



**LUNDS**  
**UNIVERSITET**

Naturvetenskapliga fakulteten

**Kloning, överuttryck och upprening av  
växtakvaporinet *AtSIP1;1* i *Escherichia coli***

VT 2020

MOBK01

Molekylärbiologi: Examensarbete – kandidatexamen  
15 hp

Författare: **Johan Zhu**  
(jo1657zh-s@student.lu.se)

Handledare: **Urban Johanson**  
(urban.johanson@biochemistry.lu.se)

VERSION 2

## Abstract

Heterologous overexpression of proteins signifies that the encoding gene of a protein in one organism is expressed in another host organism that normally does not have that gene in its genome. In basic biochemical research, this is an important method for studying various protein functions such as activity and interactions in biological processes, as well as obtaining sufficient amounts to determine protein structures. However, the expression of a foreign gene may be inefficient due to a suboptimal match with the expression machinery, or suppressed as it consumes a lot of resources. It can also be incompatible due to deleterious effects on the host's cellular functions. In addition, it may be problematic to study certain types of proteins as these have properties that are difficult to handle. A class of proteins where research is very limited is membrane proteins, which include aquaporins (AQPs) that form water-permeable channels in various membranes of cells. These channels belong to the family Major intrinsic proteins (MIPs) and are particularly abundant in plants where they can be divided into three subfamilies, depending on their cellular location: Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), Tonoplast intrinsic proteins (TIPs), and NOD26-like intrinsic proteins (NIPs). However, a new subfamily of plant aquaporins has been discovered, which has been named Small basic intrinsic proteins (SIPs). The structure and function of SIPs have not been fully determined as it has proved difficult to overexpress members of this subfamily in previous research.

The purpose of this project was to overexpress *AtSIP1;1*, which is one of three SIP isoforms present in the plant *Arabidopsis thaliana*, in the bacterial host *Escherichia coli*. This was achieved by subcloning the protein encoding gene sequence into an expression plasmid, optimize the expression conditions, purify the protein and examine the isolated protein.

The outcome was that the protein could not be overexpressed in the host organism due to the use of defective materials in one of the methods, which caused problems to proceed with the project. Suggestions on updating the materials with newer ones or other types that can be used as reserves, as well as improving the work under sterile conditions have been made. For future studies, it has been proposed to include other host organisms with expression systems of varying complexity since an expression system with a simple composition in a lower organism may be very limited to be able to express a gene from a higher organism. Such expression systems involve those found in eukaryotic cells, which have a high degree of complexity and the ability to express proteins that are generally difficult to express.

**Keywords:** Aquaporins, *AtSIP1;1*, *Arabidopsis thaliana*, Subcloning, Heterologous overexpression, *Escherichia coli*, Protein purification

## Introduktion

Heterologt överuttryck av proteiner innebär att den kodande genen för ett protein i en organism uttrycks i en annan värdorganism som normalt inte har den genen i sitt genom. Inom biokemisk grundforskning är detta en viktig metod för att kunna studera olika proteinfunktioner så som aktivitet och interaktioner i biologiska processer, såväl som att få fram tillräckliga mängder för att bestämma proteinstrukturer (Nordén *et al.*, 2011). Att framställa och isolera enskilda proteiner med hjälp av denna metod har även visat sig ha en stor betydelse inom livsmedels- och läkemedelsindustrin för kommersiellt ändamål. Däremot kan uttrycket av en främmande gen medföra skadliga effekter på värdens cellulära funktioner, men även vara kostsam för värdcellen att utföra då det tar mycket resurser i anspråk (Wagner *et al.*, 2006). Exempel på några klassiska värdorganismer med etablerade expressionssystem för heterologt överuttryck inkluderar bakterien *Escherichia coli*, samt jästsvamparna *Saccharomyces cerevisiae* och *Pichia pastoris* (Andersson *et al.*, 2018; Cregg *et al.*, 2009).

Proteiner är essentiella makromolekyler i allt levande och kan delas in i tre huvudklasser, baserat på deras tredimensionella struktur: globulära proteiner, fiberproteiner och membranproteiner (Mathews & Van Holde, 1996, ss. 165–185). Det finns ett färre antal identifierade membranproteiner då de är svårare att isolera och studera på grund av deras delvis hydrofoba natur, flexibilitet och brist på stabilitet utanför deras cellulära miljö (Carpenter *et al.*, 2008).

Till denna klass hör bland annat akvaporiner (AQP) som är transportproteiner. Akvaporiner bildar kanaler i cellmembran och är främst ansvariga för transport av vatten, men även andra små, polära molekyler i viss mån (Anderberg *et al.*, 2012). Vissa varianter har framgångsrikt överuttryckts i bland annat *P. pastoris* (Karlsson *et al.*, 2003) och strukturer har fastställts med hjälp av kristallografi (Murata *et al.*, 2000), medan membrantopologi och substratspecificitet för andra har enbart antagits utifrån analyser av proteinernas aminosyrasekvenser (Borgnia *et al.*, 1999). Vikten av fungerande vattenkanaler framhävs tydligt i sjukdomar så som nefrogen diabetes insipidus som är associerat med defekt uttryck av akvaporin typ 2 (AQP2) i njurar, samt bildandet av katarakt i ögonlinser som ett resultat av muterat akvaporin typ 0 (AQPO) (Heymann & Engel, 1999).

Akvaporiner tillhör familjen Major intrinsic proteins (MIPs) och finns i princip i alla organismer. Dock förekommer de särskilt rikligt i växter där de kan delas in i tre underfamiljer, beroende på deras lokalisering i celler: Plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), Tonoplast intrinsic proteins (TIPs) och NOD26-like intrinsic proteins (NIPs). Den sistnämnda underfamiljen är namngiven efter den första identifierade medlemmen NOD26 som finns i ett membran i en kvävefixerande region i rotknölar hos sojaböner (Johanson *et al.*, 2001). Emellertid har en ny underfamilj bland växtakvaporiner upptäckts som har fått namnet Small basic intrinsic proteins (SIPs). Sekvensanalyser och jämförelser med de andra underfamiljerna har visat att SIPs är relativt små som TIPs, men är mycket mer basiska (Johanson & Gustavsson, 2002). Utöver det är strukturen och funktionen av SIPs inte helt fastställd då det visat sig svårt att överuttrycka medlemmar ur denna underfamilj (Nordén *et al.*, 2011).

### Syfte

Målet med detta projekt var att heterologt överuttrycka växtakvaporinet *AtSIP1;1* från växten *Arabidopsis thaliana* i *E. coli* genom att subklona den kodande gensekvensen för växtakvaporinet till en expressionsplasmid för *E. coli*, optimera expressionsförhållanden, rena fram och i mån av tid testa det överuttryckta proteinet.

I arbetet med att nå målet utnyttjades både biokemiska och molekylärbiologiska arbetsmetodiker, vilka beskrivs i detalj under avsnittet Material och Metoder.

## Material och Metoder

De huvudsakliga utgångsmaterialen som användes i detta projekt sammanfattas i Tabell 1. Övrigt material och protokoll för de flesta metoder distribuerades av handledaren. Koncentrationer på DNA-innehållande komponenter mättes med hjälp av en NanoDrop spektrofotometer.

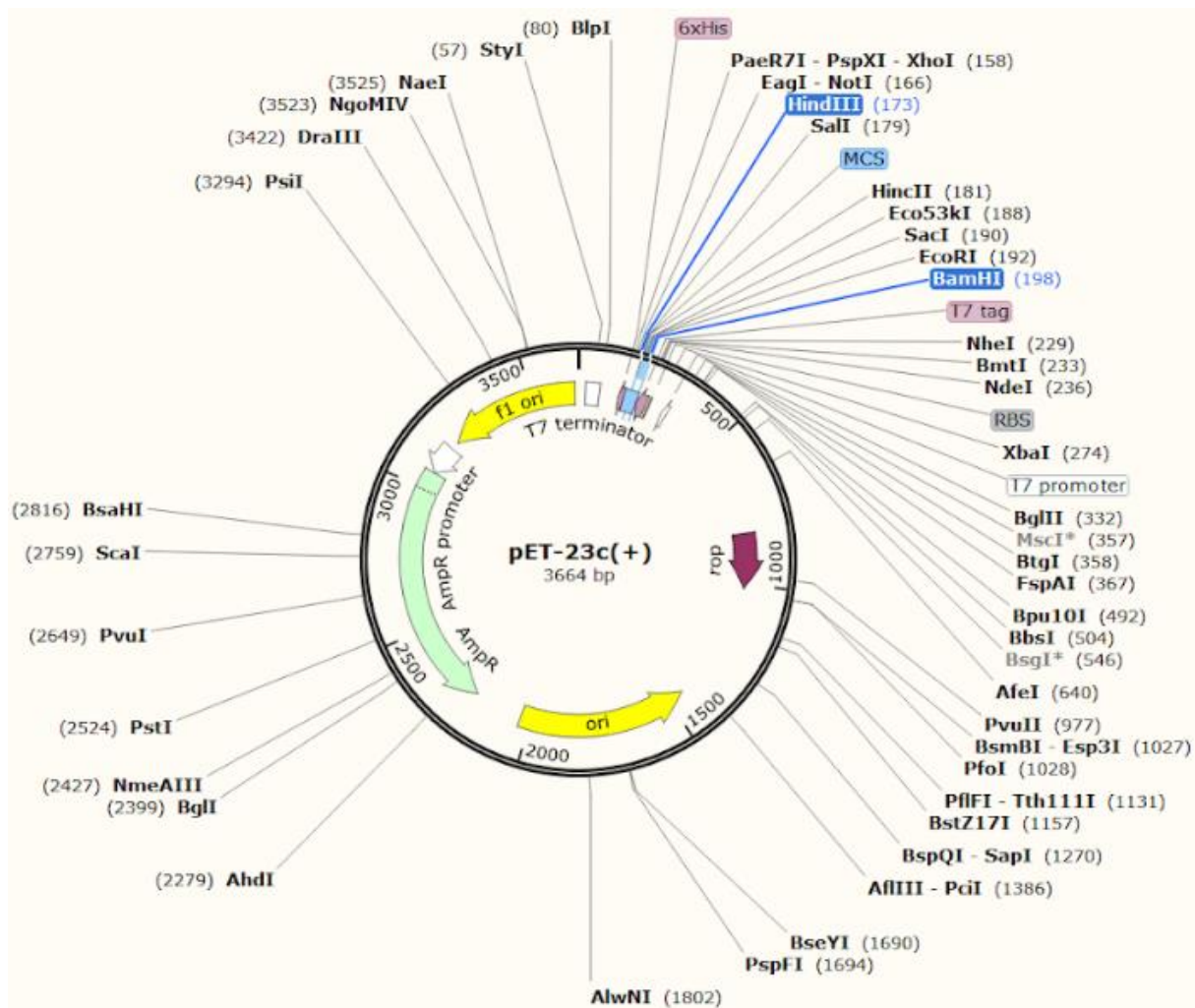
**Tabell 1.** De huvudsakliga utgångsmaterialen i projektet som tillhandahölls av handledaren.

