

Ontwikkeling van een expressiesysteem voor de productie van het “Ice Nucleation Protein”

Tim Goelen

Promotor: Prof. dr. ir. Hans Rediers

Co-promotor: Ing. Christel Verreth

Masterproef ingediend tot het behalen van de
graad van master of Science in de industriële
wetenschappen: *Biochemie*

Academiejaar 2014-2015

Ontwikkeling van een expressiesysteem voor de productie van het “Ice Nucleation Protein”

Tim Goelen

Promotor: Prof. dr. ir. Hans Rediers

Co-promotor: Ing. Christel Verreth

Masterproef ingediend tot het behalen van de
graad van master of Science in de industriële
wetenschappen: *Biochemie*

Academiejaar 2014-2015

Dankwoord

Met dit dankwoord wil ik graag alle mensen bedanken die mij op een of andere manier geholpen hebben bij het uitvoeren van mijn praktisch werk en het schrijven van deze masterproef. Allereerst zou ik mijn promotor, Hans Rediers willen bedanken voor zijn advies, steun en geduld tijdens het volledige verloop van mijn masterproef. Bij hem kon ik altijd persoonlijk, met een mailtje of telefoontje terecht met al mijn vragen. Bedankt om mij te helpen met de nuttige tips tijdens het praktische werk, voor het helpen in elkaar steken van de koelinstallatie, voor het bereid zijn dingen voor mij te regelen en testen te kunnen uitvoeren in Leuven! Daarnaast wil ik mijn co-promotor, Christel Verreth bedanken voor de hulp bij het praktische werk, nuttige advies, het beantwoorden van mijn vragen en het voorzien van al het materiaal dat ik nodig had. Stefan Ruyters ook u wil ik bedanken voor de hulp bij de opstart van mijn eerste stageperiode en de hulp bij het schrijven van mijn literatuurstudie. Hierbij wil ik ook nog Prof. Joris Winderickx bedanken voor het bezorgen van de vectoren (pSB1C3-BBa_K584024, pSB1C3-BBa_K584027) uit het iGEM project. Dankuwel Marijke voor het ter beschikking stellen van uw cultuurcollectie, anders was mijn screening nooit gelukt. Daarnaast wil ik alle labomedewerkers bedanken voor de leuke sfeer, het beantwoorden van mijn vragen en de hulp indien ik met een probleem zat. Ook mijn mede masterstudenten wil ik bedanken voor de leuke samenwerking en hulp in het labo.

Een speciale dank gaat nog uit naar mijn vriendin Sara en mijn ouders die er altijd geweest zijn om mij te steunen tijdens mijn werk en om mij de mogelijkheden te bieden mijn werk tot een goed einde te brengen. Zonder hen zou ik nu niet staan waar ik nu ben. Dankuwel Sara voor de nodige ontspanning, de leuke momenten na de lange werkdagen en voor het grondig nalezen van deze masterproef!

Ik hoop dat ik niemand vergeten ben hier te bedanken! Mocht dit wel het geval zijn dan bij deze bedankt voor alle steun en hulp!

Allemaal bedankt!

Tim Goelen

Juni 2015

Samenvatting

Veel vloeistoffen, waaronder water, bevriezen niet op het smeltpunt van de vaste fase. Kleine volumes zuiver water kunnen zelfs gekoeld worden tot -40°C voordat er spontane kristallisatie optreedt. Deze spontane of homogene nucleatie vereist een zeer zuivere vloeistof, die volledig vrij is van vaste partikels. Indien er vaste partikels of nucleatie agentia in het water aanwezig zijn, kunnen deze de ijsvorming katalyseren bij een hogere temperatuur. Dit wordt veroorzaakt door heterogene nucleatie waarbij de watermoleculen accumuleren in een ijsachtig rooster op de nucleatie agentia. Verschillende Gammaproteobacteriën die behoren tot de genera *Pseudomonas*, *Pantoea* en *Xanthomonas* zijn in staat de ijsformatie te katalyseren bij temperaturen tot -2°C , omwille van de productie van een zogenaamd Ice Nucleation Protein (INP). Belangrijke voorbeelden van Ice Nucleation Active (INA) bacteriën zijn *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* en *Pantoea agglomerans*. Het INP wordt gecodeerd door één enkel gen. In het geval van *P. syringae* is dit het *inaZ*-gen dat codeert voor een proteïne van 153 kDa. Het hoofddoel van deze masterproef was de ontwikkeling van een nieuw, induceerbaar expressiesysteem voor de recombinante expressie van het INP in *E. coli* als gastheer. In het eerste deel van deze masterproef werd een PCR voor de detectie van de *ina*-genen geoptimaliseerd en gebruikt voor de screening van de cultuurcollectie op de aanwezigheid van INA-bacteriën. Op deze manier werd er getracht een INA-bacterië te vinden met een *ina*-gen, dat zorgt voor de expressie van een INP met hoge INA. De resultaten van deze screening werden bevestigd met een INA assay. Hieruit blijkt dat slechts een beperkt aantal bacteriën binnen de geteste stammen INA vertonen. De INA van deze stammen werd verder geëvalueerd aan de hand van verschillende activiteitstesten.

In een tweede gedeelte van deze masterproef werd een expressiesysteem ontwikkeld op basis van pPro24 en pET24 vectorsystemen, om het INP tot overexpressie te brengen in *E. coli*. Hierbij werd het *inaZ* succesvol gekloneerd in beide vectorsystemen. De expressie van het INP in *E. coli* via het pPro24 vectorsysteem werd aangetoond met SDS-Page en een INA assay. Hieruit blijkt dat het expressiesysteem in *E. coli* zorgt voor een hogere nucleatie-activiteit in vergelijking met de natuurlijke INA-bacteriën.

Met de ontwikkeling van een expressiesysteem en onderzoek naar het INP zijn de eerste stappen gezet in het beter begrijpen van de werking van het INP. Toekomstige uitdagingen zijn de optimalisatie van de productie en opzuivering van het INP en de ontwikkeling van mogelijk nieuwe industriële toepassingen voor het INP.

Trefwoorden: Ice Nucleation Protein, PCR-screening, Ice Nucleation Activity, *Pseudomonas syringae*, expressiesysteem.

