASESUBSTITUSJONER INDUSERT UTEN MUTAGENET | 95 |
| 3.6.4.1 SAMMENLIGNING AV BASESUBSTITUSJONER I DENNE STUDIEN MED MUTASJONSRATER VED 0,2 mM fdU OG KONTROLLMUTASJONSRATER..... | 96 |
| 3.6.4.2 SAMMENLIGNING AV BASESUBSTITUSJONER I DENNE STUDIEN MED MUTASJONSRATER VED 0,4 mM fdU OG KONTROLLMUTASJONSRATER..... | 97 |
| 3.6.4.3 SAMMENLIGNING AV SPONTANE MUTASJONER I DENNE STUDIEN MED KONTROLLMUTASJONSRATER..... | 97 |
| 3.6.5 GENERELL SAMMENLIGNING AV MUTASJONSHYPPIGHET I DENNE STUDIEN HOS VILLTYPE OG <i>alkA</i> ⁻ -MUTANTEN HOS <i>E. coli</i> UNDER PÅVIRKNING AV fdU | 98 |
| 4. DISKUSJON..... | 100 |

| | |
|--|------------|
| 4.1 Drøfting av studiens funn | 100 |
| Nedenfor vil disse resultatene bli vurdert i lys av mutageneseprosjektet generelt..... | 102 |
| 4.2 Vurdering av studiens validitet | 104 |
| 4.2.1 ESTIMERING AV BAKTERIEKONSENTRASJON UT FRA VEKST PÅ GLUKOSEPLATER..... | 104 |
| 4.2.2 VURDERING AV GYLDIGHET TIL GELELEKTROFORESEPRODUKTENE | 106 |
| 4.2.3 VURDERING AV SEKVENSERINGSDATAENE | 107 |
| 4.2.4 VURDERING AV P ₀ -METODEN..... | 107 |
| 4.2.5 VURDERING AV GYLDIGHET AV RESULTATER I STUDIEN | 108 |
| 4.3 Konklusjon..... | 109 |
| 5. FRAMTIDSPERSPEKTIVER..... | 110 |
| 6. ORDFORKLARINGER | 111 |
| 7. REFERANSER | 112 |
| 8. VEDLEGG | 116 |

Sammendrag

5-Formyluracil (fU) er en oksidering av DNA-basen tymin. Den kan induseres av reaktive oksygenderivater som oppstår endogent eller fra forskjellige eksogene agenser. Eksempler på det siste er stråling eller visse kjemikalier. Fordi fU er en modifisert utgave av tymin, baseparer den best med adenin i DNA-heliksen. Men den kan også feilbasepare med guanin. Derfor regnes den oksiderte basen som mutagen. På grunn av det er det viktig at fU blir fjernet fra arvematerialet. *In vitro*-studier har funnet at fU hovedsakelig blir reparert av baseutkuttingsreparasjonssystemet (BER). Hovedglykosylasen i BER i *E. coli* som klipper ut fU fra DNA-tråden er 3-metyladenin-DNA-glykosylase II (AlkA). Vår forskergruppe har ønsket å finne ut om det samme er tilfellet *in vivo*. Det er blitt gjort ved å eksponere villtype og *alkA*⁻-mutant hos *E. coli* overfor fU. I den forbindelse er det funnet at visse basesubstitusjoner promoterer i villtypen i forhold til mutant. Den eneste forskjellen mellom de to *E. coli*-typene er at det genet som koder for AlkA, *alkA*-genet, er intakt i villtype men defekt i mutanten. Forskningsspørsmålet har derfor blitt om AlkA i noen tilfeller kan være mutasjonsfremmende i stedet for hemmende. Dette setter i så fall kunnskaper om DNA-reparasjonssystemer i et helt nytt lys. Fordi slike systemer er ganske like i alle organismer, kan slik kunnskap gjerne også overføres til menneskekroppen.

Nøkkelord: Mutasjon, mutasjonsfiksering, AlkA, fU, 5-formyldeoksyuridin, BER, villtype-*E. coli*, *alkA*⁻-mutant hos *E. coli*, DNA-glykosylase.

Summary

5-Formyluracil (fU) is an oxidation derivative of the DNA-base thymine. It can emerge in the organism by attack of reactive oxygen species, either endogenously or exogenously. Examples of exogenous agents are irradiation or certain chemicals. Because fU is a derivative of thymine, it makes the most stable base pair with adenine. But because it also quite easily basepairs with guanine, it has been proven to be mutagenic. And therefore it is important that it is removed from the cell's DNA. *In vitro* experiments have demonstrated that the main DNA repair system to repair fU in the organism is base excision repair (BER). The main glycosylase in BER in *E. coli* to excise fU from the DNA helix is 3-methyladenine-DNA glycosylase II (AlkA). One goal for our research group has been to find out if the same happens *in vivo*. This has been done by exposing wildtype and *alkA*⁻-mutant of *E. coli* towards fU. In these experiments it turned out that certain base substitutions were promoted in the wildtype compared to the mutant. The only difference between the two strains is that the gene coding for AlkA, the *alkA*-gene, is intact in the wildtype but defect in the mutant. Because of these findings, the following research question has arisen: Does the repair enzyme AlkA under certain circumstances function more as a mutation promoter instead of a restrainer. This possible discovery sheds new light on present knowledge of DNA repair. Since DNA repair systems in different organisms have many similarities, this knowledge may be extrapolated to humans.

Keywords: Mutation, mutation fixation, AlkA, fU, 5-formyldeoxyuridine, BER, wildtype *E. coli*, *alkA*⁻-mutant of *E. coli*, DNA glycosylase.

1. INNLEDNING

1.1 Bakgrunn

Denne mastergradsstudien i helsefag ved Institutt for samfunnsmedisinske fag, omhandler oksidativ skade på DNA og reparasjon av slike skader. Den har fokus på baseskaden 5-formyluracil (fU) som kan dannes ved oksidering av DNA-basen thymin. Studien utgjør et delprosjekt i mutageneseprosjektet: "Mutasjonsfremming ved baseutkuttingsreparasjon antyder kreftfremmende mulighet", hvor professor Svein Bjelland ved UiS er prosjektansvarlig.

Man regner med at oksidasjonsskader i DNA er en vesentlig årsak til aldring (Evans, Dizdaroglu, og Cooke 2004). Blant annet skjer det en akkumulasjon av oksidasjonsprodukter med alderen, fordi man regner med at DNA-reparasjon blir mindre effektivt. Frie radikaler som fører til oksidative skader er også en direkte årsak til delesjoner i mitokondrielt DNA, og man mener at dette også bidrar til aldringsprosessen (Evans, Dizdaroglu, og Cooke 2004). Det er bred enighet om at oksidativt stress også kan føre til carcinogenese (Flere studier som viser en klar sammenheng mellom dannelse av den oksidative baseskaden 8-oksy-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) og carcinogenese er summert hos Floyd (1990)). Oksidative skader fører til mutasjoner. Dette kan aktivere proto-onkogener og inaktivere tumor-suppressor-gener, som er vekstregulerende gener, og på den måten føre til økt cellevekst. Slike mutasjonsprosesser øker også med alderen, grunnet redusert DNA-reparasjon (Evans, Dizdaroglu, og Cooke 2004). At oksidativt stress kan være en av årsakene til kreftdannelse underbygges også med at det er funnet forhøyede nivåer av oksidative DNA-skader i mange tumorer (Rossman og Goncharova 1998).

DNA-reparasjon er også av betydning for effekten av cytostatika brukt ved kreftbehandling. fU har både strukturelle og biologiske likheter med cytostatikaet 5-fluoruracil (FU) - iminoprotonet i N³ i basen til de tilsvarende nukleosidene har blant annet lignende pK_a-verdier (Privat og Sowers 1996). Nyere undersøkelser tyder dessuten på at de samme reparasjonsenzymene i humane celler er involvert både i reparasjon av fU og FU (An et al. 2007). På grunn av dette kan forskning på hvordan fU

virker på *E. coli* være en modell for hvordan fU virker i kroppen. Man kan også spørre seg om fU gjerne kan brukes som en erstatning for FU i kreftbehandling (Bjelland et al. 2001).

Det er behov for mer kunnskaper om den oksiderte basen fU. Hvilke skader den kan forårsake i kroppen. Men også som så spennig lansert for litt siden, som en mulig kreftmedisin. Derfor synes jeg prosjektet og studien er et bidrag til framtidig medisin, og kan relateres til fagområdet ved UiB, som mastergraden er knyttet til.

Prosjektet "Mutasjonsfremming ved baseutkuttingsreparasjon antyder kreftfremmende mulighet", omhandler hvilke effekter oksidering av DNA-baser har på organismen. Det er først og fremst forsket på et bakterielt system (*Escherichia coli*). Men man er også i gang med å gjøre tilsvarende undersøkelser på et mammalsk system, med tanke på å overføre kunnskapen til det humane system. Den oksiderte basen man har konsentrert seg om er fU. Flere uavhengige forskergrupper har gjort funn som tyder på at denne baseskaden initierer mutasjoner (Kasai et al. 1990; Miyabe et al. 2001; Privat og Sowers 1996; Yoshida et al. 1997; Zhang et al. 1997). Det har også vår forskergruppe funnet indikasjoner på. I tillegg har et delmål for dette prosjektet vært å finne ut hvilke DNA-reparasjonssystemer som reparerer fU. Et annet delmål har vært å finne ut om reparasjonsenzymene andre enn de man regner som hovedreparasjonsenzymene, er involvert i reparasjon og mutagenese av fU. Dette gjelder blant annet den bakterielle SOS-responsen (omtalt i Michel (2005)). Dette gjøres med real-time-PCR (polymerase-chain-reaction).

1.2 DNA-skader

Den enzymatiske kopieringen av DNA i cellen er relativt feilfri. Replikativ feillesning korrigeres av DNA-polymerasens eksonukleaseaktivitet, som raskt fjerner feil innsette nukleotider på den voksende DNA-tråden. Dette reduserer den replikative feillesningen til 1 feil per 10^9 basepar (Alberts et al. 2008).

DNA-molekylet er kjemisk ustabil og skades eller forfaller spontant i cellene på grunn av hydrolyse, oksidasjon og ikke-enzymatisk metylering. En vanlig skade er hydrolyse

av *N*-glykosylbindingen mellom basen og deoksyribose. Purinene (adenin og guanin) tapes lettest - det dannes da et abasisk sete som også kalles et apurinsk eller apyrimidinsk (AP) sete. Estimater viser at det hvert døgn tapes om lag 18 000 puriner fra DNA i humane celler. Deaminering av cytosin til uracil er en annen viktig skade som oppstår på grunn av hydrolyse. Det dannes 100 - 500 skader per døgn per human celle (Friedberg et al. 2006). Skadene på nukleotidene kan oppstå når de er inkorporert i DNA-tråden. Men skadene kan også oppstå når de er i det cellulære nukleotidbassenget. Det vil si det lageret av nukleotider som er i cellen, og som brukes til å polymerisere nye nukleinsyrer.

DNA skades også av påvirkninger utenfra, som for eksempel ultrafiolett lys, ioniserende stråling og ulike kjemiske forbindelser. Oksidasjonsskader, hvor hydroksylradikaler ($\cdot\text{OH}$) og singlet oksygen reagerer med DNA er viktige i denne sammenhengen. Det samme gjelder metyleringsskader hvor en metylgruppe tilføres ulike posisjoner på basene. Alle basene kan metyleres, inkludert tymin som har en metylgruppe (i 5'-posisjonen) fra før (Friedberg et al. 2006).

DNA-skader kan enten være cytotoxiske eller mutagene. Hvis skaden er cytotoxisk hemmes replikasjonen og/eller transkripsjonen av DNA ved at DNA- og/eller RNA-polymerase hemmes i polymeriseringen av nye nukleinsyrer. Mutagene skader gir modifikasjoner som kan føre til at basesekvensen i DNA forandres permanent. Dersom cellene skal overleve uten for høye mutasjonsfrekvenser, og dersom DNA skal kunne replikeres og transkriberes uhindret, er de derfor avhengige av effektive enzymatiske DNA-reparasjonssystemer. Til tross for dette vil DNA-strukturen bli mer skadet i løpet av sin levetid, fordi reparasjons- og korreksjonssystemene ikke er 100 % effektive.

1.3 Reaktive oksygenderivater danner oksidative skader i DNA

Alt høyere liv avhenger av oksygen, og oksiderende biprodukter fra den normale aerobe metabolisme kan forårsake skader på DNA, proteiner og cellemembran. I eukaryote celler er det mitokondriene som står for mesteparten av denne metabolismen, og i forbindelse med denne prosessen kommer en del av de oksiderende biprodukter fra disse organellene (Friedberg et al. 2006). I tillegg til

hydrolyse er angrep av reaktivt (singlet) oksygen kanskje den viktigste årsaken til spontane DNA-skader. En menneskecelles DNA får cirka 10 000 oksidative skader per døgn (Ames og Shigenaga 1993), men de fleste repareres ved hjelp av DNA-reparasjonssystemer. Det er beskrevet omtrent 80 oksidative baseskader (Bjelland og Seeberg 2003; Friedberg et al. 2006). De oksiderende biprodukter som dannes, kalles med en samlebetegnelse reaktive oksygenderivater (ROS). Dette inkluderer hydrogenperoksid (H_2O_2), superoksid ($O_2^{\cdot-}$), $\cdot OH$ og singlet oksygen (en aktivert form av O_2). En populærbetegnelse på disse er frie radikaler. Det som kjennetegner dem er at de har uparede valenselektroner - dette gjør dem veldig reaktive. ROS oppstår ikke bare intracellulært, men også som et resultat av ioniserende stråling og ultrafiolett lys fra omgivelsene. Ulike kjemiske forbindelser som blant annet inneholder arsenikk, kadmium, krom (VI), kobolt og nikkel induserer alle intracellulære ROS og oksidativ DNA-skade. Disse stoffene er også kjent for å forstyrre DNA-reparasjonsmekanismer (Filipic og Zegura 2007).

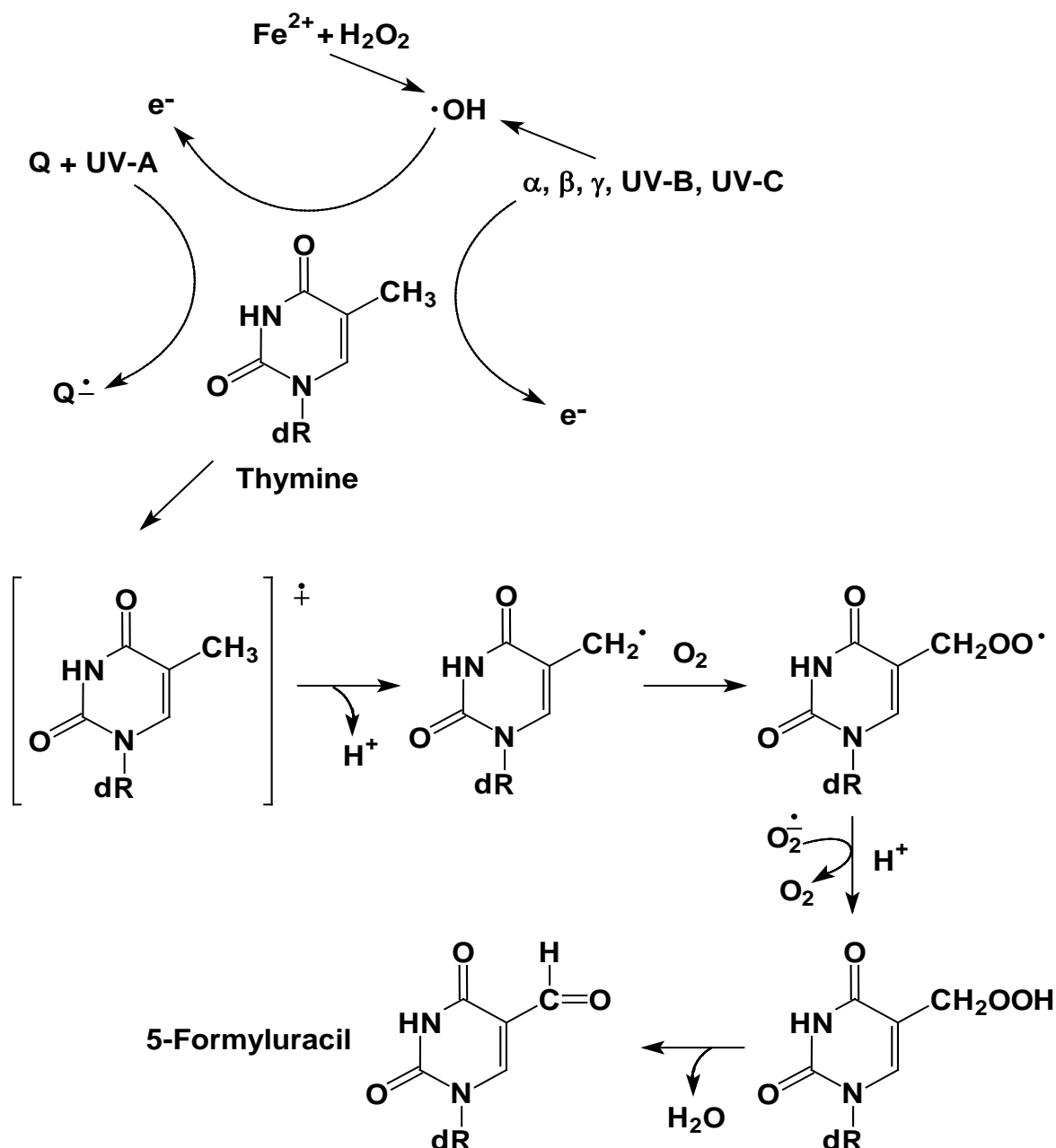
$O_2^{\cdot-}$ oppstår i elektrontransportkjeden til mitokondriene ved at et elektron overføres til molekylært oksygen. $O_2^{\cdot-}$ kan omdannes spontant og ved hjelp av enzymet superoksid-dismutase til H_2O_2 , som igjen kan uskadeliggjøres av enzymene katalase og peroksidase. Men noe H_2O_2 unnslipper den enzymatiske nedbrytningen, og vil derfor kunne danne høyreaktive $\cdot OH$ -radikaler i en prosess katalysert av metallioner, som oftest toverdige jernioner (Fe^{2+}). Eksempler på dette er Fenton-reaksjonen. $\cdot OH$ som dannes er svært reaktivt og kan blant annet skade DNA (Friedberg et al. 2006).

Ioniserende stråling har vært en kilde til naturlig forekommende fysisk skade på levende celler siden begynnelsen av den biologiske evolusjonen. Det er fordi strålingen fører til dannelse av både ROS og eksiterte og ioniserte makromolekyler, inkludert DNA. Ioniserende stråling fører ofte til radiolyse av vann i organismen (Friedberg et al. 2006). Radiolyse av vann resulterer både i $O_2^{\cdot-}$ - og $\cdot OH$ -radikaler, hvorav $\cdot OH$ -radikaler er viktigst med hensyn på DNA-skade (Friedberg et al. 2006).

ROS kan danne en mengde ulike DNA-basemodifikasjoner. En av de viktigste mutagene DNA-skadene er 8-oxoG. Dette er guanin som er oksidert i 8'-posisjonen av den dobbeltringede basen. Andre oksiderte baser, som for eksempel 5-

hydroksypyrimidiner (tymin, cytosin og uracil som er tilført oksygen eller hydroksylgrupper) kan også feilpare og medføre mutasjoner. Eksempler på slike er 5-hydroksycytosin, 5-hydroksyuracil og uracilglykol (Bjelland og Seeberg 2003; Ånensen et al. 2001).

5-formyluracil (fU) ble påvist for omkring 20 år siden ved γ -bestråling av en vandig løsning av kalvebrisse (Kasai et al. 1990). Forbindelsen er et av hovedproduktene som dannes i DNA ved ioniserende stråling, og den produseres i omtrent samme mengde som 8-oxoG og 5-hydroksymetyluracil (Kasai et al. 1990). fU er oksidert i metylgruppen i 5'-posisjonen i uracilringen. Det gjør at den aromatiske ringstrukturen er intakt. Dette er ulikt de fleste oksiderte tyminproduktene, som nettopp blir angrepet i 5,6-dobbelbindingen av den aromatiske ringen. fU dannes ved \cdot OH-abstraksjon av et hydrogen fra metylgruppen til tymin, hvor den "modifiserte" metylgruppen deretter reagerer med molekylært oksygen (se figur 1). Siden fU kan binde seg både til ribose (5-formyluridin) og deoksyribose (5-formyldeoksyuridin; fdU), vil forbindelsen kunne inkorporeres i både RNA og DNA. Foreløpig finnes det få data over de biologiske effektene av fU i DNA. Men man vet at 5-formyldeoksyuridinmonofosfat (fdUMP) som er et mellomprodukt i metabolismen av fdU inhiberer enzymet tymidylat-syntetase som er nødvendig i replikasjonsprosessen. Det er vist at en slik hemming fører til cytotoxicitet og nedsatt cellevekst (Klungland et al. 2001; Ånensen et al. 2001).



Figur 1: Mekanismer for dannelse av 5-formyluracil (fU) i DNA eller nukleotidbassenget. (Bjelland et al. 1995; 2001).

Forklarende tekst: Q = quinon, α = α -stråler, β = β -stråler, γ = γ -stråler, UV-A = UVA-stråler, UV-B = UVB-stråler, UV-C = UVC-stråler. Fe^{2+} og H_2O_2 genererer $\cdot\text{OH}$ -radikaler. Det samme gjør α -, β -, γ -, UVB- og UVC-stråling. Hydroksylradikalet som produseres da, kan fjerne et elektron fra DNA-basen tymin. UVA-strålers fotosensitiserings av quinon resulterer i et quinonradikal, som også fjerner et elektron fra tymin. Det oppstår da et

tyminradikalkation. Ved fjerning av et proton fra metylgruppen i dette går metylgruppen over til et $\text{CH}_2\cdot$ -radikal. Ved tilførsel av et oksygenmolekyl går dette radikalet over til et $\text{CH}_2\text{OO}\cdot$ -radikal. Ved tilførsel av et elektron fra superoksid og et proton går den tidligere metylgruppen i tymin over til en CH_2OOH -gruppe. Når vann spaltes av denne gruppen, er dannelsen fra tymin til fU fullført. Mekanismen for dannelse av fU fra tymin ved hjelp av UVA-strålers fotosensitisering av quinon er bare observert i enkeltrådig DNA.

1.4 DNA-baseutkuttingsreparasjon

Effektivt vedlikehold av den genetiske informasjonen er helt avgjørende for at en art skal overleve. Det er derfor sannsynlig at DNA-reparasjonsmekanismer ble utviklet tidlig under evolusjonen. DNA-skade som ikke repareres, kan føre til mutasjoner som forårsaker celledød, ødelagt vekstkontroll og økt kreftrisiko eller alvorlige syndromer (Klungland 2001).

Konseptet "DNA-excision repair", det vil si at deler av DNA-tråden med skaden blir fjernet og erstattet med nytt uskadet materiale, ble introdusert tidlig på 1960-tallet. Det er blitt gjort mange forsøk på å karakterisere de forskjellige proteinene som er involvert i denne prosessen. Fordi reparasjonsenzymene bare er til stede i lave konsentrasjoner i cellen, har man bare delvis lyktes med dette.

Baseutkuttingsreparasjonssystemet ("Base excision repair"; BER) (se figur 2), er primært utviklet for å beskytte cellene mot ødeleggende effekter av endogene DNA-skader forårsaket av hydrolyse, ROS og andre intracellulære metabolitter som endrer DNA-basestrukturen (Lindahl 1993). BER er også viktig for å reparere skader forårsaket av ioniserende stråling og eksternt tilførte alkylende stoffer, da disse i stor grad er lik skadene forårsaket av endogene faktorer (Friedberg et al. 2006).

Det første trinnet i BER katalyseres av DNA-glykosylaser (se figur 2). Disse enzymene fjerner baser som er endret eller skadd i DNA ved å kutte *N*-glykosylbindingen mellom basen og deoksyribose. Denne glykosylaseaktiviteten gir et AP-sete. Forskjellige DNA-glykosylaser fjerner ulike typer skader. Blant de viktigste er de som fjerner uracil,

alkylerte baser og oksiderte baser. Det var derfor ikke uventet at de første DNA-glykosylasene som ble delvis rensert opp var uracil-DNA-glykosylase (Lindahl et al. 1977), etterfulgt av 3-metyladenin-DNA-glykosylase I (Riazuddin og Lindahl 1978) og 3-metyladenin-DNA-glykosylase II (AlkA) (Thomas, Yang, og Goldthwait 1982), alle fra *E. coli*.

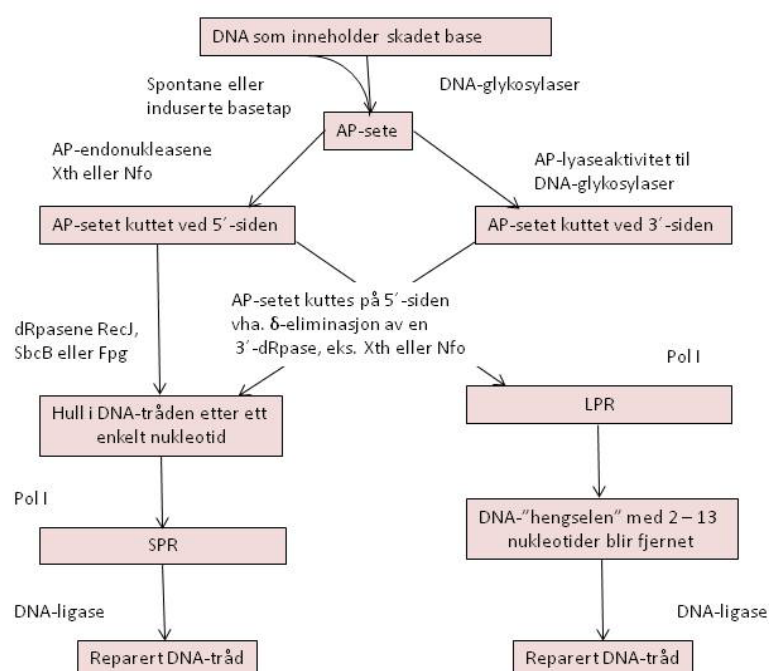
Det er kvantifisert åtte DNA-glykosylaser i *E. coli*, mens man i humane celler kjenner til elleve stykker. Noen av disse er monofunksjonelle, mens andre er bifunksjonelle. Bifunksjonelle glykosylaser har i tillegg en AP-lyaseaktivitet som noen ganger kløyver DNA-tråden mellom AP-setet og fosforatomet som er på 3'-siden av AP-setet. Dette gjøres ved hjelp av β -eliminasjon. De glykosylasene som er bifunksjonelle i *E. coli* er Fpg, Nth og Nei. AlkA er en monofunksjonell DNA-glykosylase.

Resten av trinnene i BER er uavhengige av hvilken type DNA-glykosylase som deltar i det første trinnet. I trinn to hydrolyseres fosfodiesterbindingen ved siden av det AP-setet som oppstår som et resultat av DNA-glykosylaseaktiviteten. Dette skjer ved hjelp av en AP-endonuklease (Se figur 2). Til forskjell fra AP-lyasene kutter AP-endonukleasene DNA-tråden på andre siden av AP-setet, på 5'-siden. I trinn tre fjernes sukker-fosfat-resten av en DNA-deoksyribofosfodiesterase (dRpase). I mammalske celler har polymerase (Pol) β , som er hovedpolymerasen i BER, dRpase-aktivitet. I *E. coli* er det blitt antydnet at enzymene RecJ og SbcB kan ha tilsvarende funksjon og fungere som dRpaser (Friedberg et al. 2006). I trinn fire settes korrekt nukleotid inn av en DNA-polymerase. I *E. coli* er Pol I hovedpolymerasen i BER (Friedberg et al. 2006). I trinn fem blir endelig DNA-tråden limt sammen ved hjelp av en DNA-ligase som danner en ny fosfodiesterbinding.

I BER-systemet har vi både "short-patch repair" (SPR) og "long-patch repair" (LPR). Begge BER-prosessene opptrer i både eukaryote og prokaryote organismer, men ofte ved hjelp av forskjellige proteiner (Krwawicz et al. 2007). Den mekanismen som er omtalt til nå er SPR. Her er det bare ett nukleotid som blir erstattet, og følgelig er dette den minst energikrevende prosessen. Ved LPR i *E. coli* blir 2 - 13 nukleotider byttet ut (Grøsvik 2009).

Det finnes også andre DNA-reparasjonssystemer i cellen, som for eksempel nukleotidutkuttings-reparasjonssystemet ("Nucleotide Excision Repair"; NER) og "Mismatch Repair"-systemet (MMR).

Feil i NER eller MMR kan disponere for kreft, men man har ikke funnet at det gjelder i like stor grad for BER (Klungland 2001). Imidlertid kan mutasjoner i *MYH*-genet i mennesker forårsake colorektalcancer (Friedberg et al. 2006). *MYH*-genet koder for en DNA-glykosylase som er homolog til *E. coli* MutY.



Figur 2: Baseutkuttingsreparasjonssystemet; BER i *E. coli*. Etter Friedberg et al. (2006) og Krokan, Standal og Slupphaug (1997).

Forklarende tekst: dRpase = DNA-deoksyribofosfodiesterase, Pol I = DNA-polymerase I, SPR = "short-patch repair", LPR = "long-patch repair". En DNA-glykosylase kutter ut en skadet base fra DNA-tråden. Det oppstår et AP-sete. Hvis en bifunksjonell glykosylase er involvert (høyre side av figuren), og de bruker sin AP-lyaseaktivitet, blir det et kutt 3' for AP-setet. Sukker-fosfat-resten som oppstår da kuttet ut av DNA-tråden av AP-endonukleasene Xth eller Nfo. De fungerer da som 3'-dRpaser, og reaksjonen går over på venstre siden igjen. Hvis BER ikke går "omveien" om en bifunksjonell glykosylase,

lager de samme AP-endonukleasene et kutt i DNA-tråden 5' for AP-setet. dRpasene som er involvert i *E. coli* i denne BER-veien, er RecJ, SbcB og muligens DNA-glykosylasen Fpg. Ved begge "rutene" oppstår det et hull i DNA-tråden der nukleotidet med den skadde basen har vært. Ved SPR erstatter *E. coli* Pol I det fjernede nukleotidet. Det oppstår et lite hakk 3' for det nye nukleotidet. DNA-ligase limer igjen det hakket, og DNA-tråden der den skadde basen har vært, er reparert. Når AP-endonuklease er den første som lager kutt i DNA-tråden etter at et AP-sete har oppstått (til forskjell fra kutt fra bifunksjonelle glykosylaser), velger cellen av og til LPR. I forbindelse med dRpase-aktivitet her, eller muligens Pol I-aktivitet, fjernes et 2 - 13 nukleotider stort segment. Pol I polymeriserer også her nye nukleotider, og DNA-ligase er involvert til slutt ved å sammenføre det nye segmentet i den reparerte DNA-tråden.

1.5 5-Formyluracil er en mutagen DNA-skade

Eksperimenter gjort med *E. coli* DNA-polymerase I Klenow fragment (Poll Kf) som mangler 3' → 5'-eksonukleaseaktivitet, har indikert at fU er en ganske svak blokkeringskade, men det er rapportert at den kan forsinke replikasjon (Bjelland og Seeberg 2003). Imidlertid er den først og fremst definert som en mutagen skade på grunn av dens mangesidige baseparingsegenskaper (Bjelland og Seeberg 2003).

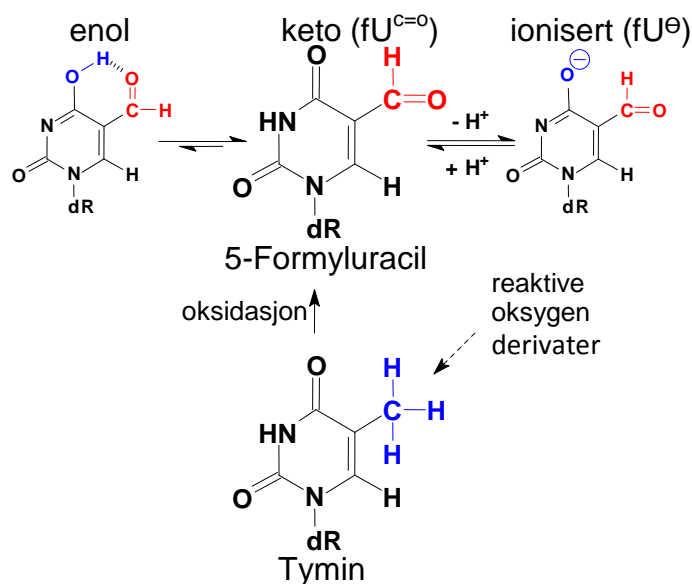
Ånensen et al. (2001) har vist at fU kan føre til alle basesubstitusjoner i *E. coli*, bortsett fra G·C → C·G-transversjonen. A·T → G·C, G·C → A·T og G·C → T·A var mye hyppigere enn A·T → T·A og A·T → C·G. Men et annet *in vivo* forsøk med *E. coli* (Fujikawa, Kamiya, og Kasai 1998) fant derimot bare at de tre første basesubstitusjonene nevnt ovenfor ble induert ved tilsetting av 5-formyldeoksyuridintrifosfat (fdUTP). Knævelsrud et al. (2009) viste at fU i mammalske celler også hadde mangesidige baseparingsevner. Her var de hyppigste basesubstitusjonene A·T → T·A og A·T → C·G. Det er også vist at fU kan induere tap eller tilførsel av TGGC-baserepetisjoner (Fujikawa, Kamiya, og Kasai 1998). Forsøk Klungland med medarbeidere (2001) har gjort med kinesiske hamsterfibroblastceller (CHF) indikerer at fdU er mer mutagen enn fU. Dette kan ha med at fdU er nærmere den metabolske veien til fdUTP, det vil si i større grad blir inkorporert i DNA. Klungland et al. (2001) fant også ut at fU er mer mutagen i

mammalske celler enn i bakterieceller. Det gjorde de ved å sammenligne mutantfrekvensen forårsaket av fdU i CHF-celler i forsøkene sine med mutantfrekvenser i *E. coli* hos Ånensen et al. (2001) og Fujikawa, Kamiya og Kasai (1998) med samme mutagen tilsatt (henholdsvis fdU og fdUTP).

