

Bachelorproef

Heterologe expressie van het *Trypanosoma evansi*
variabele antigenische glycoproteïne RoTat 1.2 in
Leishmania tarentolae

Prins Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde
Nationalestraat 155
2000 Antwerpen
Belgium
Promotor: Prof. Dr. Philippe Büscher
Copromotor: Dr. Nick Van Reet

Manon Geerts

Departement GEZ-LA
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie
Farmaceutische & Biologische Laboratoriumtechnologie
Academiejaar 2015-2016

Bachelorproef

Heterologe expressie van het *Trypanosoma evansi*
variabele antigenische glycoproteïne RoTat 1.2 in
Leishmania tarentolae

Prins Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde
Nationalestraat 155
2000 Antwerpen
Belgium
Promotor: Prof. Dr. Philippe Büscher
Copromotor: Dr. Nick Van Reet

Manon Geerts

Departement GEZ-LA
Bachelor Biomedische Laboratoriumtechnologie
Farmaceutische & Biologische Laboratoriumtechnologie
Academiejaar 2015-2016

DANKWOORD

Dit is het dan, de allerlaatste etappe voor het behalen van het diploma Professionele Bachelor in de Biomedische Laboratoriumtechnologie, afstudeerrichting Farmaceutische en Biologische Laboratoriumtechnologie. De eindwerkstage.

Ik zal beginnen met te vermelden dat het schrijven van dit dankwoord mij toch al een tijdje bezighoudt. Nooit had ik gedacht dat een stage zo veel impact op mij zou hebben en (om wat melig te doen) mij zo nauw aan hart zou liggen. Ik sta dus wat perplex en heb geen flauw idee hoe ik jullie dit moet uitleggen. De woorden schieten me tekort maar hier is een poging tot:

Het is allemaal begonnen op de dag waar een zekere prof. dr. Philippe Büscher mij terugbelde met het nieuws: “Alle, ’t is goed, je mag toch bij mij stage komen lopen”. Een vreugdedansje en een traantje van geluk, ja dit is echt waar, werd het vervolg van dit telefoontje. Al jaren was ik gefascineerd door het Tropisch Instituut te Antwerpen en eindelijk kreeg ik de kans om binnen deze indrukwekkende muren een grondig kijkje te gaan nemen. En toen was het zo ver. Al dagen stonde ik te popelen en voelde ik de kriebels in mijn buik. De grote dag was eindelijk aangebroken, mijn eerste stagedag, mijn eerste dag in het Tropisch Instituut.

Maar dan... een mysterieuze meneer met klompen, wat later mijn promotor bleek te zijn, kwam mij oppikken aan de receptie en leidde mij naar zijn bureau, waar tien minuten later mijn allereerste vergadering zou plaatsvinden. Andere rare snuiters kwamen één per één het kantoor binnen gestrompeld en namen plaats aan de ronde tafel. 9u30, start van de vergadering. 10u30, einde van de vergadering. Een uur lang heb ik met mijn wenkbrauwen zitten fronsen, met mijn mond open zitten staren en gewoon ja geknikt op elke vraag die mij gesteld werd. Niets had ik begrepen. Waar was ik in godsnaam terechtgekomen? Maar al snel, heel snel, werd gebleken dat de combinatie van deze mysterieuze man en deze rare snuiters mij een onvergetelijke ervaring gingen bezorgen.

Eerst en vooral wil ik mijn promotor prof. Dr. Philippe Büscher bedanken. Philippe, dankzij jou heb ik de kans gekregen om een stage te mogen hebben gelopen om U tegen te zeggen. Het geluid van je klompen waarmee je de gangen van het Instituut paradeert om overal en bij iedereen je bijna intimiderende wijsheid te delen zal ik nooit vergeten. Je staat altijd paraat om met een enorme oprechtheid wie dan ook te helpen en te leiden, en staat niet voor niks bekend als “de beste baas ooit”.

Nick, liefste copromotor, wat ik van jouw deskundigheid, intelligentie en ervaring heb geleerd is onbeschrijfbaar. Dankzij de vele uren die ik met jou in het labo heb mogen spenderen, ken ik nu niet alleen alle liedjes van K3 vanbuiten, maar heb ik ook indruk kunnen maken op mijn nieuwe stageplek door met mijn nieuwe kennis te showen. Bedankt voor jouw enthousiasme en passie voor het vak (jouw beste vriend *Leishmania tarentolae* niet inbegrepen) dat je met mij elke dag opnieuw deelde. Bedankt voor jouw indrukwekkend geduld met mijn onhandigheden in het labo en jouw bijsturing van mijn “Antwerpse” schrijfwijze. Bedankt voor jouw aanstekelijk lach en apart gevoel voor humor. 10 000 luchtballonnen voor jou!

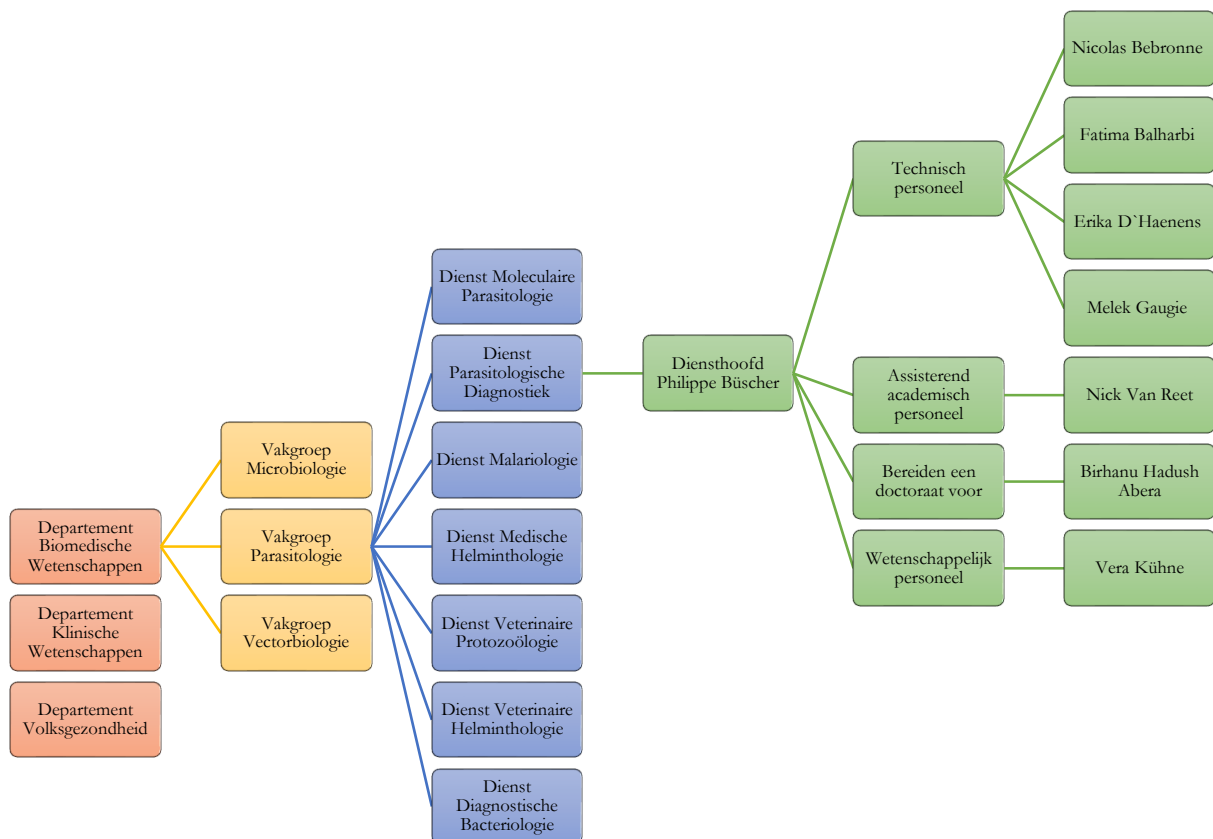
Nicolas, à toi un tout grand merci pour tes histoires souvent sans fin mais fascinantes. Vera, thank you for your impressive positivism. Also thank you to Melek, Fatima, Erika, Tessa and Sara. Each of you made me feel like home since day one.

Dankzij deze bende heb ik niet alleen onnoemelijk veel bijgeleerd en genoten van een enorm aangename werksfeer, maar ben ik ook on-be-schrij-fe-lijk veel geïnspireerd op verschillende vlakken. Maar alle geluk is dit nog niet het einde van mijn ervaring hier. See you in the summer!

BEDANKT!!!

ORGANOGRAM

De Eenheid voor Diagnostiek van Parasieten maakt deel uit van het departement Biomedische Wetenschappen van het Prins Leopold Instituut voor Tropische Geneeskunde te Antwerpen. De eenheid is een World Health Organization Collaboration Center for Research and Training on Human African Trypanosomiasis Diagnostics en een World Animal Health Organization Reference Laboratory for Surra.



INHOUD

1	Lijst van afkortingen.....	1
2	Samenvatting.....	3
3	Abstract.....	5
4	Inleiding en problematiek.....	7
5	Theorie – literatuuronderzoek.....	9
5.1	Surra.....	9
5.1.1	Inleiding.....	9
5.1.2	Morfologie.....	10
5.1.3	Klinische symptomen.....	11
5.2	Variabele oppervlakte glycoproteïnen.....	12
5.3	Diagnose van surra.....	15
5.3.1	CATT/ <i>T. evansi</i>	15
5.3.2	LATEX/ <i>T. evansi</i>	15
5.3.3	ELISA/ <i>T. evansi</i>	16
5.3.4	Immuuntrypanolyse.....	16
5.3.5	Immunochromatografie.....	16
5.4	<i>Leishmania tarentolae</i>	17
6	Objectieven.....	19
7	Experiment.....	21
7.1	Materialen en Methodes.....	21
7.1.1	Bio-informatica.....	21
7.1.2	Moleculaire biologie.....	26
7.1.3	<i>Leishmania tarentolae</i>	32
7.1	Resultaten.....	37
7.1.1	Transformatie van pLEXY met constructen uit RoTat 1.2 VSG.....	37
7.1.2	<i>Leishmania tarentolae</i>	43
8	Besluit.....	47
9	Bibliografie.....	49
10	Bijlagen.....	51
10.1	Inhoud van de buffers voor SDS-Page, Western Blot en directe immunostaining.....	51
10.2	Sequencing.....	52

1 LIJST VAN AFKORTINGEN

AP	Alkalische fosfatase
AZ	Aminozuur
BCIP	5-broom-4-chloor-3'-indolylfosfaat p-toluidine zout
BHI	Brain-Heart Infusion
CATT	Card Agglutination Test for Trypanosomiasis
CBB	Coommassie Briljant Blauw
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
ELISA	Enzymgekoppelde immunosorbent assay
GuCl	Guanidiniumchloride
HAT	Humane Afrikaanse Trypanosomiasis
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethaansulfonzuur
ICT	Immunochromatografische test
<i>L. tarentolae</i>	<i>Leishmania tarentolae</i>
LB	Luria-Bertani
LEXSY	<i>Leishmania</i> Expression System
mRNA	Messenger ribonucleïnezuur
NBT	Nitro blauw tetrazolium chloride
OD	Optische dichtheid
PDS	Potassium dodecyl sulfate
PenStrep	Penicilline Streptomycine
RNA	Ribonucleïnezuur
RoTat 1.2	Sint-Genesius Rode <i>Trypanozoon</i> antigen type 1.2
rRNA	Ribosomaal ribonucleïnezuur
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
<i>ssu</i>	Small sub unit
<i>T. evansi</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>
TAE	Tris-acetaat-EDTA
TCA	Trichloorazijnzuur
UTR	Untranslated region
VAT	Variable Antigen Type
VSG	Variable Surface Glycoprotein

2 SAMENVATTING

ACHTERGROND

Afrikaanse trypanosomiasen zijn verwaarloosde tropische ziektes die armoede handhaven door hun impact op zowel de volksgezondheid als de landbouwproductie. Door hun lage prevalentie en de toxiciteit van de behandeling, is er nood aan eenvoudige, snelle en accurate individuele tests met een hogere gevoeligheid en specificiteit dan de bestaande tests.

Humane Afrikaanse slaapziekte (HAT) of slaapziekte is een parasitaire ziekte veroorzaakt door twee geografisch gescheiden *Trypanosoma (T.) brucei (b.)* ondersoorten. *T.b. gambiense* veroorzaakt vooral chronische infecties in West- en Centraal-Afrika, terwijl de meer acute *T.b. rhodesiense* infecties endemisch zijn in oostelijk en zuidelijk Afrika. De ziekte wordt overgebracht door tsetseevliegen (*Glossina* species) en komt daardoor enkel voor in sub-Saharisch Afrika, het verspreidingsgebied van de vector.

In tegenstelling tot HAT wordt surra, een infectieziekte veroorzaakt door de protozoaire parasiet *T. evansi*, mechanisch overgebracht via bijtende insecten (*Tabanidae* en *Stomoxys* species) of vampiervleermuizen. Daardoor komt deze ziekte ook voor buiten Afrika, namelijk in het Midden-Oosten, Azië en Zuid- en Centraal-Amerika met zelfs sporadische uitbraken in Europa. Naast de wereldwijde verspreiding en de snelle uitbreiding (door de verplaatsing en de verkoop van veestapel), treft de ziekte een breed spectrum wilde en gedomesticeerde dieren en het veroorzaakt grote financiële schade.

Momenteel wordt de serodiagnose voor surra uitgevoerd via een directe kaartagglutinatie-test, namelijk de diagnostische sneltest CATT/*T. evansi*. Deze antistofdetectietest maakt gebruik van de gevriesdroogde bloedstroomvorm van de trypanosoom geïsoleerd uit geïnfecteerde ratten die het predominant variant oppervlakte glycoproteïne (VSG) RoTat 1.2 op hun oppervlakte tot expressie brengen. Maar de productie hiervan is tijdrovend, moeilijk te standaardiseren, duur en vereist het gebruik van proefdieren. Bovendien is er een hoog bioveiligheidsrisico voor het personeel (voornamelijk bij HAT).

Recent is er een nieuwe diagnostische test ontwikkeld, de Surra Sero K-SeT, op basis van een recombinant RoTat 1.2 aangemaakt in *Pichia pastoris*. Het is een individuele immuno-chromatografische test (ICT) met een laterale flow voor de detectie van specifieke antilichamen tegen het dominante RoTat 1.2 VSG in het bloed van zoogdieren. (Rogé S., 2015)

METHODEN EN RESULTATEN

In deze bachelorproef werd *Leishmania tarentolae* gebruikt als eukaryote gastheer in plaats van de gist *Pichia pastoris* voor de expressie van de recombinante antigenen. Deze parasiet heeft volgende voordelen: eukaryotische proteïnesynthese voor de correcte vouwing van eiwitten, bezit het volledige gamma aan post-translationele aanpassingen, hoge opbrengst van het recombinante eiwit en secretie van het eiwit in het supernatans wat belangrijk is voor de vereenvoudiging van de eiwitzuivering. Bovendien is *L. tarentolae* makkelijk te manipuleren en goedkoop in cultuur te houden.

Om het RoTat 1.2 VSG tot expressie te brengen hebben we vijf constructen van verschillende lengte en epitopen geselecteerd. De sequenties werden geïntegreerd in de pLEXSY-hyg expressie vector en getransformeerd naar *E. coli*. Eens de constructen geïntegreerd werden via DNA sequencing werd *L. tarentolae*

getransfekteerd. Het secretoom van de getransfekteerde klonen van *L. tarentolae* werd vervolgens geanalyseerd via SDS-PAGE en immunostaining. Hieruit bleek dat bij één construct alle klonen een aantoonbare expressie vertoonden na immunostaining. Bij een tweede construct bleek slechts één van de drie klonen een aantoonbaar eiwit te produceren. De klonen van drie andere constructen gaven geen aantoonbaar resultaat.

CONCLUSIES EN BETEKENIS

Het construct, dat bestaat uit het volledig N-terminaal gedeelte van het RoTat 1.2 VSG, blijkt tot expressie te komen in het secretoom van *Leishmania tarentolae*. Het is bovendien gelijkaardig in sequentie als het construct dat in *Pichia pastoris* reeds succesvol tot expressie kwam. Vooraleer dit antigeen in een nieuwe diagnostische sneltest voor surra kan worden geïncorporeerd zijn er echter nog vele verdere stappen in het proces nodig.

3 ABSTRACT

BACKGROUND

African trypanosomiasis are neglected tropical diseases that causes poverty through their impact on both public health and agricultural production. Due to their low prevalence and the toxicity of the treatment, there is a high need for simple, fast and accurate individual tests with higher sensitivity and specificity than the existing tests.

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a parasitic disease caused by two geographically separated *Trypanosoma (T.) brucei (b.)* subspecies. *T.b. gambiense* causes mainly chronic infections in Western and Central Africa, while the more acute *T.b. rhodesiense* infections are endemic in eastern and southern Africa. The disease is transmitted by tsetse flies (*Glossina* species) and occurs therefore only in sub-Saharan Africa, the distribution area of the vector.

Unlike HAT is surra, an infectious disease caused by the protozoan parasite *T. evansi*, mechanically transmitted by biting insects (*Tabanidae* and *Stomoxys* species) or vampire bats. Therefore, the disease doesn't occur only in Africa but also in the Middle East, Asia and South and Central America with even sporadic outbreaks in Europe. The movement of livestock and animal trade easily introduces *T. evansi* into new areas. Beside the widespread distribution, surra affects a large spectrum of wild and domesticated animals and causes major economic damage.

Currently, the serodiagnosis for surra is performed via a direct cardagglutination test, namely the rapid diagnostic test CATT/*T. evansi*. This antibody detection test makes use of a lyophilised bloodstream form of the trypanosome isolated from infected rats expressing the *T. evansi* predominant variant surface glycoprotein (VSG) RoTat 1.2 on their surface. However the production of this test is time-consuming, difficult to standardise, expensive and requires the use of laboratory animals. Moreover, there is a high risk of infection of the laboratory technician (especially for HAT).

Recently, a new diagnostic test has been developed, the Surra Sero K-Set, wherein the native antigen is replaced by a recombinant RoTat 1.2 expressed in the yeast *Pichia pastoris*. It is an individual immunochromatic test (ICT) having a lateral flow for the detection of specific antibodies against the predominant RoTat 1.2 VSG in the blood of mammals. (Rogé S. , 2015)

METHODS AND RESULTS

In this bachelor thesis we used *Leishmania tarentolae* as an eukaryotic host for the expression of recombinant antigens instead of the yeast *Pichia pastoris*. This parasite has the following advantages: eukaryotic protein synthesis for the correct folding of proteins, full range of post-translational modifications, high yields of the recombinant protein and secretion of the protein in the supernatant that is important for the purification. Moreover, *L. tarentolae* is easy to manipulate and cheap to culture.

To express the RoTat 1.2 VSG, we've selected five constructs of different lengths and epitopes. The sequences were integrated into the pLEXY-hyg expression vector and transformed into *E. coli*. Once the constructs were verified by DNA sequencing, *L. tarentolae* was transfected. The secretome of the transfected clones of *L. tarentolae* was analyzed via SDS-PAGE and immunostaining. All clones of one construct showed

a detectable expression after immunostaining. In a second construct only one of three clones produced a detectable protein. The clones of the three other constructs showed no reaction.

CONCLUSIONS AND SIGNIFICANCE

The construct, which consists of the complete N-terminus of the RoTat 1.2 VSG, is found to be expressed in the secretome of *Leishmania tarentolae*. This construct is also similar in sequence as the construct that has already been successfully expressed in *Pichia pastoris*. However, before this antigen can be incorporated into a new diagnostic rapid test for surra, there are still many further steps required in the process.

4 INLEIDING EN PROBLEMATIEK

Afrikaanse trypanosomiasen zijn verwaarloosde tropische ziektes die armoede handhaven door hun impact op zowel de volksgezondheid als de landbouwproductie. Door hun lage prevalentie en de toxiciteit van de behandeling, is er nood aan eenvoudige, snelle en accurate individuele tests met een hogere gevoeligheid en specificiteit dan de bestaande tests.

Humane Afrikaanse slaapziekte (HAT) of slaapziekte is een parasitaire ziekte veroorzaakt door twee geografisch gescheiden *Trypanosoma (T.) brucei (b.)* ondersoorten. *T.b. gambiense* veroorzaakt vooral chronische infecties in West- en Centraal-Afrika, terwijl de meer acute *T.b. rhodesiense* infecties endemisch zijn in oostelijk en zuidelijk Afrika. De ziekte wordt overgebracht door tsetseevliegen (*Glossina species*) en komt daardoor enkel voor in sub-Saharisch Afrika, het verspreidingsgebied van de vector.

In tegenstelling tot HAT wordt surra, een infectieziekte veroorzaakt door de protozoaire parasiet *T. evansi*, mechanisch overgebracht via bijtende insecten (*Tabanidae* en *Stomoxys species*) of vampiervleermuizen. Daardoor komt deze ziekte ook voor buiten Afrika, namelijk in het Midden-Oosten, Azië en Zuid- en Centraal-Amerika met zelfs sporadische uitbraken in Europa. Naast de wereldwijde verspreiding en de snelle uitbreiding (door de verplaatsing en de verkoop van veestapel), treft de ziekte een breed spectrum wilde en gedomesticeerde dieren en het veroorzaakt grote financiële schade.

Momenteel wordt de serodiagnose voor surra uitgevoerd via een directe kaartagglutinatie-test, namelijk de diagnostische sneltest CATT/*T. evansi*. Deze antistofdetectietest maakt gebruik van de gevriesdroogde bloedstroomvorm van de trypanosoom geïsoleerd uit geïnfecteerde ratten die het predominant variant oppervlakte glycoproteïne (VSG) RoTat 1.2 op hun oppervlakte tot expressie brengen. Maar de productie hiervan is tijdrovend, moeilijk te standaardiseren, duur en vereist het gebruik van proefdieren. Bovendien is er een hoog bioveiligheidsrisico voor het personeel (voornamelijk bij HAT).

Recent is er een nieuwe diagnostische test ontwikkeld, de Surra Sero K-SeT, op basis van een recombinant RoTat 1.2 aangemaakt in *Pichia pastoris*. Het is een individuele immuno-chromatografische test (ICT) met een laterale flow voor de detectie van specifieke antilichamen tegen het dominante RoTat 1.2 VSG in het bloed van zoogdieren. (Rogé S. , 2015)

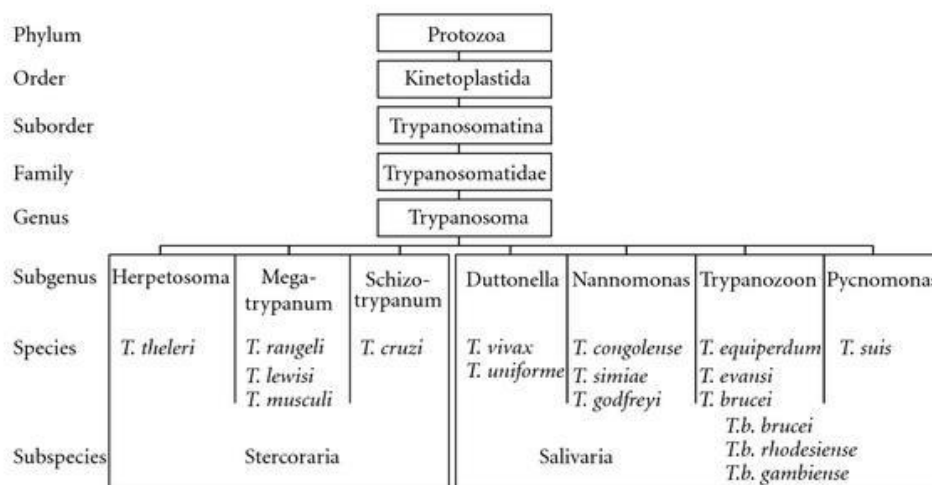
Het doel van deze bachelorproef is het uittesten van de heterologe expressie van het *Trypanosoma evansi* RoTat 1.2 variable oppervlakte eiwit in de eukaryoot *Leishmania tarentolae* in plaats van de gist *Pichia Pastoris*.