Abstract

Many liquids, like water, do not freeze at the melting point of the solid phase. For instance, small volumes of pure water can be cooled to -40°C before spontaneous crystallization occurs. This spontaneous or homogeneous nucleation requires a very pure liquid, free of any solid particles. When solid particles or nucleation agents are present in the water, they can catalyze the formation of ice at a higher temperature. This is caused by heterogeneous nucleation, in which the water molecules accumulate on an ice-like lattice on the nucleation agents. Some Gammaproteobacteria of the genera *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Xanthomonas* are able to catalyze ice formation at temperatures of -2°C , because of the production of the so called Ice Nucleation Protein (INP). Important examples of Ice Nucleation Active (INA) bacteria are *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* en *Pantoea agglomerans*. The INP is encoded by a single gene. In case of *P. syringae* this is the *inaZ* that encodes a protein of 153 kDa. The main goal of this master thesis is the development of a new, inducible expression system for the recombinant expression of the INP in *E. coli*. In the first part of this master thesis a PCR for the detection of *ina*-genes was optimized and this PCR was used for the screening of the culture collection for detection of INA-bacteria. In this way it was attempted to find an INA-bacteria with an *ina*-gene responsible for the expression of an INP with high INA. The PCR results were confirmed by an INA assay. These results showed that only a limited number of bacteria exhibit the INA in the tested strains. The INA of these strains were further evaluated by means of several activity tests.

In the second part of this master thesis an expression system was designed, based on the inducible pPro24 and pET24 vector systems, for the overexpression of the INP in *E. coli*. The *inaZ* was successfully cloned in both vector systems. The expression of the INP in *E. coli* with the pPro24 expression system was demonstrated with SDS-PAGE and an INA assay. These results indicated that the expression system in *E. coli* ensures a higher INA in comparison with the natural INA-bacteria.

With the development of an expression system and the research of the INP, the first steps are taken for a better understanding of the function of the INP. Future challenges are the optimization of the production and purification of the INP and the development of new industrial applications of the INP.

Keywords: Ice Nucleation Protein, PCR-screening, Ice Nucleation Activity, *Pseudomonas syringae*, expression system.

Inhoudstafel

Dankwoord.....	i
Samenvatting	iii
Abstract	iv
Inhoudstafel	v
Gebruikte afkortingen	vii
1 Literatuurstudie.....	1
1.1 Vriesproces	1
1.2 Ice Nucleation Protein	4
1.2.1 Heterogene ijsnucleï.....	4
1.2.2 Verspreiding en het ecologisch belang van het Ice Nucleation Protein	5
1.2.3 Genopbouw en aminozuursequentie van het INP.....	7
1.2.4 Secundaire en tertiaire structuur van het INP	11
1.2.5 Post-translationele modificaties en planaire structuur bepalen de activiteit van het INP.....	14
1.2.6 Beïnvloedende parameters van de Ice Nucleation Activity	17
1.2.7 Toepassingen van het Ice Nucleation Protein	18
1.2.7.1 Productie van kunstmatige sneeuw	18
1.2.7.2 Invriezen van voedingsmiddelen	19
1.2.7.3 INP als carrierproteïne voor oppervlakte-expressie.....	21
2 Doelstelling van de masterproef	23
3 Materiaal & methode	24
3.1 Gebruikte bacteriële stammen	24
3.2 Gebruikte vectoren	27
3.3 Consensussequentie voor subdomeinen 2 & 3 van <i>ina</i>	27
3.4 Isolatie en opzuivering van DNA	28
3.4.1 Isolatie van genomisch DNA.....	28
3.4.2 Isolatie van plasmide DNA	28
3.4.3 Opzuivering van een fragment uit gel.....	29
3.4.4 Opzuivering van een fragment via ethanol precipitatie.....	29
3.4.5 Bepaling van DNA concentratie.....	29
3.5 Polymerase chain reaction (PCR)	30
3.5.1 Amplificatie van doelwitgen voor <i>ina</i> -detectie	30
3.6 Agarosegelelektroforese	32
3.7 SDS-PAGE	32

3.7.1	Bereiding van de polyacrylamide gels	33
3.7.2	Staalvoorbereiding	34
3.7.3	Elektroforese	34
3.7.4	Kleuring	35
3.8	Standaard moleculaire technieken	35
3.9	Transformatie	35
3.10	Sequencing	36
3.11	Ice Nucleation Activity assays	36
4	Resultaten & discussie	38
4.1	Screening naar bacteriën met Ice Nucleation Activity	38
4.1.1	Detectie van <i>ina</i> -genen met behulp van PCR	38
4.1.2	Soortspecifieke detectie van <i>ina</i> -genen	40
4.1.2.1	<i>P. syringae</i> en <i>Pseudomonas spp.</i>	40
4.1.2.2	<i>P. fluorescens</i>	45
4.1.2.3	<i>Xanthomonas spp.</i> en <i>P. agglomerans</i>	46
4.2	Verdere evaluatie van de Ice Nucleation Activity van INA ⁺ -stammen	48
4.2.1	Invloed van incubatietemperatuur op INA	48
4.2.2	Invloed van lysis op INA	50
4.3	Ontwikkeling van een expressiesysteem voor de productie van het INP	52
4.3.1	Klonering van <i>inaZ</i> in expressievector pPro24	53
4.3.2	Klonering van <i>inaZ</i> in expressievector pET24	56
4.3.3	Semi-kwantitatieve bepaling van Ice Nucleation Activity	61
4.3.4	Detectie van INP expressie met behulp van SDS-PAGE	64
5	Algemeen besluit	66
	Literatuurlijst	68
	Bijlagen	74
A	Biobrick onderdeel BBa_K584024 (3758 bp).....	74
B	Biobrick onderdeel BBa_K584027 (3801bp).....	76
C	pPro24.....	78
D	pET24.....	79
E	pSB1C3-BBa_K854024.....	80
F	pSB1C3-BBa_K854027.....	81

Gebruikte afkortingen

ΔG	Vrije energie
AZ	Aminozuur
BMV	Buitenste membraan vesikel
B-PER	Bacterial Protein Extraction Reagent
CBB R-250	Coommasie Brilliant Blue R-250
EtBr	Ethidiumbromide
FI	Fosfatidylinositol
INA	Ice Nucleation Active/Activity
INP	Ice Nucleation Protein
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
MEME	Multiple Em for Motif Elicitation
PCR	Polymerase chain reaction
RBS	Ribosoombindende site
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfaat polyacrylamide gelelektroforese
TSA	Trypton Soya Agar
TSB	Trypton Soya Broth