Formylgruppen i 5'-posisjonen til uracil forandrer elektrontettheten til den aromatiske ringstrukturen slik at fU veksler mellom en pH-uavhengig keto- og enolform i cellen (se figur 3). Formylgruppen er elektrontiltrekkende overfor uracilringen. Dette gir et surere N³-hydrogen. Tilsvarende er halogener innsatt i samme posisjonen i uracilringen også elektrontiltrekkende. Eksempler på dette er brom og fluor som gir 5-bromuracil og FU. Likevekten er forskjøvet mot ketoformen. Ketoformen kan imidlertid gå over i en ionisert tilstand - tilstedeværelsen av denne øker proporsjonalt med økende pH. pK_a-verdien til N³-hydrogenet til halodeoksyridinene og fdU har blitt målt til å være omtrent 8. Det betyr at disse stoffene hovedsakelig er ionisert ved fysiologisk pH (Privat og Sowers 1996). Disse egenskapene ved fU-derivatet gjør at det sannsynligvis har en mangesidig baseparingsnatur (Ånensen et al. 2001). Zhang et al. (1997) har også vist at fU innsatt i en templattråd *in vitro* kan basepare med deoksyribocytosinmonofosfat.

Røntgenkrystallografiske eksperimenter av DNA-oligomerer med fU innsatt et spesielt sted har vist at det er ketoformen av fU som binder seg til adenin (se figur 4). Den oppfører seg som tymin, danner dermed to hydrogenbindinger til adenin og lager et "regulært" Watson-Crick-basepar (Bjelland og Seeberg 2003; Tsunoda et al. 2001). Fordi den danner et likt basepar (Watson-Crick-basepar) som tyminen den er avledet fra, er dette det mest stabile baseparet fU danner i DNA-heliksen. Det er også vist med røntgenkrystallografiske analyser, at det er den ioniserte formen som baseparer med guanin, også her med to hydrogenbindinger (se figur 4) (Bjelland og Seeberg 2003; Tsunoda et al. 2001). Dette kan forklare den molekylære basisen for A·T → G·C og G·C → A·T-transisjoner forårsaket av fU. Ved en slik baseparing mellom fU og guanin, blir det en elektrostatisk frastøtning mellom to oksygenatomer i de to molekylene. Dette kan muligens motvirkes med tilstedeværelsen av et vannmolekyl mellom de to sistnevnte atomene. Fordi vannmolekyler er en integrert del av DNA kan dette være en sannsynlig forklaring (Bjelland et al. 2001). Ånensen et al. (2001) fant som sagt

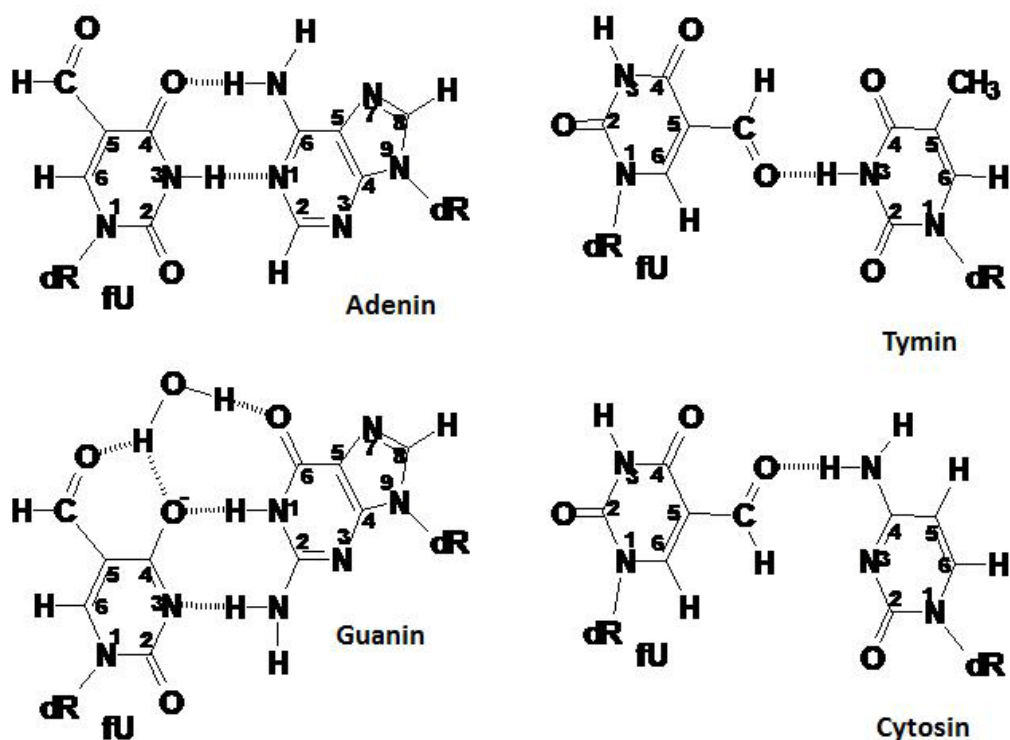
indikasjoner på at fU kan basepare med alle nukleobasene. En annen studie i vår forskergruppe (Grøsvik 2009), underbygget disse funnene med fUs baseparingsevne med adenin, guanin og cytosin, men ikke tymin. I Knævelsrud et al. (2009) sin studie i vår forskergruppe, er de nyeste modellene for fUs baseparing med de fire nukleobasene vist (se figur 4). Man tenker seg at det også er ketoformen av fU som danner basepar med tymin og cytosin, som med adenin (Kamiya et al. 2002). fUs binding til tymin og cytosin er ikke demonstrert ved røntgenkrystallografiske analyser.



Figur 3: Tymins overgang til 5-formyluracil (fU) og de tre forskjellige formene av fU. (Ånensen et al. 2001). dR = deoksyribose. Stiplet linje = hydrogenbinding.

Forklarende tekst: Når metylgruppen til tymin blir angrepet av reaktive oksygenderivater går tymin over til fU. fU foreligger i tre former *in vivo*. Den vanligste er ketoformen som er pH-uavhengig. På grunn av at formylgruppen (aldehyd) til fU gjør uracilringen mer elektronfattig (N³-hydrogenet blir mer surt), fluktuerer ketoformen med en enolform, hvorav ketoformen dominerer. ”Forklarende tekst”: Ved enolformen flyttes N³-hydrogenet over til 4’-posisjonen av molekylet. Det oppstår en dobbeltbinding mellom N³ og C⁴, og dobbeltbindingen til oksygenet i 4’-posisjonen

forsvinner. Hydrogenet som nå er overført til O^4 , danner en hydrogenbinding til oksygenet i formylgruppen. Ved økende pH oppstår den ioniserte formen. fU mister da N^3 -hydrogenet og oksygenatomet i 4'-posisjonen får negativ ladning. Det kommer også her en dobbeltbinding mellom N^3 og C^4 , og dobbeltbindingen til oksygenet i 4'-posisjonen på fU oppheves. Selv om denne formen øker ved økende pH (det tilsvarende deoksyribonukleosidet er ionisert ved pH 8 (Privat og Sowers 1996)), veksler også denne formen med ketoformen.



Figur 4: 5-Formyluracils (fU) baseparing med adenin og guanin demonstrert ved røntgenkristallografiske analyser, og foreslåtte baseparing med tymin og cytosin.

(Knævelsrud et al. 2009). "Forklarende tekst": Stiplede linjer = hydrogenbindinger. dR = deoksyribose. fU baseparer lettest med adenin og guanin. Med adenin baseparer den på samme måte som tymin (Watson-Crick basepar). Det er ketoformen av fU som danner denne typen basepar til adenin. Det blir da én hydrogenbinding mellom N^1 i

adenin og N³-hydrogenet i fU, og én hydrogenbinding mellom aminogruppen i posisjon 6' på adenin og O⁴ i fU. Dette er fUs mest stabile basepar. Guanin baseparer med den ioniserte formen av fU, også her med to hydrogenbindinger. Det dannes da én hydrogenbinding mellom aminogruppen i posisjon 2' på guanin og N³ i fU. Den andre hydrogenbindingen er mellom hydrogenet i N¹ på guanin og det ioniserte oksygenet i posisjon 4' på fU. Disse baseparingene er vist med røntgenkrystallografiske eksperimenter (Tsunoda et al. 2001). Man tenker seg at et vannmolekyl kan være involvert i den siste baseparingen, som en stabilisator (se tekst). Det binder seg et vannmolekyl med én hydrogenbinding til O⁶ på guanin. Det andre hydrogenet i vannmolekylet binder seg til det ioniserte oksygenet i posisjon 4' på fU og oksygenet i formylgruppen til fU. I forbindelse med at man i dette prosjektet har funnet indikasjoner på at fU har evne til å basepare med alle DNA-basene, har man kommet fram til modeller for hvordan fU kan basepare med tymin og cytosin (Kamiya et al. 2002). Det er én hydrogenbinding som konjugerer disse basene. Ved tymin er hydrogenbindingen mellom N³ og oksygenet i formylgruppen til fU. Ved cytosin dannes en hydrogenbinding mellom N⁴ og oksygenet i formylgruppen til fU.

1.6 Reparasjon av 5-formyluracil i DNA

Bjelland og medarbeidere (1994) gjorde en interessant oppdagelse, når de fant ut at en DNA-glykosylase i *E. coli* som vanligvis klipper ut alkylerte baser, også hadde aktivitet overfor fU *in vitro*. Dette var AlkA-DNA-glykosylasen.

AlkA-proteinet sin molekylvekt er 31 kilodalton (kDa) og består av 282 aminosyrer. Det er medlem av helix-hairpin-helix-superfamilien. Strukturen til AlkA ligner DNA-glykosylasene MutY og Nth, men det mangler en jern-svovel-enhet. Hovedsubstratet som det jobber med er 3-metyladenin, men det katalyserer også utklippingen av 3-metylguanin, 7-metylguanin, 7-metyladenin, 1,N⁶-etenoadenin, O²-metyltymine og O²-metylcytosin fra alkylert DNA. Grunnen til at slike enzymer kjenner igjen så mange alkylerte modifikasjoner kan skyldes en spesiell gjenkjenning av den positive ladningen til de elektron-manglende alkylerte basene (Friedberg et al. 2006). Den før omtalte elektrontiltrekkende formylgruppen i fU gjør også den aromatiske ringen mer positivt

ladet. Denne felles egenskapen hos fU og alkylerte baser gjør den *N*-glykosyliske bindingen til deoksyribose mer ustabil som favoriserer kutting med AlkA (Masaoka et al. 1999a; O'Brien og Ellenberger 2004).

Det er i tillegg vist at *E. coli* Mug fjerner fU i DNA-tråden når den er overfor guanin, selv om Mug's hovedaktivitet er overfor deaminerte cytosiner. Dette er også tilfellet for *M. thermoautotrophicum* Mig. I tillegg fjerner *E. coli* DNA-glykosylasene Nth, Fgp og Nei fU fra DNA, men ikke så effektivt som AlkA. fU·G-baseparet kjennes også igjen av *E. coli* MutS, noe som antyder at fU gjerne kan bli reparert av MMR (Bjelland og Seeberg 2003).

Den humane varianten av AlkA, *N*-alkylpurin-glykosylase fjerner ikke fU fra DNA (Lu et al. 2001). Hovedglykosylasen som klipper ut fU i mammalske celler er derimot SMUG1-DNA-glykosylase (hSMUG1) (Bjelland og Seeberg 2003; Knævelsrud et al. 2009). Dette enzymet klipper ut fU mest effektivt overfor tymin og cytosin, fulgt av guanin og adenin. hSMUG1 kutter også ut fU i enkeltrådig DNA. Det er også demonstrert at det humane NER fjerner fU fra DNA, men ikke overfor adenin (Knævelsrud et al. 2009).

Det er alminnelig akseptert at man tror den skadede basen i DNA-heliksen blir vippt ut for å bli tilgjengelig for det aktive setet til DNA-glykosylasene. Forsøk gjort med AlkA og hSMUG1 indikerer at fU passer godt inn i det aktive setet til enzymene (Grøsvik 2009; Knævelsrud et al. 2009).

1.7 Kort presentasjon av prosjektet " Mutasjonsfremming ved baseutkuttingsreparasjon antyder kreftfremmende mulighet"

Prosjektet har sitt hovedsete ved UiS, men involverer samarbeidspartnere med institusjoner både i Norge og utlandet. En kan nevne NTNU, UiO og Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF i Norge, og institusjoner i Frankrike og Japan i utlandet. Det har blitt finansiert både av Den Norske Kreftforening og Research Council of Norway.

Siden det i vår forskergruppe er funnet at AlkA *in vitro* blant annet reparerer fU i DNA-tråden (Bjelland et al. 1994), har man ønsket å studere om dette hadde konsekvenser *in vivo*. Det er gjort ved å indusere mutasjoner forårsaket av fdU i *E.coli*. fdU har da blitt tilsatt kultur av *E. coli* i eksponentiell vekstfase (Ånensen et al. 2001), og man mener mutasjonsdannelsen kan skje ved at fU inkorporeres i DNA via anabolsk omdannelse av fdU til det tilsvarende fdUTP (Klungland et al. 2001). Slike forsøk er i liten grad gjort av andre forskergrupper. Det har også vært et mål for prosjektet å karakterisere basesubstitusjonene forårsaket av fU. Forsøkene er utført med fdU-konsentrasjoner fra 0,05 mM opp til 0,40 mM. Relativ vekst og antall muterte celler som fører til resistens av antibiotikumet rifampicin (Rif^R) ble tellet, både med og uten fdU tilsatt i vekstmediet. For å finne ut hvilke baser som ble substituert av fU ble Rif^R-regionen i *rpoB*-genet i de muterte koloniene amplifisert ved hjelp av PCR, og det ble foretatt DNA-sekvensering av regionen. Ved hjelp av sekvenseringen kan mutasjonstyper og hyppighet av mutasjoner/basesubstitusjoner induisert av fdU detekteres og bestemmes. Vår forskergruppe har tidligere gjort funn som tyder på at DNA-reparasjonsenzymet AlkA kan ha en tosidig rolle gjennom å ha både en reparasjons- og mutasjonsfunksjon (Ånensen 2002). Dette er bakgrunnen for tittelen til prosjektet.

Det at vi har gjort funn som tyder på at reparasjon av denne baseskaden også kan initiere mutasjoner kan være med å kaste nytt lys over DNA-reparasjonsveier. Dette er som sagt relevant for kreftforskning.

1.8 Hensikt og problemstilling

Som før nevnt, så har vår forskergruppe funnet indikasjoner på en dobbeltfunksjon for DNA-glykosylasen AlkA. Både at den fungerer som et ordinært reparasjonsenzym, i tillegg til at den gjerne har mutasjonspromoterende egenskaper. Hensikten med studien er å få mer kunnskaper om dette. Dette er nødvendig, fordi det trengs flere forsøk for å styrke denne teorien.

I overensstemmelse med hensikten, har studien følgende problemstilling:

Innledning

Induserer fdU ulike mutasjoner og mutasjonsrater hos villtype og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli*?

I samsvar med studiens problemstilling, søker studien å realisere følgende målsettinger:

1.

Sammenligne mutasjoner og mutasjonsrater hos villtype og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* ved tilsetning av 0,2 mM fdU.

2.

Sammenligne mutasjoner og mutasjonsrater hos villtype og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* ved tilsetning av 0,4 mM fdU.

2. MATERIALE OG METODE

2.1 Mutagenese ved hjelp av 5-formyldeoksyuridin (fdU)

2.1.1 FORMÅL

Eksperimentene våre gikk ut på å behandle bakteriestammer med det oksiderte deoksyribonukleosidet 5-formyldeoksyuridin (fdU), for å kartlegge graden av mutasjon det induerte og detektere hvilke basesubstitusjoner stoffet eventuelt forårsaket. Den tilsvarende oksiderte DNA-basen til fdU, 5-formyluracil (fU), er som sagt kjent for å indusere mutasjoner (Kasai et al. 1990; Miyabe et al. 2001; Privat og Sowers 1996; Yoshida et al. 1997; Zhang et al. 1997). Disse mutasjonene kunne kartlegges ved hjelp av PCR og DNA-sekvensering.

2.1.2 BAKTERIESTAMMER

Det ble tatt utgangspunkt i to bakteriestammer som er derivater av *E. coli* K-12:

1. AB1157 (villtype; F^- thi^- thr^- leu^- pro^- arg^- his^- lac^- gal^- xyl^- mtl^- ara^- str^R $sup-37$)
2. MS23 ($alkA^-$).

MS23 er lik AB1157 med unntak av at den ved hjelp av bakteriofag P1 er manipulert til å ha egenskapene his^+ og $alkA^-$ i stedet (Seeberg og Strike 1976; Yamamoto et al. 1978).

2.1.3 OPPDYRNING AV BAKTERIER

Først ble det laget bakteriekulturer for å få bakterier fra originalskålene (stock-plate) til å formere seg. For å ha forholdsvis ferske bakterier fra de to *E. coli*-stammene det ble jobbet med, ble bakterier fra originalskålene sådd om på nye skåler hver 14. dag. Som stock-plater ble det benyttet næringsrike LA-skåler¹. I en bakteriekultur får bakteriene lov til å vokse i et flytende medium som inneholder alle stoffene de trenger for vekst (minimalt A-medium^{2 3 4 5 6 7 8 9} ble brukt som flytende medium i våre forsøk). Én

¹ LA-skåler: Enten 25 g LB-Broth (Miller) + 12 g agar-agar eller 37 g LB-agar (Miller) ble løst i 1 l destillert H₂O (dH₂O) og autoklavert.

² Minimalt A-medium (flytende): 20 ml 10 x A-buffer, 0,2 ml 1,00 M MgSO₄ x 6H₂O, 2 ml 20 % glukose, 2 ml aminosyrer (4 mg/ml) og 0,2 ml vitamin B₁ (5 mg/ml) ble løst i 200 ml dH₂O og fordelt på småflasker (10 - 20 ml per flaske). Flaskene ble autoklavert.

³ 10 x A-buffer: 105 g K₂HPO₄ (Mw 174,18 u), 45 g KH₂PO₄ (Mw 136,09 u), 10 g (NH₄)₂SO₄ (Mw 132,1 u) og 5 g C₆H₅N₃O₇ x 2H₂O (Mw 294,1 u) ble løst i 1 l dH₂O og autoklavert.

⁴ 1,00 M MgSO₄ x 6H₂O: 22,85 g MgSO₄ x 6H₂O (Mw 228,46 u) ble løst i 100 ml dH₂O og autoklavert. I siste halvdel av studien ble imidlertid MgSO₄ x 6H₂O skiftet ut med MgSO₄ x 7H₂O. Til å lage 1,00 M

bakteriekoloni hver fra originalskålen til den *E. coli*-typen vi ønsket å jobbe med (villtype (AB1157) -*E. coli* eller *alkA*⁻ (MS23)) ble løst i tre rør (overnattskultur A, B og C) med 2 ml minimalt A-medium. For å kontrollere at de tre rørene ikke inneholdt andre bakterier enn de fra koloniene, ble det også tatt med et kontrollrør med bare 2 ml minimalt A-medium. A-mediet er sterilt. Rørene er også autoklavert. Så hvis det ikke er kommet uvedkommende bakterier i rørene i denne operasjonen, skal det ikke komme bakterievekst i kontrollrøret ved inkubasjon. Kulturene ble inkubert ved 37 °C over natt, i risteinkubator¹⁰ ved 240 rpm.

2.1.4 MUTAGENESE AV *E. coli* VED TILSETNING AV fdU

For å beregne antall bakterier per ml målte vi optisk tetthet (optical density; OD) i overnattskulturen ved 600 nm med et spektrofotometer¹¹. OD er det samme som absorbans. Absorbans er et uttrykk for hvor mye innfallende lys en løsning absorberer, og er direkte proporsjonal til konsentrasjonen av stoffene i løsningen. Desto mer bakterievekst det ble i kulturene våre ved inkubering, desto mer blakkede ble de, og jo høyere ble den målte OD. Det ble observert best vekst når OD hadde en verdi på 0,4 - 0,8 A. Bakteriene var da i en eksponentiell vekstfase. Overnattskulturer der OD var i det området ble viderebehandlet. Men det var ønskelig med så høy OD som mulig opp mot det optimale (OD = 0,8 A), fordi det da var mindre risiko for manglende bakterievekst på skålene bakterieløsningene ble sådd ut på. Når det ble gått videre med mer enn én overnattskultur, praktiserte vi også å velge rør med omtrent samme OD-verdi. Det var for lettvinthetsskyld, fordi den videre fortynningen av kulturene etterpå kunne gjøres noenlunde likt da. Overnattskulturen(e) det ble gått videre med, ble fortynnet med 1 x A-buffer¹² til cirka 100 000 bakterier per ml. Det er kjent at OD = 1 A tilsvarer cirka 5×10^8 bakterier per ml. Det brukte vi som hjelpemiddel i

MgSO₄ x 7H₂O brukte vi en tiendedel av molekylvekten til dette stoffet i gram, som ble gjort når vi laget 1,00 M MgSO₄ x 6H₂O (se forholdet mellom gram tilsatt MgSO₄ x 6H₂O i forhold til stoffets molekylvekt).

⁵ 20 % Glukose (w/v): 40 g glukose (Mw 180,16 u) ble løst i 200 ml dH₂O og autoklavert.

⁶ 4 mg/ml L-aminosyrer: 1 g L-Treonin (Mw 119,1 u), 1 g L-Arginin (Mw 210,7 u), 1 g L-Prolin (Mw 115,1 u), 1 g L-Leucin (Mw 131,2 u) og 1 g L-Histidin (Mw 209,6 u) ble løst i 250 ml dH₂O og autoklavert.

⁷ 5 mg/ml vitamin B₁ (Mw 337,27 u): 0,125 g vitamin B₁ ble løst i 25 ml dH₂O og autoklavert.

⁸ Magnet/varmeplate til oppløsning av reagenssalter: VWR International VMS - A, Oslo.

⁹ Vekt: Sartorius AG, Goettingen.

¹⁰ Risteinkubator: New Brunswick Scientific C 25, Incubator shaker classic series, Edison, NJ - USA.

¹¹ Spektrofotometer: Analytik jena SPECORD 200.

¹² 1 x A-buffer: 1 del 10 x A-buffer ble fortynnet i 9 deler dH₂O og autoklavert.

utregningene våre. Først ble det laget en 1:100-fortynning av bakteriekulturen(e) som det var målt OD på. For å få antall μl av 1:100-bakteriefortynningen som gir 1 000 μl av bakterieløsning med konsentrasjonen 100 000 bakterier per ml, ble følgende formel brukt: $1\,000 / (\text{OD} \times 50)$. Denne formelen ble utarbeidet ved tidligere forsøk i forskningsprosjektet. Dette volumet ble fortynnet opp til 1 000 μl med 1 x A-buffer. Hvis vi for eksempel har en $\text{OD} = 0,8$ A, blir utregningen slik:
 $1\,000 / (0,8 \times 50) = 25 \mu\text{l}$ av 1:100-fortynningen av bakterier. Fortynning av dette volumet til 1 000 μl , gir bakteriekonsentrasjonen 100 000 *E. coli*-bakterier per ml.

585 μl av den fortynnede overnattskulturen (100 000 bakterier per ml) ble overført til et rør med 13 ml minimalt A-medium. Denne *E. coli*-fortynningen som nå framkommer er prosedyre etter Cupples og Miller (1989). Dette bakterieforholdet er funnet å være gunstig i mutageneseforsøk. Røret(ene) med minimalt A-medium ble inkubert ved 37 °C i 2 timer i risteinkubator ved 240 rpm. Dette ble gjort for å få bakteriene til å livne litt til igjen, etter at de hadde blitt fortynnet i et medium uten næring (1 x A-buffer). Innholdet i dette røret ble så fordelt i seks reagensrør (2 ml per rør). Det ble tilsatt 10 mM fdU-løsning¹³ til fem rør. Rør seks ble ikke tilsatt fdU-løsning, og fungerte som kontrollrør. Vi fikk tilsendt fdU fra professor Akira Matsuda, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan. Formålet med å tilsette fdU til bakteriene var å sammenligne mutagenisitet hos de to *E. coli*-bakterietypene som ble brukt utsatt for dette mutagenet. Imidlertid måtte det også sammenlignes med mutasjonshypighet med bakterier vokst uten fdU-tilsetning (*E. coli*-kontroller). Det var fordi *E. coli* også dannet mutasjoner naturlig, uten påvirkning av noen mutasjonsfremmere. *E. coli*-kontrollene fungerte da som referanseverdi for mutasjonene. Volum tilsatt 10 mM fdU varierte, alt etter hvilken sluttkonsentrasjon av fdU som var ønskelig. Det er bestemt i mutageneseprosjektet å ha minst 60 mutasjoner hver i de to *E. coli*-typene uten tilsatt mutagen, i tillegg til ved konsentrasjonene 0,1, 0,2 og 0,4 mM fdU. Ved starten av denne studien, manglet det flest mutasjoner ved 0,2 og 0,4 mM fdU. Derfor konsentrerte vi forsøkene bare om disse siste fdU-konsentrasjonene. Når det ble brukt 0,2 mM fdU i forsøkene, tilsvarte

¹³ 10 mM 5-Formyldeoksyuridin (fdU; Mw 256,18 u): 0,026 g fdU ble løst i 10 ml dH₂O og sterilfiltrert (filter; 0,22 μm). Løsningen ble oppbevart ved - 20 °C.

det 40 µl av 10 mM fdU per mutageneserør. En konsentrasjon på 0,4 mM fdU trengte da 80 µl av 10 mM fdU-løsningen i røret. Mutagenesekulturene ble inkubert ved 37 °C i cirka 2 døgn i risteinkubator ved 240 rpm.

2.1.5 FJERNING AV MUTAGEN FRA BAKTERIENE VED HJELP AV VASKING

For å fjerne fdU som bakteriene hadde blitt inkubert med, og dermed stoppe mutageneseprosessen, ble det utført en vaskeprosedyre: Reagensrørene med mutagenesekulturene ble satt på is. Vi vortekset¹⁴ rørene for å resuspendere bakteriene, og fordelte innholdet i hvert rør likt i to eppendorfrør. Eventuelt overskytende innhold fra bakterieløsningene etter helling i eppendorfrørene, ble tatt ut med pipette. Eppendorfrørene ble sentrifugert¹⁵ ved 5 000 rpm og 4 °C i 4 min. Vi fjernet supernatanten, og bakteriene ble igjen resuspendert i 1 ml 1 x A-buffer. De ble i denne omgangen også sentrifugert ved 5 000 rpm og 4 °C i 4 min. Supernatanten ble igjen fjernet og bakteriene ble resuspendert i 0,5 ml 1 x A-buffer. Til slutt ble eppendorfrørene tilhørende samme bakteriekultur blandet.

2.1.6 DYRKING AV BAKTERIER PÅ GLUKOSESKÅLER

Vi strøk ut hver av de vaskede bakterieløsningene fra forrige punkt (se 2.1.5) på fem glukoseskåler¹⁶. Utsåing av bakteriene på ikke-selektivt medium ble brukt til å beregne bakteriekonsentrasjonen i kulturene de ble dyrket opp i. Men det var også en kontroll på at mutantene på selektivt medium var muterte kloner av *E. coli*-varianten vi jobbet med. Altså at den *E. coli*-varianten man jobbet med var levedyktig, og "oppførte" seg som den skulle, og at mutantene ikke var et utslag av forurensing fra andre bakteriekilder. Før løsningene ble sådd ut på glukoseskåler, ble de fortynnet ytterligere etter følgende skjema:

¹⁴ Vorteksapparat: Test Tube Shaker ECN 444 - 1372, VWR International nv/sa, Leuven.

¹⁵ Sentrifuge: Thermo Scientific, Heraeus Fresco 17 centrifuge, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold.

¹⁶ Glukoseskåler: 12 g agar-agar, 1 ml 1,00 M MgSO₄ x 6H₂O, 2 g glukose eller 10 ml 20 % glukose, 10 ml aminosyrer (4 mg/ml), 1 ml vitamin B₁ (5 mg/ml) og 100 ml 10 x A-buffer ble løst i 1 l dH₂O og autoklavert. Mediet ble fordelt på petriskåler med ≈ 20 - 25 ml per skål.

Tabell I: Fortynningsrekke av vaskede bakterieløsninger til glukoseskåler.

| Rørnummer | Volum bakterieløsning (μl) | Volum 1 x A- buffer (μl) | Totalvolum (μl) | Fortynningsfaktor |
|-----------|---|--|---------------------------------|--------------------|
| 1 | 10 μl av ufortynnet vasket bakterieløsning | 990 | 1 000 | 1×10^{-2} |
| 2 | 10 μl fra rør 1 | 990 | 1 000 | 1×10^{-4} |
| 3 | 100 μl fra rør 2 | 990 | 1 000 | 1×10^{-5} |
| 4 | 100 μl fra rør 3 | 990 | 1 000 | 1×10^{-6} |
| 5 | 100 μl fra rør 4 | 990 | 1 000 | 1×10^{-7} |

Det var de tre siste fortynningene i tabell I som ble brukt i forsøkene. Det ble strøket ut én skål med 100 μl av 1×10^{-5} -fortynningen og to skåler hver med 100 μl av 1×10^{-6} - og 1×10^{-7} -fortynningene. Disse fortynningene for eksperimentene er bestemt for å få et "passe" kolonitall på platene. Man regner et "passe" kolonitall på en plate mellom 30 - 300 kolonier. Ved både for få og for mange kolonier på glukoseplatene, kan det bli beregnet feil bakteriekonsentrasjon i den tilhørende kulturen (se 4.2.1). Vi ønsket et så nøyaktig bakterietall som mulig, fordi vi brukte antall bakterier i kulturen til å beregne mutasjonsrate (se 2.1.9 og 3.5). I tillegg til at vi ikke ønsket for mange kolonier på ikke-selektivt medium, ønsket vi heller ikke for lite. Det var fordi mutagenesprosjektet hadde satt et minstetak for *E. coli*-bakteriekonsentrasjon i kulturene før oppdyrkede mutanter ble tatt med i prosjektet (dette blir utdypet nærmere i 3.5). Dette var grunnen til at det i forsøk 70 i eksperimentene våre (se 3.2), ble brukt enda lavere bakteriefortynning til å så ut på glukoseskålene. Det ble målt en god del lavere OD i overnattskulturene i dette forsøket i forhold til andre forsøk, derfor fryktet man desto lavere vekst på vekstmediet.

Når det brukes bakteriefortynninger som minker med en tiendedel (som ble praktisert i våre forsøk), skal kolonitallet på glukoseskålene optimalt også minke tilsvarende.

Denne estimerte nedgangen i antall kolonier på ikke-selektivt medium ved de ulike bakteriefortynningene, er også en kontroll på at det levende materialet man jobber med "oppfører" seg som forventet, i tillegg til at fortynningen er riktig gjennomført. Vi brukte steril stav til å stryke ut bakteriesuspensjonene med. Staven ble sterilisert med brenning mellom hver kultur. Skålene ble inkubert¹⁷ ved 37 °C i 2 døgn.

2.1.7 DYRKING AV MUTANTER PÅ RIFAMPICINSKÅLER

Som selektivt medium for bakteriene ble det brukt rifampicinskåler^{18 19}. De inneholdt det samme som glukoseplatene, men med antibiotikumet rifampicin i tillegg. Når rifampicinplatene ble laget, tilsatte vi rifampicin etter avkjøling av mediet til ≈ 55 °C. Mediet måtte avkjøles, fordi antibiotikumet er varmelabilt. En kan merke seg at når det ble laget rifampicinskåler, helte man større mengde medium i petriskålene enn ved tillaging av glukoseskåler (se fotnote 16 i dette kapittelet). Det var fordi rifampicinskåler ble inkubert dobbelt så lenge i varmeskap, og kunne derfor lettere tørke ut. Grunnen til at vi sådde ut bakterieløsning på rifampicinplater, var at vi var interessert i mutanter av *E. coli*-bakterier som hadde utviklet resistens mot rifampicin, og dermed kunne vokse på dette mediet. Teorien var at mutantene på selektivt medium som stammet fra *E. coli* i kulturene med mutagen, gjerne var et utslag av at mikrobene hadde blitt utsatt fdU. Det var de ufortynnede vaskede bakteriekulturene (se 2.1.5), som ble sådd ut på rifampicinskålene. Hver kultur ble sådd ut på seks skåler med selektivt medium, med 100 μ l bakteriesuspensjon på hver skål. Rifampicinplatene ble inkubert i varmeskap ved 37 °C i 4 døgn.

2.1.8 TELLING AV BAKTERIEKOLONIER PÅ GLUKOSESKÅLENE

Bakteriekoloniene på glukoseskåler ble tallet etter cirka 2 døgn. Cellevekst til *E. coli* i kulturene ble estimert ut fra dette tallet. Hvis det for eksempel var 14 kolonier på en

¹⁷ Varmeskap: Termaks.

¹⁸ Rifampicinskåler: 12 g Agar-agar, 1 ml 1,00 M MgSO₄ x 6H₂O, 2 g glukose eller 10 ml 20 % glukose, 10 ml aminosyrer (4 mg/ml), 1 ml vitamin B₁ (5 mg/ml) og 100 ml 10 x A-buffer ble løst i 1 l dH₂O og autoklavert. Etterpå ble mediet tilsatt 5 ml rifampicin (30 mg/ml). Mediet ble så fordelt på petriskåler med $\approx 25 - 30$ ml per skål.

¹⁹ 30 mg/ml Rifampicin (Mw 823,0 u): 0,030 g rifampicin løst i 1 ml metanol eller 0,150 g rifampicin løst i 5 ml metanol.

skål med 1×10^{-7} -fortynning, inneholdt den ufortynnede bakterieløsningen tilhørende den skålen $1,4 \times 10^9$ bakterier per ml (se eksempel fra forsøk 89 i 3.2).

