



Katholieke Universiteit Leuven

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Ontwerp van chimere adhesines in *Saccharomyces cerevisiae*: zijn er grenzen aan de functionele diversiteit van gistadhesie?

Promotor: Prof. Dr. Ir. Freddy Delvaux

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen

Centrum voor Levensmiddelen- en Microbiële Technologie

Masterproef voorgedragen

tot het behalen van het diploma van

Master in de bio-ingenieurswetenschappen:

cel- en genbiotechnologie

Maarten Ghequire

Juli 2009



Katholieke Universiteit Leuven

Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Ontwerp van chimere adhesines in *Saccharomyces cerevisiae*: zijn er grenzen aan de functionele diversiteit van gistadhesie?

Promotor: Prof. Dr. Ir. Freddy Delvaux

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen

Centrum voor Levensmiddelen- en Microbiële Technologie

Masterproef voorgedragen

tot het behalen van het diploma van

Master in de bio-ingenieurswetenschappen:

cel- en genbiotechnologie

Maarten Ghequire

Juli 2009

Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina.

**Katholieke
Universiteit
Leuven**



Datum: mei 2009

Betreft:

Eindwerk: Ontwerp van chimere adhesines in *Saccharomyces cerevisiae*: zijn er grenzen aan de functionele diversiteit van gistadhesie?

Deze thesis mag enkel uitgeleend worden mits schriftelijke toestemming van Prof. F.R. Delvaux.

F.R. Delvaux

Voorwoord

Laatste jaar, thesisjaar. Al van vrij vroeg in de opleiding worden wij, bio-ingenieurs in spe, er met enige weemoed op attent gemaakt dat het eindwerk veel bloed, zweet en tranen kost. Zeker wat betreft het zweet moet ik mijn voorgangers hierin overschot van gelijk geven. Het mag echter gezegd worden dat het harde werk verre van onaangenaam was. Er kon al eens zelf georganiseerd en gepland worden, theorie maakte na vele jaren plaats voor praktijk en als student werden we voor de eerste keer in een echte, academische werksfeer geïntroduceerd. Eindelijk.

Een thesis maken is in essentie net zoals een huis bouwen. De plannen ogen mooi totdat je effectief aan de bouw begint. Al snel kom je dan tot het besluit dat je er alleen niet zal geraken. Gelukkig zijn er een heleboel helpende handen die je hierin kunnen en willen assisteren. Graag wil ik hierbij in eerste instantie mijn promotor, Prof. F. Delvaux, bedanken voor de mogelijkheid mijn thesis aan het CMBS te kunnen uitvoeren. De goede begeleiding en accommodatie in dit labo waren mij een plezier en een waar genoegen!

Daarnaast een oprechte dankjewel aan mijn begeleider, Sebastiaan Van Mulders, die mij op elk moment bijstond en met veel kennis wist te verrijken. Sebba, het was telkens weer een plezier om samen over primercombinaties te discussiëren, verklaringen voor onverwachte en soms onwaarschijnlijke wendingen te zoeken en nog veel meer.

Naast Sebastiaan was er uiteraard de rest van het CMBS, stuk voor stuk toffe mensen. Hoewel noeste arbeid in het labo helaas niet altijd het verkrijgen van mooie, katholiek eenduidige antwoorden betekende, zorgden jullie glimlach, bemoedigende woorden, labofeestjes en interessante gesprekken dikwijls voor net dat ietsje meer. Bedankt leden van bureau n°1 en n°2, alle post-docs, medewerkers – *die tien bakken champignons heb je nog te goed Geert* –, Matthieu en Niels. Een speciaal woord van dank gaat uit naar Lynn: het was echt leuk om zoveel tijd met jou tussen de GC's en de geltanks te mogen doorbrengen en over koetjes en kalfjes te kunnen leuteren! Bedankt voor de vele *trucs van de voor*.

Met dit voorwoord wil ik me verder ook verontschuldigen bij al mijn vrienden die voor een groot deel verwaarloosd werden door het vele thesiswerk. Met het einde van de opleiding in zicht, komt er uiteraard geen einde aan onze vriendschapsbanden die doorheen de vele jaren gesmeed werden en kunnen we bijgevolg snel onze schade inhalen. Ik wil hierbij in het bijzonder graag Evelien – *poepie voor de vrienden* –, Frederik – *ik sta aan de leiding met de GC-analyses* – en Eline – *hoe gaat het met de gistjes?* –, bedanken voor de steun en de leuke jaren die we samen hebben mogen beleven.

Tot slot wil ik ook nog het thuisfront bedanken om mij gedurende de vele jaren met raad en daad bij te staan. Bedankt ouders en zus, Marlies, voor de suggesties en hulp doorheen de tijd! Ik wil graag ook mijn medeleiding in de chiro bedanken voor de vele jaren die we samen mochten beleven. De activiteiten met de bengels op zondag waren soms net datgene waar ik nood aan had om even het vele studiewerk te vergeten.

Mei 2009, Maarten Ghequire

Lijst met afkortingen

∞	oneindig
A	absorptie
A	adenine
ALS	agglutinin-like sequence
AMP	adenosine monofosfaat
ATP	adenosine trifosfaat
bp	basenparen
C	cytosine
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
cAMP	cyclisch adenosine monofosfaat
cDNA	copy DNA of complementair DNA
cf.	confer
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CMBS	centrum voor mouterij en brouwerij
CSM	complete supplement mixture
C _T	threshold cycle
CTAB	cetyl trimethyl ammonium bromide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	desoxyribonucleïnezuur
dNTP	desoxyribonucleotide trifosfaat
dsDNA	dubbelstrengig DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Europese commissie
EDTA	ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EPA	epithelial adhesin
ER	endoplasmatisch reticulum
Flo	flocculine
FRE	filamentous responsive element
FW	forward primer
G	guanine
gDNA	genomisch DNA
GPI	glycosyl fosfatidyl inositol
Hda	histon deacetylase
Hsp	heat shock protein
Hxk	hexokinase
Hxt	hexosetransporter
i.e.	id est
kb	kilobasenparen
KO	knockout
LB	Luria-Bertani
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MGB	minor groove binder
min	minuut
mRNA	messenger ribonucleïnezuur
N-bron	stikstofbron
OD	optische densiteit
OH	hydroxyl
ORF	open reading frame
p	plasmide
PBS	phosphate buffered saline
PCI	phenol-chloroform-isoamylalcohol
PCR	polymerase chain reaction

PKA	proteïne kinase A
RNA	ribonucleïnezuur
PP1	proteïne fosfatase 1
RT-PCR	Real-Time polymerase chain reaction
RV	reverse primer
s	seconde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pastorianus</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
SC	synthetic complete
SGD	<i>Saccharomyces</i> genome database
Snf1	sucrose non fermenting 1
ssDNA	single-stranded DNA
T	thymine
TEF	translatie-elongatiefactor
TOR	target of rapamycine
tpm	toeren per minuut
TRIS-HCl	tris-hydroxymethyl-aminomethaan-waterstofchloride
u	uur
UAS	upstream activating sequence
UV	ultraviolet
YNB	yeast nitrogen base
YP	Yeast-pepton
YPD	Yeast-pepton-dextrose
YPGal	Yeast-pepton-galactose
wt	wildtype

Samenvatting

In de continue fermentatietechnologie van ondermeer bioethanol en bier bestaat de hoop op het gebruik van geïmmobiliseerde gisten die én processief én sterk adhesief zijn. Door intensieve selectieproeven werden micro-organismen die voldoen aan de eerste eigenschap reeds geïsoleerd. De tweede eigenschap kende het afgelopen decennium heel wat belangstelling maar spitste zich tot dusver vooral toe op de samenstelling van het medium, zoals ionensamenstelling, pH, nutriëntsamenstelling, etc., en eventuele wijzigingen hierin. Op die manier hoopte men een betere gistadhesie te bekomen, zodat de retentie van de micro-organismen in de reactor beter was en uitwassing kon vermeden worden. De relevante resultaten hiervan waren echter veelal beperkt, temeer omdat de adhesiecapaciteiten sterk stamafhankelijk en heel variabel bleken. Een verkenning van het adhesiepotentieel van het gistgenoom en onderzoek naar de mogelijkheden hiervan, bleven echter veelal achterwege.

Sequencing van het genoom van *Saccharomyces cerevisiae* S288c toonde reeds aan dat deze over vijf *FLO*-genen – te weten *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* en *FLO11* – beschikt. Deze coderen voor celwandproteïnen die een grote bijdrage leveren in cel/cel- en cel/oppervlakteadhesie. De ‘leden’ van deze genfamilie, die typisch met de termen ‘*adhesine*’ of ‘*flocculine*’ bedacht worden, zijn daarenboven telkens op een analoge, karakteristiek modulaire manier opgebouwd.

In deze studie werd getracht een beter inzicht te krijgen in de relatieve bijdrages van de verschillende adhesiedomeinen in S288c, een niet-flocculente en niet-adherente giststam. Dit gebeurde via artificiële recombinaties die een nabootsing waren van hoogfrequente, natuurlijk voorkomende recombinaties, die optreden aan een snelheid die minstens honderd maal hoger ligt dan deze van ‘gewone’ mutaties. In een eerste stap werden de *FLO*-genen selectief tot overexpressie gebracht en werden ze systematisch gedeleteerd; vervolgens werden ze ‘*versneden*’ met de vorming van chimere constructen. Achteraf konden de gewijzigde stammen onderworpen worden aan een fenotypische karakterisering. Onderzoek ging hierbij uit naar flocculatie, adhesieve en invasieve groei op agar en adhesie aan polystyreen. In een tweede luik werd de labostam S288c verlaten en adhesie onderzocht in enkele industriële bioethanolstammen en een typisch invasief groeiende giststam. Op die manier was het mogelijk meer inzicht te krijgen in adhesiefenotypes van ‘industriële-relevante’ stammen. Tot slot werd in een verkennend experiment een poging gedaan om enig inzicht te krijgen in het sterk individuele adhesine-armamentarium van verschillende giststammen. Er werd hierbij gescreend naar de aanwezigheid en conservatiegraad van de verschillende *FLO*-genen en pseudogenen zoals deze gekend zijn in S288c.

Bij dit alles bleek een ‘beperkte’ familie *FLO*-genen heel divers en variabel in functie en karakteristieken te zijn. In de relatie tussen de verschillende adhesines onderling werden verbanden gelegd tussen structuur en functie. Op die manier bestaat de hoop erin enerzijds ‘klevende’ gisten te bekomen voor biotechnologische toepassingen, maar anderzijds ook nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen die de sterk verwante adhesie van pathogene micro-organismen als *Candida* met de vorming van biofilms kunnen verhinderen. De constructie van

chimere adhesines en evaluatie van de eigenschappen ervan, lijken naast de continue fermentatietechnologie ook voor deze problematiek een noodzaak.

Abstract

The search for immobilized yeasts in the continuous fermentation technology of beer and bio-ethanol that are both fast-growing and adhesive, has been ongoing for a long time. Micro-organisms that satisfy the first characteristic have already been isolated through intensive selection processes. The second quality has received a lot of attention the past decade, but focused mainly on the composition of the medium, such as ion content, pH, temperature, nutrient composition, etc., and possible changes within. It was expected to obtain an improved stickiness of the yeast by this approach. Consequently, the retention of the micro-organisms in the reactor could be ameliorated and 'wash out' could be avoided. Nevertheless, it proved difficult to draw cohesive conclusions; this was, in part, avoided by adhesion properties which seemed to be very variable and strain dependent. Reconnaissance of the adhesion potential starting from the genome of yeast and research towards the possibilities offered by this way, have received little attention so far.

The genome of *Saccharomyces cerevisiae* S288c has been sequenced and research showed the existence of five *FLO* genes, namely *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* and *FLO11*. These genes encode cell wall proteins that contribute towards cell/cell flocculation and cell/surface adhesion. 'Members' of this family are typically named 'adhesins' or 'flocculins'. Each of them is built up by a typical modular pattern.

In this study, it was tried to get a comprehensive view on the relative contributions of the different adhesion components of S288c, a strain which has been described as being non-flocculent and non-adhesive. This was achieved by performing artificial recombinations, being an imitation of high frequently, naturally occurring recombinations, at a speed at least a hundred times higher than that of 'natural' mutations. Initially, overexpression strains in the different *FLO* genes were constructed and they were subsequently deleted, followed by 'scrambling' them with the formation of chimeric adhesins. Afterwards the different strains were subjected to a phenotypical characterization. This research mainly focused on flocculation, adhesive and invasive growth on agar and polystyrene adhesion. In a second chapter adhesion was examined in an invasive growing yeast and some industrial strains that are being used in the production of bio-ethanol. Like that, it became possible to gain insight in adhesion phenotypes of 'industrial-relevant' strains. Finally a scouting experiment was done to gain insight into the individually-determined adhesion armamentarium of each yeast. Screenings towards both the presence as the degree of the conservation of different *FLO* genes and pseudogenes as they are known in S288c, were executed.

During this research, the relatively small family of *FLO* genes proved to be extremely diverse and variable in functions and characteristics. Relations between structure and function were made for the different adhesins. Taken together, the search for 'sticky' yeasts for several biotechnological applications on the one hand side was initiated. On the other side scientists hope to develop new drugs which can inhibit strongly related adhesion phenomena as caused by biofilms of pathogenic micro-organisms such as *Candida*. In either case, the construction of chimeric adhesins and the evaluation of the related characteristics will provide valuable insights.

Inhoudstafel

1. Inleiding	1
2. Literatuurstudie	3
2.1. Types van gistadhesie	3
2.1.1. <i>Cel/celadhesie of flocculatie</i>	3
2.1.1.1. <i>Flocculatie, what's in a name?</i>	3
2.1.1.2. <i>Suikergevoelige adhesie</i>	3
2.1.1.3. <i>Suikerongevoelige adhesie</i>	4
2.1.1.4. <i>Fysiologische rol van flocculatie</i>	5
2.1.2. <i>Cel/oppervlakteadhesie</i>	7
2.1.2.1. <i>Oppervlakadhesie en biofilmvorming</i>	7
2.1.2.2. <i>Matvorming</i>	8
2.1.2.3. <i>Filamenteuze groei</i>	9
2.2. De FLO-genfamilie in <i>S. cerevisiae</i>	11
2.2.1. <i>De FLO-genen</i>	11
2.2.2. <i>De Flo-proteïnen</i>	13
2.2.2.1. <i>N-terminale domein</i>	14
2.2.2.2. <i>Het centrale domein</i>	16
2.2.2.3. <i>Het C-terminale domein</i>	17
2.2.3. <i>Medische relevantie van de adhesinefamilie: fungale adhesie en tumorigenese</i>	17
2.3. Regulatie van en variatie in expressie van FLO-genen	19
2.3.1. <i>Betrokken signaaltransductiewegen in de FLO-genregulatie</i>	19
2.3.1.1. <i>Glucose repressie pathway</i>	19
2.3.1.2. <i>Mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK pathway)</i>	20
2.3.1.3. <i>cAMP/PKA pathway</i>	21
2.3.1.4. <i>Andere cascades</i>	23
2.3.2. <i>Variatie in FLO-expressie op genetische basis</i>	24
2.3.2.1. <i>Genetische karakteristieken van de giststammen</i>	24
2.3.2.2. <i>Epigenetische karakteristieken</i>	25
2.3.3. <i>Mediumfactoren die de flocculatie en adhesie beïnvloeden</i>	26
2.3.3.1. <i>Mediumsamenstelling</i>	26
2.3.3.2. <i>Mediumcondities</i>	27
2.3.3.3. <i>Celgebonden eigenschappen</i>	28
3. Materiaal en methoden	29
3.1. Gebruikte giststammen	29

3.2. Groei en bewaring van culturen	29
3.2.1. Gebruikte groeimedia	29
3.2.2. Propagatie en celverzameling	30
3.2.3. Bewaring van giststammen	31
3.2.4. Bepalen van de optische dichtheid.....	31
3.3. Isolatie van nucleïnezuren	31
3.3.1. Isolatie van genomisch DNA uit <i>S. cerevisiae</i> volgens de fastprep-methode	31
3.3.2. Isolatie van plasmide DNA uit <i>E. coli</i> volgens de CTAB-methode – Mini preps	32
3.3.3. Isolatie van RNA	33
3.3.4. Opbrengst- en kwaliteitsbepaling	34
3.4. PCR – Polymerase chain reaction	34
3.4.1. Gebruikte primers	34
3.4.2. Plasmiden	37
3.4.2.1. pYM-N18	37
3.4.2.2. pUG-6	37
3.4.2.3. pUG-27	38
3.4.2.4. pUG-66	38
3.4.2.5. pUG-72	38
3.4.2.6. pUG-73	39
3.4.2.7. pSH47	39
3.4.2.8. pSH62	39
3.4.3. Algemene PCR	40
3.4.3.1. Samenstelling van de PCR-mix en temperatuurprofielen	40
3.4.3.2. Analyse van de bandjes via gelelektroforese	41
3.4.4. Real-Time PCR	43
3.4.4.1. Toelichting techniek en kwantificatie	43
3.4.4.2. Reverse transcriptie van RNA naar cDNA.....	44
3.4.4.3. Real-Time PCR-reactie	45
3.5. Sequencing.....	45
3.6. Transformatie	46
3.6.1. Transformatie van <i>S. cerevisiae</i> , gebaseerd op de methode van Gietz & Schiestl (1995)	46
3.6.2. Transformatie van <i>E. coli</i>	47
3.6.2.1. Bereiding van competente cellen	47
3.6.2.2. Transformatie van de competente cellen.....	47
3.7. Opvolgen van cel/celadhesie en cel/oppervlakteadhesie in <i>S. cerevisiae</i>	47
3.7.1. Evaluatie van cel/celadhesie	47
3.7.2. Cel/oppervlakteadhesie	48
3.7.2.1. Evaluatie van agaradhesie en invasieve groei	48

3.7.2.2. <i>Evaluatie van adhesie aan polystyreenoppervlakken</i>	48
4. Resultaten en discussie	50
4.1. Aanmaak van selectief tot overexpressie gebrachte adhesines	50
4.1.1. <i>Algemene strategie voor de aanmaak van overexpressiestammen</i>	50
4.1.2. <i>Constructie van de overexpressiecassettes en –stammen</i>	51
4.1.3. <i>Validatie van de overexpressiestammen</i>	52
4.1.3.1. <i>Verificatie op nucleïnezuurniveau</i>	52
4.1.3.2. <i>Validatie via gewijzigde fenotypes</i>	53
4.2. Aanmaak van deletiemutanten	55
4.2.1. <i>Algemene strategie voor de aanmaak van deletiemutanten</i>	55
4.2.2. <i>Constructie van de deletiecassettes en -stammen</i>	56
4.2.3. <i>Validatie van de deletiemutanten</i>	57
4.3. Aanmaak van stammen met chimere FLO-genen	60
4.3.1. <i>Algemene strategie voor de aanmaak van stammen die chimere adhesines tot expressie brengen</i>	60
4.3.2. <i>Constructie van de cassettes en aanmaak van de stammen</i>	62
4.3.3. <i>Validatie van de stammen met chimere adhesines</i>	62
4.3.3.1. <i>Verificatie op nucleïnezuurniveau</i>	62
4.3.3.2. <i>Validatie via gewijzigde fenotypes</i>	65
4.4. FLO-stammen in de Σ1278b-achtergrond	69
4.5. Industriële giststammen	71
4.5.1. <i>Constructie van de overexpressiestammen in CMBS VM13 en CMBS VM14</i>	71
4.5.2. <i>Fenotypische en verdere genetische evaluatie van de overexpressiestammen</i>	75
4.6. Analyse van variatie binnen de FLO-genfamilie	77
5. Besluit en toekomstperspectieven	80
Literatuurlijst	84

1. Inleiding

In tijden van dure en steeds duurder wordende fossiele brandstoffen lijkt het tijdperk van groene energie definitief aangebroken, temeer omdat nagenoeg alle olievoorraden ter wereld ontdekt zijn en er steeds dieper moet geboord worden om de vereiste hoeveelheden boven te pompen. Al te sterke afhankelijkheid van politiek- en religieus-instabiele olielanden uit het Midden-Oosten bewees in het verleden in staat te zijn grote industrieën volledig vleugellam te maken. Westerse smeebeden naar goedkopere ruwe olie werden hierbij steevast afgeslagen. Naast dit significante politiek-economisch facet, is natuurlijk ook de ecologische aandacht voor hernieuwbare energie niet uit de media te slaan. Volgens het klimaatplan van de Europese Commissie (Directive 2003/30/EC) moet 10 procent van de brandstof van de transportsector tegen 2020 uit hernieuwbare energie voortkomen. België moet daarnaast 13 procent van zijn totale energie uit 'groene' bronnen halen. Momenteel bedraagt het Belgische aandeel amper 2,5 procent (2,2 procent in 2005) (ODE, 2006; Schnepf, 2006)... Naast het aanleggen van windmolenparken, bouw van grote zonnepanelen, etc. lijkt een sleutelrol weggelegd voor vloeibare biobrandstoffen. De productie en het gebruik ervan zijn niet alleen verplicht vanuit Europa, maar ook wenselijk en noodzakelijk, wil de (westerse) mens zijn maatschappelijke wensen en verlangens, economische dominantie en technologische kennis naar de toekomst toe op peil houden en verder ontwikkelen.

Biobrandstoffen vormen zoals gezegd een belangrijk onderdeel van deze groene energie. Ze worden per definitie gevormd uit biomassa en verschillende vormen bestaan dan ook: biodiesels uit koolzaad-, soja-, jatropa- en andere oliën, biogassen als methaan en waterstofgas, bio-alcoholen als methanol en ethanol, etc. Met name bioethanol, als brandstof gewonnen uit industriële fermentaties, beslaat vandaag de dag reeds grote volumes (bioethanolproductie in USA en Brazilië: 50 miljard liter/jaar). *Saccharomyces cerevisiae* is hierbij hét organisme om een suikeroplossing om te zetten naar ethanol, en dit dan nog met een grote opbrengst en met een beperkte vorming van biomassa. Een goede sturing en selectie naar hoog-productieve stammen zijn hierbij natuurlijk noodzakelijk, wil men een 'top-fermenteerder' hebben en dus een economisch rendabele productie bekomen. Tijd is echter een grote vijand in dergelijke batchprocessen. Achteraf moet het gefermenteerde medium namelijk verwijderd en gefilterd, de reactor gereinigd worden. Vandaar dat continue fermentoren een veelbelovende vernieuwing zijn. Om uitwassing van de gisten te vermijden is het uiteraard gewenst de gisten goed te laten adheren aan dragers of aan de reactorwand(en). Op die manier wordt het mogelijk ethanol te produceren vertrekkende van een continue instroom van suikerrijk medium en dit met een hoge volumetrische productie-efficiëntie. Daarenboven laat dit proces een betere sturing dan het klassieke batchproces toe.

S. cerevisiae beschikt over een unieke familie van celwandproteïnen, adhesines of flocculines genaamd. Deze proteïnen worden door vijf genen gecodeerd, namelijk *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* en *FLO11* en staan in voor cel/celadhesie of flocculatie en cel/oppervlakteadhesie. Vanuit biotechnologisch en ingenieurs-technisch standpunt vormt deze laatste eigenschap een belangrijk punt van interesse, met name voor de continue fermentortechnologie zoals hierboven reeds aangehaald. Door in te grijpen op genetisch niveau kunnen op die

manier heel processieve gisten ook uitgerust worden met superieure adhesie-eigenschappen, teneinde een efficiënt productiesysteem te bekomen dat – quasi – ongevoelig is voor uitwassing.

In de bierbrouwerij wordt er vooral aandacht besteed aan cel/celadhesie-karakteristieken van de gisten. Deze laten de brouwer namelijk toe op een gemakkelijke, voorspelbare en goedkope manier zijn gist te oogsten en te scheiden van het bier. Een biergist die net op het juiste moment van het fermentatieproces flocculeert, is gewenst: te vroege flocculatie leidt tot ‘hangende’ fermentaties waarbij nog niet alle suikers van het wort tot ethanol en CO₂ omgezet zijn. Te late, gebrekkige of onvolledige flocculatie op het einde van de fermentatie brengt filtratieproblemen met zich mee en geeft aanleiding tot ongewenste nevensmaken (off-flavours).

Naast de diverse industriële toepassingen van gistadhesie winnen adhesines ook in de medische sector aan belang. Pathogene fungi als *Candida albicans* en *Candida glabrata*, nemen een aanzienlijke portie van de ziekenhuisinfecties (15%) voor hun rekening. Deze ontstaan vaak ten gevolge van niet-steriel medisch materiaal. Oorzaak ervan is de vorming van fungale biofilms, waarin adhesie een eerste, cruciale stap vormt. Deze vaststelling betekent desalniettemin de identificatie van een nieuwe target voor antifungale agentia. Helaas vertonen de gistcellen in de matrix van dergelijke biofilms een sterk verhoogde weerstand tegen diverse agentia, waardoor dergelijke infecties vaak een dodelijke afloop kennen. Recent werd echter aangetoond dat de *ALS*-genenfamilie in *C. albicans* en de *EPA*-genen in *C. glabrata* sterke homologie vertonen met de *FLO*-genfamilie van *S. cerevisiae*. Om die reden wordt deze laatste dan ook steeds vaker als modelorganisme gebruikt om onderzoek te verrichten naar fungale biofilms. Aangezien dit organisme – in tegenstelling tot *Candida spp.* – doorgaans ongevaarlijk is (hoewel sommige bronnen dit tegenspreken) en reeds goed beschreven werd, tracht men meer inzicht te krijgen in de mechanismen van gistadhesie. Op die manier hoopt men dan ook in de toekomst nieuwe antifungale geneesmiddelen te identificeren en te ontwikkelen.

Het doel van deze thesis was een gefundeerd inzicht te krijgen in de individuele componenten van de verschillende adhesines door de aanmaak van chimere constructen die in *Saccharomyces cerevisiae* tot expressie werden gebracht. Aanvullend werd onderzoek verricht naar een aantal industriële stammen. De opgebouwde kennis zal een betere beheersing van gistadhesie toelaten en opent de deur voor de constructie van artificiële proteïnen in *S. cerevisiae* met superieure cel/cel- en cel/oppervlakte-adhesiekarakteristieken voor diverse biotechnologische toepassingen.

2. Literatuurstudie

2.1. Types van gistadhesie

2.1.1. Cel/celadhesie of flocculatie

2.1.1.1. Flocculatie, what's in a name?

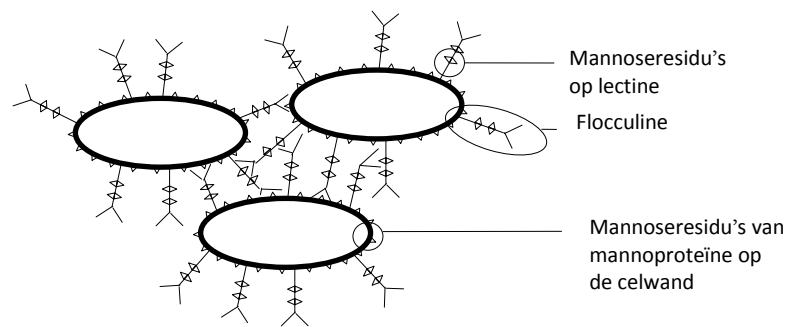
Flocculatie van gist wordt doorgaans gedefinieerd als een asexuele, calciumafhankelijke en reversibele aggregatie van cellen tot macroscopische vlokken. Bij dit fenomeen gaat men er klassiek van uit dat er componenten van het celoppervlak betrokken zijn (Bony *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1998; Soares & Vroman, 2003; Verstrepen & Klis, 2006). In vloeibaar medium resulteert deze aggregatie in sedimentatie of flotatie (Stratford, 1993; Soares & Duarte, 2002).

Naar het mechanisme van flocculatie wordt onderscheid gemaakt tussen twee grote groepen. Enerzijds is er de lectineachtige adhesie, die gevoelig is voor inhibitie door suikers; anderzijds is er de suikergevoelige adhesie. Meerdere uiteenlopende werkingsmechanismen zijn bij deze laatste categorie mogelijk (Verstrepen & Klis, 2006).

2.1.1.2. Suikergevoelige adhesie

In de suikergevoelige adhesie zijn lectines – ook wel flocculines genoemd – noodzakelijk. Dit zijn proteïnen in de celwand die specifiek suikers binden. Ze hebben typisch calciumionen nodig om in een actieve conformatie behouden te blijven (Miki *et al.*, 1982; Bony *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1998).

De adhesie zelf wordt veroorzaakt doordat lectines op de celwand van flocculente cellen selectief binden met mannanketens op proteïnen van naburige cellen, onafhankelijk van de aanwezigheid van lectines op die cellen (zie figuur 2.1) (Verstrepen *et al.*, 2003; Lesage & Bussey, 2006). Recent werd echter aangetoond dat cellen die beiden lectines op hun celwand hebben, preferentieel met elkaar zouden flocculeren, onafhankelijk van de genetische achtergrond van de gisten. Waarschijnlijk spelen mannosesuikers, gebonden aan deze flocculines, hierin een rol (Douglas *et al.*, 2007; Smukalla *et al.*, 2008). Flocculatie treedt echter niet op wanneer de suikerconcentratie in het medium voldoende hoog is; dan is de vrije concentratie in oplossing namelijk voldoende om de suikerbindende sites van de lectines te bezetten, waardoor de kans op interactie tussen flocculine en mannoseketens van een andere cel sterk gereduceerd wordt. Daalt de suikerconcentratie van het medium onder een bepaald niveau, komen deze sites wel vrij en kunnen residu's van naburige cellen gebonden worden (Miki *et al.*, 1982; Kobayashi *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2005). Aangezien de aanwezigheid van mannanketens normaalgesproken constitutief is, is coflocculatie tussen flocculente en niet-flocculente gisten (geen flocculines uitgedrukt) en zelfs tussen flocculente gisten en bacteriën via lectineachtige verbindingen mogelijk (Verstrepen *et al.*, 2003).



Figuur 2.1: Het lectinemodel voor flocculatie. Lectineachtige proteïnen op de celwand van flocculente cellen interageren met mannoseresidu's van mannoproteïnen op de celwand en met lectines van naburige cellen.

Binnen het suikergevoelige model van de giststammen onderscheidt men op basis suikerinhibitie twee belangrijke subcategorieën. Enerzijds is er het Flo1-fenotype waarbij de lectines mannosegevoelig zijn. Anderzijds is er het NewFlo-fenotype dat niet alleen afhankelijk is van mannose, maar ook van andere eenvoudige koolhydraten zoals glucose, sucrose en mannose (Claro *et al.*, 2007). Industriële brouwersgisten behoren typisch tot dit NewFlo-fenotype, terwijl laboratoriumstammen onder het Flo1-fenotype te brengen zijn (Bayly *et al.*, 2005; Claro *et al.*, 2007).

Recent toonden Beauvais en medewerkers (2008) daarenboven aan dat *S. cerevisiae* bij flocculatie een extracellulaire matrix kan vormen, een verschijnsel dat tot dusver nooit kon waargenomen worden. Deze structuur, opgebouwd uit glucose- en mannosepolysacchariden, rondom de cellen, lijkt voornamelijk de toegang van grote moleculen in de vlokken te inhiberen, maar zou niet rechtstreeks een bijdrage leveren tot resistentie tegen alcohol of antifungale agentia. Deze vaststelling vormt echter de basis voor een nieuw modelstelsel.

2.1.1.3. Suikergevoelige adhesie

Naast de reeds goed gekarakteriseerde Flo1- en NewFlo-fenotypes werden in *S. cerevisiae* ook een aantal flocculatiemechanismen beschreven die niet afhankelijk zijn van aanwezige suikers in het medium en dus het lectinemodel niet volgen. Hierbij zijn *adhesines*, lectineachtige proteïnen, die specifiek instaan voor een verhoogde celwandhydrofobiciteit betrokken (Verstrepen *et al.*, 2003; Verstrepen & Klis, 2006). Deze binden eerder peptides dan suikers of verhogen de hydrofobiciteit van het oppervlak, waardoor meer hydrofobe interacties tussen cellen enerzijds of tussen cellen en bepaalde abiotische oppervlakken anderzijds, mogelijk zijn (Guo *et al.*, 2000; Braus *et al.*, 2003; Verstrepen & Klis, 2006). Aangezien een verhoogde celwandhydrofobiciteit positief gecorreleerd was met flocculatie, besloten Jin en medewerkers (2001) dat flocculatie het resultaat is van hydrofobe interacties tussen verschillende gistcellen.

Bijkomend werd door Strauss en medewerkers (2005, 2006) een rol voor 3-hydroxy-oxylipines in flocculatie vastgesteld. Dit zijn geoxygeneerde vetzuurafgeleiden die bij heel wat eukaryoten als fungi, helminten, planten en dieren voorkomen. Deze groep omvat onder andere de eicosanoiden (Noverr *et al.*, 2003). Strauss en medewerkers (2003, 2005, 2006) toonden aan dat dergelijke verbindingen afgezet worden op het celoppervlak

tijdens de start van de flocculatie, waardoor ze de hydrofobiciteit van de celwand gevoelig kunnen opdrijven. Mogelijk spelen hierin nog andere effecten en celfuncties, maar zijn deze nog niet gekend. Toevoeging van acetylsalicylzuur kan de synthese van 3-OH-oxylipines inhiberen, waardoor flocculatie geïnhibeerd wordt (Strauss *et al.*, 2005).

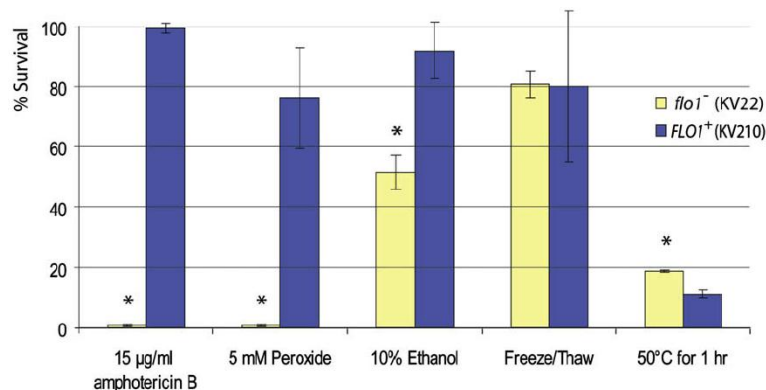
De best gekende suikerongevoelige fenotypes die in het verleden gekarakteriseerd werden, zijn het Mannose-Insensitive fenotype en het ethanolafhankelijke fenotype (Dengis & Rouxhet, 1997; Soares & Seynaeve, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004; Claro *et al.*, 2007). In dit laatste geval werkt ethanol vermoedelijk in op de celwandconformatie en vermindert het de elektrostatische cel/celrepulsies, waardoor de cellen gemakkelijker tot elkaar aangetrokken worden. Ethanol zou eveneens de celwandhydrofobiciteit licht verhogen (cf. infra) (Jin & Speers, 2000; Jin *et al.*, 2001; Claro *et al.*, 2007).

2.1.1.4. Fysiologische rol van flocculatie

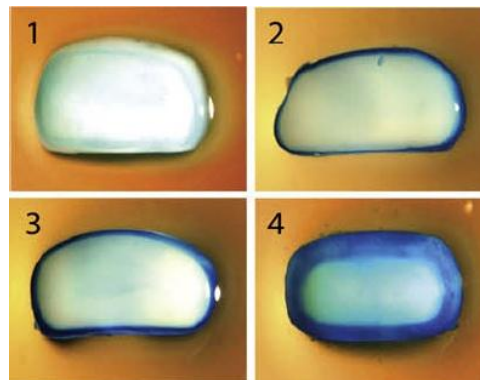
Recent toonden Smukalla en medewerkers (2008) aan dat *FLO1*, een gen dat codeert voor een adhesine en van essentieel belang is in cel/celadhesie (cf. infra), tot de zogenaamde *Green beard genes* behoort. Dit zijn genen die kopieën (of varianten) van zichzelf herkennen, onafhankelijk van de genetische achtergrond van het 'kopij-dragende-organisme'. Dergelijk coöperatief gedrag lijkt echter in eerste instantie tegen de regels van de evolutie in te gaan, aangezien het te verwachten valt dat individuen hun persoonlijke vermenigvuldiging wensen te maximaliseren. Kostbare eigenschappen (vanuit energetisch standpunt) – met een selectief voordeel – voor algemeen goed, worden verondersteld misbruikt te worden door *valsspelers* die zichzelf van deze kost ontzien en lijken bijgevolg gedoemd te verdwijnen. De valsspelers zullen namelijk misbruik maken van het aangeboden voordeel. De rest wordt bijgevolg beboet voor hun inspanning en zal logischerwijs weggeconcurrereerd worden. Dergelijk coöperatief gedrag lijkt daarom enkel in stand te kunnen gehouden worden als de valsspelers buitengesloten worden. Enkel individuen die de betreffende allelen (of de kostbare eigenschappen) delen, worden bevoordeeld in het gedrag en komen in aanmerking voor het selectieve voordeel dat de 'inspanning' betekent (Brown & Buckling, 2008; Smukalla *et al.*, 2008).

In hun onderzoek stelden Smukalla en medewerkers (2008) vast dat wanneer *FLO1*⁺-cellen met *flo1*⁻-gisten (S288c) gemengd worden, *FLO1*⁺-cellen preferentieel adheren aan elkaar met de vorming van vlokken. Hierin worden uiterst weinig cellen die *FLO1* niet tot expressie brengen, aangetroffen. Cellen met een andere genetische achtergrond, maar die ook *FLO1* tot expressie brengen worden eveneens opgenomen in de gevormde vlokken. De expressie van *FLO1* betekent voor de gistcellen in kwestie een last, aangezien de groei tot vier maal trager werd bevonden dat deze van planktonisch groeiende cellen. Dit is ook niet zo raar aangezien cellen die intern in de vlokken voorkomen minder nutriënten tot zich kunnen nemen. Flocculatie levert anderzijds het selectieve voordeel op dat in ongunstige omstandigheden zoals blootstelling van de gistcellen aan amphotericine B of aan hoge concentraties ethanol, de binnenste cellen minder schade ondervinden tengevolge van fysische afscherming en niet-directe blootstelling (zie figuur 2.2). Op die manier sterft hoogstens de buitenste laag cellen van de vlok af (zie figuur 2.3), ten voordele van de interne cellen die zich later weer kunnen ontwikkelen. Cellen die niet in de vlok aanwezig waren, ondervinden de schadelijke effecten veel effectiever en worden weggeconcurrereerd. Cellen in het centrum van de vlok vertonen

daarenboven een gewijzigde fysiologie en ontwikkelen tot cellen met een verhoogde stressresistentie (Smukalla *et al.*, 2008).



Figuur2.2: Procentuele celoverleving van twee stammen (*S. cerevisiae*, S288c) na blootstelling aan verschillende stressen. Een asterisk betekent het bestaan van significante verschillen tussen flocculente en niet-flocculente culturen ($\alpha = 0,05$). Elk van de kolommen werd geschat op basis van een gemiddelde en een standaardafwijking (Smukalla *et al.*, 2008).



Figuur2.3: Secties van gistvlokken na behandeling met verschillende agentia. Kleuring met methyleenblauw voor levensvatbaarheid. Dode cellen (buitenkant secties) worden gekleurd, terwijl levende wit blijven (binnenste van de vlok). 1: controle, 2: behandeling met 100 µg/ml amphotericine B gedurende 45 minuten, 3: 70% ethanol gedurende 1 minuut, 4: 70% ethanol gedurende 45 minuten (Smukalla *et al.*, 2008).

Op die manier blijven enkel cellen die het *FLO1*-allel dragen in de populatie en is het altruïstisch gedrag van coöperativiteit de kost toch wel waard. Bijgevolg lijkt een dergelijk coöperatief gedrag toch eerder vanuit egoïstisch standpunt voort te vloeien: individuen streven naar een verhoging van de frequentie van celegen of -verwante allelen (Smukalla *et al.*, 2008).

Aansluitend hierbij toonden Douglas en medewerkers (2007) aan dat Flo11p (eveneens een adhesine, cf. infra) vooral mannoses van andere Flo11p's herkent, dan wel mannoses van de proteïnes in de celwand, wat het vermoeden van een homotypisch adhesiemechanisme versterkt. Mogelijk zouden de repetitieve, centrale domeinen van de adhesines een rol spelen in de herkenning (adhesines bestaan typisch uit een globulaire kop, centrale repetitieve domeinen en een staart, cf. infra) (Douglas *et al.*, 2007). Smukalla en medewerkers (2008) verklaren het preferentieel binden van *FLO1*-uitdrukken stammen dan weer vanuit een mechanisch standpunt: cellen die *FLO1* uitdrukken kunnen beide elkaar binden, terwijl cellen die enkel fungeren als

receptor van *FLO1*, slechts éénwags-interacties vertonen, die minder sterk zijn. De waarschijnlijkheid om in de vlokken opgenomen te worden, is dan ook een stuk kleiner (Smukalla *et al.*, 2008).

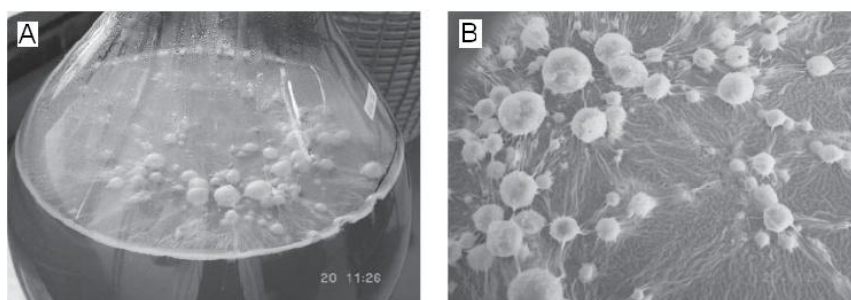
2.1.2. Cel/oppervlakteadhesie

Naast cel/cel-interacties beschikken gistcellen ook over de mogelijkheid om aan oppervlakken adheren. Verschillende adhesiefenotypes bestaan en worden onderscheiden, namelijk oppervlakadhesie an sich, vorming van matten, pseudohyfae differentiatie en invasieve groei (Reynolds & Fink, 2001; Blankenship & Mitchell, 2006; Verstrepen & Klis, 2006; Van Mulders *et al.*, 2009).