1 Literatuurstudie

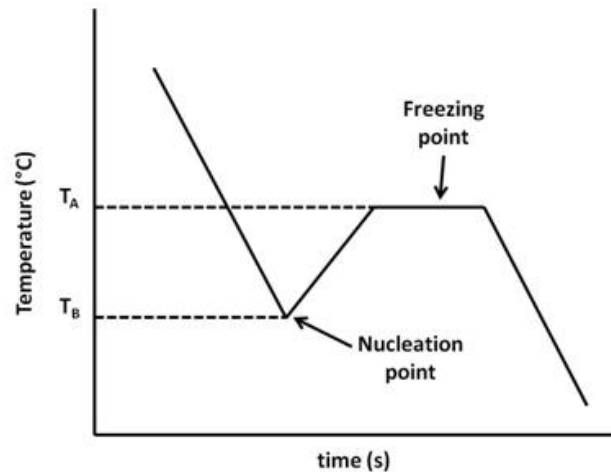
1.1 Vriesproces

Veel vloeistoffen, waaronder water, bevriezen niet op het smeltpunt van de vaste fase. Deze vloeistoffen kunnen supergekoeld (onderkoeld of subgekoeld) worden. Hierbij wordt de vloeibare toestand van de component behouden onder het smeltpunt van die component (Kasper *et al.*, 2011; Lindow, 1983). Zo kunnen kleine volumes zuiver water bijvoorbeeld gekoeld worden tot -40°C vooraleer er spontane kristallisatie optreedt (Lindow, 1983). Kristallisatie is het thermofysisch fenomeen waarbij materie neerslaat ten gevolge van superkoeling of supersaturatie. In het geval van water is superkoeling van het systeem de drijvende kracht voor het afzetten van een vaste kristallijne fase vanuit de vloeistof. Katalysatoren voor deze afzetting worden ijskernen of nucleï genoemd. Kristallisatie bestaat uit twee fasen, namelijk nucleatie en kristalgroei. Na de initiële nucleatie vinden beide processen van nucleatie en kristalgroei gelijktijdig plaats. Indien de kristallisatie start in een oplossing waarin geen initiële kristallen aanwezig zijn, dan wordt dit proces primaire kristallisatie of nucleatie genoemd. Als dit plaatsvindt in een oplossing waar al eerder gecreëerde kristallen aanwezig zijn, wordt het proces secundaire nucleatie genoemd.

Primaire nucleatie kan verder onderverdeeld worden in spontane of homogene nucleatie en heterogene nucleatie (Kiani *et al.*, 2011). Homogene nucleatie is het proces waarbij de nucleus spontaan gevormd wordt door random groepering van watermoleculen. Homogene nucleatie vereist een zeer zuivere vloeistof die volledig vrij is van vaste partikels, die dienst kunnen doen als nucleï. Heterogene nucleatie vindt plaats indien watermoleculen accumuleren in een ijsachtig rooster op nucleatie agentia, zoals gesuspendeerde fysische partikels, onregelmatigheden in wanden van recipiënten of sites op grote moleculen zoals proteïnen (zie ook verder) (Kasper *et al.*, 2011; Li *et al.*, 1995; Lindow, 1983; Wilson *et al.*, 2003). In de praktijk komt homogene nucleatie zelden voor aangezien een vloeistof kleine stofpartikels of andere onzuiverheden kan bevatten die ervoor zorgen dat er heterogene nucleatie plaatsvindt. De efficiëntie van heterogene ijskernen neemt toe met de toename van het aantal watermoleculen die geordend worden in het ijsachtig rooster. De hoeveelheid watermoleculen die geordend moeten worden om macroscopische ijsvorming te veroorzaken in supergekoeld water, neemt af met dalende temperatuur (Lindow, 1983).

Bij **secundaire nucleatie** katalyseren eerder gecreëerde kristallen het nucleatiefenomeen. De nucleatie vindt hierbij plaats op het oppervlak van deze kristallen als oppervlaktenucleatie, bij een bepaalde graad van superkoeling. De snelheid van secundaire nucleatie is hoger dan bij homogene nucleatie en vereist een lagere graad van superkoeling. Nieuwe nucleï worden gevormd door het afbreken van grote kristallen of door vorming van breuken door botsing van kristallen (Kiani *et al.*, 2011). De benodigde vrije energie (ΔG) voor nucleatie bestaat uit twee factoren. Ten eerste de energie nodig om een nieuw oppervlak te vormen. Hierbij is de ΔG positief omdat de moleculen op een nieuwe manier geordend moeten worden om een nieuw faseoppervlak te vormen. Een tweede factor van de ΔG bestaat uit de energie die vrijkomt wanneer de bulk van het partikel gevormd wordt. Deze is negatief omdat de toestand van de nieuwe bulkfase meer stabiel is en er een hoeveelheid energie vrijkomt door de aanhechting van de moleculen op het kristal. Beide factoren van de ΔG zijn afhankelijk van de straal van de gevormde nucleus. Door de afweging van deze twee factoren bestaat er een maximale kritische vrije energie voor nucleatie, die correspondeert met een kritische straal van het gevormde kristal. De kritische straal is de minimale straal voor een stabiele nucleus. Het gedrag van het nieuwgevormde kristal in de supergekoelde oplossing is dus afhankelijk van zijn grootte. Afhankelijk van de aard van vrije energie van het deeltje, kan het ofwel groeien of terug in de oplossing gaan (Kiani *et al.*, 2011; Mullin, 2001).

De drijvende kracht voor nucleatie is de graad van superkoeling. Dit is het verschil in de smelttemperatuur en de temperatuur waarbij de eerste ijskristallen worden gevormd en is afhankelijk van de eigenschappen van de oplossing en procescondities. Dit wordt geïllustreerd in Figuur 1. Bij homogene nucleatie is een hoge graad van superkoeling vereist, terwijl deze voor heterogene nucleatie veel lager is door de aanwezigheid van de nucleatiesites (Kasper *et al.*, 2011; Kiani *et al.*, 2011).



Figuur 1: Temperatuursverloop tijdens een vriesproces bestaande uit de superkoeling van de vloeistof, ijsvorming en verdere afkoeling van het ijs. De graad van superkoeling wordt bepaald door het temperatuursverschil tussen het smeltpunt en het nucleatiepunt.¹

De volgende fase in het kristallisatieproces na de nucleatie, is de **kristalgroei**. Nadat er stabiele nucleï gevormd zijn treedt er snelle ijskristallisatie op in het hele systeem. De stabiel gevormde kristallen vormen een structurele template waarop watermoleculen afgezet worden in een kristalrooster. Hierdoor groeien deze kristallen aan met een bepaalde snelheid (Kasper *et al.*, 2011). Bij dit proces moet er een onderscheid gemaakt worden tussen de koelsnelheid en de vriessnelheid. De koelsnelheid is de snelheid waarmee de vloeistof wordt afgekoeld. Daarnaast is de vriessnelheid de snelheid waarmee de ijskristallen groeien na nucleatie. Deze snelheid is sterk afhankelijk van de graad van superkoeling die nodig was voor de nucleatie (Kasper *et al.*, 2011).