<b>Templatplasmid</b>	pLS15 (pXβG-ev1; en pBSII KS-derivat) som innehåller CDS för <i>AtSIP1;1</i> ( <i>E. coli</i> )
<b>Mottagarplasmid</b>	pET-23c ( <i>E. coli</i> )
<b>Restriktionsenzym #1</b>	BamHI
<b>Restriktionsenzym #2</b>	HindIII
<b>Kloningsstam</b>	XL1-blue ( <i>E. coli</i> )
<b>Expressionsstam</b>	BL21 (DE3) pLysS ( <i>E. coli</i> )

Det experimentella arbetet gick ut på att amplifiera den kodande regionen av genen för *AtSIP1;1* i en polymeraskedjereaktion (PCR) med hjälp av två olika primers som har specifikt konstruerats för att binda till början respektive slutet av nukleotidsekvensen. Det resulterande DNA-fragmentet och en mottagarplasmid klyvdes båda med samma restriktionsenzymer för att kunna ligeras ihop till en plasmidkonstrukt. Resulterande plasmidkonstrukt transformerades först till en kloningsstam av *E. coli* för att öka antalet transformanter med plasmidkonstrukten och sedan till en expressionsstam av *E. coli* där genen för proteinet uttrycktes. Proteinuttrycket i olika expressionsförhållanden där mängden uttryckt protein detekterades och analyserades med hjälp av SDS-polyakrylamidelektrofores (SDS-PAGE) och Western blot. Slutligen renades proteinet upp genom Immobilized Metal ions Affinity Chromatography (IMAC).

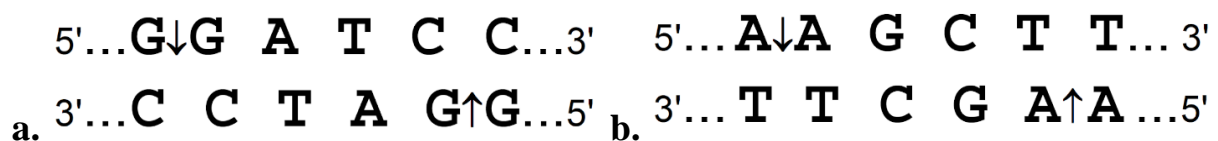
En framåt-orienterad (forward) primer och en omvänt-orienterad (reverse) primer konstruerades utifrån den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1* i enlighet med ett protokoll som distribuerades av handledaren. I båda primers finns delar som binder till den kodande nukleotidsekvensen, tillsammans med en igenkänningssekvens för ett restriktionsenzym vilken är flankerad av en slumpmässig sekvens på cirka tre nukleotider för att säkerställa att igenkänningssekvensen klyvs effektivt av restriktionsenzymet. Vid behov kan extra nukleotider behövas tilläggas för att justera läsramen vid translation av mRNA-sekvensen till en aminosyrasekvens.

Valet av de två restriktionsenzymerna gjordes utifrån nukleotidsekvensen och mottagarplasmiden. Plasmiden pET-23c innehåller igenkänningssekvenser för ett flertal restriktionsenzymer, men även en tagg på sex histidiner och en selektionsmarkör för antibiotikumet ampicillin (Figur 1). Restriktionsenzymerna BamHI och HindIII valdes för att klyva bort regionen Multiple Cloning Site (MCS) där DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* kunde infogas vid ligation. Analys av nukleotidsekvensen med hjälp av det nätbaserade verktyget [AddGene](#) visade att den kodande sekvensen för *AtSIP1;1* inte innehöll igenkänningssekvenserna för de två restriktionsenzymerna, vilket gjorde de till lämpliga val.



**Figur 1.** Karta på mottagarplasmiden pET-23c med en storlek på 3664 baspar (bp). Plasmiden har en selektionsmarkör för antibiotikumet ampicillin (grön). Restriktionsenzymerna BamHI och HindIII (blå) valdes för att klyva bort Multiple Cloning Site (MCS, ljusblå) så att DNA-fragmentet för *AtSIP1*;1 kunde infogas vid ligening. Detta kommer resultera i att proteinet får en tagg på sex histidiner (rosa) på dess C-terminal när genen uttrycks via T7-systemet. Genererad från verktyget SnapGene.

Både igenkänningssekvenserna för BamHI och HindIII består av sex nukleotider var där BamHI klyver mellan två guanin (G) (Figur 2a), medan HindIII klyver mellan två adenin (A) (Figur 2b). I forward primern konstruerades sekvensen för BamHI och i reverse primern konstruerades sekvensen för HindIII (Figur 2c). Utöver det lades tre slumpmässiga nukleotider i vardera primers för att säkra effektiv klyvning, samt två extra nukleotider i forward primern för justering av läsramen. Startkodonet ATG ingår i nukleotidsekvensen och konstruerades i forward primern, medan slutkodonet exkluderades från reverse primern då denna finns med i plasmidsekvensen.



c.

```
Forward primer: 5'-AAAGGATCCGTATGATGGGTGTGTTGAA-3'
Reverse primer: 5'-GCGAAGCTTGGCTTTCTTTGTTTCTTC-3'

>ATSIP1.1CDS
AAAGGATCCGTATGATGGGTGTGTTGAAATCGGCGATTGGGGATATGTTGATGACCTTCTCT
TGGGTTGTCCTCTCCGCTACCTTTGGAATTCAGACGGCGGCGATTATCTCCGCCGGTGATTT
TCAGGCAATCACTTGGGCTCCGTTGGTGATTTTGACGTCGTTGATTTTCGTCTACGTCCTCGA
TCTTCACCGTTATCTTCGGTAGCGCTAGCTTCAATCCTACCGGAAGCGCTGCCTTTTATGTC
GCCGGTGTCCCCGGAGATACTCTTTTCTCCTTGGCGATTAGATTACCTGCTCAGGCAATTGG
TGCTGCAGGAGGTGCATTGGCGATCATGGAGTTTCATACCAGAGAAATACAAGCATATGATTG
GAGGTCCTTCTCTTCAGGTTGATGTGCACACTGGAGCTATTGCTGAAACGATCTTAAGTTTT
GGTATTACCTTTGCGGTTTTGCTAATTATCCTCAGGGTCCACGGAGATTGCTTGCTAAGAC
GTTCTTGCTTGGCTTTCGCAACCATCTCATTTGTTGTCGCCGGATCTAAATACACTGGACCAG
CCATGAATCCTGCCATTGCGTTTGGATGGGCATACATGTACAGCTCCCACAACACATGGGAC
CATATCTACGTCTACTGGATCAGTTCTTTTCGTAGGAGCATTATCTGCTGCATTGCTTTCCG
TTCTATCTTCCCGCCACCTCGGCCCCAGAA GAAGAAACAAAAGAAAGCC AAGCTTCGC
```

**Figur 2. a)** Igenkänningssekvensen för restriktionsenzymet BamHI som klyver mellan den första och andra guanin nukleotiden (G) i 5' till 3' riktning, vilket resulterar i fragment med klistriga ändar. **b)** Igenkänningssekvensen för restriktionsenzymet HindIII som klyver mellan den första och andra adenin nukleotiden (A) i 5' till 3' riktning, vilket också ger upphov till fragment med klistriga ändar. **c)** De konstruerade forward (turkos) och reverse (gul) primers i 5' till 3' riktning med en storlek på 28 nukleotider var, samt deras positioner i förhållande till den kodande nukleotidsekvensen (CDS) för *AtSIP1;1*. Storleken på det resulterande DNA-fragmentet förväntas vara cirka 700 bp som är inom den gråfärgade regionen. Blåfärgade nukleotider är sekvenser av tre slumpmässiga nukleotider; rosafärgade nukleotider är igenkänningssekvenser för vardera restriktionsenzym; rödfärgade nukleotider är extra nukleotider; svartfärgade nukleotider är delar av nukleotidsekvensen; startkodonet ATG är understruket som är en del av nukleotidsekvensen och som finns med i forward primern. Gällande slutkodonet ingår den redan i plasmidsekvensen. De konstruerade primers och nukleotidsekvensen testades sedan i en simulerad PCR-reaktion via det nätbaserade programmet [Primer3Plus](#) innan den riktiga reaktionen.

De konstruerade primersekvenserna skickades till Eurofins Genomics för tillverkning och användes sedan i amplifieringen av den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1* i en polymeraskedjereaktion (PCR) (Tabell 2) som utfördes i PCR-maskinen T100 Thermal Cycler från Bio-Rad. Protokoll för utförande tillhandahölls av både handledaren och ThermoFisher där programmet Touch Down kördes för att öka specificiteten hos PCR-reaktionen (Tabell 3). En negativ kontroll som bestod av alla reaktionskomponenter förutom templatplasmiden ingick också för att kontrollera möjliga föroreningar som kunde ha uppstått under förberedelserna eller utförandet av PCR.