2.1.2.1. Oppervlakadhesie en biofilmvorming

Net als bacteriën kunnen gisten op abiotische oppervlakken voorkomen en groeien, al dan niet met de vorming van een biofilm. Adhesie is vanuit microbiel standpunt vooral interessant wanneer het micro-organisme zich in gunstige of rijke milieus bevindt. Het vermijdt namelijk dat cellen uit- of weggewassen worden. De relevantie van dergelijke films is zowel industrieel als medisch heel groot (cf. infra) (Garcia-Sanchez *et al.*, 2004; Blankenship & Mitchell, 2006; Verstrepen & Klis, 2006; Beauvais *et al.*, 2009).

Uit onderzoek bleek dat *S. cerevisiae* aan heel diverse oppervlakken kan adheren, zowel hydrofobe (vb. polystyreen, maar ook polypropyleen en in beperkte mate aan polyvinylchloride (PVC)), als hydrofiele oppervlakken zoals glas en polystyreen met zowel hydrofobe als hydrofiele domeinen (Reynolds & Fink, 2001; Purevdorj-Gage *et al.*, 2007; Van Mulders *et al.*, 2009). Waarschijnlijk speelt de elektrondonorcapaciteit van de celwand van de gist in dit laatste geval een rol door vorming van waterstofbruggen met hydrofiele domeinen van het abiotische oppervlak. Mortensen (2007a, 2007b) en onderzoekers toonden aan dat bij Flo11p (een adhesine, cf. infra) met name tryptofaan en proline belangrijke aminozuren (van de adhesines) zijn die bijdragen tot goede hydrofobe interacties met dito domeinen van oppervlakken (Reynolds & Fink, 2001; Mortensen *et al.*, 2007a; Mortensen *et al.*, 2007b).



Figuur 2.4: A: biofilmvorming (lucht-vloeistofinterfase) met bedekking van CO₂-bellen door sporen van Sardijnse florgist (*S. cerevisiae*) in druivensap. B: inoculum van biofilm uit A (vergroting) (Zara *et al.*, 2005).

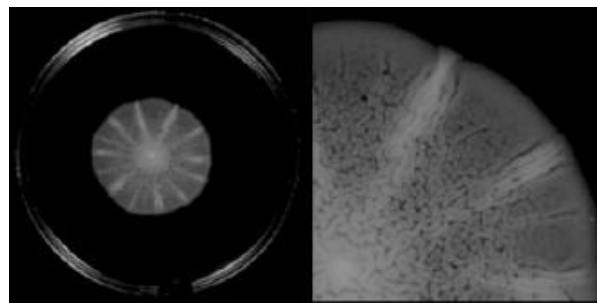
De vorming van een biofilm is een heel complex proces waarbij verschillende stappen als cel/oppervlak- en cel/celinteracties, hyfae differentiatie en de vorming van een extracellulaire matrix betrokken zijn (zie figuur 2.4) (Blankenship & Mitchell, 2006; Purevdorj-Gage *et al.*, 2007; Beauvais *et al.*, 2009). Garcia-Sanchez en onderzoekers (2004) toonden aan dat bij biofilmvorming van *C. albicans* typisch genen van het zwavelmetabolisme, naast vele andere genen voor aminozuurbiosynthese, opgereguleerd zijn. Stammen die

ergens in dit metabolisme mutant zijn, ontwikkelen typisch biofilms met een veel kleinere biomassa (Braus *et al.*, 2003; Garcia-Sanchez *et al.*, 2004).

2.1.2.2. Matvorming

De vorming van matten ontstaat bij *S. cerevisiae* uit een evenwicht tussen cel/celinteracties enerzijds en cel/oppervlakte-interacties anderzijds (Palecek *et al.*, 2002). Het bestaat erin dat cellen op een glucosearm, semivast agarmedium met lage dichtheid – typisch 0,3% agar – zich tijdens hun groei uitspreiden via een proces dat sterk lijkt op *sliding motility* van bij bacteriën. Hierbij ontstaat een complexe kolonieachtige structuur, die *mat* genoemd wordt (Reynolds & Fink, 2001; Palecek *et al.*, 2002; Reynolds, 2006; Martineau *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2008). De complexe structuur en sterke reproduceerbaarheid van matvorming wijst op een sterk gereguleerd differentiatiepatroon, met een grote invloed van omgevingsfactoren. Mogelijk zijn hierin ook cel/celcommunicatiesystemen betrokken. Over de cellulaire machinerie die betrokken is in matvorming, is vandaag de dag echter relatief weinig geweten (Martineau *et al.*, 2007).

Macroscopisch gezien bestaat een mat uit twee belangrijke structuren. Centraal ligt de *hub*, en omgevend, meerdere spaken (zie figuur 2.5) (ook wel *rim* genoemd) (Reynolds & Fink, 2001; Martineau *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2008). Reynolds en Fink (2001) stelden vast dat een mat na 13 dagen een diameter van gemiddeld 7,8 cm bereikt en gemiddeld 14,4 spaken telt. De structuur is het meest uitgesproken bij 25°C. Er is ook een duidelijk morfologieverschil merkbaar tussen de matten van isogene MAT α - en MAT α -stammen. Diploïde stammen (van dezelfde haploïden) vertonen een nog heel andere morfologie. Typisch gaat het uitgesproken patroon van *hub* en *rim* verloren bij toenemende ploïdie.



Figuur 2.5: Matvorming in *S. cerevisiae* (Σ 1278b). Links: de mat is radiaal symmetrisch en bestaat uit een *hub* (centraal), van waaruit de spaken (radiaal) vertrekken. Rechts: detailfoto van de petriplaat links (Martineau *et al.*, 2007).

Voor de vorming van de mat en adhesie aan het oppervlak van het medium, is de aanwezigheid van het adhesine Flo11p noodzakelijk (cf. infra). Reynolds en medewerkers (2008) toonden dit aan doordat een *FLO11* Δ -mutant geen mat meer kan vormen, maar veeleer als een uiterst licht spreidende massa cellen aangroeit. De matten kunnen daarenboven niet alleen morfologisch, maar ook fysisch gescheiden worden naar agaradhesie-eigenschappen: de adhesie van de *hub* aan het oppervlak van het medium is typisch veel sterker dan van de spaken. Dit verklaart zich in een hogere expressie van *FLO11* in de *hub*.

Zoals reeds hoger vermeld, zijn de belangrijkste voorwaarden om in een bepaald medium een mat te kunnen vormen, de aanwezigheid van een lage agarconcentratie en een lage suikerspiegel (typisch glucose, maar ook andere koolstofbronnen zijn mogelijk) (Reynolds & Fink, 2001; Reynolds *et al.*, 2008). Tijdens de groei van de

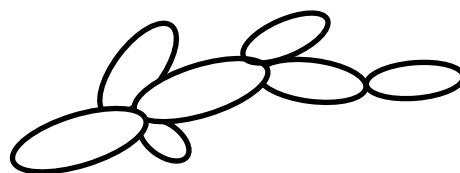
mat worden binnen het medium typisch concentrische gradiënten in suikers en pH gecreëerd. Deze zijn noodzakelijk om een goede differentiatie van de mat te bekomen. Wanneer signaalwegen die beantwoorden aan glucosegradiënten, gedeleteerd zijn, wordt de matvorming typisch geblokkeerd door beperkte *FLO11*-expressie. Snf1-kinase (cf. infra), dat glucoserepressie medieert, is een hierbij betrokken proteïne (Palecek *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2008). Een toenemende pH naar de spaken toe is ondermeer verantwoordelijk voor de beperkte expressie van *FLO11* daar (Reynolds *et al.*, 2008).

Martineau en onderzoekers (2007) toonden aan dat ook Hsp70-chaperones als regulators van nucleotide-exchange factoren, een belangrijke rol spelen en dat er meerdere *FLO11*-onafhankelijke signaalwegen in matvorming betrokken zijn.

2.1.2.3. Filamenteuze groei

Onder limiterende voedingscondities vertoont *S. cerevisiae* typisch een filamentachtige groei. Hierbij onderscheidt men twee types: pseudohyfae differentiatie enerzijds en invasieve groei anderzijds. In beide gevallen is het adhesine flo11p betrokken. Deleties van *FLO11* verhinderen zowel een pseudohyfae als een invasieve groei (Lo *et al.*, 1998; Cullen & Sprague, 2000; Guo *et al.*, 2000; Dranginis *et al.*, 2007).

Pseudohyfae differentiatie is een verschijnsel waarbij gisten overschakelen van een planktonische groei als vrije, losse cellen naar een groei als ketens van uitgerekte cellen (Lo *et al.*, 1998; Reynolds, 2006). Het meest opvallende kenmerk van de cellen hierbij is de overgang van een ovale naar een meer geëlongeerde celmorfologie, waarbij moeder- en dochtercel fysisch met elkaar verbonden blijven ter vorming van lange celstrengen of filamenten (zie figuur2.6). Hiertoe zal de knopvorming van de gistcellen nu ook typisch unipolair – met unipolaire deling als gevolg – geschieden (Liu *et al.*, 1996; Lorenz *et al.*, 2000; Cullen & Sprague, 2000; Guo *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2000; Kuchin *et al.*, 2002; Palecek *et al.*, 2002; Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004; Sengupta *et al.*, 2006). De – traditioneel – lange G₁-fase in de celdeling zal gevoelig verkorten en een shift naar langere G₂/M-tijden wordt merkbaar (Liu *et al.*, 1996; Palecek *et al.*, 2002; Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004).



Figuur2.6: Schematische voorstelling van *S. cerevisiae* met een pseudohyfae morfologie. Onder stikstoflimiterende condities vertoont *S. cerevisiae* een geëlongeerde celmorfologie en unipolaire knopvorming. Moeder- en dochtercel blijven met elkaar verbonden.

De condities die dergelijke groei en differentiatie in *S. cerevisiae* teweeg kunnen brengen, zijn heel divers. In diploïde cellen is de aanwezige stikstofbron van primordiaal belang. *S. cerevisiae* kan namelijk niet alle N-bronnen even goed assimileren (Lambrechts *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Kuchin *et al.*, 2002; Dranginis *et al.*, 2007; Fichtner *et al.*, 2007). Ammoniumionen, glutamine en glutamaat geven typisch hoge groeisnelheden; het omgekeerde geldt voor ureum, arginine en proline, waarbij dan ook typisch pseudohyfae groei optreedt (Chen & Fink, 2006; Sengupta *et al.*, 2006). Stikstoflimitatie komt bijvoorbeeld voor op gerijpt fruit – zoals druiven –, waarbij wel voldoende goed assimileerbare koolstof- en stikstofbronnen zijn, maar waar deze al te vaak slecht

gebalanceerd zijn. Op die manier kan alsnog een aminozuurtekort ontstaan met een pseudohyfae groei tot gevolg (Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004).

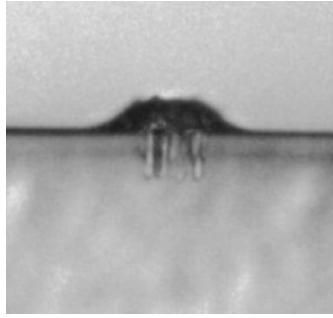
Ook haploïde gistcellen kunnen een pseudohyfae differentiatie ondergaan. Inducerende factoren (in *S. cerevisiae* Σ 1278b) zijn hier bepaalde korteketenalcoholen als isoamylalcohol en butanol. Bemerkt dat dit in stikstofarme condities typische eindproducten van het aminozuurkatabolisme zijn (Lorenz *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2000). Daarnaast bevordert ethanol in sommige gevallen een filamenteuze groei (Lorenz *et al.*, 2000; Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004). Bemerkt dat pseudohyfae groei ook in vloeibaar medium kan optreden (Lorenz *et al.*, 2000).

Recent werd ook de rol van *quorum sensing* in pseudohyfae differentiatie bevestigd. *S. cerevisiae* secreteert aromatische alcoholen die de cellen toelaten bij bepaalde alcoholconcentraties populatiedensiteiten waar te nemen, en zonodig groei en verdere ontwikkeling hierop af te stemmen. Er werd aangetoond dat mutaties in genen die hiermee verband houden, resulteren in uiterst beperkte pseudohyfae groei. Voor *S. cerevisiae* zijn betrokken alcoholen ondermeer fenylethanol en tryptophol (Chen *et al.*, 2004; Chen & Fink, 2006; Hogan, 2006; Sprague *et al.*, 2006). Chen en medewerkers (2006) toonden aan dat tyrosol in *C. albicans* fungeert als signaalmolecule.

De eigenlijke rol van dergelijk type groei is nog niet geheel gekend en bewezen, maar in elk geval stelt een pseudohyfae differentiatie de giststam in de mogelijkheid om andere gebieden te verkennen en zo op zoek te gaan naar geschikte nutriënten. Zeker voor niet-beweeglijke species is dergelijke groei van uiterst groot belang voor overleving (Cullen & Sprague, 2000; Palecek *et al.*, 2002; Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004; Dranginis *et al.*, 2007). Aangezien hyfen een relatief grote oppervlakte/volume ratio hebben, stelt een pseudohyfae differentiatie met minder biomassakost een groter gebied ter beschikking dan bij niet-filamenteuze groei. De filamenten richten namelijk typisch weg van de kolonie naar niet-gepopuleerde gebieden (Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004).

Naast pseudohyfae differentiatie vertonen sommige haploïde stammen van *S. cerevisiae* ook de eigenschap om agarmedia te penetreren en bijgevolg te invaderen. Kenmerkend hiervoor is de overgang van een axiaal naar een unipolair buddingpatroon waarbij de cellen – net als bij pseudohyfae differentiatie – meer geëlongeerd zijn. Ook bij invasieve groei worden filamentachtige structuren gevormd (Liu *et al.*, 1996; Cullen & Sprague, 2000; Lorenz *et al.*, 2000). Bij invasieve groei adheren de cellen stevig aan, maar ook in het agarmedium, zodat ze niet zomaar van media kunnen afgewassen worden (zie figuur 2.7) (Guo *et al.*, 2000).

Voor de penetratie van het agarmedium worden ondermeer hydrolytische enzymen – zoals *sta2p*, een α -glucoamylase – gesecreteerd om de polysaccharidematrix te breken (zie figuur 2.7). Bij *Candida albicans* (pathogene gist, cf. infra) werd de aanwezigheid van proteases vastgesteld (Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004; van Dyk *et al.*, 2005).



Figuur 2.7: Agarinvasie op SC-medium zonder glucose: loodrechte sectie van het medium met kolonie en visualisatie onder lichtmicroscop (Cullen & Sprague, 2000).

Invasieve groei wordt typisch veroorzaakt door een tekort aan glucose of andere vlot fermenteerbare suikers en na langdurige groei op een stikstofrijk medium (Lorenz *et al.*, 2000; Tamaki *et al.*, 2000; Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004; van Dyk *et al.*, 2005; Dranginis *et al.*, 2007). Moeilijker (relatief) assimileerbare koolhydraten die eveneens kunnen leiden tot invasieve groei, zijn ondermeer raffinose, galactose, zetmeel en ethanol (Lambrechts *et al.*, 1996; Palecek *et al.*, 2002). Net als bij pseudohyale differentiatie is ook invasieve groei afhankelijk van adhesine flo11p, waarbij dezelfde signaalwegen betrokken zijn (cf. infra) (Cullen & Sprague, 2000; Kuchin *et al.*, 2002).

Aanwezigheid van feromonen van het andere matingtype kunnen eveneens leiden tot invasieve groei (Ceccato-Antonini & Sudbery, 2004). Daarnaast kunnen gistcellen – zowel haploïde als diploïde – ook plantsignalen herkennen teneinde een plant te kunnen infecteren door invasie. Er werd aangetoond dat auxines als indoolazijnzuur hierin een rol kunnen spelen. Indoolazijnzuur is een plantenhormoon dat typisch gesecreteerd wordt nabij wondplaatsen van planten (Prusty *et al.*, 2004; Verstrepen & Klis, 2006).

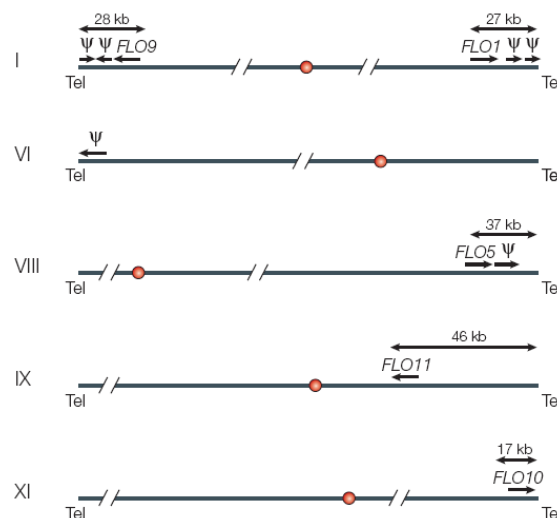
2.2. De FLO-genfamilie in *S. cerevisiae*

2.2.1. De FLO-genen

In *S. cerevisiae* werden vijf dominante, lectinecoderende genen geïdentificeerd die een rol kunnen spelen in adhesie: de flocculinegenen *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* en in mindere mate *FLO10*, zijn van belang voor cel/celadhesie, terwijl het adhesinegen *FLO11* – ook beschreven als *MUC1* – instaat voor diverse vormen van cel/substraatadhesie, zoals adhesie aan oppervlakken (plastics, glas, etc.), biofilmvorming, matvorming, florvorming, pseudohyale en invasieve groei enz. (cf. supra) (Lambrechts *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2004b; Bayly *et al.*, 2005; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Govender *et al.*, 2008; Van Mulders *et al.*, 2009). Verder is de promotor van *FLO11* een van de meest complexe van het hele gistgenoom. Met een grootte van 2,8 kb (kilobasenparen) bevat deze minstens vier *upstream activating sequences* (UAS) en negen repressie-elementen (Rupp *et al.*, 1999; Kuchin *et al.*, 2002). *FLO8* codeert niet voor een adhesine maar voor een transcriptionele activator van *FLO1* en *FLO11* (Kobayashi *et al.*, 1999; Fichtner *et al.*, 2007; Damas-Buenrostro *et al.*, 2008). Bijkomend zijn er ook nog *FLO2* en *FLO4* die allelische varianten van *FLO1* zijn. *FLO3* is semidominant en *FLO6* en *FLO7* zijn recessief (Teunissen & Steensma, 1995). Bemerkt dat er in de literatuur weinig tot geen onderscheid gemaakt wordt tussen de termen *flocculine* (doorgaans met

betrekking tot de proteïneproducten van *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* en *FLO10*) en *adhesine* (*FLO11*). In het vervolg van deze tekst zullen de termen dan ook door elkaar gebruikt worden.

FLO1 is een van de best bestudeerde genen uit de *FLO*-genfamilie (Bony *et al.*, 1997). Het is gelegen op de rechterarm van chromosoom I en heeft een *open reading frame* (ORF) van 4614 basenparen. Kenmerkend aan *FLO1* (systematische naam *YAR050W*) is het voorkomen van een groot aantal herhaalde sequenties (17 kopijen) in het centrale deel van het ORF (Verstrepen *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004b; Liu *et al.*, 2007b; Damas-Cherry *et al.*, 1997; Buenrostro *et al.*, 2008). Het *FLO5*-ORF (*YHR211W*) is 3228 bp groot en bevindt zich op de rechterarm van chromosoom VII. *FLO9* (*YAL063C*) is gelegen op de linkerarm van chromosoom I en het ORF telt 3969 basenparen. *FLO5* en *FLO9* vertonen daarenboven sterke homologie met *FLO1* (proteïneproducten van *FLO1* en *FLO5* zijn 96% similair; *FLO1* en *FLO9* 94%) (Guo *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004b; Bayly *et al.*, 2005). *FLO10* (*YKR102W*) is gelegen op de rechterarm van chromosoom XI en heeft een open reading frame van 3510 basenparen. *FLO10* vertoont eveneens gelijkenissen met *FLO1*; zij het in veel mindere mate dan *FLO5* en *FLO9*. *FLO11* (*YIR019C*) is gelegen op chromosoom IX en heeft een ORF van 4104 basenparen (zie figuur 2.8). Het *FLO11*-adhesine vertoont eveneens homologie met *FLO1* (proteïneproducten van *FLO1* en *FLO11* zijn 37% similair), maar deze is nog beperkter dan bij *FLO10*. *FLO8* (*YER109C*), dat niet codeert voor een adhesine, is gelegen op chromosoom V en het ORF is 2400 basenparen groot (Cherry *et al.*, 1997; Bayly *et al.*, 2005).



Figuur 2.8: Chromosomale locatie van de *FLO*-genen en pseudogenen (ψ) in *S. cerevisiae* S288c. De Romeinse cijfers aan de linkerkant geven het chromosoomnummer weer. Tel: telomeer. Het centromeer van de respectievelijke chromosomen is weergegeven door een bol, doorgaans centraal gelegen (Verstrepen *et al.*, 2004b).

Op *FLO11* na zijn alle adhesines subtelomerisch gelegen (Verstrepen *et al.*, 2004b; Dranginis *et al.*, 2007; Damas-Buenrostro *et al.*, 2008; Govender *et al.*, 2008). Aangezien deze gebieden vaak onderhevig zijn aan epigenetische *silencing*, komen *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* en *FLO10* in de meeste laboratoriumstammen in *S. cerevisiae* dan ook niet tot expressie (cf. infra) (Halme *et al.*, 2004; Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Fichtner *et al.*, 2007). In labostam Σ 1278b komt enkel *FLO11* tot expressie. De *FLO*-genen die gesilenced zijn, kunnen, na insertie van een artificiële promotor zoals een induceerbare *GAL1*-promoter of een constitutieve *TEF1*-promoter, echter gemakkelijk geactiveerd worden (Guo *et al.*, 2000; Van Mulders *et al.*,

2009). Bemerkt dat er in deze subtelomere domeinen op een aantal chromosomen pseudogenen (niet-functionele kopijen) van een aantal FLO-genen gelegen zijn. Het zijn vermoedelijk relictten van foutieve *crossovers* en ze zouden niet ontstaan zijn door integratie van cDNA's die geprocessed zijn (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen *et al.*, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Levdansky *et al.*, 2008). Desalniettemin vormen deze pseudogenen een reservoir van waaruit de gistcel sequenties kan inbouwen in naburige, functionele genen (Verstrepen *et al.*, 2004b). Bemerkt dat andere – industriële – stammen van *S. cerevisiae* vaak beschikken over genen die een sterke homologie met de verschillende FLO-genen vertonen (Halme *et al.*, 2004; Fichtner *et al.*, 2007).

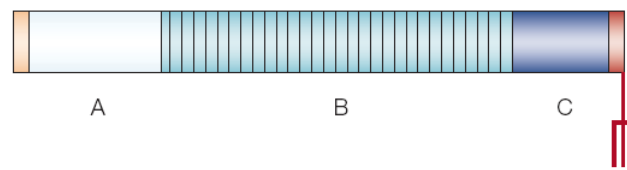
De genproducten van *FLO1*, *FLO5* en *FLO9* zijn in laboratoriumstammen verantwoordelijk voor de flocculatie van het Flo1-fenotype (Guo *et al.*, 2000). In vele lage gisten (vb. biergisten) komt echter een homoloog van *FLO1*, namelijk Lg-*FLO1*, tot expressie. Dit flocculine bindt niet alleen mannose, maar ook glucose- en maltosesuikers en staat bijgevolg in voor het reeds hoger beschreven NewFlo-fenotype (Kobayashi *et al.*, 1999; Bayly *et al.*, 2005). Vermoed wordt dat dit fenotype ontstaan is door een recombinatie met een translocatie als gevolg. Hierin zouden *FLO5* en een pseudogen betrokken zijn geweest (cf. infra) (Kobayashi *et al.*, 1998; Verstrepen *et al.*, 2004b; Dranginis *et al.*, 2007).

Guo en medewerkers (2000) onderzochten de fenotypes van de producten van de flocculinegenen *FLO1*, *FLO10* en *FLO11* in $\Sigma 1278b$ door deze tot overexpressie te brengen. Ze kwamen hierbij tot een aantal interessante vaststellingen. Onder overexpressie resulteren deze drie genen in een sterk toegenomen flocculatie, hetgeen sterkst bij *FLO1* kon waargenomen worden. De *FLO1*-overexpressie kon reversibel geïnhibeerd worden door toevoegen van mannose (Flo1-fenotype), terwijl de aanwezigheid van maltose, sucrose en glucose naast mannose de *FLO10*-aggregaten (NewFlo-fenotype) kon inhiberen (cf. infra). De flocculatiefenotypes van de *FLO11*-overexpressies werden dan weer door geen enkele van voorgaande suikers beïnvloed (Guo *et al.*, 2000). Dit laatste werd echter tegengesproken door Bayly en medewerkers (2005), die in *S. cerevisiae* var *diastaticus* aantoonde dat *FLO11*-afhankelijke flocculatie wel door mannose kan geïnhibeerd worden. Deze bevinding werd door Douglas en medewerkers (2007) bevestigd, hetgeen mogelijk wijst op een sterke stamafhankelijkheid. Daarnaast toonden Guo en medewerkers (2000) aan dat de flocculines ondanks verschillende specificiteiten in flocculatie, invasieve groei, pseudohyfae groei en *mating* elkaar kunnen compenseren. Zo kan *FLO10* onder zijn eigen promotor de functies van een *FLO11A*-mutant invullen (*bypass*-mutatie) (Guo *et al.*, 2000).

2.2.2. De Flo-proteïnen

De FLO-genen coderen voor celwandverankerde glycoproteïnen, die allen op eenzelfde karakteristieke en modulaire manier zijn opgebouwd. Ze bestaan typisch uit drie domeinen (zie figuur 2.9), namelijk een N-terminaal deel (A) dat verantwoordelijk is voor de lectine-eigenschappen van de verschillende Flo-proteïnen, een B-deel dat uit repetitieve sequenties bestaat en een C-terminaal deel (C) dat ondermeer instaat voor een – tijdelijke – verankering met glycosylfosfatidylinositol (GPI-anker) (Lambrechts *et al.*, 1996; Bony *et al.*, 1997;

Verstrepen *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2000; Braus *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Mortensen *et al.*, 2007b; Govender *et al.*, 2008; Van Mulders *et al.*, 2009).

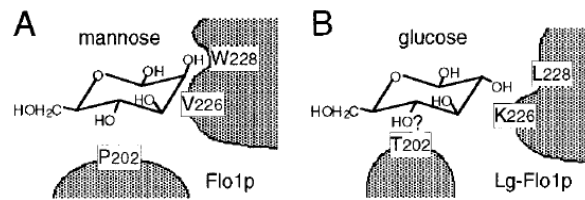


*Figuur 2.9: Typische structuur van een adhesine. 3 domeinen: N-terminaal deel (A), centraal domein met repetitieve sequenties en C-terminaal deel dat covalent kan binden met glycosylfosfatidylinositol (C) (Verstrepen *et al.*, 2004)*

2.2.2.1. N-terminale domein

Het eigenlijke N-terminale domein van de adhesines wordt vooraf gegaan door een korte hydrofobe signaalsequentie van 20 à 30 aminozuren die zorgt voor een efficiënt richten naar het endoplasmatisch reticulum, zodat het adhesine in de secretorische pathway terecht komt. Eenmaal binnen in het ER wordt deze sequentie afgesplitst door een signaalprotease (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007). Na dit korte signaalpeptidefragment komt een groter globulair deel, het eigenlijke N-terminale domein. In hun onderzoek toonden Bony en medewerkers (1997) met behulp van deletieanalyse aan dat dit deel essentieel is voor cellulaire aggregatie. Dit domein bevat dan ook de regio's die instaan voor de functionaliteiten van de adhesines (Bony *et al.*, 1997; Mortensen *et al.*, 2007b). De lectinebindende capaciteit van de flocculines situeert zich hier en verklaart de affiniteiten van de adhesines voor bepaalde oppervlakken (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007). De lectinedomeinen van de flocculines werden nog niet fysisch onderzocht, maar voorspellingen geven aan dat de secundaire structuur rijk is aan β -platen. Deze leveren waarschijnlijk een bijdrage aan de zuurstabiliteit van de flocculines (Dranginis *et al.*, 2007).

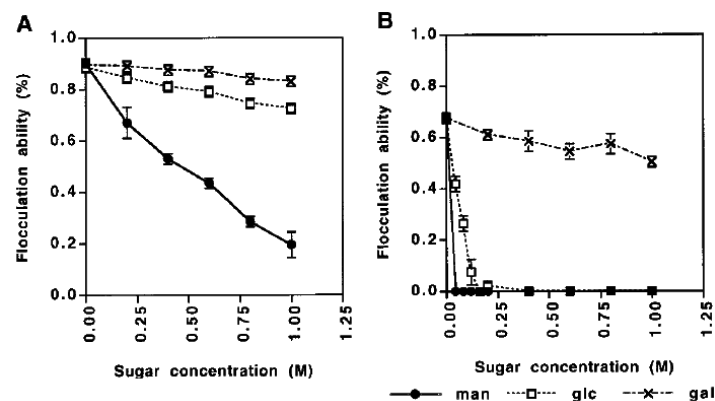
Kobayashi en medewerkers (1998) toonden aan dat mutaties in het N-terminale deel van *FLO1* verantwoordelijk zijn voor een verschil in suikerbindingsspecificiteit, resulterend in de verschillende fenotypes, namelijk Flo1 en NewFlo. Tryptofaan-228 en zijn nabijgelegen aminozuren vormen in Flo1p samen een domein dat de herkenning van de C2-hydroxylgroep van mannose toelaat (zie figuur 2.10), maar niet deze van glucose. Het verschil tussen glucose en mannose situeert zich enkel in deze C2-hydroxylgroep... Wanneer Trp-228 vervangen wordt door leucine, wordt noch de C2-hydroxylgroep van mannose, noch deze van glucose herkend. De aanwezigheid van threonine-202 laat echter interactie met de C4-hydroxylgroep van zowel mannose als glucose toe en geeft op die manier aanleiding tot het NewFlo-fenotype (bij deze mutatie spreekt men van Lg-*FLO1*). Deze hypothese vindt oorsprong in het gegeven dat galactose een NewFlo-flocculatie niet kan inhiberen. Het verschil tussen glucose en galactose situeert zich juist in de oriëntatie van deze C4-hydroxylgroep (Kobayashi *et al.*, 1998).



Figuur 2.10: Model voor suikerherkenning in Flo1 (A) en Lg-Flo1 (B). A: Tryptofaan interageert met de C2-hydroxylgroep van mannose. B: Leucine interageert niet met de C2-hydroxylgroep van glucose. Threonine interageert met de C4-hydroxylgroep van glucose en mannose (Kobayashi et al., 1998)

Bayly en medewerkers (2005) toonden aan dat Flo11p-afhankelijke flocculatie eerder van het Flo1-type dan wel van het NewFlo-type is. In het gebied dat instaat voor de substraatspecificiteit vertoont Flo11p 86,7% similariteit met het gelijkaardige Flo1p-domein. Flo11p deelt ook de kritische tryptofaan met Flo1p en niet de leucine van Lg-Flo1p (Bayly et al., 2005).

Binding tussen de lectines en mannanketens van mannoproteïnen op naburige cellen is een vrij ruim begrip aangezien naast de suikerspecificiteit ook de affiniteiten van de bindende domeinen voor bepaalde liganden of receptoren in rekening moeten gebracht worden. De sterkte en duur van de binding tussen cel/cel of cel/substraat kan daardoor vele grootteordes verschillen (Dranginis et al., 2007). De suikerconcentratie waarbij inhibitie van flocculatie optreedt, kan hierdoor dan ook sterk verschillen van flocculine tot flocculine. Hoewel flocculatie bij zowel Flo1- als NewFlo-type cellen door mannose kan optreden, verschillen deze concentraties sterk. Kobayashi en onderzoekers (1998) stelden vast dat NewFlo-type flocculatie quasi volledig geïnhibeerd wordt bij 40mM mannose, terwijl bij Flo1-type flocculatie deze overgang van geflocculeerde naar planktonische vorm een stuk minder scherp is (zie figuur 2.11). Bij 1M mannose is bij het Flo1-type nog altijd 22% van de gistcellen niet in suspensie. Aangezien bij het NewFlo-fenotype een complete inhibitie door glucose maar bij 160mM optreedt, is de affiniteit van het lectine voor mannose sterker dan voor glucose (zie figuur 2.11b) (Kobayashi et al., 1998).



Figuur 2.11: Percentage van cellen in flocculatie na toevoegen van suikers met verschillende concentratie in het medium (flocculatie-inhibitie) bij FLO1 (A) en Lg-FLO1 (B). Elk punt is het gemiddelde van drie experimenten. Man, mannose; Glc, glucose; Gal, galactose (Kobayashi et al., 1998).

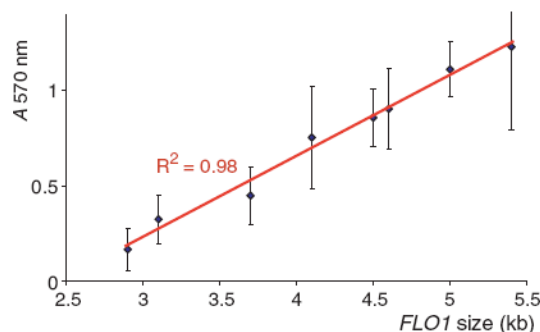
Zoals hierboven reeds vermeld, vertoont het suikerbindende domein van Flo11p sterkere gelijkenissen met dat van Flo1p dan van Lg-Flo1p. Daarnaast herkent Flo11p – net als Flo1p – enkel mannose en niet glucose. De inhibitieovergang is echter een stuk scherper dan bij de klassieke Flo1-type flocculatie en treedt op bij concentraties tussen 50 en 70mM (Bayly et al., 2005).

2.2.2.2. Het centrale domein

Centraal bestaan de flocculines uit een reeks herhaalde sequenties. Deze zijn rijk aan serine, threonine (domein B van Flo11p bevat 60% serine- en threonineresidu's) en andere β -vertakte aminozuren. Deze serine- en threonineresidu's worden meestal onder geglycosyleerde vorm teruggevonden in de celwand (Lambrechts *et al.*, 1996; Verstrepen *et al.*, 2001; Dranginis *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007b; Levdansky *et al.*, 2008).

Na toegang en een eerste verwerking in het endoplasmatisch reticulum volgen de adhesines de secretorische pathway via het Golgi-apparaat. Daar grijpen bijkomende posttranslationele modificaties plaats, onder andere de additie van mannosesuikers. Voor deze glycosylatie is er typisch een hydroxylgroep nodig, hoewel N-glycosylatie ook mogelijk is (Bony *et al.*, 1997; Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006). Eenmaal aangekomen in de celwand zullen deze suikers dan *crosslinken* met β -1,6-glucanen uit de fungale celwand (Verstrepen *et al.*, 2001; Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006). Daarnaast zouden de O-gelinkte oligosaccharide zijketens de adhesines een staafachtige structuur geven. De aanwezigheid van een beperkte, maar toch significante hoeveelheid prolineresidu's is hierbij onmisbaar om een al te sterke compactatie door de vele O-mannosylaties te vermijden. Dergelijke regio's zouden dan ook functioneren als *spacers* om het globulaire adhesiedomein (cf. supra) weg te richten van de celwand (Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007). Typisch worden uitgerekte, antiparallelle β -plaatachtige structuren gevormd (Groes *et al.*, 2002; Dranginis *et al.*, 2007). De tandemherhalingen spelen dus een zekere rol in de stabilisatie van de flocculines (Loza *et al.*, 2004).

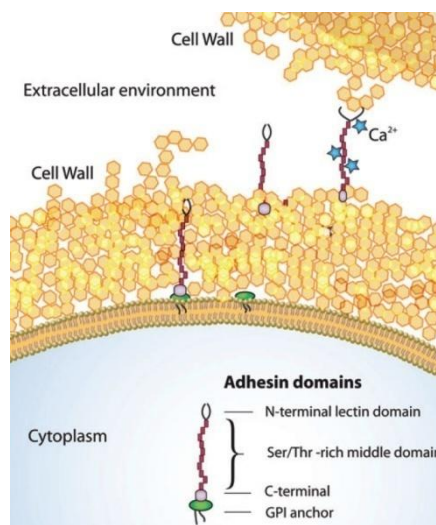
Verstrepen en medewerkers (2005) wijzigden experimenteel het aantal herhalingen en toonden aan dat een groter aantal herhalingen zorgt voor betere adhesie-eigenschappen. Ze stelden een lineaire correlatie vast tussen de grootte van *FLO1* en de graad van adhesie. Hoe groter de flo1-proteïnen, des te sterker de adhesie-eigenschappen (zie figuur 2.12) (Verstrepen *et al.*, 2005). Eenzelfde verband werd aangetoond bij Als-proteïnen (homologen van Flo) bij *Candida albicans* (Rauceo *et al.*, 2006). Liu en onderzoekers toonden daarenboven aan dat een verschillend aantal herhalingen kan resulteren in een conversie van het Flo1- in het NewFlo-fenotype; een eigenschap die oorspronkelijk uitsluitend aan het N-terminale domein van de adhesines toegeschreven werd (Liu *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2007b).



Figuur 2.12: Lineair verwantschap tussen aantal herhalingen in *FLO1* (*FLO1* size) en absorptie als maat voor de adhesie aan polystyreen. Gistcellen worden geïncubeerd en kunnen binden aan de wand van de well. Na wegwassen van het medium, wordt kristalviolet toegevoegd dat de gistcellen kan binden. Na herhaaldelijk wassen wordt de absorptie van de hoeveelheid gebonden kristalviolet bepaald (Verstrepen *et al.*, 2005)

2.2.2.3. Het C-terminale domein

Het carboxyterminale deel van de adhesines bevat een groot aandeel aan hydrofobe aminozuren en ondergaat net als het centrale domein een belangrijke posttranslationele modificatie in het endoplasmatisch reticulum. Daar gebeurt de additie van een glycosylfosfatidylinositolanker door een transamidatiereactie waarbij het adhesine aan een membraan gelinkt wordt. Het GPI-anker ondergaat in het Golgi-complex nog wijzigingen (Hamburger *et al.*, 1995; Bony *et al.*, 1997; Verstrepen *et al.*, 2001; Verstrepen & Klis, 2006). Een korte signaalsequentie aan het uiteinde van het proteïne staat in voor de herkenning van dit alles en wordt vervangen door dit anker. Na aankomst in de plasmamembraan wordt het adhesine losgeknipt van het GPI-anker en wordt het (adhesine) covalent gebonden met de β -1,6-glucanen (cf. supra) (zie figuur 2.13) (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007).



Figuur 2.13: Verankering van adhesines aan het celoppervlak van gist. Na secretie wordt het adhesine geknipt van het GPI-anker en bindt het met de celwand (Verstrepen & Klis, 2006)

2.2.3. Medische relevantie van de adhesinefamilie: fungale adhesie en tumorigenese

Pathogene fungi van het genus *Candida* – zoals *C. albicans* en *C. glabrata* – veroorzaken regelmatig ernstige systemische infecties (candidiose) bij verzwakte patiënten in ziekenhuizen. Een groot deel van deze infecties vereist de vorming van biofilms, een verschijnsel waarvoor adhesie een eerste cruciale stap vormt (Douglas, 2003; Sheppard *et al.*, 2004). Dergelijke biofilms komen in het bijzonder voor op katheters, prothetische hartkleppen en gewrichten, pacemakers en endotracheale tubes. Hierbij worden typisch door matrix omgeven microkolonies gevormd. Deze blijken een hoge resistentie tegen verschillende antifungale agentia als fluconazol, amfotericine B en flucytosine te hebben (Reynolds & Fink, 2001; Douglas, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004b; Blankenship & Mitchell, 2006; Beauvais *et al.*, 2009). Bijgevolg is een goede bestrijding van *Candida* vrij kostelijk en moeilijk. Aangezien 35% van de candidainfecties een dodelijke afloop kent, dringt een efficiënte bestrijding zich ontegensprekelijk op (Douglas, 2003).

Met het vermoeden van een vereiste adhesine-aanwezigheid op het celoppervlak van gisten voor biofilmvorming, deleteerden Reynolds en Fink (2001) *FLO11* en *FLO8* in *S. cerevisiae*. De mutanten bleken

nauwelijks te kunnen adheren aan plastic oppervlakken als polystyreen, waaruit besloten werd dat adhesine-expressie noodzakelijk is voor biofilmvorming. Hun onderzoek kaderde in de kennis dat er een genfamilie in *Candida* aanwezig was die een grote homologie vertoonde met de adhesines van *Saccharomyces*, genaamd de ALS-genen (*Agglutinin-Like Sequence*) bij *C. albicans* en EPA-genen (*Epithelial Adhesin*) bij *C. glabrata* (Douglas, 2003; Klotz *et al.*, 2004; Loza *et al.*, 2004; Verstrepen *et al.*, 2004b). Aangezien *S. cerevisiae* een goed beschreven organisme is en in tegenstelling tot *Candida* doorgaans ongevaarlijk is voor de mens, maakt dit het daarenboven tot een goed model om kennis te verwerven omtrent fungale biofilmvorming. Op die manier komt dan ook een heel nieuw veld voor antimicrobiële agentia open te liggen (Reynolds & Fink, 2001; Douglas, 2003). Onderzoek van Klotz en medewerkers (2004) wees verder uit dat de adhesines van *Candida* een heel brede range van proteïnen kunnen binden. Dit laatste zou veroorzaakt worden door een gedegeneerde herkenningssequentie van de betreffende adhesines (Klotz *et al.*, 2004).

Naast diploidie van *Candida*, is het in meerdere kopijen voorkomen van de verschillende adhesines een niet te onderschatten hindernis in ALS-onderzoek, waardoor mutatie-analyse danig bemoeilijkt wordt (Douglas, 2003). Deze vele sterk gelijkende kopijen vormen daarenboven een quasi onuitputbaar reservoir van waaruit door recombinatie verschillende oppervlakte-antigenen kunnen gegenereerd worden. Bijkomend is er nog de factor van epigenetische *silencing*, waardoor *Candida spp.* over een waar arsenaal van antigenische varianten beschikt om het de menselijke immuniteit knap lastig te maken en zondig te omzeilen (Verstrepen *et al.*, 2004b).