Slechts een deel van het water bevriest onmiddellijk omdat het supergekoelde water slechts een fractie van de vrijgekomen warmte van de exothermische ijsvorming kan absorberen. Hierdoor zal tijdens de kristallisatie de temperatuur van het systeem snel stijgen tot nabij de smelttemperatuur (Kasper *et al.*, 2011). Dit is waar te nemen in Figuur 1, waar na het nucleatiepunt de temperatuur terug stijgt. De bepalende factor bij deze kristallisatie is de warmteoverdracht van het oppervlak van het kristal tot de bulk van de supergekoelde vloeistof (Kiani *et al.*, 2011). Na de vorming van het initiële ijsnetwerk zal door verdere koeling, warmte van de oplossing worden afgevoerd. Hierdoor zal het resterende water bevroren door de groei van de gevormde kristallen. Als de oplossing volledig bevroren is, zal de temperatuur van het ijs afnemen bij verdere koeling (Figuur 1) (Kasper *et al.*, 2011).

¹ <http://2011.igem.org/Team:KULeuven/Thermodynamics>

De groei van elke nucleus is beperkt indien de initieel gevormde nucleï in grote hoeveelheden aanwezig zijn. De hoeveelheid nucleï die worden gevormd, de groeisnelheid en de grootte van de ijskristallen is afhankelijk van de graad van superkoeling. Des te lager de graad van superkoeling, des te lager de nucleatiesnelheid en des te lager de vriessnelheid. Dit resulteert in een beperkte hoeveelheid van grote ijskristallen. Bij een hoge graad van superkoeling ontstaat er een grotere hoeveelheid kleine ijskristallen. De kristalgrootteverdeling wordt bepaald door de interactie tussen de nucleatiefase en groeifase (Kasper *et al.*, 2011; Kiani *et al.*, 2011).

1.2 Ice Nucleation Protein

1.2.1 Heterogene ijsnucleï

De meest voorkomende en bestudeerde bronnen van heterogene ijsnucleï zijn minerale deeltjes. De meeste minerale deeltjes zorgen voor efficiënte nucleatie in water bij temperaturen tussen -8°C en -15°C. Een voorbeeld hiervan is zilverjodide (Kasper *et al.*, 2011; Lindow, 1983), dat gebruikt wordt als een kiemagens voor wolken in weermodificatie-studies en vroeger gebruikt werd bij het aanmaken van sneeuw (Lagriffoul *et al.*, 2010; Lindow, 1983). Het veroorzaakt ijsnucleatie bij temperaturen hoger dan -8°C (Lindow, 1983). Daarbij bevordert het de nucleatie door zijn kristalstructuur, die gelijkaardig is aan de kristalstructuur van ijs (Kasper *et al.*, 2011; Lindow, 1983). Een ander voorbeeld van veel voorkomende minerale ijsnucleï zijn stofdeeltjes en minerale kleipartikels. Deze zorgen voor nucleatie bij temperaturen tussen -10°C en -15°C. Stofdeeltjes en minerale kleipartikels werden lang beschouwd als de primaire bron van ijsnucleï, hoofdzakelijk in de atmosfeer. Dit werd ondermeer aangetoond door Kumai (1961) die kleipartikels terugvond in de kern van sneeuwvlokken (Lindow, 1983; Schnell *et al.*, 1976). Minerale deeltjes afkomstig van meteorieten worden ook beschouwd als atmosferische ijsnucleï, pieken in neerslag werden gekoppeld aan voorafgaande meteorietenregens. Deze mineralen treden pas op als actieve nucleï bij temperaturen lager dan -15°C (Lindow, 1983; Schnell *et al.*, 1976). Kaolinite is een van de meest actieve minerale ijsnucleï, die nucleatie induceert rond -9°C.

Verschillende kristallen van organische componenten waaronder steroïden, aminozuren, proteïnen en terpenen vertonen nucleatie-activiteit bij relatief warme temperaturen rond -5°C. Deze activiteit vertonen ze enkel in kristallijne vorm. Wanneer ze worden opgelost verliezen ze deze nucleatie-activiteit (Lindow, 1983). Uitgebreid onderzoek heeft aangetoond dat sommige bacteriën ook in staat zijn om

nucleatie te induceren bij relatief hoge temperaturen. Deze bacteriën produceren het zogenaamde **Ice Nucleation Protein** (INP) (Ahern *et al.*, 2007; Lindow, 1983). De soorten *Pseudomonas syringae* en *P. agglomerans* zijn de meest actieve, natuurlijk voorkomende bronnen van het bacteriële INP's (Lindow, 1983). Deze bacteriën kunnen door de productie van het INP de ijsvorming katalyseren bij temperaturen tot -2°C (Ahern *et al.*, 2007; Lindow, 1983). De meeste isolaten van *P. syringae* vertonen een activiteit bij een temperatuur van -4°C of hoger. Daarbij is niet elke cel in een cultuur van deze soort actief. De fractie van de cellen die actief zijn, neemt snel toe naarmate de temperatuur daalt onder het smeltpunt (Lindow, 1983). Over de jaren heen zijn er verschillende **Ice Nucleation Active** (INA) organismen geïdentificeerd, die in staat zijn het bevriezen van supergekoeld water te katalyseren bij relatief hoge temperaturen (Joly *et al.*, 2013; Möhler *et al.*, 2008).

1.2.2 Verspreiding en het ecologisch belang van het Ice Nucleation Protein

De INA-bacteriën zijn verspreid over drie ordes van de Gammaproteobacteriën, waarbij de meest efficiënte INA-bacteriën behoren tot de genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* en *Xanthomonas* (Hill *et al.*, 2014; Joly *et al.*, 2013). Enkele voorbeelden van de belangrijkste INA-bacteriën zijn *P. syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas viridiflava* en *Xanthomonas campestris* (Hill *et al.*, 2014; Li *et al.*, 1995). Deze behoren tot de Gram-negatieve, plantpathogene bacteriën (Li *et al.*, 1995). Elk brengen ze een isovorm van het INP tot expressie dat zich kan gedragen als een van de meest actieve, natuurlijk voorkomende, heterogene ijsnucleï. Door de productie van het INP zijn de organismen in staat de ijsnucleatie te katalyseren bij relatief hoge temperaturen tot dicht onder het smeltpunt (Hill *et al.*, 2014; Möhler *et al.*, 2008). De meeste tot nog toe beschreven INA-bacteriën werden geïsoleerd van plantoppervlakten, waarbij ze vooral voorkomen op de bladeren (Hill *et al.*, 2014; Li *et al.*, 1995). Ze komen in grote mate voor op landbouwgewassen, maar ook op bomen, met uitzondering van naaldbomen (Hill *et al.*, 2014; Joly *et al.*, 2013). Op deze plantoppervlakten kunnen ze door hun nucleatie-activiteit de ijsvorming katalyseren in dauwdruppels (Li *et al.*, 1995). In normale omstandigheden kunnen planten supergekoeld worden tot -14°C waardoor ze vorstschade kunnen vermijden. De aanwezigheid van INA-bacteriën op deze planten doet de superkoeling strategie echter teniet, waardoor de bacteriën vorstschade kunnen veroorzaken bij hogere temperaturen. Vorstgevoelige planten kunnen de