5 THEORIE – LITERATUURONDERZOEK

5.1 SURRA

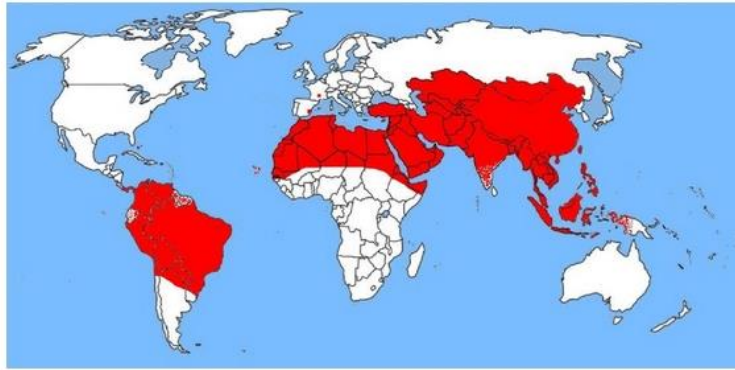
5.1.1 INLEIDING

Trypanosomen zijn ééncellig, geflagelleerde parasieten die zowel in mens als in dier ernstige ziekten kunnen veroorzaken. Er bestaan twee secties in de indeling van trypanosomen, Stercoraria en Salivaria, die gebaseerd zijn op hun levenscyclus in de vector en in het zoogdier. *Trypanozoon* is één van de subgenussen van de sectie Salivaria, waarbij de parasiet zich ontwikkelt in het voorste deel van het spijsverteringskanaal van de vector, en bevat drie soorten: *T. brucei*, *T. equiperdum* en *T. evansi* (zie figuur 1). *T. brucei* wordt overgedragen door tsetseevliegen (*Glossina* species) en het bevat drie ondersoorten: *T. brucei rhodesiense* en *T. brucei gambiense* veroorzaken respectievelijk acute en chronische humane Afrikaanse slaapziekte. *T. brucei brucei* veroorzaakt nagana in vee en wilde dieren. *T. equiperdum* veroorzaakt de seksueel overdraagbare ziekte dourine en wordt voornamelijk aangetroffen in paarden. *T. evansi* komt voor in wilde dieren, vee en huisdieren en veroorzaakt de ziekte surra, wat letterlijk “rot” betekent in het Indisch. In tegenstelling tot *T. brucei* hebben *T. equiperdum* en *T. evansi* een gedeeltelijk of complete deletie van kinetoplastisch DNA, waardoor ze geen levenscyclus in de tsetseevlieg ondergaan. *T. evansi* wordt verspreid door bijtende insecten (*Tabanidae* en *Stomoxys* species) en vampiervleermuizen. (Baral, 2010) (Desquesnes, et al., 2013) (Olsen, 1986) (Stephen, 1986)



Figuur 1: Classificatie van Protozoa (Baral, 2010)

T. evansi is voor het eerst gevonden in paarden en kamelen door Griffith Evans in 1880 in India. Sindsdien wordt de parasiet getroffen in Noord-Afrika, het Midden-Oosten, Azië en Latijns-Amerika. Maar ook in Spanje en Frankrijk zijn er onlangs dieren gediagnosticeerd geweest met de ziekte surra (figuur 2). (Desquesnes, et al., 2013) (Stephen, 1986)

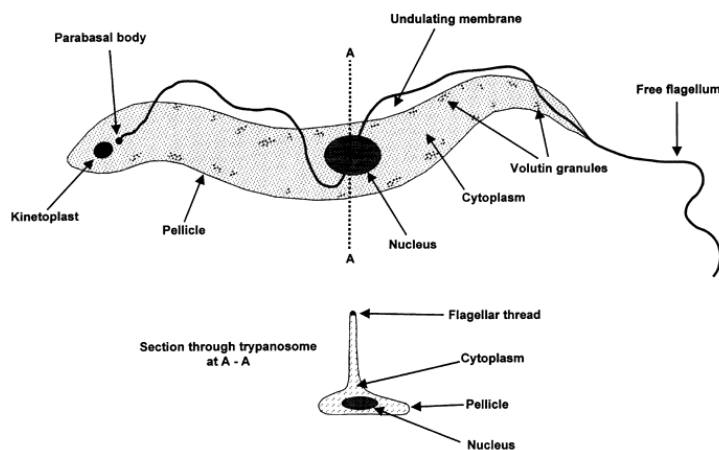


Figuur 2: Geografisch verspreiding van *T. evansi* (Desquesnes, et al., 2013)

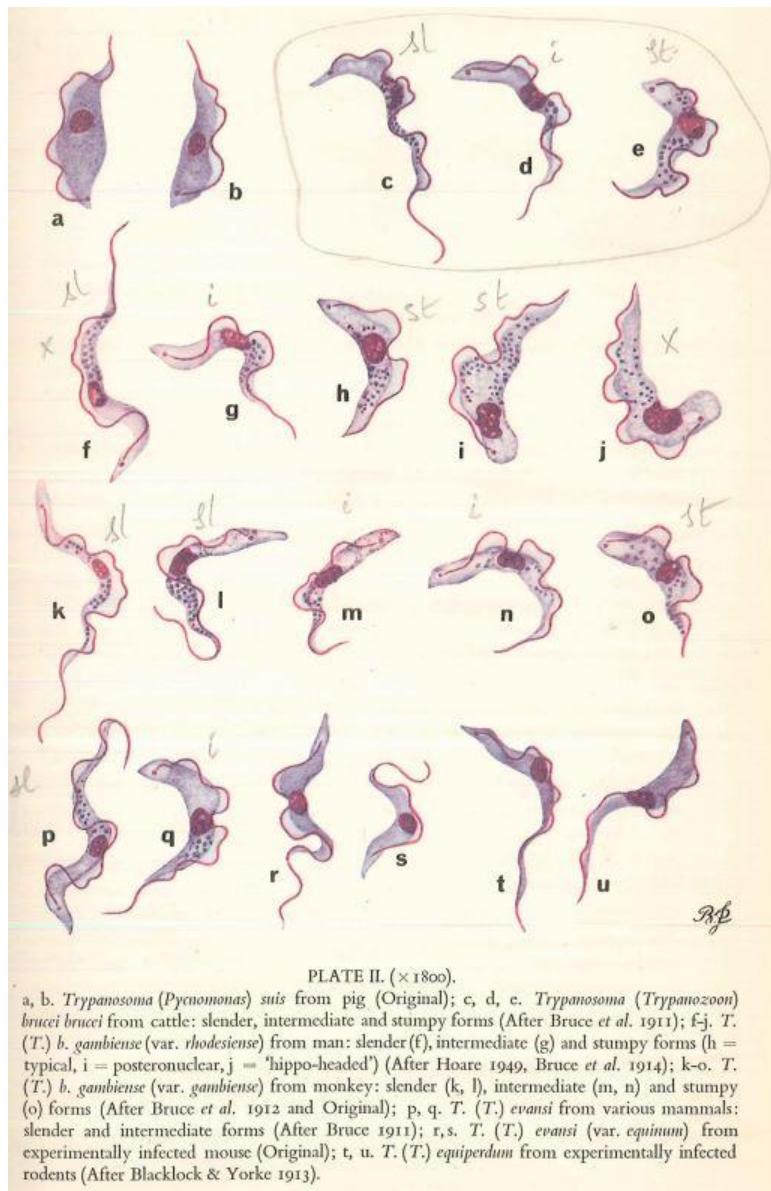
Door het breed en divers gastheerbereik van *T. evansi*, zijn mechanische transmissie en de verplaatsing en verkoop van veestapel krijgt de ziekte kans om zich snel wereldwijd te verspreiden. Dit leidt tot aanzienlijk grote economische schade door een hoge mortaliteit, lage melk- en vleesproductie, slechte karkaskwaliteit, verminderde reproductiviteit, verlaagde trekkracht, slechte mestproductie en immunosuppressie in vee. (Rogé S. , 2015)

5.1.2 MORFOLOGIE

T. evansi, in het zoogdier, is monomorfisch en komt bijna alleen maar voor als lange, slanke vorm (trypomastigoot) van ongeveer 15 à 36µm die niet te onderscheiden valt van de slanke en intermediaire vormen van *T. brucei* (zie figuur 4). Dit wil zeggen dat de parasiet de volgende kenmerken heeft: een vrij bewegende flagel, een subterminale kinetoplast, een goed ontwikkeld en golvend membraan, en een smal en uitgerekt uiteinde (figuur 3). (Maudlin, Holmes, & Miles, 2004).



Figuur 3: Basis morfologie van een trypanosoom. Illustratie van de fundamentele kenmerken in bloedstroomvorm (trypomastigoot). (fao, sd)



Figuur 4: Weergave van verschillende vormen trypanosomen

5.1.3 KLINISCHE SYMPTOMEN

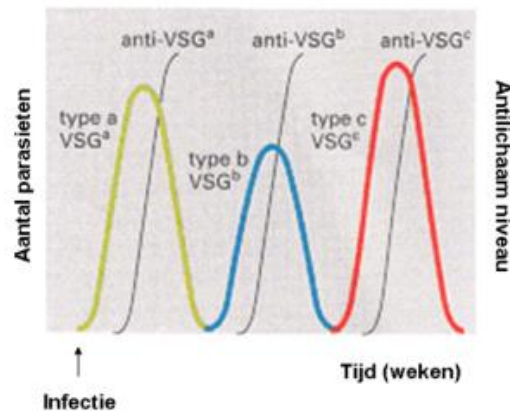
Wat opvalt aan de pathologische effecten van *T. evansi* is dat er een grote diversiteit is in intensiteit van de symptomen afhankelijk van de geografie en van de soort gastheer, waarbij sommige soorten geen of weinig symptomen vertonen en andere soorten juist zeer uitgesproken symptomen vertonen (Desquesnes, *et al.*, 2013). Bij paardachtigen, kameelachtigen, waterbuffels en honden is de ziekte het meest uitgesproken, bij vee is het matig en bij varkens, ezels, schapen en geiten is het mild of zelfs asymptomatisch (Maudlin, Holmes, & Miles, 2004). De klassieke symptomen zijn koorts, anemie, verlies van eetlust, gewicht en productiviteit, neurologische symptomen, abortus, cachexie en ten slotte dood. Acueel-geïnfecteerde dieren overlijden vrij snel maar chronische infecties kunnen een paar jaar aanhouden. (Birhanu H, 2015) (Eyob & Matios, 2013)

5.2 VARIABELE OPPERVLAKTE GLYCOPROTEÏNEN

De bloedstroomvorm van de Afrikaanse trypanosoom bezit een dense oppervlak aan variabele oppervlakte glycoproteïnen (VSG's). Deze glycoproteïnen komen voor als identieke dimeren die in overvloed aanwezig zijn op de gehele oppervlakte, inclusief op de flagel, en om de zoveel tijd worden vervangen door een andere type VSG. Deze verandering is afhankelijk van het soort variabel antigeen type of VAT dat tot expressie wordt gebracht. Er wordt steeds maar één VAT tegelijkertijd tot expressie gebracht en er is dus ook altijd maar één soort VSG aanwezig op de oppervlakte.

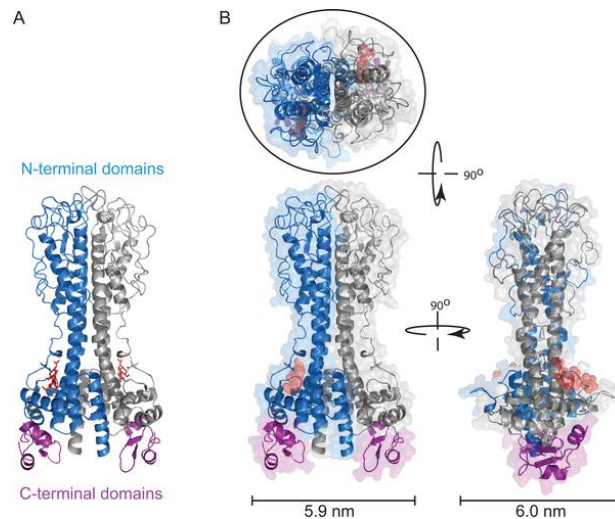
Omdat de trypanosoom een extracellulair parasiet is wordt deze voortdurend blootgesteld aan antilichamen van de gastheer. De VSG's hebben de functie dit immuunsysteem te ontwijken en deze functie bestaat uit twee delen: het beschermen van de invariabele oppervlakte glycoproteïnen of ISG's; die zorgen voor voedselopname, signalering en structurele integriteit; en onwijken van het humorale immuunsysteem door constant te veranderen van VSG.

Op een bepaald moment in de gastheer zijn er 99,9% van de parasieten die dezelfde VSG, en dus hetzelfde VAT, bezitten. Hiertegen worden er antilichamen geproduceerd als respons van de gastheer waardoor deze trypanosomen worden vernietigd. Maar, de overgebleven 0,1% bevatten een andere type VSG en zullen dus niet worden vernietigd. Deze trypanosoom kan blijven delen en zorgt ervoor dat de infectie behouden wordt. Op een bepaald moment zal dit zorgen voor een nieuwe piek waartegen het immuunrespons weeral op zal reageren enzovoort. Dit proces leidt tot verschillende pieken of golven van parasitemie, typisch voor trypanosomiasis, en wordt antigenische variatie genoemd (figuur 9). (Rogé S. , 2015) (Schwede, Macleod, MacGregor, & Carrington, 2015)

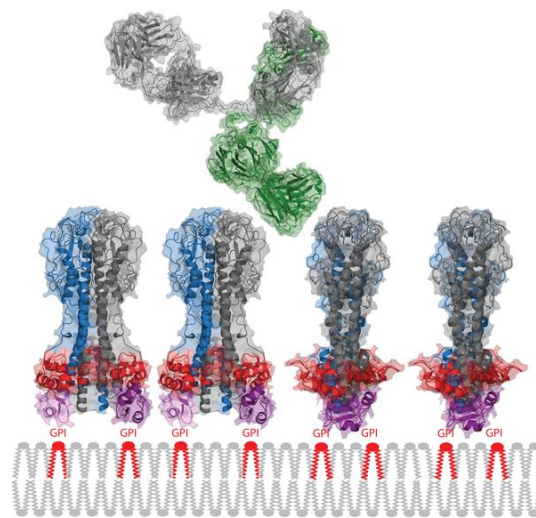


Figuur 5: Antigenische variatie zorgt voor golven van parasitemie

VSG's komen voor als homodimeren zoals weergegeven in figuur 6 en 7. Een VSG-monomeer bevat een N-terminaal domein van ongeveer 350 à 400 aminozuren en één of twee C-terminale domeinen van ongeveer 20 à 40 aminozuren elks. Het N-terminaal domein, wat de antigenische variatie veroorzaakt, is hypervariabel en bevat een veelvoud aan epitopen. Het C-terminaal gedeelte is vastgebonden aan een GPI-anker die de binding vormt tussen het VSG en het plasmamembraan. Het C-terminaal domein is minder variabel en minder bereikbaar voor antilichamen (figuur 7). (Schwede, Macleod, MacGregor, & Carrington, 2015)



Figuur 6: Model van de structuur van VSG221 (MiTat 1.2). Hier is een homodimeer weergegeven waarbij één N-terminaal gedeelte in blauw is aangeduid en het andere in grijs. De C-terminale delen zijn aangeduid in het purper en het N-gelinkte oligosaccharide in het N-terminaal deel is weergegeven het rood. (Schwede, Macleod, MacGregor, & Carrington, 2015)



Figuur 7: Densie oppervlakte van VSG's op het plasmamembraan en vergelijking met een immunoglobuline G. Het breedste deel van het N-terminaal domein is in het rood aangeduid en het C-terminaal domein in het paars. Één lichte keten en één zware keten van het IgG is aangeduid in het groen. (Schwede, Macleod, MacGregor, & Carrington, 2015)

Elk domein bevat een onafhankelijk geconserveerd patroon van cysteïneresidu's. Gebaseerd op de distributie van cysteïneresidu's worden de VSG's ingedeeld in drie types van N-terminale domeinen (A, B en C) en zes types van C-terminale domeinen (1 t/m 6). Type 2, 4 en 5 bevatten één domein en vier cysteïneresidu's, type 1, 3 en 6 bevatten twee domeinen en acht cysteïneresidu's.

Een ander kenmerk van VSG's is de glycolysatie. Secretie-eiwitten en integrale membraaneiwitten, zoals VSG's, bevatten op welbepaalde plaatsen vertakte suikerketens (posttranslationeel proces). Deze oligosacchariden worden na translatie in het endoplasmatisch reticulum aan het proteïne geplakt. De glycolysatie start in het ER en wordt voortgezet wanneer het eiwit naar het Golgi-apparaat wordt geleid. N-gelinkte oligosacchariden worden aan het aminozuur asparagine (N) geplakt door het N-X-S/T-patroon te herkennen (X: een bepaald aminozuur; S: serine; T: threonine).

Het is gebleken dat sommige VAT's herkend worden door bijna elk geïnfecteerde gastheer. Deze VAT wordt het predominante antigeen genoemd en creëert een vrij universeel humoraal respons bij de gastheer. Dit antigeen is dus ideaal om te gebruiken voor diagnostische testen waarbij antilichamen worden gedetecteerd. Bij *T. evansi* wordt dit predominante VSG RoTat 1.2 genoemd (Verloo, Magnus, & Büscher, 2001). De kenmerken zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1: Kenmerken van het predominante RoTat 1.2 (Schwede, Macleod, MacGregor, & Carrington, 2015)

Kenmerk	RoTat 1.2
Type N-terminaal domein	A
Type C-terminaal domein	2
Lengte van totale VSG	449 AZ
kDa van totale VSG	47,6
Lengte van het N-terminaal domein	385 AZ
Lengte van het C-terminaal domein	64 AZ
Aantal N-X-S/T	1
Plaats van N-X-S/T	AZ 445
Afstand van N-X-S/T van C-terminus	-4

Het VSG wordt vertaald met een signaalpeptide aan het N-terminaal domein en met een sequentie aan het C-terminaal domein dat zorgt voor toevoeging van het GPI-anker. De signaalpeptide zorgt ervoor dat de polypeptide wordt geleid naar het endoplasmatisch reticulum, waar de sequentie voor het GPI-anker wordt vertaald naar een pre-GPI-anker.

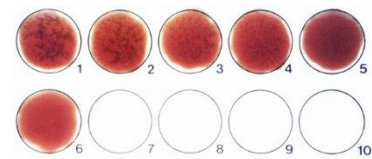
5.3 DIAGNOSE VAN SURRA

Parasitologische technieken zoals de Giemsa kleuring op een bloeduitstrijkje of een dikdruppel en de microhaematocriet centrifugatietechniek (mHCT), worden vaak gebruikt voor de diagnose van surra. Maar hun gevoeligheid is laag als gevolg van de fluctuerende en vaak lage concentratie aan parasieten in bloed (parasitemie). Hierdoor is de serodiagnose van surra, gebaseerd op de detectie van de specifieke antilichamen tegen *T. evansi*.

Het volledig oppervlakte van de trypanosoom, waaronder ook de flagel, bestaat uit een dense laag van dimeren van één type VSG. Deze VSG-mantel veroorzaakt een snelle en sterke humoraal immuunrespons waarbij IgG- en IgM-antilichamen in hoge concentraties aanwezig zijn en specifiek gericht zijn tegen het VSG van de parasiet dat op dat moment tot expressie gebracht is. Studies over antigenische variatie bij trypanosomen laten blijken dat bijna alle geïnfecteerde gastheren antilichamen hebben tegen het predominant variant antigeentype. Het zijn deze antilichamen, gericht tegen het dominante VAT, die gebruikt kunnen worden voor het indirect bewijzen van een trypanosoominfectie. Er bestaan diagnostische sneltesten die gebruikt wordt op het veld, zoals bv. de CATT-test, en laboratoriumtesten zoals de immuuntrypanolyse die vanwege hun hoge gevoeligheid en specificiteit gebruikt worden als referentietest. (Rogé S. , 2015)

5.3.1 CATT/*T. evansi*

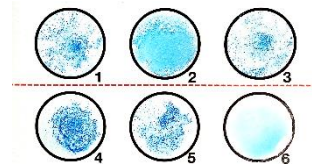
De kaartagglutinatietest voor surra is een directe agglutinatietest gebaseerd op de detectie van specifieke antilichamen in het bloed van de gastheer tegen *T. evansi*. Het CATT-antigeen bestaat uit gefixeerde, gekleurde en gelyofiliseerde bloedstroomvormen van *T. evansi*, gezuiverd uit het bloed van proefdieren, die het predominant variant antigeentype RoTat 1.2 tot expressie brengen. Indien er antilichamen tegen deze suspensie aanwezig zijn zal er, na mengen van bloed of serum met het CATT-antigeen, agglutinatie ontstaan.



Figuur 8: Voorbeeld van de CATT-test

5.3.2 LATEX/*T. evansi*

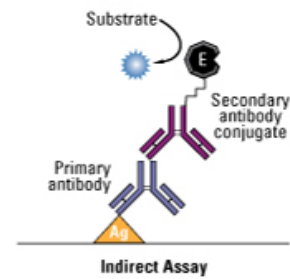
De productie van de CATT-testen vereisen infectie van proefdieren met VAT specifieke trypanosomen. In plaats van de parasiet te gebruiken om het antigeen te presenteren, wordt bij deze agglutinatietest het gezuiverde antigeen aan latex partikels gekoppeld. Zowel natieve als recombinanten antigenen kunnen hieraan gekoppeld worden.



Figuur 9: Voorbeeld van de LATEX-test

5.3.3 ELISA/*T. evansi*

De enzymgekoppelde immunosorbent assay is een strikt gestandaardiseerde en gekwalificeerde laboratoriumtest waarbij niet alleen antilichamen in bloed gedetecteerd kunnen worden maar ook in speeksel en cerebrospinaal vocht. Het ziekte-gespecificeerde antigeen is bedekt op een microtiterplaat waar het reageert met specifieke antilichamen die eventueel aanwezig zijn in het staal. Ongebonden antilichamen worden weggewassen en het species-specifieke anti-IgG enzymeconjugaat wordt toegevoegd. Na een tweede wasbeurt worden het substraat en de chromogeenoplossing toegevoegd. Indien er trypanosoom-specifieke antilichamen aanwezig zijn zal er een kleurreactie ontstaan.



Figuur 10: Schematische weergave van ELISA

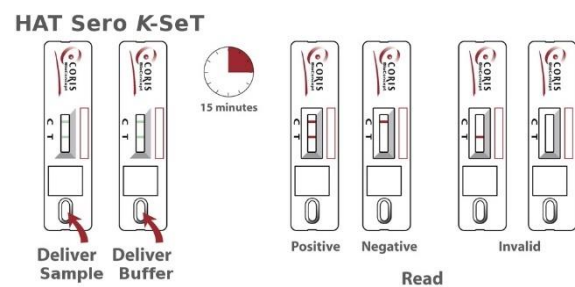
Vanwege het tijdrovend proces en de nood aan een volledig voorzien laboratorium wordt ELISA voornamelijk gebruikt om het diagnostisch potentieel van een nieuw antigeen, natief of recombinant, te bevestigen.

5.3.4 IMMUNTRYPANOLYSE

Immuuntrypanolyse is een zeer specifieke en gelieve laboratoriumtest die gebruikt wordt als referentietest. Immuuntrypanolyse maakt gebruik van levende infectieuze parasieten die worden opgekweekt in muizen en ratten. Deze bloedstroomvormen wordt gekweekt en dan verdund in caviaserum, dat rijk is aan complement. Indien het serum van de gastheer de specifieke antilichamen bevat, zullen deze binden aan de trypanosomen waardoor het complementsysteem wordt geactiveerd. Dit resulteert in lyse van de trypanosomen.

5.3.5 IMMUNOCHROMATOGRAFIE

De Surra Sero K-SeT is een individuele immuno-chromatografische test (ICT) met een laterale flow voor de detectie van specifieke antilichamen tegen het RoTat 1.2 VSG in het bloed van zoogdieren. De test gebruikt een fragment van het RoTat 1.2 VSG, geproduceerd als recombinant antigeen in de gist *Pichia pastoris*.



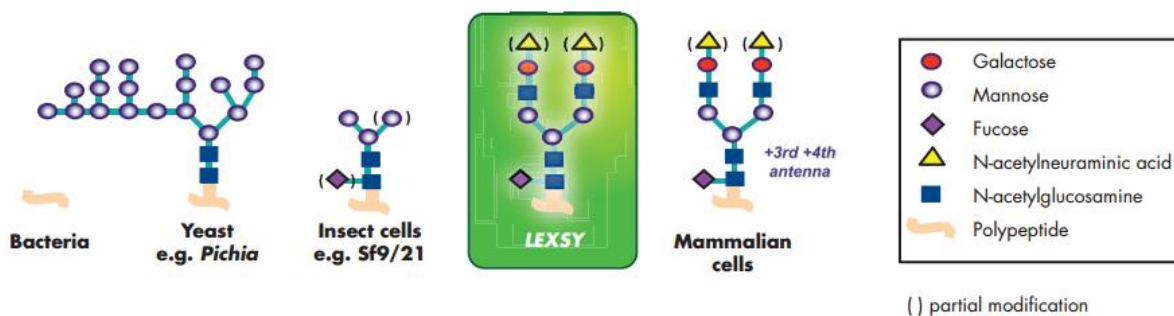
Figuur 11: HAT Sero K-SeT dat hetzelfde principe heeft als Surra Sero K-SeT

Deze test is individueel, goedkoop, snel, accuraat, ethisch (er zijn geen proefdieren nodig) en kan worden gebruikt voor eender welke gastheer zonder gastheerspecifieke conjugaten.