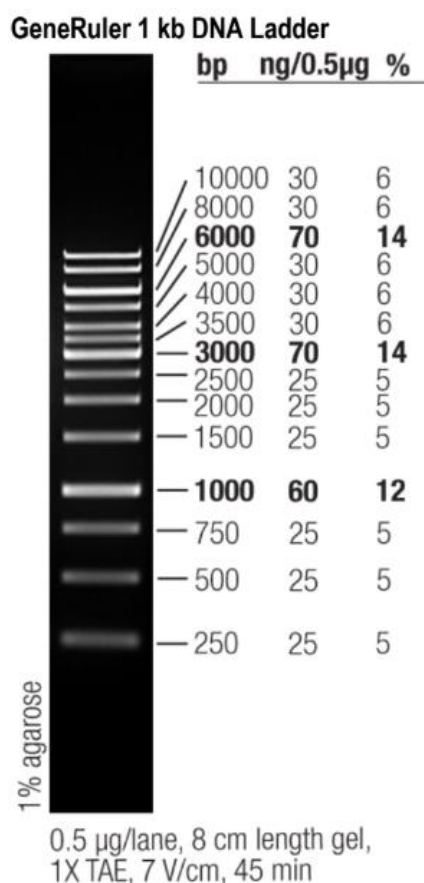
**Tabell 2.** Reaktionskomponenter och deras koncentrationer i amplifieringen av den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1* med PCR.

Reaktionskomponenter i PCR	Slutkoncentration
Phusion High-Fidelity buffer	1x
Deoxinukleosidtrifosfater (dNTPs)	200 $\mu$ M
Forward primer	0,5 $\mu$ M
Reverse primer	0,5 $\mu$ M
Phusion DNA-polymeras	0,02 U/ $\mu$ l
Templatplasmid (pLS15 (pX $\beta$ G-ev1) med CDS för <i>AtSIP1;1</i> )	1 ng/ $\mu$ l
Autoklaverat H <sub>2</sub> O	-
<b>Totalvolym = 50 <math>\mu</math>l</b>	

**Tabell 3.** Protokoll för PCR-programmet Touch Down.

Steg	Fas	Temperatur	Tid
1	Initiering	94°C	4 min
2	Denaturering	94°C	1 min
3	Hybridisering	64°C, -0.5°C per cykel	1 min
4	Förlängning	72°C	1 min
5	<b>Upprepa steg 2–4 (29x)</b>		
6	Denaturering	94°C	1 min
7	Hybridisering	50°C	1 min
8	Förlängning	72°C	1 min
9	<b>Upprepa steg 6–8 (9x)</b>		
10	Slutlig förlängning	72°C	4 min
11	Avslutande uppehåll	4°C	$\infty$

Som har nämnts i Figur 2c har det resulterande DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* en förväntad storlek på cirka 700 bp efter PCR-reaktionen. Detta verifierades genom en gelelektrofores med en 1% agarosgel med en DNA-baserad storleksmarkör som referens (Figur 3). Den resulterande gelen efter elektroforesen färgas normalt med GelStar för att tydliggöra DNA-banden.



**Figur 3.** Den DNA-baserade storleksmarkören med enheten bp. Markören användes som referens i analyser med gelelektrofores (1% agarosgel) för att verifiera storlekar på DNA-innehållande produkter. Hämtad från protokoll av ThermoFisher.

Gelelektrofores utnyttjades också för att testa funktionaliteten hos restriktionsenzymerna genom enkelklyvningar av mottagarplasmiden pET-23c med vardera enzym (Tabell 4). När funktionaliteten kunde verifieras dubbelklyvdes både DNA-fragmentet för *AzSIP1;1* och pET-23c med båda enzymerna (Tabell 5). Parallellt med enkel- och dubbelklyvningarna gjordes en negativ kontroll som bestod av den oklyvda pET-23c.

**Tabell 4.** Reaktionskomponenter och deras koncentrationer i enkelklyvning av pET-23c med a) BamHI och b) HindIII.

**a)**

Reaktionskomponenter i enkelklyvning av pET-23c med BamHI	Slutkoncentration
Mottagarplasmid (pET-23c)	1 µg/µl
Tango buffer	1x
BamHI	10 U/µl
Autoklaverat H <sub>2</sub> O	-
<b>Totalvolym = 20 µl</b>	



**b)**

Reaktionskomponenter i enkelklyvning av pET-23c med HindIII	Slutkoncentration
Mottagarplasmid (pET-23c)	1 µg/µl
Tango buffer	1x
HindIII	10 U/µl
Autoklaverat H <sub>2</sub> O	-
<b>Totalvolym = 20 µl</b>	

**Tabell 5.** Reaktionskomponenter och deras koncentrationer i dubbelklyvning av **a)** *AtSIP1;1* och **b)** pET-23c med BamHI och HindIII.

**a)**

Reaktionskomponenter i dubbelklyvning av <i>AtSIP1;1</i> med BamHI och HindIII	Slutkoncentration
DNA-fragment ( <i>AtSIP1;1</i> )	1 µg/µl
Tango buffer	2x
BamHI	10 U/µl
HindIII	10 U/µl
Autoklaverat H <sub>2</sub> O	-
<b>Totalvolym = 20 µl</b>	

**b)**

Reaktionskomponenter i dubbelklyvning av pET-23c med BamHI och HindIII	Slutkoncentration
Mottagarplasmid (pET-23c)	1 µg/µl
Tango buffer	2x
BamHI	10 U/µl
HindIII	10 U/µl
Autoklaverat H <sub>2</sub> O	-
<b>Totalvolym = 20 µl</b>	

Ligeringen av klyvd *AtSIP1;1* (insert) med klyvd pET-23c (vektor) möjliggjordes av att de båda klyvdes med samma restriktionsenzymer, vilket gav upphov till kompatibla klistriga ändrar. Ligeringen förekom i fyra olika förhållanden för att testa vilket förhållande av insert till vektor var mest optimal. Av dessa är ligeringsförhållandet 0:1 en religeringskontroll där ingen insert tillsattes för att se om pET-23c klyvdes av båda restriktionsenzymerna i dubbelklyvningen.

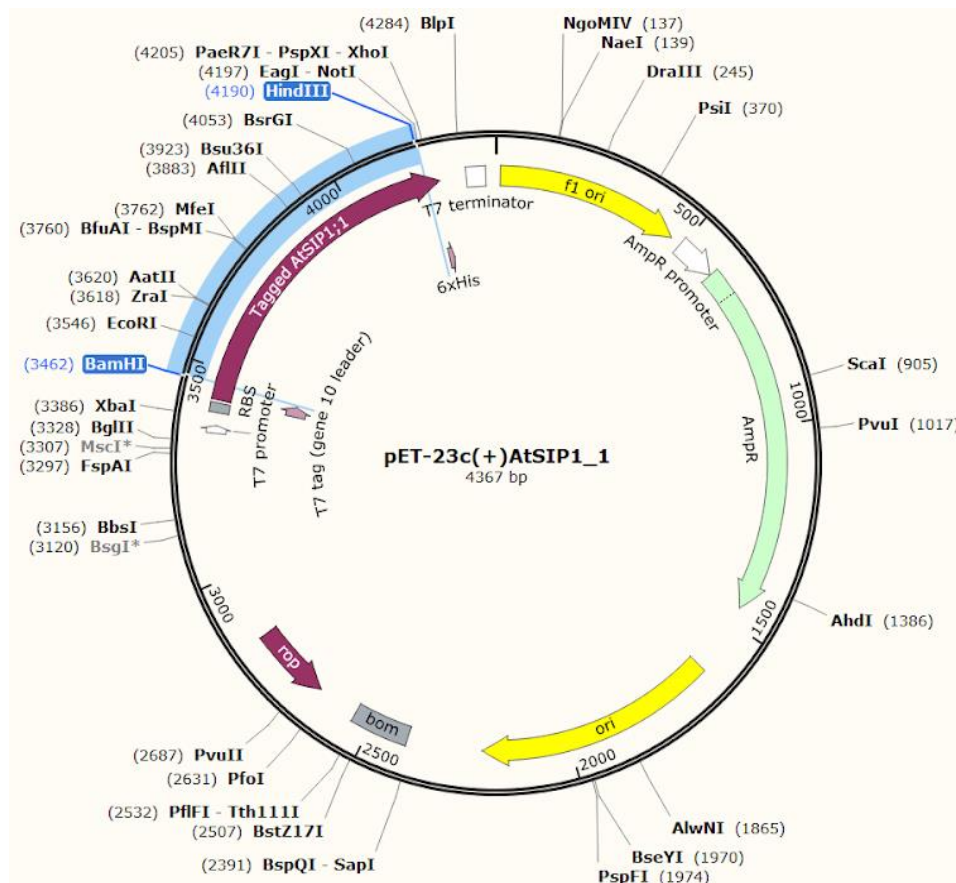
Följande ekvation användes för att beräkna hur mycket insert som skulle ligeras med vektorn i de olika förhållandena.

$$\text{insert massa (ng)} = \text{ligeringsförhållande} \times \frac{\text{insert längd (bp)}}{\text{vektor längd (bp)}} \times \text{vektor massa (ng)}$$

Insert längd är den förväntade storleken på DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* på cirka 700 bp, medan vektor längd och vektor massa för pET-23c ligger på 3664 bp respektive 100 ng. Reaktionskomponenterna och deras koncentrationer i ligeringsarna med de olika förhållandena presenteras i Tabell 6, medan kartan på den resulterande plasmidkonstrukten visas i Figur 4.

**Tabell 6.** Reaktionskomponenter och deras koncentrationer i ligeringen av *AtSIP1;1* med pET-23c.

Reaktionskomponenter i ligering av <i>AtSIP1;1</i> med pET-23c	Slutkoncentration
Insert (klyvd <i>AtSIP1;1</i> )	0 ng (0:1)
	19 ng (1:1)
	58 ng (3:1)
	100 ng (5:1)
Vektor (klyvd pET-23c)	100 ng
T4 DNA ligas buffer	1x
T4 DNA ligas	1 Weiss U
Autoklaverat H <sub>2</sub> O	-
<b>Totalvolym = 20 µl</b>	



**Figur 4.** Karta på plasmidkonstrukten (*AtSIP1;1* i pET23c) med en storlek på 4367 bp. Proteinet kommer att ha taggen på sex histidiner på dess C-terminal när genen uttrycks via T7-systemet. Genererad från verktyget SnapGene.