ijsvorming in hun weefsels niet verdragen omdat het zich snel inter- en intracellulair verspreidt en zo schade veroorzaakt aan de celmembranen (Ahern *et al.*, 2007). Dit geeft aanleiding tot vorstschade bij deze planten waardoor de micro-organismen toegang krijgen tot het plantenweefsel en de nutriënten (Ahern *et al.*, 2007; Joly *et al.*, 2013). Hierdoor zouden INA-bacteriën een selectief voordeel kunnen hebben ten opzichte van bacteriën die deze activiteit niet vertonen (Ahern *et al.*, 2007). Een voorbeeld van vorstschade aan een kersenbloesem veroorzaakt door *P. syringae* wordt weergegeven in Figuur 2. Hoewel *P. syringae* pathogeen is voor veel planten, wordt deze teruggevonden op verschillende soorten planten zonder ziekte te veroorzaken. *P. syringae* komt ondermeer voor op kersen-, peren-, olijfbomen, eiken, distels, bonen en sojabonen (Lindow *et al.*, 1978; Morris *et al.*, 2008).



Figuur 2: Vorstschade aan een kersenbloesem veroorzaakt door *P. syringae* (Sundin *et al.*, 2010).

INA-bacteriën komen eveneens voor in habitats geassocieerd met de watercyclus (Joly *et al.*, 2013). *P. syringae* wordt via aerosolen in grote mate uitgestoten in de lucht vanaf de plantoppervlakken waarop ze aanwezig zijn (Morris *et al.*, 2008). Ze zijn hierdoor in grote mate aanwezig in de lucht afkomstig van een net geoogst veld (Hill *et al.*, 2014). De aanwezigheid van de INA-bacteriën in deze aerosolen kunnen in de atmosfeer een belangrijke rol spelen in de nucleatie van ijs in supergekoelde wolken, wat in het algemeen resulteert in neerslag (Joly *et al.*, 2013). Het wordt algemeen aangenomen dat INA-bacteriën in wolken bijdragen tot de inductie van deze precipitatie en dat dit vooral belangrijk is bij hogere temperaturen (Joly *et al.*, 2013; Ahern *et al.*, 2007). De grootte van de impact van INA-bacteriën op precipitatie in de atmosfeer is nog niet goed gekend (Hill *et al.*, 2014). *P. syringae* kan vanuit wolken via regen of sneeuw terecht komen in een

verscheidenheid aan omgevingen. Op deze manier kan dit organisme zich ook verspreiden in niet-landbouwgebieden (Morris *et al.*, 2008). In het onderzoek van Morris *et al.* (2008) werd *P. syringae* geïsoleerd uit regen, sneeuw, biofilms van rivieren en waterlopen, bergmeren en gezonde wilde planten in gebieden op 2000 meter hoogte, die zich bevinden boven de zones van agriculturele productie. Het bezitten van de nucleatie-activiteit biedt eveneens mogelijke voordelen voor een actief afzettings- en verspreidingsmechanisme door de nucleatie van ijs in wolken (Hill *et al.*, 2014). De opname van *P. syringae* in aerosolen vanaf planten zorgt er voor dat de bacterie in de wolken kan opgenomen worden en zo met de wolken getransporteerd kan worden. Door regen of sneeuw kan de bacterie neerslaan en afgezet worden in een nieuw gebied. De regen en de smeltende sneeuw die *P. syringae* bevatten lopen uiteindelijk in rivieren en meren. Het water van de smeltende sneeuw, regen, rivieren en meren transporteren het *P. syringae* naar wilde planten en spoelen de bacteriën van deze planten af om ze zo naar andere plaatsen te verspreiden (Morris *et al.*, 2008).

1.2.3 Genopbouw en aminozuursequentie van het INP

Het INP is een membraanproteïne van INA-bacteriën en is het product van één enkel gen. Het meest bestudeerde gen is het *inaZ*-gen afkomstig van *P. syringae* (Hine *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994). De *ina*-genen van andere INA-bacteriën zijn gegeven in Tabel 1. Deze genen variëren in grootte van 3,4 kb tot 7,5 kb (Li *et al.*, 1994). Het open leesraam van dit gen is sterk geconserveerd voor de verschillende INA-bacteriën en bestaat uit een opmerkelijk repetitieve kernregio geflankeerd door unieke 5' en 3' uiteindes (Edwards *et al.*, 1994).

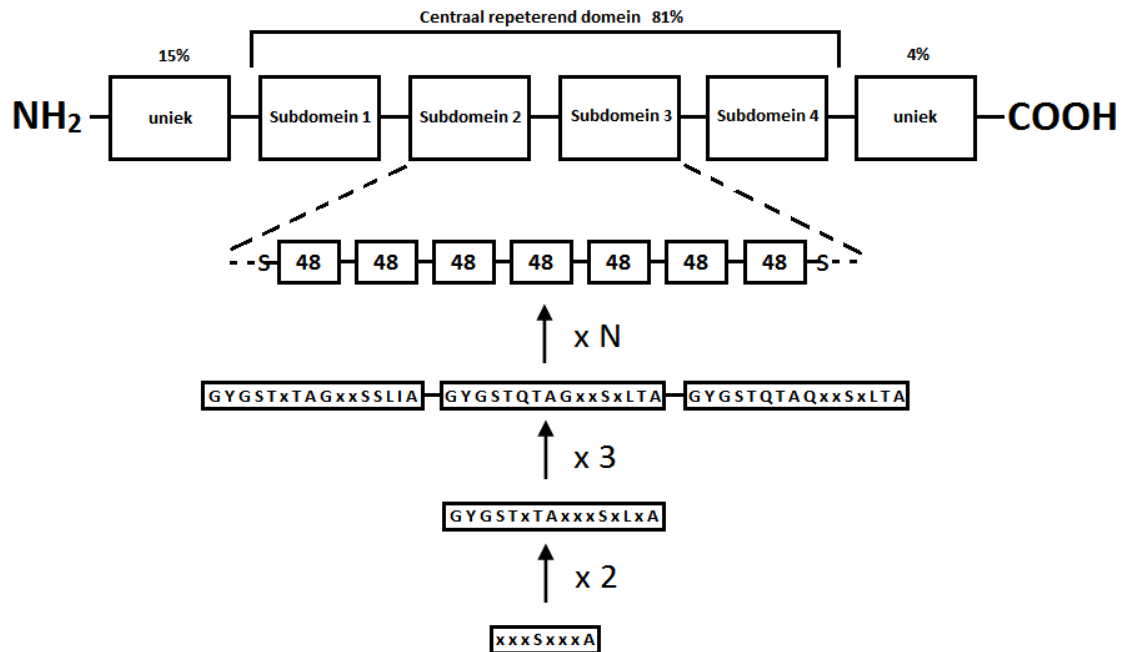
Tabel 1: *ina* genen van verschillende soorten bacteriën en hun grootte (Lee *et al.*, 1994).