5.4 *Leishmania tarentolae*

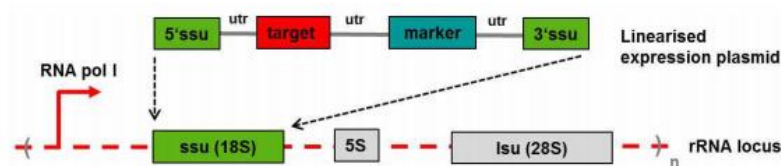
L. tarentolae is een protozoon uit de orde van de *Trypanosomatidae* en een parasiet van de gekko *Tarentolae annularis*. Recent werd deze cellijn gecommersialiseerd als een nieuw eukaryotisch expressiesysteem voor productie van recombinante proteïnen (Jena Bioscience). (Breitling, et al., 2002)

Prokaryotische expressiesystemen zoals *E. coli* en gisten zoals *P. pastoris* hebben een gebrek aan bepaalde componenten die nodig zijn voor eiwitsynthese en -vouwing en post-translationele modificatie die toegepast worden in eukaryoten. Alternatieve eukaryotische systemen, gebaseerd op zoogdiercellen of insectcellen, vereisen dan weer lange ontwikkelingscycli en leveren een lage proteïnenopbrengst op. Het *Leishmania* Expressie SYsteem pLEXSY is zodanig ontwikkeld dat de eukaryotische proteïnesynthese gecombineerd wordt met eenvoud en gebruiksgemak en hierdoor een interessante gastheer is voor heterologe expressie van eiwitten van *T. evansi*. (Breitling, et al., 2002)

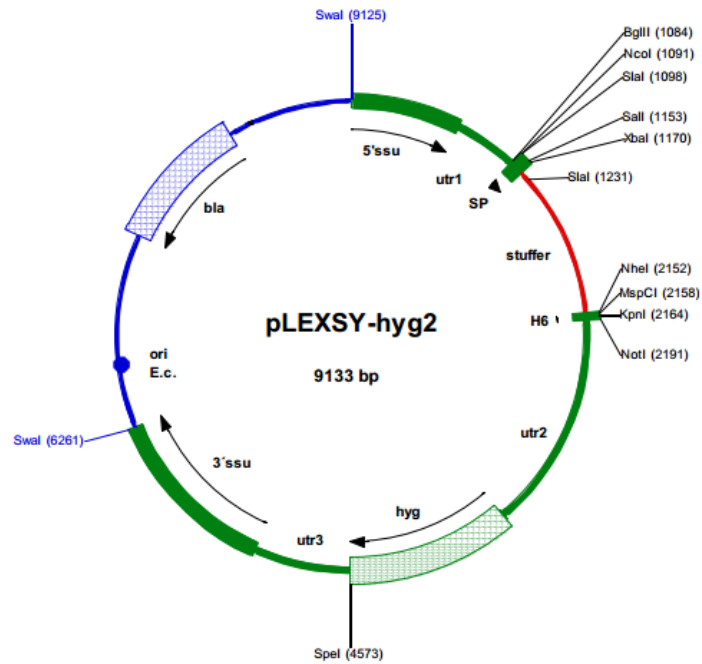


Figuur 12: N-glycosyleringspatronen van proteïnen in verschillende expressiesystemen (Basile & Peticca, 2009)

De *Leishmania* expressie systeem LEXSY-kit van Jena Bioscience biedt twee systemen aan: het constitutieve systeem en het induceerbaar systeem. In deze bachelorproef wordt het constitutieve *in vivo* LEXSY-systeem toegepast met de pLEXSY-hyg2-vector dat toelaat om efficiënt een groot aantal recombinante proteïnen te produceren. Het is gebaseerd op integratie in het chromosomaal *ssu*-locus coderend voor de tandem 18S-rRNA-genen. Integratie gebeurt a.d.h.v. homologe recombinatie na linearisatie van de expressievector met *SnaI* (figuur 13 en 14).



Figuur 13: Integratie van pLEXSY in de kleine subeenheid van het ribosomaal RNA (ssu)



Figuur 14: pLEXSY-hyg2: UTR1, UTR2 en UTR3 zijn geoptimaliseerde, non-translerende, gen-flankerende gebieden die de splicing-signalen voor post-transcriptie van mRNA verwerken voor de expressie van het insertiegen en het markergen in de gastheer. SP staat voor het signaal peptide van het secreterende zuurfosfatase van *L. mexicana* en H6 voor de polyhistidine-tag.

De pLEXSY-vector kan zo gebruikt worden dat dat recombinante eiwitten ofwel in het medium gesecreteerd worden of intracellulair tot expressie gebracht worden. Omdat *L.tarentolae* een lage hoeveelheid endogene eiwitten heeft en omdat het kweekmedium weinig toegevoegde eiwitten bevat zal het uitgescheiden recombinant proteïne de meerderheid van de totale eiwitten omvatten, wat purificatie vergemakkelijkt. (Basile & Peticca, 2009)

Secretie van proteïnen kan alleen maar plaatsvinden indien ze gefusioneerd zijn met een signaalpeptide. Een signaalpeptide is een reeks van ongeveer 20 aminozuren dat zich aan het N-terminaal gedeelte van een polypeptide bevindt en het polypeptide naar de secretieroute (endoplasmatische reticulum) zal leiden. Het signaal peptide van het secreterende zuurfosfatase van *L.mexicana*, ingebouwd in de pLEXSY-vector (figuur 14), zal er dus voor zorgen dat het recombinante proteïne geëxporteerd zal worden naar het medium. (Basile & Peticca, 2009)

6 OBJECTIEVEN

Recent is er een nieuwe diagnostische sneltest ontwikkeld, de Surra Sero K-SeT, op basis van een recombinant RoTat 1.2 aangemaakt in de gist *Pichia pastoris*. Het is een individuele immunochromatografische test (ICT) met een laterale flow voor de detectie van specifieke antilichamen tegen het predominante RoTat 1.2 VSG in het bloed van zoogdieren (Rogé S. , 2015).

Het doel van deze bachelorproef is het uittesten van de heterologe expressie van het *Trypanosoma evansi* RoTat 1.2 variable oppervlakte eiwit in *Leishmania tarentolae*. De specifieke objectieven zijn

- 1) Het selecteren van vijf verschillende regio's binnen het *T. evansi* RoTat 1.2 VSG
- 2) Het kloneren van de vijf constructen in de *Leishmania* expressievector pLEXSY in *E. coli*
- 3) Kweek en transfectie van *Leishmania tarentolae*
- 4) Analyse van de eiwitproductie in het secretoom van *L. tarentolae* door middel van SDS-PAGE en immunostaining

7 EXPERIMENT

7.1 MATERIALEN EN METHODEN

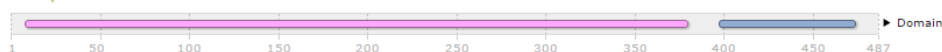
7.1.1 BIO-INFORMATICA

7.1.1.1 SELECTIE VAN ROTAT 1.2-CONSTRUCTEN

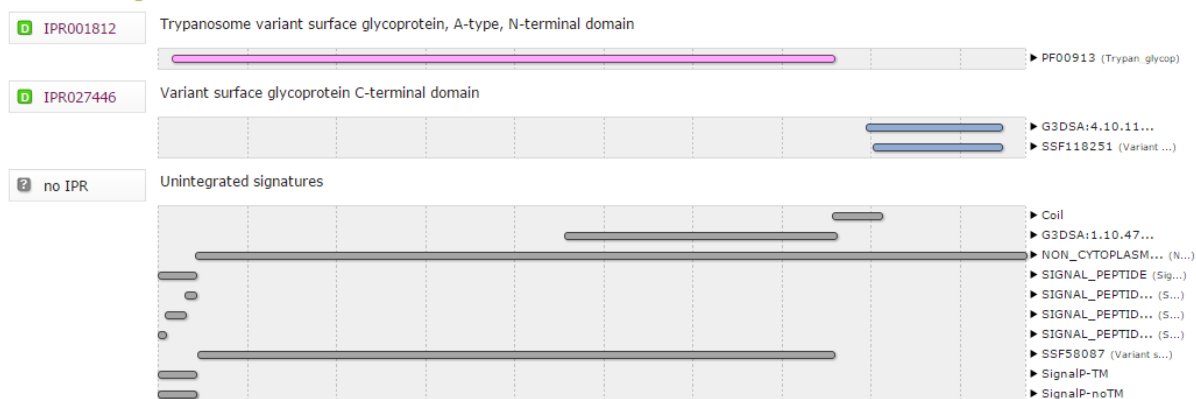
De nucleïnezuursequentie van het RoTat 1.2 VSG (figuur 16) met GenBank accessienummer AF31714 (Urakawa, Verloo, Büscher, & Majiwa, 2001) werd vertaald naar aminozuren (figuur 17) via SnapGene® 3.0.2.

Het proteïne van het RoTat 1.2-gen bestaat uit drie delen (figuur 15): het signaal peptide, het variabele N-terminaal gedeelte en het minder variabel C-terminaal gedeelte. Voor het opstellen van de constructen werd het minder variabele C-terminaal gedeelte weggelaten. Ook het signaal peptide werd weggelaten, vermits het “vervangen” wordt door het signaalpeptide van *L. mexicana* in de vector pLEXSY.

Domains and repeats



Detailed signature matches



Figuur 15: Print screen van de eiwitsequentie-analyse en classificatie van het RoTat 1.2 VSG via InterPro. Het VSG bestaat uit een signaal peptide, een N-terminaal domein (roos) en een C-terminaal domein (blauw).

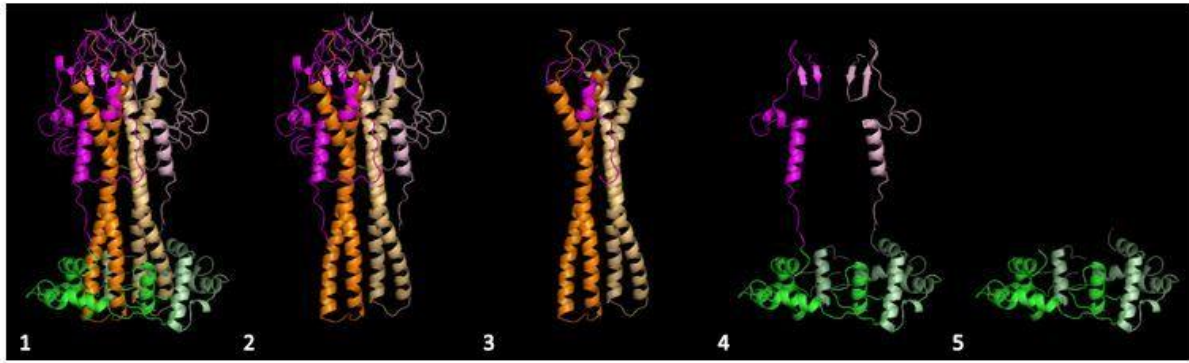
5' - TAGAACAGTTTCTGTACTATATTTGATTACCCCTGTTTTTCAGCGCTTCTAGAGACGAGCTGGACTTTTCTGCGTCTGTGCG
ACATAACGCAAACCCAGGAAACATGCAAACCAAGGCGCTCGTTGGCGTACTCTTATTTGTACTGTATCGGAGCACAACGGATG
CCGCCAATGTAGCTCTTAAAGGCAACGTCTGGAAGCATTGTGCGAACTCGCGGCAGCGACCAGGAACGGGCCAAGCCACGGCA
CGGCGCACTTCGCAGCGATCGAAAAATAGCGTCAAAACGTACACTAAGTTAAAACTAAAGCTCTTGATTTACGCGGCGGCCAAAG
GCAGCACCACCGAAGCAAGCGCAGCAAGAGGGTTAGCAGCGGCCCGCAGATAGACACATACGAGCAGCGGCCACCACGGCGAAAG
ACAAAAGCAGGGTAATTTCTGCCCGCAGTTGCCTATGGCGGCGAAGTTCGAGGGGCGATTTTCATCGGCGCTAAAATTTCTAAAGC
ACGCGGTTGGCAACAGCAAGTTTTGTGTGGGCAAAGCCGACGGCACAATGCCGACGGTAACAACGAAATCGACGCGCTAGGGT
GCGGCGAAGCCAACATGACACCTCGGCCCCAGGAGACAGCTACCTAGAGGGCGACATAAGCGCCGATGGCTTCAAAAACTAA
CAGCCGTTGCAGCGGGCAATGGACATGTAGGAAGCAACACCTGCGGGGTGTTTAAAGCAATAACCGGCAACGACGCGGAGCCG
GCGGGATCAAAATCGCGACCAGCAACATCAAGGTGCACCTCGCACACGGCCTAATCGAAGGCAAAGTTGACGACCAGCCAGAAC
GAGCAGAATTTTCCAATAATTTTCGGACAAGGAAAAGCACACCACACTGATTATTTAGGCCGAACACACGCGACTAATCAATC
TGAAGAGGTTGAAATGGAGAAGGTACCGAACTCACAGAAGAAACCTTAAGACTTTAGCAGACGACCCGGCCGCAACGGCAA
CCCTAAACGTTGAGGAATGCGCACGAACAAGCAACAAGAAGATAACAACAACAGAACCACCGAAACCGCCATAACCGAAAAAT
ATTTTGGCAAGGACAAGTCTAAAATCAAGGAGTTGTGGAACAATTTAAAAAAGAGGAGATAGAAGGAACAGAAGATGACACAA
CAAAGAAAGTAGCGCTAGAAACCGTCAACTCGATCGACAAGTTGCAACAGGCATTGGAGTTTTACACAGCGCGAGCCGCTTACA
CAATAGAAAAGTTAAAAAAGAAGTAGATAAGTTGCAAGCAGAATCAGATGCAAAAAACAAAGCAAGCACAAAAGTTACTGAAA
CAGATGAAACTTGCGAAAAAAGGAACAGGAGCTGAATGCAAGATGGTTGTAAATTGACCGGCGTTGTGCGACAATAAAAAGT
GCGTAGTGGATCCGGATTTTGTCAAAAAGGAAGTAGAGGGAGTTAAAGCGGAAAATGATGAAAAACCAACCACAAACACCACAG
GAAGCAATTCTCTCTCATCAAAGCTTCCCCTCTTTTCTTGCAGTTTGTCTTTTTAAGTTTTTCCCCTCTTTTCTTCCTTT
AAAATTTCTTGCTACTTGAAAACTTCTGATATATTTTAAACCT - 3'

Figuur 16: De nucleïnezuursequentie van het RoTat 1.2 VSG met het GenBank accessienummer AF31714. Blauw stelt het signaal peptide voor, geel het N-terminaal gedeelte en groen het C-terminaal gedeelte. Grijs is het niet-coderend gedeelte (UTR, untranslated region). (Rogé S, 2014)

**MQTKALVGVLLFVLYRSTDAANVALKGNVWVKPLCELAAATRNGPSHGTAHFAAIENSVETYTKLKLKLLIYAAAKGSTTEASA
ARGLAAAADRHIRAAATTAKDKSRVILPAVAYGGEVAGAISSALKFLKHAVGNSKFCVKGADGTNADGNNEIDALGCGEANYDT
SAPGDSYLEGDISADGFTKLTAVAAGNGHVSNCTGVFKAITGNDGEAGGIKIATSNIKVHLAGHGLIEGKVDQPERAEFSNNF
GQKHAHTDYLGRTHAALINLKRLEMEKVPPELTELKTLADDPAAATLNVEECARTSNKKITTEPPKPPITEKYFGKDKSK
IKELWNNLKKEEIEGTEDDTTKKVALETVNSIDKLQQALEFYTARAAYTIEKLLKEVDKLAESDAKNKASTKVTETDETCCKK
GTGAECKDCKLTVGVNDKCKVVDPDFVKKEVEGVKAENDGKTTTNTTGSNSLLIKASPLFLAVLLF***

Figuur 17: De aminozuursequentie van het RoTat 1.2 VSG vertaald via SnapGene® 3.0.2. Blauw stelt het signaal peptide voor, geel het N-terminaal gedeelte en groen het C-terminaal gedeelte (Rogé S, 2014).

Het volledig N-terminale gedeelte, zoals gebruikt bij de expressie in *Pichia pastoris*, vormt het eerste construct, weergegeven in figuur 18.1 (Rogé S, 2014). De volgende fragmenten, ook weergegeven in figuur 18, zijn opgesteld door rekening te houden met twee structurele aminozuren: proline en cysteïne. Proline zorgt voor een hoek in het eiwitskelet, cysteïne kan een dimeer vormen a.d.h.v. een disulfidebrug dat resulteert als “nietje” in het proteïne. (Sang-Ho, et al., 2002)



Figuur 18: Eiwitmodellen van de vijf constructen uit RoTat 1.2 VSG gecreëerd door het predictieprogramma SwissModel (website met kristalmodellen). Het model van RoTat 1.2 VSG is gebaseerd op de template 2vsg1.A van het IITat 1.24 VSG (28,45% aminozuuridentiteit). Deze peptidenmodellen zijn gevisualiseerd met het programma Edu PyMOL v1.7.4. Figuur 1: aminozuur 22 t/m 385. Figuur 2: aminozuur 22 t/m 282. Figuur 3: aminozuur 22 t/m 171. Figuur 4: aminozuur 282 t/m 385. Figuur 5: aminozuur 225 t/m 385.

Eens de constructen waren opgesteld werden deze in frame gezet met de vector pLEXSY. Vervolgens werd er nagegaan of het signaal peptide van pLEXSY op de juiste plek kliëft (SignalP 4.1 Server) en of er glycosylatieprocessen plaatsvinden (NetNGlyc 1.0 Server). Ten slotte werd ook de GPI-ankervorming gecontroleerd (GPI Prediction Server). GPI-ankervorming zou ervoor kunnen zorgen dat het recombinant proteïne niet gesecreteerd wordt.

Tabel 2: SP-predictie (SignalP 4.1 Server), GPI-predictie (GPI Prediction Server), glycosyleringpredictie (NetNGlyc 1.0 Server) en eigenschappen (ExpASY ProtParam) van de recombinante proteïnen.

	Construct	Predicties			Eigenschappen		
		SP	GPI	N-Glycosylering	# AA	Da	Th. pI
1	23 – 385	23 – 24	Nee	Nee	377	39880.6	6.49
2	23 – 282	23 – 24	Nee	Nee	274	28304.6	7.40
3	23 – 171	23 – 24	Nee	Nee	163	16678.6	8.79
4	282 – 385	23 – 24	Nee	Nee	117	13129.6	5.67
5	225 – 385	23 – 24	Nee	Nee	174	19545.8	6.13

Construct 1

```

10      20      30      40      50      60
GASLDANVAL KGNVWKLCE LAAATRNGPS HGTAHFAAIE NSVETYTKLK LKLLIYAAK
70      80      90     100     110     120
GSTTEASAAR GLAAAADRH I RAAATTAKDK SRVILPAVAY GGEVAGAISS ALKFLKHAVG
130     140     150     160     170     180
NSKFCVGRAD GTNADGNNEI DALGCGEANY DTSAPGDSYL EGDISADGFT KLTAVAAGNG
190     200     210     220     230     240
HVGSNTCGVF KAITGNDGEA GGKIATSNI KVHLAHLIE GKVDDQPERA EFSNFGQGK
250     260     270     280     290     300
AHHTDYLGR T HAALINLKR L EMEKVPELTE ETLKTLADDP AATATLNVEE CARTSNKKIT
310     320     330     340     350     360
TTEPPKPPIT EKYPFGKDKSK IKELWNNLKK EEIEGTEDDT TKKVALETVN SIDKLQALE
370
FYTARAAYTG THHHHHH

```

Construct 2

```

10      20      30      40      50      60
GASLDANVAL KGNVWKLCE LAAATRNGPS HGTAHFAAIE NSVETYTKLK LKLLIYAAK
70      80      90     100     110     120
GSTTEASAAR GLAAAADRH I RAAATTAKDK SRVILPAVAY GGEVAGAISS ALKFLKHAVG
130     140     150     160     170     180
NSKFCVGRAD GTNADGNNEI DALGCGEANY DTSAPGDSYL EGDISADGFT KLTAVAAGNG
190     200     210     220     230     240
HVGSNTCGVF KAITGNDGEA GGKIATSNI KVHLAHLIE GKVDDQPERA EFSNFGQGK
250     260     270
AHHTDYLGR T HAALINLKR L EMEKVPGTHH HHHH

```

Construct 3

```

10      20      30      40      50      60
GASLDANVAL KGNVWKLCE LAAATRNGPS HGTAHFAAIE NSVETYTKLK LKLLIYAAK
70      80      90     100     110     120
GSTTEASAAR GLAAAADRH I RAAATTAKDK SRVILPAVAY GGEVAGAISS ALKFLKHAVG
130     140     150     160
NSKFCVGRAD GTNADGNNEI DALGCGEANY DTSAPGTHHH HHH

```

Construct 4

```

10      20      30      40      50      60
MASRLVRVLA AAMLVAAAVS VDAGASLDNI KVHLAHLIE GKVDDQPERA EFSNFGQGK
70      80      90     100     110     120
AHHTDYLGR T HAALINLKR L EMEKVPELTE ETLKTLADDP AATATLNVEE CARTSNKKIT
130     140     150     160     170     180
TTEPPKPPIT EKYPFGKDKSK IKELWNNLKK EEIEGTEDDT TKKVALETVN SIDKLQALE
190
FYTARAAYTG THHHHHH

```

Construct 5

```

10      20      30      40      50      60
GASLEPELTE ETLKTLADDP AATATLNVEE CARTSNKKIT TTEPPKPPIT EKYPFGKDKSK
70      80      90     100     110
IKELWNNLKK EEIEGTEDDT TKKVALETVN SIDKLQALE FYTARAAYTG THHHHHH

```

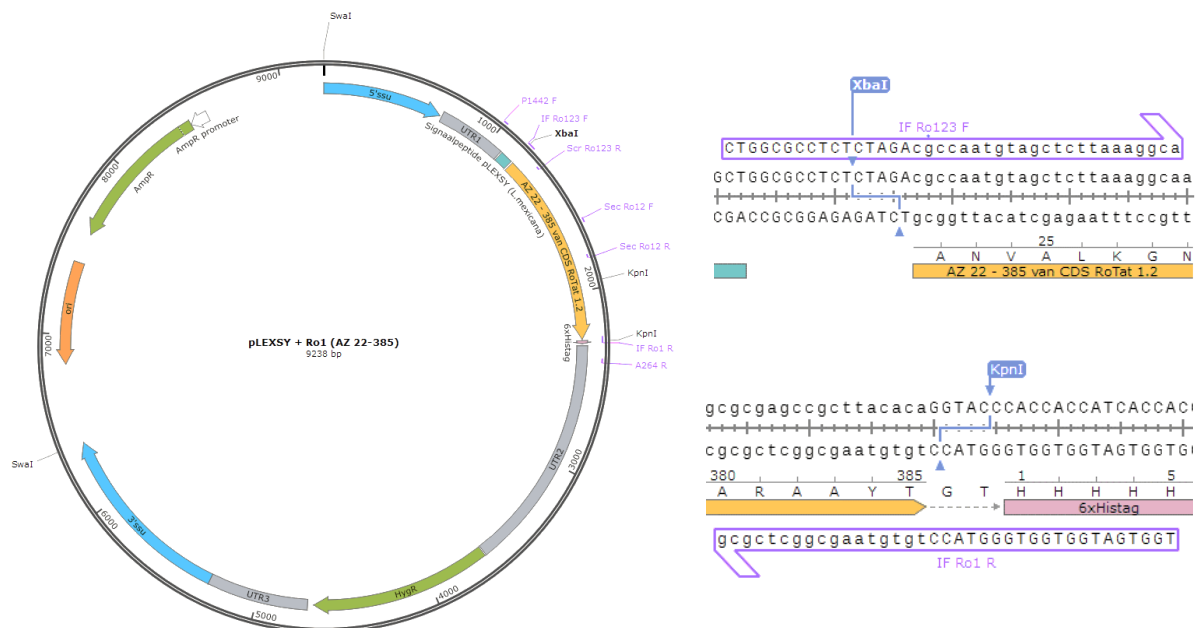
Figuur 19: Aminozuursequenties van de vijf recombinante proteïnen afkomstig van de vijf verschillende constructen met een terminale histag (ExpASY Prot-Param).

7.1.1.2 **PRIMERS**

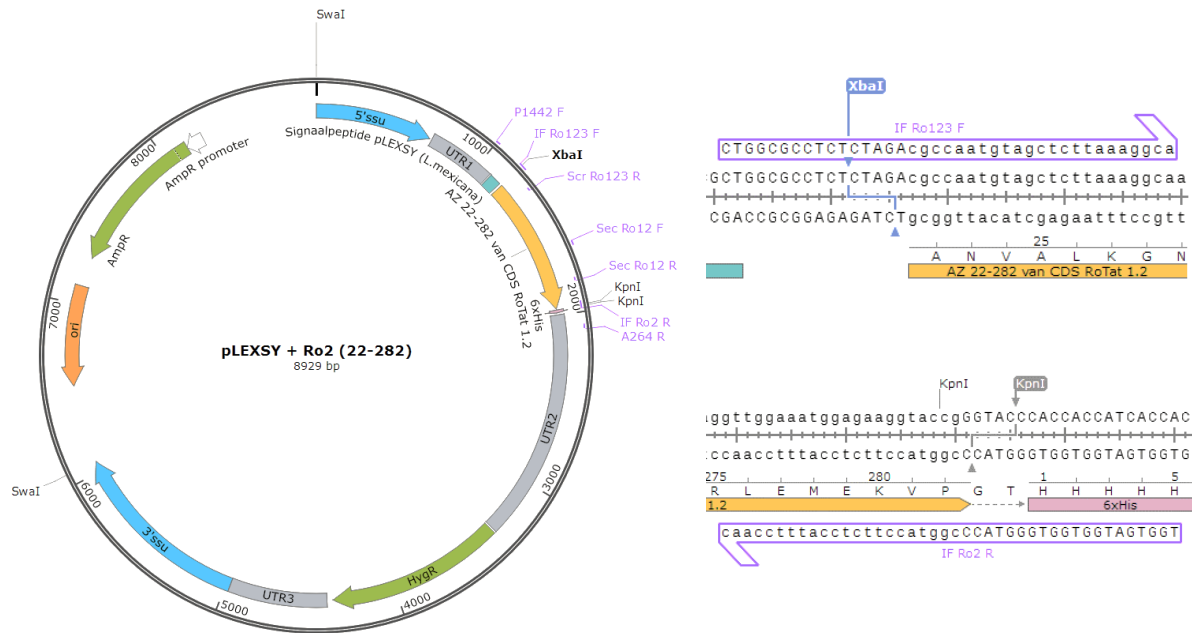
De primers voor de In Fusion-cloning werden ontworpen via SnapGene® 3.0.2. Deze primers hebben een overlap in de vector pLEXSY en een overlap in de DNA-fragmenten uit RoTat 1.2 (figuur 20 t/m 24). Primers gebruikt voor de screening en sequencing van de klonen werden ontworpen via Primer3. De primers P1442 en A264 werden geleverd met de kit (Jena Bioscience #EGE-232).