Plasmidkonstrukterna med de olika ligeringsförhållandena transformerades kemiskt till kloningsstammen XL1-blue av *E. coli* där dessa kalcium-kompetenta celler var inköpta från Agilent Technologies. Den kalcium-kompetenta kloningsstammen plattades sedan på LB agarplattor med 100 µg/ml ampicillin för att selektera fram de transformanter som har tagit upp de olika plasmidkonstrukterna, vilket motsvarade bakteriekolonier som växte på plattorna. I samband med det förbereddes en positiv kontroll som bestod av kloningsstammen med den oklyvda pET-23c där det förväntades mängder med kolonier och en negativ kontroll som bestod av kloningsstammen utan plasmidkonstrukterna där det förväntades inga kolonier, om inte det fanns spår av föroreningar som kunde ha uppstått under förberedelserna eller utförandet av transformationen.

Vad gäller religeringskontrollen förväntades inga kolonier som är ett tecken på att pET-23c klyvdes av båda restriktionsenzymerna i dubbelklyvningen. Skulle det växa kolonier på plattorna med religeringskontrollen är dessa falsk-positiva transformanter, vilket skulle innebära att båda restriktionsenzymerna inte var funktionella eller endast en av de var dysfunktionell. Detta skulle då resultera i att vektorn kunde spontant religeras till sin oklyvda plasmidform och framstå som en koloni på en positiv kontroll.

En enkelkoloni från agarplattan med det optimala ligeringsförhållandet av plasmidkonstrukten renstryktes på en ny LB agarplatta med 100 µg/ml ampicillin och ympades i ett LB medium med samma antibiotikum och koncentration över natt i 37°C. Plasmidkonstrukten från följande övernattskultur preparerades med GeneJET Plasmid Miniprep Kit från ThermoFisher och undersöktes med gelelektrofores.

För att verifiera om insert var närvarande i kolonierna på agarplattan med det optimala ligeringsförhållandet av plasmidkonstrukten genomfördes en koloni-PCR. Ett flertal enkelkolonier togs från plattan till enskilda eppendorfrör fyllda med vatten och lyserades genom en snabb uppvärmning, vilket frisatte plasmidkonstrukten från dessa. Den frisatta plasmidkonstrukten från varje koloni användes sedan som templat i PCR där samma reaktionskomponenter, koncentrationer och program kördes med undantag av templatet (Tabell 2 och Tabell 3). Resultaten efter PCR analyserades med gelelektrofores. Som positiv kontroll användes den oklyvda formen av templatplasmiden pLS15 (pXβG-ev1) med den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1*. I samband med det ingick en negativ kontroll som hade alla reaktionskomponenter utom templat för att kontrollera möjliga föroreningar som kunde ha uppstått under förberedelserna eller utförandet av koloni-PCR.

*På grund av problem med restriktionsenzymerna i ovannämnda metoder har de resterande stegen inte hunnits utföras för att fullborda projektet. Här nedan följer beskrivningar på de uteblivna metoderna och deras principiella utföranden. Mer om problemen förklaras under avsnittet Diskussion.*

Plasmidkonstrukten med det optimala ligeringsförhållandet transformeras kemiskt till expressionsstammen BL21 (DE3) pLysS av *E. coli* där dessa celler görs kalcium-kompetenta utifrån ett protokoll från handledaren. Den resterande proceduren utförs på samma vis som för kloningsstammen (se beskrivning av utförande ovan).

Rena celler från följande övernattskultur förbereds genom att överföra en liten mängd av övernattskulturen till ett nytt rör med LB medium och 100 µg/ml ampicillin där OD<sub>600</sub> mäts var trettionde minut. OD<sub>600</sub> är ett mått på bakteriers celldensitet, vilket motsvarar deras tillväxtfas då de ökar exponentiellt i cellantal. När ett optimalt värde av OD<sub>600</sub> uppnås tillsätts en viss koncentration av Isopropyl-β-D-1-tiogalaktopyranosid (IPTG) i den nya kulturen för att inducera uttrycket av *AtSIP1;1*-genen i plasmidkonstrukten via T7-systemet (Figur 4).

Det resulterande proteinet, med en His-tag på sex histinder på dess C-terminal (Figur 4), renas fram med hjälp av en Immobilized Metal ions Affinity Chromatography (IMAC) som utnyttjar följande egenskap. ArSIP1;1 solubiliseras med en detergent där cellrester centrifugeras ner och supernatanten laddas på en Ni<sup>2+</sup>-kolonn som har en stark bindningsaffinitet för histidin-innehållande proteiner. När celllysaten tillsätts kommer en lösning att rinna ut droppvis från kolonnen. Denna lösning kallas för *load* och består av icke-bundna molekyler då dessa har ingen bindningsaffinitet för metalljonerna i kolonnen. Kolonnen tvättas sedan med en detergent där en lösning också kommer att rinna ut. Denna lösning kallas för *wash* och innehåller molekyler som har en liten bindningsaffinitet för metalljonerna. Det som återstår i kolonnen är proteinet som då elueras när en kompetitiv molekyl tillsätts där denna har en starkare bindningsaffinitet för metalljonerna än proteinet med His-taggen. Lösningen med det eluerade proteinet kallas för *elute*.

De insamlade lösningarna från varje steg i IMAC analyseras i en SDS-polyakrylamidelektrofores (SDS-PAGE). Till skillnad från en gelelektrofores är denna specifik för analys av protein-innehållande produkter där gelen består av polyakrylamid och storleksmarkören som används som referens är proteinbaserad med enheten kiloDalton (kDa). Den resulterande gelen efter elektroforesen färgas normalt med Coomassie Brilliant Blue för att synliggöra proteinbanden.

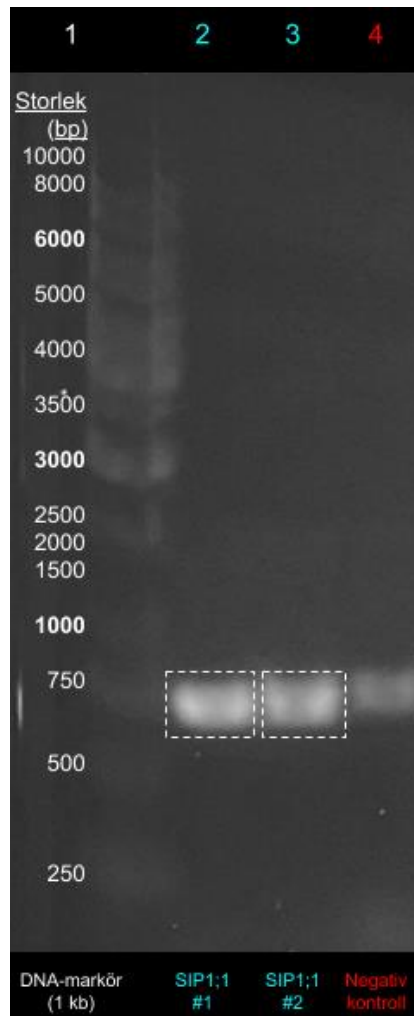
Gelen från SDS-PAGE används sedan i en Western blot för att detektera det His-taggade proteinet med hjälp av antikroppar. Huvudprinciperna i denna metod går ut på att överföra de resulterande banden från gelen till ett nitrocellulosa-membran via kapillärkraft eller elektroblotting där två olika typer av antikroppar tillsätts för att möjliggöra detekteringen av proteinet. Den primära antikroppen är en antikropp mot His-taggen på proteinet, medan den sekundära antikroppen är en antikropp mot den primära antikroppen. Den sekundära antikroppen är konjugerad med exempelvis alkalisk fosfatas, vilket klyver ett tillsatt substrat så att en blå färg erhålls där antikroppen har bundit in.

*Felaktiga och uteblivna resultat kompletteras med ett annat resultat från handledaren som presenteras och diskuteras under avsnitten Resultat och Diskussion.*

## Resultat

Det resulterande DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* efter PCR fördelades i två brunnar efter den DNA-baserade storleksmarkören i gelelektrofores. I de två brunnarna syntes ett tydligt band med en storlek på cirka 750 bp (Figur 5). Intill dessa laddades den negativa kontrollen där ett band inom samma storleksintervall uppvisades.