Gen	Stam	Grootte (kb)
<i>inaA</i>	<i>Erwinia ananas</i> IN-10	4,3
<i>inaU</i>	<i>Erwinia uredovora</i> KUIN-3	3,4
<i>inaW</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1650	7,5
<i>inaZ</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> S203	4,4
<i>iceE</i>	<i>Erwinia herbicola</i> M1	4,9
<i>inaX</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Translucens</i> X56S	5,3

Het translatieproduct van het *inaZ*-gen van *P. syringae* wordt geschat te bestaan uit meer dan 1200 aminozuren, met een geschat moleculair gewicht van 118 kDa.

Al de bacteriële nucleatieproteïnen hebben een sterk gelijkende primaire structuur, bestaande uit drie verschillende domeinen. In Figuur 3 wordt de algemene primaire structuur van een INP schematisch weergegeven. Ten eerste bevat het proteïne een uniek N-terminaal domein dat bestaat uit ~15% van de totale AZ-sequentie. Dit domein is relatief hydrofoob en hiermee zit het INP verankerd in het buitenste membraan. De tien eerste residuen van dit N-terminale domein zijn echter positief geladen. Deze eerste aminozuren zijn vermoedelijk belangrijk bij het transport naar het uitwendige membraan. Ten tweede bevat het INP een uniek C-terminaal uiteinde (4% van totale AZ-sequentie) dat rijk is aan zure en basische residuen, waardoor het zeer hydrofiel is. Dit uiteinde wordt blootgesteld aan het buitenste celoppervlak. Het is sterk negatief geladen aan het extreme uiteinde van het domein en sterk positief geladen in het andere gedeelte (Hine *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1998; Wolber, 1993; Li *et al.*, 2012). Ten derde bevat het een centraal repeterend domein (81%) dat waarschijnlijk dienst doet als template voor de oriëntering van watermoleculen in een ijsnucleus (Li *et al.*, 1995). Het centrale domein is hydrofiel en kan verder opgedeeld worden in vier subdomeinen (Li *et al.*, 1995; Wolber, 1993). Het eerste subdomein is meestal een onvolledige herhaling van 32 aminozuren, die dienst doet als overgangsregio tussen het N-terminaal domein en het centraal repeterend domein. Subdomein twee en drie bestaan uit een variabele hoeveelheid tandem repeats van 48 aminozuur lange peptide units zoals weergegeven in Figuur 3 (Li *et al.*, 1995; Wolber, 1993). De 48-peptide units van subdomein twee en drie kunnen onderverdeeld worden in drie tandem 16-peptide unit repeats, met een algemene consensussequentie GYGSTxTxxxxSxLxA rijk aan neutrale en waterstofbindende residuen (met x een niet repeterend aminozuur) (Kumaki *et al.*, 2008; Garnham *et al.*, 2011; Hazra *et al.*, 2004). Deze 16-peptide units kunnen nog verder onderverdeeld worden in twee 8-peptide units met een algemene consensussequentie xxxSxxxA, waarbij enkel serine en alanine geconserveerd zijn (Kumaki *et al.*, 2008; Wolber, 1993). Deze geneste, periodische herhaling wordt in INP's van alle INA-bacteriën teruggevonden (Kumaki *et al.*, 2008). De drie 16-peptide units uit één dergelijk 48-peptide unit vertonen een minder sterke mate van overeenkomst dan dat de 48-peptide units onderling doen. De twee 8-peptide units in één 16-peptide unit vertonen elk een bepaalde overeenkomst met het consensus octapeptide, maar verschillen sterk onderling. De subdomeinen twee en drie bestaan dus beide uit tandem repeats van 48-peptide units, maar de 48-peptide units in de twee subdomeinen verschillen onderling van elkaar (Figuur 3). Er is ook een consistente uitwisseling van basische residuen in subdomein twee met zure residuen in subdomein drie en vice versa. Hierdoor is het mogelijk dat de twee domeinen

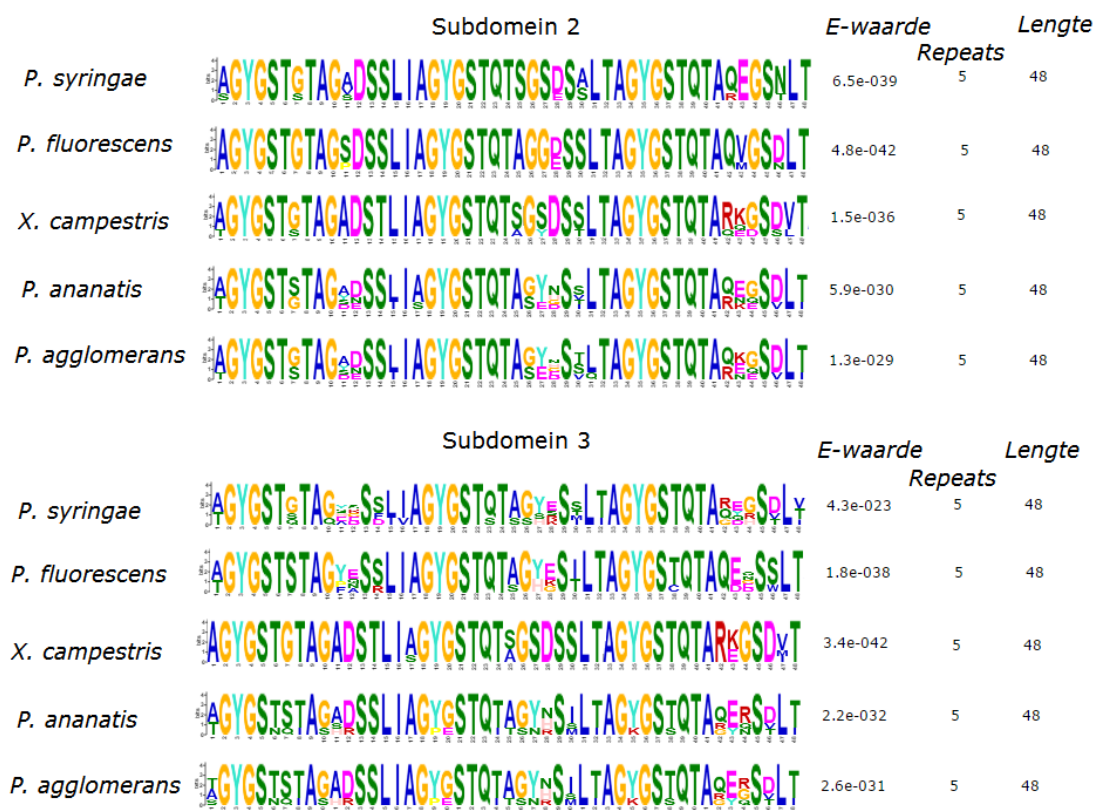
zoutbruggen vormen met elkaar (Li *et al.*, 1995; Wolber, 1993). De overgang tussen subdomein drie en vier wordt gekenmerkt door het verlies van de herhaling met 48-peptide units en bevat meestal een 8-peptide periode van herhaling (Li *et al.*, 1995; Wolber, 1993).