Ook in kankeronderzoek staan adhesines vandaag de dag in de belangstelling. Bij cellen van zoogdieren spreekt men hierbij van mucinegenen (*MUC*) als analogen van *FLO11* (Douglas *et al.*, 2007). Li en medewerkers (2008) toonden aan dat gastrische tumoren vaak een hoger *MUC1*-expressieprofiel (het meest onderzochte mucine) hebben dan gezond epitheliaal gastrisch mucosaweefsel. Daarnaast worden de mucines vaak gekenmerkt door aberrante glycosylatiepatronen (Taylor-Papadimitriou, 1999). De overlevingskansen van tumorpatiënten zonder *MUC1*-expressie bleek verder significant hoger dan patiënten met hoge, middelmatige en zelfs lage expressie. Een verhoogde *MUC1*-expressie zou een bijdrage leveren tot pathogenese, invasie, differentiatie en metastase. Vandaar dat besloten werd dat een sterk stijgende *MUC1*-expressie een indicator kan zijn voor gastrische carcinoma's (Li *et al.*, 2008; Baldus *et al.*, 2004). Legendre en medewerkers (2007) toonden aan dat een stijging in tandemrepeats vaak gepaard gaat met hogere *MUC1*-expressieprofielen en verhoogde tumoraanleg. Langner en medewerkers (2004) schatten de waarde van deze expressie als indicator daarentegen niet zo hoog in.

De positieve correlatie tussen metastasis en verhoogde *MUC1*-expressie vindt waarschijnlijk zijn oorsprong in een gewijzigd celprofiel. Epitheelcellen hebben namelijk typisch een polair karakter. Tumorcellen verliezen deze laatste eigenschap vaak, zodat de hoge expressie tot een voorkomen van de mucines over het hele celoppervlak leidt. De vele negatieve ladingen in de herhalingen zouden interfereren met cel/cel- en cel/matrixadhesies waardoor de tumorcellen zich verspreiden in het weefsel. Daarnaast zouden de mucines door hun omvang heel wat membraankanalen van naburige cellen blokkeren (door sterische hinder) zodat celfuncties verstoord worden (Langner *et al.*, 2004).

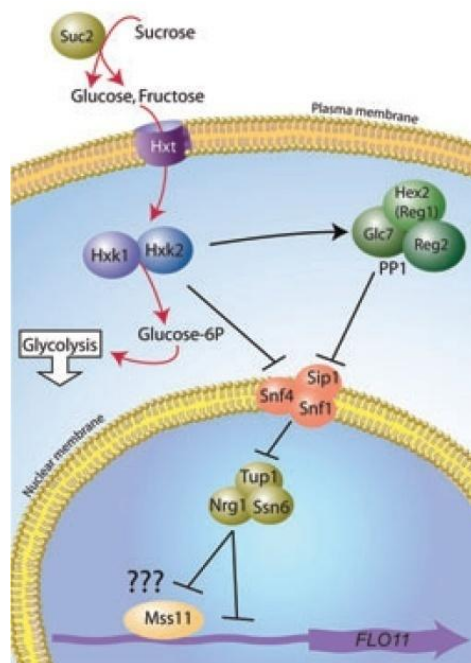
2.3. Regulatie van en variatie in expressie van *FLO*-genen

2.3.1. Betrokken signaaltransductiewegen in de *FLO*-genregulatie

Het kunnen waarnemen en detecteren van nutriënten in het milieu en de mogelijkheid van zich hieraan snel te kunnen aanpassen, is essentieel voor het overleven van micro-organismen. Hiertoe beschikken cellen over een aantal signaalnetwerken om wijzigingen waar te nemen en te vertalen naar het DNA in de kern om specifieke genen aan of uit te schakelen. Een fenotypische respons is hierbij vaak het antwoord op het veranderen van de nutritionele status (Dranginis *et al.*, 2007). Hieronder volgen een aantal belangrijke signaaltransductiewegen in *S. cerevisiae* met een impact op de *FLO*-genexpressie.

2.3.1.1. Glucose repressie pathway

In de algemene glucose repressie pathway – ook wel kataboliet repressie pathway genoemd – inhibeert de aanwezigheid van glucose of sucrose in het milieu verschillende genen. Het betreft hierbij ondermeer genen die instaan voor de opname en het metabolisme van alternatieve koolstofbronnen. Daarnaast worden genen die instaan voor gluconeogenese en respiratie, eveneens geïnhibeerd. De cel gaat typisch over naar een fermentatief metabolisme met de vorming van ethanol. De repressie van respiratie door de aanwezigheid van glucose, wordt ook wel *Crabtree*-effect genoemd (Verstrepen *et al.*, 2004a).



Figuur 2.14: De algemene glucoserepressie signaalweg; zie tekst voor details (Verstrepen & Klis, 2006)

Glucose dat zich in het extracellulair medium bevindt, wordt door een hexosetransporter (Hxt) (zie figuur 2.14) opgenomen en vervolgens gefosforyleerd door een hexokinase (Hxk) ter vorming van glucose-6-fosfaat dat verder gemetaboliseerd wordt in de glycolyse. Deze fosforylatie, al dan niet in combinatie met een tekort aan AMP door een verhoogde ATP-productie (glycolyse van glucose-6-fosfaat zet ATP vrij), inactiveert het centrale proteïnekinase Snf1 (*sucrose non-fermenting 1*). Dit gebeurt ofwel rechtstreeks door inhibitie van de

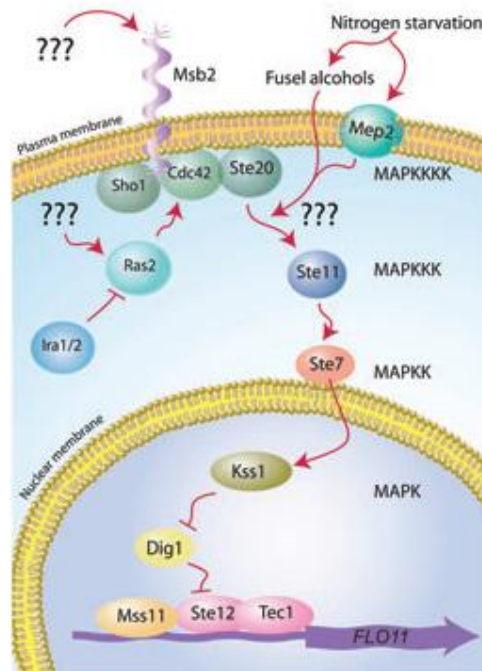
fosforylatie ervan (die normaal nodig is voor de activatie van Snf1); ofwel onrechtstreeks door stimulatie van een fosfatasecomplex (PP1) van het Snf1-defosforylase. Wanneer Snf1 inactief is, kan Mig1 naar de nucleus getransporteerd worden, waar het de repressors Tup1 en Ssn6 rekruteert en bindt op specifieke sequenties van promoters van verschillende genen (Kobayashi *et al.*, 1999; Kuchin *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2004a; Verstrepen & Klis, 2006; Palecek *et al.*, 2007). Tup1-Ssn6 is een sterk geconserveerd repressorcomplex en heeft een wijdverspreide functie in de glucoserepressie. Het bindt geen DNA, maar werkt eerder als een chromatine-remodellerend complex (Tup1 interageert met histonen H3 en H4). Ondermeer *FLO1* en *FLO11* worden door Tup1-Ssn6 geïnhibeerd. Aanwezigheid van glucose laat dan ook geen invasieve groei (door *FLO11*) toe (Fleming & Pennings, 2001; Kuchin *et al.*, 2002; Palecek *et al.*, 2007). Nrg1 fungeert hierbij als repressor van Tup1-Ssn6 (Kuchin *et al.*, 2002; Braus *et al.*, 2003).

Bij een glucosetekort en verhoogde AMP-concentraties wordt Snf1 geactiveerd. Het actieve Snf1 fosforyleert Mig1, waardoor het terugtransloceert naar het cytoplasma. De repressie wordt hierdoor opgeheven. De transcriptie van *FLO11* is dan ook niet langer onderdrukt (Verstrepen *et al.*, 2004a).

2.3.1.2. Mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK pathway)

Naast de algemene glucose repressie pathway is de MAPK pathway een tweede belangrijke signaalweg. Deze signaalwegen komen vrij algemeen voor in gist en laten cellen toe zich snel aan te passen aan wijzigende condities. Typisch is het centrale deel van deze signaalweg conserveerd, terwijl de specificiteit bepaald wordt door een aantal receptoren en kinases bovenaan de signaalcascade en door een aantal downstreamelementen, die, in het geval van de *FLO*-genen, instaan voor specifieke cellulaire functies als pseudohyfae differentiatie en invasieve groei. Er werd aangetoond dat deze signaalweg eveneens een rol speelt tijdens *mating* van haploïde cellen van een tegengesteld *mating type* en in ceelongatie, hoewel het mechanisme hiervan nog niet geheel gekend is (Lo & Dranginis, 1997; Robertson & Fink, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000; Braus *et al.*, 2003; Cullen *et al.*, 2004; Chen & Fink, 2006; Sprague & Winans, 2006).

Bovenaan deze pathway (zie figuur 2.15) staat het Msb2-mucine dat voorkomt op de celmembraan van de gistcellen en fungeert als sensor. De condities die deze receptor activeren zijn evenwel nog niet gekend. Activatie ervan leidt met behulp van de osmosensor Sho1, het GTP-bindend proteïne Ras2 en het GTP-ase Cdc42 tot de activatie van MAPKKKK Ste20 (Kobayashi *et al.*, 1999; Cullen *et al.*, 2004; Verstrepen & Klis, 2006). Anderzijds kunnen stikstofarme condities, die zich bijvoorbeeld vertalen in een aanwezigheid van korteketenalcoholen als butanol, aanleiding geven tot activatie van de signaalweg. Deze alcoholen zijn typisch nevenproducten van de aminozuurbiosynthese onder stikstoflimiterende condities. Mogelijk fungeren zij dus als signaalmoleculen voor lage stikstofconcentraties in het medium. Het ammonium permease 2 is hierbij cruciaal (Lo & Dranginis, 1997; Lorenz *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2000; Verstrepen & Klis, 2006).



Figuur 2.15: De MAPK-signalweg met activatie van *FLO11*; zie tekst voor details (Verstrepen & Klis, 2006)

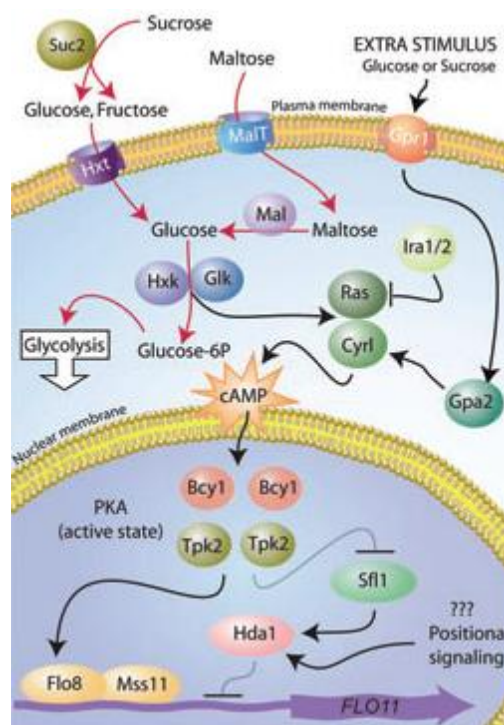
Centraal in de pathway volgen op Ste20 de sequentiële activatie van een aantal proteïnekinases, namelijk Ste11 (MAPKKK), Ste7 (MAPKK) en Kss1 (MAPK) (Liu, *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1999; Rupp *et al.*, 1999; van Dyk *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 2007). Dit laatste kinase inactieveert de repressors Dig1 en Dig2, waardoor Ste12 en Tec1 niet langer geïnhibeerd worden en een functioneel heterodimeer vormen, dat kan binden met consensussequenties van bepaalde promotors zoals deze van *FLO11* (Liu *et al.*, 1996; Lo & Dranginis, 1997; Rupp *et al.*, 1999; Tamaki *et al.*, 2000; Cullen *et al.*, 2004; Verstrepen & Klis, 2006; Palecek *et al.*, 2007; Sengupta *et al.*, 2007). De *FLO11*-promoterregio bevat namelijk een FRE (filamentous responsive element) in de *Ty1*-sequenties waarop dit complex kan binden, waardoor *FLO11* dus transcriptioneel geactiveerd wordt. Ook het *TEC1*-gen zelf wordt door een dergelijk FRE gereguleerd (Lo & Dranginis, 1997). Voor *FLO1*-expressie is de Kss1-MAPK-signalweg echter geen vereiste (Fichtner *et al.*, 2007). Getuige van het belang van de MAPK-pathway, is de vaststelling dat cellen (S288c) met mutaties in componenten van de MAPK-pathway veel trager matten vormen dan wildtypegiststammen. Onderstreep hierbij echter de stamafhankelijkheid (Reynolds & Fink, 2001).

2.3.1.3. cAMP/PKA pathway

Een derde belangrijke signaalweg voor de regulatie van FLO-genen is de cyclische adenosinemonofosfaat/proteïne-kinase A signaalweg. Belangrijke doelwitten van deze transductiecascade zijn ondermeer sleutelproteïnen in stressresistentie, controle van celgroei, glucosemetabolisme, flocculatie en filamenteuze groei (Tamaki *et al.*, 2000; Gagiano *et al.*, 2002; Braus *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004a; Chen & Fink, 2006; Sprague & Winans, 2006; Verstrepen & Klis, 2006; Van Mulders *et al.*, 2009).

Bovenaan de signaalweg staan twee onafhankelijke activatiesignalen (zie figuur 2.16) die veelal in combinatie met elkaar werken. De aanwezigheid van glucose en sucrose in het medium is in elk geval noodzakelijk om in

een volwaardige activatie van de signaalweg te resulteren. Ten eerste is er de intracellulaire fosforylatie van glucose na opname in de cel. Deze verhoogt de activiteit van het adenylaatcyclase Cyr1, waardoor meer cAMP uit ATP gevormd wordt. Een tweede systeem bestaat uit een G-proteïnegekoppelde receptor – samengesteld uit de receptor Gpr1 en het G α -proteïne Gpa2 – die de glucose- en sucrosegehalten in het extracellulaire medium voelt. Activatie van deze receptor resulteert in de binding van GTP aan Gpa2 dat onder deze vorm instaat voor een verdere stijging van de Cyr1-activiteit, met een kortstondige cellulaire cAMP-piek als gevolg. cAMP activeert vervolgens het proteïne kinase A complex (PKA) in de kern, door te binden aan de negatief regulerende Bcy1-subunits. Hierdoor dissociëren deze van de Tpk katalytische subunits van PKA, die nu hun functie kunnen uitoefenen. Bemerkt dat er drie isovormen van Tpk (Tpk1, Tpk2 en Tpk3) voorkomen, die elk een verschillende functie hebben met betrekking tot de *FLO11*-regulatie (Robertson & Fink, 1998; Chen & Fink, 2006; Peeters *et al.*, 2006; Verstrepen & Klis, 2006). Tpk2 is een activator van Flo8, die kan binden op de promotor van *FLO11* met de activatie ervan als gevolg. Daarnaast kan Tpk2 ook Sfl1 inhiberen, dat dezelfde bindingsplaats heeft als Flo8 en normaal de expressie van *FLO11* inhibeert. Sfl1 vervult echter geen repressieve rol in *FLO11*-regulatie. Tpk1 en Tpk3 hebben een negatieve invloed op pseudohyfaal groei (Robertson & Fink, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Tamaki *et al.*, 2000; Braus *et al.*, 2003; Verstrepen *et al.*, 2004a; Sprague & Winans, 2006; Verstrepen & Klis, 2006; Fichtner *et al.*, 2007). Mutaties in Ras2, Gpr1 of Gpa2 resulteren in een sterk gereduceerde pseudohyfaal groei door te lage cellulaire cAMP-concentraties. Dit kan echter gecompenseerd worden door cAMP toe te voegen aan het medium (Rupp *et al.*, 1999; Tamaki *et al.*, 2000). Wanneer de intracellulaire cAMP-concentratie terug daalt, verliest Bcy1 zijn gebonden cAMP en vormt PKA terug een inactieve tetrameer (Gagiano *et al.*, 2002).



Figuur 2.16: De RAS/cAMP/PKA pathway; zie tekst voor details (Verstrepen & Klis, 2006)

Hoewel de aanwezigheid van glucose of sucrose een belangrijke *switch* is voor de activatie van de cAMP/PKA-siginaalweg, kan deze ook geactiveerd worden door de afwezigheid van een geschikte stikstofbron in het groeimedium. De aanwezigheid van de Gpr1-receptor is hiervoor vereist (Pan *et al.*, 2000; Tamaki, 2007).

Het is echter belangrijk te realiseren dat de cAMP/PKA- en de MAPK-pathway niet los van elkaar te beschouwen zijn. *Crosstalk* tussen beide signaaltransductiewegen speelt namelijk een belangrijke rol in de regulatie van *FLO11* onder stikstoflimiterende omstandigheden (van Dyk *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 2007).

Beide signaalwegen convergeren naar hetzelfde doelwit, namelijk *FLO11*. De promoter van dit gen is zoals reeds eerder vermeld, één van de grootste van het gistgenoom. Deze bevat minstens vier UAS en negen repressorelementen. Zowel de transcriptiefactoren die geactiveerd (of geïnhibeerd) werden door de ene als de andere pathway kunnen op verschillende motieven ervan binden teneinde een goede regulatie van *FLO11* te bekomen (Rupp *et al.*, 1999; van Dyk *et al.*, 2005; Govender *et al.*, 2008).

Daarnaast is er ook communicatie via Ras2, die zowel in de cAMP/PKA- als in de MAPK-cascade als activator fungeert, mogelijk. In de MAPK-pathway activeert Ras2 Cdc42, dat op zijn beurt Ste20 activeert en de hele signaalweg in gang zet. Anderzijds drijft Ras2 in de cAMP/PKA-pathway – samen met Gpa2 – Cyr1 aan, een adenylaacyclase. Op die manier kan Ras2 instaan voor een amplificatie van het Gpa2-siginaal, wat resulteert in een verhoogde signaaloverdracht, hetgeen dan ook in een verhoogde expressie van *FLO11* uitmondt (Sengupta *et al.*, 2007). Bemerkt dat de aanwezigheid van beide pathways vereist is om een volwaardige expressie van *FLO11* te realiseren en bijgevolg een invasief fenotype te verkrijgen. Deleties leiden vaak tot defectiviteit hierin. Uit onderzoek bleek dat *FLO11*-expressie het gevoeligst is voor signalen van de cAMP/PKA-pathway (Sengupta *et al.*, 2007).

In de convergentie van de cAMP/PKA-siginaalweg en de MAPK-siginaalweg speelt ook de transcriptionele activator Mss11 een rol. Het belang ervan is echter nog niet ten volle gekend. Mss11 reguleert in elk geval meerdere genen, waaronder *FLO1* en *FLO11* (van Dyk *et al.*, 2005).

2.3.1.4. Andere cascades

Naast de hierboven beschreven cascades, werd aangetoond dat nog een aantal andere signaaltransductiewegen een rol spelen in de regulatie van de *FLO*-genen. Het betreft ondermeer een *quorumsensing*-pathway en de *Target of Rapamycin* (TOR) pathway. Kennis omtrent hun concrete rol in de regulatie van de *FLO*-genen is echter nog onderwerp van onderzoek en discussie. De TOR-pathway zou net als de MAPK-pathway betrokken zijn in *crosstalk* met de cAMP/PKA-pathway en is onderhevig aan signalen van stikstoftekort in het medium. Een cruciale rol in de regulatie van deze signaalweg zou weggelegd zijn voor het Tap42-fosfatase (Cutler *et al.*, 2001; Gagiano *et al.*, 2002; Verstrepen & Klis, 2006; Sengupta *et al.*, 2007).

2.3.2. Variatie in FLO-expressie op genetische basis

2.3.2.1. Genetische karakteristieken van de giststammen

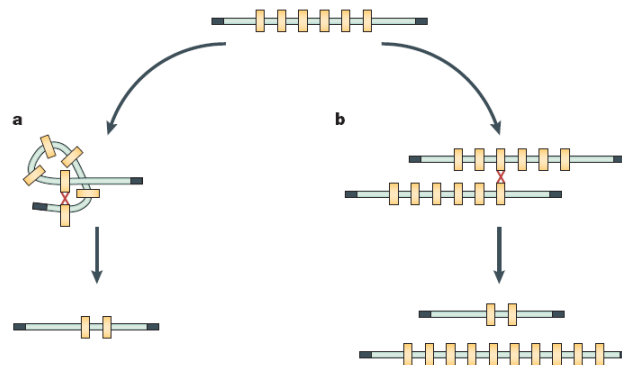
Uit onderzoek is gebleken dat de flocculatie-eigenschappen heel sterk kunnen verschillen van giststam tot giststam. Deze sterke variatie is niet alleen te vinden binnen de industriële gisten maar ook binnen verschillende laboratoriumstammen (van *S. cerevisiae*). Zo draagt de veelgebruikte (laboratorium)stam S288c een *nonsense* mutatie in *FLO8* waardoor noch *FLO1* noch *FLO11* tot expressie kunnen komen. Deze stam kan dan ook niet meer flocculeren, noch invasief groeien. Σ 1278b, een andere vaakgebruikte laboratoriumstam, daarentegen, heeft wel een intacte *FLO8* en kan bijgevolg invasief groeien. Omdat de promotor van *FLO1* echter te sterk gemuteerd is, kan Flo8p zijn rol van transcriptionele activator echter niet meer uitoefenen, zodat cel/cel-adhesie in de Σ 1278b-achtergrond, net als in S288c, onmogelijk is (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen *et al.*, 2005; Van Mulders *et al.*, 2009).

Versillen en variatie in *FLO*-genen uit zich typisch in culturen met kolonies die een gewijzigd adhesie- en flocculatiegedrag vertonen. Daarenboven speelt ook de ploïdie van de stam een rol. Algemeen geldt de regel: hoe hoger de ploïdie, hoe zwakker de adhesieve eigenschappen. *FLO11* is namelijk een ploïdie-onderdrukt gen. Aangezien industriële gisten vaak polyploïd, en dikwijls ook aneuploïd zijn, beschikken zij slechts over heel beperkte adhesie-eigenschappen (Kung, 2000; Akada, 2002).

Los van eventuele expressie, is het belangrijk te noteren dat er binnen de *FLO*-genfamilie zelf sterke verschillen bestaan wat betreft adhesieve capaciteiten. Sequentieanalyses toonden aan dat de variatie binnen deze genfamilie enorm is (Verstrepen *et al.*, 2006; Damas-Buenrostro *et al.*, 2008; Van Mulders *et al.*, 2009). Dit is vooral te wijten aan de inherente eigenschappen van de genen zelf: gelegen in subtelomere domeinen zijn ze, net als bijvoorbeeld bepaalde virulentiegenen bij parasieten als *Trypanosoma spp.*, heel gevoelig voor mutaties en recombinaties. Hierdoor kunnen aan hoge frequentie nieuwe en sterker- of zwakkerbindende adhesines gegenereerd worden (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen *et al.*, 2005; Van Mulders *et al.*, 2009). Zo is het na analyse bij industriële gisten vaak niet meer mogelijk eenduidig uit te maken over welk flocculine het gaat.

Intragenische recombinatie binnen de *FLO*-genen treedt typisch op nabij het centrale domein (zie figuur 2.17). De vele tandemherhalingen zijn namelijk een hotspot voor recombinatie. Hierdoor kunnen heel snel veranderingen in groottes van adhesines gegenereerd worden door slippen van een DNA-polymerase (contracties en expansies) of *outlooping* (contracties). Anderzijds kunnen tengevolge van ongelijke *crossing-over* tussen homologe *FLO*-genen tijdens de G₂-fase van een haploïde cel of bij een meiotische deling van een diploïde cel, verkorte of verlengde adhesines gevormd worden. Dergelijk type van recombinatie komt ook voor bij herstel van dsDNA-breuken (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen *et al.*, 2005; Verstrepen *et al.*, 2006). Contracties in adhesinelengte worden verondersteld storende mutaties te geven in brouwersgisten, omdat flocculines met beperkte flocculatiekarakteristieken kunnen bekomen worden (de adhesiecapaciteit daalt typisch bij minder herhalingsmotieven). Hierdoor vertoont de gist een stoffig karakter en zakt deze weinig of niet uit op het einde van de fermentatie, hetgeen normaal wel gewenst is bij brouwersgisten (Verstrepen *et al.*, 2001; Verstrepen *et al.*, 2005). Zoals hierboven reeds vermeld, kunnen hoogfrequente recombinaties in

pathogene gisten als *C. albicans* een efficiënt ontwijken van het immuunsysteem van de gastheer tot gevolg hebben (Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen *et al.*, 2005; Rando & Verstrepen, 2007).



*Figuur 2.17: Intragenische recombinatie tussen repetitieve domeinen genereert nieuwe allelen. Boxen zijn (repetitieve) nucleotidemotieven. A: intrachromosomale uitlussing geeft oorsprong aan kortere genen met minder herhalingen. B: ongelijke crossing-over tussen homologe chromosomen die niet perfect gealigneerd zijn. Indien de genen op niet-homologe chromosomen gesitueerd zijn, worden 'nieuwe' genen gevormd, ook wel promiscue recombinatie genoemd (Verstrepen *et al.*, 2004b)*

Naast intragenische recombinatie kunnen *FLO*-genen ook intergenisch herschikt worden, die vaak *promiscue* genoemd worden. Dit kan door ongelijke *crossing-over* tussen verschillende (niet-homologe) adhesines waarbij duplicaties of deleties kunnen ontstaan. Dergelijke recombinaties worden verondersteld aanleiding te hebben gegeven tot een aantal pseudogenen in *S. cerevisiae* en kunnen bijgevolg een reservoir zijn voor antigenische variatie (Verstrepen *et al.*, 2004b; Levdansky *et al.*, 2008).

In hun onderzoek stelden Kobayashi en medewerkers (1998) dat *Lg-FLO1* (cf. supra) op een dergelijke manier (recombinatie) zou ontstaan zijn. Dit gen zou een chimeer zijn van twee genen, namelijk het 5'-proximale deel van *YHR211* (*FLO5*) en het 3'-terminale deel van *YAL065* (pseudogen van *FLO1* op chromosoom I). Liu en medewerkers (2007b) detecteerden twee transformanten met *FLONS* en een *FLONL*, genen die sterke homologie vertonen met *FLO1*. Na allignering bleek *FLONS* twee repeats verloren te hebben ten opzichte *FLO1*, terwijl *FLONL* een extra herhaling telde in het centrale domein. Genetische variatie in lengte van de tandemherhalingen werd geassocieerd met verschillende fenotypische karakteristieken.

2.3.2.2. Epigenetische karakteristieken

Naast genetische mechanismen die variatie kunnen genereren, is het essentieel het belang van epigenetica of *genetic imprinting* in subtelomere gebieden te onderkennen. Juist omwille van hun locatie zijn *FLO*-genen namelijk onderhevig aan epigenetische regulatie. Hierbij wordt de 'informatie' niet gedragen door de DNA-sequentie als dusdanig, maar wel door alternatieve dragers zoals de chromatineconformatie, het methylatiepatroon of door prionen. Dergelijk type regulatie kan leiden tot *silencing* van intacte genen (Verstrepen *et al.*, 2004b; Rando & Verstrepen, 2007; Levdansky *et al.*, 2008).

Bij $\Sigma 1278b$ bijvoorbeeld, komt enkel *FLO11* tot expressie, terwijl *FLO1*, *FLO5* en *FLO10* gesilenced zijn. Desalniettemin vormen deze genen een reservoir voor variatie van het celoppervlak. Tot op heden werden

echter nog geen fysiologische condities ontdekt die eventueel kunnen leiden tot een derepressie van deze adhesinegenen (Verstrepen *et al.*, 2004b). Voor hun activatie is er mogelijk een rol weggelegd voor *IRA1* of *IRA2* die coderen voor Ras-GTPase-activerende proteïnen en met hoge frequentie muteren. Zo bleek in $\Sigma 1278b$ *FLO10*, dat normaal gesilenced is, gederepresseerd te worden in aanwezigheid van *IRA*-mutanten en aanleiding te geven tot hyperadhesie en hyperfilamentatie. Deze expressie bleek echter heel onstabiel en uiterst gevoelig voor wisselingen tussen *aan-* en *uitstatus*. In deze studie toonden Halme en medewerkers (2004) verder aan dat de expressie van *FLO11* eveneens onderhevig kan zijn aan epigenetische *silencing* door histondeacetylases.

Tot slot vermoedt men dat de *FLO*-expressie ook kan beïnvloed worden door de aanwezigheid van het onstabiele gistprion PSI^+ . Dit is een erfbare prionvorm van Sup35p, dat translationele terminatie ter hoogte van nonsense codons onderdrukt. Dit is vooral van belang bij stammen zoals S288c die een nonsense mutatie in *FLO8* hebben waardoor *FLO1* en *FLO11* niet tot expressie kunnen komen. Aanwezigheid van PSI^+ kan bijgevolg leiden tot een verhoogde adhesine-expressie (Verstrepen *et al.*, 2004b; Rando & Verstrepen, 2007).

2.3.3. Mediumfactoren die de flocculatie en adhesie beïnvloeden

Naast regulatie via signaalwegen en genetische variatie, dient men er rekening mee te houden dat de condities van het medium zelve de flocculatie of de adhesie danig kunnen beïnvloeden. Alhoewel deze factoren soms zelf een signaalcascade in gang kunnen zetten, dienen ze hier eerder als fysische dan wel fysiologische factoren beschouwd te worden (Verstrepen *et al.*, 2003).

2.3.3.1. Mediumsamenstelling

Meerdere factoren beïnvloeden de adhesieve capaciteiten van gistcellen in een medium. Ten eerste is er de aanwezigheid van ionen. De rol van calciumionen werd hoger reeds benadrukt. De aanwezigheid ervan is noodzakelijk om de adhesines in een actieve conformatie te behouden, alhoewel hun aanwezigheid vooral in het vrije medium vereist is (Miki *et al.*, 1982). Wanneer EDTA of organische zuren (actief toegevoegd of secretie na cellulaire productie), die onder de heersende pH (voldoende hoog) gedissocieerd zijn, toegevoegd worden, kunnen deze calcium complexeren en verliezen de flocculines onmiddellijk hun adhesieve capaciteiten. Dit proces is echter reversibel. Andere kationen kunnen eveneens een rol spelen, alhoewel calcium met voorsprong het belangrijkste werd bevonden om actieve adhesines te verkrijgen. Calciumionen zouden ook helpen om de negatief geladen celoppervlakken te 'breken' en zo de elektrostatische repulsies te beperken. De invloed en het belang van kationen en anionen bleek heel variabel (Stratford, 1989; Soares & Seynaeve, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003; Claro *et al.*, 2007).

Een tweede factor is de koolhydraatsamenstelling van het medium. De aanwezigheid van eenvoudige suikers in voldoende hoge concentraties is vereist om (industriële) gisten in oplossing te houden. Stammen van het Flo1-type staan onder invloed van mannose, terwijl flocculatie van stammen van het NewFlo-type naast mannose ook door andere eenvoudige suikers als glucose en sucrose geïnhibeerd wordt (cf. supra) (Verstrepen *et al.*, 2003). Bemerkt dat het stikstofgehalte eveneens een invloed kan uitoefenen op de flocculatie. In een medium waar geen stikstofbron aanwezig is, maar enkel een metaboliseerbare suiker zoals glucose, wordt een vervroegde flocculatie vastgesteld. Dit is onder een hogere concentratie glucose dan men normaal als kritische

grens voor flocculatie verwacht. Daarnaast zal de groei in een dergelijk medium uiteraard trager zijn. Hierin zouden wel een aantal fysiologische effecten spelen (Sampermans *et al.*, 2005).

Bij gistfermentaties wordt vaak ethanol gevormd. De invloed ervan op de flocculatie bleek uit onderzoek heel variabel: soms wordt deze versterkt, soms juist geïnhibeerd. Hoe ethanol precies een bijdrage levert, is niet geheel geweten alhoewel men vermoedt dat de celwandconformatie en oppervlaktelading erdoor gewijzigd worden (Verstrepen *et al.*, 2003). Jin & Speers (2000) veronderstellen dat de aanwezigheid van ethanol de celwandhydrofobiciteit doet toenemen, waardoor de elektrostatische repulsies verminderd worden. Anderzijds blijft de mogelijkheid ook open dat de toename van ethanol een stressrespons opwekt waarbij de *FLO*-genen geactiveerd worden (Verstrepen *et al.*, 2003). Deze hypothese werd na onderzoek door Claro en medewerkers (2007) echter verworpen: additie van ethanol in verschillende concentraties bleek tot een vervroegde flocculatie te leiden, maar was onafhankelijk van een fysiologische respons.

2.3.3.2. Mediumcondities

Uit onderzoek bleek flocculatie optimaal plaats te grijpen bij pH-waarden tussen de 1,5 en 9, een interval dat ruim de waarden van de fysiologische condities van gist overschrijdt. Optimale flocculatie werd bekomen in lichtzure media met een pH tussen de 3,5 en 5,8. De veronderstelling was dat de protonen de negatieve lading van het celoppervlak konden compenseren om zo de elektrostatische repulsie te verminderen (Jin *et al.*, 2001; Verstrepen *et al.*, 2003). Desalniettemin werden ook stammen gevonden waarbij een goede flocculatie juist een hogere pH-waarde vereiste. Dit wees duidelijk op een sterke stamvariabiliteit (Verstrepen *et al.*, 2003).

Net als de zuurtegraad van het medium is het effect van warmte of warmtestress heel stamafhankelijk. Binnen de fysiologische range (15°C – 32°C) worden doorgaans weinig tot geen effecten vastgesteld, hoewel dit niet te veralgemenen is (Verstrepen *et al.*, 2003). Jin en medewerkers (2001) vonden dat in een stam van het NewFlo-type flocculatie sterk toeneemt met de temperatuur (24,1% bij 5°C tegenover 66,8% bij 25°C). In andere studies bleek sedimentatie en flocculatie dan weer beter te verlopen bij lagere temperaturen (<5°C). Bij hogere temperaturen (>60°C) dissociëren de geflocculeerde gisten typisch, ook wel *smelten* genoemd. Bemerkt dat bij de temperatuur als mediumconditie mogelijk nog (een aantal) onbeschreven secundaire (fysiologische) factoren betrokken zijn (Verstrepen *et al.*, 2003).

In hun onderzoek toonden Lawrence en Smart (2007) de rol van CO₂ in flocculatie op een aantal brouwersgisten van het NewFlo-fenotype (*Ale*-gisten) aan. Hieruit bleek dat de start en de expressie van flocculatie duidelijk gewijzigd kunnen zijn in stammen die onder inductie van CO₂ anaeroob geïncubeerd worden. Daarenboven werd vastgesteld dat de CO₂-geïnduceerde anaerobe incubatie een meer voorspelbare en representatieve flocculatie gaf, in vergelijking met de aerobe incubatie. Wanneer en in welke mate de flocculatie precies gebeurt (anaeroob versus aeroob), bleek ook in dit onderzoek heel sterk te variëren met de stam (Lawrence & Smart, 2007).

Een laatste factor van het medium is de zuurstofconcentratie. Wanneer een wort (suikerrijke oplossing die door gisten tot bier wordt gefermenteerd) goed belucht is, treedt de flocculatie typisch op het einde van de exponentiële groeifase op (Soares & Mota, 1996). Wanneer de beluchting echter gebrekkig is, zal de flocculatie

te vroeg beginnen en onvolledig gebeuren. Hierdoor zal de fermentatie onvolledig opgetreden zijn en zal een bepaalde hoeveelheid fermenteerbare suikers achterwege gebleven zijn. Het is echter mogelijk de slechte groei en flocculatie te herstellen door ergosterol en oliezuur toe te voegen. Hierdoor rijst echter het vermoeden dat zuurstof een indirecte factor is in de flocculatie en onrechtstreeks een rol speelt via zijn belang in de synthese van sterolen en onverzadigde vetzuren (Straver *et al.*, 1993; Verstrepen *et al.*, 2003).

2.3.3.3. Celgebonden eigenschappen

Het is belangrijk zich te realiseren dat een gistpopulatie misschien wel genetisch homogeen is, maar daarom niet genealogisch. Hiermee wordt bedoeld: cellen hebben een verleden en een leeftijd die in ogenschouw moet genomen worden. Oudere cellen flocculeren typisch vroeger en sneller dan dochtercellen van recentere generaties; bijgevolg is flocculatie geen random samenklitten van cellen. Hiervoor zijn een aantal redenen. Ten eerste hebben 'jonge' cellen typisch minder flocculines in hun celwanden (Soares & Mota, 1996; Verstrepen *et al.*, 2003; Powell *et al.*, 2003). Daarnaast zijn oudere cellen een stuk groter; volgens de wet van Stokes zinken deze grotere partikels sneller in een medium. De aanwezigheid van meer *bud scars*, celwandplooien als het ware, vergemakkelijkt de cel/celadhesie. Oudere cellen delen tot slot sneller dan jonge cellen, waardoor oudere vaak met een jonge, kleine cel verbonden zijn. Dit zou nucleatie en dus flocculatie bevorderen (Verstrepen *et al.*, 2003).

3. Materiaal en methoden

3.1. Gebruikte giststammen

Voor de verschillende experimenten werd beroep gedaan op een aantal verschillende giststammen. Het betrof zowel laboratoriumstammen als industriële giststammen, weergegeven in tabel 3.1:

<i>Giststam</i>	<i>Type stam</i>	<i>Beschrijving/genotype</i>
Σ1278b Mata	Laboratoriumstam	Mata <i>leu2::hisG trp1::hisG his3::hisG ura3-52</i> (Laizé et al., 2000)
Σ1278b Mata	Laboratoriumstam	Mata <i>leu2 ura3</i> (Laizé et al., 2000)
BY4742 (S288c)	Laboratoriumstam	Mata <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> (Brachmann et al., 1998)
CBS 1513 <i>Saccharomyces pastorianus</i> var. <i>Pastorianus</i> 150	Industriële stam	Brouwersstam, <i>lager</i> -type
CMBS VM13	Industriële stam	Industriële bioethanolstam
CMBS VM14	Industriële stam	Industriële bioethanolstam
CMBS VM16	Industriële stam	Brouwersstam, <i>ale</i> -type
CMBS VM17	Industriële stam	Brouwersstam, <i>ale</i> -type

Tabel 3.1: Overzicht van de gebruikte laboratoriumstammen en industriële giststammen.

3.2. Groei en bewaring van culturen

3.2.1. Gebruikte groeimedia

- ✓ YPD (vloeibaar)
 - Yeast extract 10g/l (LabM)
 - Pepton 20g/l (LabM)
 - D-glucose 20g/l – 80g/l (Sigma-Aldrich)
- ✓ YPD (vast), kan gesupplementeerd worden met antibiotica voor de selectie van transformanten (resistentiemerker dragend)
 - Yeast extract 10g/l (LabM)
 - Pepton 20g/l (LabM)
 - D-glucose 20g/l (Sigma-Aldrich)
 - Agar no.1 20g/l (LabM)
 - (Geneticine eindconcentratie: 100µg/ml) (Invitrogen)
 - (Zeocine eindconcentratie: 100µg/ml) (Invitrogen)
- ✓ YPGal (vloeibaar)
 - Yeast extract 10g/l (LabM)

- Pepton 20g/l (LabM)
- D-galactose 20g/l (Fluka)
- ✓ Luria-Bertani (vloeibaar), kan gesupplementeerd worden met antibiotica voor de selectie van transformanten (resistentiemerker dragend)
 - Bacto-trypton 10g/l (LabM)
 - NaCl 10g/l (VWR International)
 - Bacto-yeast 5g/l (LabM)
 - pH 7,5, aangepast met NaOH 10% (Merck) voor autoclaveren
 - (Ampicilline eindconcentratie: 100µg/ml) (MP Biomedicals LCC.)
- ✓ Luria-Bertani (vast), kan gesupplementeerd worden met antibiotica voor de selectie van transformanten (resistentiemerker dragend)
 - Bacto-trypton 10g/l (LabM)
 - NaCl 10g/l (VWR International)
 - Bacto-yeast 5g/l (LabM)
 - Agar 20g/l (LabM)
 - pH 6,5, aangepast met NaOH 10% (Merck) voor autoclaveren
 - (Ampicilline eindconcentratie: 100µg/ml) (MP Biomedicals LCC.)
- ✓ SC-aa (*synthetic complete medium without 'amino acid'*) (vast): SC-ura, SC-his en SC-leu
 - Ammoniumsulfaat 5g/l (Merck Eurolab)
 - D-glucose 20g/l (Sigma-Aldrich)
 - Agar 20g/l (LabM)
 - YNB (*Yeast Nitrogen Base*) zonder aminozuren, zonder ammoniumsulfaat 1,7g/l (MP Biomedicals LCC.)
 - CSM-ura/CSM-his/CSM-leu (*Complete Supplement Mixture*) 0,77g/l (MP Biomedicals LCC.)
 - pH 6,5, aangepast met NaOH 10% (Merck) voor autoclaveren

Bemerk dat antibiotica omwille van thermodegradatie pas na het autoclaveren aan de media mogen toegevoegd worden wanneer dit voldoende afgekoeld is. Wegens Maillardreacties werd D-glucose (Sigma-Aldrich) (vanuit een geautoclaveerde stockoplossing van 40%) pas na het autoclaveren aan media toegevoegd.

3.2.2. Propagatie en celverzameling

De propagatie van gisten gebeurde door te enten in 5ml vloeibare YPD. Deze proefbuizen werden vervolgens geïncubeerd op 30°C en geschud aan 150tpm. Na minstens 5u kon – zo nodig – naar erlenmeyers met 50ml YPD overgeënt worden (volume voor de overenting afhankelijk van de celdensiteit in de proefbuizen), die op hun beurt geïncubeerd werden, en dit onder dezelfde condities (30°C, 150tpm).

De cellen konden vanuit een vloeibare cultuur verzameld worden na centrifugatie. De erlenmeyers van 50ml werden hiertoe overgebracht naar steriele falcons. Wanneer beperkte celhoeveelheden gewenst waren, werd 1,5ml cultuur overgebracht naar een steriele eppendorftube. De falcons en epjes werden hierna

gecentrifugeerd (5min, 3000rpm) (5415R (Eppendorf®), 5810 (Eppendorf®)). Na verwijdering van het medium door afgieten en afpipetteren, konden de cellen opgelost worden in een EDTA-oplossing (50mM, pH7) (Fluka) voor deflocculatie of in fysiologisch water.