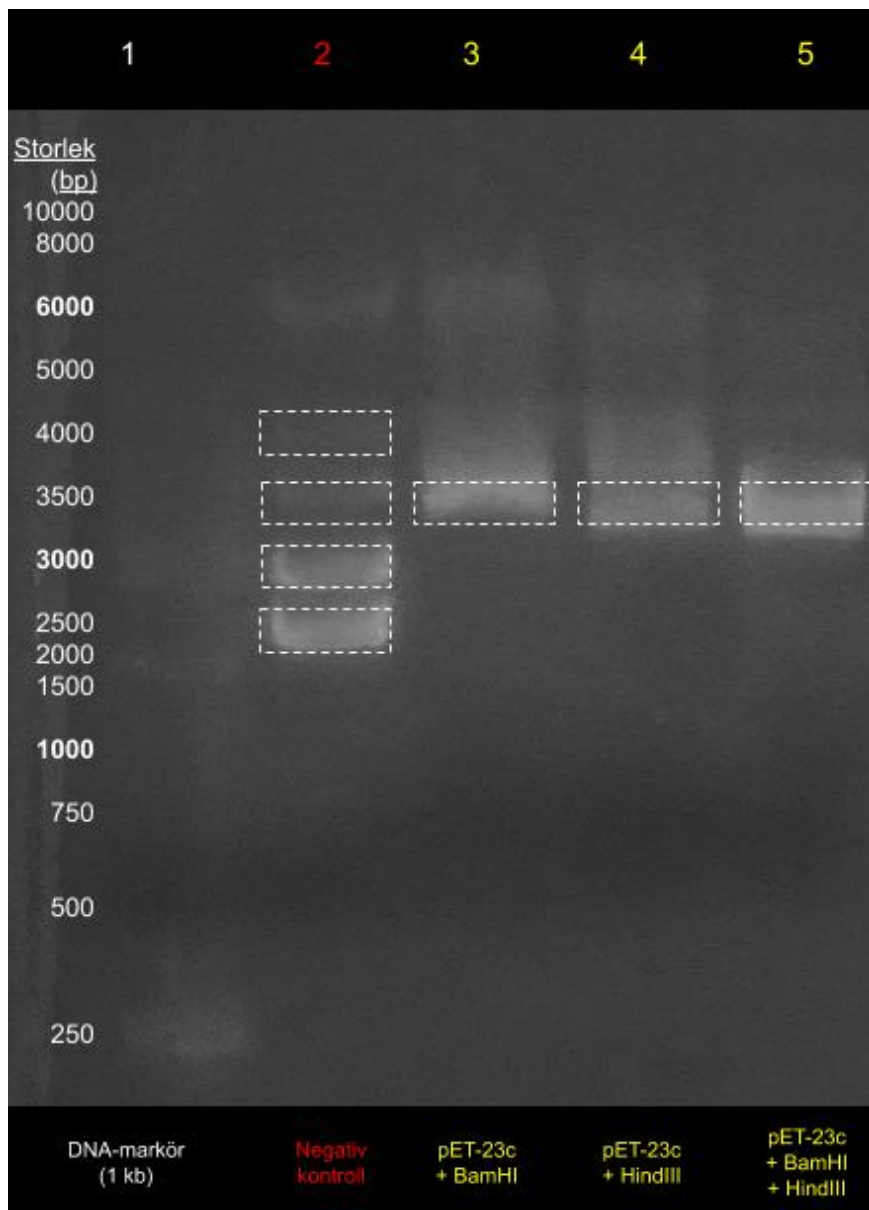
Koncentrationen av DNA-fragmentet mättes till 80 ng/ $\mu$ l med NanoDrop spektrofotometern.



**Figur 5.** Gelelektrofores av DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* efter PCR. Proverna är i följande ordning: **1.** DNA-markör, **2.** *AtSIP1;1* #1, **3.** *AtSIP1;1* #2, **4.** Negativ kontroll (inget templat). Vitt markerar band av intresse i förhållande till storleksmarkören.

I gelelektrofores av den oklyvda pET-23c som negativ kontroll uppkom fyra band, medan det uppstod ett band när det enkelklyvdes med vardera restriktionsenzym och ett band när det dubbelklyvdes med båda enzymerna (Figur 6). Från nedifrån och upp i brunnen där den oklyvda pET-23c laddades har de fyra banden storlekar på ungefär 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp och 4000 bp där alla band uppvisades tydligt. I brunnarna som innehöll enkelklyvningar av pET-23c med BamHI respektive HindIII har vardera band en storlek på ungefär 3500 bp som uppvisades tydligt. I brunnen där dubbelklyvningen av pET-23c med båda restriktionsenzymerna laddades har det resulterande bandet en storlek på cirka 3500 bp som också uppvisades tydligt. I de brunnar där prover av oklyvd och enkelklyvd pET-23c laddades syntes även band med en storlek på 6000 bp.

Koncentrationen av den oklyvda och dubbelklyvda pET-23c mättes till 200 ng/μl respektive 100 ng/μl med NanoDrop spektrofotometern, medan den dubbelklyvda *AtSIP1;1* (ej visad) mättes till 200 ng/μl.


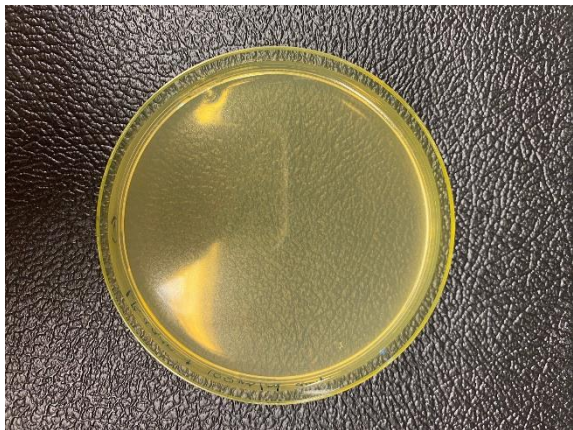
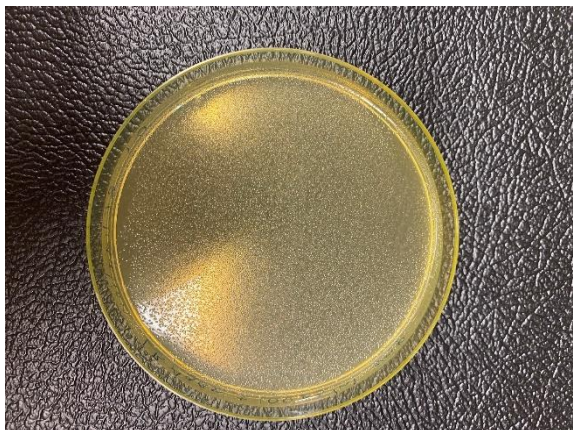


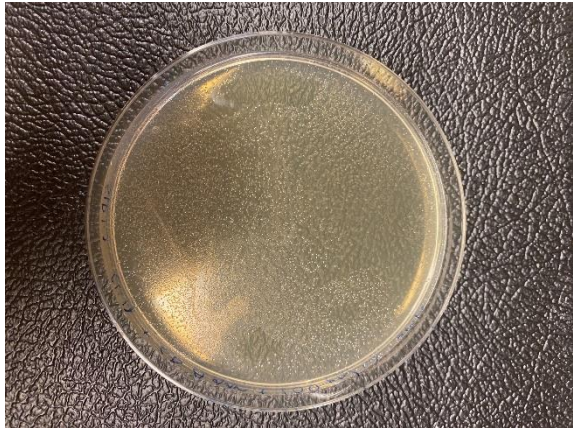
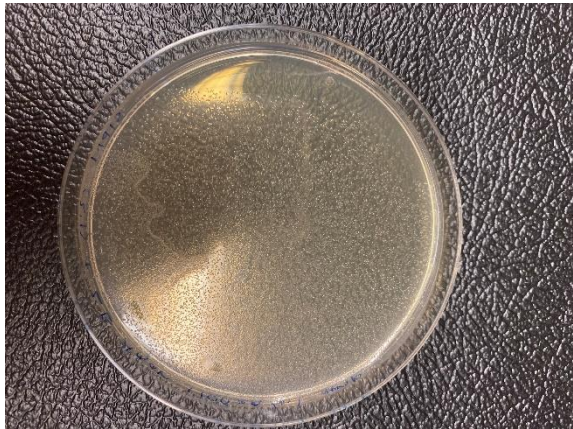

**Figur 6.** Gelelektrofores av pET-23c i sin oklyvda form samt klyvda form där den har enkelklyvts med vardera restriktionsenzym och dubbelklyvts med båda enzymerna. Proverna är i följande ordning: **1.** DNA-markör, **2.** Negativ kontroll (oklyvd pET-23c), **3.** Enkelklyvd pET-23c med BamHI, **4.** Enkelklyvd pET-23c med HindIII, **5.** Dubbelklyvd pET-23c med BamHI och HindIII. Observera att banden på 6000 bp i oklyvd och enkelklyvd pET-23c har inte inkluderats då detta förklaras under avsnittet Diskussion. Vitt markerar band av intresse i förhållande till storleksmarkören.

Vid den kemiska transformationen av plasmidkonstrukterna med de olika ligeringsförhållandena till den kalcium-kompetenta kloningsstammen XL1-blue av *E. coli* genererades mängder med transformanter på agarplattan där religeringskontrollen 0:1 plattades, såväl som på agarplattorna med ligeringsförhållandena 1:1, 3:1 och 5:1 (Tabell 7). Utöver det genererades massvis med transformanter på den positiva kontrollen, medan inga kolonier uppstod på den negativa.



**Tabell 7.** Sammanfattning på antal transformanter som genererades på de olika agarplattorna där plasmidkonstrukterna med de olika ligeringsförhållandena plattades. Observera att antalen är uppskattade och inte exakta.