Grunnen til at bakterietallet i kulturene ble $1,4 \times 10^9$ i stedet for $1,4 \times 10^8$ bakterier per ml, var at det bare ble sådd ut 100 μ l av bakterieløsningen på skålene. Derfor måtte kolonitallet multipliseres med 10 i tillegg til 1×10^7 . Forsøksrekkene besto som sagt av to plater med 1×10^{-7} -fortynning. Av den grunn ble gjennomsnittet av disse to skålene brukt for å estimere celletallet i den kulturen koloniene stammet fra. Vi registrerte koloniene på telleapparat²⁰ for bakteriekolonier. Måten det ble gjort på var at vi la skålene med koloniene på en trykkfølsom plate på telleapparatet, som var opplyst fra undersiden. Vi la skålene opp ned på denne platen. Siden platen var opplyst, vistes koloniene som mørke punkter på undersiden av glukoseskålen. Hvert punkt (koloni) ble trykket på med en tynn, permanent tusj. Dette trykket ble registrert i et telleverk på telleapparatet. Fordi tusjmarkeringen vistes på undersiden av skålene, ble det også holdt rede på hvilke kolonier som var tallet. Hvis det var veldig mange kolonier på glukoseplatene, ble gjerne ikke kolonitallet helt nøyaktig. Skålen ble imidlertid ikke tallet om igjen, fordi tellemetoden var så usikker i seg selv. Og på grunn av det var det ikke sikkert kolonitallet ble mer korrekt ved andre gangs telling.

2.1.9 TELLING AV MUTANTER PÅ RIFAMPICINSKÅLENE

Mutantkoloniene på rifampicinskålene ble tallet etter cirka 4 døgn. Vi trengte ikke kolonitelleren til denne tellingen, siden kolonitallet her var mye mindre. (Kolonitallet varierte mellom 1 og 21 i forsøkene våre.) Tidligere i prosjektet regnet man ut mutantfrekvens som et mål for mutasjonshyppighet. Da trenger man kolonitallet til rifampicinplatene. Mutantfrekvens regnes som antall mutanter som er oppstått i en kultur (det vil si antall kolonier som er oppstått på selektivt medium tilhørende den kulturen), dividert på det totale celletallet i kulturen. Imidlertid brukes nå mutasjonrate som et mål for mutagenisiteten til de to *E. coli*-stammene. Mutasjonsratemetoden prosjektet bruker tar utgangspunkt i antall kulturer i et eksperiment uten mutanter (se 3.5), og ikke antall mutanter. Men mutantfrekvens blir ennå regnet ut for hver kultur i mutageneseprosjektet. Derfor ble antall mutantkolonier på rifampicinskålene også tallet i denne studien.

²⁰ Koloniteller: Stuart Colony Counter SC 6, Barloworld Scientific Ltd., Stone, Staffordshire.

2.2 Mutantanalyse

2.2.1 FOREDLING AV MUTANTER

For å sile bort falske mutanter, det vil si kolonier som hadde vokst opp tilfeldig på rifampicinskålene, men som ikke hadde egenskapen rifampicinresistens, ble det foretatt en reedyrking av mutantene. Denne reedyrkingen foregikk i to trinn. Mutanter fra de opprinnelige rifampicinskålene ble dyrket i rifampicinmedium ytterligere to ganger (først på LA-skål, deretter i LB-medium). Hvis de da vokste opp, kunne vi være sikre på at dette var "ekte" rifampicinresistente mutanter.

Vi tok én koloni fra en rifampicinskål med vekst og spredde på LA-skål som inneholdt rifampicin. Vi hadde samme mengde rifampicin i disse platene, som til selektivt medium (5 ml 30 mg/ml rifampicin til 1 l medium). Det ble bare gått videre med én rifampicinskål i en forsøksrekke. Hvis flere av de seks platene var positive, valgte vi ut den platen som hadde de mest typiske og største koloniene. (En typisk mutantkoloni på en rifampicinskål hadde ofte en mørkere prikk i midten.) Skålene ble inkubert ved 37 °C i cirka 2 døgn, eller til det ble observert høy bakterievekst. Siden LA-mediet er veldig næringsrikt, formerte de muterte koloniene seg hurtig her.

Etter denne dyrkingen, ble det fra hver LA-skål løst én koloni i et reagensrør med 2 ml LB-medium²¹ som inneholdt 150 µg rifampicin. (Det ble tilsatt 5 µl av 30 mg/ml rifampicin-løsningen til hvert rør.) Reagensrørene med LB-medium ble så inkubert ved 37 °C i risteinkubator ved 240 rpm i 5 døgn (overnattskultur av mutanter).

2.2.2 ISOLERING AV DNA FRA *E. coli*-MUTANTENE

Den eneste cellebestanddelen vi var interessert i fra *E. coli*-mutantene, var DNA. Derfor måtte det isoleres. Dette ble gjort ved at 5 µl av overnattskulturen av mutanter ble blandet med 100 µl sterilt H₂O og kokt på varmeblokk²² i 5 min. Celleveggen til *E. coli* sprakk da, og DNA-materialet fra bakteriene ble frigjort, sammen med andre cellebestanddeler. Etter kokingen ble prøvene avkjølt på is. De ble sentrifugert ved 13

²¹ LB-medium (overnattskultur): 25 g LB-Broth (Miller) ble løst i 1 l dH₂O og autoklavert.

²² Varmeblokk: Grant QBT1, Grant Instruments Ltd., Shepreth, Cambridge.

000 rpm i 3 min i romtemperatur. Celleveggen og organeller som var tyngst lå nå i pelletten. DNAet som er lettere var i supernatanten. Det ble overført til et nytt eppendorfrør, og det var dette genmaterialet det skulle kjøres PCR²³ på.

2.2.3 PCR (polymerase-chain-reaction)

Vi gjorde PCR for å mangfoldiggjøre DNA-materialet fra mutantene. PCR-reaksjon foregår i sykluser, og for hver syklus fordobles DNA-mengden. Det brukes to primere, én til templattråden og én til den komplementære tråden (primer 1021²⁴ og primer 1022²⁵). Primerene binder seg i 3'-enden på hver tråd, flankerende til Den DNA-sekvensen som skal amplifiseres. De bindes da i hver ende av denne sekvensen, og er med på å avgrense DNA-stykket som behandles ved PCR. Dette området mellom primerene kalles målområdet for PCR-kjøringen (Hartwell et al. 2008).

En PCR-prøve ble blandet i følgende forhold:

²³ PCR-maskin: AB Applied Biosystems, Gene Amp PCR System 2700.

²⁴ Primer 1021 - GM 175: 253 pmol/μl (stock). 10 pmol/μl av primer 1021: 5 μl stock + 121,5 μl sterilt H₂O.

²⁵ Primer 1022 - GM 176: 219 pmol/μl (stock). 10 pmol/μl av primer 1022: 5 μl stock + 104,5 μl sterilt H₂O.

Tabell II: Innhold i en PCR-prøve til kjøring.

| Innhold per PCR-rør: | Volum per PCR-rør (µl): |
|--|-------------------------|
| 5 x GoTaq-Flexi-buffer | 10 |
| 25 mM MgCl ₂ -løsning | 3 |
| deoksyribonukleosidtrifosfatmiks (dNTP; 10 mM av hver) | 1 |
| Primer 1021 (10 pmol/µl) | 1 |
| Primer 1022 (10 pmol/µl) | 1 |
| GoTaq HotStart-DNA-polymerase (5 U/µl) | 0,25 |
| sterilt H ₂ O | 28,75 |
| Disse punktene listet opp til nå, utgjør en reaksjonsmiks til en PCR-prøve. Dette volumet utgjør: | 45 |
| DNA-materiale fra mutantene | 5 |
| Totalt volum: | 50 |

Hele volumet av reaksjonsmiks til en PCR-kjøring ble laget på en gang. Det er fordi noe av reaksjonsmiksens innhold er i så små volum per prøve, at den forholdsmessige sammensetningen blir mer nøyaktig ved tillaging i større kvanta. Vi pipetterte først opp 5 µl DNA fra en av mutantene som ble preparert i 2.2.2. Deretter ble 45 µl reaksjonsmiks tilsatt hver PCR-prøve. Det ble gjort i denne rekkefølgen, fordi Taq-DNA-polymerasen hadde kort holdbarhet før den kom i PCR-maskinen. Når reaksjonsmiksen ble laget, ble DNA-polymerasen tilsatt sist, før vi skulle pipettere løsningen opp i PCR-rørene. Da var det lurt at genmaterialet fra mutanten allerede var i prøvene. I stedet for DNA i den negative kontrollen, ble det tilsatt 5 µl nukleasefritt sterilt H₂O. Ellers ble

den behandlet likt som PCR-prøvene. Det nukleasefrie H₂O i negativ kontroll ble pipettert opp i dens PCR-rør først av alt, før det ble tilsatt noe i de andre PCR-rørene. Det var for å unngå at det ble kontaminert av DNA fra for eksempel de andre PCR-prøvene.

Den negative kontrollen ved en PCR-kjøring, er en kontroll på at DNA-materiale bare er i de prøvene det er ment å være. Hvis PCR-prøvene får tilsatt fremmed DNA, for eksempel fra en annen prøve, eller ved forurensing, blir ofte den negative kontrollen positiv ved den etterfølgende gelelektroforesen (se 2.2.5).

Tabell III: Sykluser vi brukte i et PCR-program.

| Trinn | Tid | Temperatur | Syklus |
|---------------------|--------|------------|--------|
| Første denaturering | 4 min | 94 °C | 1 x |
| Denaturering | 1 min | 94 °C | 34 x |
| Avkjøling | 1 min | 50 °C | |
| Forlengelse | 20 sek | 72 °C | |
| Endelig forlengelse | 5 min | 72 °C | 1 x |
| Lagring | ∞ | 4 °C | |

Grunnen til første denaturerings-trinnet i dette PCR-programmet (se første syklus i PCR-programmet), er at når det brukes HotStart-DNA-polymerase, trengs en begynnende oppvarmingsfase av ingrediensene før reaksjonen settes i gang. Den endelige forlengelse (femte syklus i PCR-programmet) innebærer at det sjekkes en siste gang, at DNA-trådene som lages er lange nok. Hvis så ikke er tilfellet, gjøres en forlengelse av DNA-materialet før det lagres (siste syklus i PCR-programmet).

2.2.4 RENSING AV PCR-PRODUKT

PCR-produktet ble rensset for å få vekk DNA-bundne proteiner og andre molekyler som kunne forstyrre sekvenseringen. Til det formålet ble det brukt kolonner²⁶ med et spesiallaget materiale som PCR-produktet rant gjennom. Vi resuspenderte kolonnematerialet ved hjelp av vorteksapparat. Lokket på kolonnene ble løsnet og bunnen knekt av. Lokket ble løsnet for å få vekk vakuemet i kolonnene. Bunnen ble knekt av, slik at væsken i disse rant ut ved sentrifugering. Etter at det var gjort ble hver av kolonnene overført til et medfølgende samlerør. De ble sentrifugert mens de sto i det samlerøret ved 2 900 rpm i 1 min. Væsken fra kolonnene ble nå drevet ut i samlerøret. Samlerørene ble kastet. Kolonnene ble så overført til hvert sitt sterile eppendorfrør. Lokket på kolonnene ble nå kastet, og PCR-produktet ble tilsatt forsiktig på toppen av kolonnen. Vi sentrifugerte kolonnene i eppendorfrørene ved 2 900 rpm i 2 min. Det amplifiserte DNA fra mutantene drev nå gjennom kolonnematerialet, og ble purifisert. Sentrifugeringen foregikk ved romtemperatur. Dette DNA-materialet som nå hadde samlet seg i eppendorfrørene, ble brukt til gelelektroforese og sekvensering. Den negative kontrollen i PCR-kjøringen ble ikke rensset på denne måten.

2.2.5 GELELEKTROFORESE

Gelelektroforesen fungerte som en grov kvantifisering av PCR-produktene, det vil si for å se om vi hadde nok DNA-materiale til å foreta DNA-sekvensering. I tillegg er gelelektroforese av PCR-produkter en kontroll på at tillagingen av prøvene til PRC er gjort under sterile nok forhold (se 2.2.3). Det er en kontroll på at prøvene ikke blir kontaminert av fremmed DNA fra for eksempel andre mikroorganismer i denne prosessen. En test på dette er at den negative kontrollen i PCR-kjøringen blir negativ i den påfølgende gelelektroforese. Gelelektroforese blir da et bevis på at det er DNA-materialet av interesse som blir mangfoldiggjort ved PCR (altså DNA fra mutantene i vårt tilfelle). Hvis det ble detektert DNA i den negative kontrollen ved en gelelektroforesekjøring, måtte prøvene kjøres om igjen fra PCR-trinnet. (Det skjedde med én gel i denne studien, se 3.3). Det var fordi, som skissert over, vi da ikke kunne være sikre på at PCR-produktet stammet fra mutantene. Det var essensielt i denne studien, at rett DNA-materiale ble amplifisert. Det var fordi hensikten med

²⁶ Kolonner til rensing av PCR-produkt: MicroSpin S-400 HR kolonner.

sekvenseringen kun var å avdekke mutasjoner ved genmaterialet hos mutantene. Det var disse resultatene som ga svar på problemstillingen vår.

Når vi laget gel til gelelektroforese, brukte vi agarose. Det er et polysakkarid som brukes til å separere større molekyler, som DNA og RNA. DNA og RNA er negativt ladet på grunn av fosfatgruppene i ryggraden av molekylene (Hartwell et al. 2008). Derfor kan de vandre i et elektrisk felt, og separeres ved hjelp av ladning, som i DNA og RNAs tilfelle er proporsjonalt til størrelse. Det ble laget 1 % agarosegel, og den ble laget på følgende måte: 0,5 g agarose ble løst i 50 ml 1 x TAE-buffer^{27 28}. Blandingen ble kokt i mikrobølgeovn til agarosen var løst. Løsningen ble så avkjølt til cirka 50 °C før 0,5 µl etidumbromid (10 mg/ml) ble tilsatt. Det ble så helt opp i formen som fulgte med elektroforeseutstyret. Det ble satt i en "kam" som laget brønner, og vi lot det stivne i 20 - 30 min. Etidumbromid binder seg til DNA i cellen, og når gelen blir eksponert overfor ultrafiolett lys, tar stoffet opp fotoner og sender ut synlig rødt lys. Etidumbromid er veldig toksisk for kroppen. Derfor brukte vi veldig lite gjennomtrengelige hansker (nitril-hansker) og egne frakker når vi jobbet med stoffet. På slutten av forsøkene våre, begynte en annen forskergruppe i samme lokalene å bruke GelRed™ nukleinsyre gel-farger i stedet for etidumbromid. Dette stoffet regnes ikke som toksisk, men binder seg til DNA på samme måte som det tidligere brukte reagenset. DNA-båndene i gelelektroforesen kan fremkalles med samme UV-transilluminator som før. Når den andre forskergruppen begynte å bruke GelRed™, ble også dette stoffet benyttet i våre eksperimenter. GelRed™ kunne tilsettes når agarosen var kokende, og det ble brukt 5 µl til 50 ml agaroseløsning i stedet for 0,5 µl som av etidumbromid.

Med i gelelektroforese hadde vi en DNA-standard. Det var ved hjelp av denne standarden vi kvantifiserte prøvene. Som DNA-standard ble det brukt Low DNA Mass Ladder (LML; 200 µl (2 µl/brønn)). Det ble også brukt en 50 base pair (bp) DNA Ladder (50 µg (1 µg/µl)) i begynnelsen, som en ekstra kvantifisering. Men dette var egentlig ikke nødvendig, fordi det var bare LML som ble brukt til å bestemme DNA-masse. Både DNA-standardene og PCR-prøvene ble preparert før det ble kjørt elektroforese på

²⁷ 1 x TAE-buffer: 20 ml 50 x TAE-buffer ble fortynnet i 980 ml dH₂O.

²⁸ 50 x TAE-buffer: 48,4 g Tris-base (Mw 121,14 u), 11,42 ml is-eddiksyre og 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ble løst i 200 ml dH₂O og autoklavert.

disse. Den negative kontrollen fra PCR-kjøringen ble preparert likt som prøvene (se prøvekolonner i tabell IV).

Tabell IV: Preparering av LML, 50 bp DNA Ladder og renset PCR-produkt (prøve) ved kjøring av gelelektroforese.

| Innhold: | Low DNA Mass Ladder (μ l) | 50 bp Ladder (μ l) | prøve (μ l) |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------|
| 6 x Loading Dye Solution | 0,5 | 1 | 2 |
| DNA-standard | 2 | 0,5 | |
| renset PCR-produkt | | | 10 |
| sterilt H ₂ O | 0,5 | 4,5 | |

DNA-standard i tabellen henviser til ufortynnet LML og 50 bp Ladder.

Den tørkede gelen ble satt i elektroforesekammeret og det ble helt opp i 1 x TAE-buffer slik at det dekket hele gelen. Prøver/standard/negativ kontroll ble pipetert opp i brønnene (se tabell over). Gelen ble kjørt²⁹ ved 80 V i 40 - 45 min. Etter at det var kjørt gelelektroforese av PCR-produktene ble de visualisert ved hjelp av ultrafiolett lys på UV-transilluminator³⁰. Programmet vi brukte på UV-transilluminatoren var program Quantity One, versjon 4,0. Denne visualiseringen av DNA-båndene i gelen gjorde at vi kunne sammenligne båndene i LML-standard med båndene til prøvene våre. En DNA-standard ser ut som en stige i gelen, der hvert bånd utgjør en viss baseparlengde og DNA-mengde. Våre prøver skulle være 300 basepar og DNA-mengden skulle utgjøre ≥ 10 ng, for at prøvene kunne sendes inn til sekvensering. Hvis DNA-båndene til prøvene var mellom andre og tredje "stige-trinn" nedenfra i LML-standard, eller høyere, ble de sendt inn for sekvenseringsanalyse. Andre DNA-båndet nedenfra i denne standarden tilsvarer 10 ng i DNA-masse og er 200 basepar i lengde. Tredje DNA-båndet tilsvarer 20 ng og 400 basepar i lengde.

²⁹ Strømkilde til gelelektroforese: BioRad Power Pac 300.

³⁰ Transilluminator: GelDoc 2000 BioRad.

2.2.6 SEKVENSERING AV PCR-PRODUKTENE

PCR-produktene ble sendt til England for DNA-sekvensering hos Genome Enterprise Limited, The Genome Analysis Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH. Metoden som ble brukt var Sanger-sekvensering (Sanger, Nicklen, og Coulson 1977). Sekvenseringen ble gjort for å oppdage mutasjoner i Rif^R-sekvensen i *E. coli*-mutantene. Rif^R-sekvensen er en beta subunit i RNA-polymerase i *E. coli*. Selve prosedyren for fortolkning av sekvenseringsdataene vil bli redegjort for i presentasjonen av disse i resultatsdelen (se 3.4).

2.3 Forebygging av feilkilder

Når vi jobbet med bakteriekulturene, enten for å lage overnattekultur, overføre bakteriekultur til glukose- eller rifampicinplater og lagde prøver det skulle kjøres PCR eller elektroforese på, jobbet vi hele tiden i sterilskap³¹. Vi spritet utstyret godt før bruk, blant annet pipetter, og vi spritet også sterilskapet godt, både før og etter bruk. Reagensene ble også delvis tillagt under sterile forhold. Disse ble i tillegg autoklavert før bruk, for å unngå kontaminasjon.

³¹ Sterilskap: Nuair Biological Safety Cabinets, class II, Nuair Inc., Plymouth.

3. RESULTATER

Forskningsspørsmålet i denne studien har vært å vurdere om 5-formyldeoksyuridin (fdU) induserer ulike mutasjoner og mutasjonsrater hos villtype og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli*. Vi vil i dette kapitlet presentere resultater som kan besvare dette.

Det er i studien utført 22 forsøk med villtype eller *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli*, og disse er nummerert fra forsøk 69 til forsøk 92 (se forsøkene i 3.2). Forsøk 74 og 77 gikk ut på grunn av manglende vekst i overnattekkulturene. Vi har utført seks forsøk med villtype-*E. coli* ved 0,2 mM og ett med samme bakterievarianten ved 0,4 mM fdU. Vi har også utført syv forsøk med *alkA*⁻ ved 0,2 mM og åtte med *alkA*⁻-mutanten ved 0,4 mM fdU. I forsøkene hadde vi til sammen 222 kulturer (forsøksrekker), og 48 av disse fikk ingen mutanter på de tilhørende rifampicinplater. På det tidspunktet arbeidet ble utført, opererte mutageneseprosjektet bare med én kontrollforsøksrekke (bakterier som vokste uten tilsetning av fdU) per hver femte forsøksrekke (se forsøkene i 3.2). Siden det tidligere var sekvensert mange kontroller i prosjektet, ble denne kontrollhyppigheten vurdert som tilstrekkelig i den aktuelle studien. Vi tok derfor heller ikke vare på så mange av kontrollmutantene (se tabell IX). De vi tok vare på var hovedsakelig fra villtype-*E. coli*, fordi det der var sekvensert færrest i mutageneseprosjektet. Grunnen til at det også ble sekvensert en spontan *alkA*⁻-mutant i studien, var egentlig en feilsending.

3.1 Kvantitativ bedømmelse av vekst på glukoseplater hos villtype og *alkA*⁻-mutant hos *E. coli*

Når vi utførte forsøkene våre, sådde vi blant annet de oppdyrkede og behandlede bakteriene på glukoseplater for å bedømme vekst. Veksten til de to *E. coli*-bakterievariantene var med på å bestemme gyldigheten til basesubstitusjonene oppnådd. Og dette ga svar på problemstillingen i studien. Hvis det ikke ble vekst på glukoseplatene, kunne det også være en grunn til at mutanter uteble på rifampicinplatene. Som nevnt (se 2.1.6 og 3.5), kunne manglende vekst på glukoseplatene også være en indikasjon på at tilhørende mutanter som vokste opp på

selektivt medium slett ikke stammet fra "vår" bakterie. Påviste mutanter kunne da heller være et utslag av kontaminering.

Veksten på glukoseplater ble brukt til å estimere bakteriekonsentrasjonen i kulturene (se 2.1.6 og 2.1.8), og dette ble brukt til å regne ut mutasjonsrate (se 3.5). I 2.1.6 i ble det presisert at det ble satt et minstetak for antall kolonier på glukoseplater før vi sendte inn tilhørende mutanter til sekvensering. Derfor var kartlegging av veksten på ikke-selektivt medium med på å bestemme hvilke mutanter som ble sekvensert, og som ga svar på antall mutasjoner og mutasjonstyper.

En kvantitativ bedømmelse av vekst til villtype-*E. coli* og *alkA*⁻-mutant hos *E. coli* på glukoseplatene i våre forsøk, blir presentert i tabellene V og VI.

Forklaring til tabellene V og VI:

1. Null bakterievekst: Skåler der det ikke ble påvist noen vekst på glukose ble klassifisert som null bakterievekst.

2. Dårlig bakterievekst: Skåler der veksten på glukose med 1×10^{-5} -fortynningen hadde mellom 1 og 50 kolonier ble klassifisert som dårlig bakterievekst.

3. Middels bakterievekst: Skåler der veksten på glukose med 1×10^{-5} -fortynningen hadde mellom 50 og 100 kolonier ble klassifisert som middels bakterievekst.

4. God bakterievekst: Skåler der veksten på glukose med 1×10^{-5} -fortynningen hadde mer enn 100 kolonier ble klassifisert som god bakterievekst.

Disse grensene for vekst er egentlig vilkårlige, og bare tatt fra egen vurdering. Men forutsetningen for denne klassifiseringen av bakterievekst i en forsøksrekke, var at det ut fra 1×10^{-5} -fortynningen, også var forventet vekst på glukose med 1×10^{-6} - og 1×10^{-7} -fortynningene. Noen ganger var det ingen vekst på platen med 1×10^{-5} -fortynningen, men vekst i de andre fortynningene i forsøksrekka. En slik forsøksrekke ble klassifisert som dårlig vekst i veksttabellene. Dette var uavhengig av veksten i de andre fortynningene i forsøksrekka. Det samme var tilfellet ved god vekst på glukose med 1×10^{-5} -fortynning, men ingen vekst i de andre fortynningene (dette forekom bare i én forsøksrekke, i forsøk 85, se 3.2).

Tabell V: Vekst hos villtype-*E. coli* på ikke-selektivt glukosemedium. fdU = 5-

Formyldeoksyuridin.

| Antall forsøksrekker: | <i>E. coli</i> -villtype | % God bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) | % Middels bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) | % Dårlig bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) | % Null bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) |
|-----------------------|--------------------------|--|--|---|---|
| 12 | Uten tilsatt fdU | 16 % | 0 % | 42 % | 42 % |
| 46 | Tilsatt 0,2 mM fdU | 31 % | 4 % | 15 % | 50 % |
| 10 | Tilsatt 0,4 mM fdU | 0 % | 0 % | 20 % | 80 % |

Tabell VI: Vekst til *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* på ikke-selektivt glukosemedium. fdU =

5-Formyldeoksyuridin.

| Antall forsøksrekker: | <i>alkA</i> ⁻ -mutanten hos <i>E. coli</i> | % God bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) | % Middels bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) | % Dårlig bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) | % Null bakterievekst (i forhold til totalt antall forsøksrekker) |
|-----------------------|---|--|--|---|---|
| 27 | Uten tilsatt fdU | 70 % | 0 % | 15 % | 15 % |
| 47 | Tilsatt 0,2 mM fdU | 43 % | 8 % | 34 % | 15 % |
| 80 | Tilsatt 0,4 mM fdU | 60 % | 13 % | 26 % | 1 % |

3.2 Resultater av kolonitelling i forsøkene

Som nevnt i 3.1 var vekst på ikke-selektivt og selektivt medium med på å gi svar på problemstillingen i studien.

Nedenfor vises resultater av telling av kolonier på glukose- og rifampicinskåler i forsøkene våre:

Forsøk 69 til og med 76: *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* ved 0,2 mM fdU.

Forsøk 78 til og med 85: *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* ved 0,4 mM fdU.

Forsøk 86 og 88 til og med 92: villtype-*E. coli* ved 0,2 mM fdU.

Forsøk 87: villtype-*E. coli* ved 0,4 mM fdU.

Generelle opplysninger om forsøksrekkene: Forsøksrekkene på glukose, besto av én plate med 100 µl av 1×10^{-5} -bakteriefortynning og to av hver av plater med henholdsvis 100 µl av 1×10^{-6} - og 1×10^{-7} -bakteriefortynninger (se 2.1.6). Unntaket var forsøk 70. Her ble det i stedet sådd ut 100 µl av 1×10^{-4} -, 1×10^{-5} - og 1×10^{-6} -bakterieforynninger på de respektive glukoseplatene. Vi brukte lavere bakteriefortynning på glukose i dette forsøket, fordi det ble målt så lav OD i overnattskulturene. Når det gjaldt rifampicinplatene i forsøksrekkene, ble det sådd ut 100 µl ufortynnet bakterieløsning på seks plater (se 2.1.7). Vi hadde et unntak med hensyn på antall rifampicinskåler. Det var også i forsøk 70. Her brukte vi fem skåler av selektivt medium per forsøksrekke. Grunnen til det var som nevnt tidligere at bakterieveksten var lav i overnattskulturene. Vi regnet da med at det oppsto tilsvarende færre mutanter fra materialet. Derfor var det tilstrekkelig med det plateantallet.

Bokstaven A, B eller C i navnet på forsøksrekka indikerer navnet på overnattskulturen forsøksrekka stammet fra (som det ble målt OD på). Som nevnt i 2.1.3, dyrket vi alltid opp tre overnattskulturer for hvert forsøk. De ble navngitt med A, B og C. Vi gikk videre med én eller to av disse, og valgte da de med mest "passende" OD (se 2.1.4). F'en i forsøksrekka indikerer at kulturen den stammet fra inneholdt fdU. K'en indikerer at det var en kontrollforsøksrekke (*E. coli* som har vokst uten fdU). Romertallene indikerer nummeret til de parallelle forsøksrekkene fra samme bakteriekultur. Som også nevnt i 2.1.4, ble en overnattskultur delt opp i fem mutagenesekulturer, og en uten mutagen.

a) Forsøksnummer 69

Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: 0,2 mM fdU.

Tabell 1: Antall kolonier på glukoseplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortytning: | | | | |
|-----------------------|--|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 561 | 82 | 82 | 6 | 6 |
| BF I | 176 | 39 | 29 | 4 | 4 |
| BF III | 192 | 42 | 22 | 6 | 1 |

Tabell 2: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|----|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| BF III | 1 | 3 | 2 | 4 | 10 | 7 |

b) Forsøksnummer 70Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,2 mM fdU.**Tabell 3: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortytning: | | | | |
|-----------------------|--|----------------------|---|----------------------|---|
| | 1 x 10 ⁻⁴ | 1 x 10 ⁻⁵ | | 1 x 10 ⁻⁶ | |
| CK | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 12 | 13 | 5 | 2 | 9 |
| CF II | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 5 | 1 | 2 | 0 | 0 |

Tabell 4: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

c) Forsøksnummer 71Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 5: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 1 | 37 | 5 | 7 | 9 |
| CF III | 0 | 23 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 |
| CF V | 14 | 2 | 11 | 2 | 1 |

Tabell 6: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 2 | 4 | 5 | 7 | 1 | 0 |
| CF III | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

d) Forsøksnummer 72Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 7: Antall kolonier på glukoseplaten.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortytning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 491 | 57 | 43 | 7 | 4 |
| AF I | 158 | 52 | 35 | 5 | 7 |
| AF II | 422 | 67 | 53 | 3 | 2 |
| AF III | 122 | 43 | 33 | 6 | 3 |
| AF V | 333 | 44 | 57 | 6 | 6 |
| | | | | | |
| CK | 168 | 29 | 23 | 2 | 5 |
| CF I | 286 | 30 | 47 | 3 | 3 |
| CF II | 23 | 3 | 4 | 0 | 2 |
| CF III | 260 | 27 | 25 | 1 | 1 |
| CF IV | 93 | 20 | 30 | 3 | 4 |
| CF V | 78 | 19 | 15 | 2 | 0 |

Tabell 8: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| AK | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 2 | 1 | 3 | 4 | 7 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

e) Forsøksnummer 73Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 9: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortyning: | | | | |
|-----------------------|--|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 21 | 19 | 50 | 8 | 3 |
| AF I | 318 | 20 | 10 | 1 | 0 |
| AF II | 283 | 28 | 24 | 0 | 0 |
| AF IV | 199 | 59 | 50 | 2 | 1 |
| AF V | 412 | 56 | 52 | 3 | 2 |
| | | | | | |
| CK | 395 | 70 | 57 | 7 | 5 |
| CF I | 191 | 18 | 19 | 2 | 0 |
| CF II | 6 | 1 | 7 | 0 | 3 |
| CF III | 14 | 10 | 22 | 2 | 0 |

Tabell 10: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

f) Forsøksnummer 75

Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,2 mM fdU.

Tabell 11: Antall kolonier på glukoseplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortytning: | | | | |
|-----------------------|--|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 548 | 42 | 53 | 4 | 5 |
| BF I | 213 | 43 | 43 | 6 | 4 |
| BF II | 348 | 56 | 48 | 0 | 2 |
| BF III | 169 | 26 | 47 | 4 | 2 |
| BF IV | 255 | 30 | 31 | 2 | 0 |
| BF V | 65 | 25 | 27 | 9 | 6 |

Tabell 12: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl uforynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|--|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BF III | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

g) Forsøksnummer 76Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 13: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 7 | 11 | 2 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 9 | 19 | 0 | 1 |
| AF II | 322 | 47 | 50 | 9 | 0 |
| AF III | 308 | 49 | 45 | 7 | 2 |
| AF IV | 198 | 25 | 32 | 0 | 2 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 2 | 19 | 4 | 0 |
| CF II | 54 | 40 | 28 | 0 | 1 |
| CF III | 15 | 8 | 12 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

Tabell 14: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| AK | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 2 | 0 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| CF IV | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

h) Forsøksnummer 78Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,4$ mM fdU.**Tabell 15: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 226 | 65 | 36 | 5 | 6 |
| BF I | 297 | 42 | 10 | 0 | 0 |
| BF II | 225 | 30 | 37 | 1 | 3 |
| BF III | 104 | 20 | 28 | 4 | 5 |
| BF IV | 508 | 54 | 62 | 4 | 1 |
| BF V | 244 | 38 | 35 | 5 | 1 |
| | | | | | |
| CK | 398 | 48 | 44 | 1 | 3 |
| CF I | 310 | 57 | 46 | 1 | 2 |
| CF II | 356 | 32 | 58 | 5 | 2 |
| CF III | 281 | 51 | 32 | 2 | 4 |
| CF IV | 342 | 26 | 46 | 1 | 2 |
| CF V | 362 | 46 | 31 | 3 | 5 |

Tabell 16: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| CF V | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

i) Forsøksnummer 79Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,4 mM fdU.**Tabell 17: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortyning: | | | | |
|-----------------------|---|----------------------|----|----------------------|----|
| | 1 x 10 ⁻⁵ | 1 x 10 ⁻⁶ | | 1 x 10 ⁻⁷ | |
| AK | 3 | 51 | 1 | 5 | 10 |
| AF I | 34 | 9 | 12 | 1 | 1 |
| AF II | 408 | 47 | 28 | 5 | 0 |
| AF III | 66 | 13 | 12 | 4 | 1 |
| AF IV | 361 | 38 | 24 | 2 | 1 |
| AF V | 82 | 8 | 14 | 0 | 1 |
| | | | | | |
| BK | 175 | 21 | 48 | 2 | 3 |
| BF I | 146 | 19 | 22 | 1 | 2 |
| BF II | 264 | 24 | 13 | 1 | 0 |
| BF III | 84 | 19 | 21 | 3 | 0 |
| BF IV | 280 | 26 | 17 | 1 | 3 |
| BF V | 87 | 12 | 16 | 3 | 2 |

Tabell 18: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

j) Forsøksnummer 80Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,4$ mM fdU.**Tabell 19: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 490 | 49 | 47 | 3 | 0 |
| AF I | 58 | 15 | 15 | 0 | 3 |
| AF II | 146 | 11 | 6 | 0 | 0 |
| AF III | 70 | 6 | 10 | 1 | 1 |
| AF IV | 154 | 11 | 19 | 0 | 0 |
| AF V | 200 | 34 | 28 | 9 | 2 |
| | | | | | |
| CK | 316 | 30 | 21 | 0 | 0 |
| CF I | 47 | 16 | 17 | 1 | 0 |
| CF II | 383 | 28 | 26 | 3 | 1 |
| CF III | 193 | 48 | 44 | 4 | 3 |
| CF IV | 45 | 15 | 3 | 2 | 1 |
| CF V | 157 | 32 | 3 | 0 | 1 |

Tabell 20: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| AK | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

k) Forsøksnummer 81Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,4 mM fdU.**Tabell 21: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|--|----------------------|----|----------------------|---|
| | 1 x 10 ⁻⁵ | 1 x 10 ⁻⁶ | | 1 x 10 ⁻⁷ | |
| BK | 599 | 66 | 72 | 7 | 6 |
| BF I | 297 | 52 | 64 | 3 | 6 |
| BF II | 436 | 48 | 70 | 5 | 5 |
| BF III | 126 | 52 | 66 | 7 | 3 |
| BF IV | 440 | 36 | 50 | 4 | 0 |
| BF V | 325 | 46 | 46 | 2 | 8 |
| | | | | | |
| CK | 294 | 21 | 21 | 1 | 0 |
| CF I | 24 | 17 | 13 | 0 | 5 |
| CF II | 84 | 15 | 5 | 2 | 0 |
| CF III | 33 | 6 | 24 | 2 | 3 |
| CF IV | 123 | 16 | 13 | 1 | 0 |
| CF V | 23 | 12 | 12 | 2 | 0 |

Tabell 22: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|----|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 2 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 |
| CF I | 0 | 1* | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Kolonien så ut som en soppkoloni (forurensing på platen). Tok ikke vare på den.