Tabel 3: Primers voor de klonering, screening en sequencing

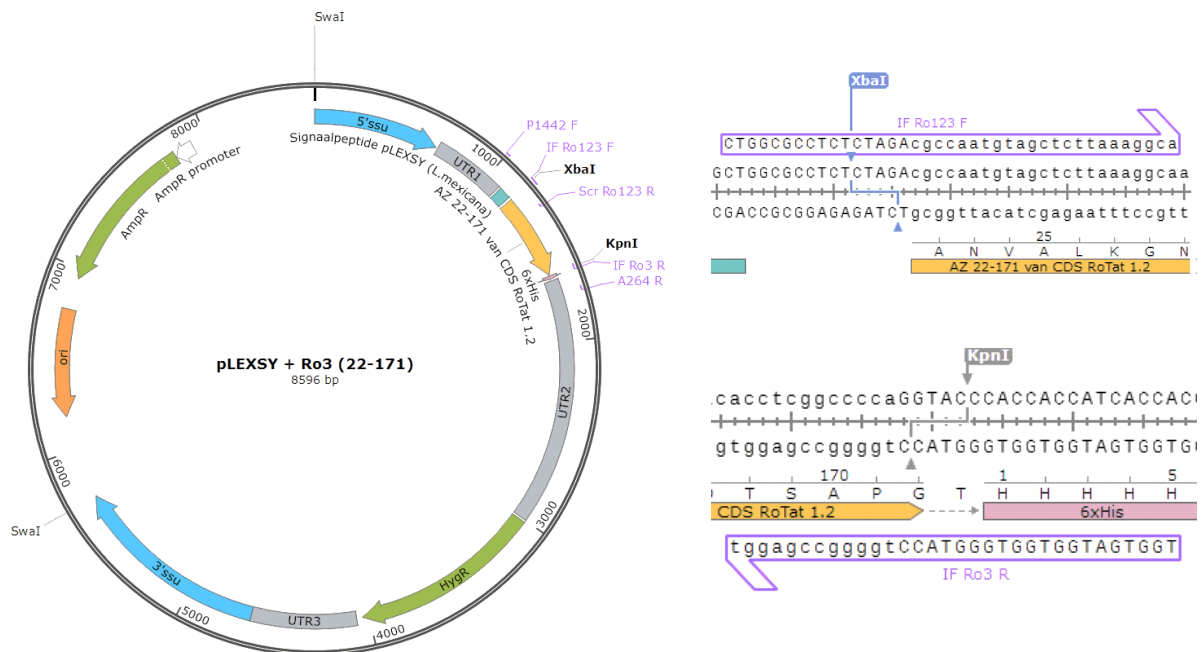
	Construct	IF-cloning	Screening	Sequencing
1	23 – 385	IF Ro123 F IF Ro145 R	P1442 F Scr Ro123 R	P1442 F Sec Ro12 F A264 R Sec Ro12 R
2	23 – 282	IF Ro123 F IF Ro2 R	P1442 F Scr Ro123 R	P1442 F Sec Ro12 F A264 R Sec Ro12 R
3	23 – 171	IF Ro123 F IF Ro3 R	P1442 F Scr Ro123 R	P1442 F A264 R
4	282 – 385	IF Ro4 F IF Ro145 R	P1442 F Scr Ro45 R	P1442 F A264 R
5	225 – 385	IF Ro5 F IF Ro145 R	P1442 F Scr Ro45 R	P1442 F A264 R



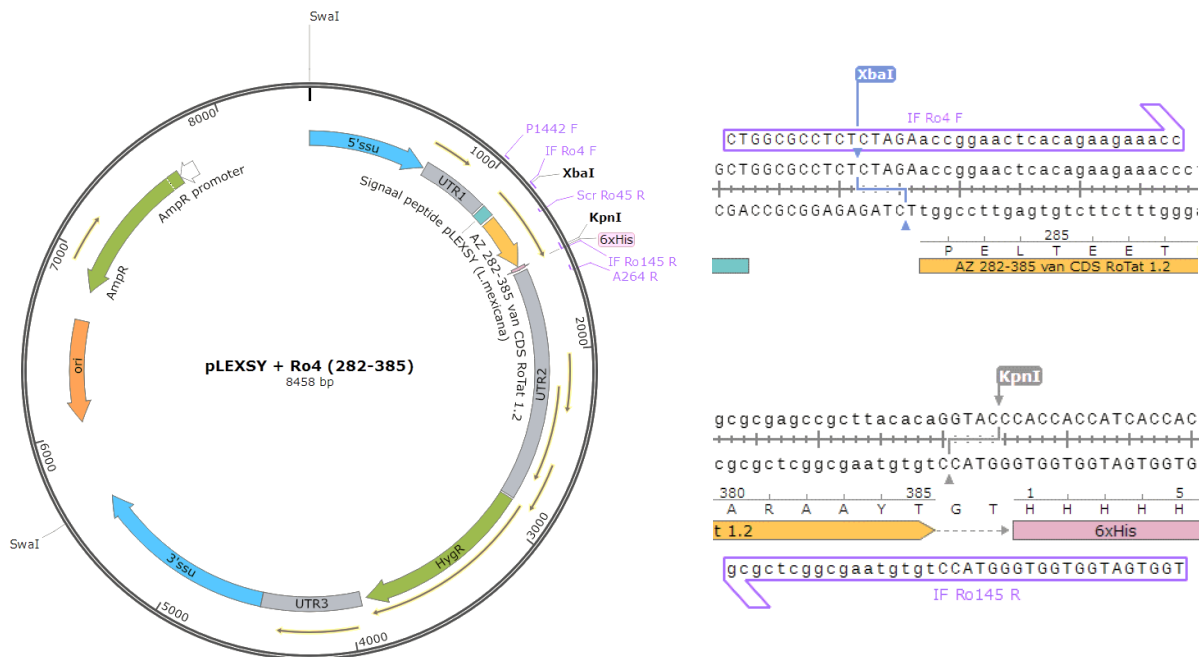
Figuur 20: Construct 1 (AZ 23-385) in pLEXSY met In Fusion-primers bekomen via SnapGene® 3.0.2.



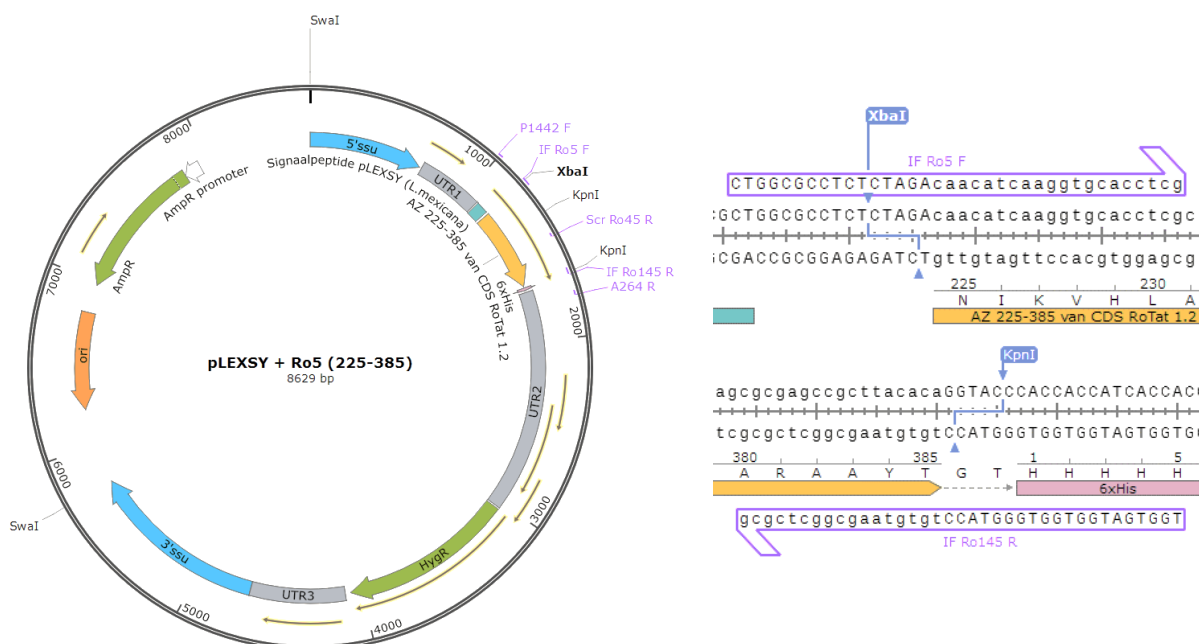
Figuur 21: Construct 2 (AZ 23-282) in pPLEXSY met In Fusion-primers bekomen via SnapGene® 3.0.2



Figuur 212: Construct 3 (AZ 23-171) in pPLEXSY met In Fusion-primers bekomen via SnapGene® 3.0.2



Figuur 23: Construct 4 (AZ 282-385) in pLEXSY met In Fusion-primers bekomen via SnapGene® 3.0.2



Figuur 24: Construct 5 (AZ 225-385) in pLEXSY met In Fusion-primers bekomen via SnapGene® 3.0.2

7.1.2 MOLECULAIRE BIOLOGIE

7.1.2.1 LB-MEDIUM

Vloeibaar LB-medium bevat 1% NaCl (VWR® Chemicals #27510.295), 1% Bacto™ tryptone (BD #211705), 0,5% Bacto™ gistextract (BD #212750) opgelost in reverse osmotisch water. Voor vast medium werd hieraan nog 1,5% Bacto™ Agar (BD #214010) toegevoegd. Autoclaveren gebeurde gedurende 10 minuten op 121°C. Hierna werd een 1000x concentratie van carbenicilline toegevoegd met een eindconcentratie van 100µg/mL (startconcentratie: 100mg/mL).

7.1.2.2 TRANSFORMATIE VAN STELLAR™ COMPETENT CELLS

Transformatie van *E. coli* Stellar™ Competent Cells gebeurde zoals beschreven door de producent (In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech® #011614)). De cellen werden ontdooid op ijs en geïncubeerd met plasmide DNA gedurende 20 minuten. Vervolgens volgde een hittesthock transformatie van 45 seconden op 42°C waarna de cellen terug 2 minuten op ijs werden geplaatst. Het mengsel werd gedurende een uur op 37°C in SOC-medium op de schudincubator (Thermomixer) geplaatst (225 rpm). De getransformeerde cellen werden uitgeplaat op LB-medium bevattende agar en carbenicilline. De vector bevat het β -lactamase-gen en veroorzaakt resistentie tegen penicillines zoals carbenicilline. Incubatie verloopt gedurende overnacht op 37°C.

7.1.2.3 IN VITRO CULTIVATIE VAN *E. COLI*

Geïsoleerde kolonies van getransformeerde *E. coli* werden geselecteerd (klonale selectie) en verder gegroeid door een tippuntje te inoculeren in 5mL vloeibaar LB-medium en 5 μ L van een 1000x stock carbenicilline. De bacteriën werden overnacht geïncubeerd op 37°C en op 250rpm (Incubator® 44, Eppendorf).

Glycerolstocks werden gemaakt door 180 μ L van 85% geautoclaveerd glycerol te mengen met 820 μ L *E. coli*-cultuur. Vervolgens werden de cellen ingevroren in droog ijs/ethanol bad en bij -80°C bewaard.

7.1.2.4 QIAPREP® SPIN MINIPREP KIT (QIAGEN)

Plasmide-isolatie uit 5mL culturen na overnachtincubatie gebeurde d.m.v. de QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN #27106). De cellen werden gepelleteerd door 15 minuten te centrifugeren op 3220g op 4°C. Het plasmide werd gezuiverd d.m.v. een alkalische-cellyse-methode (Birnboim & Doly, 1979) via een silicagelmembraan in de aanwezigheid van hoge zoutconcentraties.

De eerste stap is het verwijderen van het supernatans en het oplossen van de celpellet in een resuspensiebuffer. Deze bevat RNase die later het aanwezige RNA zal degraderen. Vervolgens wordt de opgeloste celpellet behandeld met een lyse-buffer. Deze bevat SDS, een detergent die de fosfolipiden en proteïnen van het celmembraan zal oplossen waardoor de cel lyseert en de celinhoud vrijkomt. Natriumhydroxide zorgt voor een alkalische pH waardoor de vrijgekomen celinhoud; genomisch DNA, plasmide DNA en proteïnen; zal denatureren.

Toevoeging van de neutralisatiebuffer, bevattende kaliumacetaat en guanidiniumchloride, neutraliseert de pH waardoor het plasmide-DNA renatureert en in oplossing blijft terwijl de SDS-gebonden proteïnen en genomisch DNA zullen neerslaan door vorming van het onoplosbaar PDS. Er wordt dus een pellet gevormd na centrifugatie (10 minuten op ~17 900g) en er wordt verder gewerkt met het supernatans.

GuCl is een chaotropisch zout dat de DNA-silica-binding zal vergemakkelijken in de volgende stap.

Het supernatans kan nu geladen worden op de kolom. De silicamembraan, in aanwezigheid van de hoge zoutconcentratie, zorgt ervoor dat DNA absorbeert op de filter van de kolom. De zwak-gebonden elementen worden verwijderd met de eerste wasbuffer (PB) bevattende isopropanol en GuCl. Daarna worden de zouten verwijderd met de wasbuffer (PE) bevattende ethanol en Tris-HCl. Tenslotte wordt het plasmide geëluëerd in Tris-HCl (pH = 8,5).

7.1.2.5 NUCLEOSPIN® PCR CLEAN UP AND GEL EXTRACTION KIT (CLONTECH)

Plasmidepurificatie na restrictiedigestie of PCR gebeurde d.m.v. de NucleoSpin® PCR Clean Up en Gel Extraction (Clontech® #740609.10). De eerste stap is het toevoegen van 2 keer het volume van het staal aan binding buffer (NT1) die zowel een chaotropisch zout bevat, dat de DNA-silica-binding zal vergemakkelijken in de volgende stap, als een pH-indicator (geel). DNA bindt alleen aan de silica indien de lading negatief is, en dit bij een pH tussen 5,0 en 6,0. Indien er na toevoeging van het DNA-mengsel een verandering ontstaat, moet de pH worden aangepast vooraleer de opzuivering verder gezet kan worden. De volgende stappen met de wasbuffer (NT3) en de elutiebuffer (NE) zijn gelijkaardig aan die van de QIAprep® Spin Miniprep Kit.

7.1.2.6 QIAQUICK® PCR PURIFICATION KIT (QIAGEN)

Plasmidepurificatie van het getransformeerde plasmide na linearisatie met SwaI gebeurde a.d.h.v. de QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN #28106). Het verschil met de NucleoSpin® PCR Clean Up en Gel Extraction is dat deze kolommen een bindingscapaciteit hebben van 10µg dsDNA i.p.v. 25µg, maar ze laten toe om het DNA volledig steriel te zuiveren.

7.1.2.7 NANODROP® ND-1000 SPECTROPHOTOMETER

De concentratie aan DNA werd gemeten a.d.h.v. de Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (ISOGEN). Het is een spectrofotometrische analysemethode waarbij de absorptie van UV-licht wordt gemeten van moleculen en wordt uitgedrukt in OD (optische dichtheid) in functie van de golflengte. dsDNA absorbeert licht met een golflengte van 260nm, proteïnen absorberen licht van 280nm en chaotrope zouten absorberen licht van 230nm. Een concentratie van 50ng dsDNA/µL geeft een OD₂₆₀ van 1.

Een waarde tussen 1,8 en 2,0 voor de verhouding van OD₂₆₀/OD₂₈₀ is ideaal. Een lagere ratio duidt op een hoge concentratie proteïnen, een hogere ratio duidt op de isolatie van RNA (dus meer onzuiverheid). Naast de OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio wordt ook de verhouding van OD₂₆₀/OD₂₃₀ uitgezet. Hoe hoger deze ratio, hoe minder chaotrope zouten en dus hoe zuiverder het DNA-staal.

7.1.2.8 RESTRICTIEDIGESTIE

Voor de restrictiedigestie van ongeknipt plasmide DNA werd een overmaat van 10 units aan restrictie-enzymen gebruikt (1 U is de hoeveelheid enzyme nodig om 1 µg DNA te knippen in 1 uur op 37°C en in 50µL). Restrictie-enzymen zijn opgelost in 50% glycerol. Om steractiviteit tegen te gaan moet er vermeden worden dat er meer dan 5% glycerol in het totaal volume zit. Dit komt overeen met een maximum van 5µL restrictie-enzyme-oplossing in een totaal volume van 50µL. Indien nodig wordt het totaal volume van de reactie vergroot. De mengsels werden aangelengd met Molecular Biology Water (AccuGENE™) en incubatie verliep overnacht op 37°C in de Thermocycler T3000 (Biometra®).

Tabel 4: Overzicht restrictie-enzymen

Restrictie-enzyme	Concentratie	Firma	Buffer
KasI	5U/µL	NEB #R0544S	CutSmart® Buffer 10X (NEB #B7204S)
KpnI-HF®	20U/µL	NEB #R3142S	CutSmart® Buffer 10X (NEB #B7204S)
XbaI	20U/µL	NEB #R0145S	CutSmart® Buffer 10X (NEB #B7204S)
SwaI	10U/µL	NEB #R0604S	NEBuffer 3.1 10X (NEB #B7203S)

7.1.2.9 CLONEAMP™ HIFI PCR PREMIX

PCR-amplificatie van de doelwitsequenties uit het gDNA van RoTat 1.2 werd uitgevoerd met de CloneAmp™ High Fidelity PCR Premix (Clontech® #639298). Het is belangrijk om een nauwkeurige replicatie te genereren van het gewenste DNA-templeate. Dit wordt bekomen door gebruik te maken van een high-fidelity polymerase die door deze kit wordt bezorgd, alsook dNTP's en een geoptimaliseerde buffer. Het DNA-polymerase combineert een lage misincorporatie van nucleotiden samen met een 3' → 5' exonuclease-activiteit, ook bekend als proofreading, zodanig dat de lage misincorporatie wordt gecorrigeerd.

Tabel 5: CloneAmp™ HiFi PCR Mix

Mix	Provider	Stock C	Finale C	Reactie (µL)	x5
Water	Accugene			9,25	46,25
CloneAmp HiFi PCR Premix	Clontech	2x	1x	12,5	62,5
Forward primer	IDT	10µM	0,25µM	0,625	3,125
Reverse primer	IDT	10µM	0,25µM	0,625	3,125
gDNA RoTat 1.2	ITM	10ng/µL	20ng	2	10
Totaal				25	125

Tabel 6: CloneAmp™ HiFi primerpaar

Mix	Forward primer	Reverse primer	Template
pLEXSY Ro1	IF Ro123 F	IF Ro145 R	<i>T. evansi</i> RoTat 1.2 gDNA
pLEXSY Ro2	IF Ro123 F	IF Ro2 R	<i>T. evansi</i> RoTat 1.2 gDNA
pLEXSY Ro3	IF Ro123 F	IF Ro3 R	<i>T. evansi</i> RoTat 1.2 gDNA
pLEXSY Ro4	IF Ro4 F	IF Ro145 R	<i>T. evansi</i> RoTat 1.2 gDNA
pLEXSY Ro5	IF Ro5 F	IF Ro145 R	<i>T. evansi</i> RoTat 1.2 gDNA

Tabel 7: CloneAmp™ HiFi PCR-instellingen met gradënt

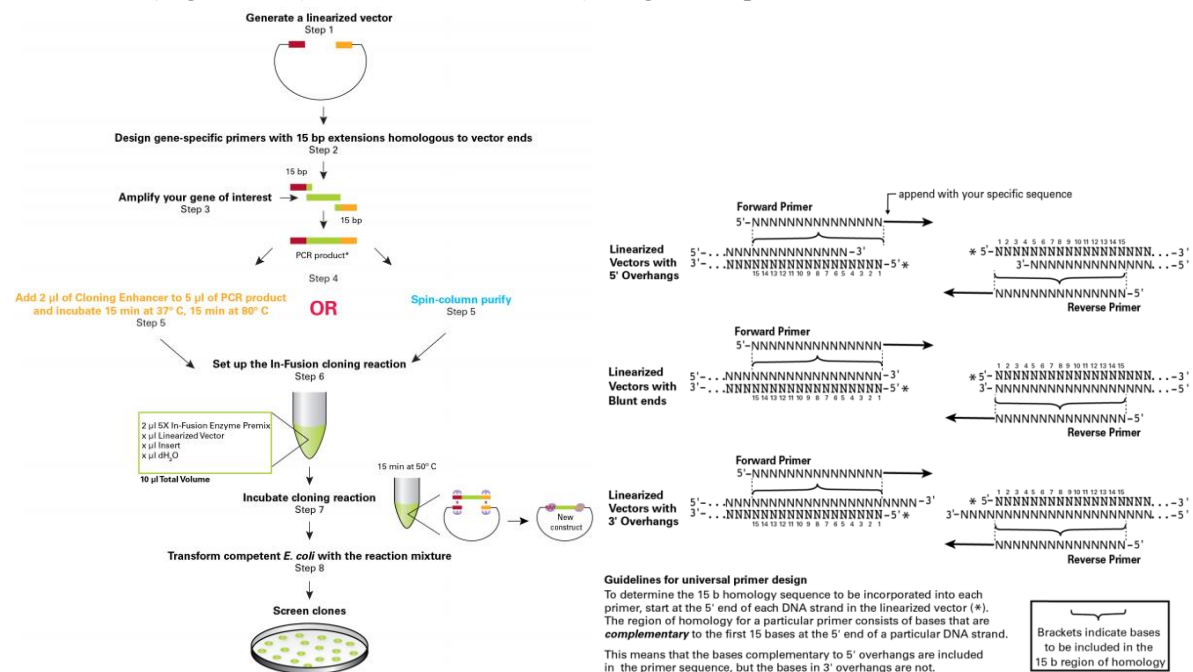
Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cyclus
1	98	30"	
2	98	10"	
3	55 – 65	15"	
4	72	30"	34 cycli naar stap 2
5	72	5'	
6	4	forever	

7.1.2.10 IN FUSION® HD CLONING KIT

Eens de constructen waren geamplificeerd en het leeg plasmide was gelineariseerd met KpnI en XbaI werd er overgegaan naar de klonering a.d.h.v. de In Fusion® HD Cloning Kit (Clontech #011614).

In-Fusion Cloning is een methode van Clontech die ontworpen is om snel en directioneel één of meerdere DNA-fragmenten te kunnen kloneren in elke vector. Bij deze PCR-methode worden de primers zo ontworpen dat ze een deel, namelijk 15 basenparen, van de gelineariseerde vector bevatten en een deel van de DNA-fragmenten. Het In Fusion Enzyme zal deze overlappen herkennen en de twee fusioneren. De eerste stap is de linearisatie van de vector d.m.v. van een restrictiedigestie.

Vervolgens wordt het DNA-fragment geamplificeerd a.d.h.v. een proofreading-polymerase met de ontworpen primers (zie figuur 23) zodat er een overlap wordt gecreeërd. Dit wil zeggen dat er geen restrictiedigestie nodig is. Eens de vector gelineariseerd is en het DNA-fragment geamplificeerd worden ze gekloneerd d.m.v. het In-Fusion Enzyme a.d.h.v. homologe recombinatie wat de klonering ligatie-onafhankelijk maakt. *E. coli*-cellen worden getransformeerd met de finale constructen, die “seamless” of “naadloos” zijn gevormd (zonder extra nucleotiden), volgens het protocol van de firma.



Figuur 22: Overzicht van de In-Fusion HD Cloning (Clontech, 2013)

Figuur 23: Primer design. Primers bevatten een 15bp-overlap van de vector. Voor vectoren met sticky ends worden basen in de 5'-overhang in de primersequentie mee geïncorporeerd, basen in de 3'-overhang niet. De overlap van het DNA-fragment bevat de restrictiesites en wordt zo opgesteld dat de primers ongeveer dezelfde smelttemperatuur hebben. (Clontech, 2013)

7.1.2.11 HOTSTARTTAQ PLUS

Om te controleren of *E. coli* effectief was getransformeerd werden de kolonies gescreend d.m.v. kolonie-PCR. Een tippuntje van cellen werd direct in de PCR-reactie gestoken. Deze worden gelyseerd tijdens de initiële PCR-stap dat resulteert in het vrijkomen van het plasmide (zie tabel 10).

De kolonie-PCR werd uitgevoerd met het HotStartTaq *Plus* DNA-polymerase (QIAGEN, #203601). Dit is een polymerase dat inactief is bij kamertemperatuur doordat er antilichaam gebonden is aan de actieve plaats van het enzyme. Dit voorkomt de extensie van non-specifieke annealing van primers en primerdimeren. Het polymerase wordt geactiveerd door incubatie gedurende 5 minuten op 95°C. De CoralLoad PCR Buffer zorgt voor optimale omstandigheden tijdens de amplificatie en dient ook als ladingbuffer en visualisatie tijdens de gelelektroforese.