Platta	Antal transformanter (kolonier)	Bild
Positiv kontroll [1]	1000+	
Negativ kontroll	0	
0:1 [2]	1000+	

1:1	500+	
3:1	500+	
5:1	500+ <sup>[3]</sup>	

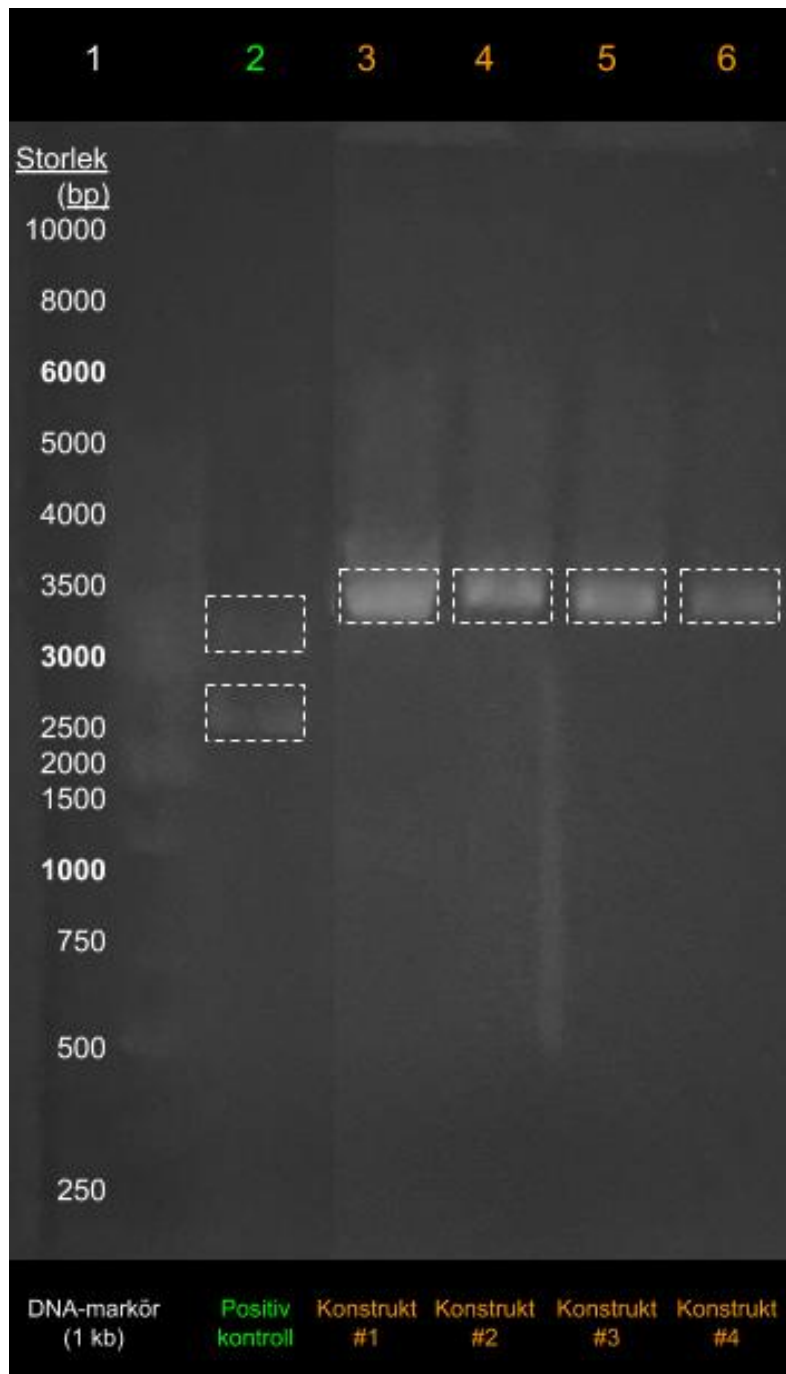
<sup>[1]</sup> Oklyvd pET-23c.

<sup>[2]</sup> Religeringskontroll.

<sup>[3]</sup> Enkelkolonierna var mer utspridda på agarplattan jämfört med kolonierna på agarplattorna för plasmidkonstrukterna 1:1 och 3:1.

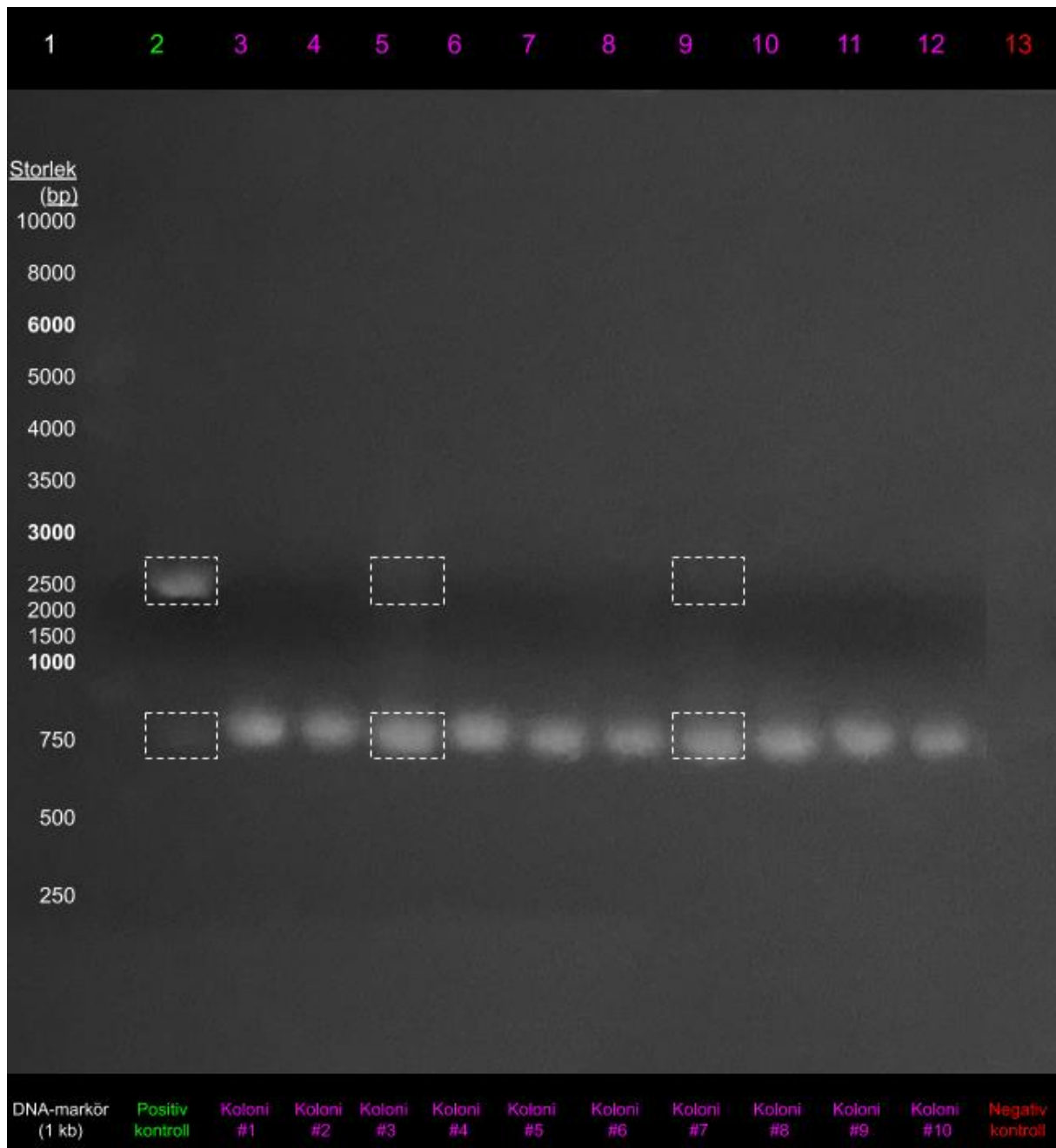
Utifrån Tabell 7 preparerades plasmidkonstrukten med ligeringsförhållandet 5:1 från en enkelkoloni på agarplattan. Plasmidkonstrukten dubbelklyvdes sedan med BamHI och HindIII, följt av gelelektrofores. Innehållet delades upp i fyra brunnar där ett tydligt band med en storlek på cirka 3500 bp visades upp i vardera brunn (Figur 7). Som positiv kontroll användes den oklyvda pET-23c där enbart två utav de fyra banden syntes i gelen fast väldigt svagt.





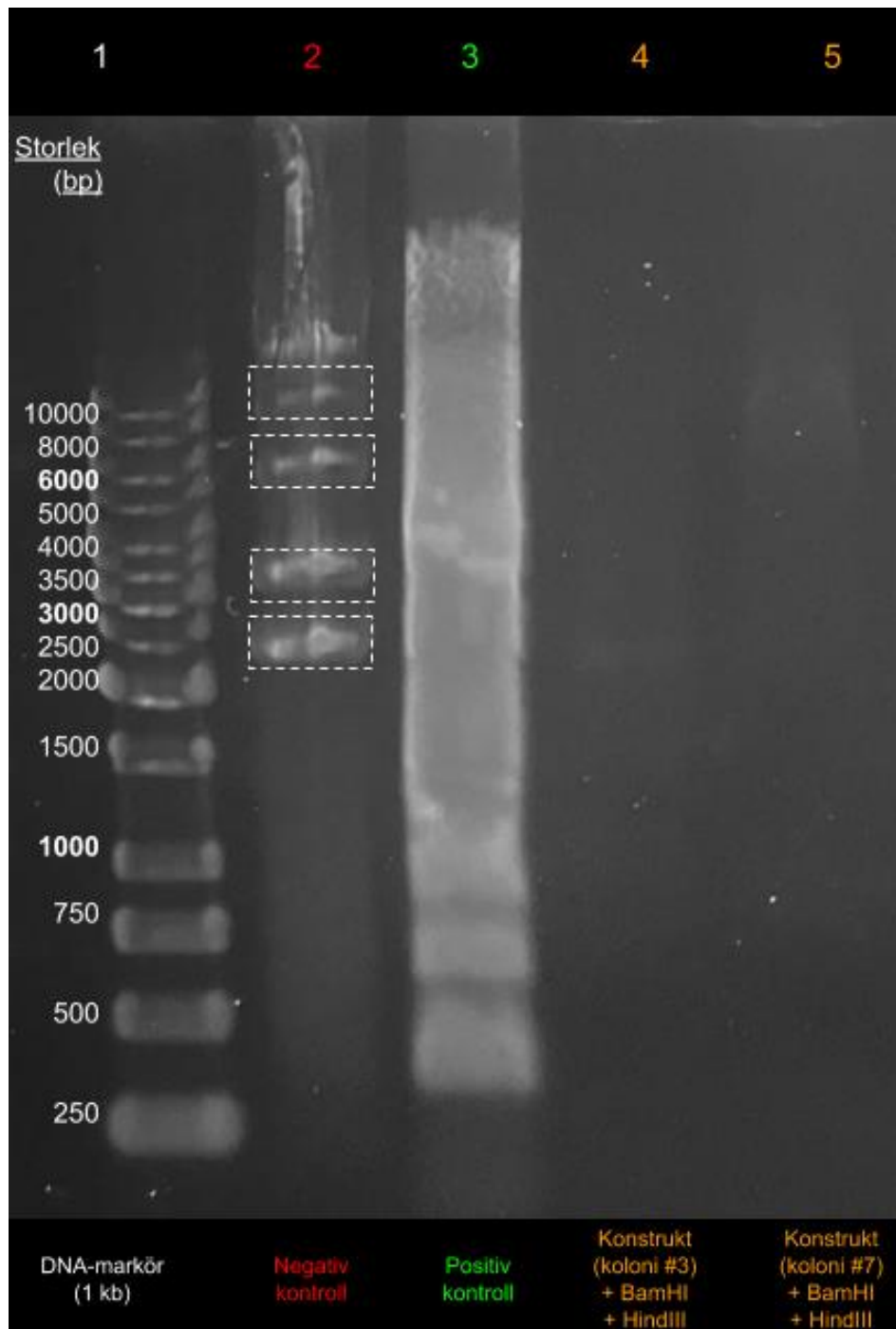
**Figur 7.** Gelelektrofores av den preparerade plasmidkonstrukten med ligeringsförhållandet 5:1 som dubbelklyvdes med BamHI och HindIII. Proverna är i följande ordning: **1.** DNA-markör, **2.** Positiv kontroll (oklyvd pET-23c), **3.** Dubbelklyvd plasmidkonstrukt #1, **4.** Dubbelklyvd plasmidkonstrukt #2, **5.** Dubbelklyvd plasmidkonstrukt #3, **6.** Dubbelklyvd plasmidkonstrukt #4. Vitt markerar band av intresse i förhållande till storleksmarkören.