3.2.3. Bewaring van giststammen

Omdat gistcellen zouden beschadigd geraken (door kristalvorming) wanneer ze ingevroren worden bij -80°C, werden de stammen bewaard in een glyceroloplossing (YP-glycerol 30%). Stammen die frequent gebruikt werden, konden (op agarplaten) bij 4°C in de frigo bewaard worden. Na ongeveer een maand werd een nieuwe streepenting uitgevoerd op een verse YPD-plaat.

- ✓ YP-glycerol 30%
 - Yeast extract 10g/l (LabM)
 - Pepton 20g/l (LabM)
 - 30% v/v 87% glycerol (Merck)

3.2.4. Bepalen van de optische densiteit

Om een maat voor de celconcentratie in oplossing te hebben, werd gebruik gemaakt van een optische-densiteitsmeting. Deze werd bepaald door de absorptie bij 600nm te meten met behulp van de Biowave DNA Life Science (WPA). Een OD-waarde van 0,1 kwam hierbij ongeveer overeen met een celdensiteit van 1.10^6 cellen/ml. Bemerkt dat extrapolaties van resultaten op deze manier verkregen, enkel geldig waren binnen het lineaire gebied ($0,080 < OD < 0,8$).

METHODE

1. Cuvetten van 1,5ml werden gevuld met celoplossingen en verdunningen hiervan, die zeker binnen het lineaire gebied vielen. Flocculatie kon opgeheven worden met een EDTA-oplossing (50mM) (Fluka).
2. De spectrofotometer werd gekalibreerd met een blankostaal (zuivere EDTA-oplossing).
3. De absorptie van de verschillende stalen werd bij 600nm opgemeten.

3.3. Isolatie van nucleïnezuren

3.3.1. Isolatie van genomisch DNA uit *S. cerevisiae* volgens de fastprep-methode

BUFFERS EN OPLOSSINGEN

- TE-buffer: EDTA 1mM (VWR International), Tris-HCl 10mM (pH 8) (Fluka)
- Glasbollen: diameter 0,45mm (Sigma)
- PCI (25/24/1): fenol (pH 6), chloroform, isoamylalcohol (Fluka)
- Diethylether (Biosolve)

WERKWIJZE

1. Een kolonie werd opgepikt van een agarplaat en overgeënt in 5ml YPD en overnacht gegroeid op 30°C.

2. 1,5ml van deze cultuur werd overgebracht in een 2ml tube met schroefdop en gedurende 2min gecentrifugeerd aan 5000tpm, 20°C.
3. Het supernatans werd verwijderd en de gistcellen werden opgelost in 150µl TE-buffer. Hieraan werden achtereenvolgens 250µl glasbolletjes (diameter 0,45mm) en 150µl PCI toegevoegd (onder trekkast).
4. De buisjes werden gedurende 20s geschud aan 6m/s in een *fastprep*[®] dissicator (MP Biomedicals LCC.) met disruptie van de celwanden als gevolg.
5. De buisjes werden gedurende 10min gecentrifugeerd op 13200tpm bij 20°C.
6. Van de bovenste, waterige fase werd 100 tot 150µl overgebracht in een nieuwe eppendorftube, waaraan nog 800µl diethylether werd toegevoegd.
7. De epjes werden gedurende 15s gevortext.
8. Na 2min werden de epjes gecentrifugeerd gedurende 10 minuten (13200tpm, 4°C).
9. De etherlaag (bovenaan) werd verwijderd en de epjes werden gedurende 2u onder de laminaire flow geplaatst, om de resterende diethylether te laten verdampen.
10. Het geïsoleerde DNA werd bewaard op -20°C. De opbrengst en zuiverheid/kwaliteit van het genomisch DNA werden spectrofotometrisch bepaald (zie verder).

3.3.2. Isolatie van plasmide DNA uit *E. coli* volgens de CTAB-methode – Mini preps

Naar de methode van: Del Sal *et al.* (1988) *A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing.* Nucleic acids research. 16(20): 9878

BUFFERS EN OPLOSSINGEN

- STET: sucrose 8% w/v (Fluka), Triton X-100 0,1% v/v (Roche), EDTA 50mM (VWR International), Tris-HCl 50mM (Fluka)
- CTAB: cetyl-trimethyl-ammoniumbromide 5% w/v (Sigma-Aldrich)
- Lysozyme: 50mg/ml (Roche)
- NaCl: 1,2M (Fisher Scientific)
- TE-buffer: EDTA 1mM (VWR International), Tris-HCl 10mM (pH 8) (Fluka)
- Ethanol: 100% (VWR International)

WERKWIJZE

1. Kolonies van *E. coli* werden overgeënt van LB-agarplaten met ampicilline naar 5ml LB-medium met ampicilline en overnacht opgegroeid bij een temperatuur van 37°C.
2. 1,5ml van de cultuur werd overgebracht in een eppendorftube. De cellen werden verzameld door de na centrifugatie (5min, 3000tpm, 20°C).
3. Het supernatans werd verwijderd en de celpellet heropgelost in 300µl STET en 3µl lysozymeoplossing.
4. Het mengsel werd gedurende 5 minuten op kamertemperatuur geïncubeerd en vervolgens verwarmd tot 95°C à 100°C (in *heat block*) gedurende 1 minuut.
5. De eppendorftube werd gecentrifugeerd (13200tpm, 10-15min.).
6. De pellet werd verwijderd met een steriele tandenstoker of pipettip.

7. Aan de oplossing in het epje werd 6µl CTAB toegevoegd. Het epje werd hierna gevortext en gecentrifugeerd (13200tpm, 10-15min.).
8. Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd opgelost in 300µl NaCl-oplossing (1,2M) door op en neer pipetteren.
9. 750µl ethanol (100%) werd toegevoegd aan de oplossing.
10. Het epje werd hierna gecentrifugeerd (13200tpm, 5-10min.); het supernatans werd verwijderd en afgepipetteerd.
11. Het epje werd gedurende 5min blootgesteld aan de lucht om te drogen.
12. Tot slot werd de pellet opgelost in 50µl TE-buffer. De opbrengst en zuiverheid/kwaliteit van de plasmide-oplossing werden spectrofotometrisch bepaald (zie verder).

3.3.3. Isolatie van RNA

BUFFERS EN OPLOSSINGEN

- Chloroform (Fisher-Scientific)
- Glasbollen: diameter 0,45mm (Sigma)
- Isopropanol (BDH)
- Ethanol 75% (VWR International)
- Nuclease-vrij water (Promega)
- *TRIZOL*[®] reagent (Invitrogen)

WERKWIJZE

1. In een tube (2ml) met schroefdop werden ongeveer $150 \cdot 10^6$ cellen gebracht. De cellen werden verzameld door centrifugatie (5min, 3000tpm) en het supernatans werd verwijderd.
2. De celpellet werd opgelost in 500µl *TRIZOL*[®] reagent door op- en neerpipetteren. Hieraan werd 500µl glasbollen toegevoegd.
3. De buisjes werden gedurende 20s geschud aan 6m/s in een *fastprep*[®] dissicator (MP Biomedicals LCC.) met disruptie van de celwanden als gevolg.
4. De buisjes werden onmiddellijk gekoeld op ijs. Hierna werd opnieuw 500µl *TRIZOL*[®] reagent toegevoegd waarna de buisjes 5min op kamertemperatuur geïncubeerd werden.
5. De tubes werden vervolgens gecentrifugeerd (15min, 13200tpm, 4°C).
6. De *TRIZOL*[®] suspensie werd overgebracht naar een steriel epje. Hieraan werd 200µl chloroform toegevoegd. De epjes werden gevortext (10s) en 3min op kamertemperatuur geïncubeerd.
7. De epjes werden hierna gecentrifugeerd (15min, 13200tpm, 4°C).
8. De waterige fase werd overgebracht naar een steriel epje. Hieraan werd 500µl isopropanol toegevoegd en gemengd door 10x te inverteren. De epjes werden hierna 10min op kamertemperatuur geïncubeerd.
9. De epjes werden vervolgens gecentrifugeerd (15min, 13200tpm, 4°C) en het supernatans werd verwijderd (aandacht ging ernaar uit de pellet niet te verstoren).

10. De pellet werd gewassen met 1ml ethanol. De epjes werden gedurende 10s gevortext en gecentrifugeerd (15min, 13200rpm, 4°C).
11. Hierna werd het supernatans verwijderd en voorzichtig afgepipetteerd. De epjes werden 5min onder de laminaire flow geplaatst totdat de randen van de pellet glazig werden.
12. De pellet werd tot slot opgelost in 50µl Rnase-vrij water. Het RNA werd bewaard bij -80°C. De opbrengst en de zuiverheid/kwaliteit van het RNA konden spectrofotometrisch bepaald worden (zie verder).

3.3.4. Opbrengst- en kwaliteitsbepaling

Om de concentratie van het DNA/RNA te bepalen, alsook de effectiviteit van wasstappen in de isolatieprocedure, kon de absorptie bij 260nm (UV-bereik) van het staal nagegaan worden. Dit gebeurde spectrofotometrisch met behulp van de *Traycell* (Biowave DNA Life Science, WPA). 3µl milliQ-water werd initieel op de opening van de Hëllmacuvet gepipetteerd ter kalibratie. Na reiniging van het meetoog met ethanol 70% werd telkens 3µl staal aangebracht.

Een absorptie A_{260nm} van 1 kwam hierbij overeen met een DNA-concentratie van 50ng/µl of een RNA-concentratie van 40ng/µl. De gemiddelde extinctiecoëfficiënt voor dsDNA was 50, voor ssDNA 37, voor RNA 40 en voor oligonucleotiden 33. De kwaliteit van het geïsoleerde DNA, werd bepaald door A_{260nm}/A_{280nm} . Voor zuiver, kwalitatief DNA bedroeg deze factor ongeveer 1,8, voor plasmide DNA rond de 2,0 en voor RNA tussen de 1,9 en 2,1. Afwijkende (te lage) waarden wezen typisch op een fenolcontaminatie (tengevolge van de extractie, zie 3.3.1.).

3.4. PCR – Polymerase chain reaction

3.4.1. Gebruikte primers

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
91	ACT1-qPCR-FW	CGTCTGGATTGGTGGTTCTA
92	ACT1-qPCR-RV	GTGGTGAACGATAGATGGAC
93	FLO1F	TAGCTGCTGAGACGATTACCAA
94	FLO1R	GCGTGATTAGATCTTGAAAGCGAA
95	FLO11F	GTTCAACCAGTCCAAGCGAAA
96	FLO11R	GTAGTTACAGGTGTGGTAGGTGAAGTG
97	TEF1F	GCTGGTGGTGTGGTGAATT
98	TEF1R	GCGTGTTCTGTTTTGACCAT
110	FLO10-qPCR-FW	CGTTTTGACAGCCACTGCTA
111	FLO10-qPCR-RV	GTGGGCTCCATGTGGAATAAA
122	YAR062w-qPCR-FW	AAGTTCTTACAGTTCAGTTTTCGTAAG
123	YAR062w-qPCR-RV	CACAACATTCGAACGCAACGTT
124	LgFLO1-qPCR-FW	CGTAGCATCAGGAAGTACACAAGCAT
125	LgFLO1-qPCR-RV	CATATATTGCGGGTTCGGAATACGT
126	YAR061W-qPCR-FW	CTTATCACTATTTATTTTTGGCACTCTTCA
127	YAR061W-qPCR-RV	TGCTTGTGTACTTCTGAAACAACAT
128	LgFLO1-qPCR-FW2	GTACGCCGGTACTATTACCCGAT
129	LgFLO1-qPCR-RV2	GGAAGCCTAGCCAAGACTTTAGCAT
130	FLO1-qPCR-FW	ATCGCTATATGTTTTGGCAGTCTTTA
131	FLO1-qPCR-RV	GTAAGCACGCCTCTGTGGCT
132	FLO5-qPCR-FW	GCACACCACTGCATATTTTTGGTAA

133	FLO9-qPCR-FW	TTATTGTTTACTACTAGCCATCGTCACA
134	FLO9-qPCR-RV	AAGTTTACATTCATACCATTCTTCTTGA
135	ACT1-TAQqPCR-FW	CTCCACCACTGCTGAAAGAGAA
136	ACT1-TAQqPCR-RV	CCAAGGCGACGTAACATAGTTTT

Tabel3.2: Primers gebruikt in Real-Time PCR, PCR's naar FLO-variabiliteit en transformatievalidatie.

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
179	MAT	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
180	MAT α	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
181	MAT α	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG

Tabel3.3: Primers voor het bepalen van het matingtype.

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
137	FLO1_TEF_FW	TTCCGGGTTCTTATTTTTAATTCTTGTCCACAGTAAACA GAACATCCAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
138	FLO1_TEF_RV	AGTGCCAGAAGGTAAAGACTGCCAAAAACATATAGC GATGAGGCATTGTCATCGATGAATTCTCTGTCG
139	FLO5_TEF_FW	CAGTAAATCCGCAATGATTTTCTTTAAATTGATTAGC ACCACTAAAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
140	FLO5_TEF_RV	TAATTAGTGCCAGAAAGGCCAAGATTACAAAAATATG CAGTGGTGTGCAATTGTCATCGATGAATTCTCTGTCG
141	FLO9_TEF_FW	GCTCTTTAAATTGCAATTTAAAAAGAACAATTGTACAAT AAAAGCCCCAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
142	FLO9_TEF_RV	TAGTTAATCCCAGCAATGTGACGATGGCTAGTAGTAA CAATAATGTGCCAGAGACATCGATGAATTCTCTGTCG
143	FLO10_TEF_FW	TTACGTTGAAGATTTGTTTTAGGGTGCTTAATCAAAGA ACAACAAATAAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
144	FLO10_TEF_RV	TAGCTACAGATAGCAAAAATAGGCCGGTCAAAAATAT ATATCGAGCAGCCACAGGCATCGATGAATTCTCTGTCG
145	FLO11_TEF_FW	TTCTAATTAATAATACTTTTGTAGGCCTCAAAAATCCA TATACGCACACTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
146	FLO11_TEF_RV	AAGCCGAGTTAAATAGAAGCGAAAGGACCAATAAGC GAGTAGAAATGGTCTTGCATCGATGAATTCTCTGTCG

Tabel3.4: Primers voor de aanmaak van de overexpressiecassettes en chimere cassettes voor de verschillende FLO-genen. Sequentie in vet: nucleotidenhomologie met het plasmide. Sequentie gewoon: nucleotidenhomologie met het tot overexpressie te brengen FLO-gen.

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
230	FLO1_KO_FW	TTCCGGGTTCTTATTTTTAATTCTTGTCCACAGTAAACAG AACATCCAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC
231	FLO5_KO_FW	CAGTAAATCCGCAATGATTTTCTTTAAATTGATTAGC ACCACTAAAAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC
232	FLO9_KO_FW	GCTCTTTAAATTGCAATTTAAAAAGAACAATTGTACAAT AAAAGCCCCAAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC
233	FLO10_KO_FW	TTACGTTGAAGATTTGTTTTAGGGTGCTTAATCAAAGAA CAACAAATAAAAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC
234	FLO11_KO_FW	TTCTAATTAATAATACTTTTGTAGGCCTCAAAAATCCAT ATACGCACACTCAGCTGAAGCTTCGTACGC
235	FLO1_KO_RV	TAAGAAGCGCAAGAATTATCATTTAGTCAATTTGAATAT TTGAAAGTATGGAGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
236	FLO5_KO_RV	TAAATATAAAAAGAACAAGCACATACTTTAAATAACTAAT TATCCCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
237	FLO9_KO_RV	CGGAATCTAATCTGAAAGTTAAAAAATTTCTTACGATAT TCTTATCATAAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
238	FLO10_KO_RV	GACGAATCGTAGACGCAGAAGTATCAATCCAAAGGATA TTTCTGCACCTAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
239	FLO11_KO_RV	ATTAAGAATGAAAACATCGTAATGAAGAAACGAACAT GTTGGAATTGTATCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG

Tabel3.5: Primers voor de aanmaak van de deletiecassettes voor de verschillende FLO-genen. Sequentie in vet: nucleotidenhomologie met het plasmide. Sequentie gewoon: nucleotidenhomologie met het te deleteren FLO-gen.

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
165	KANMX_FW	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
247	loxPble219-237_FW	CATTTAGCCCATACATCCC
248	loxPble982-999_FW	CCTCGACATCATCTGCC
256	loxPble237-219_RV	GGGATGTATGGGCTAAATG
257	loxPble999-982_RV	GGCAGATGATGTCGAGG
260	KANMX_RV	CATCGATGAATTCTCTGTCG
262	KANMX_FW	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
313	URA3_FW1	GGGGTCATGATTAGCCAA
314	URA3_RV1	GGGTAGAAGATCGGTCTG

Tabel3.6: Primers voor de verificatie van integratiesite van deletie- en overexpressiecassettes, gelegen op plasmides.

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
242	FLO1up604-587_FW	ATAGGGAGGCATCATGGT
243	FLO5up219-199_FW	GTGTAACACTATTGGTAGAG
244	FLO9up235-214_FW	CTCAAAATCTATCGGGTGG
245	FLO10up399-382_FW	GTTGTTGTGATCCGTCAC
246	FLO11up376-359_FW	GATTCAAGGCATCATCGC
250	FLO11up19-1_FW	AAAATCCATATACGCACACT
251	FLO1down660-641_RV	TTTTGGTGCACCTTTACACC
252	FLO5down1367-1344_RV	ATTCTTGCGATATTTTTATCAT
253	FLO9down1476-1455_RV	AAATATCAGCAGTTATCAAAGC
254	FLO10down439-419_RV	CAGCTGTTGGTTGACTTTATG
255	FLO11down723-704_RV	TGTCGTTCTATCTCGGAAT
258	FLO11down1-22_RV	CGAACATGTTGGAATTGTATCA
261	GPI_RV_1	GGTGTGCTACGAGGCTGTT
263	GPI_RV_2	CAGGTGAAGTAGTTTCGGAAC
264	GPI_RV_3	TAATTGCCAGCAATAAGGACG

Tabel3.7: Primers voor de verificatie van de integratiesite van de deletie- en overexpressiecassettes, gelegen op genomisch DNA.

Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
302	FLO10_RV_847-864_FLO11	GTACCGCCACAATTATTGTCACAATCTATGTTCCAATA GAAGCCTGGGAAT GGAAACGGAAACAGTGAGC
303	FLO11_RV_614-633_FLO10	GATACACAAGTTCTTGATGCTCAGCAGGGTTTGGAA CGGAACAGTGAGCAGAT GACTTCGTACCGCCAC

Tabel3.8: Primers voor de aanmaak van chimere cassettes. Sequentie in vet: nucleotidenhomologie met distaal uiteinde van N-terminaal domein overexpressiestam. Sequentie gewoon: nucleotidenhomologie met distaal deel van N-terminaal domein van FLO voor de constructie van een chimeer (acceptorstam).

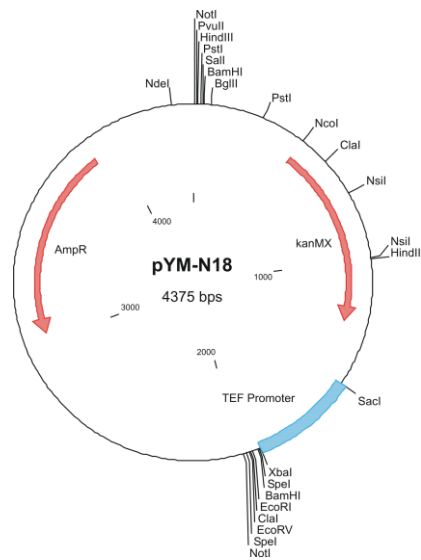
Nr.	Primernaam	Sequentie (5' → 3')
315	FLO1_REPS_FW1	CTAAGTCAATCTAACTGTAAGTGTCCCTGA
316	FLO1_REPS_RV1	GTAGTTGGAGTTTTGACAACAATGACAGTT
317	FLO5_REPS_FW1	AAGGGTACGTTTACTCTTTTGACGATGACC
318	FLO5_REPS_RV1	ACTGAAGAAGAAATTACTGAGGAGGAAATC
319	FLO9_REPS_FW1	TCTAAGCCAGCCAACTGTACCATTCCAGA
320	FLO9_REPS_RV1	GTAGTTGGAGTTTTGACAATAATGACAGTT
321	FLO10_REPS_FW1	TTTCTTTGACGATAATGCTACTCAAGCTC
322	FLO10_REPS_RV1	AAAGACGTCATGGTATTGGAAGTTGAAGCG
323	FLO11_REPS_FW1	TAGTGCCGCTCAATATGCAAGCTCCTGGCA
324	FLO11_REPS_RV1	TGTTTACTGCCAGGGTATTGGATGATGA

Tabel3.9: Primers voor de bepaling van de lengte van de tandemherhaling van de verschillende FLO-genen.

3.4.2. Plasmiden

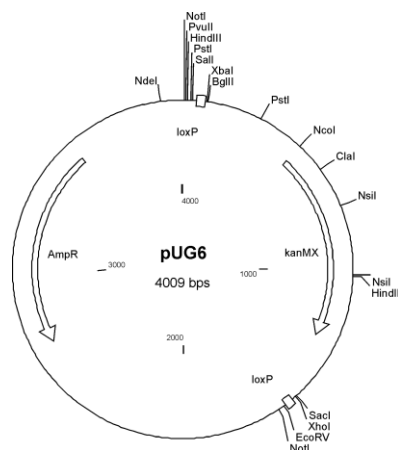
Voor de amplificatie van cassettes werden meerdere plasmiden gebruikt. Voor gebruik en functionele onderdelen: zie verder. Deze plasmiden werden allen commercieel aangeboden door EUROSCARF™.

3.4.2.1. pYM-N18



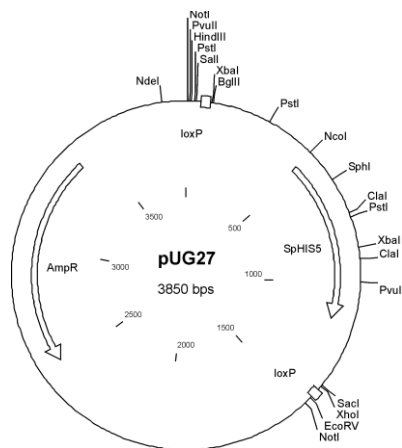
Figuur3.1: Plasmide pYM-N18, commercieel aangeboden door EUROSCARF™. pYM-N18 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), KANMX (resistentie tegen kanamycine, voorafgegaan door een gistspecifieke promoter), de constitutieve TEF1-promoter (actief in gist).

3.4.2.2. pUG-6



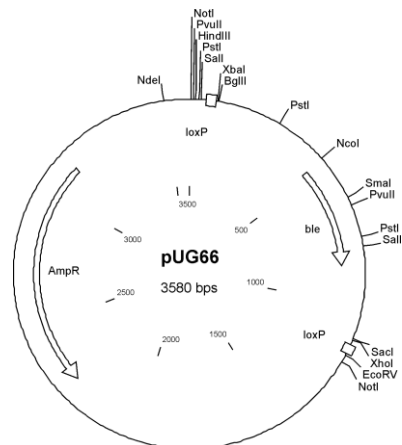
Figuur3.2: Plasmide pUG6, commercieel aangeboden door EUROSCARF™. pUG6 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), KANMX (resistentie tegen kanamycine, voorafgegaan door een gistspecifieke promoter) gelegen tussen twee LoxP-sites.

3.4.2.3. pUG-27



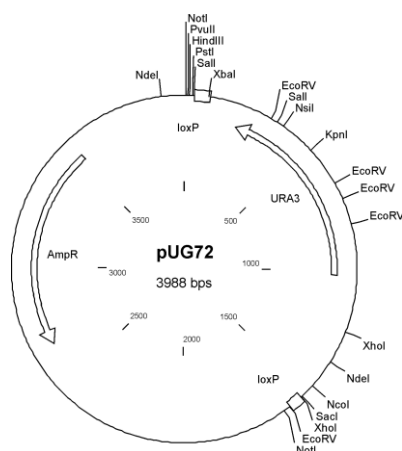
Figuur3.3: Plasmide pUG27, commercieel aangeboden door EUROSCARFTM. pUG27 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), SpHIS5 (complementatie auxotrofe mutatie in gist, voorafgegaan door een gistspecifieke promoter) gelegen tussen twee LoxP-sites.

3.4.2.4. pUG-66



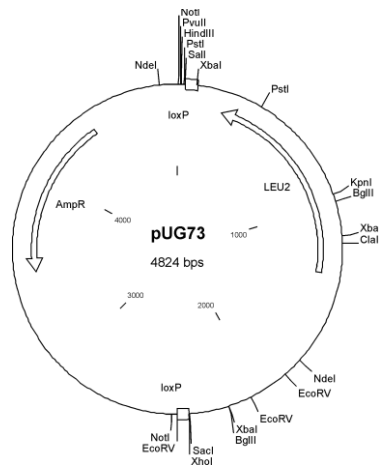
Figuur3.4: Plasmide pUG66, commercieel aangeboden door EUROSCARFTM. pUG66 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), BLE (resistentie tegen zeocine, voorafgegaan door een gistspecifieke promoter) gelegen tussen twee LoxP-sites.

3.4.2.5. pUG-72



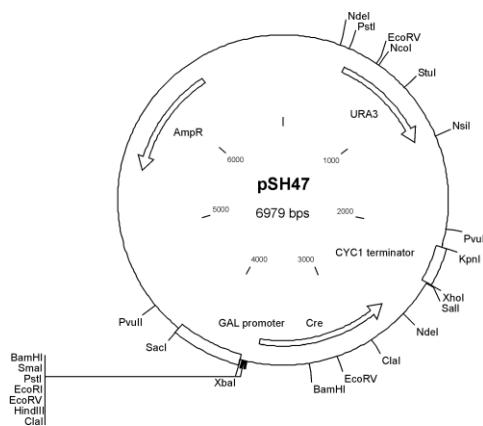
Figuur3.5: Plasmide pUG72, commercieel aangeboden door EUROSCARFTM. pUG72 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), URA3 (complementatie auxotrofe mutatie in gist, voorafgegaan door een gistspecifieke promoter) gelegen tussen twee LoxP-sites.

3.4.2.6. pUG-73



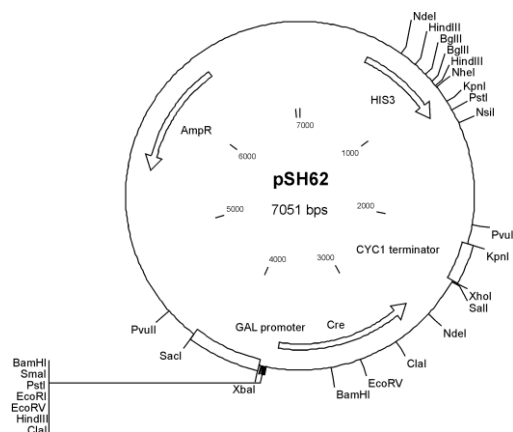
Figuur3.6: Plasmide pUG73, commercieel aangeboden door EUROSCARF™. pUG73 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), LEU2 (complementatie auxotrofe mutatie in gist, voorafgegaan door een gistspecifieke promotor) gelegen tussen twee LoxP-sites.

3.4.2.7. pSH47



Figuur3.7: Plasmide pSH47, commercieel aangeboden door EUROSCARF™. pSH47 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), URA3 (complementatie auxotrofe mutatie in gist, voorafgegaan door een gistspecifieke promotor), Cre na induceerbare GAL-promoter.

3.4.2.8. pSH62



Figuur3.8: Plasmide pSH62, commercieel aangeboden door EUROSCARF™. pSH62 bevat AMP^R (selectiemerker plasmide in *E. coli*), HIS3 (complementatie auxotrofe mutatie in gist, voorafgegaan door een gistspecifieke promotor), Cre na induceerbare GAL-promoter.

3.4.3. Algemene PCR

3.4.3.1. Samenstelling van de PCR-mix en temperatuurprofielen

Een PCR-reactie bestaat uit een cyclisch verloop van een aantal temperatuurfases, te weten denaturatie van dsDNA, primerbinding (hybridisatie) en elongatie. Naargelang de gebruikte primer (lengte en GC-gehalte) en de lengte van het te verwachten dsDNA-product, werden de primerbindingstemperatuur en -tijd, respectievelijk de elongatietijd gewijzigd. 'Standaard' werd een annealingtemperatuur van 58°C, een elongatietemperatuur van 72°C en voor de denaturatie (smelten) van het dsDNA een temperatuur van 94°C, gebruikt. Een elongatietijd van 1min liet de amplificatie van een streng van ongeveer 1000bp toe, hoewel polymerases ten opzichte van elkaar hierin wel konden verschillen. De samenstelling van het PCR-epje om dergelijke amplificatie te bekomen, lag echter min of meer vast (hoewel afwijkingen ook hier mogelijk zijn) (zie tabel 3.10, tabel3.11, tabel3.12).

PCR-reactie	Volume	Eindconcentratie
H ₂ O	17,4µl	
dNTPs (10mM) (Westburg)	1µl	400µM
Taq DNA-polymerase (5U/µl) (New England Biolabs)	0,1µl	0,5U
Forward primer (10µM) (Sigma genosys)	1,25µl	0,5µM
Reverse primer (10µM) (Sigma genosys)	1,25µl	0,5µM
Thermopol buffer (5x) (New England Biolabs)	2,5µl	1x
MgCl ₂ (Roche)	0,5µl	0,5mM
gDNA	1µl	±40ng/µl
TOTAAL	25µl	

Tabel3.10: Componenten van een PCR-reactie met Taq DNA-polymerase voor de detectie/bevestiging van de aanwezigheid van deletie- of overexpressiecassettes ter hoogte van de verschillende FLO-genen en voor het nagaan van variatie binnen de FLO-genfamilie tussen verschillende species.

PCR-reactie	Volume	Eindconcentratie
H ₂ O	31µl	
dNTPs (10mM) (Westburg)	2µl	400µM
Expand High Fidelity ^{PLUS} DNA-polymerase (5U/µl) (Roche)	0,5µl	2,5U
Forward primer (10µM) (Sigma genosys)	2,5µl	0,5µM
Reverse primer (10µM) (Sigma genosys)	2,5µl	0,5µM
Expand High Fidelity ^{PLUS} buffer met MgCl ₂ (5x) (Roche)	10µl	1x
MgCl ₂ (25mM) (Roche)	0,5µl	0,5mM
gDNA of plasmide DNA	1µl	±20ng/µl
TOTAAL	50µl	

Tabel3.11: Componenten van een PCR-reactie met Expand High Fidelity^{PLUS} PCR system (Roche) voor de amplificatie van deletie- of overexpressiecassettes vertrekkende vanaf plasmides of overexpressiestammen. Een volume van 50µl was hier gewenst om voldoende DNA te hebben om mee te transformeren. Het gebruik van Expand High Fidelity^{PLUS} DNA-polymerase boven Taq verklaarde zich een lagere error rate van eerstgenoemde.

PCR-reactie	Volume	Eindconcentratie
H ₂ O	14,5µl	
dNTPs (10mM) (Westburg)	1µl	400µM
Longe Range DNA-polymerase (5U/µl) (Roche)	0,25µl	1,25U
Forward primer (10µM) (Sigma genosys)	1,25µl	0,5µM
Reverse primer (10µM) (Sigma genosys)	1,25µl	0,5µM
Long Range buffer met MgCl ₂ (5x) (Roche)	5µl	1x
DMSO (100%) (Roche)	0,75µl	3%
gDNA	1µl	±40ng/µl
TOTAAL	25µl	

Tabel3.12: Componenten van een PCR-reactie met Expand Long Template PCR system (Roche) voor de amplificatie van lange fragmenten (>4kb) ter bevestiging van de aanwezigheid van overexpressiecassettes ter hoogte van de verschillende FLO-genen.

Zoals hierboven reeds vermeld, waren variaties in temperatuursprofielen mogelijk. Hieronder volgen een aantal 'standaardprofielen' voor de verschillende polymerases respectievelijk (zie tabel3.13, tabel3.14, tabel3.15). De PCR-reacties werden uitgevoerd in de MJ Mini™ Thermal Cycler (Biorad) en de Biometra® (Westburg).

Temperatuursprofiel PCR-reactie		
	94°C	2min
25cycli	94°C	15s
	58°C	30s
	72°C	1min
	72°C	5min
	10°C	∞

Tabel3.13: Temperatuursprofiel van een standaard PCR-reactie met Taq DNA-polymerase ter amplificatie van een fragment van ongeveer 1000bp.

Temperatuursprofiel PCR-reactie		
	98°C	2min
10cycli	98°C	20s
	58°C	30s
	72°C	1min
	72°C	1min
20cycli	98°C	20s
	58°C	30s
	72°C	1min
	72°C	1min + 5à20s/cyclus
	72°C	5min
	10°C	∞

Tabel3.14: Temperatuursprofiel van een PCR-reactie met Expand High Fidelity^{PLUS} DNA-polymerase ter amplificatie van een fragment van ongeveer 1000bp. Temperatuursprofiel, aangepast van Janke et al., 2004.

Temperatuursprofiel PCR-reactie		
	92°C	2min
10cycli	92°C	10s
	58°C	15s
	68°C	1min
	68°C	1min
20cycli	92°C	20s
	58°C	30s
	68°C	1min + 5à20s/cyclus
	68°C	5min
	10°C	∞

Tabel3.15: Temperatuursprofiel van een standaard PCR-reactie met Longe Range DNA-polymerase ter amplificatie van een fragment van ongeveer 1000bp.

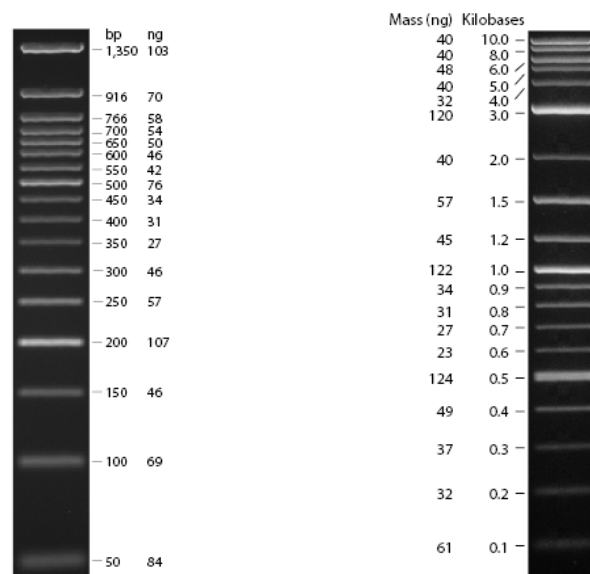
3.4.3.2. Analyse van de bandjes via gelelektroforese

Om de amplificatie van een dsDNA-product na te gaan, werd een analyse ervan nagegaan op een gel via elektroforese. Onder invloed van een elektrisch veld migreerden de negatief geladen DNA-strengen naar de positieve pool. De grootte en concentratie van de fragmenten kon geschat worden door te vergelijken met een parallel geïnjecteerde ladder. De 'dikte' van de bandjes bepaalde de concentratie van het DNA.

MATERIAAL

- ✓ Geltank en -kammen (Biorad)
- ✓ Agarose (VWR International) of Trevigel™ 500 powder (Trevigen)
- ✓ TAE-buffer, pH8: bereid uit een stockoplossing (50x geconcentreerd) (VWR International)

- Tris-HCl: 40mM
- EDTA: 1mM
- Acetaat: 20mM
- ✓ DNA-kleuring: *Gelred* (10.000x) (VWR International) of *SYBR Safe*® (Invitrogen)
- ✓ Laadbuffer
 - *Blue/Orange Loading Dye* (6x) (Promega)
 - *BY Gel Loading Dye Blue* (New England Biolabs®, Inc.)
- ✓ DNA-ladders (New England Biolabs®, Inc.) (zie figuur3.9)
 - 50bp-ladder
 - 2log-ladder



Figuur3.9: Gebruikte DNA-ladders voor gelelektroforeses. Links: 50bp-ladder, rechts: 2log-ladder. De grootte en de concentratie van de verschillende DNA-fragmenten is aangegeven naast elk bandje.

WERKWIJZE

1. 1% agarose of Trevigel werd opgelost in TAE-buffer en verwarmd in de microgolfoven totdat een homogene massa bekomen werd. Indien de te verwachten bandlengte kleiner dan 500bp was, werd een 2%-gel gemaakt.
2. Na afkoelen van de gel werd *Gelred* of *SYBR Safe*® toegevoegd: 1µl/10ml TAE-buffer.
3. De gel werd gegoten in een geltank en voorzien van één of meerdere kammen. Het stollen van de gel gebeurde onder de laminaire flow gedurende een half uur, zodat geen licht de gel bereikte (risico op fotodegradatie van *Gelred* of *SYBR Safe*®).
4. De stalen werden tijdens het stollen bereid:
 - a. 3µl laadbuffer
 - b. 15µl PCR-product (dsDNA)
 - of
 - a. 3µl laadbuffer
 - b. 14µl water

- c. 1µl ladder
5. Na het stollen werden de kammen verwijderd en werd de geltank volgegoten met TAE-buffer, totdat de gel onder buffer stond. Vervolgens werden de stalen in de verschillende slots geïnjecteerd.
 6. Hierna werd het deksel op de geltank geplaatst en aangesloten op de PowerPacTM HC (Biorad) (stroombron).
 7. De stroombron werd aangezet op 150V, waarna het DNA van de negatieve naar de positieve pool liep.
 8. Wanneer de kleurmerker van de laadbuffer het eindfront bereikte, werd de stroombron afgezet. Het deksel werd verwijderd en de gel werd uit de tank genomen.
 9. Vervolgens werd de gel in de Biorad GelDoc XR gelegd. De gescheiden fragmenten werden gevisualiseerd met behulp van UV-licht. Deze gegevens konden ingelezen worden met de Quantity One software op de computer. Met behulp van de ladders (in de uiterste slots van de gel) kon hierna een schatting van de grootte van de DNA-fragmenten gebeuren. Indien een meer correcte grootte gewenst was, kon deze door de Quantity One software bepaald worden via analytische methoden.

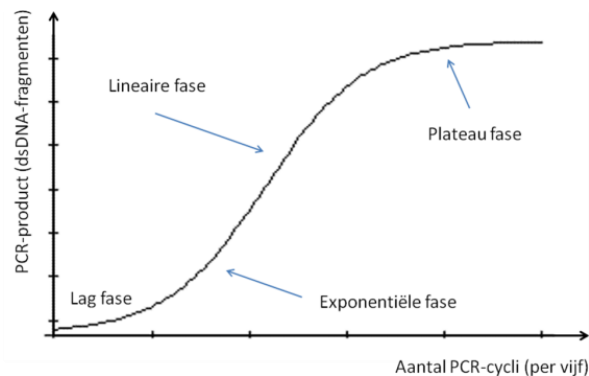
3.4.4. Real-Time PCR

3.4.4.1. Toelichting techniek en kwantificatie

Real-Time PCR of kwantitatieve PCR werd gebruikt om genexpressie te kwantificeren. De techniek is in grote mate gebaseerd op de klassieke PCR, met als grootste verschil dat het gehalte geamplificeerde dsDNA-fragmenten continu wordt opgevolgd, terwijl in een gewone PCR enkel het 'eindresultaat' in rekening wordt genomen. Deze continue opvolging (in functie van het aantal doorlopen PCR-cycli) gebeurt typisch via fluorescentie, ofwel via *SYBR® Green Dye* ofwel via *Taqman® MGB probes*.

Voor de PCR-reactie zelve wordt er vertrokken vanaf geïsoleerd mRNA (als maat voor de genexpressie) dat via een reverse transcriptiereactie tot cDNA wordt omgezet. Binnen het gen (en dus cDNA) van interesse neemt men vervolgens hoogspecifieke primers voor de amplificatie van een kort fragmentje uit dit cDNA. Bij de amplificatie van deze korte sequentie is typisch een logistisch vermenigvuldigingspatroon merkbaar, gekenmerkt door een initiële lag-fase, gevolgd door een fase van exponentiële 'groei', vervolgens een lineaire fase en tot slot een plateaufase (uitputting primers en/of dNTPs) (zie figuur 3.10). In RT-PCR is men met name geïnteresseerd in de fase van exponentiële groei. Het valt te verwachten dat naarmate een gen meer tot expressie komt er ook meer mRNA (en dus cDNA) van dit gen in de RNA-pool zal aanwezig zijn. Bijgevolg zal mRNA dat in hoge hoeveelheid aanwezig is, sneller in de exponentiële fase terecht komen. Zoals hierboven reeds vermeld, valt dit te detecteren met fluorescentie. Het gebruik van *SYBR® Green Dye* kenmerkt zich erin dat deze merker zich inbouwt in dsDNA en hierdoor fluorescent wordt. Na elke smelting (per cyclus) valt de fluorescentie terug op nul, omdat *SYBR® Green Dye* niet fluorescent is in aanwezigheid van ssDNA. Voorwaarde voor het gebruik van deze kwantificatiemethode is dat de primers heel specifiek zijn zodat de expressie van andere genen niet opgevolgd wordt (tengevolge van specifieke primerbinding). Anderzijds kan ook gebruik gemaakt worden van *Taqman® MGB probes*. Dit zijn ssDNA-fragmenten met aan hun 5'-uiteinde een fluorescentiemerker en aan het 3'-uiteinde een dovend element. De probes worden gekozen zodat ze gelegen zijn binnenin het te amplificeren fragment van een bepaald cDNA/gen. Doordat het polymerase een

exonucleasewerking heeft, zal (enkel) bij perfecte binding de reporter afgesplitst worden waarbij fluorescentie optreedt.



Figuur 3.10: toename van de hoeveelheid PCR-product in functie van het aantal PCR-cycli dat doorlopen werd. Het gebruik van RT-PCR situeert zich in de exponentiële fase.