I) Forsøksnummer 82Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,4 mM fdU.**Tabell 23: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|--|----------------------|----|----------------------|---|
| | 1 x 10 ⁻⁵ | 1 x 10 ⁻⁶ | | 1 x 10 ⁻⁷ | |
| AK | 371 | 47 | 63 | 3 | 2 |
| AF I | 301 | 53 | 42 | 4 | 1 |
| AF II | 236 | 33 | 25 | 1 | 0 |
| AF III | 105 | 13 | 32 | 1 | 1 |
| AF IV | 417 | 41 | 49 | 3 | 3 |
| AF V | 172 | 21 | 30 | 2 | 3 |
| | | | | | |
| BK | 141 | 7 | 8 | 0 | 0 |
| BF I | 49 | 7 | 9 | 4 | 2 |
| BF II | 356 | 30 | 31 | 2 | 0 |
| BF III | 288 | 37 | 44 | 6 | 5 |
| BF IV | 335 | 39 | 50 | 4 | 1 |
| BF V | 195 | 36 | 58 | 2 | 1 |

Tabell 24: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|----|---|---|
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 1* | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Kolonien så ut som en soppkoloni (forurensing på platen). Tok ikke vare på den.

m) Forsøksnummer 83Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,4 mM fdU.**Tabell 25: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|--|----------------------|----|----------------------|---|
| | 1 x 10 ⁻⁵ | 1 x 10 ⁻⁶ | | 1 x 10 ⁻⁷ | |
| BK | 12 | 1 | 4 | 0 | 0 |
| BF I | 36 | 7 | 11 | 0 | 0 |
| BF II | 22 | 6 | 10 | 0 | 0 |
| BF III | 10 | 3 | 4 | 0 | 0 |
| BF IV | 82 | 11 | 7 | 0 | 1 |
| BF V | 3 | 7 | 23 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 292 | 46 | 41 | 2 | 2 |
| CF I | 14 | 18 | 15 | 1 | 1 |
| CF II | 169 | 13 | 11 | 2 | 0 |
| CF III | 50 | 25 | 20 | 1 | 3 |
| CF IV | 49 | 6 | 13 | 0 | 1 |
| CF V | 56 | 4 | 15 | 3 | 1 |

Tabell 26: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 |

n) Forsøksnummer 84Bakteriestamme: MS23 *alkA⁻*. Mutagen: $\approx 0,4$ mM fdU.**Tabell 27: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 201 | 46 | 18 | 4 | 0 |
| BF I | 0 | 15 | 6 | 0 | 1 |
| BF II | 59 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 103 | 17 | 50 | 2 | 0 |
| BF IV | 475 | 27 | 13 | 1 | 0 |
| BF V | 17 | 9 | 9 | 0 | 7 |
| | | | | | |
| CK | 537 | 73 | 46 | 13 | 2 |
| CF I | 144 | 26 | 63 | 5 | 6 |
| CF II | 554 | 52 | 48 | 1 | 0 |
| CF III | 222 | 30 | 44 | 7 | 7 |
| CF IV | 508 | 53 | 81 | * | 1 |
| CF V | 164 | 34 | 45 | 6 | 6 |

*Antall kolonier kunne ikke bestemmes, fordi agaren hadde tørket ut.

Tabell 28: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

o) Forsøksnummer 85Bakteriestamme: MS23 *alkA*⁻. Mutagen: ≈ 0,4 mM fdU.**Tabell 29: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 µl av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|--|----------------------|----|----------------------|---|
| | 1 x 10 ⁻⁵ | 1 x 10 ⁻⁶ | | 1 x 10 ⁻⁷ | |
| BK | 573 | 50 | 38 | 6 | 3 |
| BF I | 211 | 40 | 56 | 11 | 4 |
| BF II | 239 | 32 | 36 | 0 | 2 |
| BF III | 35 | 51 | 31 | 3 | 3 |
| BF IV | 239 | 20 | 15 | 0 | 0 |
| BF V | 1 | 13 | 14 | 1 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 118 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| CF IV | 254 | 38 | 15 | 3 | 2 |
| CF V | 42 | 7 | 16 | 1 | 1 |

Tabell 30: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| CF IV | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

p) Forsøksnummer 86Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 31: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 83 | 13 | 3 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BF IV | 9 | 31 | 14 | 2 | 0 |
| BF V | 0 | 11 | 3 | 2 | 1 |
| | | | | | |
| CK | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabell 32: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|-----|-----|-----|
| BK | 0 | 0 | 5 | 20* | 21* | 10* |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

*Koloniene lå i et veldig lite felt, som om det var glemt å stryke ut bakterieløsningen. Koloniene virket også lysere, mer utypiske. Tok vare på den platen med fem kolonier i BK-rekken. Her virket koloniene mer slik som de pleide. Med en mørkere kerne.

g) Forsøksnummer 87Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,4$ mM fdU.**Tabell 33: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortytning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 19 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabell 34: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

r) Forsøksnummer 88

Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.

Tabell 35: Antall kolonier på glukoseplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 28 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BF II | 427 | 63 | 50 | 5 | 8 |
| BF V | 504 | 72 | 43 | 4 | 8 |

Tabell 36: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 μ l uforynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |

s) Forsøksnummer 89Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 37: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortytning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|----|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 778 | 80 | 23 | 4 | 7 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 561 | 74 | 79 | 7 | 14 |
| AF III | 469 | 65 | 65 | 4 | 7 |
| AF IV | 569 | 62 | 61 | 8 | 3 |
| AF V | 345 | 44 | 32 | 3 | 2 |

Tabell 38: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 μ l uforyttnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|--|---|---|---|---|---|
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

t) Forsøksnummer 90Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 39: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|----|--------------------|----|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| BK | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 661 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| BF II | 505 | 58 | 58 | 4 | 10 |
| BF III | 641 | 63 | 63 | 12 | 0 |
| BF IV | 86 | 18 | 53 | 11 | 0 |
| BF V | 665 | 62 | 70 | 5 | 8 |

Tabell 40: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

u) Forsøksnummer 91Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 41: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|-----|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| AK | 741 | 94 | 78 | 8 | 3 |
| AF I | 732 | 96 | 81 | 8 | 2 |
| AF II | 690 | 72 | 88 | 12 | 9 |
| AF III | 372 | 47 | 47 | 10 | 6 |
| AF IV | 608 | 83 | 111 | 0 | 4 |
| AF V | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 2 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabell 42: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| AK | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| AF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

v) Forsøksnummer 92Bakteriestamme: AB1157 villtype-*E. coli*. Mutagen: $\approx 0,2$ mM fdU.**Tabell 43: Antall kolonier på glukoseplatene.**

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på glukoseplater oppstått fra 100 μ l av bakteriekultur med fortykning: | | | | |
|-----------------------|---|--------------------|---|--------------------|---|
| | 1×10^{-5} | 1×10^{-6} | | 1×10^{-7} | |
| BK | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

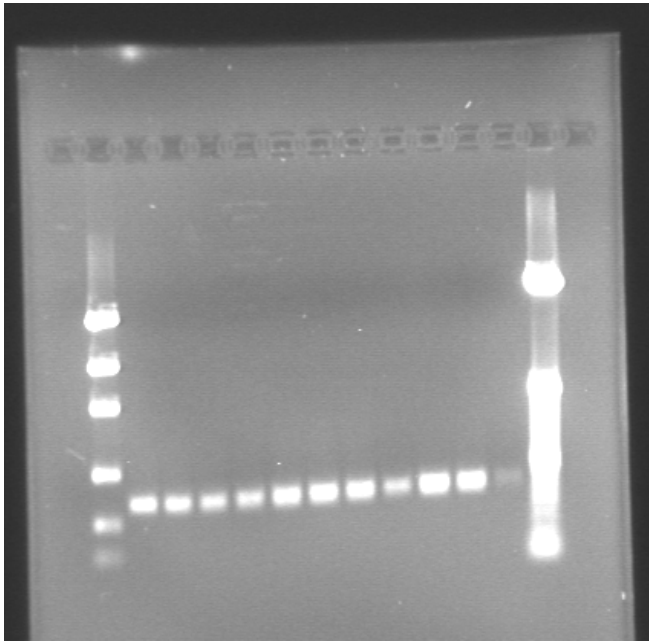
Tabell 44: Antall kolonier på rifampicinplatene.

| Navn på forsøksrekke: | Antall kolonier på rifampicinplater oppstått fra 100 µl ufortynnet bakterieløsning: | | | | | |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| BK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | | |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

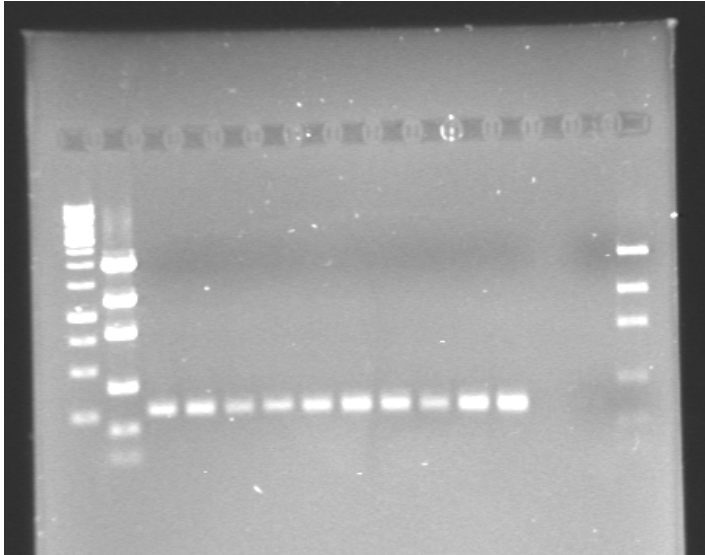
3.3 Resultater fra gelelektroforeseforsøkene

Grunnen til at vi kjørte gelelektroforese på PCR-produktene våre var, som nevnt (se 2.2.5), for å få sjekket at tillagingen av prøvene til PCR hadde blitt laget under rene nok forhold. Dette ville øke sannsynligheten for at DNA-materialet som ble sendt til DNA-sekvensering, stammet fra våre mutanter.

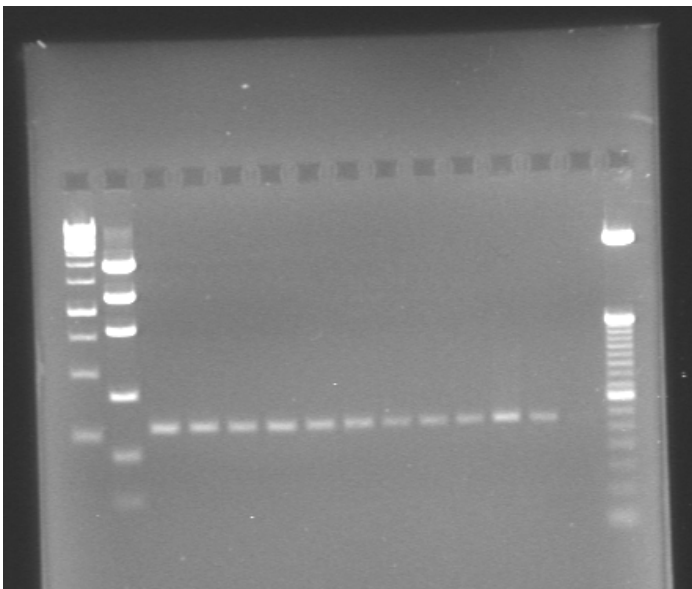
Figurene 5 - 11 viser resultater av gelelektroforese på alle PCR-produktene våre.



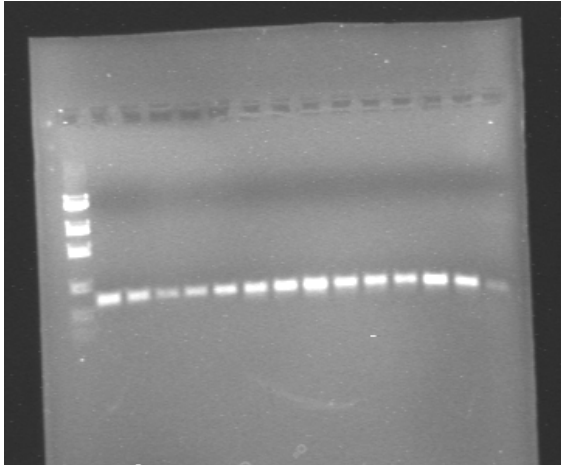
Figur 5: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Brønn (Br.) 1: fargetest. Br. 2: Low DNA Mass Ladder. Br. 3: 67 AF IV, Br. 4: 67 BF I, Br. 5: 67 BF II, Br. 6: 67 BF III, Br. 7: 67 CF I, Br. 8: 67 CF II, Br. 9: 67 CF V, Br. 10: 67 DF IV, Br. 11: 67 DF V og Br. 12: 68 BF I. Br. 13: negativ kontroll. Br. 14: 50 base pair Ladder (test på kvantifisering av PCR-produkt).



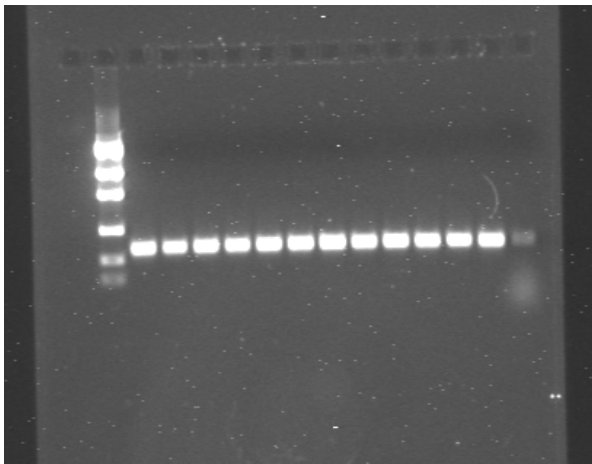
Figur 6: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Br. 1: 1 kilo-base pair Ladder (fargetest). Br. 2: Low DNA Mass Ladder. Br. 3: 68 BF III, Br. 4: 68 CF I, Br. 5: 61 AF IV, Br. 6: 61 BF IV, Br. 7: 61 BF V, Br. 8: 69 BF I, Br. 9: 69 BF III, Br. 10: 71 AF II, Br. 11: 71 AF III og Br. 12: 71 AF IV. Br. 13: uten innhold. Br. 14: negativ kontroll. Br. 15: 50 base pair Ladder (test på kvantifisering av PCR-produkt).



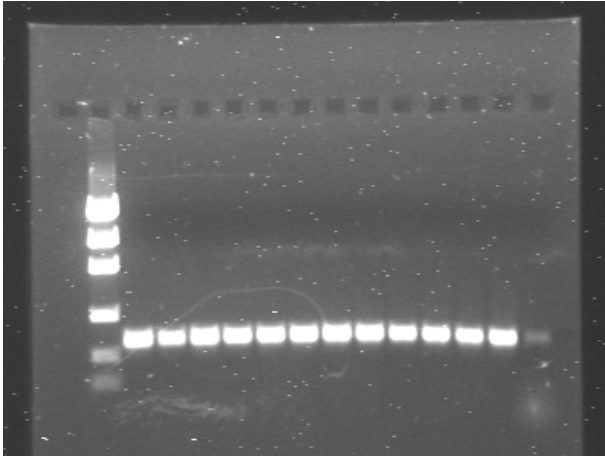
Figur 7: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Br. 1: 1 kilo-base pair Ladder (fargetest). Br. 2: Low DNA Mass Ladder. Br. 3: 71 CF II, Br. 4: 71 CF III, Br. 5: 71 CF IV, Br. 6: 71 CF V, Br. 7: 72 CF I, Br. 8: 72 CF II, Br. 9: 72 CF III, Br. 10: 72 CF V, Br. 11: 73 AF IV, Br. 12: 73 AF V og Br. 13: 73 CF III. Br. 14: negativ kontroll. Br. 15: 50 base pair Ladder (test på kvantifisering av PCR-produkt).



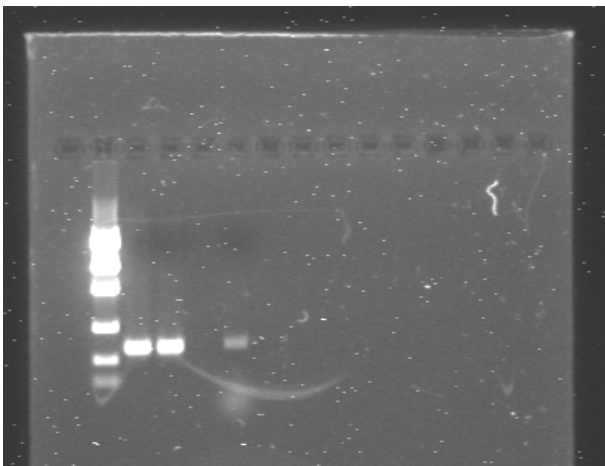
Figur 8: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Br. 1: Low DNA Mass Ladder. Br. 2: 75 BF III, Br. 3: 75 BF II, Br. 4: overslag fra 75 BF II, Br. 5: 76 CF IV, Br. 6: 76 CF I, Br. 7: 76 CF III, Br. 8: 76 AF III, Br. 9: 78 BF IV, Br. 10: 78 CF I, Br. 11: 78 CF IV, Br. 12: 78 CF V, Br. 13: 75 BF V og Br. 14: 76 AF II. Br. 15: negativ kontroll.



Figur 9: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Br. 1: fargetest. Br. 2: Low DNA Mass Ladder. Br. 3: 86 BF II, Br. 4: 83 CK, Br. 5: 85 CF I, Br. 6: 86 BK, Br. 7: 84 CF II, Br. 8: 85 CF III, Br. 9: 81 BF V, Br. 10: 81 CF IV, Br. 11: 79 CF II, Br. 12: 83 CF V, Br. 13: 80 CF IV og Br. 14: 85 CF IV. Br. 15: negativ kontroll.



Figur 10: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Br. 1: fargetest. Br. 2: Low DNA Mass Ladder. Br. 3: 86 CF V, Br. 4: 86 CF IV, Br. 5: 86 BF IV, Br. 6: 88 BF V, Br. 7: 88 BF II, Br. 8: 88 BK, Br. 9: 89 AF IV, Br. 10: 91 AK, Br. 11: 87 CF IV, Br. 12: 87 CF III, Br. 13: 87 CF II og Br. 14: 87 CK. Br. 15: negativ kontroll.



Figur 11: Gelelektroforese av PCR-produkt til mutanter. Br. 1: fargetest. Br. 2: Low DNA Mass Ladder. Br. 3: 87 BF V og Br. 4: 87 BF IV. Br. 5: uten innhold. Br. 6: negativ kontroll.

PCR-produktene i figur 8 hadde blitt kjørt om igjen. Det var fordi den negative kontrollen ble tydelig positiv ved første gangs kjøring (Det var DNA-bånd i den på nivå med prøvene). Dette betydde forurensing av den negative kontrollen. Den negative kontrollen ved vår PCR og gelelektroforese hadde nukleasefritt sterilt vann i stedet for DNA-materiale (se 2.2.3). Derfor skal det ikke være noe DNA-bånd i den ved gelelektroforese. Imidlertid opplevdes det svake DNA-bånd i nesten alle de negative kontrollene i gelproduktene våre (se figurene 5 og 8 - 11). Men ikke så mye som med gelen som ble kjørt om. Den negative kontrollen i gelene 6 og 7 unngikk derimot dette problemet. Siden den negative kontrollen ved gelelektroforese fulgte fra PCR-trinnet, innebar en forurensing av den at det måtte lages nye prøver helt fra dette trinnet (se 2.2.5). Foruten gel 8, så vi det imidlertid ikke som nødvendig å kjøre om igjen de andre gelproduktene.

Det vi ellers kan lese fra prøvematerialet i gelene, er at alle PCR-produktene hadde nok DNA-mengde og tilstrekkelig baseparlengde. Det kan vi se ut fra at samtlige prøver lå mellom andre og tredje trinn i Low DNA Mass-Ladder (se 2.2.5) vi hadde med som et hjelpemiddel for å kvantifisere produktene. DNA-båndene posisjonert slik tilsvarer mellom 200 og 400 basepar i lengde og mellom 10 og 20 ng i masse. Prøvenavnene i gelene 5 - 11 er nummeret til mutanten som PCR-produktet stammer fra. Et eksempel på det er mutant nummer 69 BF I i åttende brønn i figur 6. Dette indikerer at mutanten kommer fra forsøk 69 og er første forsøksrekke i overnattekultur B. (Dette kan sjekkes ved å gå inn på tabell 2 i forsøk 69. Da ser man at det har oppstått mutanter i forsøksrekke 1.) For forklaring av F og K i mutantene, henvises til 3.2.

3.4 Resultater fra DNA-sekvensering og fortolkning av mutasjoner ved hjelp av sekvenseringsdata

På grunnlag av de sekvenserte mutantene, fikk vi tilbake fra Genome Enterprise Limited (se 2.2.6) to illustrasjoner for hver Rif^R-sekvens som ble sekvensert. Det var en word-utskrift som summerte opp baserekkefølgen i alle mutantene vi i en omgang hadde sendt inn til sekvensering. I tillegg fikk vi tilsendt en BioEdit-fil for hver enkelt mutant. Word-utskriften ble satt inn i et blaste-program (BLAST; Basic Local Alignment

Search Tool) hentet fra nettet. BLAST er en samling programmer for analyse av biologiske sekvensdata. De blir brukt for å sammenligne DNA- eller proteinsekvenser med data fra store databaser (Altschul et al. 1990). Vårt blaste-program finnes på følgende internettside: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/gebblast.cgi?gi=19221>. Når vi satte inn word-utskriften i blaste-programmet, genererte det blaste-figurer. En slik figur inneholdt en DNA-tråd som var fasit (Sbjct-tråden) av Rif^R-sekvensen i *E. coli*-bakteriene våre, parett mot DNA-tråden fra prøvene våre (Query-tråden) (se eksempel på blaste-illustrasjoner i figurene 12 og 13, og i vedlegg). En sammenligning av disse to DNA-trådene var med på å gi svar på om mutanten vår inneholdt en reel mutasjon. Ved en baseendring i Query-tråden i forhold til Sbjct-tråden kunne det være tale om mutasjon. Men mutasjonen måtte verifiseres av den tilsvarende BioEdit-filen. Query-tallet i blaste-figuren tilsvarer posisjonene i BioEdit-filen. På en BioEdit-fil har de forskjellige basene ulike fargekoder og opptrer som kurver. Adenin har grønne kurver, cytosin blå, guanin svarte og tymin røde kurver.

Sekvenseringsdataene for mutantene i denne studien er som vedlegg. Imidlertid er det tatt med to eksempler i dette avsnittet. De viser sekvenseringsdata fra mutant 75 BF III og mutant 69 BF III, og er presentert i henholdsvis figurene 12 og 13. Grunnen til at disse sekvenseringsdataene er tatt med i resultater, er for å illustrere eksempler på en mutasjon som var litt vanskelig å tolke (se figur 12), og en lettere fortolkning (se figur 13). Man trenger noe trening for å tolke BioEdit-filene, spesielt ved usikre fortolkninger. Professor Svein Bjelland har gjort den endelige karakteriseringen av mutasjoner i denne studien ved hjelp av disse to mutasjonsillustrasjonene.

Resultater

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

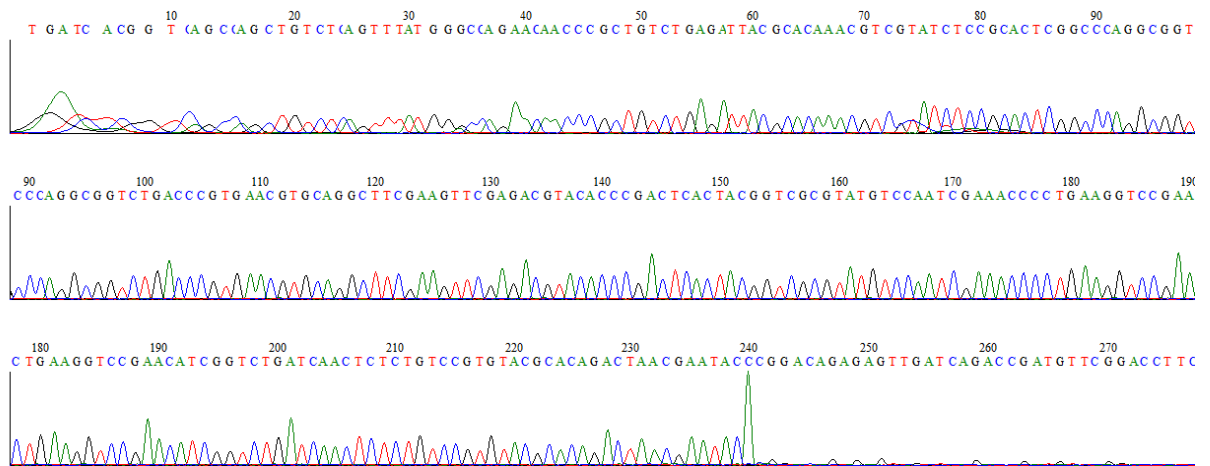
Score = 408 bits (452), Expect = 1e-114
Identities = 228/229 (99%), Gaps = 0/229 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 11      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACCAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 70
          |||
Sbjct 3453913  CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 3453854