Från agarplattan där plasmidkonstrukten med ligeringsförhållandet 5:1 plattades valdes tio enkelkolonier för koloni-PCR. Den efterföljande gelelektroforesen uppvisade ett band med en storlek på cirka 750 bp för samtliga kolonier där var och en laddades i enskilda brunnar i gelen (Figur 8). Den oklyvda templatplasmiden pLS15 (pXβG-ev1) med den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1* användes som positiv kontroll där två band syntes till: ett tydligt band på cirka 2500 bp och ett svagt band på cirka 750 bp. I den negativa kontrollen uppvisades inga band.



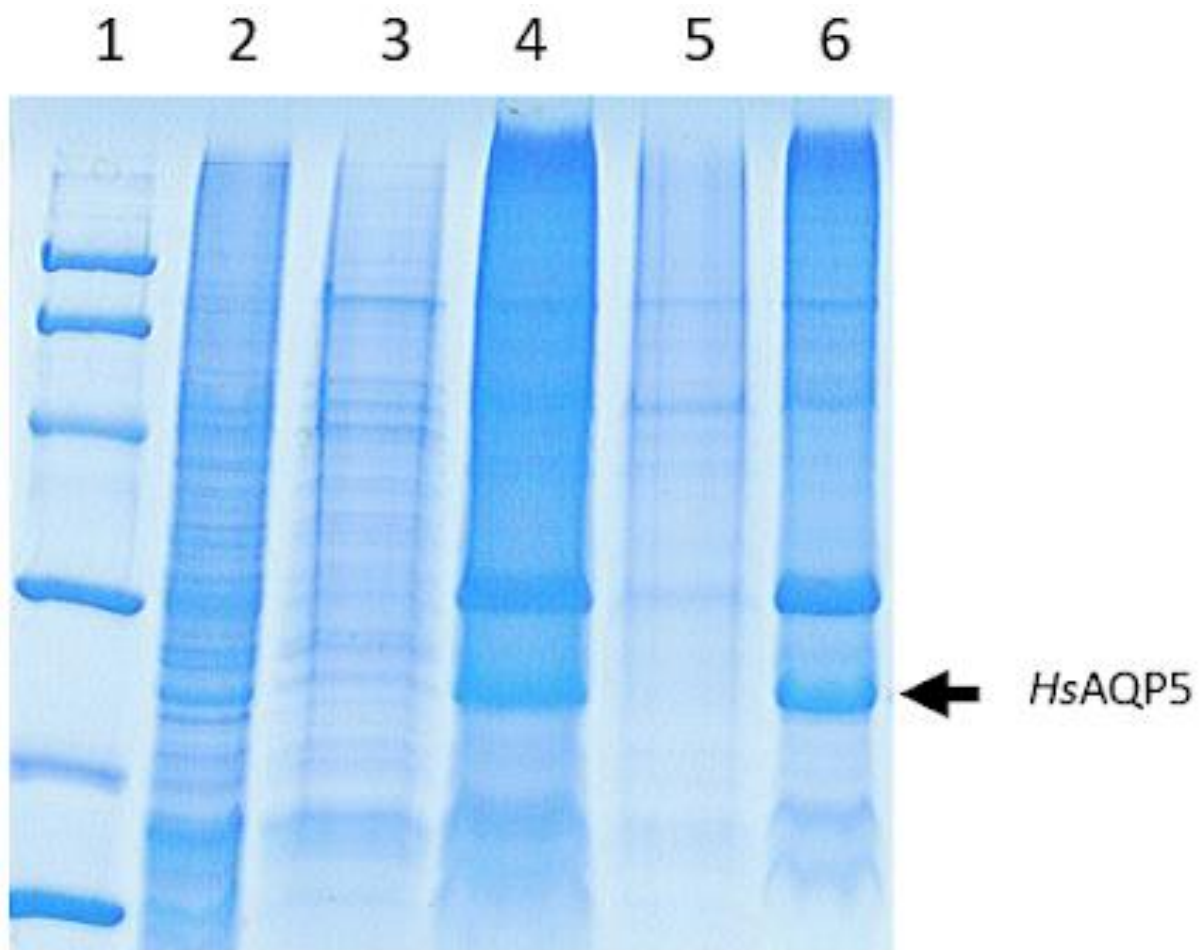
**Figur 8.** Gelelektrofores av koloni-PCR på tio enkelkolonier från agarplattan där plasmidkonstrukten med ligeringsförhållandet 5:1 plattades. Proverna är i följande ordning: **1.** DNA-markör, **2.** Positiv kontroll (oklyvd pLS15 (pXβG-ev1) med CDS för *AtSIP1;1*), **3.** Enkelkoloni #1, **4.** Enkelkoloni #2, **5.** Enkelkoloni #3, **6.** Enkelkoloni #4, **7.** Enkelkoloni #5, **8.** Enkelkoloni #6, **9.** Enkelkoloni #7, **10.** Enkelkoloni #8, **11.** Enkelkoloni #9, **12.** Enkelkoloni #10, **13.** Negativ kontroll (inget templat/plasmidkonstrukt). Vitt markerar band av intresse i förhållande till storleksmarkören.

Utifrån Figur 8 preparerades plasmidkonstrukten från enkelkolonin #3 och enkelkolonin #7, följt av dubbelklyvning med BamHI och HindIII. I gelelektroforesen uppvisades inga band för båda kolonierna (Figur 9). Närmast intill DNA-markören laddades den oklyvda pET-23c som negativ kontroll där de fyra banden syntes i gelen. Bredvid den oklyvda plasmiden laddades den dubbelklyvda formen som en positiv kontroll där ett överflöd av DNA uppstod.



**Figur 9.** Gelelektrofores av den preparerade plasmidkonstrukten 5:1 från utvalda enkelkolonier utifrån resultat i koloni-PCR som dubbelklyvdes med BamHI och HindIII. Proverna är i följande ordning: **1.** DNA-markör, **2.** Negativ kontroll (oklyvd pET-23c), **3.** Positiv kontroll (dubbelklyvd pET-23c), **4.** Dubbelklyvd plasmidkonstrukt från enkelkoloni #3, **5.** Dubbelklyvd plasmidkonstrukt från enkelkoloni #7. Vitt markerar band av intresse i förhållande till storleksmarkören.

Nedan presenteras referensdatan från handledaren som komplement till de felaktiga och uteblivna resultaten i detta projekt (Figur 10). Figuren visar överuttrycket av humant akvaporin typ 5 (*HsAQP5*) i jästsvampen *P. pastoris* där detta har analyserats med SDS-PAGE. I den Coomassie-färgade gelen visas bandet för det överuttryckta proteinet som har en ungefärlig storlek mellan 15 och 25 kDa.



**Figur 10.** SDS-PAGE av isolerade membran-fraktioner från *P. pastoris* som har överuttryckt *HsAQP5*. Membraner samlades upp från celllysats genom ultracentrifugering där de återsuspenderades och tvättades med 4 M urea, följt av 20 mM natriumhydroxid (NaOH) för att avlägsna perifera membranproteiner. Proverna är i följande ordning: **1.** Protein-markör, **2.** Membraner från celllysats, **3.** Supernatant från tvättning med 4 M urea, **4.** Membran-pellet efter tvättningen med urea, **5.** Supernatant från tvättning med 20 mM NaOH, **6.** Membran-pellet efter tvättningen med NaOH. Opublicerade resultat från K. Nordén, tillhandahållen av handledaren.

## Diskussion

I gelelektroforesen i Figur 5 uppkom ett band av DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* med en ungefärlig storlek på 750 bp, vilket stämmer överens med den förväntade storleken på cirka 700 bp. Däremot syntes ett band av samma storleksordning i den negativa kontrollen som tyder på att det har funnits spår av templatplasmiden.