Figuur 3: Schematische weergave van de algemene primaire structuur van een bacterieel INP. Het proteïne bestaat uit een uniek N-terminaal uiteinde, een uniek C-terminaal uiteinde en een repeterend centraal domein dat kan opgedeeld worden in vier subdomeinen. Elk subdomein is opgebouwd uit units van 48 aminozuren die op hun beurt opgebouwd zijn uit drie tandem repeats van 16 aminozuurlange peptide units. De 16-peptide units kunnen beschouwd worden als een tandem repeat van twee 8 aminozuurlange repeats. De aminozuren zijn weergegeven door de één-lettercodes (overgenomen en aangepast van: Wolber, 1993; Garnham *et al.*, 2011).

De mate van overeenkomst tussen de tandem repeats in een domein is het hoogst in subdomein twee en drie. In subdomein twee is de overeenkomst van de 48-peptide units bijna perfect. De overgangsregio tussen subdomein twee en drie wordt gekenmerkt door een verlies in geconserveerdheid tussen de verschillende bacteriële INP's (Li *et al.*, 1995; Wolber, 1993). In het algemeen zijn de centrale domeinen van de verschillende bacteriële INP's onderling sterk geconserveerd waarbij het aantal 16-peptide unit repeats het belangrijkste onderlinge verschil is (Wu *et al.*, 2009). Voor het geval van *P. syringae* bestaat het centrale domein uit 61 herhalingen van de algemene 16-peptide consensussequentie (Hine *et al.*, 1994).

Om de conservering van de verschillende INP's en de verschillen weer te geven over de verschillende bacteriële soorten, worden in Figuur 4 de consensussequenties van de 48-aminozuur repeats van subdomeinen twee en drie van elke bacterie weergegeven. Deze sequenties werden gegenereerd aan hand de van Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) met sequenties van verschillende INA-bacteriën uit de NCBI-databank (dit werk). MEME is een tool waarmee nieuwe geconserveerde motieven in een aminozuur- of nucleotidesequentie geïdentificeerd kunnen worden (Bailey *et al.*, 2009). Uit de resultaten konden de vier verschillende subdomeinen, het N- en C-terminale uiteinde van het INP duidelijk onderscheiden worden.



Figuur 4: Consensussequenties van subdomeinen twee en drie van *P. syringae*, *X. campestris*, *P. Ananatis*, *P. Agglomerans* en *P. fluorescens*. Voor elk motief is de lengte, het aantal repeats en de E-waarde gegeven.

In alle aminozuursequenties van de INA-bacteriën worden telkens vijf 48-peptide units teruggevonden in zowel subdomein twee als subdomein drie. Hierin is duidelijk te zien dat de consensusaminozuursequenties van de 48-peptide repeats van de domeinen twee en drie, zeer goed geconserveerd zijn, zowel binnen één proteïne als over de verschillende INA-bacteriën. Uit Figuur 4 valt eveneens af te leiden dat de 48-peptide repeats van subdomeinen twee en drie onderling in één proteïne, telkens zeer goed overeenkomen met elkaar. Hierin komen telkens

dezelfde motieven terug zoals GYGS, xLTA en TQTA die belangrijk zijn voor de secundaire en tertiaire structuur van de INP's (zie verder). *P. syringae* en *P. fluorescens* hebben een lagere E-waarde voor subdomein twee dan voor subdomein drie. Dit geeft aan dat subdomein twee voor deze stammen het meest geconserveerd is. Daarentegen hebben *X. campestris*, *P. ananatis* en *P. agglomerans* een lagere E-waarde voor subdomein drie. Dit geeft aan dat subdomein drie het meest geconserveerd is bij deze stammen.

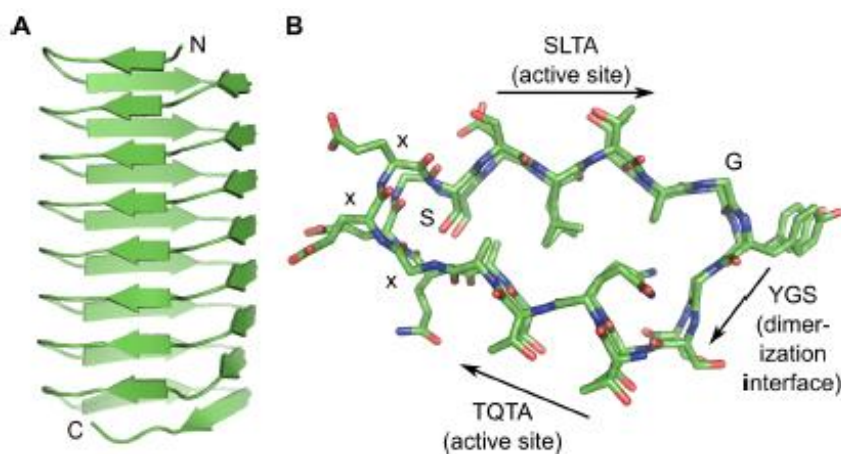
Verwanten soorten zoals *P. agglomerans* en *P. ananatis* vertonen zeer grote mate van overeenkomst in aminozuurconsensus. Uit een alignering van de twee volledige nucleotidesequenties van het *ina*, volgde dat deze sequenties een identiteit hebben van 87%. Daarbij verschillen deze consensussequenties van de *Pantoea* wel meer met die van de rest van de INA-bacteriën. De 48-peptide repeats van *P. syringae* en *P. fluorescens* vertonen in het subdomein twee, een zeer sterke gelijkenis. De repeats zijn hier nagenoeg volledig dezelfde. Uit een alignering van de twee volledige nucleotidesequenties van het *ina*, volgde dat deze sequenties een identiteit hebben van 81%. Dit geeft aan dat de aminozuursequenties zeer goed overeenkomen met elkaar en daardoor sterk geconserveerd zijn. Uit de resultaten van een alignering van meerdere nucleotidesequenties van het *inaZ* van verschillende *P. syringae*, volgde dat deze onderling identiteiten vertoonden van 88% tot 99%. Dit geeft aan dat het *ina* zeer sterk geconserveerd is binnen de *P. syringae*.