Voor de eigenlijke kwantificatie kiest men een bepaalde fluorescentiedrempel – ook wel de C_T -waarde genoemd –, die voor elk staal overeenkomt met een fractioneel aantal PCR-cycli vereist om deze waarde te bereiken. De redenering is dat het bereiken van deze drempelwaarde exponentieel (omwille van het amplificatiekarakter van PCR) evenredig is met de initiële hoeveelheid cDNA aanwezig. Omdat kleine verschillen in starthoeveelheden cellen waarvan men mRNA isoleert, pipetteeronnauwkeurigheden, etc. een verschillend aantal vereiste cycli tot het bereiken van de C_T -waarde zouden geven, wordt de hoeveelheid cDNA in een staal typisch vergeleken met een endogeen controlegene (vb. *ACT1*, *RDN18* (18S rRNA)), waarvan men veronderstelt dat de expressie constant en stabiel is in functie van de tijd. Op die manier is de vergelijking tussen expressies van twee stalen een vergelijking tussen relatieve waarden ten opzichte van endogene controles.

3.4.4.2. Reverse transcriptie van RNA naar cDNA

In deze stap werd het via 3.3.3. geïsoleerde RNA omgezet naar cDNA. Dit gebeurde ondermeer met behulp van een reverse transcriptase, random primers en oligo-dT-primers, die binden op de polyA-staarten van het RNA. Er werd gebruik gemaakt van de *Reverse Transcription System* kit (Promega). In onderstaande tabel 3.16 staan de verschillende componenten van de reverse transcriptie reactie.

Reverse transcriptie reactie (Promega)	Volume
dNTPs	2 μ l
AMV reverse transcriptase	0,6 μ l
Recombinant Rnasin ribonuclease inhibitor	0,5 μ l
RNA	1 μ g
Oligo-dT primers	1 μ l
Random primers	1 μ l
Reverse transcription buffer	2 μ l
MgCl ₂	4 μ l
Nuclease-vrij H ₂ O	tot 20 μ l
TOTAAL	20μl

Tabel 3.16: Componenten van de reverse transcriptie mix.

WERKWIJZE

1. De mengsels werden bereid volgens tabel 3.15 en geïncubeerd gedurende 60min op 42°C.

2. De reactie werd geïnactiveerd door de epjes gedurende 5 minuten op 95°C te bewaren (*heat block*). De epjes werden hierna onmiddellijk op ijs gekoeld.
3. De stalen werden hierna verdund met 130µl nuclease-vrij water. De opbrengst en kwaliteit van het cDNA konden spectrofotometrisch bepaald worden. De cDNA-stalen werden verder verdund naar een concentratie van 100ng/µl.
4. De stalen werden bewaard bij -80°C.

3.4.4.3. Real-Time PCR-reactie

In deze reactie werd het gewenste cDNA (zoals reeds hoger beschreven) met behulp van specifieke primers geamplificeerd in de 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Er werd geopteerd voor het gebruik van SYBR® *Green Dye* als fluorescente merker. De samenstelling van één well voor de RT-PCR reactie is weergegeven in tabel 3.17.

RT-PCR reactie	Volume
Primer (SYBR) FW (Sigma genosys)	1,25µl
Primer (SYBR) RV (Sigma genosys)	1,25µl
Power SYBR Green Mix (2x) (Applied Biosystems)	12,5µl
cDNA of gDNA (opstellen ijklijn)	5µl
qPCR-grade H ₂ O (Applied Biosystems)	5µl
TOTAAL	25µl

Tabel 3.17: Componenten van de RT-PCR reactie.

3.5. Sequencing

Het sequencen van DNA-fragmenten zelf gebeurde aan de VIB Genetic Service Facility. Voorwaarden voor het te sequencen fragment en de mee te leveren primer(s):

- Primerconcentratie 5pmol/µl, templateconcentratie 100ng/µl
- Minimumvolume van primer/template : 10 µl

Bemerk dat het DNA van de template zoals door de VIB Facility gewenst, niet onmiddellijk overeenkwam met de inhoud van het PCR-epje na amplificatie. Zo was het noodzakelijk de primers en ander ssDNA te splitsen en te inactiveren.

WERKWIJZE (Voorbereiding te sequencen stalen)

1. In één epje werden gemengd:
 - 5µl PCR product (minstens 400ng/µl)
 - 14,8µl H₂O
 - 0,1µl *ExoI* (New England Biolabs®, Inc.; splitst primers en ss(g)DNA)
 - 0,1µl CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Invitrogen, splitst fosfaten af)

De epjes werden gedurende twee uur bij 37°C geïncubeerd.

2. De enzymes werden geïnactiveerd door de epjes gedurende 30min bij 65°C te incuberen. De opbrengst werd hierna bepaald en diende minstens 100ng/µl te bedragen (zie 3.3.4.).
3. De stalen werden in afwachting van sequencing bewaard bij -20°C.

3.6. Transformatie

3.6.1. Transformatie van *S. cerevisiae*, gebaseerd op de methode van Gietz & Schiestl (1995)

BUFFERS EN OPLOSSINGEN

- PLI (8/1/1)
 - ✓ PEG 3350 50% (Merck)
 - ✓ LiAc 1M (Sigma)
 - ✓ H₂O (MilliQ)
- ssDNA
 - ✓ een oplossing van haringsperma DNA (10mg/ml) werd gedurende 10 minuten gedeneureerd op 95°C en onmiddellijk op ijs gezet.
- 0,1M LiAc, vers bereid uit 1M stockoplossing
- Fysiologisch H₂O (0,85% NaCl) (Fisher Scientific)

WERKWIJZE

1. De cellen werden overnacht opgegroeid in 5ml YPD (4%) en overgeënt naar 50ml YPD (2%). Deze culturen werden gegroeid tot een OD₆₀₀ tussen 0,5 en 1,5.
2. De cellen werden afgecentrifugeerd (5min., 3000rpm) en het supernatans verwijderd.
3. De cellen werden gesuspenderd in 1ml 0,1M LiAc en overgebracht in een eppendorftube.
4. De cellen werden verzameld en gesuspenderd in 0,1M LiAc. De toegevoegde hoeveelheid LiAc was afhankelijk van het aantal transformaties dat moest worden uitgevoerd, maar bedroeg maximum 500µl. De suspensie werd 10 minuten bewaard op kamertemperatuur.
5. In een nieuwe eppendorftube werd het transformatiemengsel bereid:
 - i. 50µl celsuspensie (zie 4)
 - ii. 20 tot 50µl restrictiemengsel, plasmide of dsDNA
 - iii. 300µl PLI
 - iv. 5µl ssDNA

Het geheel werd gedurende 10s gevortext en vervolgens 30 minuten geïncubeerd op 30°C.

6. De stalen werden 20 à 30 minuten in een schuddend waterbad op 42°C geplaatst.
7. Hierna werden de cellen verzameld en het supernatans verwijderd.
8. De cellen werden gesuspenderd in 1ml fysiologisch water. Hiervan werd 100µl uitgeplaat op een geschikt selectief medium.
9. Vervolgens werden de cellen opnieuw gecentrifugeerd en het supernatans verwijderd.
10. De cellen werden gesuspenderd in 100µl fysiologisch water. Deze 100µl werd uitgeplaat op een geschikt selectief medium.
11. De platen werden tot slot gedurende vijf dagen geïncubeerd op 30°C en hierna afgelezen.

3.6.2. *Transformatie van E. coli*

Competente cellen werden bereid vanuit TOP10F'-cellen door middel van de CaCl₂-methode. De competente cellen werden dan bewaard op -80°C tot het moment van gebruik.

3.6.2.1. *Bereiding van competente cellen*

BUFFERS EN OPLOSSINGEN

- 0,1M CaCl₂, vers te bereiden uit een 1M stockoplossing (Merck)
- Glycerol 70% (Merck)

WERKWIJZE

1. Een kolonie TOP10F'-cellen werd opgepikt van een LB-agarplaat en overnacht gegroeid in 3ml LB-medium op 37°C. 100ml LB werd geïnoculeerd met 1ml van deze cultuur en gedurende 2 tot 3uur gegroeid op 37°C.
2. De cellen werden gecentrifugeerd (4000rpm, 5min, 4°C).
3. De neerslag werd gesuspendeerd in 40ml 0,1M CaCl₂ en op ijs bewaard gedurende tenminste 1uur.
4. De cellen werden neergeslagen (4000rpm, 5min, 4°C) en gesuspendeerd in 1ml 0,1M CaCl₂.
5. De suspensie werd verdeeld over voorgekoelde microcentrifugetubes. Per 100µl celsuspensie werd steeds 21µl glycerol toegevoegd. De tubes werden ingevroren bij -80°C tot verder gebruik.

3.6.2.2. *Transformatie van de competente cellen*

6. De competente cellen werden ontdooid op ijs. 100µl van de celsuspensie werd toegevoegd aan 20µl gekoeld ligatiemengsel, plasmide of dsDNA, waarna het geheel tenminste 15min op ijs bewaard werd.
7. De cellen werden gedurende 45s op 42°C gebracht en daarna onmiddellijk gedurende 2min op ijs geplaatst.
8. Er werd 1ml LB toegevoegd en de cellen werden 40min geïncubeerd op 37°C in de schudincubator.
9. 100µl werd uitgeplaat op LB-agarplaten met ampicilline. De rest van de cellen werd gecentrifugeerd, gesuspendeerd in 100µl water, en ook uitgeplaat op LB-agarplaten met ampicilline.
10. De platen werden overnacht geïncubeerd op 37°C.

3.7. *Opvolgen van cel/celadhesie en cel/oppervlakteadhesie in S. cerevisiae*

3.7.1. *Evaluatie van cel/celadhesie*

In deze test werd een kleine fermentatie opgestart. Beoordeling gebeurde visueel.

WERKWIJZE

1. In een proefbuisje werd 3ml vloeibare YPD gepipetteerd. Daarin werd een kleine hoeveelheid cellen geënt. Voor de enting vanuit een vloeibare cultuur volstond 20µl celcultuur, afhankelijk van de optische densiteit.
2. De proefbuisjes werden 12 tot 24u geïncubeerd op 30°C.

3. Evaluatie van cel/celadhesie gebeurde door de proefbuizen gedurende een drietal seconden te vortexen. Een vlokkerige suspensie van celklompen wees op een flocculent karakter. Niet-flocculente celoplossingen bleven gedurende minstens tien minuten homogeen in oplossing.
4. Optioneel konden de cellen verzameld worden en aan OD_{600nm} 10 in flocculatiebuffer (3mM $CaSO_4$ (Sigma)) opgelost worden. De cellen werden gedurende minstens ½ uur op 20°C schuddend (150tpm) geïncubeerd.

3.7.2. Cel/oppervlakteadhesie

3.7.2.1. Evaluatie van agaradhesie en invasieve groei

Om te gaan of een gist adhesief of invasief kon groeien, werd gebruik gemaakt van een visuele methode. Hierbij werd de gist na groei op plaat herhaaldelijk gewassen met water. Er was sprake van invasieve groei wanneer een dunne, niet-oppervlakkig gelegen gistlaag in de agar waarneembaar was.

WERKWIJZE

1. De gistcellen werden uitgesmeerd op een YPD-plaat (2%), die in meerdere partities werd opgedeeld. Er werd op gelet op elk deel evenveel gist uit te strijken. De platen werden vervolgens vijf dagen geïncubeerd op 25°C, zodat alle glucose opgebruikt was en eventueel invasieve groei kon optreden. Foto's werden hierna genomen met het Geldoc XR toestel, Biorad.
2. De platen werden een twee tot drie keer onder een zachte stroom water gewassen, zodat elke partitie aan evenveel invallend water werd blootgesteld. Wanneer alle gistcellen van de wt (BY4742, noch adhesief noch invasief) weggewassen waren, werden de platen gelegd onder het Geldoc XR toestel, als maat voor het adhesief karakter van de getransformeerde gist of andere stam.
3. De platen werden verder gewassen totdat geen oppervlakkige gistcellen meer zichtbaar waren. Enkel invasief groeiende gistcellen bleven achter. Foto's werden gemaakt met het Geldoc XR toestel. Als referentie voor invasieve groei werd $\Sigma 1278b$ gekozen.

3.7.2.2. Evaluatie van adhesie aan polystyreenoppervlakken

In deze test (Reynolds & Fink, 2001) werden gistcellen gekleurd met kristalviolet. Deze kleurstof kan binden met negatief geladen componenten van de celwand. Naarmate er meer cellen achterbleven op de wand en op de bodem van de well (adherente cellen) bleef een deel van de kleurstof achter in de wellen. De kleurintensiteit van kristalviolet is bijgevolg een maat voor het aantal achtergebleven cellen.

MATERIAAL

- PBS-oplossing (pH7,4) (10x) (Sigma)
 - ✓ NaCl: 1,37mM
 - ✓ KCl: 27mM
 - ✓ Na_2HPO_4 : 20mM
- Kristalviolet (Sigma-Aldrich), 0,1% opgelost in oplossing (1/1/18) van
 - ✓ Isopropanol (BDH)
 - ✓ Methanol (VWR International)

✓ PBS (1x) (Sigma)

- Ethanol 95% (VWR International)
- Vloeibare YPD
- 96-well plaat, polystyreen (Cellstar®, Greiner Bio-one)

WERKWIJZE

1. De gistcellen werden gepropageerd in vloeibare YPD en verdund naar een dichtheid van 0,5 (OD_{600nm} , cf. supra). 150 μ l YPD-medium werd gepipetteerd in elke well van de 96-well plaat. De plaat werd gedurende 24u geïncubeerd bij 30°C.
2. Het medium werd voorzichtig afgepipetteerd. Aandacht werd besteed aan het niet verstoren van giststructuren op de bodem/wanden van de wellletjes.
3. 150 μ l kristalvioletooplossing werd toegevoegd aan elke well. De plaat werd gedurende 15min geïncubeerd op kamertemperatuur.
4. De kristalvioletooplossing werd vervolgens voorzichtig afgepipetteerd.
5. Hierna werd aan elke well 200 μ l PBS toegevoegd om de eventueel op de wanden aanwezige niet-adhesieve cellen en residuele kristalviolet weg te wassen. De buffer werd hierna voorzichtig weggepipetteerd zonder de biofilm te verstoren. Deze procedure werd nog minstens eenmaal herhaald.
6. Aan elke well werd tot slot 200 μ l ethanol toegevoegd en de absorptie werd hierna gemeten bij 570nm met behulp van de Powerwave 340 (BioTek®).

4. Resultaten en discussie

4.1. Aanmaak van selectief tot overexpressie gebrachte adhesines

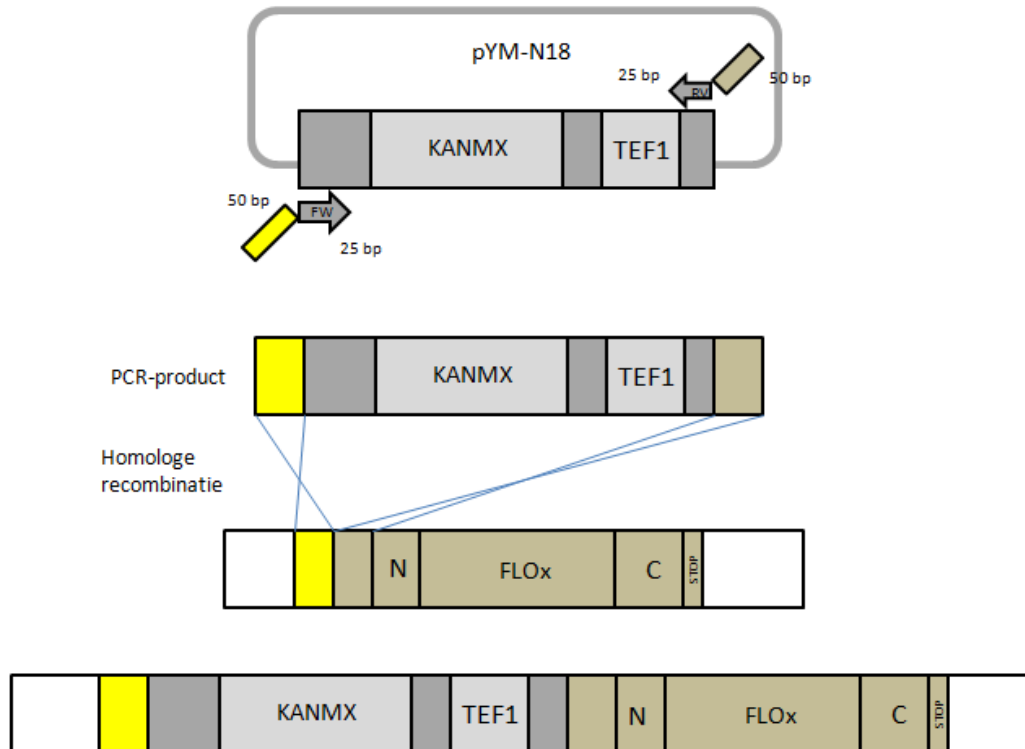
4.1.1. Algemene strategie voor de aanmaak van overexpressiestammen

In de laboratoriumstam S288c komen geen adhesines tot expressie. Redenen hiertoe zijn ondermeer een gemuteerde en niet-actieve activator en epigenetische *silencing* (cf. supra) (Halme *et al.*, 2004; Verstrepen *et al.*, 2004b; Verstrepen & Klis, 2006; Dranginis *et al.*, 2007; Fichtner *et al.*, 2007). Bijgevolg is een grondige studie van de *FLO*-genen, hoewel aanwezig, in principe niet mogelijk, tenzij rechtstreeks, genetisch, op de giststam ingegrepen wordt. Bemerk dat het tot expressie van *FLO*-genen in *E. coli* of een andere bacterie, risico's op recombinaties met zich meebrengt omwille van de vele tandemherhalingen in het centrale domein. Als oplossing hiervoor kan echter met een *RecA*-stam gewerkt worden. Anderzijds dient aandacht gevestigd te worden op het feit dat bacteriën de eindstandige mannanketens op hun celwand missen, een volgens de klassieke lectinetheorie onmisbaar gegeven (Stratford, 1992). De secretiemachinerie bij prokaryoten is tot slot verschillend van eukaryoten en ze missen ook posttranslationele modificatiemechanismen zoals deze voorkomen bij gisten.

Voor de studie van *FLO*-genen, werden deze selectief tot overexpressie gebracht via een PCR-gebaseerde strategie, waarbij een sterke promotor (*TEF1*) voor de verschillende *FLO*-genen geplaatst werd. Voor de selectie werd gebruik gemaakt van een *KANMX*-antibioticummerker, voorafgaand aan deze promotor. Deze cassette werd commercieel aangeboden op pYM-N18 (te isoleren uit *E. coli*), een plasmide van EUROSCARFTM (zie figuur3.1). Voor de amplificatie ervan was het essentieel primers met 'staarten', die aan hun 5'-uiteinde homologie vertoonden met de sequentie onmiddellijk *upstream* van de corresponderende *FLO*-genen en in het begin van het ORF, te gebruiken (Janke *et al.*, 2004). Op deze manier was het mogelijk de cassettes effectief te laten recombineren en dit ook op de juiste plaats. Het resultaat hiervan was dat de natuurlijke promotors van de *FLO*-ORF's vervangen werden door een (artificiële) constitutieve promotor (strategie zie figuur4.1). Hoewel de verschillende adhesines (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* en *FLO11*) heel wat homologie vertonen, is deze proximaal van de verschillende *FLO*-genen relatief beperkt, zodat de kans op verkeerde integratiepatronen door een verstandige primerkeuze toch sterk te reduceren was (Janke *et al.*, 2004; Van Mulders *et al.*, 2009). Selectie gebeurde op YPD met kanamycine.

Dit alles is uiteraard alleen maar mogelijk wanneer de genomesequentie van de gebruikte giststam gekend is, hetgeen bij S288c weldegelijk het geval is (Saccharomyces Genome Database). De genomesequentie van de andere veelgebruikte laboratoriumstam Σ 1278b is nog onvolledig.

In 2007/2008 werden de verschillende overexpressiestammen door Van Mulders en medewerkers (2009) reeds geconstrueerd. In het kader van een publicatie en verder projectwerk (zie 4.3. Aanmaak van stammen met chimere *FLO*-genen) was de realisatie en validatie van nieuwe overexpressiestammen gewenst.



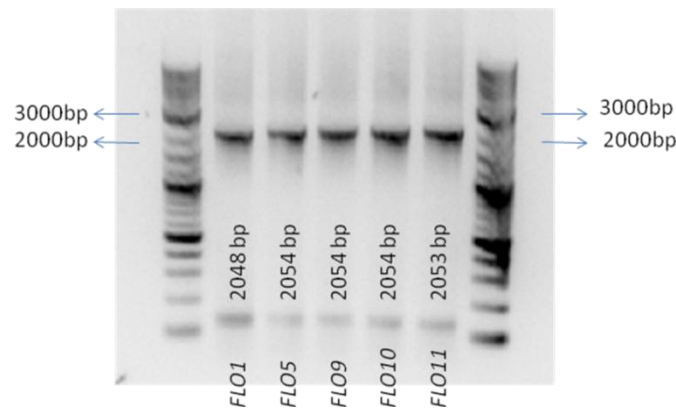
Figuur4.1: Strategie voor de aanmaak van de overexpressiecassettes. Initieel werd de overexpressiecassette uit pYM-N18 geamplificeerd. De hiervoor gebruikte primers vertoonden aan hun 5'-uiteinde homologie met de sequentie proximaal van FLOx en met de sequentie in het begin van het ORF. De homologie staart van de reverse primer viel in het begin van het N-terminale domein van FLOx. Na amplificatie van de cassette werd deze naar de gistcellen getransformeerd. Er werd geselecteerd op YPD-platen met kanamycine.

4.1.2. Constructie van de overexpressiecassettes en –stammen

Na isolatie van pYM-N18 (zie figuur3.1) uit *E. coli*, werd de cassette (KANMX en TEF1) voor de verschillende *FLO*-genen (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* en *FLO11*) uit het plasmide geamplificeerd met de primers weergegeven in tabel 3.4 met behulp van het Expand High Fidelity^{PLUS} polymerase (omwille van de lagere foutenlast bij DNA-synthese, protocol zie tabel3.14). Na amplificatie, werd een deel van dit PCR-product op gel gezet, ter verificatie van een correcte amplificatie (zie figuur4.2). Het bandje had een lengte van ongeveer 2000 basenparen, hetgeen vrij goed overeenstemde met de op basis van de sequentie berekende lengte: namelijk 1941bp voor de cassette met KANMX en TEF1 en 107 additionele basenparen voor de *FLO1*-homologe staarten, 113 voor *FLO5*, 113 voor *FLO9*, 113 voor *FLO10* en 112 voor *FLO11*.

Na transformatie van competente gistcellen (BY4742-achtergrond, S288c) met het resterende PCR-product en incubatie op YPD-platen met kanamycine gedurende vijf tot zeven dagen op 30°C, werden een aantal van de grootste kolonies opgepikt. Bemerkt dat er heel wat *escapes* waren; dit zijn cellen die ondanks het niet-bevatten van de KANMX-merker, toch groeiden op kanamycine. Deze kolonies bleven omwille van het antibioticum in de

YPD-platen typisch heel beperkt in grootte. Een aantal kolonies (grootste) werden vervolgens geselecteerd en volgens een streepenting uitgeplaat op een nieuwe YPD-plaat met geneticine. Na incubatie werden een aantal *single colonies* opgepikt en opgegroeid in vloeibare YPD voor de opvolging van fenotypische eigenschappen.



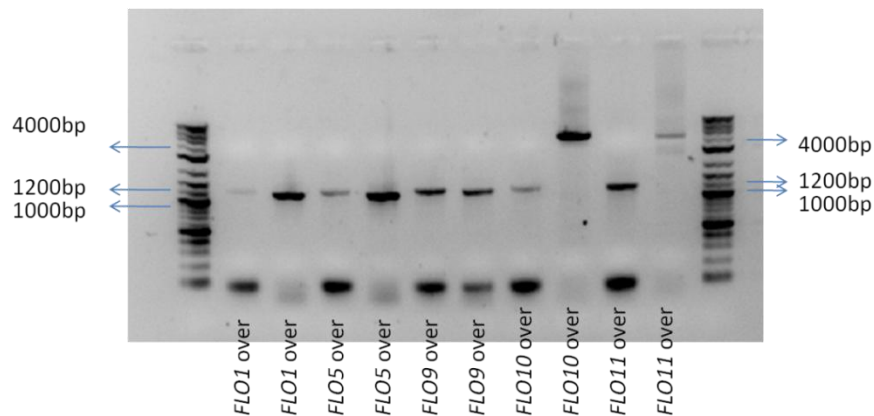
Figuur 4.2: Bevestiging amplificatie van de overexpressiecassettes met Expand High Fidelity^{PLUS} voor respectievelijk FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 en FLO11 (laan 2 tot en met 6). Te verwachten bandlengtes: zie figuur. Op basis van visuele schatting met de 2log-ladder (laan 1 en laan 7), werd voor alle FLOx-cassettes een bandlengte van ongeveer 2000bp vastgesteld.

4.1.3. Validatie van de overexpressiestammen

4.1.3.1. Verificatie op nucleïnezuurniveau

De validatie van de overexpressiestammen kon op verschillende manieren gebeuren. Allereerst werd het DNA van potentiële transformanten geïsoleerd (na opgroei in vloeibare YPD, zie 4.1.2.) en gecontroleerd op de aanwezigheid van de cassette via PCR. Positieve kolonies werden hierna nog gecontroleerd op een correcte integratiesite van de cassette (zie figuur 4.3 en tabel 4.1). De hiervoor gebruikte primers zijn terug te vinden in tabel 3.2, 3.6 en 3.7. De te verwachten bandlengte voor de aanwezigheid van de *KANMX*-merker met behulp van primerkoppel 247/257 was 1209bp, hetgeen door de gel bevestigd werd. Voor de correcte integratiesite werd een primerkoppel gekozen waarvan de *forward primer* (165) in de overexpressiecassette gelegen was; de *reverse primer* werd specifiek gekozen in het tot overexpressie te brengen *FLO*-gen. Bemerkt dat de *reverse primer* voor *FLO1* en voor *FLO5* dezelfde zijn (131). Dit is te verklaren door de grote homologie tussen beide genen (zie hoofdstuk 2.2.1). Differentiatie tussen beide was echter wel te maken door de keuze van een ander primerkoppel waarbij de *forward primer* (vb. 242 of 243, tabel 3.5) in de sequentie proximaal van *FLO1* of *FLO5* genomen werd. De *reverse primer* (vb. 257 of 260) kon dan bijvoorbeeld in de cassette genomen worden (gels niet weergegeven).

Voor de bevestiging van de correcte integratieplaats werd gebruik gemaakt van het Taq-polymerase (zie tabel 3.13), behalve voor de langere fragmenten (op basis van berekening) waar het Expand Long Range polymerase gebruikt werd (protocol zie tabel 3.15). Bemerkt dat er in de keuze en in het design van de primers grondig rekening diende gehouden te worden met de grote homologie tussen de verschillende *FLO*-genen en de aanwezigheid van meerdere *FLO*-pseudogenen in het genoom van *S. cerevisiae*. *BLASTing* was bijgevolg noodzakelijk om zichzelf ervan te verzekeren dat de primers uniek 'genoeg' waren.



Figuur4.3: Bevestiging aanwezigheid en correcte integratieplaats van de overexpressiecassettes voor de verschillende FLO-genen. Ladder (2log): laan1 en laan12; aanwezigheid overexpressiecassette: laan2, 4, 6, 8, 10; correcte integratiesite overexpressiecassette: laan3, 5, 7, 9, 11. Voor verwachte en geschatte bandlengtes: zie tabel4.1.

Overexpressiestam	Laan	Gebuurte primerkoppel (zie tabel3.6, 3.7)	Berekende grootte PCR-product (in basenparen)	Geschatte grootte PCR-product (in basenparen)
BY4742 [FLO1]	2	247/257	1209	1200
BY4742 [FLO1]	3	165/131	1087	1100
BY4742 [FLO5]	4	247/257	1209	1200
BY4742 [FLO5]	5	165/131	1087	1100
BY4742 [FLO9]	6	247/257	1209	1200
BY4742 [FLO9]	7	165/134	1124	1100
BY4742 [FLO10]	8	247/257	1209	1200
BY4742 [FLO10]	9	165/96	4058	4000
BY4742 [FLO11]	10	247/257	1209	1200
BY4742 [FLO11]	11	165/111	4100	4200

Tabel4.1: Overzicht van de verwachte en de geschatte bandlengtes van de PCR-fragmenten op basis van figuur4.3. De verwachte groottes werden berekend op basis van de sequenties van plasmide pYM-N18 en de S288c stam. De getalwaarden uit kolommen 3 en 4 sluiten bij elkaar aan.

Om zichzelf te verzekeren van een verhoogde FLO-gentranscriptie bij de getransformeerde gisten, werden een aantal op basis van PCR geslaagde giststammen geselecteerd en onderworpen aan een Real-Time PCR-experiment. Aangezien in de BY4742 wildtype geen adhesines tot expressie kwamen (zie hoger), lag de C_T -waarde hier in principe op oneindig. Eventuele mutaties in de cassettes (het promoterdeel) die transcriptie verhinderden, konden op deze manier opgespoord worden. Bij PCR blijven mutaties namelijk veelal 'onzichtbaar', tenzij het product gesequeneerd wordt. Besprekingen resultaten: zie verder (4.3.).

4.1.3.2. Validatie via gewijzigde fenotypes

De overexpressiestammen konden op verschillende manieren fenotypisch gekarakteriseerd worden. Door Van Mulders en medewerkers (2009) werden de eigenschappen van de adhesieve fenotypes van verschillende FLOx-overexpressies in S288c reeds terdege beschreven. Vandaar dat deze hier slechts summier behandeld worden. In het onderzoek naar gewijzigde fenotypes werd aandacht besteed aan cel/celflocculatie en cel/oppervlaktheadesie, dat gekwantificeerd werd met behulp van kristalviolet (protocol3.7.2.2.). Anderzijds

werd ook onderzoek verricht naar agaradhesie en invasieve groei (protocol3.7.2.1.). Voor een bespreking binnen de context van andere gerealiseerde stammen: zie verder.

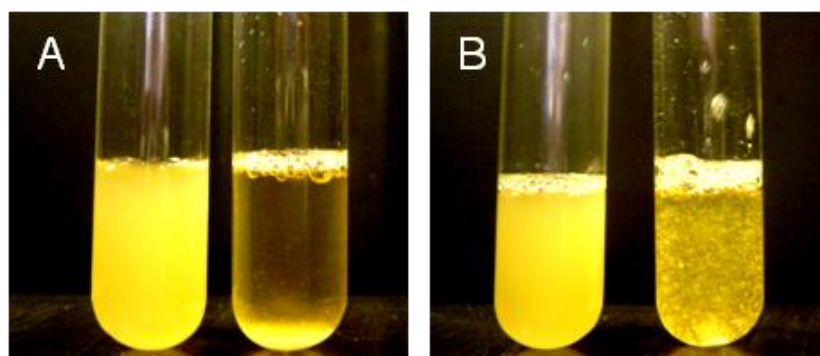
De verschillende overexpressiestammen werden volgens protocol3.7.1 opgegroeid in YPD en na incubatie opgeschud. Hoewel alle PCR-bevestigde overexpressies *FLO*-genen besloegen, werden uiteenlopende flocculatiefenotypes waargenomen (zie tabel4.2).

Stam	Flocculatie	Cellen in suspensie	Aantal vlokken en grootte
BY4742 wt	Geen	Volledig	Geen
BY4742 [<i>FLO1</i>]	Sterk en constitutief	Geen	Grote vlokken, weinig in aantal
BY4742 [<i>FLO5</i>]	Sterk en constitutief	Weinig tot geen	Grote vlokken, weinig in aantal
BY4742 [<i>FLO9</i>]	Sterk en constitutief	Weinig tot geen	Gemiddelde grootte, meer in aantal
BY4742 [<i>FLO10</i>]	Zwak en niet constitutief (flocculatie gaat verloren na meermaals opschudden)	Deels tot volledig na meermaals opschudden	Kleine vlokken, groot in aantal
BY4742 [<i>FLO11</i>]	Geen	Volledig	Geen

Tabel4.2: Overzicht van de verschillende overexpressiestammen in individuele *FLO*-genen en flocculatie-eigenschappen: aanwezigheid van flocculatie, cellen in suspensie en aantal vlokken en grootte.

Bemerk dat het tot overexpressie brengen van *FLO5* en *FLO9*, maar vooral *FLO1*, een moeilijk in suspensie brengen van de cellen betekende. Het samenklitten van de cellen (ondermeer door een toegenomen hydrofobiciteit van de celwand) gaf vrij grote vlokken met een hoge sedimentatiesnelheid (zie figuur4.4). Aangezien de globulaire domeinen van *FLO1*, *FLO5* en *FLO9* voor meer dan 95% homoloog zijn en de verschillen tussen deze genen voornamelijk bepaald worden door het aantal herhalingen in het domein van de tandemherhalingen ($FLO1 > FLO5 > FLO9$), werd besloten dat een groter aantal repeats een steviger flocculatie teweegbrengt. Een groter aantal herhalingen laat de adhesines namelijk toe verder uit de celwand te steken om zo beter in interactie te treden met de omgeving, zie Verstrepen en medewerkers (2005). Anderzijds mag het belang van een aantal kritische puntmutaties zeker niet onderschat worden.

BY4742 [*FLO10*] en BY4742 [*FLO11*] waren veel gemakkelijker in oplossing te brengen. Na herhaaldelijk opschudden van de *FLO10*-overexpressie ging de flocculatie verloren. Herstel hiervan was mogelijk na een rustfase (>1uur).



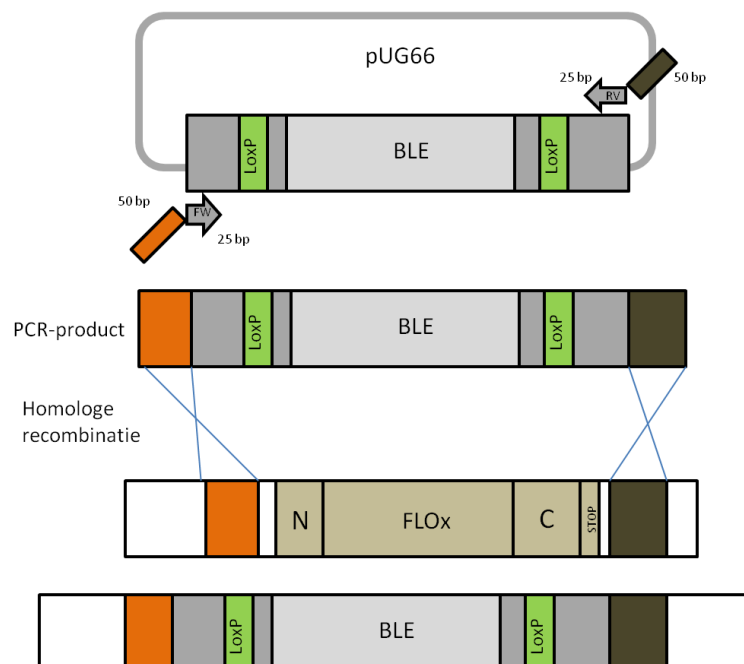
Figuur4.4: Visuele voorstelling van BY4742 wt (links op foto A en foto B) en BY4742 [*FLO1*] (rechts op foto A en foto B), 24u opgegroeid in YPD (2%), 30°C. Foto A: proefbuizen voor opschudden. Foto B: proefbuizen na 3s vortexen.

4.2. Aanmaak van deletiemutanten

4.2.1. Algemene strategie voor de aanmaak van deletiemutanten

Een tweede luik bestond erin chimere adhesines, bestaande uit een genenversnijding van verschillende flocculines, te construeren (cf. infra, figuur4.9). Aangezien hierin een aantal recombinatieprocessen onontbeerlijk waren en de homologie tussen de verschillende de adhesines vrij hoog is, was de aanmaak van giststammen die bepaalde *FLO*-genen missen (deletiemutanten) essentieel. Op die manier konden de beoogde recombinaties voor de constructie van chimere of ‘versneden’ adhesines met een veel hogere efficiëntie uitgevoerd worden.

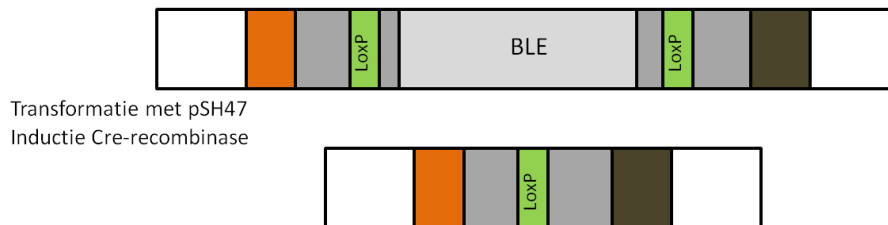
De deleties werden initieel gerealiseerd door een *BLE*-cassette (resistentie tegen zeocine/phleomycine) uit pUG66 te amplificeren (zie figuur4.5). Hiervoor werden primers met starten specifiek voor de opwaarts en neerwaarts gelegen sequenties van de verschillende *FLO*-ORF's (homologie vertonend) gekozen. Na amplificatie en transformatie was hierdoor een recombinatie mogelijk waarbij adhesinegenen selectief voor een zeocineresistentiegen konden uitgewisseld worden. Een geslaagde transformatie gaf dan ook resistentie tegen zeocine.



Figuur4.5: Strategie voor de aanmaak van deletiemutanten. Initieel werd de deletiecassette geamplificeerd uit het commercieel aangeboden plasmide pUG66. Hiervoor werden primers gebruikt met starten die perfecte homologie vertoonden met sequenties op- en neerwaarts van het FLO-gen dat men wenste te deleteren. Na amplificatie werden de gistcellen met de cassette getransformeerd. Selectie gebeurde op YPD met zeocine.

Omdat het wenselijk is om resistentiegenen achteraf toch uit een genoom te halen, werd het plasmide (pUG66) (zie figuur3.4) zo gekozen dat *BLE* tussen twee *LoxP*-sites gelegen was. Resistente kolonies werden hiertoe opgegroeid in vloeibaar YPD-medium en getransformeerd met pSH47, een plasmide dat compenseert voor de auxotrofe *URA3*-mutatie van BY4742 (zie figuur3.7) en verder een galactose-induceerbaar *Cre*-recombinase codeert. Kolonies die konden groeien op SC-ura werden geselecteerd en gedurende korte tijd gepropageerd in

vloeibare YPD om hierna geïnduceerd te worden in YPGal. Aangezien Cre specifiek *LoxP*-sites herkent, konden getransformeerde deletiemutanten op die manier hun merker verliezen (zie figuur4.6). Na inductie werden de cellen op YPD uitgeplaat. Een verlies van resistentie was aan te tonen na *replicapating* naar YPD met zeocine (geen groei) en/of via een PCR-gebaseerde methode.



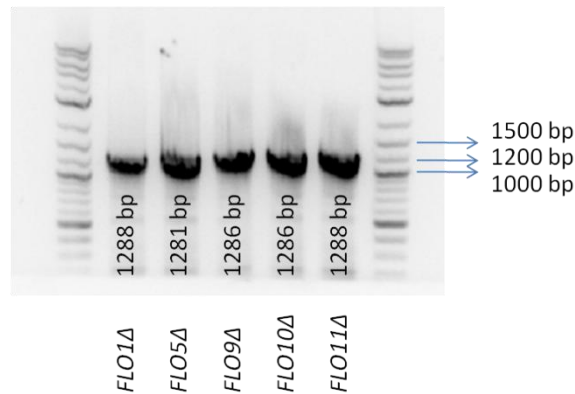
*Figuur4.6: Strategie voor de verwijdering van een resistentiegen. De deletiemutanten werden op hun beurt getransformeerd met pSH47 en geselecteerd op SC-ura. Na een korte propagatie was er inductie van Cre met galactose. Het Cre-recombinase herkende de *LoxP*-sites en luste de merker uit het genoom. Geïnduceerde deletiemutanten konden niet meer groeien op YPD met zeocine.*

Het verlies van het plasmide tot slot, werd gerealiseerd door enkele streepentingen van geïnduceerde kolonies op YPD (niet-selectief medium) uit te voeren. Na een aantal celgeneraties verloren de geïnduceerde deletiemutanten de mogelijkheid de auxotrofe mutatie (*URA3*) te compenseren. Dit was eveneens te verifiëren door *replicapating* naar SC-ura.

Na het deleteren van een bepaald *FLO*-gen en het verwijderen van een antibioticummerker, konden sequentieel andere *FLO*-genen uit deze stam verwijderd worden. Op die manier werden multiële deletanten bekomen. In dit opzicht was de verwijdering van de merker niet alleen gewenst, maar ook een strikte vereiste: wanneer vertrokken werd van een deletiemutant waar de merker niet verwijderd was, moest op een andere merker geselecteerd worden. Daarenboven waren er nog twee *LoxP*-sites aanwezig in het gistgenoom. Transformatie met een cassette die zich richtte naar een ander *FLO*-gen dan het oorspronkelijk gedeleteerde, zou mogelijk resulteren in het uitwisselen van merkers in plaats van merker voor *FLO*-gen omwille van de homologie van de *LoxP*-sites.

4.2.2. Constructie van de deletiecassettes en -stammen

Na isolatie van pUG66 uit *E. coli* (zie protocol3.3.2.) kon de zeocinecassette geamplificeerd worden. Hiertoe werden zoals reeds hoger vermeld primerkoppels gebruikt met staarten die perfecte homologie vertoonden met sequenties proximaal en distaal van de verschillende *FLO*-genen (zie tabel3.5: 230 tot en met 239). De amplificatie gebeurde volledig analoog als in 4.1.2. volgens protocol tabel3.11 en tabel3.14. De te verwachten lengte van de zeocinecassettes op basis van de sequentie bedroeg 1184bp; plus 104 additionele basenparen voor de *FLO1*-homologe staarten, 97 voor *FLO5*, 102 voor *FLO9*, 102 voor *FLO10* en 104 voor *FLO11*. Aangezien de bandjes zich bij de referentieladder (2log) ter hoogte van het fragment van 1200bp (zie figuur4.7) bevonden, werd besloten dat de amplificatie correct verlopen was. Bemerkt dat kleine afwijkingen van de bandgrootte merkbaar zijn door de extreem hoge DNA-concentratie aanwezig op de gel.