Query 71      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 130
          |||
Sbjct 3453853  TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 131     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 190
          |||
Sbjct 3453793  AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 191     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 239
          |||
Sbjct 3453733  CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
```



Figur 12: DNA-sekvensering av mutant 75 BF III fra *alkA*⁻ mutant hos *E. coli* ved 0,2 mM 5-formyldeoksyuridin. Blaste-figur er øverst og BioEdit-fil nederst. Figurene er importert fra henholdsvis blaste- og BioEdit-fil-programmene vi brukte. Mutasjonen er ved Query-nummer 34 i blasten og i samme posisjon i BioEdit-filen. Basesubstitusjonen går fra A → G. For nærmere forklaring, se tekst under.

tilhørende kurver er også henholdsvis guanin og tymin. Men i tillegg ligger en kurve fra en cytosinbase over disse basene. Vi ser fra BioEdit-filer til både figurene 12 og 13 at kurvene igjen er utflytende fra cirka posisjon 240. Dette er tilfellet for alle BioEdit-filene våre (se vedlegg). I BioEdit-filen til figur 12 er det en cytosin ved denne posisjonen, men kurven er en adeninkurve. Men fordi BioEdit-filene ikke kan tolkes ved omtrent denne posisjonen, regnes ikke en "mutasjon" her som er reell. Den faktiske mutasjonen i figur 12 er ved Query-nummer 34 i blaste-figuren (mutasjonen går fra A → G). Dette gir en A·T → G·C-basesubstitusjon. Denne mutasjonen er vanskelig å tolke. Ved posisjon 34 i BioEdit-filen, er det en svart guaninkurve. Men i tillegg er det en grønn, litt mindre adeninkurve oppå guaninkurven. Altså den basen Rif^R-sekvensen hadde før substitusjonen. Det viser at vi er avhengig av BioEdit-filen for å regne en mutasjon i en blast som sikker. Mutanten blir allikevel tolket til å ha en A·T → G·C-transisjon, altså at adenin er skiftet ut med guanin i posisjon 34 i Rif^R-sekvensen. Men for å finne ut om en slik posisjon i BioEdit-filen inneholder en reell mutasjon, må man ha litt erfaring i å tolke slike data.

3.4.2 FORTOLKNING AV SEKVENSERINGSDATA I FIGUR 13

Fenomenet som har skjedd ved posisjonene 73 og 74 i BioEdit-filen til figur 12 er til stede også i BioEdit-filen til mutant 69 BF III i figur 13. Imidlertid oppstår fenomenet her ved posisjonene 75 og 76. Det ser vi, fordi de samme basene er involvert. Ellers er kurvebildet ganske "ryddig" fra mellom posisjonene 20 og 30 i denne DNA-sekvensen også. Blaste-figuren i figur 13 fortjener imidlertid større oppmerksomhet. Foruten den virkelige mutasjonen, er det også mutasjoner ved Query-numrene 6 og 11 i denne illustrasjonen. Det er to T → A-mutasjoner. Blastene i vårt program viser vanligvis mange "mutasjoner" i begynnelsen av Rif^R-sekvensen, som her. Men dette er veldig usikre mutasjoner. Det er fordi, som vi ser, kurvene er veldig utflytende i begynnelsen av de tilsvarende BioEdit-filene. Hvis vi i tillegg går inn på BioEdit-filen ved disse posisjonene, ser vi også i begge tilfellene, at det er ingen adeninkurver i disse posisjonene. Det er tyminkurver som dominerer bildet. Det vil si baser som er i Sbjct-tråden, og som var "fasiten" på Rif^R-sekvensen vår. Et annet fenomen dukket også opp i blasteillustrasjonen i figur 13. Det er en strek i Query-tråden ved posisjon 14, istedenfor en base. Dette illustrerer at Query-tråden "hopper" over en base i Sbjct-

tråden. Det kalles et "gap" i blasten. Denne strekposisjonen i "vår" DNA-tråd er egentlig en ikke-eksisterende posisjon. Derfor regnes den ikke med Query-nummeret. Men fordi det kan skjule seg mutasjoner bak disse posisjonene, må en slik posisjon alltid undersøkes på BioEdit-filen. Vi ser imidlertid på den tilhørende BioEdit-fil, at alle kurvene i det området tilhører en posisjon. Det vil si at det ikke er noen doble kurver. Derfor kan vi ser bort fra streken i dette sekvenseringsresultatet. Den faktiske mutasjonen i figur 13 er ved Query-nummer 81 i blasten (mutasjonen går fra C → A). Det betyr at det har oppstått en G·C → T·A-transversjon. Vi ser her en sekvensering som har en tydelig fortolkning. Ved posisjon 81 i BioEdit-filen er det en klar grønn adeninkurve som går ned i grunnlinjen. Den har lite overlapping fra omkringliggende kurver. Det gjør at denne mutasjonen er lett å fastslå.

Det er verdt å merke seg at funnene i BioEdit-filene ved henholdsvis posisjonene 73 og 74 i figur 12, og posisjonene 75 og 76 i figur 13, ikke støttes av de tilhørende blaste-figurer.

En oppsummering av indikasjoner for mutasjoner i sekvenseringsdata blir da slik; for at en mutasjon i blaste-figur skal være sikker må basen i Query-tråden være forskjellig fra base i Sbjct-tråd. Denne baseendringen må samsvare med BioEdit-filen. Kurven i BioEdit-filen må også være ganske tydelig. Den må i tillegg helst ende i grunnlinjen, og ikke ha for mange overlappende og høyere kurver (ha et ganske "ryddig" kurvebilde).

3.5 Utrekning av mutasjonsrate

Som gjentatt før, bruker nå mutageneseprosjektet mutasjonsrate som et mål for mutasjonshyppighet (se 2.1.9).

Mutasjonsratene utregnet i prosjektet er ikke direkte relatert til å gi svar på problemstillingen i denne studien. Det er fordi det ikke er regnet ut mutasjonsrater eksplisitt for mutasjonsmaterialet i vårt arbeid. Men mutasjonstendensene i denne studien ble sammenlignet med mutasjonsrater i det større prosjektet (se 3.6). Og der de samsvarte, kunne det underbygge gyldigheten av at mutasjonene i studien hadde oppstått som en følge av fdU-påvirkning.

På samme måte er heller ikke antall kolonier på glukose- og rifampicinplater direkte relatert til karakterisering av basesubstitusjoner i studien. Men de var også indirekte med på å verifisere disse. Det er fordi de før nevnte mutasjonsrater, blant andre kolonitall, også nyttet kolonitallene i vår studie til utregningen av dem (se 2.1.6 og 2.1.9). Som nevnt i disse punktene, og også i dette avsnittet, så brukes forsøksrekker uten mutanter (andre tabell i hvert enkelt forsøk, se 3.2) og den totale bakteriekonsentrasjonen i tilhørende kultur til utregning av mutasjonsrater. Så på den måten, har kolonitallene i denne studien bidratt til mutasjonsrater i det større prosjektet.

Mutasjonsrate er definert som antall mutasjoner per celledeling (Luria og Delbrück 1943; Rosche og Foster 2000). Den utregningsmetode som er brukt til utregning av mutasjonsrate i prosjektet, kalles p_0 -metoden (Rosche og Foster 2000). Det er en Luria og Delbrück-metode (1943) basert på fluktuasjonstest (fluktuere = variere). Fluktuasjonstesten går ut på å bestemme fordelingen av mutanter i de parallelle kulturene i et forsøk. Denne fordelingen er med på å bestemme mutasjonsraten. Ved p_0 -metoden tar man utgangspunkt i antall kulturer med null mutasjoner.

Formelen for p_0 ved null mutasjoner er:

$p_0 = e^{-\mu n}$, der μ er mutasjonsraten og n er antall bakterier i kulturen per ml. Hvis n er stor, og utgangsverdien var liten, er bakterietallet i kulturen omtrent lik antall celledelinger (Griffiths et al. 2000).

Denne utregningen kan demonstreres ved følgende eksempel:

11 av 20 kulturer i et eksperiment har ikke mutanter og $n = 2 \times 10^7$ celledelinger per kultur.

μ blir da den eneste ukjente i formelen, og kan løses med hensyn på e :

$$11/20 \text{ mutasjoner per kultur} = e^{-\mu \times 2 \times 10^7 \text{ celledelinger per kultur}}$$

$$\rightarrow 0,55 \text{ mutasjoner per kultur} = e^{-\mu \times 2 \times 10^7 \text{ celledelinger per kultur}}$$

$$\rightarrow \mu \times 2 \times 10^7 \text{ celledelinger per kultur} = -\ln 0,55 \text{ mutasjoner per kultur}$$

→ $\mu = -\ln 0,55$ mutasjoner per kultur/ 2×10^7 celledelinger per kultur

→ $\mu =$ mutasjonsrate $= 3 \times 10^{-8}$ mutasjoner per celledeling (eksempelet er tatt fra Griffiths et al. 2000).

n kan regnes som gjennomsnittlig antall celler i kulturene. Men i dette mutageneseprosjektet har professor Bjelland i stedet bestemt at medianen av celletall i kulturen skal brukes (Grøsvik, K., personlig kommunikasjon). Det er fordi prosjektet har vart så lenge og så mange forskjellige personer har vært involvert. Forsøkene er derfor utført under ganske varierende forhold. Dessuten er det levende materiale vi har brukt, og veksten til bakterier kan være varierende. Det er erfart mange ganger, og vi opplevde det også i denne studien. Så tanken bak å bruke median i stedet for gjennomsnitt, var for å få vekk de kolonitallene som var minst representative for bakterietallet i kulturene. Det ble også bestemt at bakterieveksten i en kultur (som vi finner ved å telle bakteriekoloniene på glukoseskåler) ikke skulle være mindre enn 1×10^7 per ml for at mutantene skulle være en del av resultatene i prosjektet (Grøsvik, K., personlig kommunikasjon). En grunn til det var, som nevnt (se 2.1.6), at en adekvat vekst på glukoseskålene var en indikasjon på at *E. coli*-stammen vi jobbet med var levedyktig. Da var det også større sjanse for at mutantene på rifampicinskålene stammet fra bakteriene av interesse. En annen grunn er at vi ser ut fra mutasjonsrateformelen, at bakterietallet i kulturene er med på å bestemme mutasjonsraten. Hvis bakteriestammen var svekket og ga lav vekst ved utsåing, var det ikke sikkert at den utregnede mutasjonsraten ved vår metode, var representativ for antall mutasjoner som oppsto i stammen under forsøkene.

3.6 Identifisering av basesubstitusjoner ved hjelp av DNA-sekvensering, og verifisering av disse ved sammenligning av mutasjonsrater i mutageneseprosjektet

Fra forsøkene i denne studien, oppsto det 57 mutanter som vi sendte inn til DNA-sekvensering. I tillegg ble det karakterisert 12 mutanter som ble dyrket fram i eksperimenter før denne studien. Vi kjørte imidlertid PCR på dem, og de ble sekvensert i denne studien. Derfor var det naturlig å ta disse resultatene med. Totalt 69 mutanter

Resultater

ble dermed karakterisert i denne studien (se vedlegg). Imidlertid så viste det seg at fem av disse ikke inneholdt mutasjoner. Tre av disse mutantene inneholdt derimot to mutasjoner i Rif^R-sekvensen. Resultatene i denne studien består da altså av 62 mutasjoner som har oppstått under påvirkning av fdU (se tabellene VII og VIII), og fem mutasjoner uten (se tabell IX).

Tabell VII: Mutasjoner karakterisert i denne studien hos villtype-*E. coli* ved 0,2 mM og 0,4 mM 5-formyldeoksyuridin (fdU). Antall basesubstitusjoner er i parentes.

| Basesubstitusjonstyper: | Mutasjoner i villtype- <i>E. coli</i> | |
|-------------------------|---------------------------------------|------------|
| | 0,2 mM fdU | 0,4 mM fdU |
| A·T → C·G | 0 | 0 |
| G·C → A·T | 35,3 % (6) | 60 % (3) |
| G·C → C·G | 0 | 0 |
| G·C → T·A | 23,5 % (4) | 40 % (2) |
| A·T → T·A | 0 | 0 |
| A·T → G·C | 41,2 % (7) | 0 |
| SUM: | 100 % (17) | 100 % (5) |

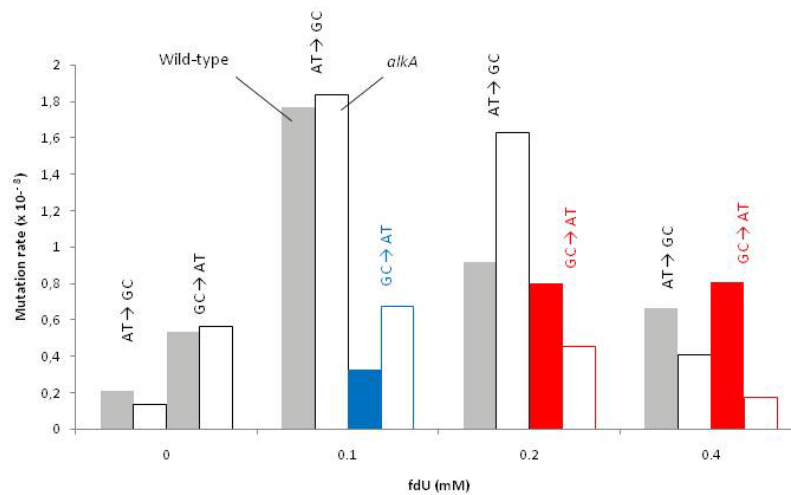
Tabell VIII: Mutasjoner karakterisert i denne studien i *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* ved 0,2 mM og 0,4 mM 5-formyldeoksyuridin (fdU). Antall basesubstitusjoner er i parentes.

| Basesubstitusjonstyper: | Mutasjoner i <i>alkA</i> ⁻ -mutant hos <i>E. coli</i> | |
|-------------------------|--|------------|
| | 0,2 mM fdU | 0,4 mM fdU |
| A·T → C·G | 4,2 % (1) | 6,3 % (1) |
| G·C → A·T | 16,7 % (4) | 18,7 % (3) |
| G·C → C·G | 0 | 6,3 % (1) |
| G·C → T·A | 8,3 % (2) | 43,7 % (7) |
| A·T → T·A | 4,2 % (1) | 12,5 % (2) |
| A·T → G·C | 66,6 % (16) | 12,5 % (2) |
| SUM: | 100 % (24) | 100 % (16) |

Tabell IX: Karakterisering av mutasjoner i denne studien i villtype-*E. coli* og *alkA*⁻-mutant hos *E. coli* vokst uten påvirkning av 5-formyldeoksyuridin (fdU).

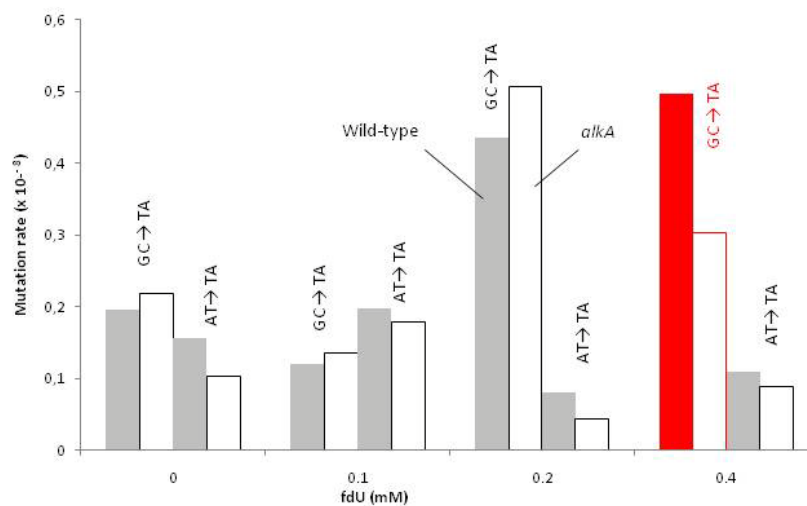
| Basesubstitusjonstyper: | Antall mutasjoner i villtype- <i>E. coli</i> vokst uten påvirkning av fdU | Antall mutasjoner i <i>alkA</i> ⁻ -mutant hos <i>E. coli</i> vokst uten påvirkning av fdU |
|-------------------------|---|--|
| A·T → C·G | | 1 |
| G·C → A·T | 2 | |
| G·C → C·G | | |
| G·C → T·A | 1 | |
| A·T → T·A | 1 | |
| A·T → G·C | | |
| SUM: | 4 | 1 |

Resultater



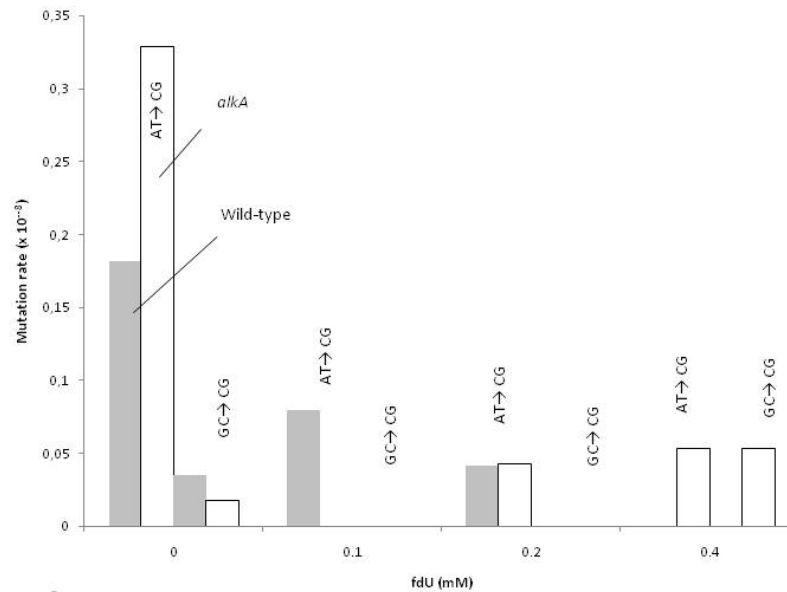
Figur 14 A:

Søylediagram over mutasjonsrater i mutageneseprosjektet per april 2010. Figuren viser mutasjonsrater til A·T → G·C- og G·C → A·T-transisjoner i villtype-*E. coli* og *alkA*-mutanten hos *E. coli*. For videre forklaring, se tekst under.



Figur 14 B:

Søylediagram over mutasjonsrater i mutageneseprosjektet per april 2010. Figuren viser mutasjonsrater til G·C → T·A- og A·T → T·A-transversjoner i villtype-*E. coli* og *alkA*-mutanten hos *E. coli*. For videre forklaring, se tekst under.



Figur 14 C:

Søylediagram over mutasjonsrater i mutageneseprosjektet per april 2010. Figuren viser mutasjonsrater til A·T → C·G- og G·C → C·G-transversjoner i villtype-*E. coli* og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli*. For videre forklaring, se tekst under.

Forklaring til figurene 14 A - C:

Disse tre figurene viser fordeling av mutasjonsrater for de seks mulige basesubstitusjonene uttrykt for mutageneseprosjektet per april 2010. Villtype-*E. coli* illustreres med fylte søyler og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* illustreres med åpne søyler. Mutasjonsratene er en funksjon av 5-formyldeoksyridin (fdU) -konsentrasjon, og de er oppgitt i x 10⁻⁸ mutasjoner per celledeling. Røde søyler er promotering av mutasjoner i villtype. Blå søyle er et eksempel på hemming av mutasjoner i villtypen (altså promotering i *alkA*⁻-mutanten). Dette gjelder villtypesøylen til G·C → A·T-transisjonen ved 0,1 mM fdU. Figurene 14 A - C er produsert av postdoktor Kristin Grøsvik i mutageneseprosjektet. Grøsvik har også vært med på å beregne mutasjonsratene i disse figurene. Mutasjonene i denne studien er innbakt i søyler uten mutagen, og henholdsvis 0,2 mM og 0,4 mM fdU-søylene.

Det oppsto 26 mutasjoner hos villtype-*E. coli* fordelt på syv forsøk. Bakteriestammen ble bare representert ved basesubstitusjonene; A·T → G·C, G·C → A·T og G·C → T·A ved tilstedeværelse av fdU. Ved 0,2 mM fdU oppsto det syv A·T → G·C-, seks G·C → A·T- og

fire G·C → T·A-mutasjoner (se tabell VII). Samme *E. coli*-stamme ved 0,4 mM fdU hadde fem mutasjoner fordelt på tre G·C → A·T-basesubstitusjoner og to G·C → T·A-mutasjoner (se tabell VII). Fire av mutantene som ble karakterisert fra villtype-*E. coli* oppsto uten fdU-tilsetning. Disse besto av to G·C → A·T-transisjoner og én av hver av transversjonene G·C → T·A og A·T → T·A (se tabell IX).

alkA⁻-mutanten hos *E. coli* fikk 41 mutasjoner på 15 forsøk. Som ved villtype, oppsto også mutasjonene A·T → G·C, G·C → A·T og G·C → T·A hyppigst i *alkA*⁻-mutanten ved tilsetning av mutagen. Ved mutagenkonsentrasjonen på 0,2 mM oppsto det henholdsvis seksten A·T → G·C-, fire G·C → A·T- og to G·C → T·A-mutasjoner (se tabell VIII). I tillegg ble det dyrket fram én av hver av A·T → T·A- og A·T → C·G-basesubstitusjonene. Det oppsto ingen G·C → C·G-transversjoner ved 0,2 mM fdU. *alkA*⁻-mutanten ved 0,4 mM fdU hadde to A·T → G·C-, tre G·C → A·T- og syv G·C → T·A-mutasjoner. Det oppsto også to A·T → T·A-basesubstitusjoner. Én av hver av de mutagene forandringene A·T → C·G og G·C → C·G ble i tillegg produsert av denne mutanten ved tilsetning av den høyeste fdU-konsentrasjonen (se tabell VIII). Én av mutantene hadde vokst uten tilsetning av fdU, og det var en A·T → C·G-transversjon (se tabell IX).

3.6.1 SAMMENLIGNING AV MUTASJONSTYPER HOS VILLTYPE og *alkA*⁻-MUTANT HOS *E. coli* VED 0,2 mM fdU

Når vi sammenligner villtype-*E. coli* med *alkA*⁻- ved 0,2 mM fdU i tabellene VII og VIII ser vi som sagt, at transisjonene A·T → G·C og G·C → A·T, og transversjonen G·C → T·A var hyppigst representert i begge to bakteriestammene. Imidlertid var de representert i varierende grad. A·T → G·C-basesubstitusjonen opptrådte 25,4 % hyppigere hos mutanten i forhold til i villtype-*E. coli* (se tabellene VII og VIII). Imidlertid så forekom G·C → A·T og G·C → T·A oftere i villtypestammen. De opptrådte henholdsvis 18,6 % og 15,2 % hyppigere i den reparasjonsdyktige stammen i forhold til den reparasjonsdefekte (se tabellene VII og VIII). I tillegg hadde som nevnt over, *alkA*⁻-mutanten ved denne fdU-konsentrasjonen også én av hver av basesubstitusjonene A·T → T·A- og A·T → C·G. Disse utgjorde hver 4,2 % av mutasjonsmaterialet i mutanten.

3.6.2 SAMMENLIGNING AV MUTASJONSTYPER HOS VILLTYPE OG *alkA*⁻-MUTANT HOS *E. coli* VED 0,4 mM fdU

Når vi sammenligner de to *E. coli*-typene ved 0,4 mM fdU i tabellene VII og VIII, ser vi at det var ingen A·T → G·C-transisjoner i villtypevarianten ved denne mutagenkonsentrasjonen. Dette til tross for at mutasjonen var hyppig representert i begge *E. coli*-stammene ved 0,2 mM fdU (se tabellene VII og VIII). Men i mutanten var det to stykker av transisjonen ved den høyeste fdU-konsentrasjonen. Dette utgjør 12,5 % (se tabell VIII). Vi ser også at basesubstitusjonene G·C → A·T og G·C → T·A oppsto oftest i begge bakterietypene ved 0,4 mM fdU. Villtypen ved 0,4 mM fdU hadde bare disse mutasjonstypene. G·C → A·T ble induert 41,3 % oftere i villtype-*E. coli* i forhold til *alkA*⁻-mutanten (se tabellene VII og VIII). Med G·C → T·A-transversjonen var tendensen omvendt. Den var til stede i større grad i den reparasjonsdefekte varianten i forhold til den reparasjonsdyktige (se tabellene VII og VIII). Men forskjellen utgjorde bare 3,7 %. I sammenligningen mellom de to *E. coli*-typene ved 0,4 mM fdU, var det også bare her mutanten som inneholdt transversjonene A·T → T·A og A·T → C·G. Deres andel av mutasjoner i *alkA*⁻-mutanten var henholdsvis 12,5 % og 6,3 %. I tillegg forekom den eneste G·C → C·G-transversjonen som oppsto i vårt mutasjonsmateriale i mutanten ved denne fdU-konsentrasjonen. Den utgjorde også 6,3 % i den reparasjonsdefekte bakterien.

3.6.3 FORSKJELLER I BASESUBSTITUSJONSTYPER VED 0,2 mM OG 0,4 mM fdU

Forskjeller i antall basesubstitusjonstyper hos villtype-*E. coli* og *alkA*⁻-mutant ved 0,2 mM og 0,4 mM fdU i denne studien kan oppsummeres slik:

A·T → G·C ble induert 25,4 % oftere i mutanten ved 0,2 mM fdU. Ved 0,4 mM fdU oppsto den ikke i villtype. Men den var til stede i 12,5 % grad i mutanten.

G·C → A·T ble induert henholdsvis 18,6 % og 41,3 % oftere i villtypen ved 0,2 mM og 0,4 mM fdU.

G·C → T·A ble induert 15,2 % oftere i villtype ved 0,2 mM fdU og 3,7 % oftere i mutant ved 0,4 mM fdU.

Transversjonene A·T → T·A, A·T → C·G og G·C → C·G ble ikke dyrket fram fra villtype-*E. coli*, bare hos *alkA*⁻-mutant ved tilsetning av fdU. De oppsto oftest ved 0,4 mM fdU.

Faktisk opptrådte de til sammen i dobbelt så stor grad hos *alkA*⁻-mutanten ved 0,4 mM fdU i forhold til ved 0,2 mM fdU (fire basesubstitusjoner mot to, se tabell VIII).

A·T → T·A forekom 8,3 % oftere i *alkA*⁻-mutanten ved 0,4 mM fdU i forhold til ved 0,2 mM fdU.

A·T → C·G forekom 2,1 % oftere i *alkA*⁻-mutanten ved 0,4 mM fdU i forhold til ved 0,2 mM fdU.

G·C → C·G forekom i 6,3 % grad i *alkA*⁻-mutanten ved 0,4 mM fdU. Transversjonen oppsto ikke hos mutanten ved 0,2 mM fdU.

3.6.4 SAMMENLIGNING AV MUTASJONSHYPPIGHET HOS BASESUBSTITUSJONER OPPSTÅTT UNDER PÅVIRKNING AV fdU MED SAMME BASESUBSTITUSJONER INDUSERT UTEN MUTAGENET

Validiteten til mutasjonstrender ved tilsetning av mutasjonsfremmende stoff, måles med at de overgår de naturlige mutasjonstrendene. Så før vi kan si noe om reelle mutasjonstendenser hos de ulike bakterievariantene våre ved tilsetning av fdU, må vi sammenligne denne tendensen med mutasjonstendens hos de samme bakteriestammene uten tilsetning av mutagen. Det er fordi de bakterietypene vi brukte også hadde et visst mønster i forhold til spontane mutasjoner, og disse kunne gjerne også innbyrdes være forskjellig i de to bakterievariantene. Av tabell IX, ser vi at vi hadde samlet på få mutanter fra det vekstmiljøet. Forklaringen er (se begynnelsen av dette kapitlet), at det regnes at man i mutageneseprosjektet har samlet nok kontroller til å vise trend til de ulike basesubstitusjonene som oppsto uten påvirkning av fdU. Siden vi ikke tok vare på alle mutantene under disse vekstforholdene, ble de heller ikke representative for den spontane mutasjonstendensen ved vårt mutasjonsmateriale. Og siden vi ikke kunne sammenligne mutasjonstendens med og uten fdU, hadde vi egentlig ikke kontroller på gyldighet av våre mutasjoner. Det nærmeste vi kom kontroller for våre mutasjoner, var kontrollmutasjonsratene i figurene 14 A - C (basesubstitusjoner oppstått uten tilsetning av fdU). Det var fordi disse kontrollmutasjonsratene var oppnådd i samme type forsøk som våre. Men for at vi kunne se om mutasjonshyppighet i denne studien overgikk kontroller for mutasjonsrater, måtte de først sammenlignes med mutasjonsrater (se figurene 14 A - C) for tilsvarende basesubstitusjon og fdU-konsentrasjon.

Følgende kriterier må da oppfylles før vi kan antyde om tendenser ved vårt mutasjonsmateriale kan være et utslag av fdU-påvirkning:

Trendene for mutasjonshyppighet i våre resultater må være sammenfallende med trendene for mutasjonsrater i det større prosjektet, og de igjen må være større enn spontane mutasjonsrater. De sistnevnte ratene er uttrykk for kontroller i mutageneseprosjektet, og de må være kontroller for våre resultater også, siden vi har så få egne "kontroller".

3.6.4.1 SAMMENLIGNING AV BASESUBSTITUSJONER I DENNE STUDIEN MED MUTASJONSRATER VED 0,2 mM fdU OG KONTROLLMUTASJONSRATER

I våre resultater er det flere A·T → G·C (25,4 % flere) i mutant i forhold til villtype. Det er flere G·C → A·T (18,6 % flere) i villtype i forhold til mutant, og det er flere G·C → T·A (15,2 % flere) i villtype i forhold til mutant. Én A·T → T·A og én A·T → C·G (utgjør hver 4,2 %) oppstår i mutant. Ingen av disse sjeldne transversjonene forekommer i villtype. Transversjonen G·C → C·G blir verken indusert i villtype eller mutant ved denne fdU-konsentrasjonen.

Mutasjonsratene (se figurene 14 A - C) viser flere A·T → G·C i mutant i forhold til villtype. De viser flere G·C → A·T i villtype i forhold til mutant og de viser flere G·C → T·A i mutant i forhold til villtype. De viser flere A·T → T·A i villtype i forhold til mutant, og de viser bitte litt flere A·T → C·G i mutant i forhold til villtype.

Kontrollmutasjonsratene (se figurene 14 A - C) for A·T → G·C er lavere enn mutasjonsratene ved 0,2 mM fdU, både i villtype og mutant. De er også lavere for G·C → A·T i villtype ved 0,2 mM fdU og for G·C → T·A-transversjonen i villtype og mutant. Men A·T → T·A og A·T → C·G har høyere kontrollmutasjonsrater i villtype og mutant enn mutasjonsratene for transversjonene ved 0,2 mM fdU. Det viser at trendene i mutasjonsrate kun er gyldige for de tre vanligste mutasjoner. Våre resultater ved 0,2 mM fdU følger trender for mutasjonsrater ved A·T → G·C-transisjoner i mutant og G·C → A·T-transisjoner i villtype. Dette er når sistnevnte rater er verifisert opp mot kontrollmutasjonsrater.

3.6.4.2 SAMMENLIGNING AV BASESUBSTITUSJONER I DENNE STUDIEN MED MUTASJONSRATER VED 0,4 mM fdU OG KONTROLLMUTASJONSRATER

I våre resultater er det flere A·T → G·C (utgjør 12,5 %) i mutant i forhold til villtype. Det er flere G·C → A·T (41,3 % flere) i villtype i forhold til mutant, og det er flere G·C → T·A (3,7 % flere) i mutant i forhold til villtype. Det er to A·T → T·A (utgjør 12,5 %) og én av hver av A·T → C·G og G·C → C·G i mutant (utgjør hver 6,3 %). Det er ingen av disse mutasjonene i villtype.

Mutasjonsratene (se figurene 14 A - C) er høyere i villtype enn i mutant både når det gjelder A·T → G·C, G·C → A·T og G·C → T·A. De er også høyere for A·T → T·A i villtype i forhold til mutant. Når det gjelder A·T → C·G og G·C → C·G, er mutasjonsrater for basesubstitusjonene høyere i mutant i forhold til villtype. Faktisk er det ingen av disse transversjonene i villtype ved 0,4 mM fdU (se figur 14 C, søyler for A·T → C·G og G·C → C·G ved 0,4 mM fdU).

Kontrollmutasjonsrater (se figurene 14 A - C) for de hyppig forekommende A·T → G·C og G·C → T·A-basesubstitusjonene er lavere enn mutasjonsrater, både i villtype og mutant. For G·C → A·T-transisjonen er kontrollmutasjonsratene lavere i villtypen enn ratene ved 0,4 mM fdU. Derfor er mutasjonsratene for disse basesubstitusjonene gyldige. Kontrollmutasjonsrater for A·T → T·A og A·T → C·G i mutant er høyere enn de tilsvarende mutasjonsratene for transversjonene ved denne fdU-konsentrasjonen. Av samme grunn som nevnt over, er mutasjonsratene for disse transversjonene ved tilsetning av 0,4 mM fdU da ikke gyldige. Ratene for G·C → C·G i mutant ved den høyeste fdU-konsentrasjonen er derimot gyldige, fordi de er høyere enn kontrollmutasjonsratene. Våre resultater ved 0,4 mM fdU følger trender for mutasjonsrater ved G·C → A·T-transisjoner i villtype og G·C → C·G-transversjoner i mutant. Dette er når sistnevnte rater er verifisert opp mot kontrollmutasjonsrater.

3.6.4.3 SAMMENLIGNING AV SPONTANE MUTASJONER I DENNE STUDIEN MED KONTROLLMUTASJONSRATER

Likt som for de andre mutasjonene i studien, ble mutantene som oppsto uten tilstedeværelse av fdU, innbakt i mutasjonsrater i mutageneseprosjektet. I kontrollmutasjonsratene (se figurene 14 A - C) i disse tilfellene. Vi foretok en sammenligning av våre spontane basesubstitusjoner med kontrollmutasjonsrater i det

større prosjektet, for å se om de fulgte lignende trender. Det er interessant fordi prosjektet har mange flere slike spontane mutasjoner, og de blir på en måte fasit for det spontane mutasjonsmønsteret i denne studien. Ved denne sammenligningen gjorde vi følgende funn:

Fra villtype-*E. coli* blant våre mutanter som hadde vokst uten fdU, plukket vi ut to G·C → A·T og én av hver av G·C → T·A og A·T → T·A (se tabell IX). Kontrollmutasjonsrater (se figurene 14 A - C) viser nettopp at G·C → A·T er den hyppigste mutasjonstypen i villtype (se figur 14 A). Det at sekvenseringen avdekket én av hver av G·C → T·A og A·T → T·A blant våre spontane mutasjoner, kan tyde på at disse også er forholdsvis hyppige i det spontane mutasjonsmaterialet. Imidlertid ligger G·C → T·A omtrent "midt på treet" med hensyn på kontrollmutasjonsrater i villtype. Transisjonen ligger på nivå med A·T → G·C (se figurene 14 A og B). Når det gjelder A·T → T·A, er det den nest sjeldneste basesubstitusjonen i villtype-kontrollene i prosjektet (se figur 14 B). Det er bare transversjonen G·C → C·G som har lavere kontrollmutasjonsrater (se figur 14 C).

Fra *alkA*⁻-mutanten i våre forsøk plukket vi bare ut én spontan mutasjon (se tabell IX). Den ble sekvensert til å være en A·T → C·G-transversjon. Med det kan man statistisk sett anta, at denne basesubstitusjonen forekommer ganske ofte blant de spontane mutasjoner hos *alkA*⁻-mutanten i våre resultater. A·T → C·G har nest hyppigst kontrollmutasjonrate hos *alkA*⁻-mutanten (se figur 14 C). Som ved villtype-*E. coli*, er det G·C → A·T som har de høyeste spontane mutasjonsrateverdiene i mutanten også (se figur 14 A).

3.6.5 GENERELL SAMMENLIGNING AV MUTASJONSHYPPIGHET I DENNE STUDIEN HOS VILLTYPE OG *alkA*⁻-MUTANTEN HOS *E. coli* UNDER PÅVIRKNING AV fdU

I forbindelse med mutasjonshyppighet, er det riktigst å ta utgangspunkt i antall forsøksrekker ved de to bakterietypene, og ikke antall forsøk. Fordi det varierte om vi i et forsøk gikk videre med én eller to overnatte kulturer. En overnatte kultur ga vanligvis seks forsøksrekker, inkludert kontrollrekke (se de to tabellene i hvert forsøk i 3.2). En forsøksrekke ble sådd ut på seks rifampicinplater. Så desto flere forsøksrekker vi hadde i et forsøk, jo flere rifampicinskåler ble det og jo større mulighet var det for mutantene til å vokse. Derfor er det antall forsøksrekker som kan relateres til mutasjonshyppigheten, og ikke forsøk.

Resultater

Antall forsøksrekker til de to bakterievariantene som vokste ved tilsetning av fdU, er oppgitt i første kolonne i tabellene V og VI. Det blir da 22 mutasjoner i villtype-*E. coli* (se tabell VII) på til sammen 56 forsøksrekker, og 40 mutasjoner (se tabell VIII) fordelt på 127 forsøksrekker i *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli*. Ut fra disse tallene, ser vi at forholdet mellom mutasjoner og forsøksrekker i villtype-*E. coli* er $22/56 = 0,39$ og $40/127 = 0,31$ i *alkA*⁻-mutanten. Vi ser da at av de to bakterievariantene vi jobbet med, får villtype-*E. coli* det høyeste forholdet mellom mutasjoner og forsøksrekker.

4. DISKUSJON

I dette kapittelet vil funnene i studien bli drøftet i lys av øvrige funn i mutageneseprosjektet. Disse vil også bli satt i sammenheng med andre relevante forskningsresultater. Til slutt vil validiteten til funnene bli vurdert på bakgrunn av noen av de metodene som er nyttet for å besvare studiens problemstilling.

4.1 Drøfting av studiens funn

Den overordnede hensikten med studien har vært å generere mer kunnskap om "DNA-reparasjon og mutasjoner". Mer spesifikt har det vært ønskelig at resultater fra arbeidet skal bidra til at man i større grad kan si noe om en eventuell dobbeltfunksjon hos DNA-glykosylasen AlkA (se 1.7). I denne sammenhengen er det derfor undersøkt om det er forskjell i mutasjonstyper og antall mutasjoner forårsaket av tilsatt 5-formyldeoksyuridin (fdU) mellom villtype-*E. coli* og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli*. Den eneste forskjellen mellom de to *E. coli*-varianter, er at førstnevnte har et intakt *alkA*-gen, mens hos *alkA*⁻-mutanten er dette genet defekt.

Fra *in vitro*-studier (Bjelland et al. 1994; Masaoka et al. 1999b), er det funnet at den hyppige ROS-lesjonen 5-formyluracil (fU) først og fremst blir reparert av det enzymet som *alkA*-genet koder for: AlkA-reparasjonsenzymet. For å vurdere om det samme skjer *in vivo* ble de to bakterievariantene i denne studien eksponert overfor 0,2 mM og 0,4 mM fdU.

Som nevnt i introduksjonen av denne oppgaven (se 1.5), er de hyppigste basesubstitusjonene som blir induisert av fU i *E. coli* transisjonene A·T → G·C og G·C → A·T, og transversjonen G·C → T·A (Fujikawa, Kamiya, og Kasai 1998; Grøsvik 2009; Ånensen et al. 2001). Transversjonene A·T → T·A, A·T → C·G og G·C → C·G er mer sjeldne under denne mutagenpåvirkningen. Arbeidene til Ånensen med kollegaer (2001) indikerte også at mutasjonshyppigheten av de vanligste basesubstitusjonene var i rekkefølgen som er skissert over (A·T → G·C > G·C → A·T > G·C → T·A). De fant i tillegg at A·T → T·A forekom hyppigere i *E. coli* ved fdU-induksjon enn A·T → C·G.

Imidlertid ble det i dette arbeidet ikke funnet holdepunkter for at G·C → C·G kunne oppstå som en følge av fdU. Men Grøsvik (2009) gjorde slike oppdagelser.

I overensstemmelse med dette, viser også vårt mutasjonsmateriale at de hyppigste mutasjonstypene som oppstår ved tilstedeværelse av fdU, er A·T → G·C, G·C → A·T og G·C → T·A. Faktisk er villtypestammen ved tilsetning av fdU bare representert med disse basesubstitusjonene (se tabell VII). Som nevnt har vi bare ett forsøk med villtype-*E. coli* ved 0,4 mM fdU, og her oppstår det fem mutanter. På grunn av dette "skrinne" materialet i villtype ved 0,4 mM fdU, blir en sammenligning av de to *E. coli*-typene ved denne mutagenkonsentrasjonen gjerne ikke representativ. Spesielt ser det ut til at transisjonen A·T → G·C kommer "skadelidende" ut av denne sammenligningen. Den oppstår hyppig både i villtype og mutant ved 0,2 mM fdU. Også i Grøsviks (2009) arbeid forekom transisjonen i ganske stor grad ved 0,4 mM fdU i *E. coli* med intakt AlkA-enzym (data ikke vist). Så grunnen til at A·T → G·C ikke forekommer i villtype-*E. coli* ved 0,4 mM fdU i våre resultater, kan vel gjerne heller komme av at vi har så få mutanter, enn at den er sjelden hos denne bakterie- og fdU-varianten.