Tabel 8: Hot Start Taq Plus PCR Mix

Mix	Provider	Stock C	Finale C	Reactie (µL)	x16
Water	Accugene			13,12	209,92
Coral Load Buffer	Qiagen	10x	1x	2	32
MgCl ₂	Qiagen	25mM	2,5 mM	0,8	12,8
dNTPs	Eurogentec	20mM/5mM	0,8mM/200µM	0,8	12,8
BSA acetylated	Promega	10 mg/mL	0,1 mg/mL	0,2	3,2
P1442 F	IDT	10 µM	0,5µM	1	16
Scr145 R	IDT	10 µM	0,5 µM	1	16
Hot Star Taq Plus	Qiagen	5 U/µL	1 U in 50µL	0,08	1,28
gDNA <i>E. coli</i>				1	16
Totaal				20	320

Tabel 9: Hot Start Taq Plus primerpaar

Mix	Forward primer	Reverse primer	Template
1	P1442F	Scr Ro123 R	<i>E. coli</i> pLEXSY Ro 1
2	P1442F	Scr Ro123 R	<i>E. coli</i> pLEXSY Ro 2
3	P1442F	Scr Ro123 R	<i>E. coli</i> pLEXSY Ro 3
4	P1442F	Scr Ro45 R	<i>E. coli</i> pLEXSY Ro 4
5	P1442F	Scr Ro45 R	<i>E. coli</i> pLEXSY Ro 5

Tabel 10: Hot Start Taq Plus instellingen PCR

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Cyclus
1	95	5'	
2	94	30"	
3	55	30"	
4	72	30"	24 cycli naar stap 2
5	72	5'	
6	15	forever	

7.1.2.12 GELELEKTROFORESE

DNA werd gescheiden op een agarosegel a.d.h.v. gelelektroforese. Bij deze scheidingstechniek wordt een elektrisch veld aangelegd op een vaste fase, bv. een agarosegel, waardoor geladen moleculen zullen migreren naar de tegenovergestelde pool. DNA is negatief geladen en zal dus migreren van de kathode (-) naar de anode (+). De scheiding gebeurt op basis van een agarosegel die de rol speelt van een moleculaire zeef: hoe groter het percentage aan agarose in de gel, hoe kleiner de “mazen van het net”, hoe moeilijker grote fragmenten zullen migreren doorheen de agarosegel en dus hoe dichter bij de kathode deze fragmenten waarneembaar zullen zijn op de gel. Kleine fragmenten zullen dan gemakkelijker migreren en dichter bij de anode waarneembaar zijn op de gel. Dit resulteert in een scheiding o.b.v. de grootte van de DNA-fragmenten.

De drie gebruikte molmassamerkes zijn de GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific #SM0314), de GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific #SM0243) en de GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific #SM0323).

In de gebruikte 0,5x TAE-running buffer (Tris-base-Azijnzuur-EDTA) zorgen Tris-base en azijnzuur zorgen voor een correcte pH voor de ionisatie van DNA terwijl EDTA Ca^{2+} en Mg^{2+} -ionen complexeert die zouden kunnen zorgen voor DNA-degradatie.

Visualisatie van de scheiding aan de hand van de grootte van DNA-fragmenten gebeurde door de gel na elektroforese 15 minuten te laten weken in ethidiumbromide. Deze molecule intercaleert tussen de opeenvolgende baseparen en vormt een complex dat in het oranje (590nm) fluoresceert na UV-bestraling. Het fotograferen van de agarosegel gebeurde a.d.h.v. GelVue UV Transilluminator (Syngene #GVM20).

7.1.2.13 SEQUENCING

Voor de exacte sequentie te achterhalen van de constructen werden de stalen opgestuurd naar het VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) Genetic Service Facility, University of Antwerp (GSF).

Tabel 11: Primers voor de sequencing. P1442 F = CCGACTGCAACAAGGTGTAG; A264 R = CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG; Sec Ro12 F = GACAGCTACCTAGAGGGCGA; Sec Ro12 R = AACTTTGCCTTCGATTAGGC

Construct	Forward	Reverse
pLEXSY Ro1	P1442 F Sec Ro12 F	A264 R Sec Ro12 R
pLEXSY Ro2	P1442 F Sec Ro12 F	A264 R Sec Ro12 R
pLEXSY Ro3	P1442 F	A264 R
pLEXSY Ro4	P1442 F	A264 R
pLEXSY Ro5	P1442 F	A264 R

7.1.3 *Leishmania tarentolae*

7.1.3.1 BHI-MEDIUM

VLOEIBAAR BHI-MEDIUM

18,5g BHI-poeder werd opgelost in 500mL dH₂O en 10 minuten geautoclaveerd op 121°C. Hierna werd 2,5mL van een 200x Pen-Strep-oplossing en 1,0mL van een 500x hemine-oplossing (finale concentratie: 5 µg/mL) toegevoegd. Indien selectief medium nodig was werd er een 1000x oplossing van hygromycine toegevoegd. Dit behoort allemaal tot de LEXSYcon2 Expression Kit (Jena Bioscience #EGE-232).

BHI-AGAR-MEDIUM

BHI-agar-medium werd gebruikt voor de klonale selectie van de getransformeerde *L. tarentolae*. Een 2X concentratie van Bacto™ Agar (2g/100mL; #214010, BD) en van BHI (7,4g/100mL) werden apart 10 minuten geautoclaveerd op 121°C. Aan 72mL geautoclaveerd BHI-medium werd 20mL hitte-geïnactiveerd foetaal kalfserum (Gibco™ #10500-064); 8mL 1M HEPES (Sigma-Aldrich® #052K5427) met een pH van 7.4; 1mL Pen-Strep; 0,4mL hemine en agar toegevoegd. Als laatste werd hieraan nog 0,2mL van een 1000x oplossing van de selectieve antibiotica pLEXSY-hyg2 (Jena Bioscience #EGE-232) toegevoegd (eindconcentratie: 0,1 mg/mL). Dit was genoeg voor acht platen.

7.1.3.2 REACTIVATIE VANUIT DE GLYCEROLSTOCK EN *IN VITRO* CULTIVATIE

Leishmania tarentolae (stam P10) werd vanuit de gebruikte LEXSYcon2 Expression Kit (Jena Bioscience #EGE-232) geactiveerd vanuit een glycerolstock. De cellen werden 20 minuten op ijs bewaard waarna 1,6mL uit de glycerolstock in 10mL BHI-medium werd overgebracht. De cellen werden statisch geïncubeerd in het donker en op 26°C totdat er een concentratie van $6 - 8 \cdot 10^7$ cellen/mL bekomen werd (+/- twee dagen). De celcultuur werd dan verdund (1:10 en 1:20) en verder geïncubeerd gedurende drie dagen.

Voor verdere cultivatie werd er twee keer per week een passage uitgevoerd, beginnend met een 1:50-verdunning (bv. maandag) en vier dagen later een 1:20-verdunning (bv. vrijdag) enzovoort.

7.1.3.3 TRANSFECTIE VAN *L. tarentolae*

De transfectie van *L. tarentolae* met het plasmide (pLEXSY + Ro x) gebeurde a.d.h.v. elektroporatie. Elektroporatie of elektropermeabilisatie is een moleculaire, biologische techniek waarbij gebruik wordt gemaakt van een elektrisch veld. Dit elektrisch veld genereert een elektrische stroom die over de celmembraan van de cel wordt geleid. Dit resulteert in een verhoogde permeabiliteit of een tijdelijke "pore"-formatie die de cel het mogelijk maakt om exogene moleculen, bv. vreemd DNA, op te nemen vanuit het medium.

Voor de optimale elektroporatie werd er 450µL van een 10^8 cellen/mL-cultuur genomen (indien de concentratie niet hoog genoeg was werd de cultuur geconcentreerd door centrifugatie en verwijdering van supernatans) en 50µL (1 – 10µg; zie tabel 12) van het gelineariseerd DNA. De elektroporatie gebeurde door de Gene Pulser Xcell™ Total System (met Pulse Controller en Capacitance Extender; Bio-Rad #165-2660) volgens het hoge-voltage-protocol beschreven door de kit (Jena Bioscience #EGE-232). De cellen werden overnacht geïncubeerd in 10mL BHI-medium op 26°C als statische suspensiecultuur.

Tabel 12: Instellingen voor de elektroporatie

Lengte cuvetten	4mm (Bio-Rad #1652088)
Volume	0,5mL
Voltage	1500V
Capaciteit	25µF
Aantal pulsen	2 met een interval van 10''
Duur pulsen	~ 1,2ms
Weerstand	~ 50 Ω

7.1.3.4 KLONALE SELECTIE EN *IN VITRO* CULTIVATIE VAN GETRANSFECTEERDE CELLEN

De overnachtsuspensiecultuur werd 3 minuten gecentrifugeerd op 2000g en op kamertemperatuur waarna de celpellet werd geresuspendeerd in 50 – 100µL overblijvend medium. De verschillende transfecties werden uitgeplaat op BHI-agar-medium met de selectieve antibiotica hygromycine. De platen werden geïncubeerd totdat er kolonies met een diameter van 1 à 2 mm gevormd waren (5 à 9 dagen).

METHODE 1

Er werden een paar kolonies per construct geselecteerd en overgezet naar 1mL vloeibaar BHI-medium met hygromycine in een 24-well plaat (Nunc™ #142475) en geïncubeerd volgens de optimale condities (zie 6.1.3.2) gedurende twee dagen.

METHODE 2

Er werden een paar kolonies per construct geselecteerd en overgezet naar 150µL vloeibaar BHI-medium met hygromycine in een 96-well plaat (Costar® #18915042) en geïncubeerd volgens de optimale condities en op 100rpm (geagiteerd) gedurende twee dagen. Een troebele 150µL-cultuur werd vervolgens overgezet naar 1mL en weer geïncubeerd gedurende twee dagen om dan over te zetten naar 10mL. Deze werden verder gecultiveerd volgens de optimale condities (zie 6.1.3.2).

7.1.3.5 PROTEÏENPRECIPITATIE MET TCA

De troebele cultuur van 10mL werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd op 3000g. Aan 9mL supernatans werd 1mL 100% ijskoud TCA (Sigma-Aldrich® #Y6399100G) toegevoegd zodat een eindconcentratie van 10% TCA werd bekomen. Dit werd geïncubeerd gedurende 30 minuten op ijs. Na incubatie werd het staal 15 minuten gecentrifugeerd op 17000g en 4°C waarna het supernatans werd geaspireerd. Hierna werd de pellet gewassen: 1mL 80% aceton (Merck Millipore #1000141000) toevoegen, 30 seconden vortexen, 15 minuten centrifugeren op 17000g en 4°C en het supernatans aspireren.

7.1.3.6 PROTEÏENSCHEIDING D.M.V. SDS-PAGE

SDS-PAGE is een elektroforesetechniek waarbij eiwitten gescheiden worden op een polyacrylamidegel. De proteïnen zullen door plaatsing van spanning op de gel, die werkt als moleculaire zeef, bij deze specifieke techniek scheiden o.b.v. hun grootte. Het percentage van de gel bepaalt de grootte van de mazen van de zeef en dus de grootte van de proteïnen die optimaal gescheiden kunnen worden.

Om een rechtstreeks verband te kunnen maken tussen de grootte of het moleculair gewicht en de lading van het proteïne wordt SDS of natriumdodecylsulfaat toegevoegd. SDS is een chaotropisch, anionisch detergent dat proteïnen partieel zal denatureren, eraan zal binden en er daardoor een negatieve lading aan zal meegeven. Hierdoor zullen de eiwitten dus allemaal migreren naar de anode.

Naast SDS, kunnen eiwitten eventueel kort worden verwarmd in aanwezigheid van een reductiemiddel, zoals 2-mercaptoethanol, die de eiwitten verder denatureert door de disulfidebruggen te verbreken. Dit zal sommige vormen van tertiaire eiwitvouwing voorkomen en quaternaire eiwitstructuren opbreken. Dit staat bekend als reducerende SDS-PAGE.

Bij deze elektroforese werd er gewerkt volgens het principe van Laemmli (discontinue systeem). D.w.z. dat er met twee gels werd gewerkt:

- a) “Stacking” gel met de slotjes
- b) “Resolving” gel of scheidende gel

Door dit protocol te hanteren wordt er een grensgebied bekomen waarop de proteïnen zich tijdens de elektroforese zullen concentreren wat resulteert in scherpere banden.

Voor de inhoud van de buffers, zie bijlagen.

STAALVOORBEREIDING

De pellet, bekomen na de proteïnenprecipitatie, werd geresuspendeerd in een totaal volume van 30 μ L 1X reducerende SDS-PAGE loading buffer bevattende: 47,5% 2X Laemmli sample buffer (Bio-Rad #1610737); 2,5% 2-mercaptoethanol 98% (Aldrich #M3701) en 50% Tris-HCl 0,5M (pH 8,8). De proteïnen werden gedurende vijf minuten gedeneureerd op 105°C en hierna direct op ijs geplaatst totdat de stalen waren afgekoeld. Tenslotte werden de stalen 5 minuten gecentrifugeerd op 13000rpm en geresuspendeerd.

GELVOORBEREIDING

Tabel 13: Voorbereiding voor twee gels

Scheidingsgel 14% (μL)		Stackinggel 6%
SDS 10%	100 μ L	250 μ L
Water	2290 μ L	2900 μ L
Tris-HCl 1,5M (pH 8,8)	2500 μ L	
Tris-HCl 0,5M (pH 8,8)		1250 μ L
Protogel	5000 μ L	650 μ L
APS 10%	100 μ L	50 μ L
TEMED 100%	10 μ L	5 μ L
Polymerisatietijd	45min	30min

INSTELLINGEN

De gels werden in de Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad #1658001) geplaatst en ondergedompeld in 1X elektrodebuffer. Indien er negen kammen werden gebruikt werd de gel geladen met 30 μ L staal/well. De gel werd gerund gedurende 50 minuten op 200V d.m.v. de PowerPac™ HC Power Supply (BioRad #1645052). De gebruikte ladder is de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad #1610374).

7.1.3.7 COOMASSIE BRILJANT BLAUW KLEURING EN GELDROGING

De SDS-polyacrylamidegel werd overnacht geïncubeerd in CBB-oplossing. Hierna werd de gel ontkleurd met ontkleuringsbuffer gedurende anderhalfuur waarbij de buffer éénmaal werd verversd na een halfuur. Absorberend papier werd mee op de gel geplaatst. Na ontkleuring werd de gel een uur geïncubeerd in krimpoplossing en tegelijkertijd werden twee cellofaanvellen (BIOzym) gedurende een uur gesatureerd in 10% glycerol. Alle stappen gebeurden op de Orbital Shaker (Labnet Orbit 1000, Biologio) op 50rpm. De gel werd tenslotte tussen de twee cellofaanvellen gedurende een nacht gedroogd.

7.1.3.8 WESTERN BLOTTING

De gel werd 15 minuten geëquilibreerd in transfer buffer. De gel werd dan geblot met één nitrocellulosemembraan (Amersham™ Hybond™ P0,45 PVDF; GE Healthcare Life Sciences #10600023) en twee filterpapieren aan elke kant. De instructies van het apparaat (Criterion™ Blotter; Biorad #1704070) werden gevolgd. De running (Powerpac™ Power Supply; BioRad #1645052) verliep gedurende 50 minuten op 100V.

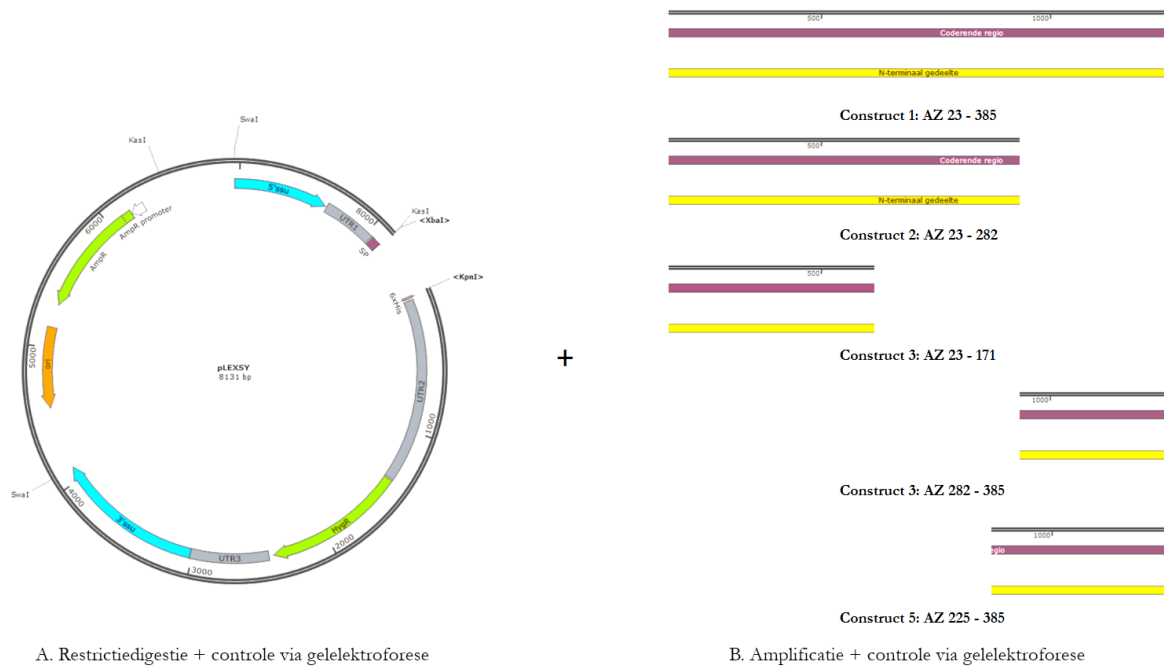
7.1.3.9 DIRECTE IMMUNOSTAINING

Het membraan werd overnacht gesatureerd in TBS-Blotto op 4°C om de potentiële specifieke bindingsites te blokkeren. Hierna werd het staal drie maal gewassen gedurende vijf minuten met TBS. Incubatie met het conjugaat (muis-anti-histidine met alkalische fosfatase als tag) verliep gedurende één uur. Het membraan

werd hierna vier maal gewassen met TTBS en één maal met AP-buffer gedurende vijf minuten. Incubatie met het chromogeen substraat verliep gedurende maximum 20 minuten met 50mL AP-buffer, 132 μ L NTB-stock en 66 μ L BCIP-stock en de reactie werd gestopt met water. In aanwezigheid van een histag zal het enzyme AP, gebonden aan de anti-histidine, NTB en BCIP omvormen in een blauw/paarse kleur. Alle stappen gebeurden op de Orbital Shaker (Labnet Orbit 1000, Biolegio) op 50rpm.

7.1 RESULTATEN

7.1.1 TRANSFORMATIE VAN PLEXY MET CONSTRUCTEN UIT ROTAT 1.2 VSG



Figuur 24: Flowchart van de klonering van de vijf verschillende constructen met pLEXY

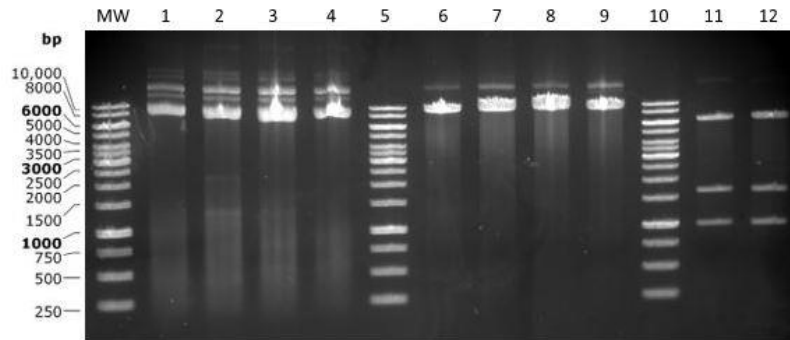
7.1.1.1 TRANSFORMATIE EN RESTRICTIEDIGESTIE VAN PLEXY

E. coli Stellar cellen werden door middel van hittestoek getransformeerd met 100ng leeg pLEXY plasmide en uitgeplaat op carbenicilline bevattende LB platen. Geïsoleerde kolonies werden verder in vloeibaar cultuurmedium opgegroeid. Er werd op vier culturen een plasmidezuivering uitgevoerd.

Het gezuiverd plasmide pLEXY werd geknipt met de restrictie-enzymen KasI en KpnI. KasI is een “unieke” restrictiesite achter het signaal peptide in pLEXY en KpnI is een unieke restrictiesite voor de His-tag in pLEXY. Na restrictiedigestie werd d.m.v. gelelektroforese nagegaan of het proces correct was verlopen (figuur 25).

Er is duidelijk te zien in laan 11 en 12 dat er op drie plaatsen is geknipt i.p.v. twee. Het blijkt na contact te hebben opgenomen met de firma Jena Bioscience dat de sequentie van pLEXY, weergegeven op de site, niet correct was en dat er in pLEXY twee KasI-sites zijn (tabel 14).

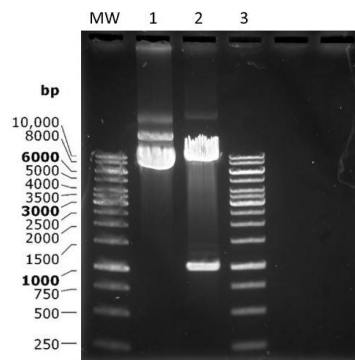
De restrictiedigestie werd opnieuw uitgevoerd, maar deze keer met XbaI i.p.v. KasI dat zich ook achter het signaal peptide in pLEXY bevindt. Men ziet op figuur 26 dat de restrictiedigestie deze keer wel een correct resultaat gaf. In figuur 27 en 28 zijn hiervan flowcharts weergegeven.



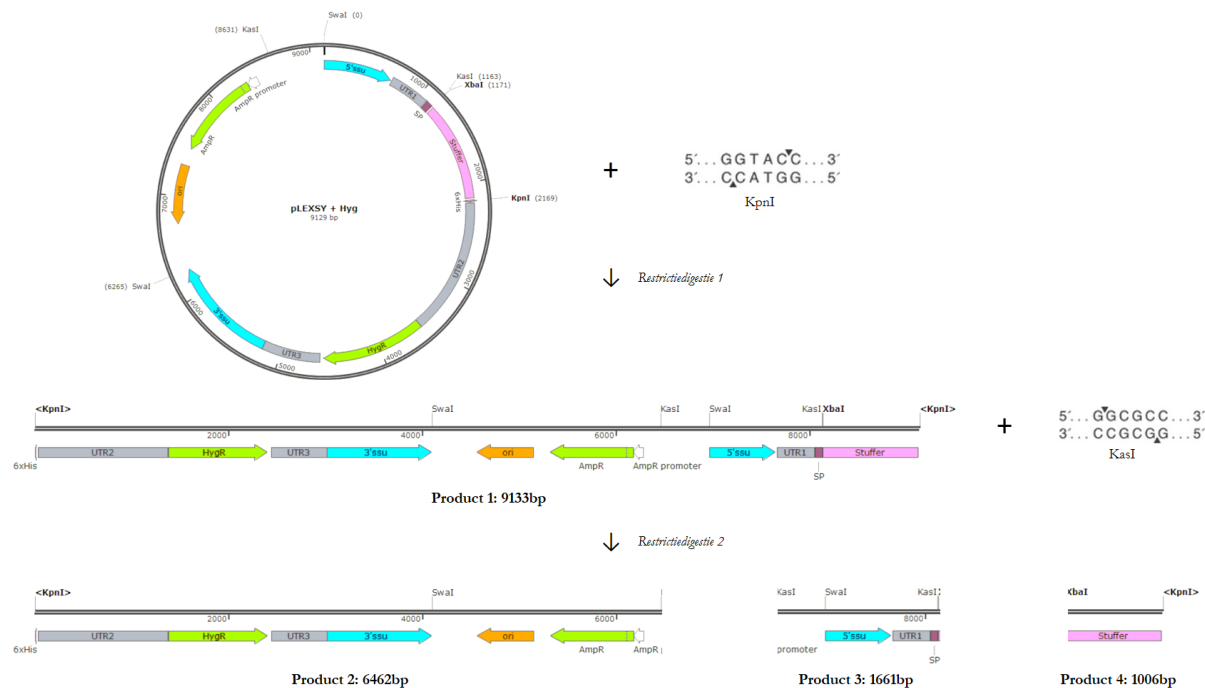
Figuur 25: Restrictiedigestie met KpnI-HF® en KasI. 2,5µL staal + ladingbuffer 30' @ 135V in 1,0% agarose 0,5 TAE gekleurd met ethidiumbromide en gevisualiseerd a.d.h.v. de GelVue UV Transilluminator. Laan 0, 5 en 10: molmassamerker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Laan 1 – 4: ongeknipt pLEXSY. Laan 6 – 9: pLEXSY geknipt met KpnI-HF®. Laan 11 en 12: pLEXSY geknipt met KpnI-HF® en KasI.