Figuur4.7: Bevestiging amplificatie van de deletiecassettes met Expand High Fidelity^{PLUS} voor respectievelijk FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 en FLO11 (laan2 tot en met laan6). Te verwachten bandlengtes: zie figuur. Laan1 en laan7: 2log-ladder. De verwachte bandlengte van de cassettes kwam overeen met de geobserveerde.

Transformatie gebeurde volledig analoog met de transformatie van de overexpressiecassettes. Na incubatie werden de grootste kolonies opgepikt en werd hiervan een streepenting op YPD met zeocine uitgevoerd. Na incubatie werd een aantal *single colonies* opgepikt en opgegroeid in vloeibare YPD.

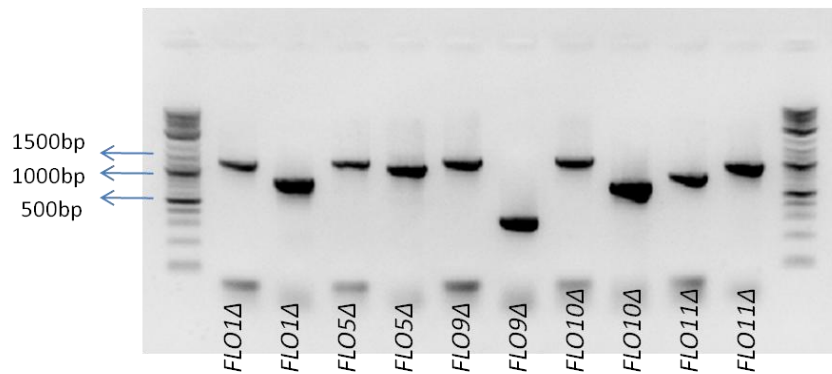
Omdat de transformatie met de zeocinecassette echter zelden getransformeerde (na validatie, cf. infra) kolonies gaf, werd eveneens gebruik gemaakt van pUG6 (resistentiegen tegen kanamycine); pUG72 (compensatie auxotrofe *URA3*-mutatie) en pUG73 (compensatie auxotrofe *LEU2*-mutatie). De amplificatie van de cassettes uit deze plasmiden gebeurde met dezelfde primerkoppels en werd op een analoge manier als beschreven in 4.1.2. bevestigd door analyse na gelelektroforese (gels niet weergegeven).

Verwijdering van de genen in de deletiecassettes gebeurde door de deletiemutanten te transformeren met plasmides pSH47, waarbij geselecteerd werd op SC-ura (niet in aanwezigheid van deletiecassette uit pUG72) of pSH62, waarbij geselecteerd werd op SC-his. Voor de verwijdering van de deletiemerkers werden de *FLOx*-gedeleteerde stammen met pSH47 of pSH62 gedurende twee uur opgegroeid in vloeibare YPD. Vervolgens werd overgeënt in vloeibare YPGal en gedurende twee uur op 30°C geïncubeerd. De cellen werden verzameld en uitgeplaat (verdunding 1/125.000 à 1/250.000) op YPD (2%). Na incubatie gedurende twee dagen op 30°C werd een *replicapating* uitgevoerd naar een plaat, specifiek voor de initiële selectiemerker. Succesvol geïnduceerde kolonies waren dan niet meer in staat te groeien op deze platen. Bemerkt hierbij dat een te lange incubatie in vloeibare YPD resulteerde in een verlies van het plasmide (wegvallen selectiefactor plasmide), hetgeen een sterk verlaagde inductie-efficiëntie met zich meebracht. Getuige hiervan waren sterk schommelende inductie-efficiënties van 5 tot 70%.

4.2.3. Validatie van de deletiemutanten

De validatie van de deletiemutanten gebeurde door het DNA van enkele kolonies op het selectieve medium te screenen op de aanwezigheid van de antibioticummerker (primerkoppel 247/257). De hierbij als positief geïdentificeerde kolonies werden vervolgens ook nog getest op de correcte integratieplaats van de cassette. Binnen BY4742 werden alle enkelvoudige *FLOx*-deleties bekomen, zoals weergegeven in figuur4.8 (vóór uitsluiten van de merkers). Per stam staat een bandje weergegeven voor de aanwezigheid van de merker en

een bandje dat de correcte integratieplaats valideert. Bemerkt dat de bandlengte voor de cassetteaanwezigheid van de BY4742 *FLO11Δ* verschilde van deze van BY4742 *FLO1Δ*, BY4742 *FLO5Δ*, BY4742 *FLO9Δ* en BY4742 *FLO10Δ*. De verklaring hiervoor situeert zich in de gebruikte merker: de *single* deletie in *FLO11* werd gerealiseerd met *BLE*, terwijl de (enkelvoudige) deleties voor *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* en *FLO10* met *KANMX* uitgevoerd werden. Aangezien het primerkoppel 247/257 amplificeerde *over* de merker en *BLE* een korter gen dan *KANMX* was, is het geobserveerde bandje voor BY4742 *FLO11Δ* korter. Voor de gebruikte primerkoppels per laan, de verwachte en geschatte bandlengtes: zie tabel4.3.



Figuur4.8: Validatie van de *single* deleties van *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* en *FLO11* in BY4742. Laan1, 12: 2log-ladder. Laan2, 4, 6, 8, 10: bevestiging aanwezigheid overexpressiecassette; laan3, 5, 7, 9, 11: screening naar correcte integratiesite. Gebruikte primerkoppels en verwachte/geschatte bandlengtes: zie tabel4.3.

Overexpressiestam	Laan	Gebruikte primerkoppel (zie tabel3.6, 3.7)	Berekende grootte PCR-product (in basenparen)	Geschatte grootte PCR-product (in basenparen)
BY4742 <i>FLO1Δ</i>	2	247/257	1209	1200
BY4742 <i>FLO1Δ</i>	3	248/251	822	800
BY4742 <i>FLO5Δ</i>	4	247/257	1209	1200
BY4742 <i>FLO5Δ</i>	5	248/252	1013	1000
BY4742 <i>FLO9Δ</i>	6	247/257	1209	1200
BY4742 <i>FLO9Δ</i>	7	248/253	331	300
BY4742 <i>FLO10Δ</i>	8	247/257	1209	1200
BY4742 <i>FLO10Δ</i>	9	248/254	705	700
BY4742 <i>FLO11Δ</i>	10	247/257	781	800
BY4742 <i>FLO11Δ</i>	11	248/255	932	950

Tabel4.3: Overzicht van de verwachte en de geschatte bandlengtes van de amplicons op basis figuur4.8. De verwachte groottes werden berekend op basis van de sequenties van de plasmides en de S288c stam. De enkelvoudige deleties in BY4742: *FLO1Δ*, *FLO5Δ*, *FLO9Δ* en *FLO10Δ* werden gerealiseerd met *KANMX*; *FLO11Δ* met *BLE*. De verwachte lengtes op basis van sequentiedata stemden vrij goed overeen met de geschatte bandlengtes.

De fenotypes van de verschillende enkelvoudige deletiemutanten werden geobserveerd (zie tabel4.4). Aangezien reeds in BY4742 wt geen *FLO*-genen tot expressie kwamen, was de verwachting geen flocculatie of andere verschijnselen waar te nemen bij de deletiemutanten. Dit bleek na analyse zo (fotoresultaten niet weergegeven). Bijgevolg was het verschil tussen BY4742 deletiemutanten en BY4742 wt enkel PCR-gewijs te maken.

Stam	Flocculatie	Cellen in oplossing
BY4742 wt	Geen	Volledig
BY4742 <i>FLO1Δ</i>	Geen	Volledig
BY4742 <i>FLO5Δ</i>	Geen	Volledig
BY4742 <i>FLO9Δ</i>	Geen	Volledig
BY4742 <i>FLO10Δ</i>	Geen	Volledig
BY4742 <i>FLO11Δ</i>	Geen	Volledig

Tabel4.4: Overzicht van de enkelvoudige *FLOx*-deleties en het geobserveerde flocculatiekarakter na 3s vortexen.

Na realisatie van de verschillende enkelvoudige deleties, werden met het oog op het vervolg van het project nog meer deletiemutanten gerealiseerd. Hierbij werd vertrokken van de geïnduceerde *FLO1Δ*- en *FLO5Δ*-mutanten. Zoals reeds hoger vermeld situeerde het belang van de inductiefase en uitlissing van de merker zich hier. Transformatie zou anders niet met dezelfde merker kunnen gebeuren en er was door complementariteit met de *LoxP*-sites van de initiële merker eventueel een uitwisseling van merker voor merker mogelijk en dus niet van merker voor *FLO*-gen. Hierdoor zou geen *FLO*-gen gedeleteerd worden.

Omdat de initiële deletiemutanten echter om een onbekende reden een latente kanamycineresistentie behielden (ondanks bevestigde merkerverwijdering), werd noodgedwongen overgestapt naar een andere deletiecassette, namelijk met de *URA3*-merker. Selectie van de deletiemutanten gebeurde dan niet op YPD met antibioticum, maar op SC-ura. Incubatiecondities en testcondities voor transformanten bleven wel behouden. De amplificatie van de cassettes (vanuit pUG72) gebeurde met dezelfde primerkoppels (zie tabel3.5) en volgens hetzelfde protocol (tabel3.11 en 3.14) zoals reeds hoger beschreven. Omdat het plasmide pSH47 de *URA3*-merker herbergde, kon voor merkeruitlissing hiermee niet getransformeerd worden. Bijgevolg werd geopteerd voor pSH62 met de *HIS3*-merker (selectie op SC-his). Ook dit plasmide bevatte een galactose-induceerbaar *Cre*-recombinase. Op een volledig analoge manier zoals hierboven reeds beschreven, kon de *URA3*-merker (voor dubbele deletie) dan uitgelust worden. De verschillende stammen werden opnieuw PCR-bevestigd (gels niet weergegeven). Later werd overgestapt naar de *LEU2*-merker (gelegen op pUG73) voor de drievoudige deleties. Zowel pSH47, als pSH62 konden dan gebruikt worden. In onderstaande tabel4.5 staat een overzicht van de geconstrueerde enkele, dubbele en drievoudige deletiemutanten en de hiervoor gebruikte (deletie)merkers.

Gebuurde deletiemerker	<i>FLO1</i>	<i>FLO5</i>	<i>FLO9</i>	<i>FLO10</i>	<i>FLO11</i>
Geconstrueerde deletiestammen					
BY4742 <i>FLO1Δ</i>	<i>KANMX</i>	-	-	-	-
BY4742 <i>FLO5Δ</i>	-	<i>KANMX</i>	-	-	-
BY4742 <i>FLO9Δ</i>	-	-	<i>KANMX</i>	-	-
BY4742 <i>FLO10Δ</i>	-	-	-	<i>KANMX</i>	-
BY4742 <i>FLO11Δ</i>	-	-	-	-	<i>BLE</i>
BY4742 <i>FLO5Δ FLO1Δ</i>	<i>KANMX</i>	<i>URA3</i>	-	-	-
BY4742 <i>FLO1Δ FLO5Δ</i>	<i>URA3</i>	<i>KANMX</i>	-	-	-
BY4742 <i>FLO9Δ FLO1Δ</i>	<i>KANMX</i>	-	<i>URA3</i>	-	-

BY4742 <i>FLO9Δ FLO5Δ</i>	-	<i>KANMX</i>	<i>URA3</i>	-	-
BY4742 <i>FLO1Δ FLO9Δ FLO5Δ</i> ¹	<i>LEU2</i>	<i>KANMX</i>	<i>URA3</i>	-	-
BY4742 <i>FLO10Δ FLO9Δ FLO5Δ</i> ²	-	<i>KANMX</i>	<i>URA3</i>	<i>LEU2</i>	-
BY4742 <i>FLO11Δ FLO9Δ FLO5Δ</i> ³	-	<i>KANMX</i>	<i>URA3</i>	-	<i>LEU2</i>

Tabel 4.5: Overzicht van de geconstrueerde deletiestammen en de hiervoor gebruikte merkers. Bij multiële deleties: gedeleteerd *FLO*-gen meest distaal in notatie werd oorspronkelijkst verwijderd.

4.3. Aanmaak van stammen met chimere *FLO*-genen

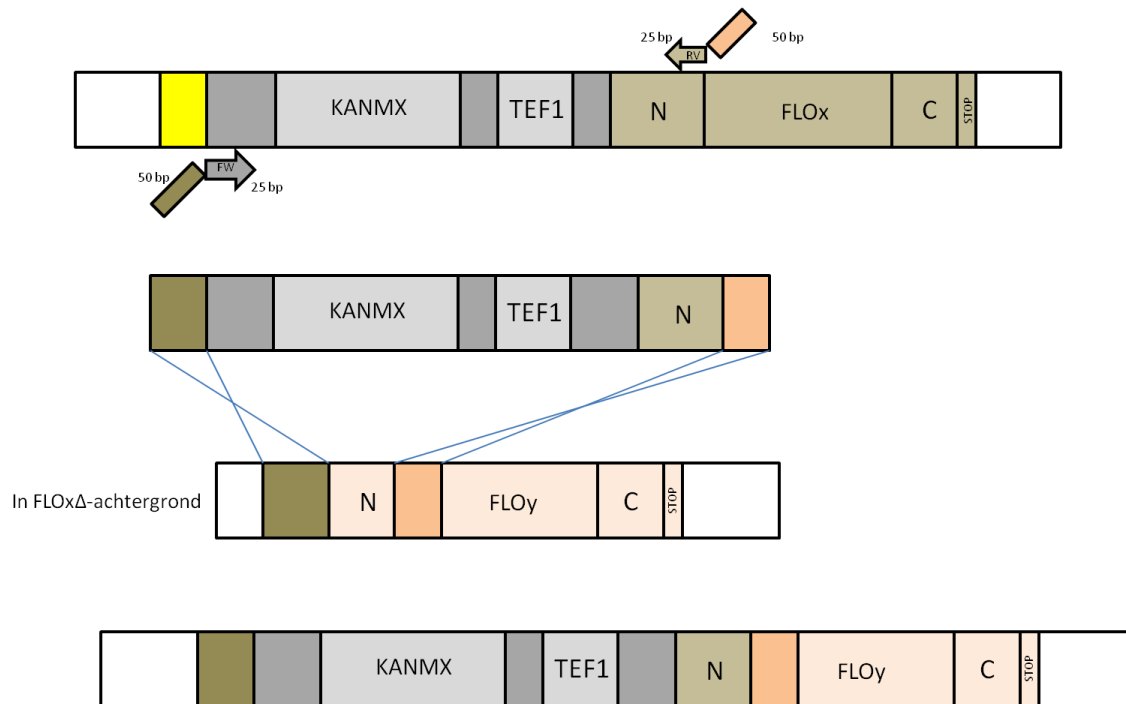
4.3.1. Algemene strategie voor de aanmaak van stammen die chimere adhesines tot expressie brengen

Om een beter inzicht te krijgen in de relatieve bijdrages van de verschillende componenten van de adhesines (2.2.2., zie figuur 2.9) werden ter voorbereiding in 4.1. en 4.2. een aantal giststammen (overexpressie- en deletiestammen) in de BY4742-achtergrond gemaakt. Het belang van zowel het N-terminale als het centrale domein werd reeds door meerdere auteurs aangetoond (Bony *et al.*, 1997; Verstrepen *et al.*, 2005). Nooit eerder echter werden beide componenten onafhankelijk en ontkoppeld van variatie geëvalueerd en bediscussieerd. De interesse in het C-terminale domein was in deze experimenten doorgaans laag, aangezien de homologie heel hoog en de relatieve bijdrage tot adhesieve capaciteiten hiervan quasi nihil zou zijn. Wanneer men nu de variatie ten gevolge van de verschillende globulaire domeinen zou kunnen uitsluiten, of anderzijds de variatie ten gevolge van het centrale domein, zou men, onafhankelijk, de relatieve bijdrage van de verschillende componenten van de verschillende *FLO*-genen ten opzichte van elkaar kunnen kwantificeren. Het doel van de constructie van deze derde groep giststammen bestond er dan ook in het N-terminaal deel van een adhesine (*FLO*) te plaatsen voor het centrale domein van een ander, ter vorming van een 'versneden' *FLO*-gen. De vraag hierbij was of het gevormde *chimeer* construct hierdoor een hogere of lagere adhesieve capaciteit kreeg en of de stam door een gewijzigd fenotype gekenmerkt werd.

Allereerst werd vanuit het DNA van een geconstrueerde overexpressiestam het N-terminale gedeelte van een *FLO*-gen (aangeduid met *FLOx*), met inbegrip van de merker en de TEF1-promoter, geamplificeerd (zie figuur 4.9). De keuze viel hierbij op primers met staarten en moest uiterst secuur gebeuren. De 'kern' van de ene primer (FW) vertoonde homologie met de cassette, proximaal van *KANMX*. De kern van de *reverse primer* vertoonde perfecte homologie met het distale deel van het N-terminale deel van het tot overexpressie gebrachte *FLO*-gen uit de overexpressiestam. Aandacht werd besteed deze *reverse primer* niet te ver in het *FLOx*-gen te nemen zodat zeker geen herhalingsdomeinen aangetast of meegenomen werden en zodat amplificaties voldoende efficiënt konden gebeuren. Op die manier zouden bij verdere analyses geen verkeerde conclusies getrokken worden. De keuze van de staarten van de primers diende eveneens met de nodige zorg te gebeuren en de lengte ervan bedroeg typisch een 50-tal basenparen. De staart van de *forward primer* vertoonde perfecte homologie met de sequentie onmiddellijk proximaal van het startcodon van het *FLO*-gen

^{1,2,3} Bij het ter perse gaan, waren de drievoudige deletiemutanten nog niet PCR-bevestigd.

waarmee men een chimeer construct wenste te maken (aangeduid met *FLOy*, 'acceptorstam'). De staart van de *reverse primer* vertoonde perfecte homologie met een distaal sequentiedeel van het N-terminale domein van het *FLO*-gen waarvan men het globulaire deel wou uitwisselen (*FLOy*), net voor het repeatbegin van *FLOy*. Bemerkt dat het *kerndeel* van de *reverse primer* zo gekozen werd dat het geamplificeerde N-terminale domein na een triplet werd afgesloten teneinde het leesraam na recombinatie niet te verstoren. De staart van de *reverse primer* begon op een triplet, zodat een 'drievoud' voor een 'drievoud' uitgewisseld werd.



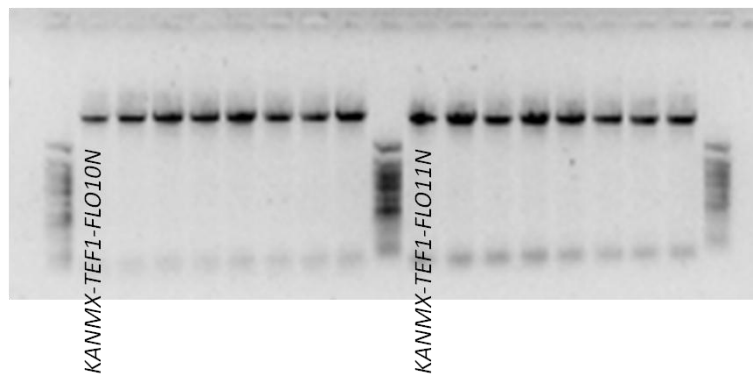
Figuur4.9: Strategie voor de aanmaak van stammen met een chimeer *FLO*-construct. Initieel werd uit een overexpressiestam de *KANMX*-merker, de *TEF1*-promoter en het N-terminale domein van het tot overexpressie gebrachte *FLO*-gen (*FLOx*) geamplificeerd. De primerstaarten vertoonden homologie met een ander *FLO* (*FLOy*). Na recombinatie werd het N-terminale domein van *FLOx* voor het centrale en C-terminale deel van *FLOy* geplaatst en dit onder een overexpressiepromoter. Selectie op YPD met kanamycine.

Na amplificatie werd het dsDNA-product (dat als dusdanig zelf al chimeer is) getransformeerd naar een stam, waarin *FLOx* gedeleteerd werd en geselecteerd op kanamycine. Bemerkt dat de deletie van *FLOx* een *conditio sine qua non* is, aangezien het risico op recombinatie met een fragment uit het N-terminale deel van *FLOx* (niet tot overexpressie gebracht!) anders mogelijk was. Bovendien zijn *FLO1*, *FLO5* en *FLO9* heel sterk homoloog (zie 2.2.1.). Op die manier viel de interesse in de domeinen van *FLO5* en *FLO9* weg, maar was de deletie ervan voor chimere constructen met *FLO1* in betrokken, noodzakelijk. Bijvoorbeeld, de constructie van een *FLO10N/FLO1*-construct (N-terminale domein van *FLO10*, centrale en C-terminale domein van *FLO1*) was enkel mogelijk in een stam waarin *FLO5* en *FLO9* en *FLO10* gedeleteerd werden. Amplificatie van het fragment *KANMX*-merker/*TEF1*-promoter/N-terminaaldomein-*FLO10* diende dan te gebeuren in een *FLO10*-overexpressiestam met primers die homologe staarten hadden met sequenties proximaal en in *FLO1*. Voor de constructie van een *FLO10N/FLO11*-construct (of omgekeerd) daarentegen, volstond te werken in een *FLO10Δ*-achtergrond (of omgekeerd), aangezien de homologie tussen *FLO10* en *FLO11*, *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* (zie 2.2.1.) beperkt is. Enkelvoudige deleties volstonden in dit geval.

Stammen waarin het fragment succesvol geïntegreerd was, konden bijgevolg groeien op kanamycine en konden gevalideerd worden op de aanwezigheid van de cassette. De keuze van een primerkoppel specifiek voor het N-terminale domein van *FLOx* enerzijds en voor het C-terminale domein van *FLOy* (of distaler) gaf – bij generatie van een bandje – ontegensprekelijk bewijs van een correct construct.

4.3.2. Constructie van de cassettes en aanmaak van de stammen

Omdat de aanmaak van deletiemutanten minder efficiënt verliep dat initieel verwacht (cf. supra, 4.2.), kon de constructie van chimere adhesines waarin *FLO1* betrokken was, niet gebeuren (herinner dat er weinig interesse was in *FLO5* en *FLO9*, omwille van de heel sterke homologie met *FLO1*). Bijgevolg kon slechts de aanmaak van twee constructen, namelijk *FLO11N/FLO10* en *FLO10N/FLO11* geprobeerd worden. De aanmaak hiervan gebeurde met primers weergegeven in tabel 3.4 en 3.8 volgens protocol tabel 3.14 met High Fidelity^{PLUS} DNA-polymerase (zie figuur 4.10). De lengte van de fragmenten werd geverifieerd met de Quantity One Software.



Figuur 4.10: Gel met cassettes voor chimere constructen. Laan 1, 10, 19: ladder (50bp), laan 2 tot en met 9: *KANMX/TEF1/FLO10N*-terminaaldeel (in achtvoud uitgevoerd), laan 11 tot en met 18: *KANMX/TEF1/FLO11N*-terminaaldeel (in achtvoud uitgevoerd). Gebruikte primerkoppels: laan 2-9 145/302, laan 11-18 143/303.

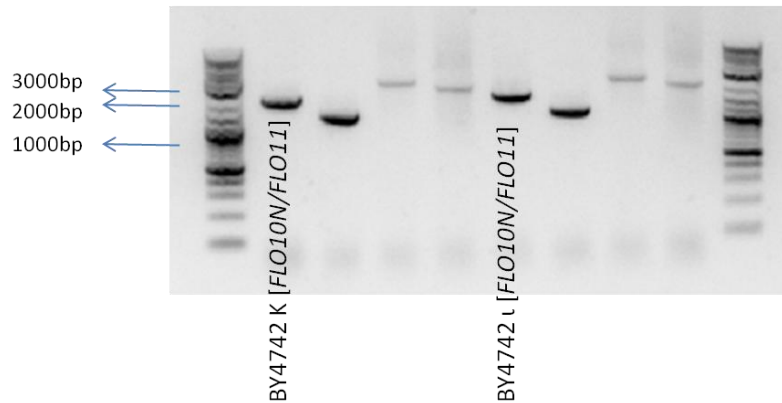
Na aanmaak van de *KANMX/TEF1/FLO10N*-cassette en de *KANMX/TEF1/FLO11N*-cassette werden deze getransformeerd naar *BY4742 FLO10Δ* en *BY4742 FLO11Δ* respectievelijk. Een aantal kolonies werden geïsoleerd en onderworpen aan verder onderzoek.

4.3.3. Validatie van de stammen met chimere adhesines

4.3.3.1. Verificatie op nucleïnezuurniveau

De validatie gebeurde allereerst door het DNA van een groot aantal (single) kolonies – na opgroei in vloeibare YPD (2%) – te isoleren en te screenen naar de aanwezigheid van de overexpressiecassette met primerkoppel 165/260 (zie tabel 3.6). Positieve kolonies werden hierna gescreend op een correcte integratiesite van de cassette. De hiervoor gebruikte primers zijn terug te vinden in tabel 3.1, 3.6, 3.7, 3.8 en 3.9. Van de onderzochte kolonies konden slechts twee transformanten gedetecteerd worden met de cassette ook op de juiste plaats, namelijk kolonie kappa en iota (verder aangeduid met κ en ι), beide stammen met een *FLO10N/FLO11N*-adhesine. Figuur 4.11 toont de gel ter bevestiging van de aanwezigheid en de correcte integratieplaats. Onderstaand tabel 4.6 met de verwachte en de geschatte bandlengtes. Omwille van de significante lengtes van

een aantal bandjes (het centrale domein moest in de amplificatie overbrugd worden), werd gebruik gemaakt van het Long Range DNA-polymerase (protocol tabel3.15). Op basis van tabel4.6 werd besloten dat κ en ι geslaagde transformanten waren. Het was niet mogelijk om in een PCR aan te tonen waar de verkeerd geïnsereerde cassettes in de andere stammen geïntegreerd waren. Het was eveneens niet met zekerheid aan te tonen of het aantal tandemherhalingen in κ en ι ongewijzigd was gebleven.

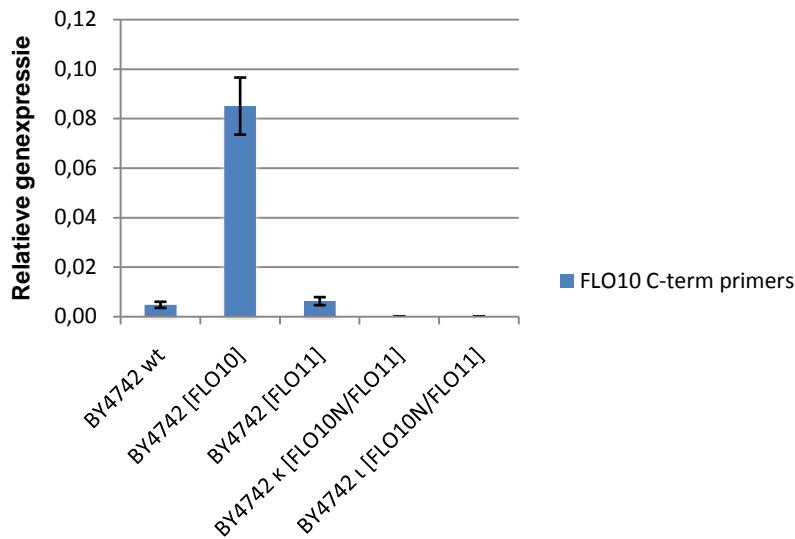


Figuur4.11: Validatie van chimere adhesines FLO10N/FLO11 van twee kolonies: κ (laan2 tot en met 5) en ι (laan6 tot en met 9). Laan1 en 10: 2log-ladder. Voor gebruikte primerkoppels, verwachte en geschatte lengtes: zie tabel4.6.

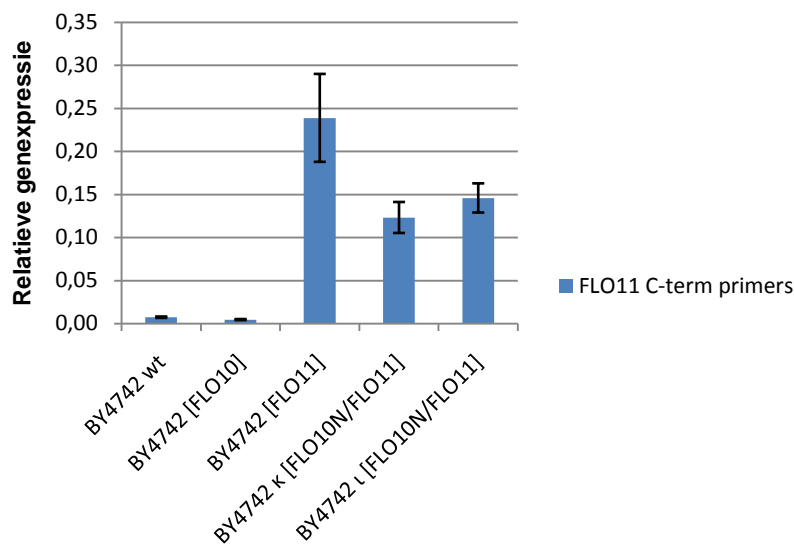
Chimere stam	Laan	Gebruikte primerkoppel (zie tabel3.6, 3.7)	Berekende grootte PCR-product (in basenparen)	Geschatte grootte PCR-product (in basenparen)
BY4742 κ , FLO10N/FLO11	2	245/260	2321	2200
BY4742 κ , FLO10N/FLO11	3	247/257	1209	1350
BY4742 κ , FLO10N/FLO11	4	321/96	2575	2900
BY4742 κ , FLO10N/FLO11	5	321/324	2201	2400
BY4742 ι , FLO10N/FLO11	6	245/260	2321	2200
BY4742 ι , FLO10N/FLO11	7	247/257	1209	1200
BY4742 ι , FLO10N/FLO11	8	321/96	2575	2800
BY4742 ι , FLO10N/FLO11	9	321/324	2201	2300

Tabel4.6: Overzicht van de verwachte en de geschatte bandlengtes van de amplicons op basis van figuur4.11. De verwachte groottes werden berekend op basis van de sequenties van pYM-N18 en de S288c stam; de geschatte lengtes op basis van visuele schatting. De lengtes stemden vrij goed overeen.

Bij activatie van een adhesine of een proteïne met adhesineactiviteit viel een bepaalde gentranscriptie te verwachten. Bijgevolg werd een Real-Time PCR-experiment opgestart. Op cDNA van BY4742 wt, BY4742 [FLO10], BY4742 [FLO11], BY4742 κ [FLO10N/FLO11] en BY4742 ι [FLO10N/FLO11] werden FLO10- en FLO11-specifieke primers getest (beide koppels gelegen in het C-terminaal gebied). De verwachtingen waren bij de FLO10-specifieke primers enkel expressie te zien bij BY4742 [FLO10] en niet bij de andere stammen. Omdat κ en ι beide het centraal domein en het C-terminale domein van FLO11 hadden, viel een verhoogde transcriptie te verwachten bij BY4742 [FLO11], BY4742 κ [FLO10N/FLO11] en BY4742 ι [FLO10N/FLO11] bij het opvolgen van genexpressie met FLO11-specifieke primers (zie figuur4.12 en figuur4.13).



Figuur4.12: Expressie van FLO10-fragment in BY4742 wt, BY4742 [FLO10], BY4742 [FLO11], BY4742 κ [FLO10N/FLO11] en BY4742 ι [FLO10N/FLO11] tijdens exponentiële groeifase. Primerkoppel FLO10-specifieke primers: 110/111. Gemiddelde expressieniveaus bepaald op 3 stalen. Expressieniveau κ en ι bepaald op 6 stalen.



Figuur4.13: Expressie van FLO11-fragment in BY4742 wt, BY4742 [FLO10], BY4742 [FLO11], BY4742 κ [FLO10N/FLO11] en BY4742 ι [FLO10N/FLO11] tijdens exponentiële groeifase. Primerkoppel FLO11-specifieke primers: 95/96. Gemiddelde expressieniveaus bepaald op 3 stalen. Expressieniveau κ en ι bepaald op 6 stalen.

Op basis van figuur4.13 viel onmiddellijk een sterk verhoogde expressie en dus transcriptie te noteren bij BY4742 [FLO10], ten opzichte van BY4742 wt, waardoor besloten werd dat de overexpressie correct gerealiseerd werd. Daarnaast was een latente FLO10-expressie merkbaar bij BY4742 wt en bij BY4742 [FLO11], hoewel FLO10 normaalgesproken niet tot expressie komt (Van Mulders *et al.*, 2009). Een kleine expressiepiek kon te wijten zijn aan een basale expressie of aan kleine contaminaties van genomisch DNA. Aangezien voor de constructie van κ en ι gewerkt werd in een BY4742 FLO10Δ achtergrond, konden noch basale expressies noch genomische contaminaties een (kleine) expressiepiek teweeg brengen. Op basis van figuur4.13 werd gezien de hoge expressiepiek besloten dat BY4742 [FLO11] correct geconstrueerd werd. Verhoogde expressieniveaus

waren ook merkbaar voor κ en ι , lage tot geen expressie voor BY4742 wt en BY4742 [FLO10]. De expressieniveaus van κ en ι waren significant lager dan de expressie in BY4742 [FLO11]. Over de expressie van κ en ι : de gemiddelde expressieniveaus zijn ongepaard en bij benadering normaal verdeeld, de varianties σ_1^2 en σ_2^2 zijn niet gekend. Volgens het Behrens-Fisher-probleem (zie formule4.1):

$$T = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} \approx t_r \text{ met } r \approx \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{1}{n_1-1} \left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 + \frac{1}{n_2-1} \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}$$

Formule4.1: Variabelen teststatistiek van het Behrens-Fisher-probleem.

met r het aantal vrijheidsgraden (afgerond 10 in casu, n_1 en $n_2 = 6$), s_1 en s_2 schatters van σ_1 en σ_2 ; kan de H_0 -hypothese $\mu_1 - \mu_2 = 0$ met behulp van de *Student t-verdeling* verworpen worden op significantieniveau $\alpha = 0,05$. De expressie van FLO10N/FLO11 van ι is bijgevolg significant verschillend van κ , hetgeen op basis van figuur4.13 niet met zekerheid te concluderen was. Hiervoor was geen onmiddellijke verklaring. Mogelijk lag een mutatie in de TEF1-promoter aan de basis van deze subtiele expressieverschillen. Statistische verschillexperimenten in het vervolg van deze tekst werden allemaal met de Behrens-Fisher-statistiek benaderd. Een belangrijk gevolg van deze sterk verhoogde transcripties is dat gewijzigde fenotypes van de transformanten mogen gekoppeld worden aan het gerealiseerde construct.

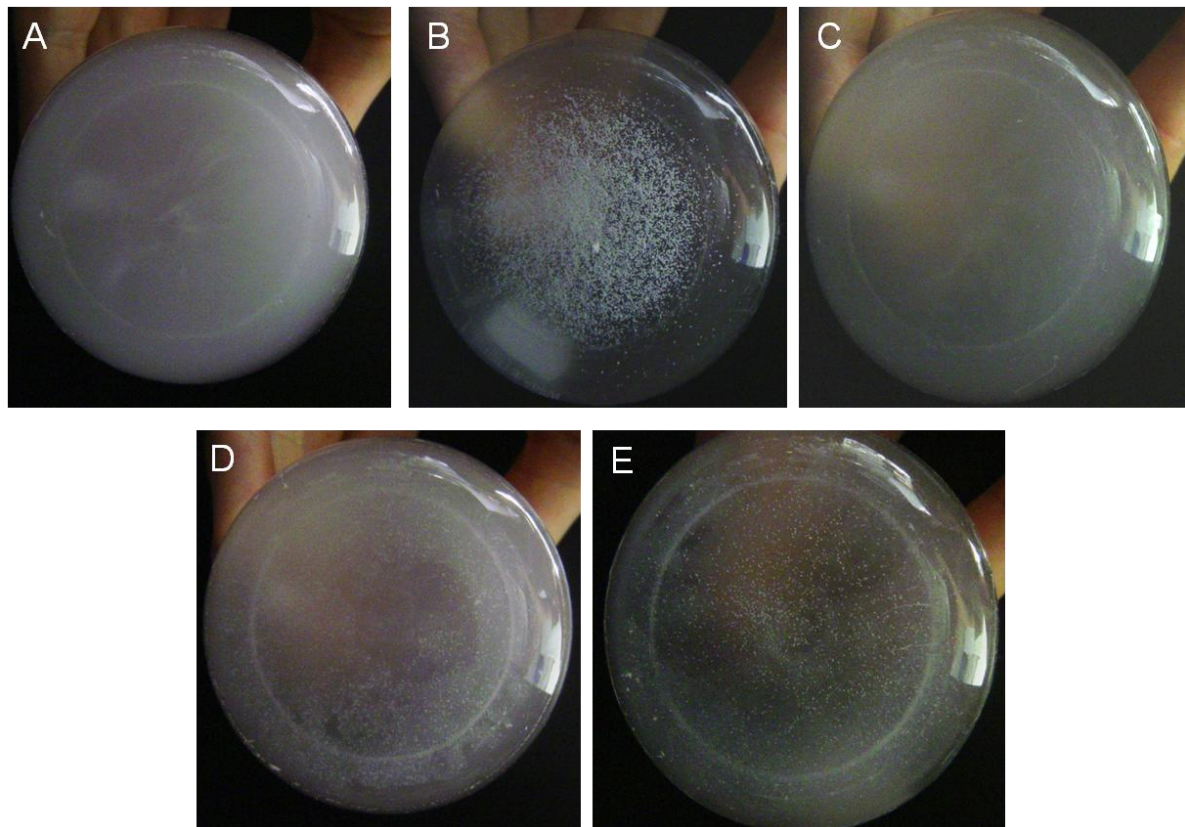
4.3.3.2. Validatie via gewijzigde fenotypes

De chimere stammen konden op verschillende manieren fenotypisch gekarakteriseerd worden. Om een inzicht te krijgen in hun capaciteiten tot flocculatie en adhesie was het zinvol ze altijd in vergelijking met de afgeleide overexpressiestammen (BY4742 [FLO10] en BY4742 [FLO11]) en deleties te evalueren. Achtereenvolgens staan de resultaten van een flocculatie-experiment, agaradhesie en polystyreenadhesie weergegeven.

In een flocculatie-experiment werden gelijke hoeveelheden cellen van BY4742 wt, BY4742 [FLO10], BY4742 [FLO11], BY4742 κ [FLO10N/FLO11] en BY4742 ι [FLO10N/FLO11] in erlenmeyers opgelost in flocculatiebuffer (Ca^{2+} -houdend). Deze werden aan een laag toerental (150tpm) geschud. Na minstens 60min werd vanonderaf een foto van de celsuspensie getrokken (zie figuur4.14). Waargenomen flocculatiekarakteristieken staan weergegeven in tabel4.7.

Stam	Flocculatie	Cellen in suspensie	Aantal vlokken en grootte
BY4742 wt	Geen	Volledig	Geen
BY4742 [FLO10]	Vlokken	Weinig cellen in oplossing	Middelgrote vlokken, intermediair in aantal
BY4742 [FLO11]	Geen	Volledig	Geen
BY4742 κ [FLO10N/FLO11]	Kleine vlokjes	Deels	Heel kleine vlokken, heel groot in aantal
BY4742 ι [FLO10N/FLO11]	Vlokjes	Minder dan κ , meer dan BY4742 [FLO10]	Kleine vlokken, groot in aantal

Tabel4.7: Overzicht van de verschillende geconstrueerde stammen en visueel waargenomen flocculatie-eigenschappen: aanwezigheid, cellen in suspensie en aantal vlokken en grootte.

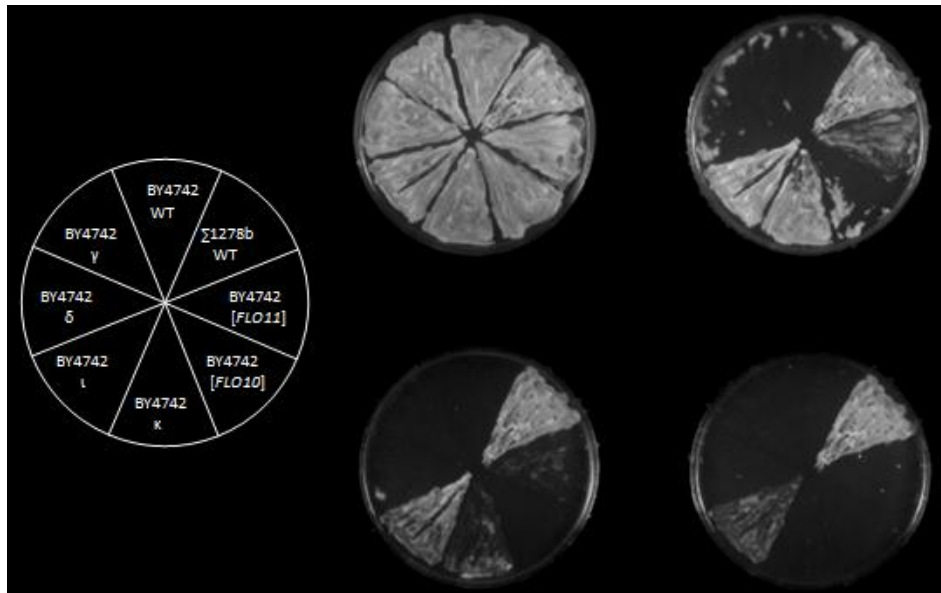


Figuur 4.14: Foto's van flocculatie in een aantal transformante stammen van BY4742. Foto's gemaakt vanaf de onderkant van erlenmeyers met gistcellen aan OD_{600nm} 10 opgelost in 10ml flocculatiebuffer. 60min geïncubeerd op kamertemperatuur aan 150rpm. A: BY4742 wt, B: BY4742 [FLO10], C: BY4742 [FLO11], D: BY4742 κ [FLO10N/FLO11] en E: BY4742 ι [FLO10N/FLO11].