Når det gjelder A·T → T·A, A·T → C·G og G·C → C·G, er det bare *alkA*⁻-mutanten i vårt mutasjonsmateriale som produserer disse transversjonene ved tilstedeværelse av fdU. Men det må også nevnes at det oppstår én A·T → T·A og én A·T → C·G som spontane mutasjoner (se tabell IX). Den første transversjonen forekommer i villtype og den siste i *alkA*⁻-mutanten. Det blir ikke produsert mange av disse transversjonene (til sammen seks stykker ved tilstedeværelsen av fdU). Derfor er som observert tidligere i vår forskergruppe (Grøsvik 2009; Ånensen et al. 2001), vår erfaring også at de er sjeldne. Siden disse basesubstitusjonene i vår studie bare oppstår hos *alkA*⁻-mutanten ved tilstedeværelse av fdU, kan det også virke som om den reparasjonsdefekte stammen under denne påvirkningen, produserer disse tre sistnevnte transversjoner i større grad enn stammen med intakt AlkA-enzym. Dette er imidlertid gjerne et svakt grunnlag å bygge denne antagelsen på, siden vi totalt har så få av disse mutasjonstypene. Men Grøsvik (2009) gjorde også slike funn i sin doktorgrad i mutageneseprosjektet når bakteriene vokste med 0,4 mM fdU.

For å vurdere om eventuelle mutasjonstendenser i studien er et utslag av tilsatt mutagen eller naturlige må resultatene sammenlignes med spontane mutasjoner. Men fordi vi har sekvensert få av disse blir mutasjonstendenser i denne studien verifisert mot mutasjonsrater i det større prosjektet (se figurene 14 A - C), og disse igjen ble først kontrollert mot tilhørende kontrollmutasjonsrater (se 3.6.4). Ved sammenligningen av de to *E. coli*-bakterietypene og den nylig skisserte verifiseringen av disse sammenligningene, kan det se ut som om følgende mutasjonstendenser er gyldige i denne studien;

G·C → A·T hos villtype og A·T → G·C i *alkA*⁻-mutant hos *E. coli* ved 0,2 mM fdU,

og

G·C → A·T hos villtype og G·C → C·G i *alkA*⁻-mutant hos *E. coli* ved 0,4 mM fdU.

Når det gjelder vårt "kontroll"-materiale (spontane mutasjoner), følger de noenlunde kontrollmutasjonsratene i mutageneseprosjektet. Dette gjelder i alle fall G·C → A·T i villtype-*E. coli* og delvis den eneste "kontroll"-mutasjonen vi har i *alkA*⁻-mutanten, altså A·T → C·G. En svakhet med våre resultater er at vi har så få "kontroller". Men fordi vi, som nevnt, ikke bruker disse til å vurdere mutasjonstendenser i villtype og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* i denne studien, har de spontane mutasjoner for denne vurderingen ikke særlig praktisk betydning.

Som nevnt til slutt i presentasjon av mutasjonstendenser i resultater (se 3.6.5), så er mutasjonshypigheten per forsøksrekke noe høyere i villtype i forhold til mutant. Når vi vurderer basesubstitusjonene som er presentert i resultater har vi nettopp slått fast at det mer spesifikt kan være tilfellet for G·C → A·T-transisjonen (se også 3.6.4.1 og 3.6.4.2). Det viser at villtype-*E. coli* muligens kan være mutasjonspromoterende overfor denne transisjonen ved tilstedeværelse av fdU.

Nedenfor vil disse resultatene bli vurdert i lys av mutageneseprosjektet generelt. Flere forskerarbeider har funnet holdepunkter for at fU har mutagene egenskaper (Kasai et al. 1990; Miyabe et al. 2001; Privat og Sowers 1996; Yoshida et al. 1997; Zhang et al. 1997). Grunnen til det kan være at fU har evne til å feilbasepare med guanin (Privat og Sowers 1996; Yoshida et al. 1997). Som nevnt innledningsvis i

kapitlet, fant Bjelland med medarbeidere (1994) ut at DNA-glykosylasen AlkA i *E. coli*, *in vitro* hadde den oksiderte DNA-basen fU som substrat. Et mål for mutageneseprosjektet har vært å finne ut om AlkA også hadde slik funksjon *in vivo*. Da Ånensen (2002) tok sin doktorgrad i mutageneseprosjektet, ønsket hun nettopp å forske på dette. Villtype-*E. coli* og *alkA*⁻-mutanten hos *E. coli* ble i hennes forsøk eksponert overfor fdU. Hun oppdaget da at villtype hadde større mutasjonstendenser for visse basesubstitusjoner enn mutanten. Det hun fant var at villtype-*E. coli* hadde flere A·T → G·C-transisjoner i forhold til *alkA*⁻-mutanten. Tendenser til det motsatte ble funnet ved G·C → A·T-transisjonen.

Mutageneseprosjektet ble utvidet til å eksponere de to *E. coli*-typene overfor varierende fdU-konsentrasjoner (Grøsvik 2009). Mutagenkonsentrasjonene som ble brukt var; 0,1 mM, 0,2 mM og 0,4 mM fdU. Grøsvik (2009) oppdaget også at visse basesubstitusjoner hadde høyere mutantfrekvens i villtype-*E. coli* i forhold til mutanten. Men hun fant at dette gjaldt samtlige av A·T → G·C, G·C → A·T og G·C → T·A. Imidlertid ble det også funnet at disse mutasjonstendensene endret seg ved varierende fdU-konsentrasjon (se figurene 14 A - C).

Konsekvensen av dette ble at man antok at AlkA-reparasjonsenzymet, som den reparasjonsdefekte *E. coli*-stammen ikke kunne kode for, gjerne i noen tilfeller kan være mutasjonsfremmende. Dette er for så vidt ikke en enestående oppdagelse. Liu, Burdzy og Sowers (2003) gjorde også funn som antydte at mutagenese kan oppstå i forbindelse med reparasjonen av av fU·G-feilbaseparet i HeLa-celle-ekstrakt. Én av grunnene til dette kan være at AlkA ikke diskriminerer mellom utkutting av fU overfor adenin eller guanin (Terato et al. 1999).

Flere forskere har funnet at det er den ioniserte formen av fU (fU[⊖]) som danner basepar med guanin (Masaoka et al. 1999b; Privat og Sowers 1996; Yoshida et al. 1997). Dette er også demonstrert med røntgenkrystalliske forsøk (Tsunoda et al. 2001) I mutageneseprosjektet er det gjort funn, som antyder at det nettopp er fU[⊖] som gjør at AlkA gjerne indirekte kan være mutasjonspromoterende. Digitale modellforsøk gjort av vår forskergruppe antyder at fU[⊖] ikke har tilgang til det aktive setet til AlkA (Grøsvik 2009). Når fU er i den formen kan den ikke bli klippet ut av AlkA, og blir således

overgitt til DNA-polymerase, som ukorrekt setter inn en guanin i stedet for adenin (Grøsvik 2009). Som en konsekvens av dette kan man tenke seg at AlkA både motvirker mutagenese, og fikserer denne reaksjonen *in vivo*.

Vi ser også ut fra våre valide mutasjonstendenser, at det er flere av G·C → A·T i villtype-*E. coli* både ved 0,2 mM og 0,4 mM fdU i forhold til *alkA*⁻-mutanten. Det kan da være naturlig å spørre seg om resultatene i denne studien også underbygger teorien om at AlkA-reparasjonsenzymet i BER kan være involvert i økningen av denne transisjonen i villtypen. Mutageneseprosjektet (Grøsvik 2009), har utarbeidet følgende arbeidsmodell for hvordan dette kan inntreffe:

Hvis det settes inn en fU overfor guanin i forbindelse med replikasjon, er det vanligvis fU[⊖] som baseparerer med guanin. Som tidligere nevnt, har denne forskergruppen funnet indikasjoner på at fU[⊖] ikke passer i det aktive setet til AlkA, og kan ikke klippes ut av DNA-heliksen i den formen. Imidlertid kan gjerne DNA-polymerase sette en adenin overfor fU[⊖] ved andre replikasjonsrunde. Som det går fram av avsnitt 1.5, er dette den foretrukne basen fU settes over i DNA-dobbeltråden. Imidlertid som nevnt i forklaringen til figur 3 i samme avsnitt, av den ioniserte formen og ketoformen av fU, er ketoformen den dominerende formen. Det er også den formen som danner det mest stabile baseparet til adenin (se tekst i 1.5 og figur 4 i samme avsnitt). Men i en slik form, er fU igjen tilgjengelig for AlkA, og kan kuttes ut. AlkA fungerer dermed i dette trinnet indirekte mutasjonsfremmende. Det er fordi den "baseløse" adenin nå er tilgjengelig for DNA-polymerase, som vanligvis setter en kognat tymin overfor den i forbindelse med tredje replikasjonsrunde. G·C → A·T-mutasjonen er dermed oppstått.

4.2 Vurdering av studiens validitet

4.2.1 ESTIMERING AV BAKTERIEKONSENTRASJON UT FRA VEKST PÅ GLUKOSEPLATER

Generelt i forsøkene våre hadde vi ganske ofte problemer med bakterievekst når de ble sådd ut på medium. Det var lettest å merke dette på glukoseplater, siden det der skulle være mye mer vekst enn på rifampicinplatene. Men problemet kunne gjerne være eksisterende på selektivt medium også, med det til følge at vi ikke klarte å fange opp alle mutasjonene som oppsto. Det er naturlig at veksten blir nedsatt ved tilsetning

av fdU, siden det er toksisk. Dette blir forklart ved at fdU blir omdannet til fdUMP, som hemmer tymidylat-syntetase (Klungland et al. 2001; Ånensen et al. 2001). Dette er et enzym som danner tymidinmonofosfat fra deoksyuridinmonofosfat (Friedberg et al. 2006; Hoskins og Butler 2008). Når tymidylat-syntetase blir hemmet, blir det mangel på tymidintrifosfat, som er et nukleotid i DNA-tråden. Imidlertid var den manglende veksten ikke alltid mindre i bakteriene uten fdU. Eksempel på det ser vi i tabell V (se 3.1). Vi ser av forsøkene (se 3.2) at vekstproblemet berørte villtype-*E. coli* mest (se også tabellene V og VI). Imidlertid er det rart at den ene av *E. coli*-variantene våre var mindre villig til å vokse enn den andre, fordi i utgangspunktet er fdU like toksisk for begge bakteriestammene.

Siden problemet med manglende bakterievekst var størst hos villtypen, prøvde vi å lage stock-plate på nytt til denne bakterievarianten. Vi sådde da ut villtype-*E. coli* på LA-skåler fra frysekultur (se 2.1.3). Men like uvillig var bakteriene til å vokse. Imidlertid opplevdes det samme problemet med villtype-*E. coli* i forsøkene til mutageneseprosjektet som ble gjort etter denne studien.

Vi brukte bakterievekst på ikke-selektiv agar til å estimere bakteriekonsentrasjonen i den tilhørende kulturen. Som nevnt, er denne verdien en faktor i utregning av mutasjonsrate (se 3.5) En vesentlig fallgrube i forhold til validitet av våre resultater, er da manglende bakterievekst på vekstmedium. Hvis grunnen til svekket vekst er at det er feil på vekstmediet, er det ikke samsvar mellom den beregnede *E. coli*-mengde i kulturen, og den faktiske bakteriekonsentrasjonen i løsningen. Vi får da en falskt for lav bakteriekonsentrasjon. Men hvis lav vekst på glukoseskåler gjenspeiler den reelle *E. coli*-konsentrasjon i kulturen, oppstår selvfølgelig ikke dette problemet. Grunnen til slike tilfeller, kan komme av at det i utgangspunktet er mange døde bakterier i bakterieløsningen. Dette kan skje hvis tettheten av mikrober i kulturen er så høy, at det ikke er nok næring til alle. Det er ofte tilfellet hvis bakteriekulturer har OD-verdier over 1,0 A.

Det kunne av og til være veldig vanskelig å telle noen av glukoseplatene med høyest bakteriekonsentrasjon (1×10^{-5} -fortynningen), fordi det kunne være tett med kolonier på dem. Dette førte til at koloniene nesten fløt sammen. Det som skjedde da, var at

tellingen ble mindre oversiktlig, og vi kunne for eksempel telle kolonier to ganger. Konsekvensen av dette er at det blir beregnet falskt for høy bakteriekonsentrasjon i kulturen bakteriene er sådd ut fra. Imidlertid pleide vi ikke å få så høye kolonitall i forsøkene. Og for å unngå det, brukte vi ikke lavere bakteriefortynning enn 1×10^{-5} . Unntaket var ett forsøk der det ble målt spesielt lav OD i overnattskulturene (se 3.2). Følgelig var bakterietallet i kulturene lavt. Fordi dette tallet er en faktor i utregning av mutasjonsrate ved vår metode, ønsket vi ikke for lav bakterievekst i overnattskulturene. (Taket var 1×10^7 bakterier per ml, se 3.5. Se også 2.1.6.) Og for å få mer vekst på glukoseskålene i dette forsøket, praktiserte vi da lavere fortytning i bakterieløsningene det ble sådd ut fra.

Ut fra disse drøftingene, går det an å se at fenomenet svekket bakterievekst, som var et problem i våre forsøk, kan ha mange årsaker. Og det er ofte en kompleks jobb å kartlegge dem. Årsaker som er nevnt er; på grunn av tymidylat-syntetase-hemming, manglende ingredienser i mediet eller gjerne for høy OD i overnattskulturene. Noen årsak til svekket bakterievekst i studien ble aldri funnet. Men grunnen kan ikke være for høy OD. Det er fordi vi bare gikk videre med overnattskulturer med OD mellom 0,4 og 0,8 A (se 2.1.4). Den mest plausible årsaken er i grunnen bare svekkede bakterier. En annen feilkilde det imidlertid må tas høyde for, er feil i fortynningsprosedyrene av bakterieløsningene til glukoseplater (se 2.1.6). Dette var en jobb som krevde stor konsentrasjon, og det var lett å bli distraheret.

4.2.2 VURDERING AV GYLDIGHET TIL GELELEKTROFORESEPRODUKTENE

Det at negativ kontroll ved PCR ikke viser noe DNA-bånd ved påfølgende gelelektroforese, indikerer at tillagingen av PCR-prøver er riktig gjennomført. Dette skulle da i vårt tilfelle sikre at det bare var genmateriale fra mutantene som ble pipettert opp i PCR-rørene. Vi ser at det er litt DNA-spor i de negative kontrollene i alle gelene våre. Unntaket er gelene 6 og 7 (se 3.3). DNA-spor i de negative kontrollene skyldes en forurensing av kontrollen, enten i PCR- eller gelelektroforesetrinnet. Og det kan også innebære en kontaminering av PCR-produktene. Hvor sikre kan vi da være på at genmaterialet kommer fra den mutanten vi tror det er? I dette ligger det at DNA-båndene i gelene ikke behøver å komme fra en av våre mutanter. Men det kan også innebære at vi har blandet hvilken mutant vi pipetterte opp hvilket PCR-rør. I

forbindelse med den etterfølgende DNA-sekvenseringen, kunne da basesubstitusjonene gjerne knyttes opp mot feil *E. coli*-type eller feil fdU-konsentrasjon (0,2 mM eller 0,4 mM fdU). Som vi ser, så kan det ved begge disse problemstillingene sås tvil om validiteten til mutasjonsmønsteret til bakteriene i studien.

4.2.3 VURDERING AV SEKVENSERINGSDATAENE

Det er selve DNA-sekvenseringen som bekrefter om det har oppstått noen mutasjoner i Rif^R-sekvensen på mutantene som vi sendte inn. Figurene 12 og 13 i resultatene er eksempler på sekvenseringsdata. Det blir for det meste bare gitt en generell omtale av disse (se 3.4.1 og 3.4.2). Utover den karakteristikken som allerede er gitt av mutasjoner i disse dataene, føler vi ikke vi har kunnskaper til å vurdere disse mutasjonene ytterligere. Det er fordi selve sekvenseringen ble foretatt av eksterne aktører (se 2.2.6), Dessuten ble den endelige karakteriseringen utført av prosjektleder professor Bjelland. Men det blir poengtert (se 3.4), at en eventuell mutasjon i våre mutanter må samsvare både med blast og BioEdit-fil. Det blir slått fast i disse eksemplene, at eventuelle mutasjoner i henholdsvis posisjonene 73 og 74 i BioEdit-fil til figur 12 og posisjonene 75 og 76 i BioEdit-fil til figur 13 ikke støttes av blaste-dataene til mutantene. Derfor kan disse "uregelmessighetene" i BioEdit-filene gjerne ikke regnes som mutasjoner. Vår konklusjonen på mutasjoner i figurene 12 og 13, blir også at Rif^R-sekvensene i disse figurene ikke har noen tilleggsmutasjoner enn de som allerede er med i resultatene.

4.2.4 VURDERING AV P₀-METODEN

Lea og Coulson (1949) gjorde funnene i Luria og Delbrücks (1943) arbeid om til en kvantitativ test. Siden p₀-metoden ikke baserer seg på andre eksperimenter enn de med mutantverdien null, er denne metoden ikke så følsom overfor avvik fra Lea og Coulson-testen. Derfor har det ikke noe å si at mutanter for eksempel vokser senere enn ikke-mutanter, så lenge én klon av mutanten vokser fram. Men metoden kan ikke brukes hvis det er mindre enn 10 % eller flere enn 70 % av kulturene som ikke har mutanter, det vil si at $0,3 < \mu n < 2,3$. I det ligger at p₀-metoden egner seg best på lave mutasjonsrater (Rosche og Foster 2000). En annen svakhet er at p₀-formelen ($p_0 = e^{-\mu n}$) er ekstremt sensitiv til faktorer som øker forholdet mellom kulturer uten mutanter og

totalt antall kulturer (p_0 -verdien). Eksempler på dette er ved fenotypisk "lag". Det vil si når en mutasjon i kulturen ikke gir seg til uttrykk før generasjoner etter at den har oppstått. Et annet eksempel er nedsatt evne for mutantene til å vokse. Det kan komme av lite passende vekstmedium med det til følge at mutantene dør. Hvis ikke hele kulturen er utsådd kan man også få et for lavt antall mutanter fra kulturen (Rosche og Foster 2000). Vi opplevde ofte dårlig bakterievekst på glukoseplater i våre forsøk (se 4.2.1). Det kan da tenkes at mutantene også hadde problemer med å vokse på rifampicinskålene i disse forsøkene, som er en av feilkildene nevnt over. Ved alle disse eksemplene som gir falskt for høyt antall kulturer uten mutanter, blir resultatet at det blir falskt for høy p_0 -verdi. Dette får større innvirkning på p_0 -utregningsmetoden enn andre mutasjonsratemetoder, siden denne metoden nettopp tar utgangspunkt i disse kulturene.

Som nevnt tidligere, har celletallet i kulturen også innvirkning på mutasjonsraten. Ved falskt for lav bakteriemengde i kulturen, blir mutasjonsraten falskt for høy. Tilsvarende gir et falskt for høyt kolonitall på glukoseskålene falskt for lave mutasjonsrateverdier. Disse to feilkildene blir omtalt i 4.2.1. Til slutt kan postmutasjoner på selektivt medium nevnes som en svakhet ved p_0 -metoden (Rosche og Foster 2000). Dette fenomenet som betyr at det dannes mutasjoner etter at kulturen er sådd ut på selektivt medium, gir da falskt for mange kulturer med mutanter. Dette gir for lav p_0 -verdi.

4.2.5 VURDERING AV GYLDIGHET AV RESULTATER I STUDIEN

Vi har vurdert gyldigheten av resultatene i denne studien på grunnlag av mutasjonsrater i mutageneseprosjektet. Det er ikke gjort statistiske beregninger av disse ratene. Hovedårsaken til det er at det har vært litt lite rådata. (Ved avslutningen av mutageneseprosjektet hadde man omtrent 60 mutasjoner i hver kategori for de to bakterietypene.) Det kan dermed ikke avgjøres om det er signifikante forskjeller mellom mutasjonsrater for de *E. coli*-variantene som er brukt. Dette rokker også ved validiteten til våre resultater, og det er en svakhet ved våre metoder.

4.3 Konklusjon

Der vi anser tendensene i vårt mutasjonsmateriale som gyldige ved kontrollering mot mutasjonsrater i mutageneseprosjektet, er det en indikasjon på at mutasjonene i denne studien har oppstått som en følge av fdU-påvirkning. Funnene om at den ene av disse mutasjonstypene (G·C→ A·T) øker i villtype-*E. coli* ved tilsetning av fdU, kan dessuten være med på å styrke teorien til mutageneseprosjektet; at AlkA-reparasjonsenzymet i noen tilfeller muligens kan promotere fdU-induserte mutasjoner.

5. FRAMTIDSPERSPEKTIVER

En spesifikk framtidssikt for denne studien og mutageneseprosjektet, må bli å undersøke nærmere mekanismene for hvordan AlkA-enzymet eventuelt kan virke mutasjonsfremmende.

5-fluoruracil (FU) er en vanlig kjemoterapi for å behandle colorektalcancer (Braun og Twelves 2009; Richter et al. 2009). Man kjenner ikke helt virkningsmekanismene til FU, men den virker blant annet ved å hemme tymidylat-syntetase. Noen forskningsresultater tyder også på at den virker inn på RNA-metabolismen (Hoskins og Butler 2007, 2008; Noordhuis et al. 2004). Som før slått fast, så virker også fU tymidylat-syntetase-hemmende (Bjelland et al. 2001; Ide et al. 1997; Klungland et al. 2001). Dette blir forklart ved at fdU blir omdannet til 5-formyldeoksyuridinmonofosfat som hemmer tymidylat-syntetase (Klungland et al. 2001; Ånensen et al. 2001).

Det er derfor gjerne en mulighet for at fU kan være et alternativ i kjemoterapi. Imidlertid er det gjort lite undersøkelser på dette. Dette ble slått fast etter å ha søkt på blant annet fagdatabasene PubMed og SciFinder. Vi har før nevnt likheter mellom fU og FU. Blant annet er begge de tilsvarende nukleosidene ionisert ved fysiologisk pH (Privat og Sowers 1996; Ånensen et al. 2001). Derfor kan det være interessant å forske videre på strukturelle og kjemiske likheter mellom fU og FU, og om fU kan erstatte FU som legemiddel.

6. ORDFORKLARINGER

AlkA-reparasjonsenzym = 3-metyladenin-DNA-glykosylase II.

alkA-gen = gen som koder for reparasjonsenzymet 3-metyladenin-DNA-glykosylase II.

alkA⁻-mutant = *E. coli* som er lik villtype med unntak av knock-out i *alkA*-genet.

BER = baseutkuttingsreparasjonssystemet.

dH₂O = destillert vann.

dsDNA = dobbeltrådig DNA.

Escherichia coli = *E. coli*-bakterie.

fdU = 5-formyldeoksyuridin.

fdUMP = 5-formyldeoksyuridinmonofosfat.

fU = 5-formyluracil.

fU[⊖] = ionisert form av fU.

fU^{c=O} = ketoformen av fU.

FU = 5-fluoruracil.

K'en i forsøktabellene står for kontroll. F'en står for kulturer tilsatt fdU.

Nuklotidbassenget = bassenget av nukleotider som ligger i kjernen, klar til å bli inkorporert i DNA.

Spontane mutasjoner = den naturlige mutasjonsraten i en organisme, uten påvirkning av noe mutagen.

Transisjon = mutasjon som går over fra en purin til en annen purin eller en pyrimidin til en annen.

Transversjon = mutasjon som går over fra en purin til en pyrimidin eller omvendt.

Villtype-*E. coli* = *E. coli*-bakterie som ikke er manipulert på noe vis.

Quinon = gruppe organiske stoffer som er avledet fra aromatiske molekyler.

7. REFERANSER

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, og P. Walter. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, og D. J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.
- Ames, B. N., og M. K. Shigenaga. 1993. Oxidants are a major contributor to cancer and aging. I *DNA and free radicals*, red. B. Halliwell og O. I. Aruoma. Chichester: Ellis Horwood Ltd.
- An, Q., P. Robins, T. Lindahl, og D. E. Barnes. 2007. 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the SMUG1-DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. *Cancer Research* 67 (3): 940-945.
- Bjelland, S., N-K. Birkeland, T. Benneche, G. Volden, og E. Seeberg. 1994. DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl-group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269 (48): 30489-30495.
- Bjelland, S., L. Eide, R. W. Time, R. Stote, I. Eftedal, G. Volden, og E. Seeberg. 1995. Oxidation of Thymine to 5-Formyluracil in DNA: Mechanisms of Formation, Structural Implications, and Base Excision by Human Cell Free Extracts. *Biochemistry* 34 (45): 14758-14764.
- Bjelland, S., og E. Seeberg. 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531 (1-2): 37-80.
- Bjelland, S., H. Ånensen, I. Knævelsrud, og E. Seeberg. 2001. Cellular effects of 5-formyluracil in DNA. *Mutation Research-DNA Repair* 486 (2): 147-154.
- Braun, M. S., og C. J. Twelves. 2009. Capecitabine in colorectal cancer. *Therapy* 6 (2): 239-248.
- Cupples, C. G., og J. H. Miller (1989) A set of *lacZ* mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86 (14): 5345-5349.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu, og M. S. Cooke. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 567 (1): 1-61.
- Filipic, M., og B. Zegura. 2007. The role of oxygen free radicals in DNA damage and mutation induction. I *New developments in mutation research*, red. C. L. Valon. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Floyd, R. A. 1990. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11 (9): 1447-1450.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz, og T. Ellenberger. 2006. *DNA repair and mutagenesis*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press.

- Fujikawa, K., H. Kamiya, og H. Kasai. 1998. The mutations induced by oxidatively damaged nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 26 (20): 4582-4587.
- Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, og W. M. Gelbart. 2000. *Introduction to Genetic Analysis*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company.
- Grøsvik, K. 2009. Mutagenicity and base excision repair of spontaneously arisen DNA lesions. PhD, Teknologisk og vitenskapelig fakultet, Universitetet i Stavanger, Stavanger.
- Hartwell, L. H., L. Hood, M. L. Goldberg, A. E. Reynolds, L. M. Silver, og R. C. Veres. 2008. *Genetics - From Genes to Genomes*. 3rd ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hoskins, J., og J. S. Butler. 2007. Evidence for distinct DNA- and RNA-based mechanisms of 5-fluorouracil cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24 (10): 861-870.
- Hoskins, J., og J. S. Butler. 2008. RNA-based 5-fluorouracil toxicity requires the pseudouridylation activity of Cbf5p. *Genetics* 179 (1): 323-330.
- Ide, H., H. Terato, A. Masaoka, N. Nagasawa, og Y. Ohyama. 1997. Mechanisms of the genotoxic effects associated with 5-formyluracil: Effect of exogenous 5'-formyl-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Symposium Series* (Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 1997), no. 37:165-166.
- Kamiya, H., N. Murata-Kamiya, N. Karino, Y. Ueno, A. Matsuda, og H. Kasai. 2002. Induction of T → G and T → A transversions by 5-formyluracil in mammalian cells. *Mutation Research* 513 (1-2): 213-222.
- Kasai, H., A. Iida, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, og H. Tanooka. 1990. 5-Formyldeoxyuridine - a new type of DNA damage induced by ionizing radiation and its mutagenicity to *Salmonella* strain TA102. *Mutation Research* 243 (4): 249-253.
- Klungland, A. 2001. Et liv uten DNA-reparasjon. *Tidsskrift Norske Lægeforening*, no. 121:41-49.
- Klungland, A., R. Paulsen, V. Rolseth, Y. Yamada, Y. Ueno, P. Wiik, A. Matsuda, E. Seeberg, og S. Bjelland. 2001. 5-Formyluracil and its nucleoside derivatives confer toxicity and mutagenicity to mammalian cells by interfering with normal RNA and DNA metabolism. *Toxicology Letters* 119 (1): 71-78.
- Knævelsrud, I., G. Slupphaug, I. Leiros, A. Matsuda, P. Ruoff, og S. Bjelland. 2009. Opposite-base dependent excision of 5-formyluracil from DNA by hSMUG1. *International Journal of Radiation Biology* 85 (5): 413-420.
- Krokan, H. E., R. Standal, og G. Slupphaug. 1997. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemical Journal* 325 (1): 1-16.
- Krwawicz, J., K. D. Arczewska, E. Speina, A. Maciejewska, og E. Grzesiuk. 2007. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes

- involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochimica Polonica* 54 (3): 413-434.
- Lea, D. E., og C. A. Coulson. 1949. The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *Journal of Genetics* 49 (3): 264-285.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (6422): 709-715.
- Lindahl, T., S. Ljungquist, W. Siebert, B. Nyberg, og B. Sperens. 1977. DNA N-glycosidases. Properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 252 (10): 3286-3294.
- Liu, P. F., A. Burdzy, og L. C. Sowers. 2003. Repair of the mutagenic DNA oxidation product, 5-formyluracil. *DNA Repair* 2 (2): 199-210.
- Lu, A-L., X. Li, Y. Gu, P. M. Wright, og D-Y. Chang. 2001. Repair of oxidative DNA damage: Mechanisms and functions. *Cell Biochemistry and Biophysics* 35 (2): 141-170.
- Luria, S. E., og M. Delbrück. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28 (6): 491-511.
- Masaoka, A., M. Kobayashi, H. Terato, Y. Ohyama, og H. Ide. 1999a. Cellular repair mechanisms of 5-formyluracil. *Nucleic Acids Symposium Series*, no. 42:291-292.
- Masaoka, A., H. Terato, M. Kobayashi, A. Honsho, Y. Ohyama, og H. Ide. 1999b. Enzymatic repair of 5-formyluracil. I. Excision of 5-formyluracil site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by AlkA protein (*Escherichia coli* 3-methyladenine-DNA glycosylase II). *Journal of Biological Chemistry* 274 (35): 25136-25143.
- Michel, B. 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biology* 3 (7): 1174-1176.
- Miyabe, I., Q-M. Zhang, H. Sugiyama, K. Kino, og S. Yonei. 2001. Mutagenic effects of 5-formyluracil on a plasmid vector during replication in *Escherichia coli*. *International Journal of Radiation Biology* 77 (1): 53-58.
- Noordhuis, P., U. Holwerda, C. L. Van der Wilt, C. J. Van Groeningen, K. Smid, S. Meijer, H. M. Pinedo, og G. J. Peters. 2004. 5-fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of Oncology* 15 (7): 1025-1032.
- O'Brien, P. J., og T. Ellenberger. 2004. The *Escherichia coli* 3-methyladenine-DNA glycosylase AlkA has a remarkably versatile active site. *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 26876-26884.
- Privat, E. J., og L. C. Sowers. 1996. A proposed mechanism for the mutagenicity of 5-formyluracil. *Mutation Research* 354 (2): 151-156.
- Richter, S. N., M. Nadai, M. Palumbo, og G. Palu. 2009. Topoisomerase I involvement in schedule-dependent interaction between 5-fluorouracil and Irinotecan in the

- treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64 (1): 199-200.
- Riazuddin, S., og T. Lindahl. 1978. Properties of 3-methyladenine-DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 17 (11): 2110-2118.
- Rosche, W. A., og P. L. Foster. 2000. Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods-a Companion to Methods in Enzymology* 20 (1): 4-17.
- Rossmann, T. G., og E. I. Goncharova. 1998. Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutation Research* 402 (1-2): 103-110.
- Sanger, F., S. Nicklen, og A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74 (12): 5463-5467.
- Seeberg, E., og P. Strike. 1976. Excision repair of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid in plasmolyzed cells of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 125 (3): 787-795.
- Thomas, L., C-H. Yang, og D. A. Goldthwait. 1982. Two DNA glycosylases in *Escherichia coli* which release primarily 3-methyladenine. *Biochemistry* 21 (6): 1162-1169.
- Terato, H., A. Masaoka, M. Kobayashi, S. Fukushima, Y. Ohyama, M. Yoshida, og H. Ide. 1999. Enzymatic repair of 5-formyluracil. II. Mismatch formation between 5-formyluracil and guanine during DNA replication and its recognition by two proteins involved in base excision repair (AlkA) and mismatch repair (MutS). *Journal of Biological Chemistry* 274 (35): 25144-25150.
- Tsunoda, M., T. Sakaue, S. Naito, T. Sunami, N. Karino, Y. Ueno, A. Matsuda, og A. Takénaka. 2001. X-ray analyses of DNA dodecamers containing 2'-deoxy-5-formyluridine. *Nucleic Acids Research Supplement* 2001, no. 1:279-280.
- Yamamoto, Y., M. Katsuki, M. Sekiguchi, og N. Otsuji. 1978. *Escherichia coli* gene that controls sensitivity to alkylating agents. *Journal of Bacteriology* 135 (1): 144-152.
- Yoshida, M., K. Makino, H. Morita, H. Terato, Y. Ohyama, og H. Ide. 1997. Substrate and mispairing properties of 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate assessed by *in vitro* DNA polymerase reactions. *Nucleic Acids Research* 25 (8): 1570-1577.
- Zhang, Q-M., H. Sugiyama, I. Miyabe, S. Matsuda, I. Saito, og S. Yonei. 1997. Replication of DNA templates containing 5-formyluracil, a major oxidative lesion of thymine in DNA. *Nucleic Acids Research* 25 (20): 3969-3973.
- Ånensen, H. 2002. Mutagenicity and base excision repair of spontaneously induced DNA damages. PhD, Medisinsk fakultet, Universitetet i Oslo, Oslo.
- Ånensen, H., F. Provan, A. T. Lian, S-H. H. S. Reinertsen, Y. Ueno, A. Matsuda, E. Seeberg, og S. Bjelland. 2001. Mutations induced by 5-formyl-2'-deoxyuridine in *Escherichia coli* include base substitutions that can arise from mispairs of 5-formyluracil with guanine, cytosine and thymine. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 476 (1-2): 99-107.

87 CK: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 401 bits (444), Expect = 2e-112
 Identities = 224/225 (99%), Gaps = 0/225 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 16      CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 75
              |||
Sbjct 3453909 CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 3453850

Query 76      ATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 135
              |||
Sbjct 3453849 ATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 3453790

Query 136     GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCTTGAAGGTCCGAACATC 195
              |||
Sbjct 3453789 GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCTTGAAGGTCCGAACATC 3453730

Query 196     GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 240
              |||
Sbjct 3453729 GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



67 BF II: Ingen reell mutant

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 4e-116
 Identities = 229/229 (100%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 14      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 73
                |||
Sbjct 3453913 CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 3453854

Query 74      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 133
                |||
Sbjct 3453853 TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 134     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 193
                |||
Sbjct 3453793 AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 194     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 242
                |||
Sbjct 3453733 CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



67 CF II: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 408 bits (452), Expect = 2e-114
 Identities = 228/229 (99%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

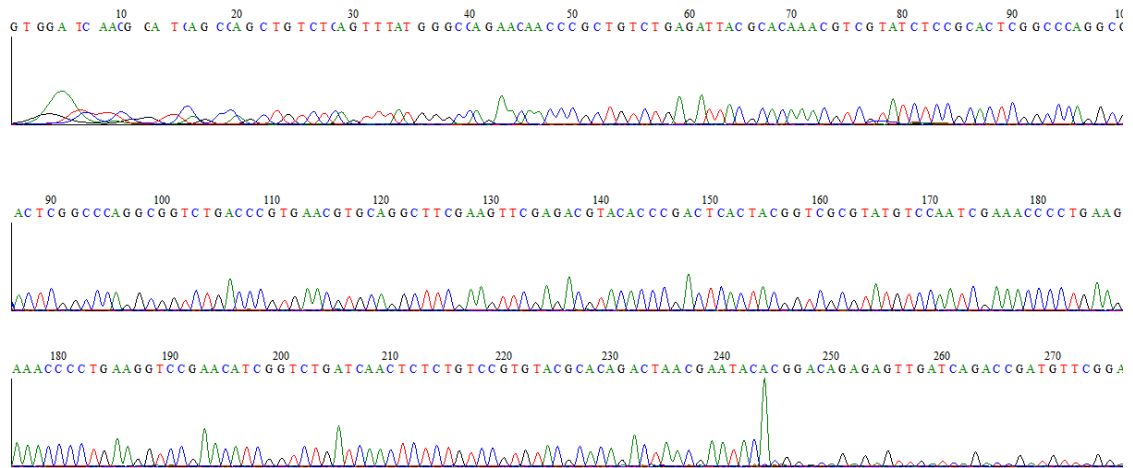
```