Tabel 14: Grootte van de amplicons uit template pLEXSY na restrictiedigestie berekend met SnapGene® 3.0.2

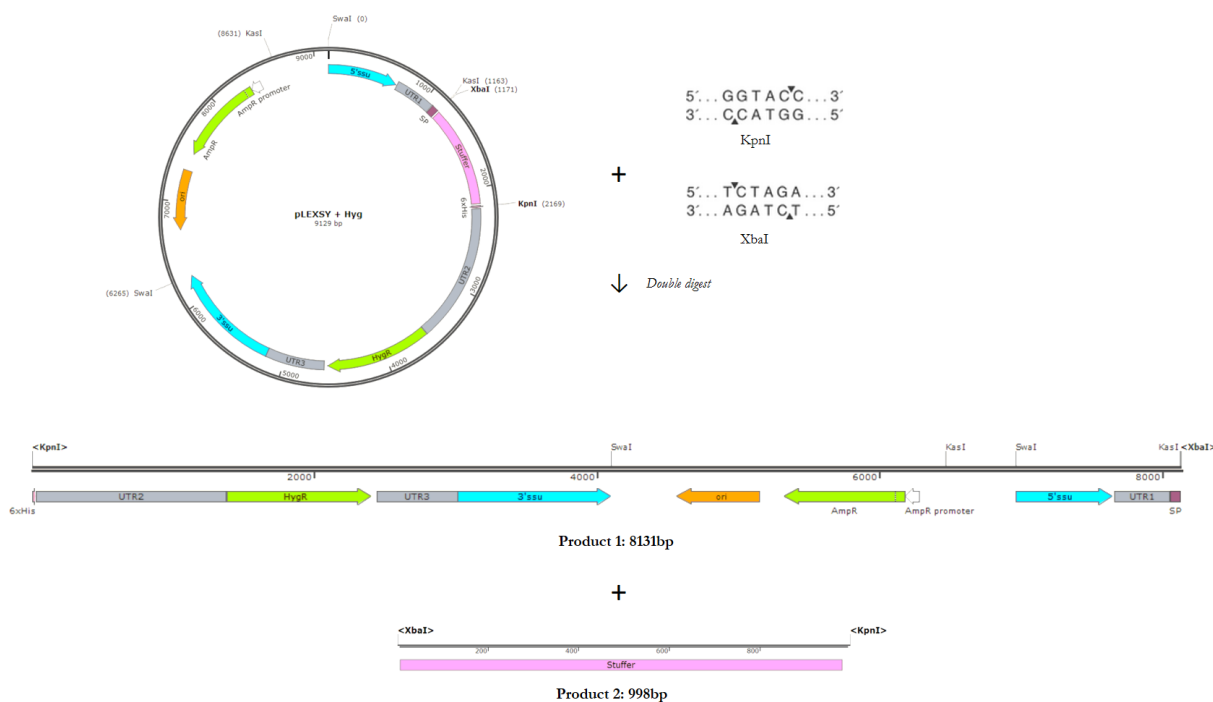
Digest	Product	Lengte ongeknipt (bp)	Lengte geknipt (bp)		
KasI-KpnI	Verbeterde sequentie pLEXSY	9129	6462	1661	1006
	Foute sequentie pLEXSY	9133	8127	1006	
XbaI-KpnI	Verbeterde sequentie pLEXSY	9129	8131	998	



Figuur 26: Restrictiedigestie met KpnI-HF® en XbaI. 2,5µL staal + ladingbuffer 30' @ 135V in 1,0% agarose 0,5 TAE gekleurd met ethidiumbromide en gevisualiseerd a.d.h.v. de GelVue UV Transilluminator. Laan 0 en 3: molmassamerker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Laan 1: ongeknipt pLEXSY. Laan 2: pLEXSY geknipt met KpnI-HF® en XbaI (double digest).



Figuur 27: Flowchart van de restrictiedigestie van de foute pLEXSY-sequentie met KasI en KpnI.



Figuur 28: Flowchart van de restrictiedigestie van de juiste pLEXSY-sequentie met XbaI en KpnI.

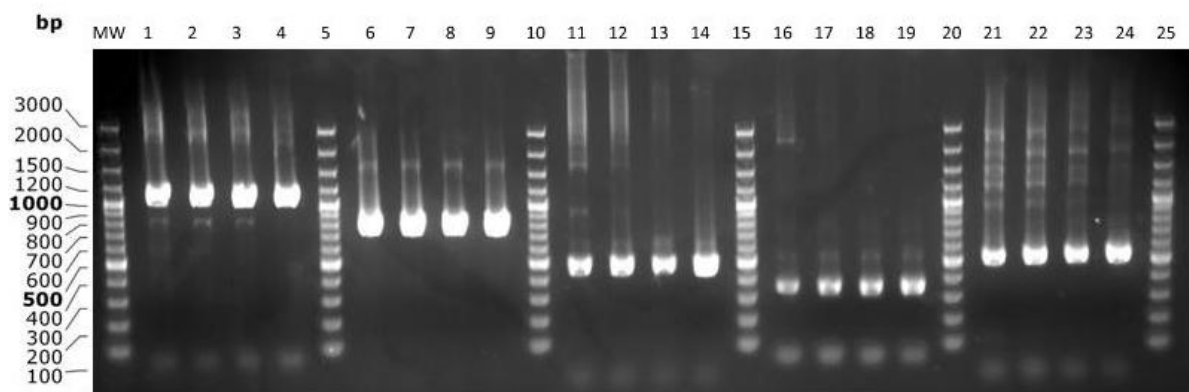
7.1.1.2 ROTAT 1.2-CONSTRUCTEN

De *T. evansi*-constructen werden geamplificeerd met primers opgesteld zoals nodig voor een In Fusion-cloning. Deze primers bevatten een deel van de vector (15bp-overlap), een deel van het construct en de KpnI- en XbaI-sites.

In tabel 15 is de grootte van de te verwachten sequenties weergegeven en men kan zien op figuur 29 dat de PCR-amplificatie van de vijf constructen afkomstig van het gDNA van *T. evansi* een correct resultaat heeft geleverd. Wel zijn er heel wat primerdimeren en specifieke bandjes te zien.

Tabel 15: Grootte van de amplicons uit template *T. evansi* RoTat 1.2 gDNA na PCR-amplificatie berekend met SnapGene® 3.0.2

Construct	Product	Forward	Reverse	Lengte (bp)
1	<i>T. evansi</i> Ro1	IF Ro123 F XbaI	IF Ro145 R	1129
2	<i>T. evansi</i> Ro2	IF Ro123 F XbaI	IF Ro2 R	820
3	<i>T. evansi</i> Ro3	IF Ro123 F XbaI	IF Ro3 R	487
4	<i>T. evansi</i> Ro4	IF Ro4 F XbaI	IF Ro145 R	349
5	<i>T. evansi</i> Ro5	IF Ro5 F XbaI	IF Ro145 R	520



Figuur 29: PCR-amplificatie met temperatuurgadiënt (55°C-65°C) van gDNA van *T. evansi* met primers voor IF-cloning: IF Ro123 F, IF Ro4 F, IF Ro5 F, IF Ro145 R, IF Ro2 R, IF Ro3 R. 2,5µL + ladingbuffer 30' @ 135V in 1,5% agarose 0,5X TAE gekleurd met ethidiumbromide en gevisualiseerd a.d.h.v. de GelVue UV Transilluminator. Laan 0, 5, 10, 15, 20 en 15: molmassamerker GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder. Laan 1 – 4: *T. evansi* Ro1. Laan 6 – 9: *T. evansi* Ro2. Laan 11 – 14: *T. evansi* Ro3. Laan 16 – 19: *T. evansi* Ro4. Laan 21 – 24: *T. evansi* Ro5.

In tabel 16 wordt weergegeven hoeveel DNA nodig was voor de transformatie van *E. coli*, berekend volgens de IF® Molar Ratio Calculator.

Tabel 16: Instellingen voor de transformatie van *E. coli* Stellar Competent Cells

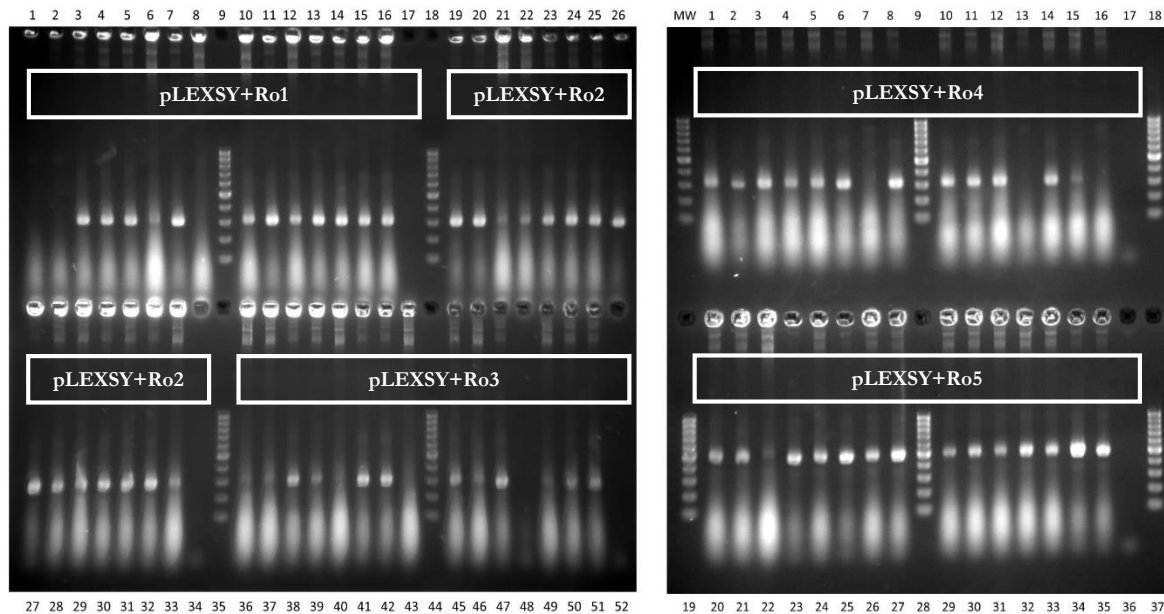
DNA	Vector (ng)	Insert (ng)
pLEXSY + Ro1	200	49,3
pLEXSY + Ro2	200	36,2
pLEXSY + Ro3	200	21,2
pLEXSY + Ro4	200	15,2
pLEXSY + Ro5	200	22,7

7.1.1.1 SCREENING VAN DE TRANSFORMATIES

Na de In Fusion-cloning van de vijf constructen in pLEXSY werd *E. coli* getransformeerd met de plasmiden en dit werd middels gelelektroforese gecontroleerd. In de volgende tabel is weergegeven hoe groot de amplicons zouden moeten zijn. In figuur 30 is duidelijk te zien dat bijna alle kolonies getransformeerd zijn.

Tabel 17: Grootte van de amplicons uit template van de screening van *E. coli* pLEXSY + Ro berekend met SnapGene® 3.0.2

Construct	Product	Forward	Reverse	Lengte (bp)
1	Overlap pLEXSY + Ro1	P1442F	Scr Ro123 R	304
2	Overlap pLEXSY + Ro2	P1442F	Scr Ro123 R	304
3	Overlap pLEXSY + Ro3	P1442F	Scr Ro123 R	304
4	Overlap pLEXSY + Ro4	P1442F	Scr Ro45 R	308
5	Overlap pLEXSY + Ro5	P1442F	Scr Ro45 R	479

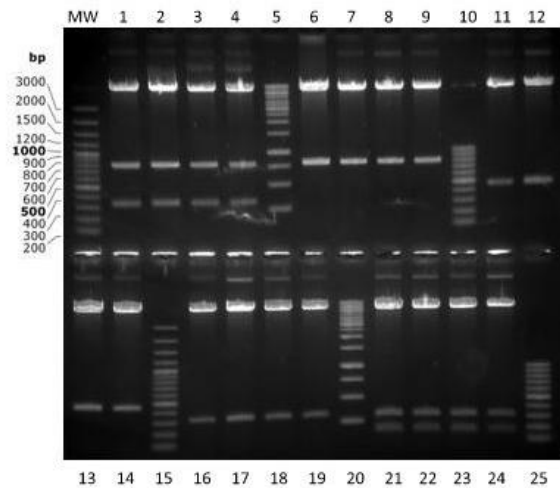


Figuur 30: Amplificatie met primers ontworpen voor de screening, 2,5µL 30' @ 135V in 2% agarose 0,5 TAE gekleurd met ethidiumbromide en gevisualiseerd a.d.h.v. de GelVue UV Transilluminator. Molmassamerker: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder. Laan 17a, 34a, 52a, 17b en 26b: negatieve controles.

Er werd van elk construct vier getransformeerde kolonies geselecteerd. Deze werden gecontroleerd op het behoud van de restrictiesites door een restrictiedigestie uit voeren. Middels gelelektroforese werd dit gecontroleerd. Tabel 18 geeft de predicties weer en de resultaten zijn zichtbaar in figuur 31.

Tabel 18: Grootte van de amplicons na double digest met XbaI en KpnI-HF® berekend met SnapGene® 3.0.2

Construct	Product	Lengte (bp)		
1	pLEXSY + Ro1	8135	787	316
2	pLEXSY + Ro2	8135	787	7
3	pLEXSY + Ro3	8135	461	
4	pLEXSY + Ro4	8135	323	
5	pLEXSY + Ro5	8135	316	178



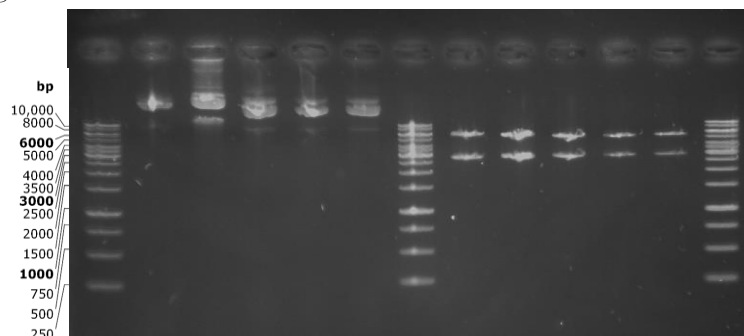
Figuur 31: Restrictiedigestie met KpnI-HF® en XbaI. 15µL staal + 3µL 6x ladingbuffer 30' @ 135V in 1,5% agarose 0,5 TAE gekleurd met ethidiumbromide en gevisualiseerd a.d.h.v. de GelVue UV Transilluminator. Laan 0 en 15: molmassamerker GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder. Laan 5 en 20: molmassamerker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Laan 10 en 25: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder. Laan 1 – 4: pLEXSY + Ro1. Laan 6 – 9: pLEXSY + Ro2. Laan 11 – 14: pLEXSY + Ro3. Laan 16 – 19: pLEXSY + Ro4. Laan 21 – 24: pLEXSY + Ro5.

7.1.1.2 SEQUENCING VAN DE TRANSFORMATIES

Per construct werden er drie van de vier klonen opgestuurd naar het VIB om na te gaan of de sequentie volledig behouden is. Bijna allen hebben de exacte sequentie behouden, zie bijlagen.

7.1.1.3 LINEARISATIE MET SWAI

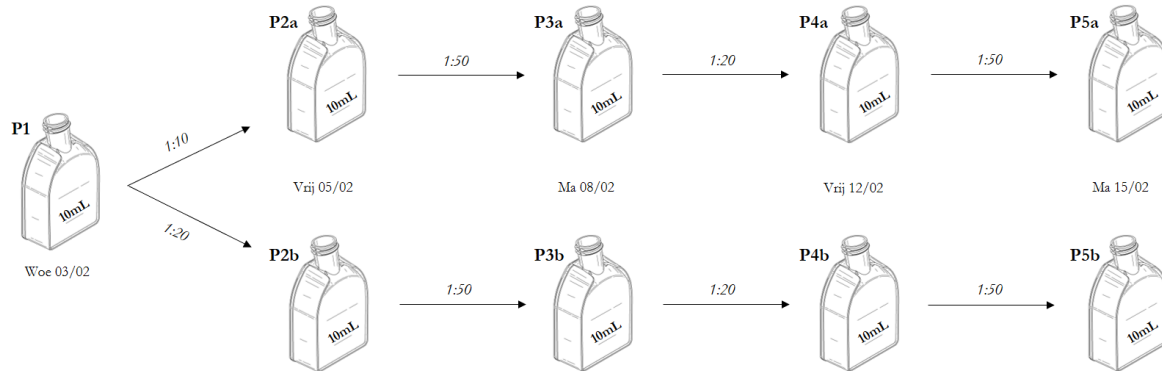
Vooraleer *L. tarentolae* getransfecteerd kon worden moesten de plasmiden gelineariseerd worden met SwaI zodat de insertie hiervan in het chromosomaal *ssu*-locus van *L. tarentolae* kon plaatsvinden. Ook dit werd via gelelektroforese gecontroleerd.



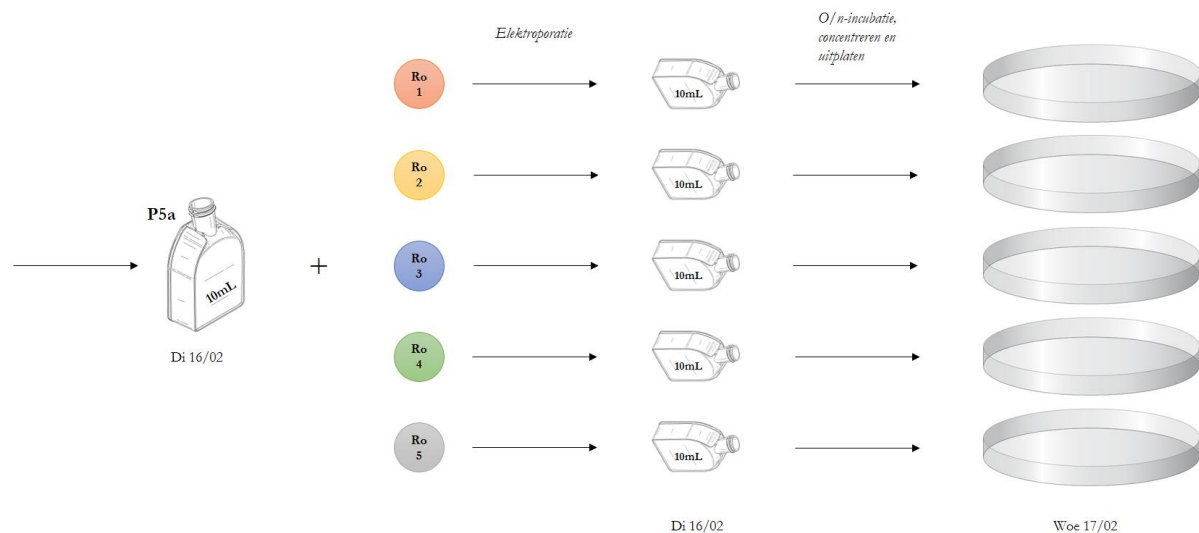
Figuur 32: Restrictiedigestie voor linearisatie van de getransformeerde plasmiden met SwaI. 1µl staal + 6x ladingbuffer 30' @ 135V in 1,5% agarose 0,5 TAE gekleurd met ethidiumbromide en gevisualiseerd a.d.h.v. de GelVue UV Transilluminator. Laan 0, 6 en 12: molmassamerker GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Laan 1 – 5: ongeknipte plasmiden. Laan 7 – 11: geknipte plasmiden. Laan 1 en 7: pLEXSY + Ro1. Laan 2 en 8: pLEXSY + Ro2. Laan 3 en 9: pLEXSY + Ro3. Laan 4 en 10: pLEXSY + Ro4. Laan 5 en 11: pLEXSY + Ro5.

7.1.2 *Leishmania tarentolae*

Zowel de reactivatie uit de glycerolstock en de *in vitro* cultivatie van *L. tarentolae* als de elektroporatie van *L. tarentolae* met “pLEXSYS + RoTat 1.2” wordt duidelijk gemaakt in de volgende figuren. In tabel 19 wordt weergegeven met hoeveel DNA *L. tarentolae* exact werd getransfecteerd.



Figuur 33: Flowchart van de reactivatie uit de glycerolstock en *in vitro* cultivatie van *L. tarentolae*

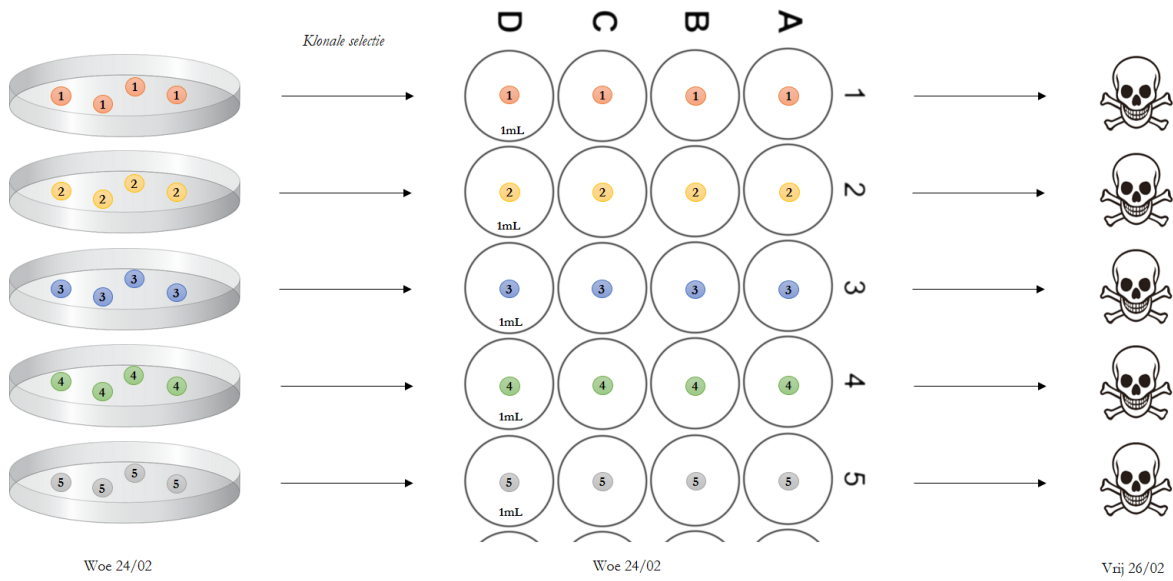


Figuur 34: Flowchart van de transfectie van *L. tarentolae* met pLEXSYS+Ro d.m.v. elektroporatie

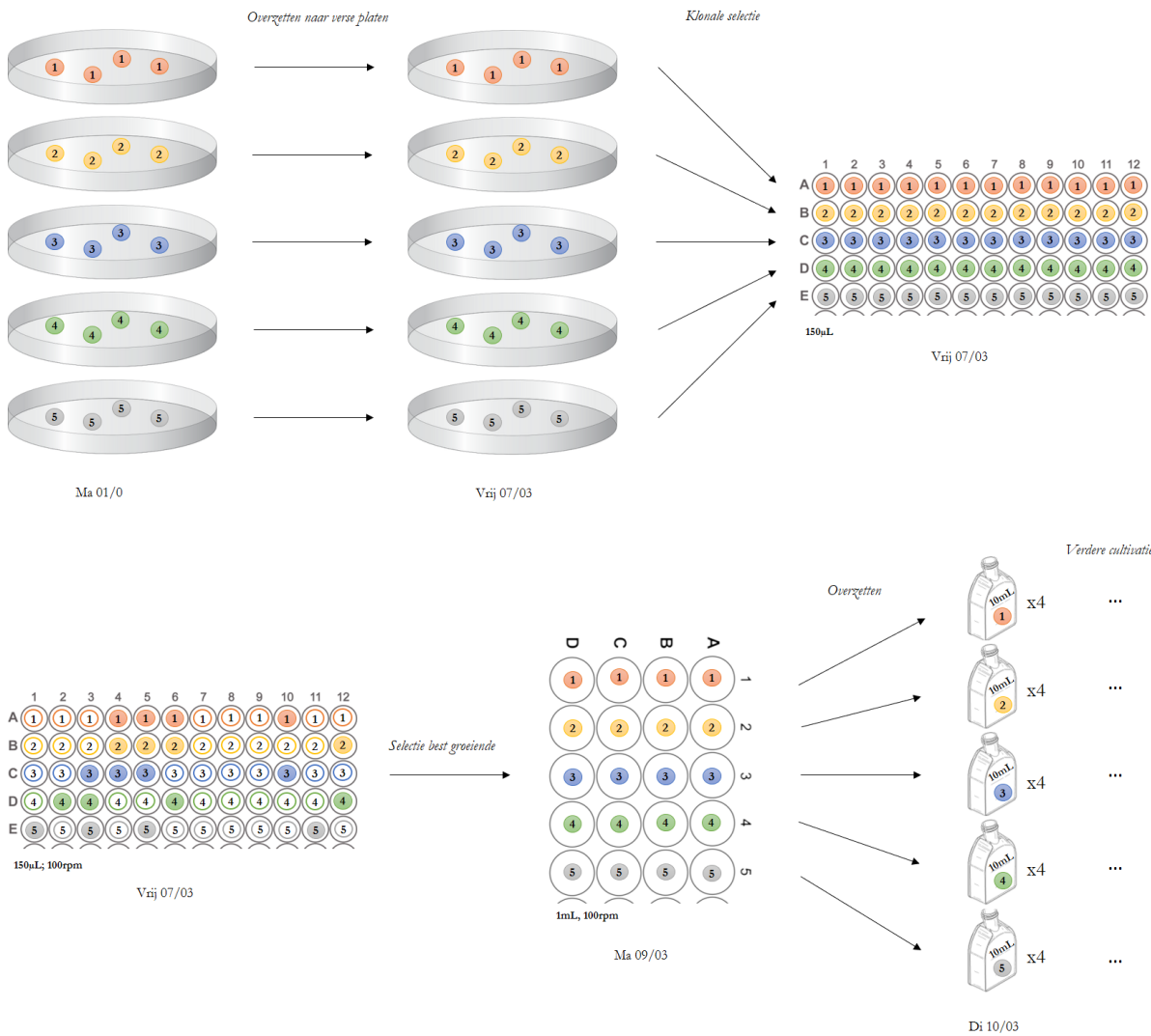
Tabel 19: Concentratie van gezuiverd plasmide (pLEXSYS + Ro), gelineariseerd met SwaI, gemeten via Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (ISOGEN)

Construct	ng/ μ L	μ g/50 μ L (gebruikt voor transformatie)
pLEXSYS + Ro1	70,28	3,5
pLEXSYS + Ro2	146,75	7,3
pLEXSYS + Ro3	138,23	6,9
pLEXSYS + Ro4	114,23	5,7
pLEXSYS + Ro5	92,02	4,6

Eens de cellen waren getransfecteerd werden kolonies geselecteerd en volgens verschillende methoden gecultiveerd. Bij de eerste methode overleefden de getransfecteerde cellen niet. Dit omdat een te lage concentratie aan cellen in te groot volume van medium niet optimaal is. Bij de tweede methode werd dus het volume aan medium verkleind én de cellen werden geïncubeerd op 100rpm (geagitteerd). De cellen groeiden wel en van elk construct werden vier klonen verder gecultiveerd en getest. Dit wordt weergegeven in figuur 35 en 36. Het verloop van de verdere cultivatie van de getransfecteerde cellen wordt weergegeven in figuur 37.