Zoals te verwachten uit voorgaande experimenten vertoonde BY4742 [FLO10] een duidelijke, doch beperkte (cf. supra), flocculatie. BY4742 [FLO11] vertoonde geen flocculerende eigenschappen (zie reeds 4.1.3.2.). Beide chimere stammen waren flocculent, waardoor bijgevolg aangetoond werd dat de cel/celflocculatie-eigenschappen van FLO10 vervat liggen in het N-terminale domein. De expressieverschillen tussen κ en ι kwamen eveneens tot uiting: zo was de flocculatie van ι intenser waardoor de vlokken iets groter waren enerzijds (niet zichtbaar op figuur 4.14) en waren er anderzijds beduidend minder cellen in suspensie. De flocculatiecapaciteiten van zowel κ als ι bleken echter beperkter dan deze van BY4742 [FLO10]. Omdat het repetitieve domein van FLO11 groter is dan van FLO10 kon echter het omgekeerde verwacht worden (globulaire domeinen steken verder uit de celwand voor betere mannoproteïnebinding). Het is echter essentieel voor ogen te houden dat de kennis en de bijdrage van de centrale FLO-domeinen nog niet geheel gekend is en naar alle waarschijnlijkheid ook een rol speelt (zij het eerder beperkt). Anderzijds dient men er rekening mee te houden dat het niet uitgesloten was dat de sites voor recombinatie tussen FLO10 en FLO11 niet ideaal gekozen waren met torsië in de polypeptideketen of een minder efficiënte vouwing van het globulaire domein in de chimere stammen als gevolg.

Naast cel/celflocculatie werd eveneens onderzoek verricht naar cel/oppervlakteadhesie. Hierbij werden twee testen uitgevoerd: agaradhesie en een polystyreenadhesietest. In de agaradhesietest werden verschillende

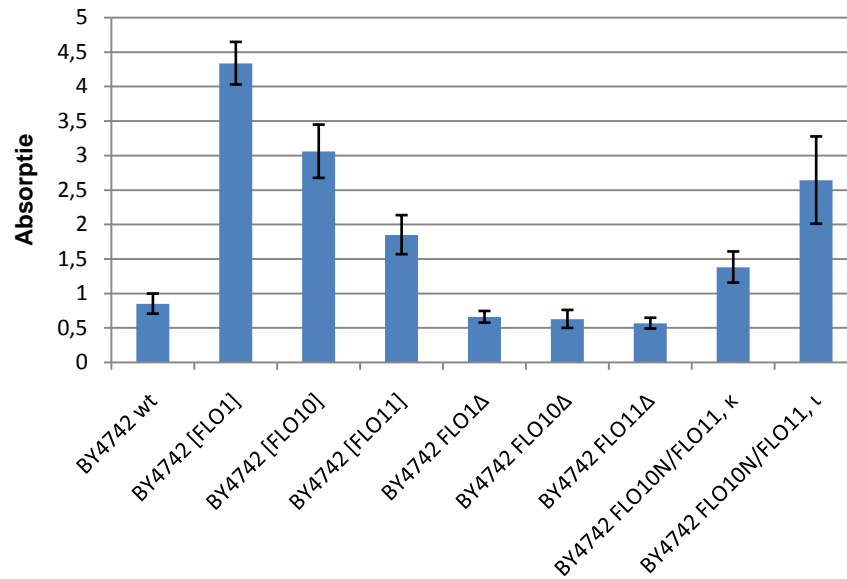
geconstrueerde giststammen uitgeplaat op een in secties verdeelde agarplaat en geïncubeerd volgens protocol 3.7.2.1 (zie figuur 4.15). De geteste giststammen waren (in wijzerzin): BY4742 wt, $\Sigma 1278b$ wt, BY4742 [FLO11], BY4742 [FLO10], BY4742 κ , BY4742 ι , BY4742 δ , BY4742 γ . Deze laatste twee stammen waren transformanten waarvan niet kon aangetoond worden dat de cassette op de juiste plaats geïntegreerd was (geen PCR-bevestiging). $\Sigma 1278b$ wt is een labostam die typisch heel adhesief groeit (cf. supra).



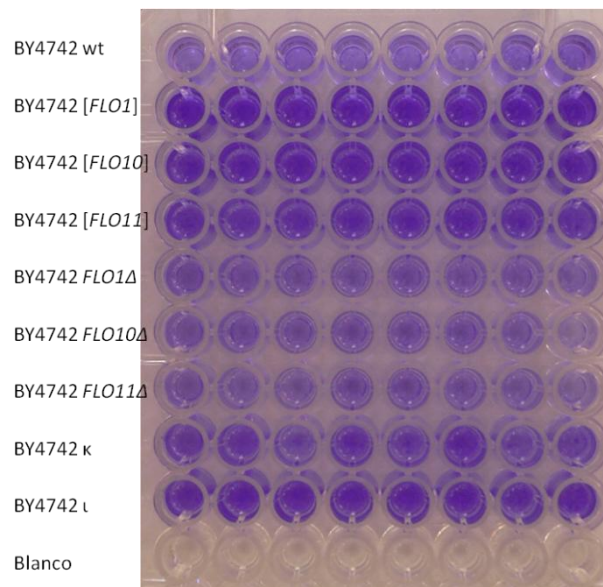
Figuur 4.15: Agaradhesie-experiment van BY4742 wt, $\Sigma 1278b$ wt, FLO-overexpressiestammen in BY4742 en een aantal chimere transformanten. Links: model van uitgeplate giststammen, centraal boven: plaat voor wassen, rechtsboven: plaat na kort wassen onder zachte straal, centraal onder: plaat na langer wassen onder zachte straal, rechtsonder: plaat na wassen onder harde straal.

Wat onmiddellijk opviel was het snelle lossen van γ en δ , naast BY4742 wt, bij het minste watercontact. Aangezien de cassette bij deze stammen waarschijnlijk niet voor een adhesie geïntegreerd was, was deze vaststelling ook niet merkwaardig. Vervolgens loste BY4742 [FLO10], een stam die door Van Mulders en medewerkers (2009) reeds beschreven werd als beperkt agaradhesief groeiend. Nog later loste κ samen met BY4742 [FLO11]. Chimeer ι daarentegen bleek nauwelijks afwasbaar, alhoewel meer cellen afgewassen werden dan bij $\Sigma 1278b$ wt. Aangezien κ en ι een stuk adhesiever aan agar groeiden dan BY4742 [FLO10] en in hun groei eerder leken aan te leunen bij BY4742 [FLO11], werd gesloten dat de bijdrage van het centrale FLO-domein een overheersende factor is in agaradhesie.

Tot slot werd nog een polystyrentest uitgevoerd. Cellen van een aantal verschillende giststammen werden aan gelijke densiteiten opgelost in wellen met YPD van een multiwellplaat en overnacht geïncubeerd (zie protocol 3.7.2.2.). De microfermentaties werden beëindigd met het afpipetteren van de YPD en kleuren van de achtergebleven cellen met kristalviolet. Na wassen werd de absorptie van de achtergebleven kristalviolet gemeten. De geteste stammen waren: BY4742 wt ter controle van niet-adhesieve groei aan polystyreen (Van Mulders *et al.*, 2009), BY4742 [FLO1]/[FLO10]/[FLO11] als controle voor adhesieve groei, BY4742 FLO1 Δ , BY4742 FLO10 Δ , BY4742 FLO11 Δ , κ en ι (zie figuur 4.16 en figuur 4.17).



Figuur4.16: Polystyreenadhesietest. Absorptie van kristalviolet bij 570nm van BY4742 wt en een aantal transformanten van BY4742, is een maat voor de hoeveelheid achtergebleven gistcellen in de wells. De gemiddeldes en standaarddeviaties zijn gespreid over acht absorptiewaardes.



Figuur4.17: Polystyreenadhesietest. Foto van multiwellplaat na kleuring met kristalviolet en wassen. Analytische data weergegeven in figuur4.16. Per stam werden acht microfermentaties opgestart.

Op basis van figuur4.16 viel te besluiten dat de verschillende overexpressiestammen in BY4742 een beduidend betere polystyreenadhesie met zich meebrachten, met de *FLO1*-overexpressie duidelijk sterkst. Een duidelijk lagere adhesie van BY4742 [*FLO11*] tegenover BY4742 [*FLO1*] en BY4742 [*FLO10*] liet toe te besluiten dat de resultaten van agaradhesie niet zonder meer extrapolerebaar waren naar polystyreenadhesie. De geteste deletiestammen vertoonden een adhesie in dezelfde grootteorde als BY4742 wt; dit volgens de verwachtingen aangezien de deletie van *FLO*-genen geen veranderde celwandsamenstelling met zich meebracht. De polystyreenadhesiecapaciteit van κ bleek verder significant lager dan van ι, een vaststelling die in lijn lag met de resultaten vastgesteld in Real-Time PCR, cel/celflocculatie en agaradhesie. Het is echter niet met zekerheid te

besluiten dat de hogere expressie van ι ten opzichte van κ een verklaring was voor de significant hogere adhesie van deze. De polystyreenadhesie van ι bleek intermediair aan deze van BY4742 [*FLO10*] en van BY4742 [*FLO11*] zodat niet onmiddellijk een besluit kon getrokken wat betreft de relatieve bijdrage van de verschillende adhesiedomeinen. Reden hiertoe was ondermeer de hoge spreiding op de absorptiewaardes van *iota*.

4.4. *FLO*-stammen in de Σ 1278b-achtergrond

Zoals in 2.2.1. reeds gezegd, komt *FLO11* in *S. cerevisiae* Σ 1278b (veelgebruikte laboratoriumstam naast S288c) wel tot expressie met een sterke agaradhesie als gevolg. Daarnaast groeit Σ 1278b typisch invasief (Stanhill *et al.*, 1999). Om inzicht te krijgen in de sterkte van de promoter en de relatieve bijdrage van *FLO11* in de cel/oppervlakteadhesie werden in de *Mata* achtergrond deleties en overexpressies gerealiseerd (zie tabel4.8). Daarnaast werden er ook in de *Mata* achtergrond *FLO11*-deletanten gecreëerd en dit met een andere merker (zie tabel4.8). In een volgende fase konden dan diploïde *Mata*/ α stammen gemaakt worden. Selectie diende te gebeuren in YPD met kanamycine en zeocine. Dit alles kaderde in een onderzoek naar de effecten op pseudohyfae groei, maar werd slechts begonnen in de jaargang 2008/2009 en wordt in de toekomst verdergezet.

Stam	Cassetteplasmide	Gebruikte merker
Σ 1278b <i>Mata</i> [<i>FLO11</i>]	pYM-N18	<i>KANMX</i>
Σ 1278b <i>Mata FLO11</i> Δ	pUG6	<i>KANMX</i>
Σ 1278b <i>Mata</i> <i>FLO11</i> Δ	pUG66	<i>BLE</i>

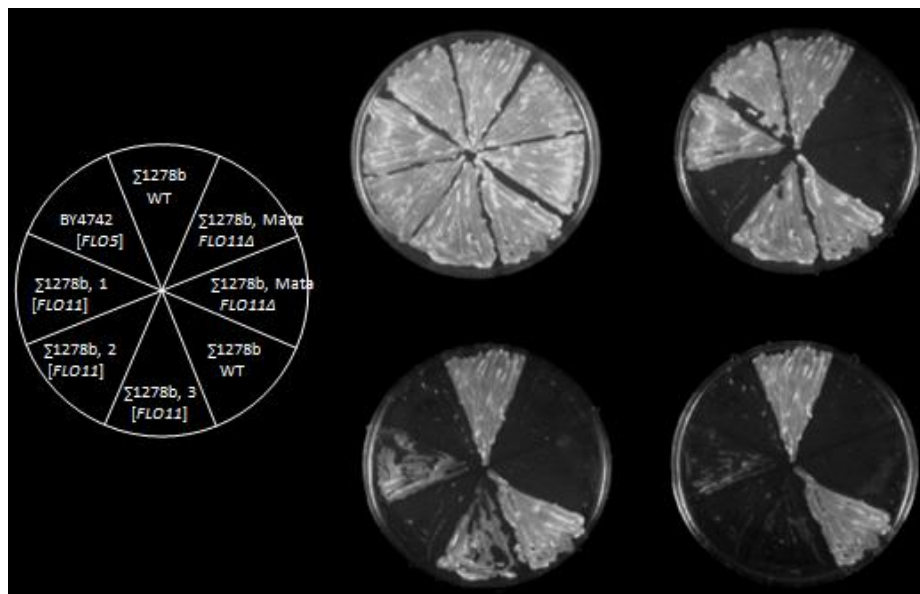
Tabel4.8: Overzicht van de geconstrueerde overexpressie- en deletiestammen in Σ 1278b en de hiertoe gebruikte plasmides met bijhorende merkers.

Omdat het genoom van Σ 1278b niet (volledig) gekend is, werd de keuze gemaakt dezelfde primers als bij BY4742 te gebruiken voor de aanmaak van overexpressie- en deletiecassettes, in de veronderstelling dat de stam voldoende homoloog is met het volledig gesequeneerde S288c. Alle amplificatie-, transformatie- en validatieprotocollen waren volledig analoog met deze beschreven in 4.1. en 4.2. Voor de genetische validatie werden primers gebruikt die perfecte homologie vertoonden met S288c. Dit opnieuw onder de veronderstelling dat de homologie tussen beide stammen voldoende groot was.

Na de aanmaak van de verschillende stammen werden deze onderworpen aan een aantal experimenten. Allereerst werden de agaradhesiecapaciteiten van de verschillende transformanten nagegaan (zie figuur4.18). Na uitplaten en incubatie gedurende vijf dagen op 30°C werden de gistcellen weggewassen. De stam waarin *FLO11* gedeleteerd werd, bleek hierbij niet meer in staat adhesief te groeien en liet onmiddellijk los na watercontact. Er werd geen verschil genoteerd in de verschillende *Mat*-achtergronden. De Σ 1278b *FLO11*-overexpressies bleven, naast de controle (BY4742 *FLO5*-overexpressie), adherent. Hun adhesieve karakter bleek sterker dan BY4742 [*FLO5*], maar minder sterk dan de Σ 1278b wildtype. Tegen de verwachtingen in, liet stam2 van de Σ 1278b *FLO11*-overexpressie echter ook snel los en vertoonde deze bijgevolg een analoog fenotype als de Σ 1278b *FLO11* Δ . Aangezien de stam gevalideerd werd door PCR, was dit resultaat enigszins onverwacht te

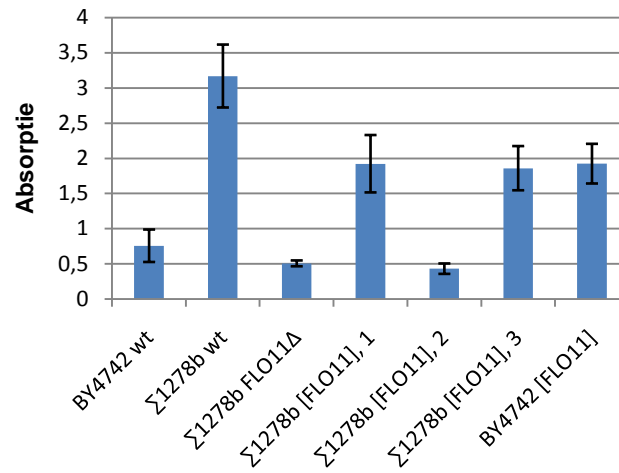
noemen. De overexpressie van het adhesine zou nooit in een prematuur lossen van de plaat mogen resulteren. Mogelijk lag een (punt)mutatie in een secretiemotief van *FLO11* of in de TEF1-promoter aan de oorzaak van dit resultaat. De verklaring hiervan werd niet achterhaald. Sequencerig en/of een studie van genexpressie van de verschillende *FLO11*-overexpressiestammen van $\Sigma 1278b$, lijkt bijgevolg een noodzaak. Een ander opmerkelijk resultaat was de vaststelling dat de $\Sigma 1278b$ *FLO11*-overexpressies (1 en 3) minder adhesief groeiden dan de $\Sigma 1278b$ wt. De verwachtingen hiervan waren eerder omgekeerd. Uitgangspunt was dat de sterke TEF1-promoter een verhoogde hoeveelheid Flo11p-adhesines op de celwand zou brengen met een verhoogde adhesie. De wildtype zou zich dan makkelijker (hoewel reeds harde waterstraal) laten afwassen. Aangezien dit niet zo was, werd besloten dat de endogene promotor van *FLO11* sterker was dan de TEF1-promoter. Bemerkt hierbij dat in 2.2.1. reeds vermeld werd dat de promotor van *FLO11* één van de meest complexe is van het hele gistgenoom (3kb, meerdere activatie- en repressie-elementen). Door insertie van de overexpressiecassette werd deze structuur verstoord: de aanwezigheid van de *KANMX/TEF1*-cassette onderbrak de promotor. Het verwijderen van de cellen van de $\Sigma 1278b$ wt was daarenboven enkel manueel mogelijk. Er werd besloten dat de activiteit van Flo11p in $\Sigma 1278b$ noodzakelijk was voor een agaradhesieve groei.

Na volledig afwassen van de cellen werden de platen ook nog gecontroleerd op invasieve groei (niet zichtbaar op figuur4.18). Naast $\Sigma 1278b$ wt, bleken ook $\Sigma 1278b$ [*FLO11*], 1 en $\Sigma 1278b$ [*FLO11*], 3 invasief te groeien, zij het minder sterk.



Figuur4.18: Agaradhesie-experiment van $\Sigma 1278b$ wt, *FLO11Δ* en een aantal overexpressiestammen. Links: model van uitgeplate giststammen, centraal boven: plaat voor wassen, rechtsboven: plaat na kort wassen onder zachte straal, centraal onder: plaat na langer wassen onder zachte straal, rechtsonder: plaat na wassen onder harde straal water.

Naast agaradhesie werd ook de polystyreenadhesie van de verschillende $\Sigma 1278b$ -stammen in een aantal microfermentaties getest (protocol3.7.2.2.). Als controles werden BY4742 wt en BY4742 [*FLO11*] toegevoegd (polystyreenadhesie reeds gekarakteriseerd in voorgaande experimenten en door Van Mulders en medewerkers (2009)) (zie figuur4.19).



Figuur4.19: Polystyreenadhesietest. Absorptie van kristalviolet bij 570nm van een aantal stammen afgeleid van $\Sigma 1278b$, BY4742 wt en BY4742 [FLO11], is een maat voor de hoeveelheid achtergebleven gistcellen in de wells. De gemiddeldes en standaarddeviaties zijn gespreid over acht absorptiewaardes.

De resultaten van deze test bleken gelijklopend met de resultaten van het agaradhesie-experiment (hoewel niet extrapol eerbaar, zie hoger). $\Sigma 1278b$ wt bleek meest adhesief te kunnen groeien aan polystyreen. In mindere mate bleken ook $\Sigma 1278b$ [FLO11], 1 en 3 hiertoe in staat. Bemerkt dat de adhesiecapaciteit van deze van dezelfde orde grootte was als BY4742 [FLO11]. Hoewel $\Sigma 1278b$ [FLO11], 1 en 3 op agar duidelijk adhesiever groeiden dan BY4742 [FLO11], bleek op polystyreen geen significant adhesieverschil merkbaar ($\alpha=0,05$) (Behrens-Fisher, zie hoger). Bijgevolg spelen mogelijk nog andere factoren een rol in agaradhesie of worden differenties veroorzaakt door (punt)mutaties in de sequenties van met de agarinteragerende domeinen. $\Sigma 1278b$ [FLO11], 2 bleek net als $\Sigma 1278b$ FLO11Δ niet adhesief te kunnen groeien, aangezien de absorptiewaardes in de buurt lagen van de BY4742 wt, een in de wildtype niet-adhesief groeiende gist.

4.5. Industriële giststammen

4.5.1. Constructie van de overexpressiestammen in CMBS VM13 en CMBS VM14

Aangezien dit project kaderde in een verkenning van adhesiecapaciteiten bij gisten, werd gepoogd *FLO*-genen (of genen verwant hieraan) in een aantal industriële stammen tot overexpressie te brengen. Nadeel hierbij was dat de genomen van deze stammen echter veelal niet gekend zijn. Op die manier was de ontwikkeling van primers met homologe staarten voor een correcte integratiesite van een overexpressiecassette in principe onmogelijk. Bijkomende nadelen zijn het voorkomen van frequente recombinaties binnen subtelomere domeinen (waar de *FLO*-genfamilie voornamelijk gelegen is), waardoor de kans op integratie van de cassette voor een niet-actief *FLO*-gen of voor een pseudogen gevoelig verhoogd werd (Schacherer *et al.*, 2007). Bemerkt dat industriële giststammen typisch polyploïd en vaak ook aneuploïd zijn, waardoor veelal minder eenduidige fenotypes bekomen worden.

CMBS VM13 en CMBS VM14, de geteste gisten, zijn beide industriële stammen die gebruikt worden in de productie van bioethanol. Aangezien beide stammen in de wildtype niet flocculent zijn, kon screening op

potentiële transformanten (met een geactiveerd adhesine) visueel gebeuren, zie tabel 4.9, volgens protocol 3.7.1. waarbij in YPD opgegroeide gisten gedurende korte tijd geschud en visueel geobserveerd werden naar flocculent karakter. Op basis van het fenotype werden een aantal stammen geselecteerd voor verder onderzoek, namelijk CMBS VM13, 11/ 14/15, CMBS VM14, 14/23/51.

Stam	Gerichte <i>FLO</i> -gen	Fenotype
CMBS VM13, wt		Losse cellen, niet flocculent
CMBS VM13, 11	[<i>FLO5</i>]	Zwakke vlokken
CMBS VM13, 14	[<i>FLO10</i>]	Zwakke vlokken
CMBS VM13, 15	[<i>FLO10</i>]	Kleine vlokken, losse cellen
CMBS VM13, 16	[<i>FLO10</i>]	Vlokken
CMBS VM13, 18	[<i>FLO1</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, wt		Losse cellen, niet flocculent
CMBS VM14, 8	[<i>FLO11</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, 12	[<i>FLO11</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, 13	[<i>FLO1</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, 14	[<i>FLO1</i>]	Vlokken
CMBS VM14, 16	[<i>FLO5</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, 18	[<i>FLO5</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, 23	[<i>FLO1</i>]	Kleine vlokken
CMBS VM14, 32	[<i>FLO9</i>]	Licht pseudohyfaal
CMBS VM14, 37	[<i>FLO10</i>]	Kleine vlokken
CMBS VM14, 39	[<i>FLO10</i>]	Losse cellen
CMBS VM14, 51	[<i>FLO5</i>]	Vlokken en losse cellen

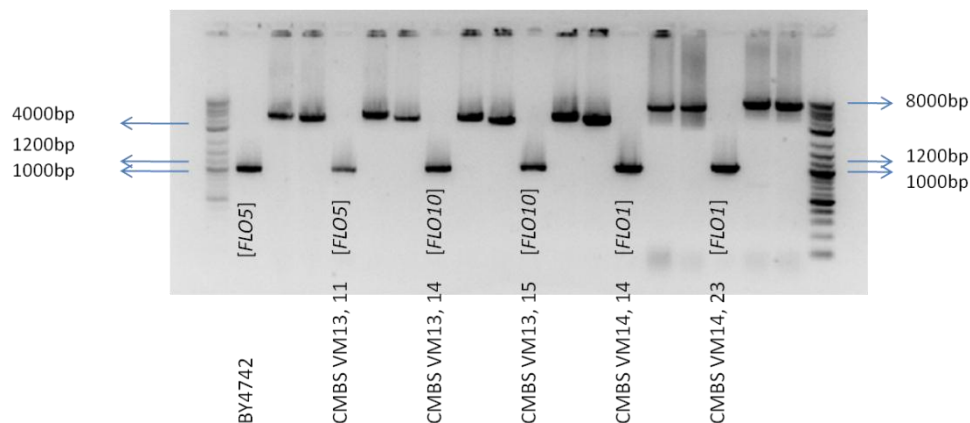
Tabel 4.9: Overzicht van fenotypes van een aantal met de *pYM-N18*-cassette getransformeerde CMBS VM13 en CMBS VM14 stammen en de gedoelde *FLO*-genen. De weergegeven stammen werden aangetoond de overexpressiecassette te bevatten (gels niet weergegeven).

Bemerk dat verschillende fenotypes geobserveerd werden. Dit kan verklaard worden doordat industriële gisten typisch polyploid zijn: een geactiveerd *FLO*-gen (of een afgeleide hiervan) kan chromosoomafhankelijk zijn of een deel van zijn interchromosomale homologie verloren hebben wat aanleiding kan geven tot (subtiele) verschillen. Secundaire effecten door translocaties of duplicaties zijn anderzijds ook niet uit te sluiten.

Zoals hierboven gesteld was de keuze van de primers met homologe staarten niet triviaal. Er werd echter geopteerd voor dezelfde primers als in de aanmaak van de overexpressiecassettes voor de verschillende *FLO*-genen in BY4742 (zie tabel 3.4). Uitgangspunt hierbij was dat de sequenties zoals deze gekend zijn voor de *FLO*-genen (i.e. onmiddellijk stroomopwaarts en aan het begin van het leesraam) dezelfde zijn of hoogstens door een discreet aantal (punt)mutaties gekenmerkt worden. De amplificatie van de cassettes werd opnieuw uitgevoerd met Expand High Fidelity^{PLUS} polymerase volgens tabel 3.14 (zie ook gel, figuur 4.2). Op dezelfde manier werd geselecteerd op geneticineplaten (YPD, 2%). Bemerk hierbij dat de hogere processiviteit van de industriële gisten duidelijk zichtbaar was tijdens en na incubatie: de kolonies groeiden na transformatie veel

sneller bij dezelfde temperatuur dan de BY4742 wt (S288c) en de platen telden ook meer *escapes*, hetgeen waarschijnlijk te wijten was aan een gewijzigde fysiologie van de industriële giststammen. Deze werden namelijk via een heel intensief selectieproces geïsoleerd om weerstandig te zijn aan grote stressen (onder andere 20% ethanol) zodat een (beperkte) groei op YPD met geneticine toch niet zo onrealistisch was (Basso *et al.*, 2008). Op die manier dienden heel wat meer kolonies gescreend te worden op de aanwezigheid van de overexpressiecassette om toch een aantal ware transformanten te bekomen. Verificatie van de aanwezigheid van de cassette gebeurde met de koppels 247/257, 248/257, 165/260 of 248/260 (zie tabel3.6).

Validatie van de correcte integratiesite was omwille van het niet gekend zijn van de genomen (cf. supra) heel moeilijk. Daarenboven moet men er rekening mee houden dat een groot deel van de interchromosomale homologie bij industriële gisten verloren is gegaan (polyploidie verlaagt de druk op mutatieherstel en laat een verhoogde evolutiegraad toe, haplosufficiëntie). Als 'compromis' werd besloten om één primer (165) (*forward primer*) te kiezen in de cassette en één primer (*reverse primer*) met homologie voor de GPI-ankersequentie (zie tabel3.6 en tabel3.7). Deze sequentie is aanwezig in alle actieve *FLO*-genen en is noodzakelijk voor celwandbouw (ook aanwezig bij andere genen die coderen voor celwandproteïnen) (zie figuur4.20). Daarenboven vertoont dit motief typisch een hoge conserveringsgraad zodat een eventueel actief adhesine toch minstens deze nucleïnezuursequentie diende te bevatten. Bemerkt dat dit uiteraard geen garantie vormde voor de detectie van een geactiveerd adhesine aangezien hierin nog een heel aantal andere factoren betrokken zijn, maar eerder voor de activering van een DNA-fragment dat voorafgegaan wordt door een '*FLO*-achtige' sequentie en een GPI-anker bevat. De PCR-reacties ter verificatie van de cassette-aanwezigheid en de integratiesite werden allen uitgevoerd met het Long Range polymerase. In tabel4.10 staan de lengtes van de verschillende amplicons – geobserveerd en geschat – weergegeven.



Figuur4.20: Bevestiging aanwezigheid en verificatie van de integratieplaats van de overexpressiecassette in enkele getransformeerde CMBS VM13 en CMBS VM14 stammen. Ladder (2log): laan1 en 20. Laan2-4: BY4742, *FLO5*-overexpressie; laan5-7: CMBS VM13 11, transformatie naar *FLO5*; laan 8-10: CMBS VM13 14, transformatie naar *FLO10*; laan 11-13: CMBS VM13 15, transformatie naar *FLO10*; laan 14-16: CMBS VM14 14, transformatie naar *FLO1*; CMBS VM14 23, transformatie naar *FLO1*. Laan2, 5, 8, 11, 14, 17: screening naar aanwezigheid overexpressiecassette. Laan3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19: screening naar aanwezigheid van GPI-anker. Gebruikte primerkoppels en lengtes, zie onder, tabel4.10.

Overexpressiestam	Gebruikte primerkoppel (zie tabel3.6, 3.7)	Berekende grootte PCR-product (in basenparen)	Geschatte grootte PCR-product (in basenparen)
BY4742 [<i>FLO5</i>]	165/260	1022	1030

	165/261	4178	5560
	165/263	3853	4900
CMBS VM13, 11 [FLO5]	165/260	1022	1040
	165/261	4178	5940
	165/263	3853	4770
CMBS VM13, 14 [FLO10]	165/260	1022	1080
	165/261	4460	5070
	165/263	4126	4540
CMBS VM13, 15 [FLO10]	165/260	1022	1110
	165/261	4460	5050
	165/263	4126	4660
CMBS VM14, 14 [FLO1]	165/260	1022	1110
	165/261	5559	8340
	165/263	5180	8290
CMBS VM14, 23 [FLO1]	165/260	1022	1120
	165/261	5559	10540
	165/263	5180	9200

Tabel4.10: Overzicht van de verwachte en de geschatte bandlengte van de PCR-fragmenten op basis van gel figuur4.20. De verwachte groottes werden berekend op basis van de sequenties van de S288c stam. De geschatte groottes werden bepaald met behulp van de Quantity One software (Biorad).

Uit bovenstaande tabel4.10 bleken de waarden voor de lengtes van de sequenties (op basis van de gel) vanaf de overexpressiecassette voor BY4742 [FLO5] sterk af te wijken van de berekende lengtes (ongeveer 30%). Redenen hiertoe waren ondermeer: fouten van het Long Range Polymerase in de amplificatie (door inlassen van herhalingen) of te dikke bandjes met aberraties van de software als gevolg. Bemerkt dat de bandjes van 4,0 en 5,0kb van de 2log-ladder relatief dicht op elkaar volgden. Als oplossing kan het gebruik van een andere ladder overwogen worden met een betere scheiding voor deze fragmenten of een gel met een andere poriegrootte. Daarenboven moet men er rekening mee houden dat tengevolge van het vele overenten en de transformaties (en de selectiedruk die hiermee gepaard gaat) de giststam een gewijzigd aantal herhalingen in het centrale domein kan verworven hebben en dus gemuteerd was, los van de andere 'natuurlijke' recombinaties in de subtelomere domeinen. Dit verschijnsel werd door Fidalgo en medewerkers (2008) reeds beschreven voor FLO11 in een florigist (wild, *Saccharomyces spp.*) (zie ook Verstrepen *et al.*, 2006). Het is uiteraard niet uitgesloten dat een combinatie van deze factoren aan de basis lag van de afwijkingen.

Omwillen van bovenstaande redenen dienden de afwijkingen in geschatte en geobserveerde lengtes met enige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden. Het was echter in elk geval duidelijk dat alle transformanten zoals hier afgebeeld de overexpressiecassette en een anker bevatten. De gemeten lengtes in de transformanten van CMBS VM13 waren vrij goed in overeenstemming te brengen met de berekende (rekening houdend met de foutenmarge zoals geobserveerd in de FLO5-overexpressie bij BY4742). De FLO1-overexpressies van CMBS VM14 daarentegen waren 50% tot 90% langer dan verwacht. Indien de cassettes ter hoogte van een fragment met adhesineactiviteit geïntegreerd waren, werd besloten dat de mogelijkheid reëel was dat de ORF's in de

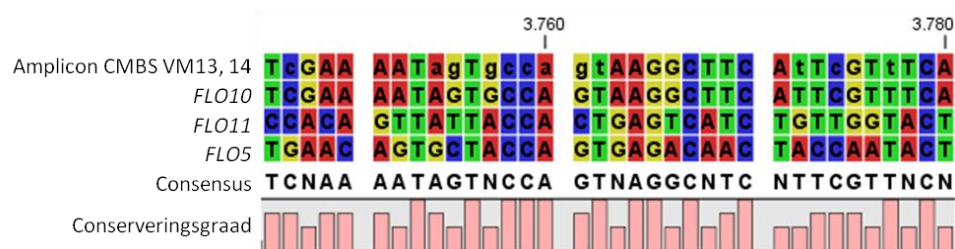
evolutie een groot aantal extra repeats verzameld hadden. Het was anderzijds niet uitgesloten dat een aantal recombinaties in het genoom van de giststam aan de basis lagen van de lengte zoals hier weergegeven. Het was op basis van de gegevens zoals nu gekend ook niet met zekerheid te besluiten dat de onverwachte bandlengtes te wijten waren aan een gewijzigd aantal repeats; inserties van 'vreemde' elementen (o.a. transposons) bleven ook een mogelijkheid.

4.5.2. Fenotypische en verdere genetische evaluatie van de overexpressiestammen

Teneinde inzicht te krijgen in de adhesieve capaciteiten en de sterkte van een aantal verschillende 'overexpressie'-stammen (met bevestigd GPI-anker), werd vervolgens onderzoek verricht naar agaradhesie en polystyreenadhesie. Dit omdat het op basis van de gel van figuur4.20 niet mogelijk was met zekerheid te besluiten dat het amplicon weldegelijk een adhesine betrof, laat staan een adhesineachtige activiteit had.

In een eerder experiment werd wel aangetoond dat de *FLO5*-overexpressie in BY4742 weldegelijk op *FLO5* sloeg. Om een beter inzicht te krijgen in de tot overexpressie gebrachte fragmenten was het bijgevolg aangewezen om de resterende PCR-producten, die potentieel een (groot) deel van een adhesine konden bevatten (gesteund door visuele observaties, plasticadhesie- en agaradhesie-experimenten, cf. infra), te sequencen en op zoek te gaan naar homologie met bestaande genen, pseudogenen of andere *FLO*-genfragmenten.

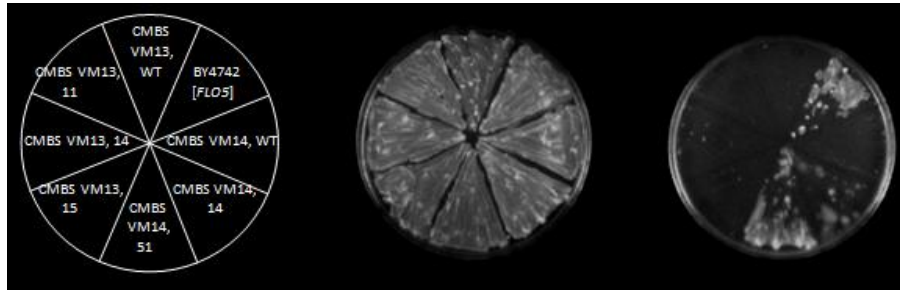
Er werd aangetoond dat het amplicon van CMBS VM13 11, corresponderend met laan7 uit figuur4.20 homologie vertoonde met *FLO5*, het gen dat ook bedoeld werd. Het amplicon van CMBS VM13 14, corresponderend met laan10 uit figuur4.20, vertoonde verwantschap met *FLO10* (zie figuur4.21). Op onderstaande figuur4.21 een fragment van de allignering tussen het amplicon uit laan10 en *FLO10*, *FLO11* en *FLO5*. Het sequentiefragment, zoals weergegeven, vertoonde significante homologie met het C-terminale domein van *FLO10* (100%, tegenover 49% voor *FLO11* en 57% voor *FLO5*). Bij het ter perse gaan was dit onderzoek echter nog lopende.



Figuur4.21: Fragment van de allignering tussen het amplicon uit laan10 van figuur4.20 van CMBS VM13, 14 en *FLO10*, *FLO11* en *FLO5*, van basenpaar 3746 tot en met 3780.

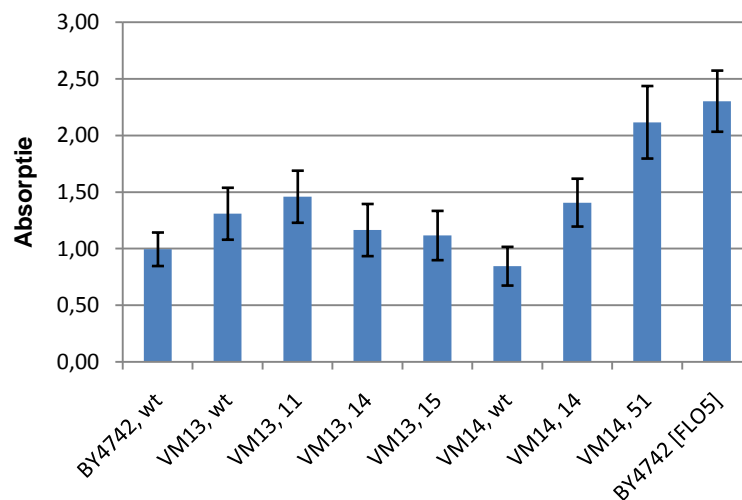
Naar analogie met de overexpressies in de laboratoriumstammen BY4742 (S288c) en Σ 1278b zoals reeds eerder besproken, werd eerst een agaradhesie-experiment uitgevoerd (zie figuur4.22). Een beperkte hoeveelheid cellen van een aantal PCR-bevestigde transformanten, werd uitgesmeerd op een YPD-plaat, geïncubeerd en onder een zachte stroom water afgewassen (zie protocol3.7.2.1.). Als referentie voor overexpressie werd de gevalideerde *FLO5*-overexpressie in BY4742 gebruikt (hoewel niet echt agaradhesief, zie Van Mulders *et al.*,

2009). Verhoogde adhesie was na het wassen onder een zachte waterstraal merkbaar voor CMBS VM14,14 ([FLO1]) en CMBS VM14, 51 ([FLO5]). Geen van de uitgeplate gisten vertoonde invasieve groei (niet zichtbaar op basis van figuur4.22). Er werd besloten dat in CMBS VM14, 14 en 51 mogelijk een adhesine geactiveerd werd. Bemerkt dat tot op heden echter onvoldoende geweten is in welke mate VM13 en VM14 secretie en celwandbouw van proteïnes toelaten, zodat bijkomend onderzoek zich opdringt.



Figuur4.22: Agaradhesie-experiment van twee industriële gisten: CMBS VM13 en CMBS VM14, wildtypes en transformanten, BY4742 [FLO5] als controle voor adhesieve groei. Links: model van de uitplantingen op YPD-plaat, midden: foto van plaat voor wassen, rechts: foto van plaat na wassen.

Daarnaast werd ook de adhesiecapaciteit van een aantal transformanten op een multiwellplaat (polystyreen) nagegaan door het opstarten van een aantal microfermentaties (protocol3.7.2.2.). Bemerkt hierbij dat dit alles mogelijk was aangezien CMBS VM13 en CMBS VM14 in de wildtype niet flocculent waren, noch adhesief leken te groeien. Een aantal transformanten werden samen met de CMBS VM13 en CMBS VM14 wildtypes getest op hun adherende karakter aan het gemengd hydrofoob/hydrofiel oppervlak van de plastic multiwellplaat (zie figuur4.23). Als referentie werden de BY4742 wt en BY4742 [FLO5] toegevoegd om een eventueel adhesief karakter relatief te kunnen schatten.



Figuur4.23: Polystyreenadhesietest. Absorptie van kristalviolet bij 570nm van een aantal transformanten van CMBS VM13 en VM14, BY4742 wt en BY4742 [FLO5], is een maat voor de hoeveelheid achtergebleven gistcellen in de wells. De gemiddeldes en standaarddeviaties zijn gespreid over acht absorptiewaardes.

Met behulp van de gegevens uit figuur4.23 kon de H_0 -hypothese: de adhesie van VM13, 11/14/15 is verschillend van de adhesie van VM13 wt niet verworpen worden op significantieniveau 0,05. De adhesie van

VM14, 14 en VM14, 51 was significant verschillend van VM14 wt ($\alpha=0,05$), waardoor de H_0 -hypothese kon verworpen worden. Daarnaast was de adhesie van VM13 wt en VM14 wt niet significant verschillend ($\alpha=0,05$) van de adhesie van de BY4742 wt. Bemerk dat het hydrofoob karakter van VM14, 51 dicht in de buurt kwam van dit van BY4742 [FLO5], door Van Mulders en medewerkers (2009) als heel adhesief omschreven. De adhesie van VM14, 51 was dan ook niet significant verschillend van BY4742 [FLO5] (significantieniveau 0,05). Er werd besloten dat CMBS VM14, 14 en 51 mogelijk gekenmerkt werden door een echt geactiveerd adhesine.

Op basis van de resultaten van tabel4.9, figuur4.21, figuur4.23 en figuur4.24 werd geconcludeerd dat in CMBS VM14, 14 en 51 naar alle waarschijnlijkheid een adhesine geactiveerd werd. Bij CMBS VM13, 11/14/15 waren de resultaten minder eenduidig. Mogelijk werd hier een niet- of semi-actief adhesine onder overexpressie gebracht. Het is evenwel aangewezen om ook adhesie aan andere oppervlakken als glas, hout, epitheel, volledig hydrofobe oppervlakken, etc. te onderzoeken. Bemerk dat er op basis van tabel4.9 een hele waaier aan fenotypes werd waargenomen, hetgeen het vermoeden van het dragen van een eigen adhesinepalet door elke gist, alleen maar kon versterken. Dit opende dan ook het luik voor de volgende paragraaf in deze studie...

4.6. Analyse van variatie binnen de FLO-genfamilie

Gezien de locatie en de bouw van de FLO-genen, lijken onderzoekers er steeds meer van overtuigd dat elke – industriële – stam over zijn eigen set adhesines beschikt. Enkel op deze manier is het mogelijk een verklaring te vinden voor de grote verschillen, wat betreft flocculatie en adhesie, tussen stammen onderling. Naast een goede beheersing van de verschillende medium- en omgevingsparameters (cf. supra 2.3.3.) lijkt bijgevolg een grote rol weggelegd voor een verkenning van het adhesine-armamentarium van ‘zijn’ gist om zo een idee te krijgen van de capaciteiten van deze en eventueel voorspellingen te kunnen doen.