Query 15      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 74
                |||
Sbjct 3453913 CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 3453854

Query 75      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 134
                |||
Sbjct 3453853 TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 135     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 194
                |||
Sbjct 3453793 AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 195     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 243
                |||
Sbjct 3453733 CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



67 CF V: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 408 bits (452), Expect = 2e-114
 Identities = 228/229 (99%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

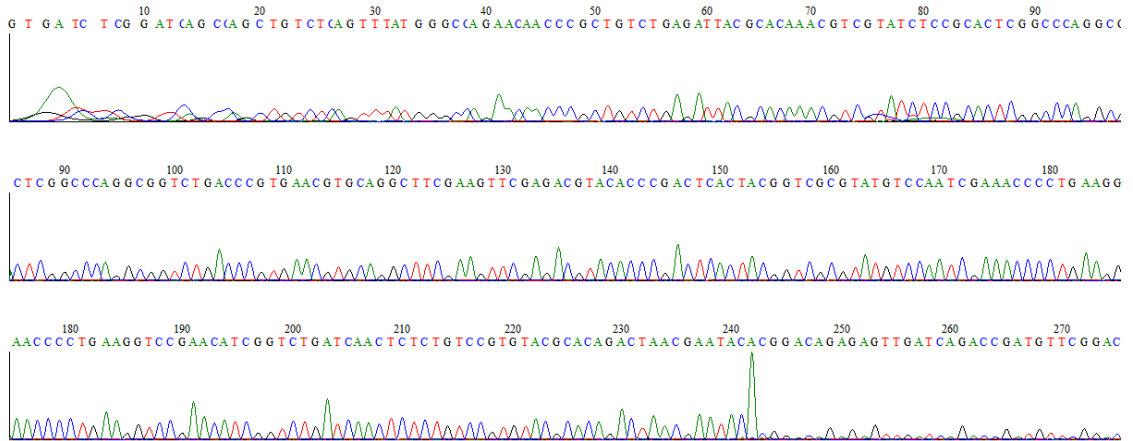
```

Query 13      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 72
                |||
Sbjct 3453913 CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 3453854

Query 73      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 132
                |||
Sbjct 3453853 TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 133     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 192
                |||
Sbjct 3453793 AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 193     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453733 CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



67 DF IV: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 410 bits (454), Expect = 5e-115
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

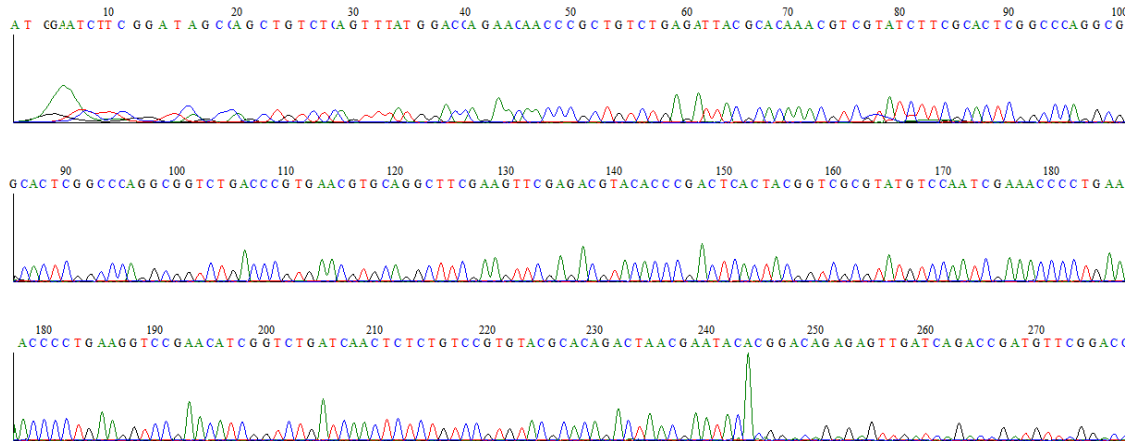
```

Query    7      TCTTCGGAT--AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA  64
          |||
Sbjct   3453923 TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA  3453864

Query    65      CGCACAAACGTCGTATCTTCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT  124
          |||
Sbjct   3453863 CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT  3453804

Query    125     TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG  184
          |||
Sbjct   3453803 TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG  3453744

Query    185     AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC  243
          |||
Sbjct   3453743 AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC  3453685
  
```



67 DF V: G·C → T·A

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 410 bits (454), Expect = 5e-115
 Identities = 233/236 (99%), Gaps = 2/236 (0%)
 Strand=Plus/Minus

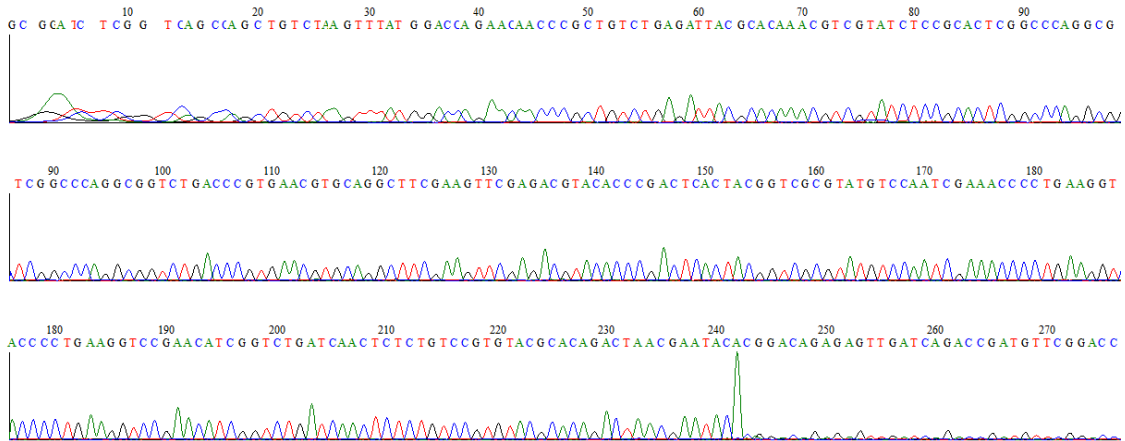
```

Query 8      TCGGT--CAGCCAGCTGTCTAAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGC 65
           |||
Sbjct 3453920 TCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGC 3453861

Query 66     ACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCG 125
           |||
Sbjct 3453860 ACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCG 3453801

Query 126    AAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAG 185
           |||
Sbjct 3453800 AAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAG 3453741

Query 186    GTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
           |||
Sbjct 3453740 GTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



68 CF I: Ingen reell mutant

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 419 bits (464), Expect = 1e-117
 Identities = 237/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

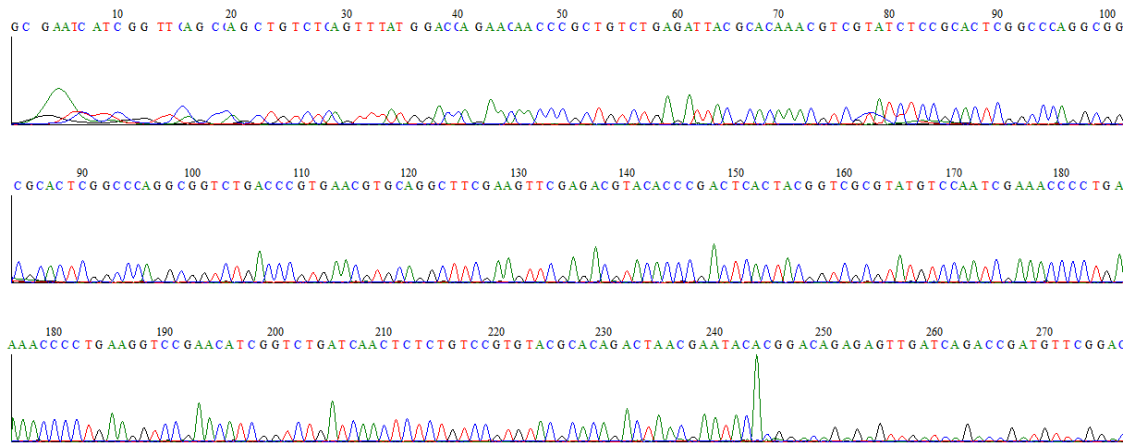
```

Query 6      TCATCGGTTC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA 64
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3453923 TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA 3453864

Query 65     CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT 124
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3453863 CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT 3453804

Query 125    TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG 184
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3453803 TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG 3453744

Query 185    AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 243
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 3453743 AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



86 BF II: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 403 bits (446), Expect = 5e-113
 Identities = 233/237 (99%), Gaps = 3/237 (1%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 8      TTCGGT--CAGC-AGCTGTCTCAGTTTATGAACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACG 64
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 3453921 TTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACG 3453862

Query 65     CACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTC 124
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 3453861 CACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTC 3453802

Query 125    GAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAA 184
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 3453801 GAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAA 3453742

Query 185    GGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 3453741 GGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



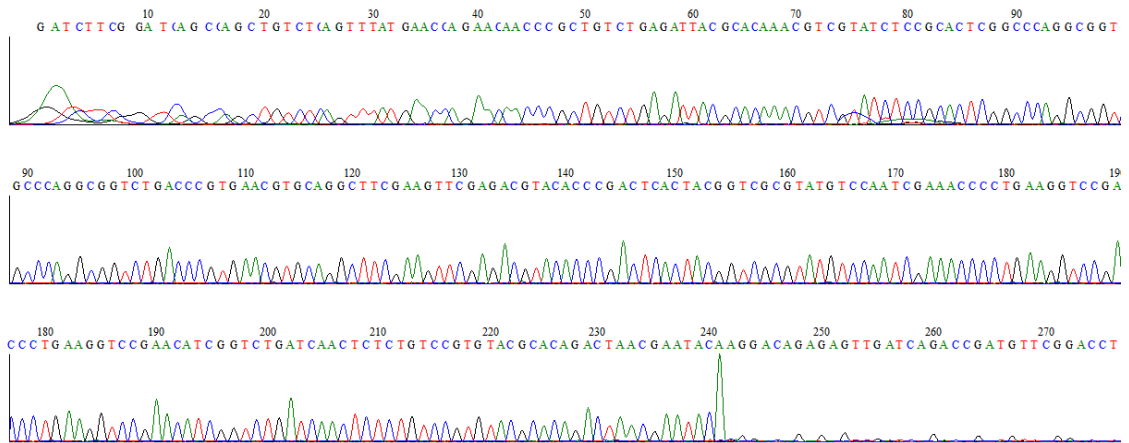
86 BF IV: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 3e-116
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 3 | TCTTCGGATC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGAACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 61 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 62 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 121 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 122 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 181 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 182 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 240 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



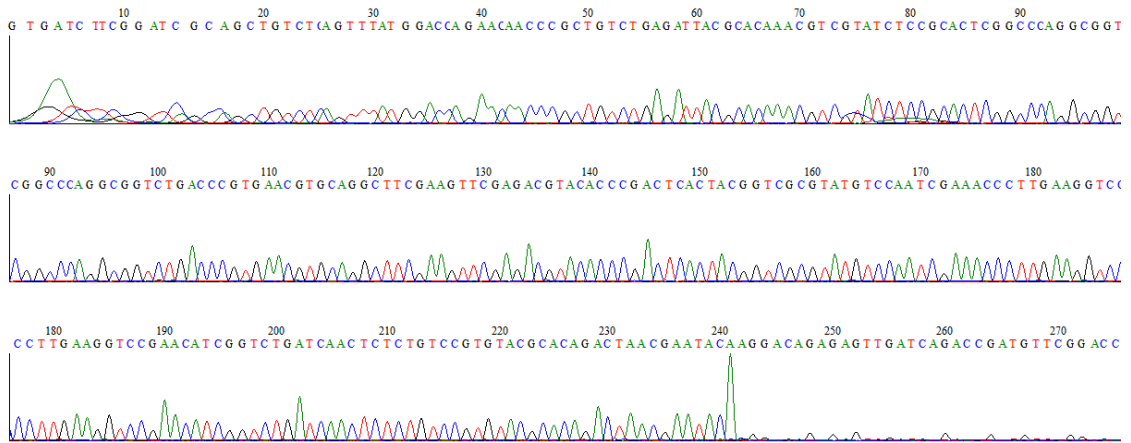
86 CF V: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 403 bits (446), Expect = 6e-113
 Identities = 233/239 (98%), Gaps = 3/239 (1%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGATCG---CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 61 |
| | | | |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 62 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 121 |
| | | | |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 122 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 181 |
| | | | |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 3453744 |
| Query | 182 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



88 BF V: G·C → T·A

RNA polymerase, beta subunit

Score = 410 bits (454), Expect = 4e-115
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

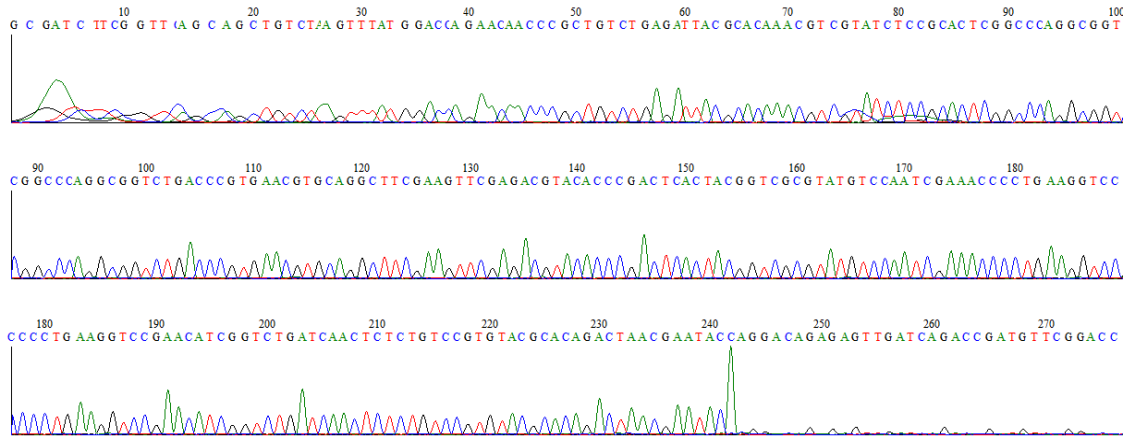
```

Query    5      TCTTCGGTTC-AGC-AGCTGTCTAAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA 62
          |||
Sbjct   3453923 TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA 3453864

Query    63      CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT 122
          |||
Sbjct   3453863 CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT 3453804

Query    123     TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG 182
          |||
Sbjct   3453803 TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG 3453744

Query    183     AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
          |||
Sbjct   3453743 AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC
    
```



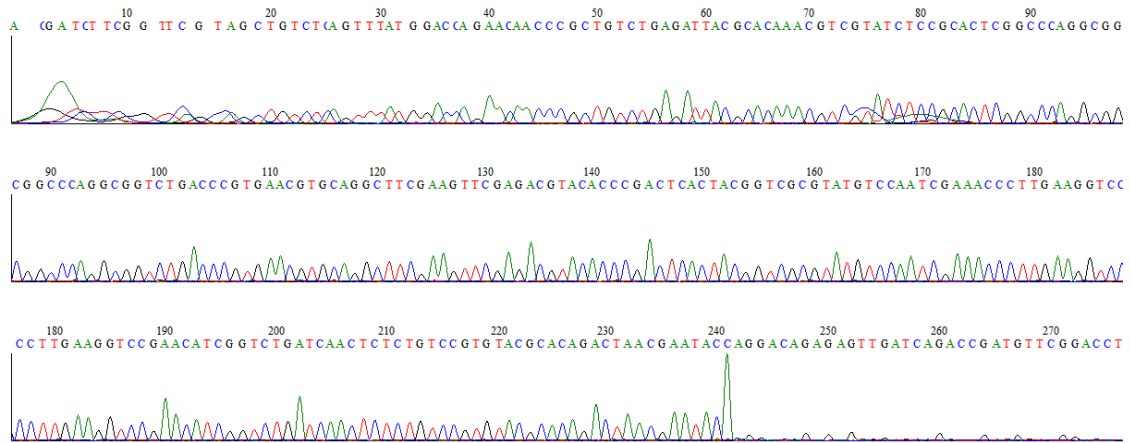
87 BF IV: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 403 bits (446), Expect = 6e-113
 Identities = 233/239 (98%), Gaps = 3/239 (1%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGTTCGT--AGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 61 |
| | | | |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 62 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 121 |
| | | | |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 122 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 181 |
| | | | |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 3453744 |
| Query | 182 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



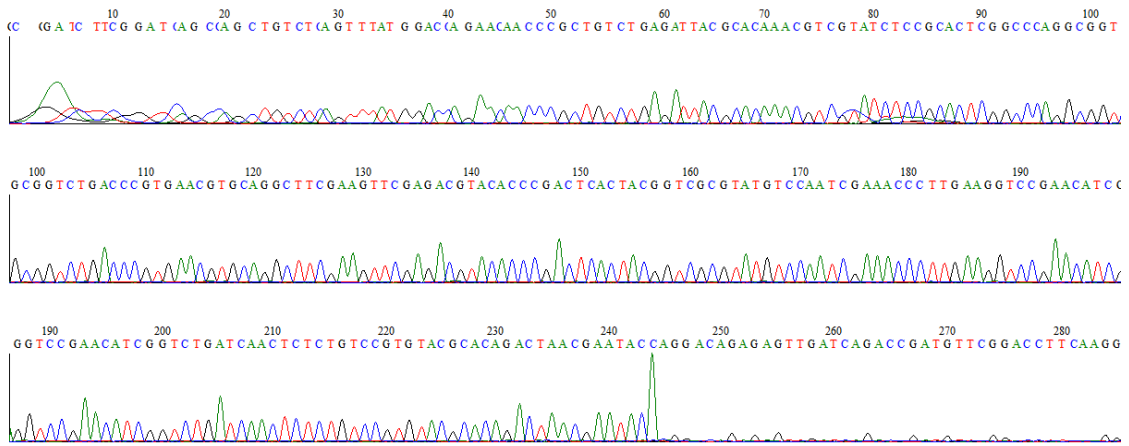
87 CF II: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 3e-116
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 6 | TCTTCGGATC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 64 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 65 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 124 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 125 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 184 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 3453744 |
| Query | 185 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 243 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



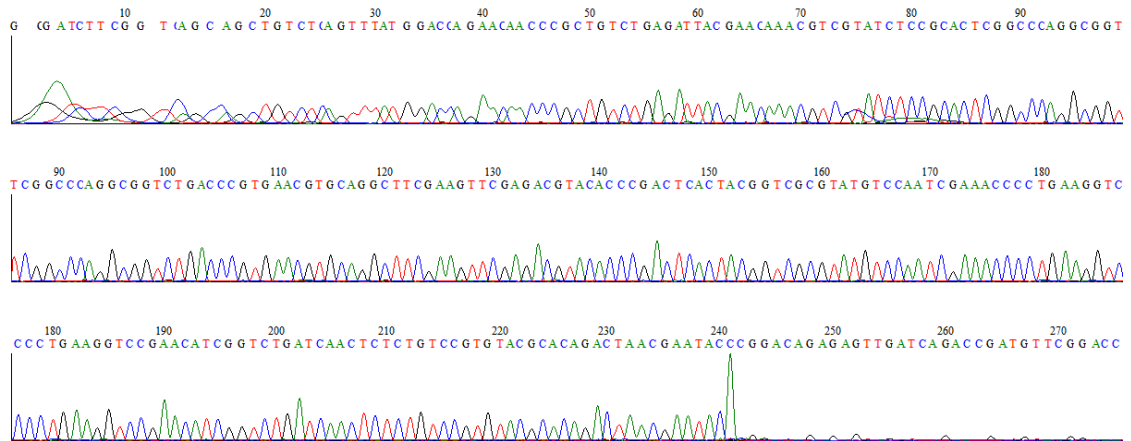
87 CF III: G·C → T·A

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 407 bits (450), Expect = 5e-114
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 3/239 (1%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGT--CAGC-AGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 61 |
| | | | |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 62 | CGAACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 121 |
| | | | |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 122 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 181 |
| | | | |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 182 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



87 CF IV: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 401 bits (444), Expect = 2e-112
 Identities = 224/225 (99%), Gaps = 0/225 (0%)
 Strand=Plus/Minus

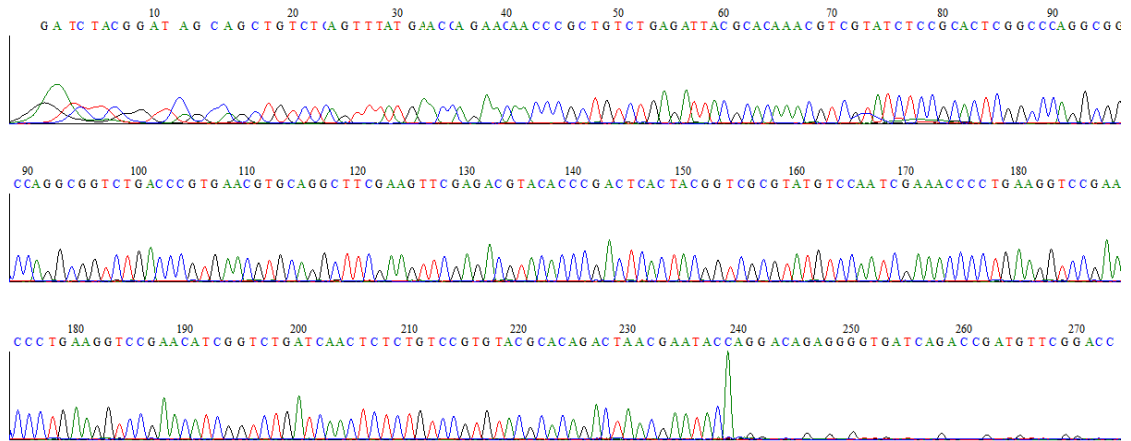
```

Query 14      CAGCTGTCTCAGTTTATGAACCAGAACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 73
                |||
Sbjct 3453909 CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 3453850

Query 74      ATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 133
                |||
Sbjct 3453849 ATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 3453790

Query 134     GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC 193
                |||
Sbjct 3453789 GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC 3453730

Query 194     GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 238
                |||
Sbjct 3453729 GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



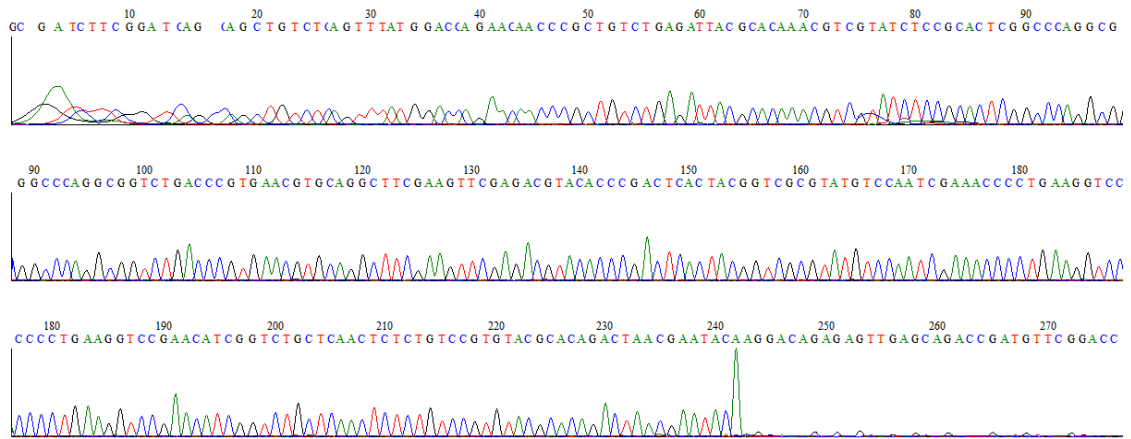
83 CK: A·T → C·G

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 407 bits (450), Expect = 4e-114
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGATC-AGC-AGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 62 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 63 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 122 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 123 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 182 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 183 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGCTCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 241 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



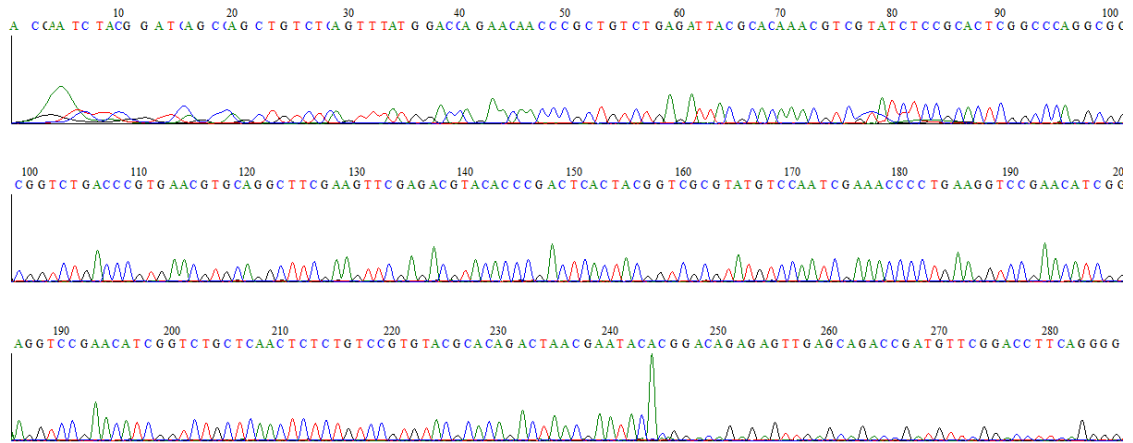
71 AF II: A·T → C·G

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 410 bits (454), Expect = 5e-115
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 6 | TCTACGGATC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 64 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 65 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 124 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 125 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 184 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 185 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGCTCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 243 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



71 CF II: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 4e-116
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 6 | TCTTCGGATC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 64 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 65 | CGCACAAACGTCGTATCTTCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 124 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 125 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 184 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 185 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 243 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



71 CF V: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 405 bits (448), Expect = 2e-113
 Identities = 226/227 (99%), Gaps = 0/227 (0%)
 Strand=Plus/Minus

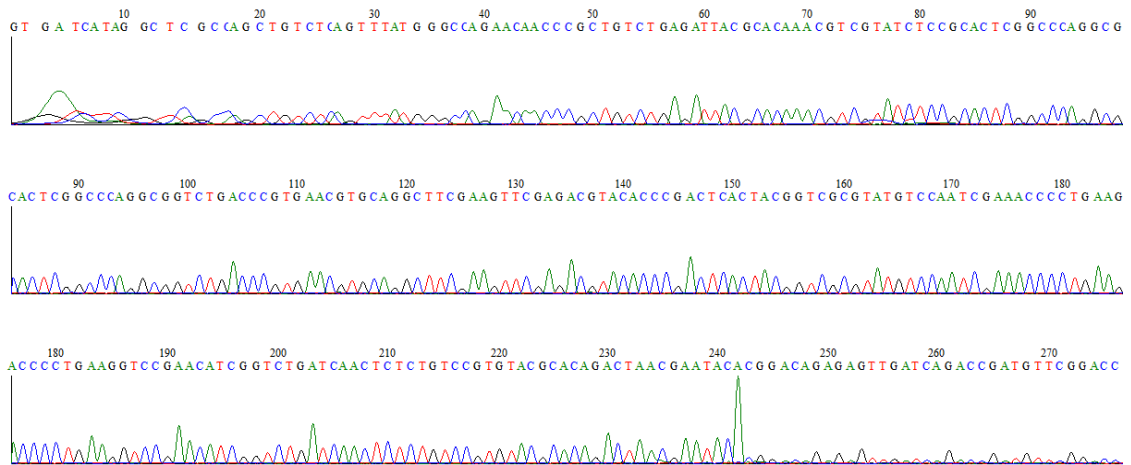
```

Query 15      GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTC 74
                |||
Sbjct 3453911 GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTC 3453852

Query 75      GTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAG 134
                |||
Sbjct 3453851 GTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAG 3453792

Query 135     ACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGTCCGAACA 194
                |||
Sbjct 3453791 ACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGTCCGAACA 3453732

Query 195     TCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453731 TCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



72 CF I: Ingen reell mutant

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 407 bits (450), Expect = 6e-114
 Identities = 225/225 (100%), Gaps = 0/225 (0%)
 Strand=Plus/Minus

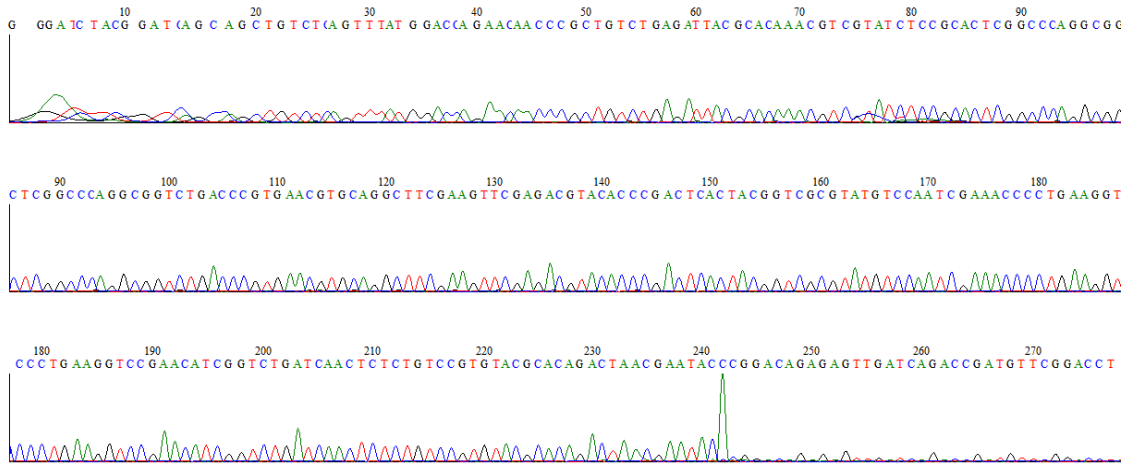
```

Query 17      CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 76
                |||
Sbjct 3453909  CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 3453850

Query 77      ATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 136
                |||
Sbjct 3453849  ATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 3453790

Query 137     GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCGGAACATC 196
                |||
Sbjct 3453789  GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCGGAACATC 3453730

Query 197     GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453729  GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



72 CF II: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 407 bits (450), Expect = 6e-114
 Identities = 227/228 (99%), Gaps = 0/228 (0%)
 Strand=Plus/Minus

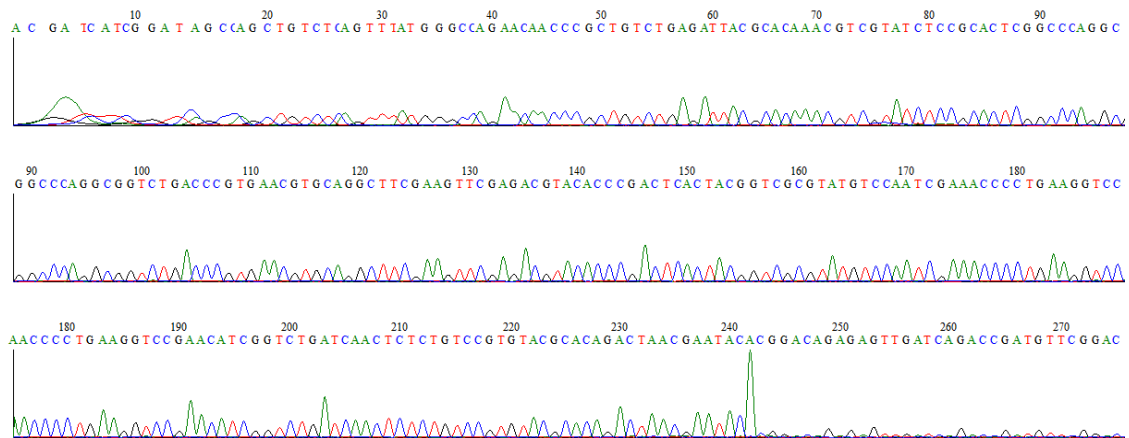
```

Query 14      AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGT 73
                |||
Sbjct 3453912 AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGT 3453853

Query 74      CGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGA 133
                |||
Sbjct 3453852 CGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGA 3453793

Query 134     GACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGTCCGAAC 193
                |||
Sbjct 3453792 GACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGTCCGAAC 3453733

Query 194     ATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453732 ATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC
    
```