Figuur 35: Klonale selectie (hygromycine) en *in vitro* cultivatie van getransfecteerde cellen: methode 1



Figuur 36: Klonale selectie en *in vitro* cultivatie van getransfecteerde cellen: methode 2

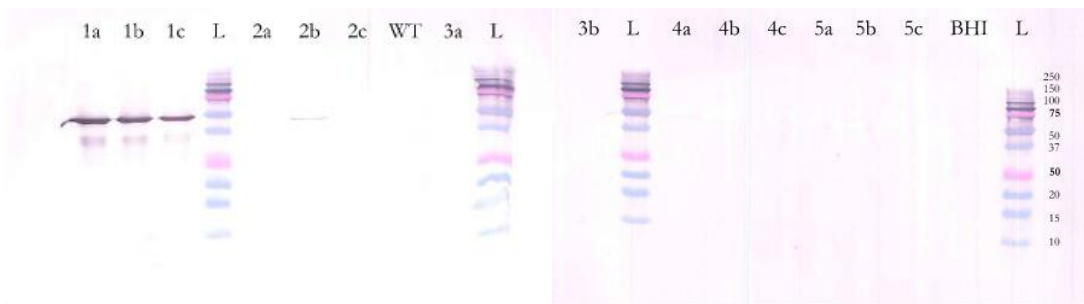
	Ro 1A	Ro 1B	Ro 1C	Ro 1D	Ro 2A	Ro 2B	Ro 2C	Ro 2D	Ro 3A	Ro 3B	Ro 3C	Ro 3D	Ro 4A	Ro 4B	Ro 4C	Ro 4D	Ro 5A	Ro 5B	Ro 5C	Ro 5D
10/03	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1
12/03	P2		P2	P2			P2	P2				P2		P2	P2	P2			P2	P2
15/03	P3	P2	P3	P3	P2		P3	P3	P2	P2		P3		P3	P3	P3		P2	P3	P3
17/03	P4*	P3*	P4*	P4*	P3*	P2*	P4*	P4*	P3*	P3*	P2*	P4*	☠	P4*	P4*	P4*	☠	P3*	P4*	P4*

Figuur 37: Evolutie van de cultivatie van de transformanten in 10mL BHI-medium met selectieve merker (Hyg). Incubatie volgens standaardcondities. P: passage. *: glycerolstock. ☠: geen doorgroei.

7.1.2.1 ANALYSE VAN DE GETRANSFECTEERDE *L. tarentolae*

DIRECTE IMMUNOSTAINING

De recombinante proteïnen werden uit het supernatans van de culturen geprecipiteerd met TCA, gescheiden op een acrylamidegel en gedetecteerd via directe immunostaining. Een blauw/paarse kleur wijst op aanwezigheid van een histag, en dus van het recombinante eiwit. In de volgende figuur is duidelijk te zien dat construct één (40kDa) in grote concentratie in het supernatans aanwezig is. Er zijn wat afbraakproducten te zien onder het specifieke bandje maar dit komt hoogstwaarschijnlijk omdat oude cultuur getest werden (dag 7). Construct twee geeft een heel lichte reactie in één cultuur (2b) en construct drie, vier en vijf geven geen reactie.



Figuur 38: Directe immunostaining met muis-anti-histag-AP van RoTat 1.2 + Histag na proteïnenprecipitatie (TCA) en SDS-PAGE: 30µL staal in ladingbuffer 50' @ 200V op een 14% polyacrylamidegel. Ladder: Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Construct 1 = 40kDA. Construct 2 = 28kDA. Construct 3 = 17kDA. Construct 4 = 13kDA. Construct 5 = 20kDA.

Om het RoTat 1.2 VSG tot expressie te brengen hebben we vijf constructen van verschillende lengte en epitopen geselecteerd. De sequenties werden geïntegreerd in de pLEXSY-hyg expressie vector en getransformeerd naar *E. coli*. Eens de constructen geverifieerd werden via DNA sequencing werd *L. tarentolae* getransfecteerd. Het secretoom van de getransfecteerde klonen van *L. tarentolae* werd vervolgens geanalyseerd via SDS-PAGE en immunostaining. Hieruit bleek dat bij één construct alle klonen een aantoonbare expressie vertoonden na immunostaining. Bij een tweede construct bleek slechts 1 van de 3 klonen een aantoonbaar eiwit te produceren. De klonen van drie andere constructen gaven geen aantoonbaar resultaat.

CONCLUSIES EN BETEKENIS

Het construct, dat bestaat uit het volledig N-terminaal gedeelte van het RoTat 1.2 VSG, blijkt tot expressie te komen in het secretoom van *Leishmania tarentolae*. Het is bovendien gelijkaardig in sequentie als het construct dat in *Pichia pastoris* reeds succesvol tot expressie kwam. Vooral dit antigeen in een nieuwe diagnostische sneltest voor surra kan worden geïncorporeerd zijn er echter nog vele verdere stappen in het proces nodig.

8 BESLUIT

Uit het gDNA van het dominante variante antigeentype RoTat 1.2, waarvan de diagnostische waarde reeds bewezen is, werden vijf verschillende constructen opgesteld. Deze constructen werden uitsluitend opgesteld uit het N-terminaal gedeelte. Dit omdat het minder variabele C-terminaal gedeelte minder bereikbaar is voor antilichamen (Schwede, Macleod, MacGregor, & Carrington, 2015). Construct één bestaat uit het volledige N-terminaal gedeelte (Rogé S. , 2015), namelijk uit aminozuren 23 t/m 385. Construct twee (AZ 23 t/m 282) en construct drie (AZ 23 t/m 171) bestaan uit het begin van het N-terminaal gedeelte en construct vier (AZ 282 – 385) en construct vijf (AZ 225 – 385) bestaan uit het einde van het N-terminaal gedeelte. Deze constructen werden geamplificeerd en getransformeerd met de vector pLEXSY-hyg in *E. coli* via een hitteshock waarop het DNA werd geanalyseerd via screening en sequencing. Na zuivering en linearisatie van de getransformeerde plasmiden werd *L. tarentolae* hiermee getransfecteerd via elektroporatie. De getransfecteerde parasieten met de vijf verschillende constructen werden gecultiveerd en troebele culturen werden geanalyseerd via SDS-PAGE en directe immunostaining (anti-histag).

Uit deze resultaten kon men waarnemen dat construct drie, vier en vijf geen reactie opleverden. Om te weten waar het juist fout loopt zijn verdere testen nodig, zoals bv. een diagnostische PCR om te achterhalen of het getransformeerde plasmide wel effectief is opgenomen, maar men kan wel concluderen dat deze recombinante eiwitten niet (correct) worden gesecreteerd in het supernatans. Van de twee constructen die wel een reactie opleverden, vertoonde construct twee een heel lichte expressie. Maar de resultaten waren niet consequent en het recombinante eiwit was in te lage hoeveelheden aanwezig. Het eerste construct daarentegen, dat bestaat uit het volledig N-terminaal gedeelte van het RoTat 1.2 gDNA, blijkt een hoge opbrengst te leveren aan recombinant eiwit in de eukaryoot *Leishmania tarentolae*. Dat wil zeggen dat de heterologe expressie van het *T. evansi* variable antigenische glycoproteïne RoTat 1.2 in *Leishmania tarentolae* een positief resultaat heeft geleverd en dat dit gebruikt kan worden in het verder proces voor het maken van een nieuwe diagnostische sneltest voor surra. Verdere stappen in het proces zijn: het opschalen van de productie van 10mL- naar 100mL-culturen, het opschalen van concentratiemethoden (geen TCA maar ultrafiltratie), affiniteitschromatografie met HisTag-kolommen en het testen van positieve en negatieve stalen van kamelen, geiten en andere via ELISA en deze vergelijken met het diagnostisch potentieel van het natief RoTat 1.2.

9 BIBLIOGRAFIE

- Baral, T. (2010). Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2010/389153
- Bargul, J., McOdimba, F. A., Jung, J., Omogo, C. O., Adung'a, V. O., Krüger, T., . . . Engstler, M. (2016). Species-Specific Adaptations of Trypanosome Morphology and Motility to the Mammalian Host. *PLoS Patho*. doi:10.1371/journal.ppat.1005448
- Basile, & Peticca. (2009, november). Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*, 43(3):273-8. doi:10.1007/s12033-009-9213-5
- Birhanu H, R. S. (2015). Surra Sero K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animals. *Veterinary Parasitology*, 211: 153-157.
- Birnboim, & Doly. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1513-23.
- Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Geyer, A., Ehrlich, G., . . . Alexandrove, K. (2002). Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Academic Press*.
- Clontech. (2013). *In-Fusion HD Cloning*. Japan : Takara . Opgehaald van Clontech .
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., De-Hua, L., Dargantes, A., Lun, Z.-R., & Jittaplapong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2013/194176
- Eyob, E., & Matios, L. (2013). Review on camel trypanosomiasis (surra) due to *Trypanosoma evansi*: Epidemiology and host response. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 334-343. doi:10.5897/JVMAH2013.0236
- fao. (sd). *A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal Trypanosomiasis*. Opgeroepen op 02 29, 2016, van Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/x0413e02.htm>
- Hoare, C. (1972). *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Oxford: Blackwell Scientific Publications .
- Maudlin, I., Holmes, P., & Miles, M. (2004). *The trypanosomiases* . U.K.: CABI Publishing .
- Mottram laboratory. (2008). *Protocols for handling and working with Leishmania species (Working with Leishmania for Dummies)*. Opgehaald van University of Glasgow: http://www.gla.ac.uk/media/media_91939_en.pdf
- Olsen, O. W. (1986). *Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology*. New York: Dover Publications Inc. .
- Rogé S, B. R. (2014). Development of a latex agglutination test with recombinant variant surface glycoprotein for serodiagnosis of surra. *Veterinary Parasitology*, 205: 460-465.
- Rogé, S. (2015). Development of new serodiagnostic tests for African trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma brucei gambiense*.
- Rogé, S., Reet, N. V., Odiwuora, S., Trana, T., Schildermans, K., Vandamme, S., . . . Büscher, P. (2013). Recombinant expression of trypanosome surface glycoproteins in *Pichia pastoris* for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection. *Veterinary Parasitology*, 197: 571-579.
- Rooney, B., Piening, T., Büscher, P., Rogé, S., & Smales, C. M. (2015). Expression of *Trypanosoma brucei gambiense* Antigens in *Leishmania tarentolae*. Potential for Use in Rapid Serodiagnostic Tests (RDTs). *PLoS Negl Trop Dis* 9(12): e0004271. doi:10.1371/journal.pntd.0004271
- Sang-Ho, P., Chi-Man, K., Hyung-Eun, K., Hee-jeong, Y., Eung-Chil, C., & Bong-jin, L. (2002). Role of proline, cysteine and a disulphide bridge in the structure and. *Biochem. J.*, 171-182. doi:10.1042/BJ20020385
- Schwede, A., Macleod, O. J., MacGregor, P., & Carrington, M. (2015). How does the VSG coat of bloodstream form African Trypanosomes interact with external proteins? . *PLoS Pathog* 11(12): e1005259. doi:10.1371/journal.ppat.1005259
- Songa, E. B., & Hamers, R. (1988). A Card Agglutination Test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 233 - 240.
- Stephen, L. E. (1986). *Trypanosomiasis: a veterinary perspective* (1ste ed., Vol. 7: *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi*). Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto: Pergamon Press.

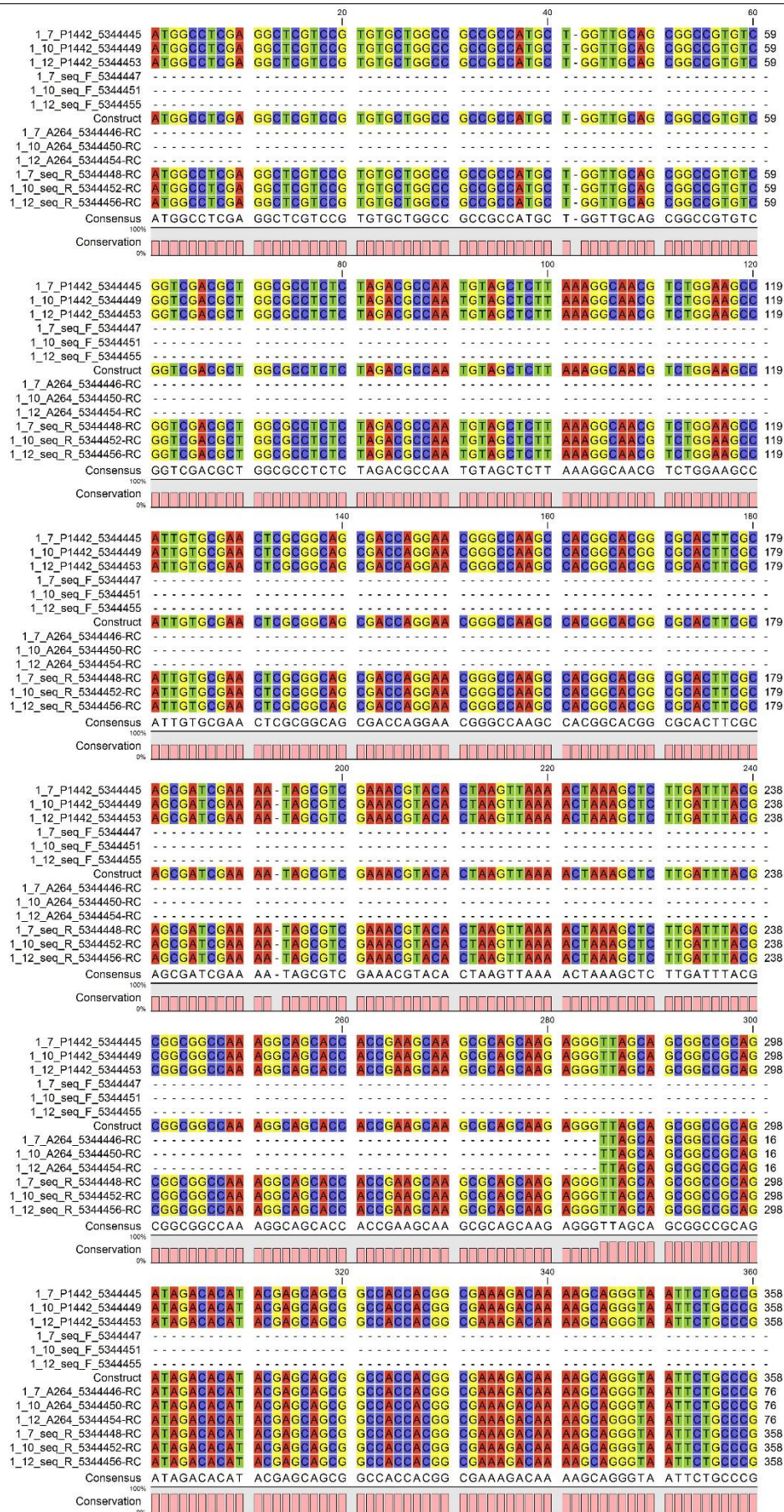
- Urakawa, T., Verloo, D., Büscher, P., & Majiwa, P. (2001). Cloning and expression in insect cells of the T. evansi RoTat1.2.
- Verloo, D., Magnus, E., & Büscher, P. (2001). General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in Trypanosoma evansi isolates from different origin. *Veterinary Parasitology*, 183-189.

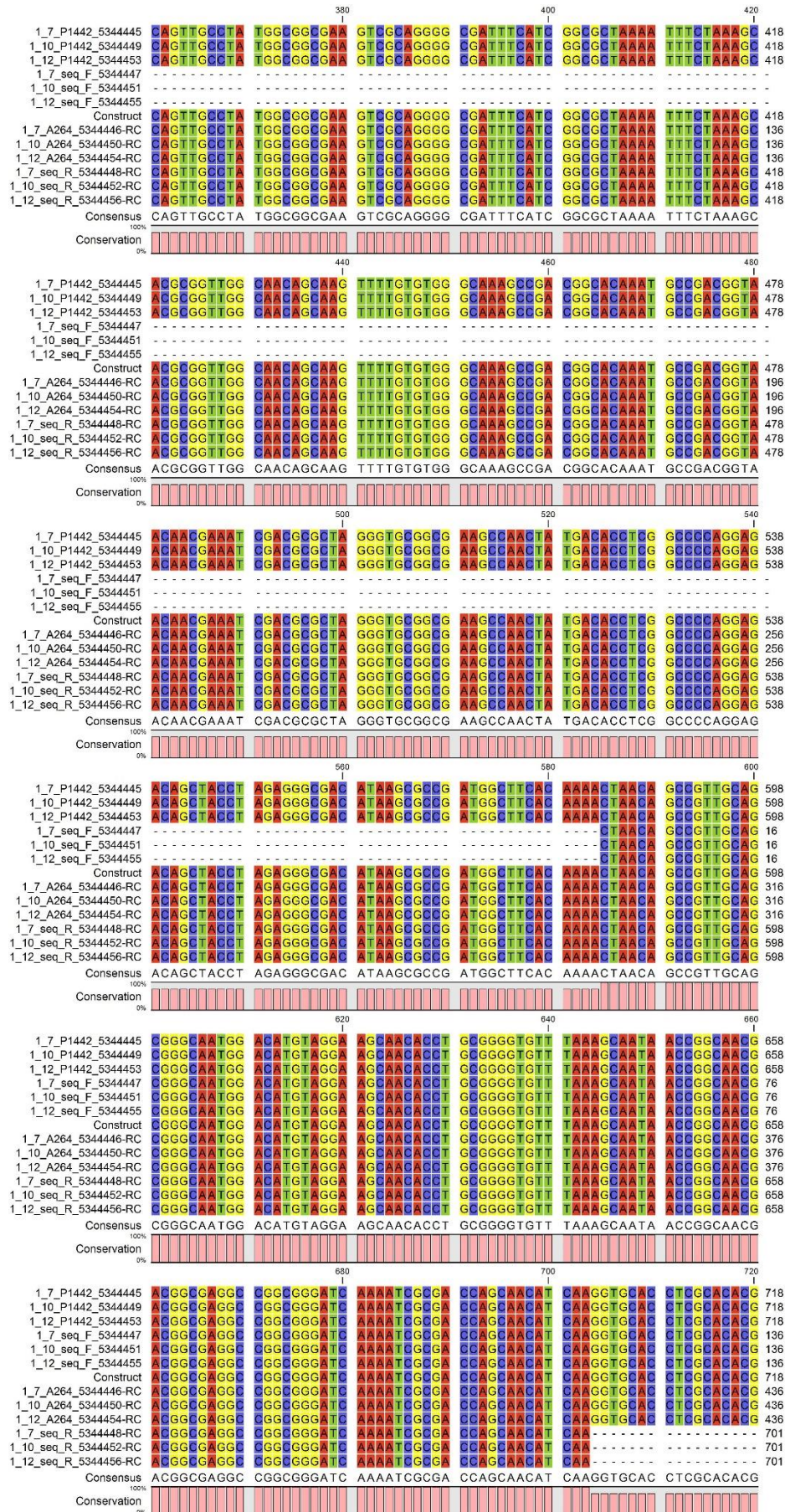
10 BIJLAGEN

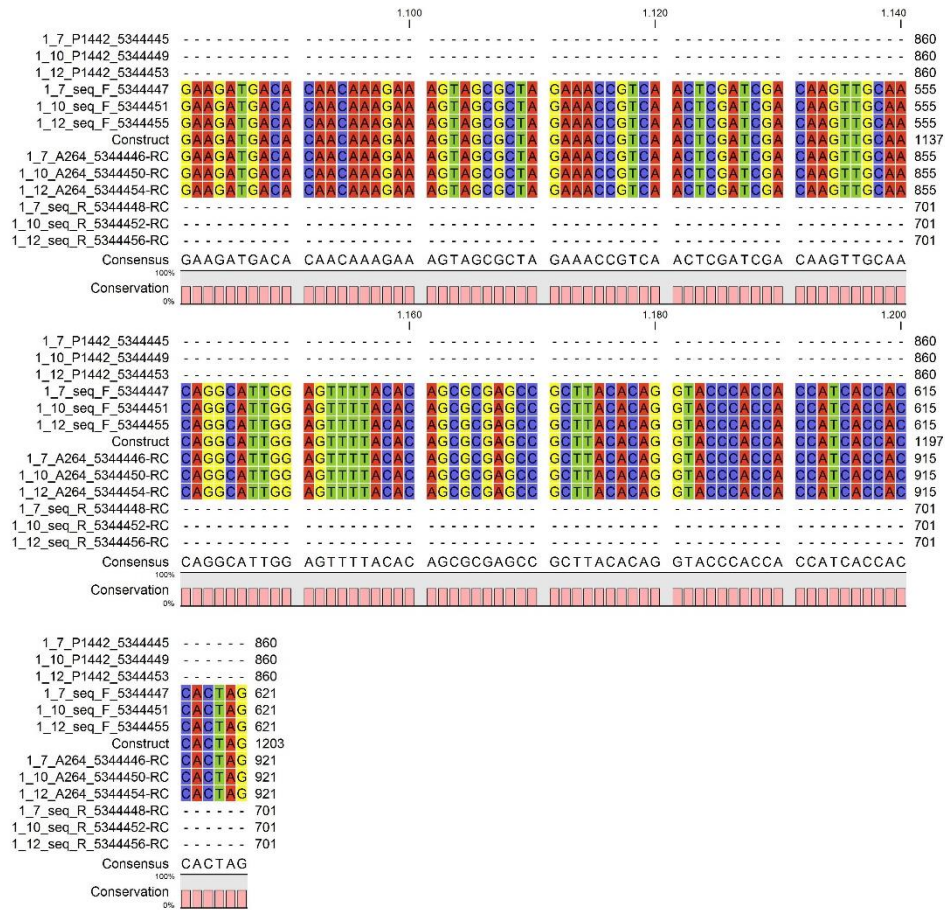
10.1 INHOUD VAN DE BUFFERS VOOR SDS-PAGE, WESTERN BLOT EN DIRECTE IMMUNOSTAINING

Oplossing	Inhoud	Firma en catalogusnummer
TBS-Blotto	TBS 1X 5% skimmed milk powder Fluka	Fluka® Analytical #70166500G
TBS 5X	0,1M Tris-HCl (pH 7,5) 2,5M NaCl 0,02% NaN ₃	
Conjugaat (muis-anti-histidine met AP)	1:2000 (conjugaat/TBS)	BioRad #MCA1396A
TTBS	TBS 1X 0,05% Tween® 20	Merck #8221840500
AP-buffer	0,1M Tris-HCl (pH 9,5) 0,1M NaCl 5mM MgCl ₂	
NTB-stock	1g in 20mL 70% dimethylformamide	
BCIP-stock	0,5g in 10mL 100% dimethylformamide	
Transfer buffer (Towbin)	100mL 10X blotbuffer 700mL water 200mL methanol	Forever Products
Blotbuffer 10X	0,25M Tris 1,92M glycine (pH 8,3)	
Coommassie Briljant Blauw	50% water 40% methanol 10% azijnzuur 0,025% CBB-G250	Forever Products VWR #20103295 BioRad #1610406
CBB-ontkleuring	85% water 10% azijnzuur 5% gedenatureerd ethanol	VWR #20103295
Krimpoplossing	2% glycerol 60% methanol 7% azijnzuur	Forever Products VWR #20103295
10% glycerol	28,75mL 87% glycerol 221,25 mL water	Merck #1040941000
Elektrodebuffer 10X	0,25M Tris base (pH 8,3) 1,92M glycine 1% SDS	
SDS 10%	10% w/v in H ₂ O	BioRad #1610302