I gelelektroforesen i Figur 6 uppvisades fyra band med varierande storlekar i den negativa kontrollen, vilket var den oklyvda pET-23c. I teorin motsvarar bandet på cirka 2500 bp pET-23c i supercoiled form, medan bandet på cirka 3000 bp motsvarar en annan supercoiled plasmid. Denna plasmid kallas för pLysS och finns i den stam av *E. coli* där pET-23c preparerades från. De andra banden på cirka 3500 och 4000 bp motsvarar antingen den öppen-cirkulära eller linjäriserade formen av pET-23c. De resulterande banden för pET-23c efter enkelklyvning med BamHI respektive HindIII och dubbelklyvning med båda restriktionsenzymerna har en storlek på ungefär 3500 bp, vilket korresponderar till det band i den oklyvda pET-23c som uppvisar samma storleksordning. Som har nämnts motsvarar denna storleksordning på 3500 bp antingen den öppen-cirkulära eller linjäriserade formen av plasmiden, vilket restriktionsenzymerna åstadkom med. Dessutom förväntades ett ytterligare band för dubbelklyvningen av pET-23c då BamHI och HindIII klyver en region där detta fragment har en storlek på cirka 25 bp (Figur 1). Detta band kan ha uppstått i gelelektroforesen men är för litet för att detekteras med hjälp av den använda metoden. Gällande banden med en storlek på 6000 bp som uppkom i oklyvd och enkelklyvd pET-23c kan dessa vara reaktionsblandningarna som överladdades i brunnarna eller möjliga föroreningar som uppstod under förberedelserna eller utförandet av restriktionsenzymklyvningarna då det i teorin inte finns något som motsvarar denna storleksordning.

Resultaten i Tabell 7 var ej förväntat då det genererades mängder med falsk-positiva transformanter i religeringskontrollen 0:1. Detta kan tyda på att båda restriktionsenzymerna som användes i dubbelklyvningarna av pET-23c och *AtSIP1;1* var dysfunktionella eller endast ett av enzymerna var defekt, vilket resulterade i den spontana religeringen av plasmiden. Utöver detta noterades inte någon direkt större skillnad i kolonier på agarplattor där plasmidkonstrukterna med de olika ligeringsförhållandena plattades. En liten detalj som upptäcktes var att kolonierna på agarplattan där plasmidkonstrukten med ligeringsförhållandet 5:1 plattades var mer utspridda jämfört med kolonierna i 1:1 och 3:1 förhållandena. Utifrån denna detalj ansågs detta ligeringsförhållande vara den optimala, vilket låg till grund för preparationen av följande plasmidkonstrukt från kolonierna. För övrigt genererades massvis med kolonier i den positiva kontrollen, vilket var förväntat. Inga kolonier genererades i den negativa kontrollen, vilket tyder på att det inte uppstod föroreningar under förberedelserna eller utförandet av transformationen.

Felaktigheten som uppkom i Tabell 7 kunde tydliggöras av gelelektroforesen i Figur 7 där dubbelklyvningen av den preparerade plasmidkonstrukten uppvisade enbart ett band på cirka 3500 bp som korresponderar antingen till den öppen-cirkulära eller linjäriserade formen av plasmiden och inget band som korresponderar till DNA-fragmentet. Detta kunde tolkas som att ligeringen av *AtSIP1;1* till pET-23c misslyckades på grund av att båda eller ett av restriktionsenzymerna var defekta, vilket gav upphov till att DNA-fragmentet och plasmiden inte klyvdes. Till följd av denna felaktighet kunde projektet inte gå vidare med att transformera plasmidkonstrukten till expressionsstammen för uttryck, följt av upprening med IMAC samt detektion och analys med SDS-PAGE och Western blot av det uttryckta proteinet.

Gelelektroforesen i Figur 8 där koloni-PCR utfördes på tio enkelkolonier från agarplattan med plasmidkonstrukten 5:1 uppvisade två band i den positiva kontrollen, vilket var den oklyvda templatplasmiden pLS15 (pXβG-ev1) med den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1*. Det tydliga bandet på cirka 2500 bp motsvarar själva pLS15 (pXβG-ev1) plasmiden,

medan det svaga bandet på cirka 750 bp motsvarar den kodande nukleotidsekvensen för *AtSIP1;1*. Detta bandmönster uppvisades av plasmidkonstrukten i enkelkoloni #3 och även möjligen av plasmidkonstrukten i enkelkoloni #7 i vilka bandet på cirka 2500 bp syntes otydligt. Detta tyder på att DNA-fragmentet för *AtSIP1;1* fanns närvarande vid transformationen av plasmidkonstrukten till kloningsstammen. Bandmönstret uppkom inte i de andra kolonierna då bandet som dessa uppvisade på cirka 750 bp var primer-dimerer som uppstod som biprodukter i koloni-PCR. Enkelkolonierna #3 och #7 valdes för vidare undersökning där plasmidkonstrukten hos dessa dubbelklyvdes med BamHI och HindIII. Resultatet utav detta i gelelektroforesen i Figur 9 tyder på inga spår av DNA-fragmentet, vilket ifrågasätter resultatet för koloni-PCR. En möjlig förklaring till varför inga band syntes för dessa prover i gelelektroforesen kan vara att koncentrationerna av DNA-fragmenten var för låga, vilket gjorde de ej detekterbara. Utöver detta vandrade storleksmarkören felaktigt i gelen, vilket gav upphov till fel storleksordningar på de fyra banden i den negativa kontrollen. Dessutom uppvisades ett överflöd av DNA i den positiva kontrollen. Följande observationer kan ha berott på överladdningar i brunnarna, men även spår av möjliga föroreningar.

Utifrån dessa observationer och analyser på de erhållna resultaten kan det konstateras att felaktigheten berodde på en defekt i restriktionsenzymer som uppkom snarare vid dubbelklyvningar med båda enzymerna än vid enkelklyvningar med enzymerna var för sig då de påvisades vara funktionella vid enkelklyvningarna (Figur 6). Detta kan åtgärdas genom att uppdatera restriktionsenzymerna med nya då utgången material kan förlora sin funktionalitet med tiden. Alternativt kan andra restriktionsenzymer användas som reserv ifall felaktigheter uppkommer. Samtidigt kan mängden föroreningar minskas genom att arbeta mer sterilt då dessa kan mer eller mindre påverka det slutgiltiga resultatet.

De felaktiga och uteblivna resultaten kompletterades i viss mån av referensdatan från handledaren. Ett lyckat överuttryck av *HsAQP5* i *P. pastoris* visades i SDS-PAGE i Figur 10 där storleken på proteinet bestämdes till ett ungefärligt storleksintervall mellan 15 och 25 kDa.

I Nordén *et al.* (2011) uttrycktes fyra olika akvaporiner i *P. pastoris* varav *HsAQP5* och *AtSIP1;1* ingick. I denna studie lyckades man överuttrycka alla förutom *AtSIP1;1* då uttrycket av denna var för svagt. Detta berodde delvis på att proteinet uppvisade reducerade transkriptionsnivåer som orsakades av post-transkriptionella begränsningar.

Att heterologt överuttrycka en gen som kodar för ett protein i en annan värdorganism som normalt inte har genen i sitt genom är en förutsättning för att kunna studera proteiners struktur och funktion då analyser av proteiners aminosyrasekvenser inte är tillförlitliga för att bestämma dessa faktorer eftersom det grundar sig på förutsägelser. Som det nämns i Wagner *et al.* (2006) kan uttrycket av en främmande gen medföra skadliga effekter på värdens cellulära funktioner, men även vara kostsam att utföra då det går åt mycket resurser. Ett expressionssystem med en enkel sammansättning i en lägre organism kan vara mycket begränsat för att kunna uttrycka en gen från en högre organism. Utifrån detta var en tänkbar problematik för projektet att det prokaryotiska expressionssystemet i *E. coli* kan vara för enkelt och begränsat för att kunna uttrycka genen för *AtSIP1;1* från den eukaryotiska *A. thaliana*.

Framtida studier bör därför inkludera andra värdorganismer med varierande expressionssystem där förslag på expressionssystem för svåruttryckta proteiner tas upp i studien av Andersson *et al.* (2018). Att åstadkomma med att heterologt överuttrycka proteiner ger tillräckliga mängder för att kunna kartlägga strukturer, som i sin tur utnyttjas för att bestämma funktioner så som aktiviteter och betydelser i biologiska sammanhang, vilket bidrar med nya insikter och möjligheter inom forskningsområdet där framsteg inte har uppnåtts.

## Referenser

- Anderberg, H. I., Kjellbom, P. & Johanson, U. (2012). Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Frontiers in Plant Science*, 3(33), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00033>
- Andersson, P., Edenståhl, S., Eriksson, E. & Hävermark, T. (2018). *Framtidens expressionssystem för svåruttryckta proteiner: Utvärdering av tolv expressionssystem*. Uppsala universitets publikationer. <http://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:1212333/FULLTEXT01.pdf>
- Borgnia, M., Kozono, D., Calamita, G., Maloney, P. C. & Agre, P. (1999). Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the *E. coli* water channel protein. *Journal of Molecular Biology*, 29(5), 1169–1179. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3032>
- Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D. & Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(5), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K. & Chappell, T. (2009). Chapter 13 Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. I J. Abelson, M. Simon, G. Verdine och A. Pyle (Red.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 169–189). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63013-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63013-5)
- Heymann, J. B. & Engel, A. (1999). Aquaporins: phylogeny, structure and physiology of water channels. *News Physiology Science*, 14(5), 187–193. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1999.14.5.187>
- Johanson, U. & Gustavsson, S. (2002). A New Subfamily of Major Intrinsic Proteins in Plants. *Molecular Biology and Evolution*, 19(4), 456–461. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004101>
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A. R. & Kjellbom, P. (2001). The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in Arabidopsis Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants. *Plant Physiology*, 126, 1358–1369. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1358>
- Karlsson, M., Fotiadis, D., Sjövall, S., Johansson, I., Hedfalk, K., Engel, A. & Kjellbom, P. (2003). Reconstitution of water channel function of an aquaporin overexpressed and purified from *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 537(1–3), 68–72. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00082-6)
- Mathews, C. K. & Van Holde, K. E. (1996). *Biochemistry* (2<sup>nd</sup> ed.). Benjamin Cummings. <https://archive.org/details/biochemistry00math>
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. & Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407, 599–605. <https://doi.org/10.1038/35036519>
- Nordén, K., Agemark, M., Danielson, J. ÅH., Alexandersson, E., Kjellbom, P. & Johanson, U. (2011). Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology*, 11(47), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-47>
- Wagner, S., Bader, M. L., Drew, D. & de Gier, JW. (2006). Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, 24(8), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.008>