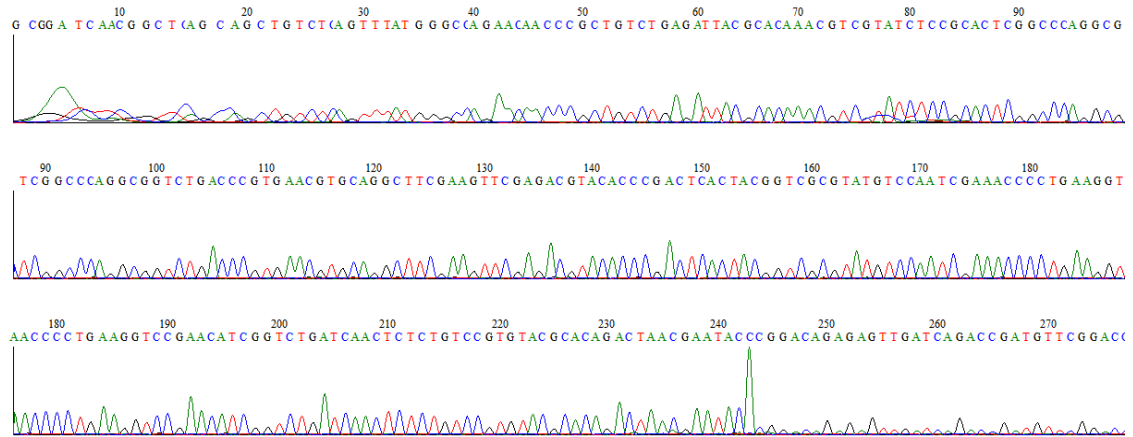
72 CF V: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 401 bits (444), Expect = 3e-112
 Identities = 224/225 (99%), Gaps = 0/225 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 18 | CAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT | 77 |
| Sbjct | 3453909 | CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT | 3453850 |
| Query | 78 | ATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC | 137 |
| Sbjct | 3453849 | ATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC | 3453790 |
| Query | 138 | GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC | 197 |
| Sbjct | 3453789 | GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC | 3453730 |
| Query | 198 | GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 242 |
| Sbjct | 3453729 | GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



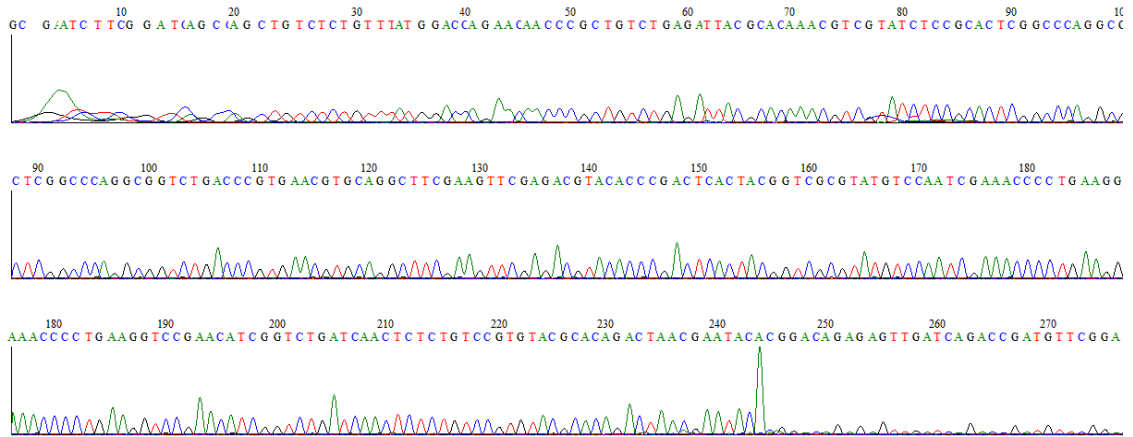
73 AF IV: A·T → T·A

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 4e-116
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 6 | TCTTCGGATC-AGCCAGCTGTCTCTGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 64 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 65 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 124 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 125 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 184 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 185 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 243 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



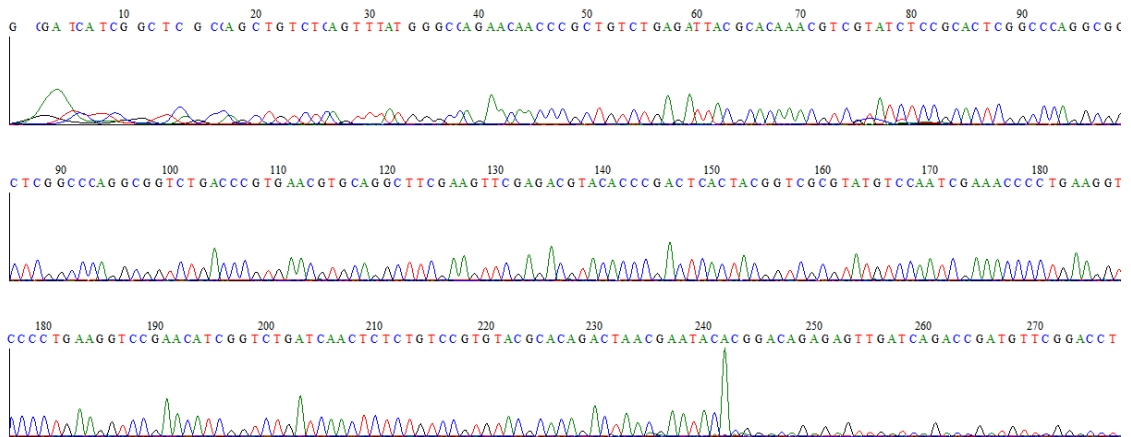
73 AF V: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 407 bits (450), Expect = 6e-114
 Identities = 234/239 (98%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 5 | TCATCGGCTC--GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 62 |
| | | | |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 63 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 122 |
| | | | |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 123 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 182 |
| | | | |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 183 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 241 |
| | | | |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



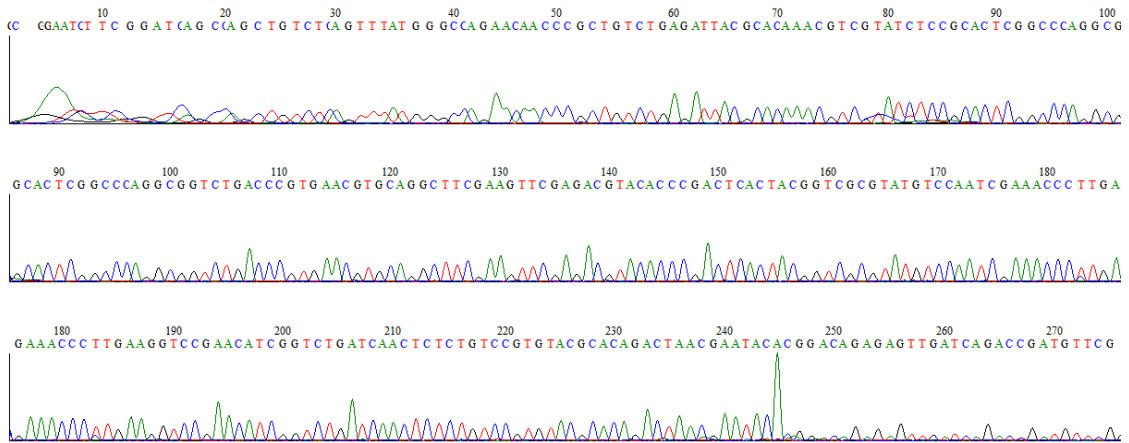
73 CF III: A·T → G·C og G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 410 bits (454), Expect = 5e-115
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|---|---------|
| Query | 7 | TCTTCGGATC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAAACCCGCTGTCTGAGATTA | 65 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 66 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 125 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 126 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 185 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTG | 3453744 |
| Query | 186 | AAGGTCGGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 244 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCGGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



75 BF II: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 405 bits (448), Expect = 1e-113
 Identities = 226/227 (99%), Gaps = 0/227 (0%)
 Strand=Plus/Minus

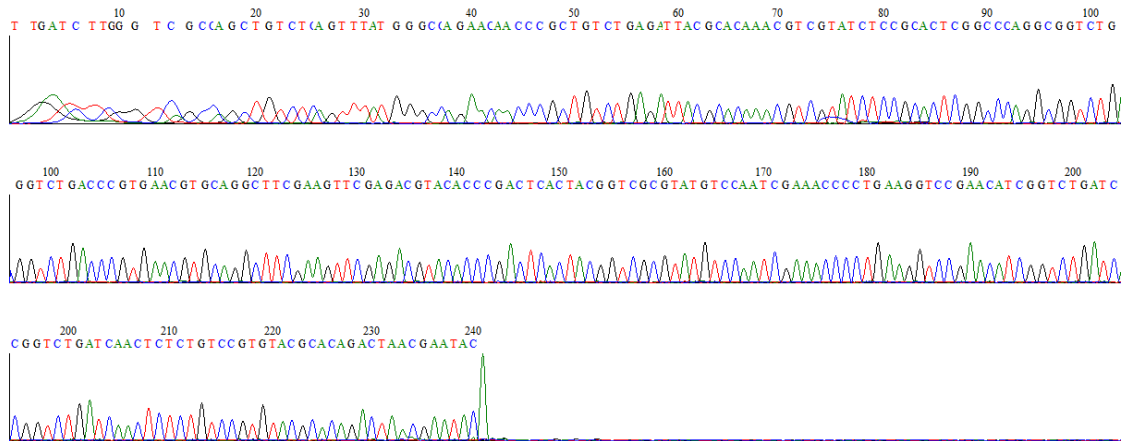
```

Query 14      GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTC 73
              |||
Sbjct 3453911 GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTC 3453852

Query 74      GTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCTGTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAG 133
              |||
Sbjct 3453851 GTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCTGTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAG 3453792

Query 134     ACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACA 193
              |||
Sbjct 3453791 ACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACA 3453732

Query 194     TCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 240
              |||
Sbjct 3453731 TCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



75 BF III: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 408 bits (452), Expect = 1e-114
 Identities = 228/229 (99%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 11      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACCAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAAAG 70
                |||
Sbjct 3453913  CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAAAG 3453854

Query 71      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 130
                |||
Sbjct 3453853  TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 131     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 190
                |||
Sbjct 3453793  AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 191     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 239
                |||
Sbjct 3453733  CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



75 BF V: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 401 bits (444), Expect = 2e-112
 Identities = 224/225 (99%), Gaps = 0/225 (0%)
 Strand=Plus/Minus

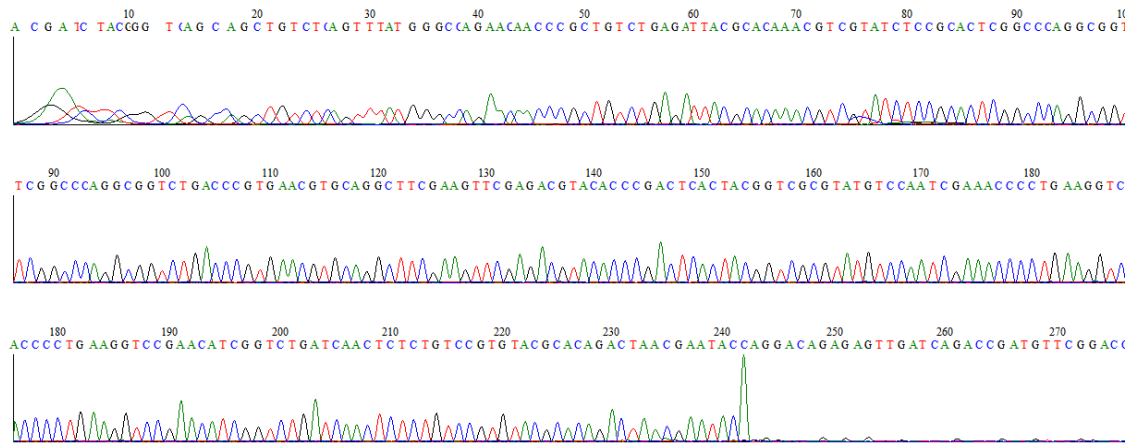
```

Query 17      CAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 76
                |||
Sbjct 3453909 CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 3453850

Query 77      ATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 136
                |||
Sbjct 3453849 ATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 3453790

Query 137     GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC 196
                |||
Sbjct 3453789 GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC 3453730

Query 197     GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453729 GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



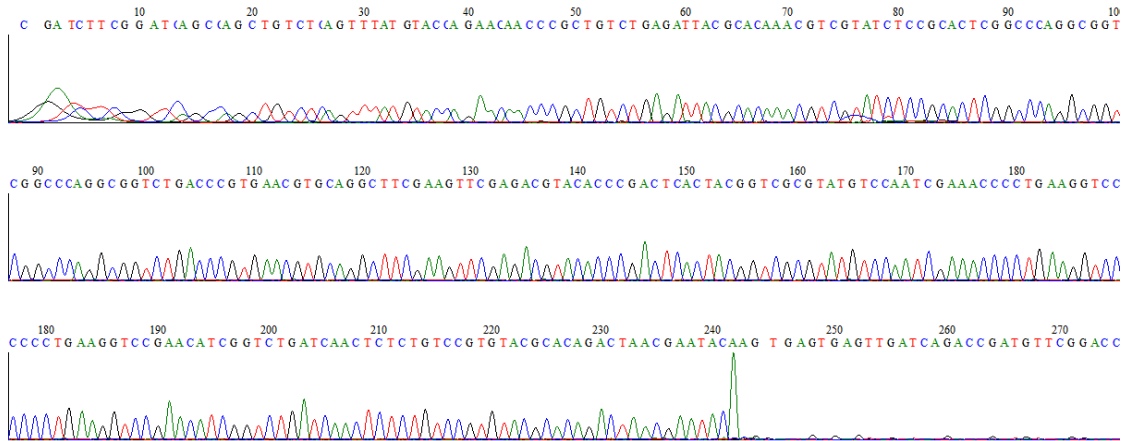
76 AF II: G·C → T·A

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 3e-116
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 4 | TCTTCGGATC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGTACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 62 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 63 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 122 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 123 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 182 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 183 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 241 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



76 AF III: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 401 bits (444), Expect = 2e-112
 Identities = 224/225 (99%), Gaps = 0/225 (0%)
 Strand=Plus/Minus

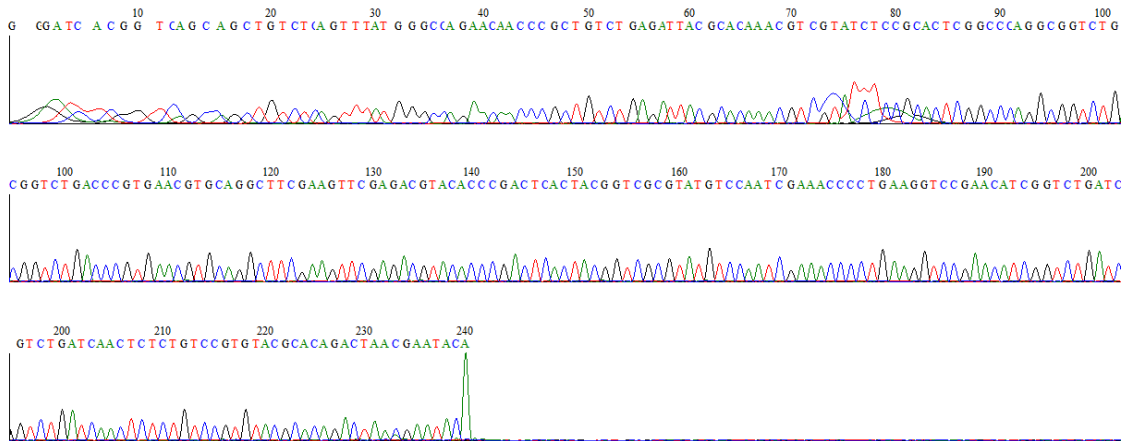
```

Query 15      CAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 74
              |||
Sbjct 3453909 CAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGT 3453850

Query 75      ATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 134
              |||
Sbjct 3453849 ATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAGAC 3453790

Query 135     GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC 194
              |||
Sbjct 3453789 GTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAACATC 3453730

Query 195     GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 239
              |||
Sbjct 3453729 GGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



76 CF I: G·C → A·T

RNA polymerase, beta subunit

Score = 407 bits (450), Expect = 4e-114
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 3/239 (1%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query    6      TCTTCGGT--CAGC-AGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA 62
          |||
Sbjct   3453923 TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA 3453864

Query    63      CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT 122
          |||
Sbjct   3453863 CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT 3453804

Query    123     TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG 182
          |||
Sbjct   3453803 TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG 3453744

Query    183     AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
          |||
Sbjct   3453743 AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



76 CF IV: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 3e-116
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 1/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGGTC-AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACACCCGCTGTCTGAGATTA | 63 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 64 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 123 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 124 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 183 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 184 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 242 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



78 BF IV: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 408 bits (452), Expect = 1e-114
 Identities = 228/229 (99%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

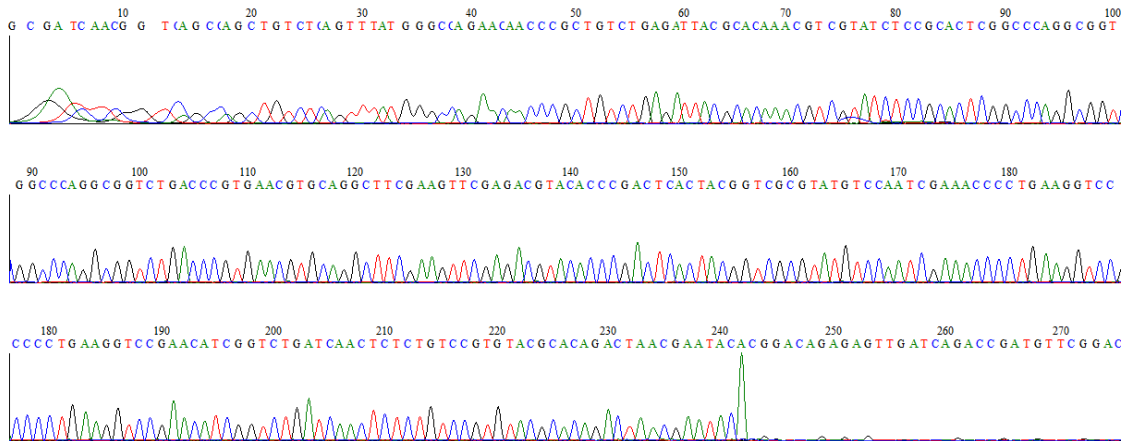
```

Query 13      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGGCCAGAACCAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAAAG 72
                |||
Sbjct 3453913 CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAAAG 3453854

Query 73      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 132
                |||
Sbjct 3453853 TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 133     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 192
                |||
Sbjct 3453793 AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 193     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453733 CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



78 CF I: G·C → T·A

RNA polymerase, beta subunit

Score = 408 bits (452), Expect = 1e-114
 Identities = 228/229 (99%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

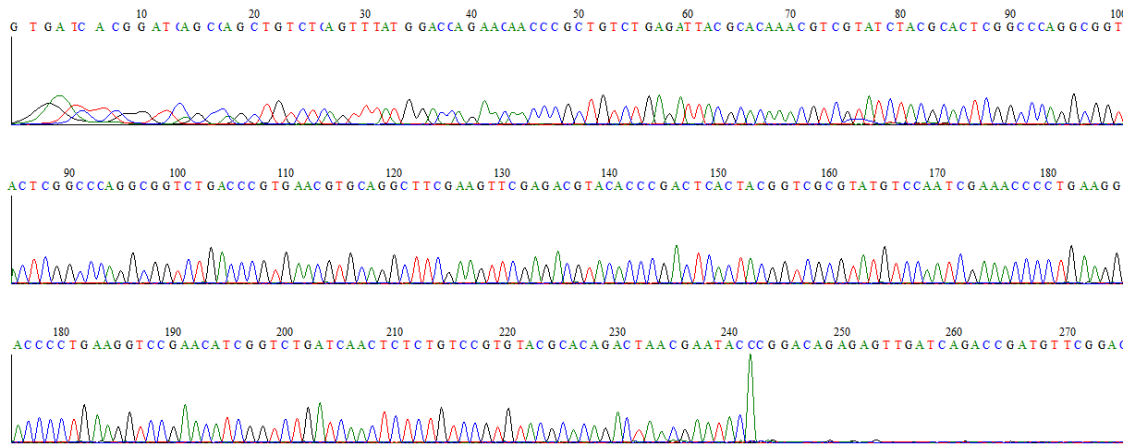
```

Query 13      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 72
                |||
Sbjct 3453913 CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 3453854

Query 73      TCGTATCTACGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 132
                |||
Sbjct 3453853 TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 133     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCTGAAGGTCCGAA 192
                |||
Sbjct 3453793 AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCTGAAGGTCCGAA 3453734

Query 193     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 241
                |||
Sbjct 3453733 CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



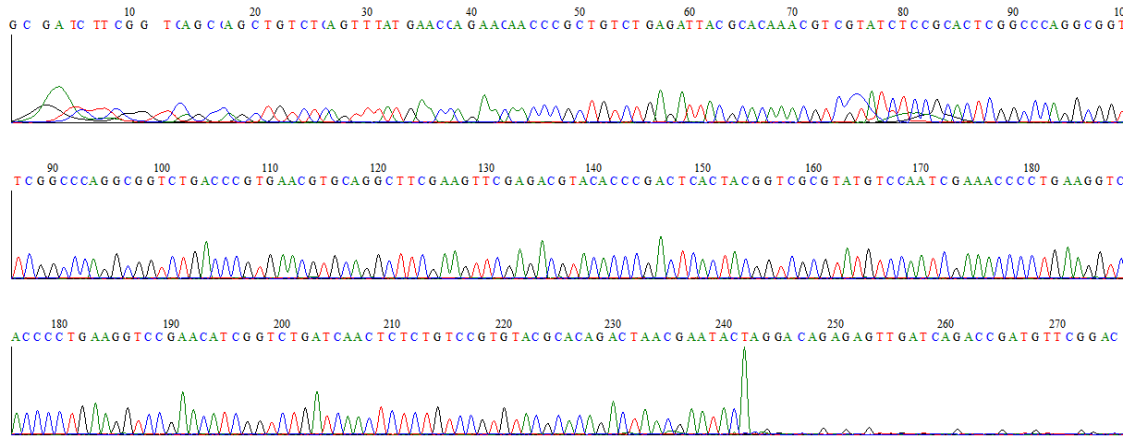
78 CF IV: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 416 bits (460), Expect = 8e-117
 Identities = 236/239 (99%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGT--CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGAACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 62 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 63 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 122 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 123 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 182 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 183 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 241 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



78 CF V: G·C → T·A

RNA polymerase, beta subunit

Score = 410 bits (454), Expect = 3e-115
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

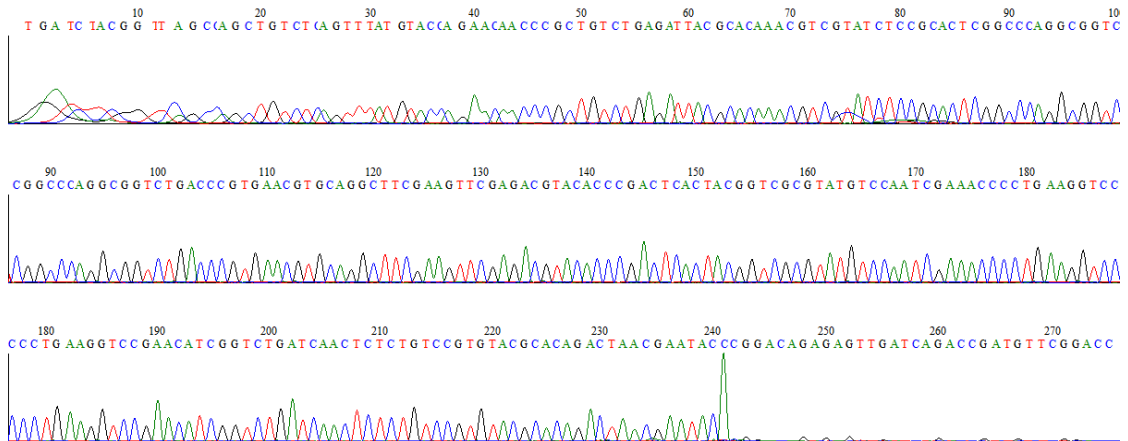
```

Query    4      TCTACGGTT--AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGTACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA  61
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct   3453923 TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA  3453864

Query    62      CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT  121
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct   3453863 CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT  3453804

Query    122     TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG  181
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct   3453803 TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG  3453744

Query    182     AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC  240
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct   3453743 AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC  3453685
  
```



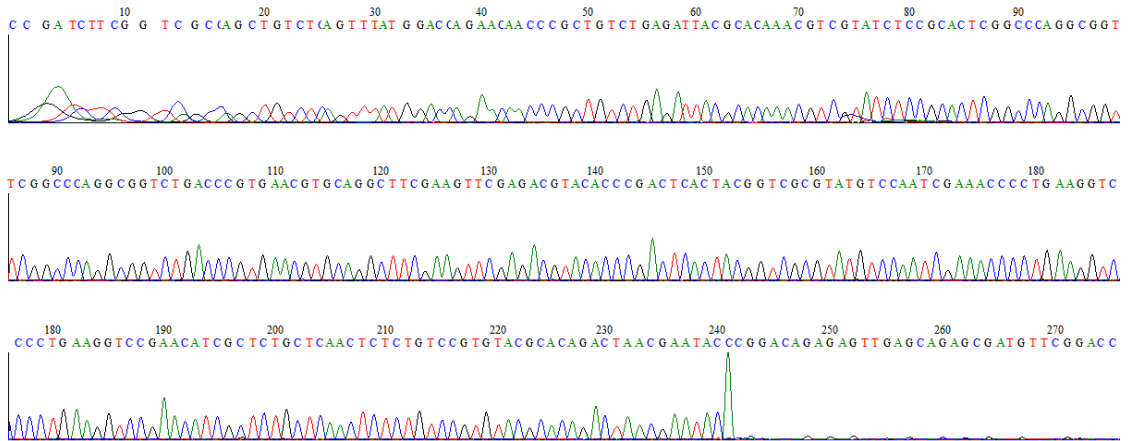
79 CF II: G·C → C·G og A·T → C·G

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 403 bits (446), Expect = 5e-113
 Identities = 233/239 (98%), Gaps = 3/239 (1%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 5 | TCTTCGGTC---GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 61 |
| | | | |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 62 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 121 |
| | | | |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 122 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 181 |
| | | | |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 182 | AAGGTCCGAACATCGCTCTGCTCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 240 |
| | | | |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGCTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



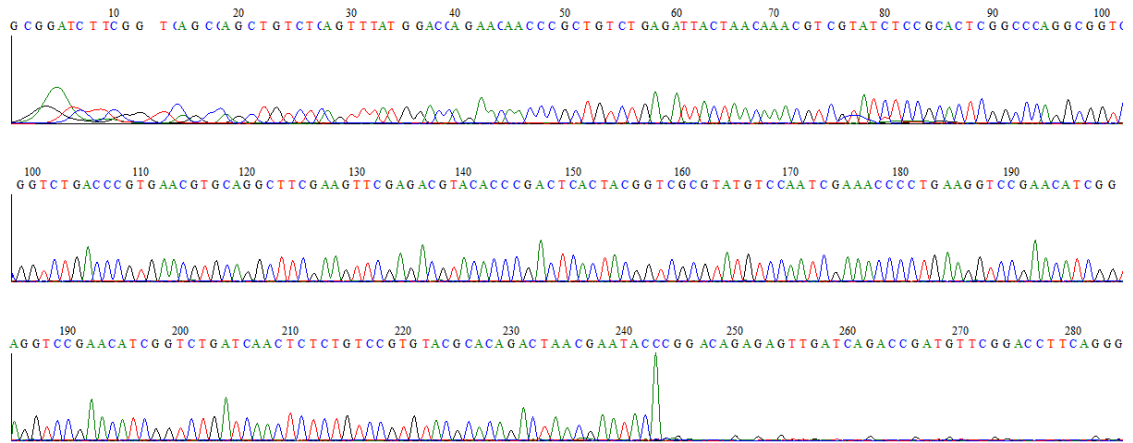
80 CF IV: G·C → T·A og G·C → T·A

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 410 bits (454), Expect = 3e-115
 Identities = 235/239 (99%), Gaps = 2/239 (0%)
 Strand=Plus/Minus

| | | | |
|-------|---------|--|---------|
| Query | 6 | TCTTCGGT--CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 63 |
| Sbjct | 3453923 | TCTTCGGTTCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTA | 3453864 |
| Query | 64 | CTAACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 123 |
| Sbjct | 3453863 | CGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCT | 3453804 |
| Query | 124 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 183 |
| Sbjct | 3453803 | TCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTG | 3453744 |
| Query | 184 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 242 |
| Sbjct | 3453743 | AAGGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC | 3453685 |



81 CF IV: G·C → A·T

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 405 bits (448), Expect = 1e-113
 Identities = 226/227 (99%), Gaps = 0/227 (0%)
 Strand=Plus/Minus

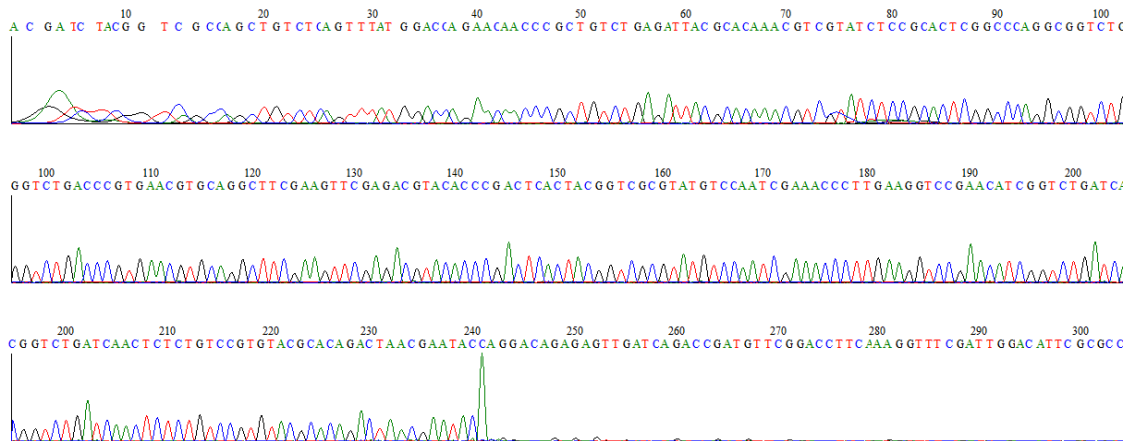
```

Query 14      GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTC 73
              |||
Sbjct 3453911 GCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTC 3453852

Query 74      GTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCTGTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAG 133
              |||
Sbjct 3453851 GTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCTGTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGAG 3453792

Query 134     ACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTGAAGTCCGAACA 193
              |||
Sbjct 3453791 ACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTTGAAGTCCGAACA 3453732

Query 194     TCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 240
              |||
Sbjct 3453731 TCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```



85 CF I: A·T → G·C

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 407 bits (450), Expect = 4e-114
 Identities = 227/228 (99%), Gaps = 0/228 (0%)
 Strand=Plus/Minus

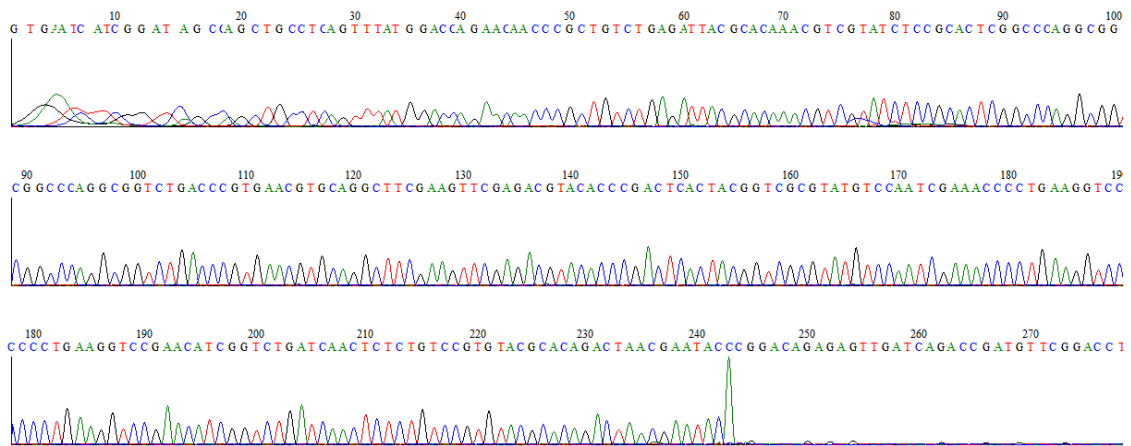
```

Query 15      AGCCAGCTGCCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGT 74
                |||
Sbjct 3453912  AGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGT 3453853

Query 75      CGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGA 134
                |||
Sbjct 3453852  CGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCGA 3453793

Query 135     GACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAAC 194
                |||
Sbjct 3453792  GACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGGTCCGAAC 3453733

Query 195     ATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 242
                |||
Sbjct 3453732  ATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
    
```



85 CF III: Ingen reell mutant

Features in this part of subject sequence:

[RNA polymerase, beta subunit](#)

Score = 414 bits (458), Expect = 3e-116
 Identities = 229/229 (100%), Gaps = 0/229 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 12      CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 71
                |||
Sbjct 3453913 CAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAACAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACG 3453854

Query 72      TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 131
                |||
Sbjct 3453853 TCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGCGGTCTGACCCGTGAACGTGCAGGCTTCGAAGTTCG 3453794

Query 132     AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGTCCGAA 191
                |||
Sbjct 3453793 AGACGTACACCCGACTCACTACGGTCGCGTATGTCCAATCGAAACCCCTGAAGTCCGAA 3453734

Query 192     CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 240
                |||
Sbjct 3453733 CATCGGTCTGATCAACTCTCTGTCCGTGTACGCACAGACTAACGAATAC 3453685
  
```