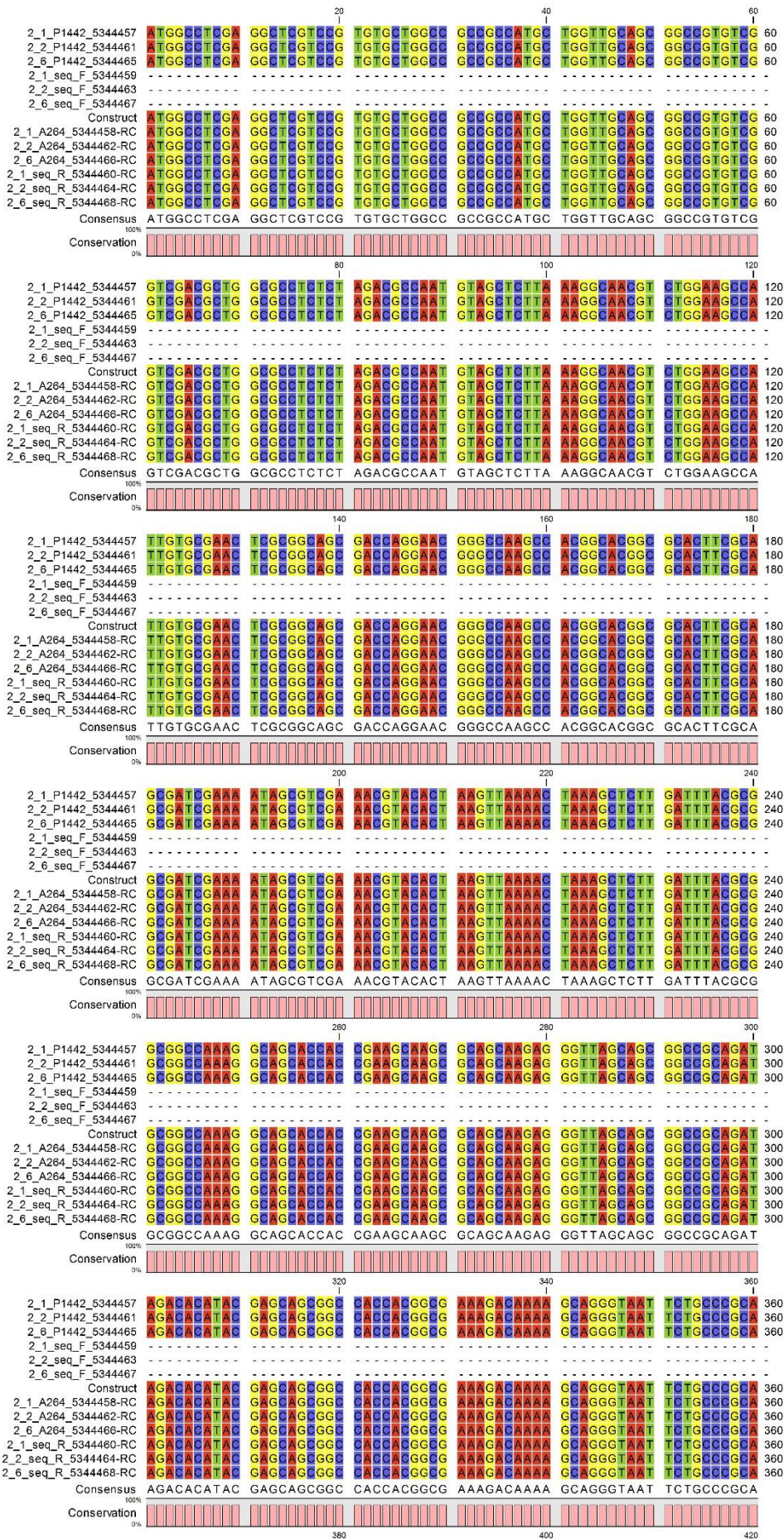
10.2 SEQUENCING

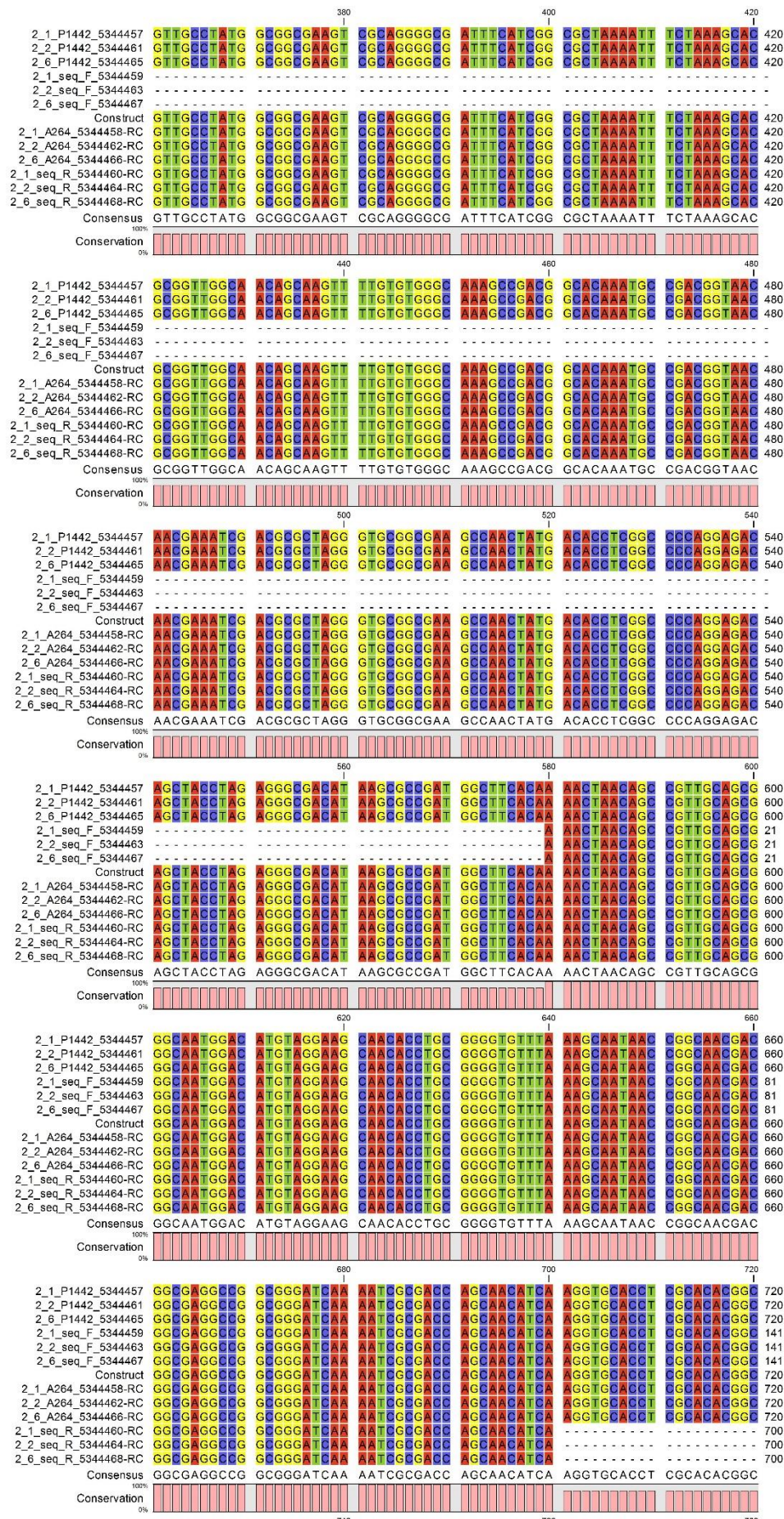


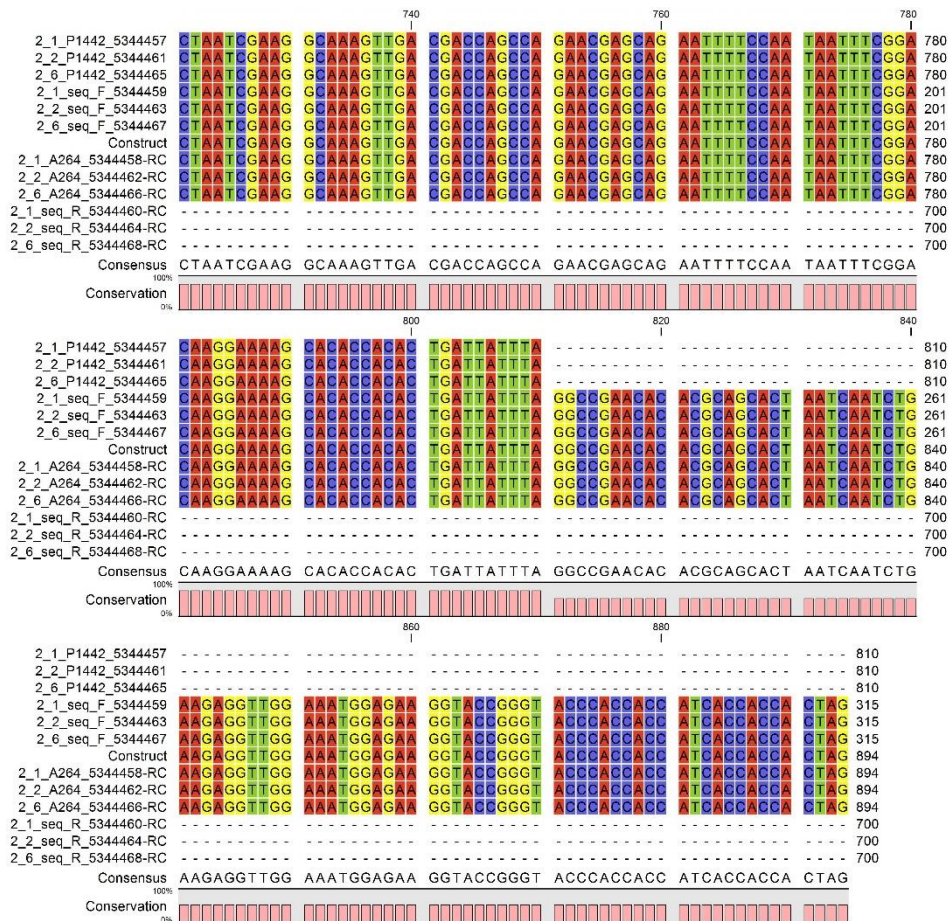




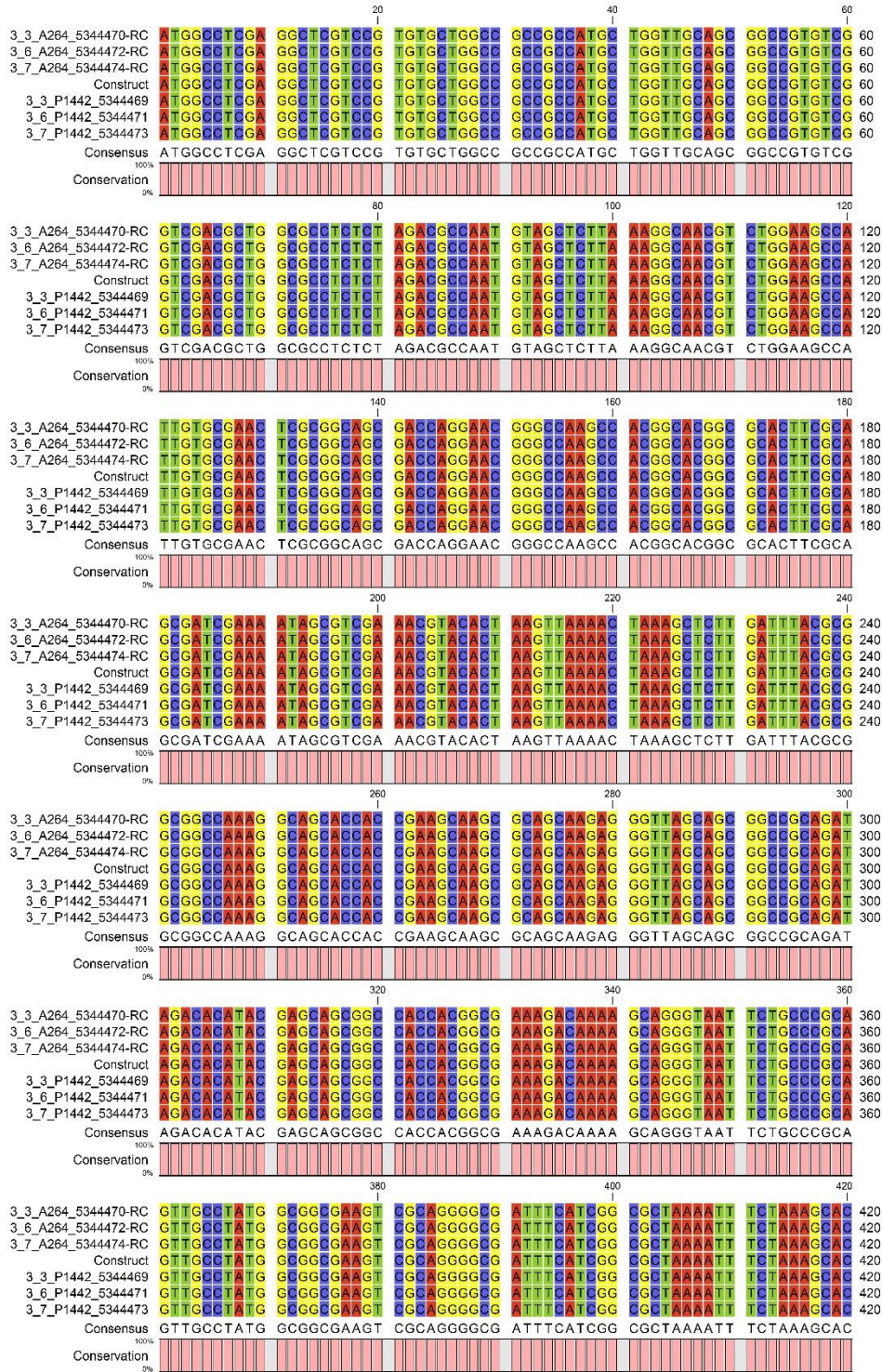
Figuur 39: Sequencing van construct 1 (AZ 22 – 385) met als primers P1442 F, Sec Ro12 F, A264 R en Sec Ro12 R. Start = ATG; stop = TAG. Er zijn geen fouten te zien.

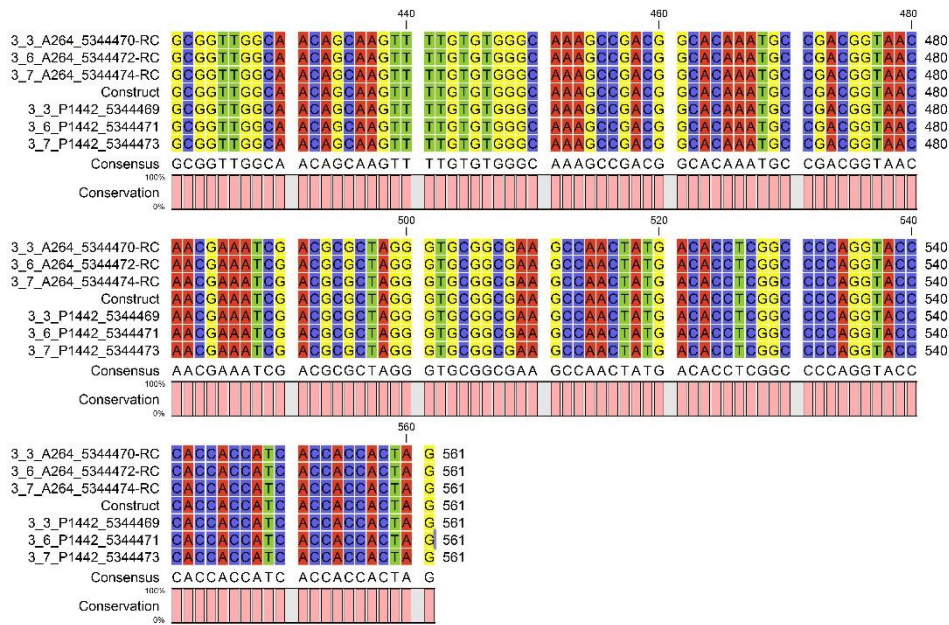




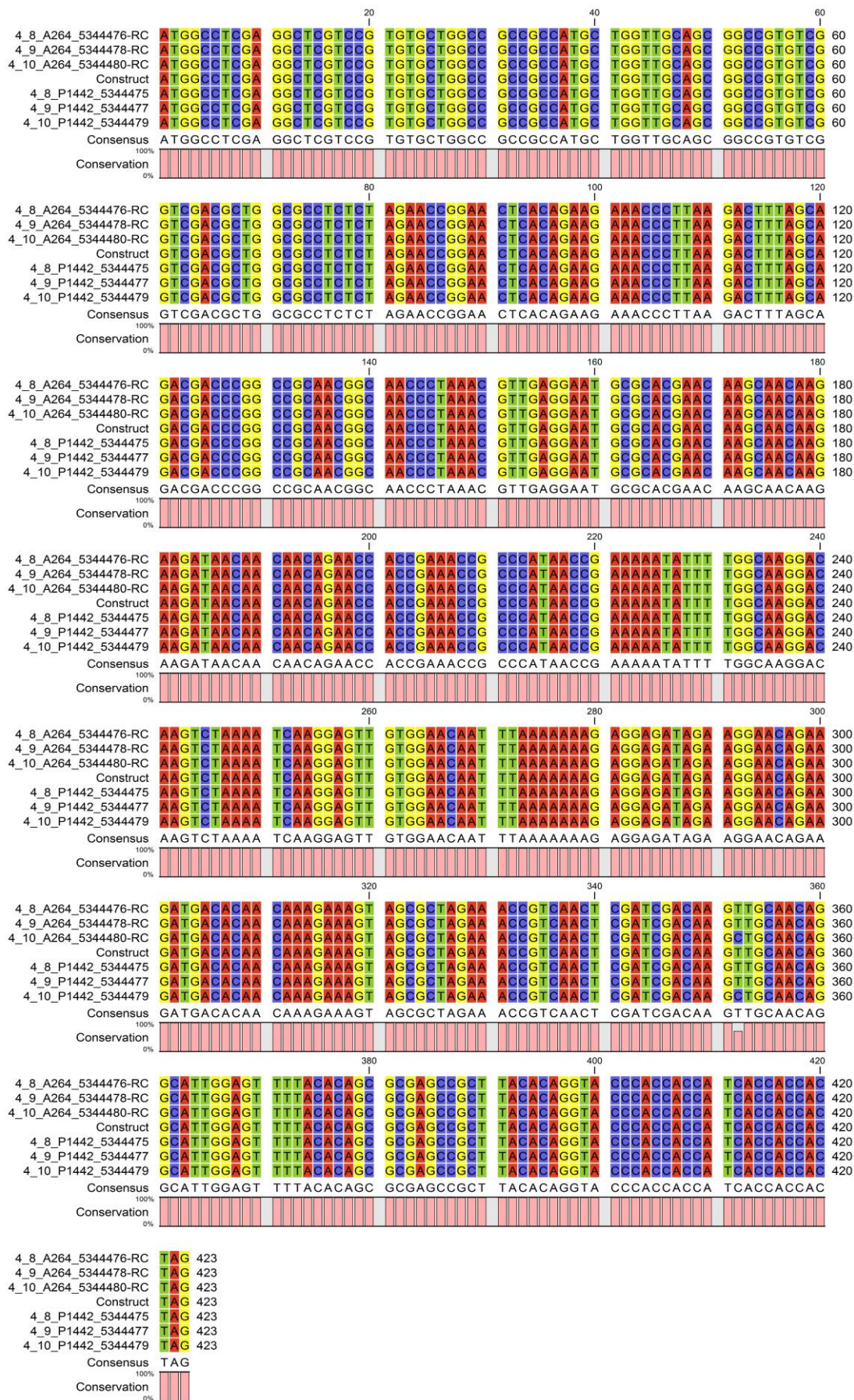


Figuur 40: Sequencing van construct 2 (AZ 22 – 282) met als primers P1442 F, Sec Ro12 F, A264 R en Sec Ro12 R. Start = ATG; stop = TAG. Er zijn geen fouten te zien.

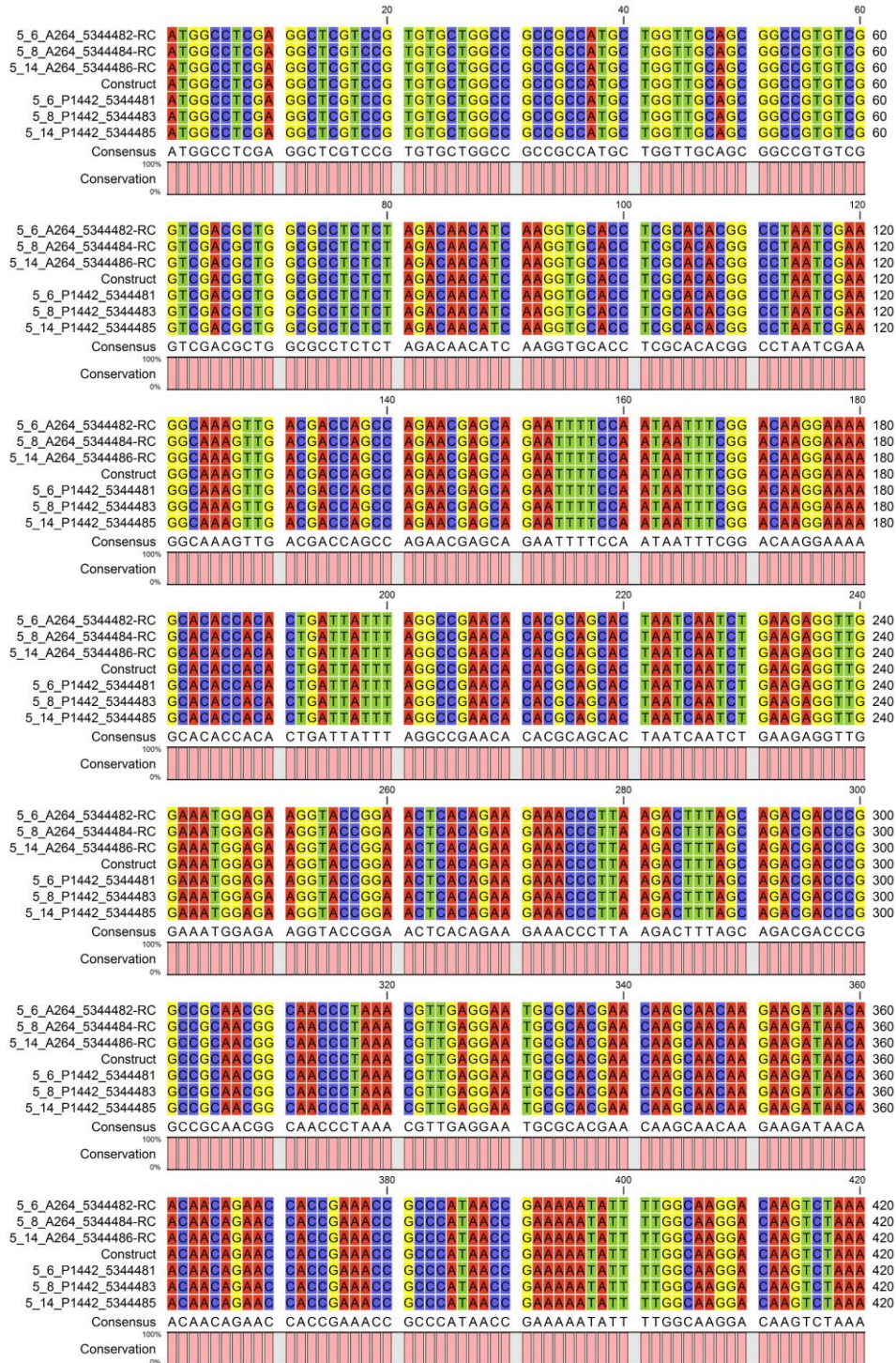


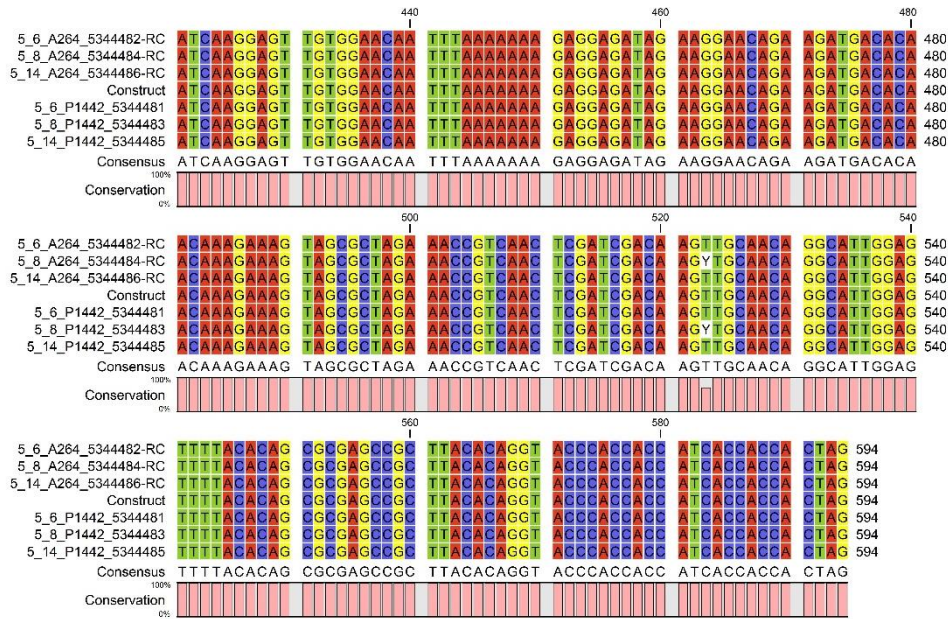


Figuur 41: Sequencing van construct 3 (AZ 22 – 171) met als primers P1442 F, Sec Ro12 F, A264 R en Sec Ro12 R. Start = ATG; stop = TAG. Er zijn geen fouten te zien.



Figuur 42: Sequencing van construct 4 (AZ 282 – 385) met als primers P1442 F en A264 R. Start = ATG; stop = TAG. Puntmutatie te zien in construct 10.





Figuur 43: Sequencing van construct 5 (AZ 225 – 385) met als primers P1442 F en A264 R. Start = ATG; stop = TAG. Puntmutatie te zien in construct 8.