In een verkennend experiment werden een aantal primerkoppels ontwikkeld op basis van het gekende genoom van de gesequeneerde stam S288c. In totaal werden negen primerparen ontworpen: vijf voor de FLO-genen FLO1, FLO5, FLO9, FLO10 en FLO11; twee voor de pseudogenen YAR061W en YAR062W; Lg-FLO1 en de endogene controle ACT1. Om na te gaan of de primers specifiek genoeg waren en weldegelijk bonden aan de wildtype labostam, werden deze initieel getest op BY4742 (S288c) en in tweede instantie deletanten van deze (gels niet weergegeven). Hieruit bleek dat de primers gevoelig en selectief waren. Amplificatie van de korte gensequenties gebeurde met Taq-polymerase (zie tabel3.10 en tabel3.13), gevolgd door een gelelektroforese met de 50bp-ladder als referentie. Bemerk dat om een geslaagde scheiding van de fragmenten te bekomen hier een 2%-gel vereist was. Deze primerkoppels werden eveneens gebruikt in de RT-PCR-experimenten (zie hoger).

De ontwikkelde primerkoppels werden vervolgens getest op drie brouwersstammen: CBS 1513 *Saccharomyces pastorianus* var. *Pastorianus* 150, CMBS VM16 en CMBS VM17, allen van het NewFlo-fenotype. In tabel4.11 wordt een overzicht gegeven van de lengtes (in bp) van de geamplificeerde fragmenten ten opzichte van de te verwachten lengte op basis van de sequentie van S288c. Hierbij waren drie mogelijkheden: of het amplicon was niet zichtbaar, of het amplicon was wel zichtbaar op de juiste hoogte of het bandje viel op de verkeerde hoogte (duidelijk afwijkend), ook wel aspecifieke binding genoemd. In het eerste geval zal het adhesine echt afwezig zijn of al te sterk gemuteerd zijn zodat primerbinding niet meer mogelijk was. Echter, de amplificatietijd werd

voldoende ruim genomen en de primerbindingstemperatuur voldoende laag zodat een of een discreet aantal mismatches alsnog een amplificatie zouden kunnen betekenen. Had het amplicon de juiste lengte, viel te verwachten dat dit adhesine (of toch minstens het geteste deel) nog aanwezig was. Vaak bleek het amplicon echter op een licht afwijkende hoogte gesitueerd. Te verwachten oorzaken hiervan waren mutaties (inserties en deleties) binnen het amplicon of specifieke bandjes doordat primers op een verkeerde plaats bonden (verlaagde annealingtemperatuur, cf. supra). Bemerkt dat het gen *ACT1* als endogene controle zelf ook een zekere graad van variatie toonde. Dit was niet zozeer te wijten aan mutaties van dit gen gezien zijn sterke conserveringsgraad, maar wel aan onzuiverheden van de PCR, gel en kwantificatiesoftware van de computer. Bijgevolg mogen variatie in data niet te absoluut beschouwd worden en is het veiliger een voldoende hoge standaardafwijking op de detectie in acht te nemen.

Bij het bekijken van de resultaten voor de lengtes van de verschillende amplicons, was onmiddellijk heel wat variatie merkbaar. Naast het niet detecteren van bepaalde adhesines en het voorkomen van specifieke banden, bleek heel wat variatie te bestaan in de ampliconlengte van de adhesines. Bemerkt hierbij dat het niet mogelijk was op basis van de lengte van de geamplificeerde fragmenten of op basis van het wel/niet detecteren, uit te maken of de onderzochte gist een brouwersgist of een bioethanolgist betrof, of van het *lager* of van *ale* type was, aangezien deze onder elkaar geen duidelijke patronen vertonen. Voor een grondige studie zijn evenwel nog heel wat meer en verder uit elkaar liggende (zowel evolutionair als qua functie) gisten nodig.

Een verklaring voor de sterk op elkaar lijkende waarden van CMBS VM16 en CMBS VM17 (met uitzondering van *YAR062W*) was niet onmiddellijk voor handen. Beide stammen zijn afkomstig uit eenzelfde gistcultuur van een Belgisch bier. Het is uitgesloten dat de ene stam een mutant is van de andere, aangezien de ene stam van het *lager*-type is (afgeleid van *S. pastorianus*) en de andere van het *Ale*-type (afkomstig van een kruising tussen *S. cerevisiae* en *S. bayanus*) en dus weinig onderling verwantschap hoeven te tonen.

Daarnaast is het zinvol de detectie van een bandje met de Lg-*FLO1*-primers (specifiek voor het suikerbindende domein, zie 2.2.2.1.) op te merken. CBS 1513 *S. pastorianus*, CMBS VM16 en CMBS VM17 zijn allen brouwersgisten van het NewFlo-fenotype, wat het voorkomen van Lg-*FLO1* in hun genoom veronderstelde. De geschatte ampliconlengte bleek toch enigszins af te wijken van de verwachte (op basis van de sequentie). Ook CMBS VM03, VM06, VM11 en VM12 zijn brouwersgisten. Van al deze is CMBS VM06 de enige stam die niet-flocculent groeit (stofgist). De aanwezigheid van Lg-*FLO1* bij deze kon markant genoeg niet gedetecteerd worden, hetgeen naar alle waarschijnlijkheid het belang van Lg-Flo1p in flocculatie duidt. Noch voor S288c, noch voor Σ 1278b was een bandje voor Lg-*FLO1* te detecteren. Dit was niet geheel verrassend; aangezien beide labostammen van Flo1-fenotype zijn.

Dit alles kan de lezer doen besluiten dat elke giststam over zijn eigen adhesine-arsenaal beschikt. In het licht van de informatie weergegeven in tabel 4.11 is het bijgevolg beter de *FLO*-gen-'familie' te zien als een geheel van genen die kunnen recombineren onder elkaar en met pseudogenen en daarnaast snel en gemakkelijk mutaties opstapelen om op die manier een hoge graad aan variatie op te slaan en te kunnen tentoonstellen.

Giststam	Beschrijving	ACT1 (135/136)	FLO1 (93/94)	FLO5 (131/132)	FLO9 (133/134)	FLO10 (110/111)	FLO11 (95/96)	YAR062W (122/123)	YAR061W (126/127)	Lg-FLO1 (128/129)
S288c	Laboratoriumstam	99,79	105,57	73,00	107,45	59,63	62,38	71,37	62,63	
Sigma 1278b	Laboratoriumstam	88,95	127,86	87,05	112,89	68,43	66,30	102,87	96,50	
CMBS VM03	Lager gist, brouwersgist	92,29			106,28		51,36			44,44
CMBS VM06	Ale gist, brouwersgist	92,42			112,41		50,17	65,87	66,57	
CMBS VM11	Ale gist, brouwersgist	94,66		425,10	108,86		53,09	67,72		57,44
CMBS VM12	Ale gist, brouwersgist	104,77		445,58	119,18		74,66	82,98		67,51
CMBS VM13	Ale gist, bioethanol	97,35		80,10	112,49	59,04	63,76	79,23	74,86	
							386,20			
							713,01			
CMBS VM14	Ale gist, bioethanol	99,19	106,01	517,90	110,24	54,70	59,98	64,02	58,05	
				75,31						
CMBS VM15	Ale gist	101,91	105,26	505,94	101,72	57,80	382,03	64,52	55,26	
							62,36			
CBS 1513 <i>S. pastorianus</i>	Lager gist, brouwersgist	98,45	118,25	103,60	123,45		99,99	107,34		96,09
CMBS VM16	Lager gist, brouwersgist	87,39	105,95	90,81	108,01		85,72	64,22	65,47	82,49
CMBS VM17	Ale gist, brouwersgist	87,21	107,26	89,90	108,25		84,44	95,55	64,27	81,04
	Berekende lengte (S288c)	104,00	81,00	81,00	113,00	61,00	66,00	83,00	73,00	66,00

Legenda:
Niet gedetecteerd
Aspecifieke binding

Tabel 4.11: Overzicht van geobserveerde lengtes (in basenparen) van amplicons van verschillende FLO-genen en pseudogenen, bepaald met de Quantity One software, tegenover de berekende lengte van de PCR-producten op basis van de sequentie van S288c. De lengtes van de amplicons van CBS 1513 *S. pastorianus*, CMBS VM16 en CMBS VM17 werden bepaald. Fragmentlengtes van andere stammen (S288c, Sigma1278b, CMBS VM03, CMBS VM06, CMBS VM11, CMBS VM12, CMBS VM13, CMBS VM14, CMBS VM15) werden bepaald in 2006/2007 en 2007/2008.

5. Besluit en toekomstperspectieven

In deze studie werd onderzoek verricht naar adhesines in *S. cerevisiae*: de verschillende modulaire eenheden die cel/cel- en cel/oppervlaktheadhesie kunnen beïnvloeden enerzijds en de samenstelling van het *FLO*-genpalet in verschillende giststammen anderzijds. Een betere kennis hiervan moet het mogelijk maken adhesieve fenotypes beter te voorspellen en te sturen in verschillende industrieel-relevante processen.

In een eerste deel werden chimere *FLO*-genen in BY4742, een niet-flocculente en niet-adhesieve giststam, aangemaakt via een PCR-gebaseerde strategie. Voor de doelgerichte constructie ervan was het belangrijk te werken in deletieachtergronden. Daarnaast was de aanmaak van stammen met selectief tot overexpressie gebrachte adhesines essentieel. De aanmaak van zowel deletie- als overexpressiestammen gebeurde eveneens via een PCR-gebaseerde strategie. Validatie van getransformeerde giststammen vond typisch plaats via PCR. Er werd hierbij aangetoond dat de deletie- en overexpressiestammen correct en selectief werden aangemaakt. Vervolgens werd in een Real-Time PCR-experiment op een aantal transformante stammen een genexpressiestudie uitgevoerd. Een aantal stammen waarin adhesines (al dan niet chimeer) tot overexpressie kwamen, werden hierbij op een sterk verhoogde *FLO*-transcriptie gevalideerd. Significante expressieverschillen tussen twee correct geconstrueerde chimere *FLO10N/FLO11*-stammen werden hierbij eveneens vastgesteld. Mogelijk lag een (punt)mutatie in de constitutieve *TEF1*-promoter of een gewijzigd aantal tandemherhalingen aan de basis van deze vaststelling. Een sterk verhoogde transcriptie van *FLO*-genen betekende daarenboven dat de gewijzigde fenotypes van de transformanten mogen gekoppeld worden aan het gerealiseerde DNA-construct (cf. infra). In dit alles bleken auxotrofe merkers met een grotere efficiëntie in het gistgenoom van BY4742 opgenomen te worden. Er werden meer *escapes* vastgesteld bij gebruik van antibioticummerkers.

Naast een genetische analyse werden de transformante giststammen onderworpen aan een aantal experimenten die screenden naar gewijzigde fenotypes. Cel/celadhesietesten op verschillende overexpressiestammen en stammen met chimere adhesines lieten hierbij een verkennende karakterisatie toe. Opvallend hierbij waren de sterk uiteenlopende flocculatiefenotypes, i.e. vloggroottes, constitutief karakter van de flocculatie (en hieraan gekoppelde reversibiliteit) en cellen in oplossing. Zo bleken BY4742 [*FLO1*], BY4742 [*FLO5*] en BY4742 [*FLO9*] sterk en constitutief te flocculeren. BY4742 [*FLO10*] bleek eveneens aanleiding te geven tot flocculatie hoewel minder uitgesproken: typisch werden er kleinere vlokken gevormd en verdwenen deze bij intense agitatie. De *FLO11*-overexpressie gaf geen aanleiding tot flocculatie. Aangezien de chimere stam *FLO10N/FLO11* wel (kleine) vlokken vormde, werd besloten dat het globulaire domein van *FLO10* essentieel is voor flocculatie. De flocculatie van de chimere stammen was – net als bij BY4742 [*FLO10*] – op te heffen door intense agitatie. Omdat *FLO1*, *FLO5* en *FLO9* sterk homoloog zijn en voornamelijk verschillen in hun aantal herhalingen (in het centrale domein, waarbij *FLO1* meest herhalingen telt) werd de sterke flocculatie van *FLO1* in eerste instantie hieraan toegewezen. Een verder uit de celwand stekend adhesine kan aanleiding geven tot nog betere en hechtere interacties met naburige cellen, zodat de gevormde celklompen nog steviger zijn. Aangezien in BY4742 wt geen adhesines tot expressie kwamen, werden voor de *FLO*-deletiestammen, wat

betreft cel/celflocculatie, geen gewijzigde fenotypes waargenomen. Dit lag geheel in de lijn van de verwachtingen.

In een aantal cel/oppervlakteadhesietesten werd agar- en polystyreenadhesie onderzocht. Omdat de chimere stammen op agar een stuk adhesiever groeiden dan BY4742 [*FLO10*], werd een belangrijke rol hierin toegewezen aan het centrale domein van *FLO11*. Dit, uiteraard, onder de veronderstelling dat het C-terminale domein diep in de celwand verscholen zit en hierdoor geen bijdrage levert. Van de twee geconstrueerde chimere giststammen (allebei BY4742 [*FLO10N*]/[*FLO11*]) bleek één stam nauwelijks afwasbaar. Een verklaring voor dit fenotype werd niet gevonden; het lijkt hierbij onwaarschijnlijk dat de hogere *FLO*-expressie van deze stam ten opzichte van de andere hiervoor verantwoordelijk is. In een polystyreenadhesie-experiment kon een sterk verhoogde adhesie vastgesteld worden voor de verschillende chimere en overexpressiestammen. De adhesie van de *FLO*-deletiemutanten daarentegen, bleef totaal ongewijzigd. De adhesie van de chimere stammen situeerde zich hierbij intermediair aan deze van BY4742 [*FLO10*] en BY4742 [*FLO11*].

In een tweede deel werd de BY4742 giststam verlaten en werd adhesie onderzocht in Σ 1278b, een sterk adhesief- en invasief-groeiende gist, en in twee industriële bioethanolstammen. Aangezien deze stammen in de wildtype niet flocculent waren, kon screening op (potentiële) transformanten in een cel/celflocculatie-experiment vrij snel gebeuren. Er werd aangetoond dat voor de groei op agar van Σ 1278b de aanwezigheid van een intact *FLO11* onontbeerlijk is. Overexpressie van *FLO11* bleek te resulteren in een verminderde adhesiviteit waardoor besloten werd dat de TEF1-promoter minder sterk was dan de endogene. Ook in een polystyreenadhesie-experiment bleek Σ 1278b wildtype over het sterkste adhesiepotentieel te beschikken. Overexpressie van *FLO11* in Σ 1278b en BY4742 gaf een adhesie die ongeveer even sterk was. Ook in de bioethanolstammen werd gepoogd een aantal overexpressies te realiseren. Omwille van het niet-gekend zijn van het genoom werd screening op geslaagde transformanten echter danig bemoeilijkt. Het was niet met zekerheid aan te tonen dat er in CMBS VM13 daadwerkelijk adhesines tot expressie werden gebracht. In CMBS VM14 werden waarschijnlijk wel twee adhesines tot expressie gebracht. Deze vaststelling baseerde zich op een niet-sluitende PCR-bevestiging, een sterk verhoogde agaradhesie en een significant hogere polystyreenadhesie ten opzichte van de wildtype.

In een laatste deel werden een aantal stammen onderworpen aan een verkennend experiment omtrent variatie in het *FLO*-palet. De bedoeling hierbij was meer inzicht te krijgen in de conservatie van *FLO*-genen en *FLO*-pseudogenen tussen stammen onderling. Vaststellingen hierbij waren dat verschillende typische *FLO*-gensequenties in bepaalde gisten niet meer aanwezig waren, hetzij door vele recombinaties, hetzij door een gevorderde graad van puntmutaties. Wanneer wel nog aanwezig, bleken de lengtes van amplicons waarnaar gescreend soms sterk af te wijken. Het was daarenboven niet mogelijk om op basis van de aan- of afwezigheid van *FLO*-genen (al dan niet afwijkend) uit te maken met welk doel een gist zou kunnen gebruikt worden; hierin was geen lijn te trekken. Een interessante vaststelling was dat alle brouwersgisten die beschikken over Lg-*FLO1*

in staat zijn te flocculeren (bij het einde van de gisting wanneer de suikers opgebruikt zijn). Brouwersgisten die Lg-*FLO1* missen, hebben een typisch 'stoffig' karakter. Dit illustreert op het eerste zicht het belang van de aanwezigheid van *FLO*-genen in industriële fermentaties boven mogelijke expressieverschillen in verschillende stammen. Er werd besloten dat elke gist waarlijk over een eigen adhesinefamilie beschikt die vaak niet of slechts beperkt tot expressie komt. Deze vormt echter een reservoir voor antigenische variatie.

Naar de toekomst toe is het finaliseren van de drievoudige *FLO*-deleties in BY4742 een must. Hierna kunnen de verschillende stammen met chimere *FLO1/10/11*-adhesines aangemaakt worden. Het is daarenboven aangewezen om verschillende constructen per globulair domein te verifiëren en te vergelijken in verschillende experimenten naar fenotypes om eventuele torsies in de polypeptideketen te kunnen onderkennen. Op die manier wordt de analyse van de verschillende *FLO*-genen zeker niet beïnvloed door secundaire effecten tengevolge van vouwings-'fouten'. Na bevestiging van een correct geïntegreerde chimere cassette is het verder aangewezen om de aanwezigheid van een onveranderd aantal tandemherhalingen bij elk tot expressie gebracht adhesine te controleren, eveneens om secundaire effecten hierdoor veroorzaakt, niet verkeerdelijk als primair te evalueren. Gewijzigde repeatlengtes werden reeds bewezen een invloed te hebben op fenotypes (Verstrepen *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2008). Hierna kunnen de verschillende stammen met chimere adhesines op tal van fenotypes getest worden. Met name de cel/oppervlakadhesie vormt in het licht van de toepassingen een belangrijk domein van interesse. Hierbij zouden naast de klassiek geteste agar- en (gemodificeerde) polystyreenoppervlakken ook andere materialen als hydrofobe en metalen oppervlakken, hout, glas en andere industriële dragers moeten getest worden in de mate dat ze relevant zijn voor het beoogde industriële continue fermentatieproces. Op die manier zou het mogelijk moeten worden de functies en de bijdrages van de verschillende adhesinemodules beter te begrijpen om zo een 'ideaal' chimeer adhesine te creëren met superieure adhesie-eigenschappen aan het materiaal naar keuze. Tot slot kan de gebruikte TEF1-promoter vervangen worden door een andere, eveneens constitutieve promotor die een zwakkere expressie geeft, maar nog net voldoende is om bij een bepaald nutriëntdebiet een voldoende hoge celretentie te betekenen. Op die manier kan de metabole last die met de *FLO*-expressie gepaard gaat een stuk verlicht worden.

In een tweede fase zou de gist uit de beoogde continue fermentatie moeten gesequeneerd worden. Hierna kan het *FLO*-arsenaal binnen dit micro-organisme nauwkeurig gedetecteerd en geannoteerd worden. Aangezien in een vorige fase (in een laboratoriumstam) een superieur adhesine (naar alle verwachtingen chimeer) gecreëerd werd, valt te verwachten dat een 'industriële' chimeer adhesine eveneens superieure eigenschappen zou kunnen bezitten. Bemerkt dat er in heel wat industriële producties waarin micro-organismen betrokken zijn, het gebruik van GMO's (resistentiemerker dragend) echter niet toegelaten is. Bijgevolg kan of mag er enkel *eigen* genetisch materiaal gebruikt worden, ook wel cisgenese of 'self-cloning' genoemd. Aangezien de chimere *FLO*-genen echter enkel uit celeigen materiaal bestaan, vormt dit echter geen probleem. Zwakkere, constitutieve promotors uit gisteigen genomen zijn verder ter beschikking (vb. promotors uit centrale signaalwegen). De uitdaging omtrent de constructie van chimere adhesines situeert zich echter vooral rond de keuze van een goede selectiemerker (resistentiemerkers niet toegelaten wegens celvreemd DNA-materiaal). Het

nettovoordeel van de realisatie van gewijzigde gisten lijkt in elk geval een stevige stimulans tot ontwikkeling van deze te zijn.

Daarnaast kan een betere beheersing en grondiger kennis van de functie en bijdrage van de verschillende modules en/of domeinen van de adhesines een stevige basis bieden in het begrijpen van de vorming van biofilms in andere (pathogene) gisten als *Candida spp.* In een volgende fase kunnen deze gegevens een stevig platform vormen in de ontwikkeling van een waaier geneesmiddelen die interfereren met adhesines of, eventueel, de signaaltransductiewegen verantwoordelijk voor hun adhesieve fenotypes (herinner de grote variabiliteit en hoog-frequente antigenische shift). Op die manier zouden een groot deel van de ziekenhuisinfecties kunnen teruggeschroefd worden.

Dit onderzoek heeft duidelijk gemaakt dat slechts het topje van de ijsberg in het adhesiepotentieel van *S. cerevisiae* onderzocht werd. Het 'arsenaal' aan flocculatiegenen kan eindeloos uitbreiden door heel frequente recombinaties. Op die manier zal elke giststam over een eigen unieke *FLO*-genfamilie beschikken, die ook tijdens het 'leven' van een gist nog kan veranderen. Verder onderzoek zal uitwijzen of de grenzen aan functionele diversiteit van gistadhesie ook zullen bereikt worden.

Literatuurlijst

Akada, R. (2002) *Genetically modified industrial yeast ready for application*. Journal of bioscience and bioengineering. 94(6): 536-544

Baldus, S.; Engelmann, K.; Hanisch, F.-G. (2004) *MUC1 and the MUCs: a family of human mucins with impact in cancer biology*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 41(2): 189-231

Basso, L.C.; de Amorim, H.V. ; Oliveira, A.J. & Lopes, M.L. (2008) *Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil*. FEMS. 8(7): 1155-1163

Bayly, J.C.; Douglas, L.M.; Pretorius, I.S.; Bauer, F.F.; Dranginis, A.M. (2005) *Characteristics of Flo11-dependent flocculation in Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European microbiological societies yeast research. 5(12): 1151-1156

Beauvais, A.; Loussert, C.; Prevost, M.C.; Verstrepen, K.J. & Latgé, J.P. (2009) *Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in FLO1-expressing Saccharomyces cerevisiae cells*. Federation of European Microbiological Societies. 9(3): 411-419

Blankenship, J.R.; Mitchell, A.P. (2006) *How to build a biofilm: a fungal perspective*. Current Opinion in Microbiology. 9(6): 588-594

Bony, M.; Thines-Sempoux, D.; Barre, P. & Blondin, B. (1997) *Localization and cell surface anchoring of the Saccharomyces cerevisiae flocculation protein Flo1p*. Journal of microbiology. 179(15): 4929-4936

Brachmann, C.B.; Davies, A.; Cost, G.J.; Caputo, E.; Li, J., Hieter, P. & Boeke, J.D. (1998) *Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications*. Yeast. 14(2): 115-132

Braus, G.H.; Grundmann O.; Brückner, S. & Mösch H.-U. (2003) *Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell. 14(10): 4272-4284

Brown, S.P. & Buckling, A. (2008) *A social life for discerning microbes*. Cell. 135(4): 600-603

Ceccato-Antonini, S.R. & Sudbery, P.E. (2004) *Filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian Journal of Microbiology. 35(3): 173-181

Chang, Y.-I.; Shih, L.H. & Chen, S.W. (2005) *Effects of glucose and mannose on the flocculation behaviour of Saccharomyces cerevisiae at different life stages*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 44(1): 6-14

Chen, H. & Fink, G.R. (2006) *Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols*. Genes and development. 20(9): 1150-1161

Chen, H.; Fujita, M.; Feng, Q.; Clardy, J. & Fink, G.R. (2004) *Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 101(14): 5048-5052

- Cherry, J.M.; Ball, C.; Weng, S.; Juyik, G.; Schmidt, R.; Adler, C.; Dunn, B.; Dwight, S.; Riles, L.; Mortimer, R.K. & Bolstein, D. (1997) *Genetic and physical maps of Saccharomyces cerevisiae*. Nature. 387(6631 suppl.): 67-73.
- Claro, F.B.; Rijsbrack, K. & Soares, E.V. (2007) *Flocculation onset in Saccharomyces cerevisiae: effect of ethanol, heat and osmotic stress*. Journal of applied microbiology. 102(3): 693-700
- Cullen, P.J.; Sabbagh W.Jr.; Graham E.; Irick, M.M.; Van Olden E.K.; Neal, C.; Delrow, J.; Bardwell, L. & Sprague G.R. Jr. (2004) *A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast*. Genes and development. 18(14): 1695-1708
- Cullen, P.J. & Sprague, Jr., G.F. (2000) *Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 97(25): 13619-13624
- Cutler, N.S.; Pan, X.; Heitman, J. & Cardenas, M.E. (2001) *The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients*. Molecular biology of the cell. 12(12): 4103-4113
- Damas-Buenrostro L.C.; Garcia-Gonzalez, G.; Hernandez-Luna, C.E.; Galan-Wong, L.J.; Pereyra-Alferez, B. & Sierra-Benavides, J.A. (2008) *Detection of FLO genes in Lager and Wild yeast strains*. American Society of Brewing Chemists. 66(3): 184-187
- Del Sal, G.; Manfioletti, G. & Schneider, C. (1988) *A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing*. Nucleic acids research. 16(20): 9878
- Dengis, P.B. & Rouxhet, P.G. (1997) *Surface properties of top- and bottom-fermenting yeast*. Yeast. 13(10): 931-943
- Douglas, L. (2003) *Candida biofilms and their role in infection*. Trends in Microbiology. 11(1): 30-36
- Douglas, L.; Li, L.; Yang, Y.; Dranginis, A.M. (2007) *Expression and characterization of the Flocculin Flo11/Muc1, a Saccharomyces cerevisiae mannoprotein with homotypic properties of adhesion*. Eukaryotic Cell. 6(12): 2214-2221
- Dranginis, A.M.; Rauceo, J.M.; Coronado, J.E. & Lipke P.N. (2007) *A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions*. Microbiology and molecular biology reviews. 71(2): 282-294
- Fichtner, L.; Schulze, F. & Braus, G.H. (2007) *Differential Flo8p-dependent regulation of FLO1 and FLO11 for cell-cell and cell-substrate adherence of S. cerevisiae S288c*. Molecular Microbiology. 66(5): 1276-1289
- Fidalgo, M.; Barrales, R.R. & Jimenez, J. (2008) *Coding repeat instability in the FLO11 gene of Saccharomyces yeasts*. Yeast. 25(12): 879-889
- Fleming, A.B. & Pennings, S. (2001) *Antagonistic remodelling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for FLO1 gene regulation*. The EMBO Journal. 20(18): 5219-5231
- Gagiano, M.; Bauer, F.F. & Pretorius, I.S. (2002) *The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological societies. 2(4): 433-470

- Garcia-Sanchez, S.; Aubert, S.; Iraqui, I.; Janbon, G.; Ghigo, J.-M. & d'Enfert Christophe (2004) *Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns*. Eukaryotic cell. 3(2): 536-545
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H. (1995) *Transforming yeast with DNA*. Methods in molecular and cellular biology. 5(5): 255-269
- Govender, P.; Domingo, J.L.; Bester, M.C.; Pretorius, I.S. & Bauer, F.F. (2008) *Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5 and FLO11 in Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology. 74(19): 6041-6052
- Groes, M.; Teilum, K.; Olesen, K.; Poulsen, F.M. & Henriksen, A. (2002) *Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from Saccharomyces carlsbergensis*. Acta crystallographica. D58: 2135-2137
- Guo, B.; Styles, C.A.; Feng, Q. & Fink, G.R. (2000) *A Saccharomyces cerevisiae gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 97(22): 12158-12163
- Halme, A.; Bumgarner, S.; Styles, C. & Fink, G.R. (2004) *Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast*. Cell. 116(3): 405-415
- Hamburger, D.; Egerton, M. & Riezman, H. (1995) *Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins*. The Journal of Cell Biology. 129(3): 629-639
- Hogan, D.A. (2006) *Quorum sensing: alcohols in a social situation*. Current biology. 16(12): R457-R458
- Janke, C.; Magiera, M.M.; Rathfelder, N.; Taxis, C.; Reber, S.; Maekawa, H.; Moreno-Borchart, A.; Doenges, G.; Schwob, E.; Schiebel, E. & Knop, M. (2004) *A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes*. Yeast. 21(11): 947-962
- Jin, Y.-L.; Ritcey, L.L.; Speers, R.A. & Dolphin, P.J. (2001) *Effect of cell surface hydrophobicity, charge, and zymolectin density on the flocculation of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the American Society of brewing chemists. 59(1): 1-9
- Jin, Y.-L. & Speers, R.A. (2000) *Effect of environmental conditions on the flocculation of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the American Society of brewing chemists. 58(3): 108-116
- Klotz, S.A.; Gaur, N.K.; Douglas F.L.; Chan, V.; Rauceo, J. ; Lipke, P.N. (2004) *Degenerate peptide recognition by Candida albicans adhesins Als5p and Als1p*. Infection and Immunity. 72(4): 2029-2034
- Kobayashi, O.; Hayashi, N.; Kuroki, R. & Sone, H. (1998) *Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition*. Journal of bacteriology. 180(24): 6503-6510
- Kobayashi, O.; Yoshimoto, H. & Sone, H. (1999) *Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics. 36(5): 256-261
- Kuchin, S.; Vyas, V.K. & Carlson, M. (2002) *Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation*. Molecular and cellular biology. 22(12): 3994-4000

- Kung, Y.-T. (2000) *Promoter analysis of the ploidy-repressed FLO11 gene in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Bug journal. 3: 41-46
- Laizé, V.; Tacnet, F.; Ripoche P. & Hohmann, S. (2000) *Polymorphism of Saccharomyces cerevisiae aquaporins*. Yeast. 16(10): 897-303
- Lambrechts, M.G.; Bauer, F.F.; Marmur, J. & Pretorius, I.S. (1996) *Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 93(16): 8419-8424
- Langner, C.; Ratschek, M.; Rehak, P.; Schips, L.; Zigeuner, R. (2004) *Expression of MUC1 (EMA) and E-cadherin in renal cell carcinoma: a systematic immunohistochemical analysis of 188 cases*. Modern Pathology. 17(2): 180-188
- Lawrence, S.J. & Smart, K.A. (2007) *Impact of CO₂-induced anaerobiosis on the assessment of brewing yeast flocculation*. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 65(4): 208-213
- Legendre, M.; Pochet, N.; Pak, T.; Verstrepen, K. (2007) *Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability*. Genome research. 17(12): 1787-1796
- Lesage, G. & Bussey, H. (2006) *Cell wall assembly in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 70(2): 317-343
- Levdansky, E.; Sharon, H. & Osherov, N. (2008) *Coding fungal tandem repeats as generators of fungal diversity*. Fungal biology reviews. Doi: 10.1016/j.fbr.2008.08.001
- Liu, H.; Styles, C.A. & Fink, G.R. (1996) *Saccharomyces cerevisiae S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth*. Genetics. 144(3): 967-978
- Liu, N.; Wang, D.-L.; Wang, Z.Y.; He, X.-P. & Zhang, B.R. (2007a) *Deletion of tandem repeats causes flocculation phenotype conversion from Flo1 to NewFlo in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of molecular microbiology and biotechnology. 16(3-4): 137-45
- Liu, N.; Wang D.; Wang. Z.Y.; He X.P. & Zhang, B.R. (2007b) *Genetic basis of flocculation phenotype conversion in Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies. 7(8): 1362-1370
- Li, XH.; Zheng, HC; Wang ZG, Takahashi, H., Yang XH; Guan YF; Takano Y. (2008). *The clinicopathological and prognostic significance of MUC-1 expression in Japanese gastric carcinomas: an immunohistochemical study of tissue microarrays*. Anticancer research, 28 (2A): 1061-1067
- Lo, W.-S. & Dranginis, A.M. (1997) *The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell. 9(1): 161-171
- Lorenz, M.C.; Cutler, N.S. & Heitman, J. (2000) *Characterization of alcohol-induced filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae*. Molecular biology of the cell. 11(1): 183-199
- Loza, L.; Fu, Y.; Ibrahim, A.S.; Sheppard, D.C.; Filler, S.G. & Edwards, J.E. (2004) *Functional analysis of the Candida albicans ALS1 gene product*. Yeast. 21(6): 473-482

- Martineau, C.N.; Beckerech, J.-M.; Kabani, M. (2007) *Flo11p-independent control of "Mat" formation by Hsp70 molecular chaperones and nucleotide exchange factors in yeast*. Genetics. 177(3): 1679-1689
- Miki, B.L.; Poon, N.H.; James, A.P. & Seligy, V. (1982) *Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. 150(2): 878-889
- Mortensen, H.D.; Dupont, K.; Jespersen, L. & Arneborg, N. (2007a) *The Flo11p-deficient Saccharomyces cerevisiae strain background S288c can adhere to plastic surfaces*. Colloids and surfaces B: biointerfaces. 60(1): 131-134
- Mortensen, H.D.; Dupont, K.; Jespersen, L.; Willats, W.G.T. & Arneborg, N. (2007b) *Identification of amino acids involved in the Flo11p-mediated adhesion of Saccharomyces cerevisiae to a polystyrene surface using phage display with competitive elution*. Journal of applied microbiology. 103(4): 1041-1047
- Noverr, M.C.; Erb-Downward, J.F. & Huffnagle, G.B. (2003) *Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes*. Clinical journal of microbiology reviews. 16(3): 517-533
- ODE (2006) *Europees Klimaatplan: hernieuwbare energie* [on line]. ODE. Beschikbaar op <http://news.ode.be/index.php?mact=News,cntnt01,detail,0&cntnt01articleid=378&cntnt01returnid=15> [datum van opzoeking 01/05/2009].
- Pan, X.; Harashima, T. & Heitman, J. (2000) *Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of Saccharomyces cerevisiae*. Current opinion in microbiology. 3(6): 567-572
- Palecek, S.P.; Parikh, A.S.; Huh, J.H. & Kron, S.J. (2002) *Depression of Saccharomyces cerevisiae invasive growth on non-glucose carbon sources requires the Snf1 kinase*. Molecular Microbiology. 45(2): 453-469
- Powell, C.D.; Quain, D.E. & Smart, K.A. (2003) *The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance attenuation and flocculation*. Federation of European Microbiological Societies. 3(2): 149-157
- Prusty, R.; Grisafi, P. & Fink, G.R. (2004) *The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 101(12): 4153-4157
- Purevdorj-Gage, B.; Orr, M.E.; Stoodley, P.; Sheehan, K.B. & Hyman, L.E. (2007) *The role of FLO11 in Saccharomyces cerevisiae biofilm development in a laboratory flow-cell system*. Federation of European Microbiological Societies. 7(3): 372-379
- Rando, O.J. & Verstrepen, K.J. (2007) *Timescales of genetic and epigenetic inheritance*. Cell. 128(4): 655-668
- Rauceo, J.M.; De Armond, R.; Otoo, H.; Kahn, P.C.; Klotz, S.A.; Gaur, N.K. & Lipke, P.N. (2006) *Threonine-rich repeats increase fibronectin binding in the Candida albicans adhesin Als5p*. Eukaryotic cell. 5(10): 1664-1673
- Reynolds, T.B. (2006) *The Opi1p transcription factor affects expression of FLO11, mat formation, and invasive growth in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic cell. 5(8): 1266-1275
- Reynolds, T.B. & Fink, G.R. (2001) *Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation*. Science. 291(5505): 878-881

- Reynolds, T.B.; Jansen, A.; Peng, X.; Fink, G.R. (2008) *Mat formation in Saccharomyces cerevisiae requires nutrient and pH gradients*. Eukaryotic cell. 7(1): 122-130
- Robertson, L.S. & Fink, G.R. (1998) *The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 95(23): 13783-13787
- Rupp, S.; Summers, E.; Lo, H.-J.; Madhani, H. & Fink, G. (1999) *MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene*. EMBO Journal. 18(5): 1257-1269
- Sampermans, S.; Mortier, J. & Soares, E.V. (2005) *Flocculation onset in Saccharomyces cerevisiae: the role of nutrients*. Journal of applied microbiology. 98(2): 525-531
- Schacherer, J.; Ruderfer, D.M.; Gresham, D.; Dolinski, K.; Botstein, D. & Kruglyak, L. (2007) *Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used Saccharomyces cerevisiae strains*. PLoS ONE. 2(3): e322
- Schnepf, R. (2006) *European Union biofuels Policy and Agriculture: an overview*.
- Sengupta, N.; Vinod, P.K.; Venkatesh, K.V. (2007) *Crosstalk between cAMP-PKA and MAP kinase pathways is a key regulatory design necessary to regulate FLO11 expression*. Biophysical Chemistry. 125(1): 59-71
- Sheppard, D.C.; Yeaman, M.R.; Welch, W.H.; Phan, Q.T.; Fu, Y.; Ibrahim, A.S.; Filler, S.G.; Zhang, M.; Waring, A.J. & Edwards, J.E.Jr. (2004) *Functional and structural diversity in the Als protein family of Candida albicans*. The journal of biological chemistry. 279(29): 30480-30489
- Smukalla, S.; Caldara, M.; Pochet, N.; Beauvais, A.; Guadagnini, S.; Yan, C.; Vincés, M.D.; Jansen, A.; Prevost, M.C.; Lathé, J.-P.; Fink, G.R. & Verstrepen, K.J. (2008) *FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast*. Cell. 135(4): 726-737
- Soares, E.V. & Duarte A.A. (2002) *Addition of nutrients induce a fast loss of flocculation in starved cells of Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology letters. 24(23): 1957-1960
- Soares, E.V. & Mota, M. (1996) *Flocculation onset, growth phase, and genealogical age in Saccharomyces cerevisiae*. Canadian journal of microbiology. 42(6): 539-547
- Soares, E.V. & Seynaeve, J. (2000) *Induction of flocculation of brewer's yeast strains of Saccharomyces cerevisiae by changing the calcium concentration and pH of culture medium*. Biotechnology letters. 22(23): 1827-1832
- Soares, E.V. & Vroman, A. (2003) *Effect of different starvation conditions on the flocculation of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of applied microbiology. 95(2): 325-330
- Soares, E.V.; Vroman, A.; Mortier, J.; Rijsbrack, K. & Mota, M. (2004) *Carbohydrate carbon sources induce loss of flocculation of an ale brewing yeast strain*. Journal of applied microbiology. 96(5): 1117-1123
- Sprague, Jr., G.F. & Winans, S.C. (2006) *Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast*. Genes & development. 20(9): 1045-1049

- Stanhill, A.; Schick, N. & Engelberg, D. (1999) *The yeast Ras/Cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress respons.* Molecular and cellular biology. 19(11): 7529-7538
- Stratford, M. (1989) *Evidence for two mechanisms of flocculation in Saccharomyces cerevisiae.* Yeast. 5: 441-445
- Stratford, M. (1992) *Yeast flocculation: a new perspective.* Advances in Microbial Physiology. 33: 2-71
- Stratford, M. (1993) *Yeast flocculation: flocculation onset and receptor availability.* Yeast. 9(1): 85-93
- Strauss, C.J.; Kock, J.L.F.; Van Wyk, P.W.J.; Lodolo, E.J.; Pohl, C.H. & Botes, P.J. (2005) *Bioactive oxylipins in Saccharomyces cerevisiae.* Journal of the institute of brewing. 111(1): 304-308
- Strauss, C.J.; Kock, J.L.F.; Van Wyk, P.W.J.; Viljoen, B.C.; Botes, P.J. ; Hulse, G. & Nigam, S. (2003) *Inverse flocculation patterns in Saccharomyces cerevisiae UOFS Y-2330.* Journal of the institute of brewing. 109(1): 3-7
- Strauss, C.J.; Van Wyk, P.W.J.; Lodolo, E.J.; Botes, P.J.; Pohl, C.H.; Nigam, S. & Kock, J.L.F. (2006) *Oxylipin associated co-flocculation in yeasts.* Journal of the institute of brewing. 112(1): 66-71
- Straver, M.H.; Van der Aar, P.C.; Smit, G. & Kijne, J.W. (1993) *Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort.* Yeast. 9(5): 527-532
- Tamaki, H.; Miwa, T.; Shinozaki, M.; Saito, M.; Yun, C.-W.; Yamamoto, K. & Kumagai H. (2000) *GPR1 regulates filamentous growth through FLO11 in yeast Saccharomyces cerevisiae.* Biochemical and biophysical research communications. 267(1): 164-168
- Taylor-Papadimitriou J.; Burchell, J.; Miles, D.W. & Dalziel M. (1999) *MUC1 and cancer.* Biochimica et Biophysica Acta. 1455(2-3): 301-313
- Teunissen, A.W.R.H. & Steensma, H.Y. (1995) *Review: The dominant flocculation genes of Saccharomyces cerevisiae constitute a new subtelomeric gene family.* Yeast. 11(11): 1001-1013
- van Dyk, D.; Pretorius, I.S. & Bauer, F.F. (2005) *Mss11p is a central element of the regulatory network that controls FLO11 expression and invasive growth in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics. 169(1): 91-106
- Van Mulders, S.E.; Christianen, E.; Saerens, S.M.G.; Daenen, L.; Verbelen, P.J.; Willaert, R.; Verstrepen, K.J. & Delvaux, F.R. (2009) *Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in Saccharomyces cerevisiae.* Federation of European Microbiological societies. 9(2): 178-190
- Verstrepen, K.J.; Derdelinckx, G. & Delvaux, F.R. (2001) *Late fermentation expression of FLO1 in Saccharomyces cerevisiae.* Journal of the American Society of brewing chemists. 59(2): 69-76
- Verstrepen, K.J.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H. & Delvaux, F.R. (2003) *Yeast flocculation: what brewers should know.* Applied Microbiology and biotechnology. 61(3): 197-205
- Verstrepen, K.J.; Iserentant, D.; Malcorps, P.; Derdelinckx, G.; Van Dijck, P.; Winderickx, J.; Pretorius, I.S.; Thevelein, J.M. & Delvaux, F.R. (2004a) *Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?* Trends in biotechnology. 22(10): 531-537

Verstrepen, K.J.; Jansen, A.; Lewitter, F. & Fink, G.R. (2005) *Intragenic tandem repeats generate functional variability*. Nature Genetics. 37(9): 986-990

Verstrepen, K.J. & Klis, F.M. (2006) *Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts*. Molecular microbiology. 60(1): 5-15

Verstrepen, K.J.; Reynolds T.B. & Fink, G.R. (2004b) *Origins of variation in the fungal cell surface*. Nature Reviews. 2(7): 533-540

Zara, S.; Bakalinsky, A.T.; Zara, G.; Pirino, G.; Demontis, M.A. & Budroni, M. (2005) *FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology. 71(6): 2934-2939