1.2.4 Secundaire en tertiaire structuur van het INP

De secundaire en tertiaire structuur van het INP is niet gekend. Er worden in de literatuur verschillende structurele modellen voorgesteld. Hierbij is het INP telkens in staat de structuur van een ijsnucleus na te bootsen en zo dienst te doen als template voor de ijsformatie (Li *et al.*, 1995; Cochet *et al.*, 2000), waarbij watermoleculen geordend worden in een ijsachtig kristalrooster. Dit is gelijkaardig aan de nucleatie door anorganische zouten waar de watermoleculen worden geordend op gebroken kristallen met een kristalrooster vergelijkbaar met dat van ijs (Lindow, 1983; Li *et al.*, 1995; Kasper *et al.*, 2011). Warren *et al.* (1986) stelden een model voor waarbij de secundaire structuur van de unieke N- en C-terminale domeinen beschreven werden als α -helices en β -sheets. De repeterende domeinen werden verondersteld te bestaan uit afwisselende β -sheets en random coil regio's. Hierbij werden twee modellen verondersteld voor de 3D-structuur, bestaande uit een driehoekige ofwel hexagonale structuur, gelijkend op dat van ijs (Cochet *et al.*, 2000; Kajava *et al.*, 1993). Mizuno (1989) stelde een helixstructuur

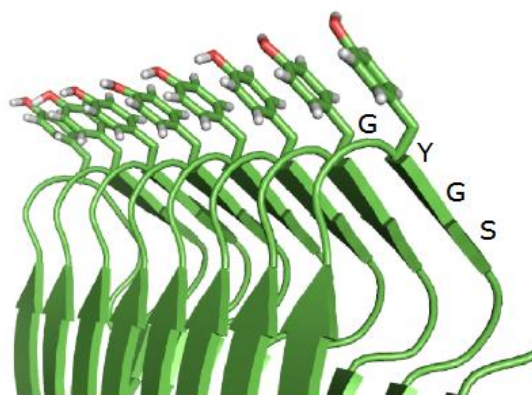
voor met aan het oppervlak een schikking van waterstofbindende sites die goed overeenkomen met de waterstofbruggen in hexagonale ijskristallen. Een andere 3D-structuur werd voorgesteld door Kajava en Lindow (1993) als een schikking van gestapelde β -hairpins. Hierbij vertonen de β -sheets een antiparallelle oriëntatie met onderlinge waterstofbindingen, waarbij een bocht verwacht wordt om de 8, 16 of 48 aminozuren. Deze β -structuren worden vervolgens met een beperkt aantal op elkaar gestapeld (Cochet *et al.*, 2000; Kajava *et al.*, 1993).

In een meer recente studie van Garnham *et al.* (2011) werd nog een ander voorstel gedaan voor de 3D-structuur van het INP, op basis van homologie gebaseerde modellering en Molecular Dynamics simulaties op een 128-aminozuur lang fragment van het INP van *Pseudomonas borealis*. *P. borealis* produceert een INP bestaande uit 1244 aminozuren dat homologie vertoont met alle andere bacteriële INP's. Het centrale domein bestaat uit 64 tandem repeats van 16-peptide units. Elke 16-peptide unit bevat vier onderscheidbare tetrapeptides. Twee β -sheets met consensus sequenties TQTA en SLTA, die de actieve ijsnucleatiesites vormen en twee glycine- and serinerijke turns met de consensus sequenties xxxS en GYGS. De consensus sequentie van de 16-peptide unit heeft dus volgende vorm GYGSTQTAxxxSSLTA (Garnham *et al.*, 2011). Uit deze studie volgt dat deze sequenties zich kunnen ordenen in een rechtsdraaiende β -helix waarbij de β -sheets TQTA en SLTA zich boven elkaar bevinden, verbonden door de sequenties xxxS en GYGS (Figuur 5) (Garnham *et al.*, 2011).



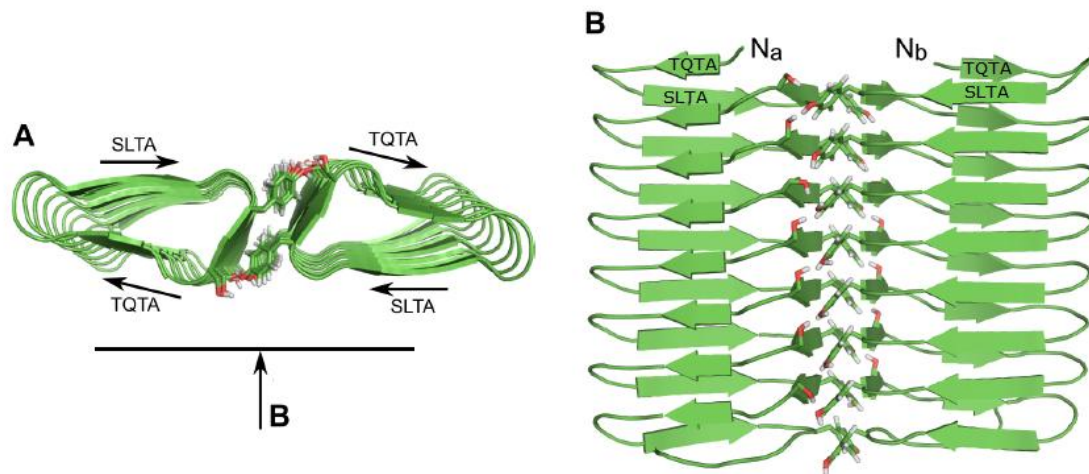
Figuur 5: A) Schematische voorstelling van β -helix model van het 128 aminozuur lange fragment van het INP van *P. borealis*. De β -strengen worden voorgesteld door de groene pijlen. **B)** Dwarsdoorsnede van het INP. Zuurstofatomen zijn rood gekleurd, stikstofatomen blauw en koolstofatomen groen (Garnham *et al.*, 2011).

In deze conformatie bevat het proteïne een relatief hydrofobe kern bestaande uit de methylgroepen van alanine, glutamine, serine en de leucine zijketen van de sequentie SLTA (Figuur 5B). Hierbij wijzen de polaire groepen van glutamine en serine in de richting van de turns van het proteïne, weg van de hydrofobe kern. Dit geheel wordt gestabiliseerd door de vorming van waterstofbruggen door de zijketens met de peptide backbonestructuur (Garnham *et al.*, 2011). Door deze dichtgepakte kern is er geen plaats meer voor de tyrosinezijketens van het GYGS peptide. Hierdoor is de tyrosinezijketen gericht naar de buitenzijde en stapelen de opeenvolgende tyrosinezijketens op elkaar ter vorming van een tyrosineladder. Hierbij heeft het YGS gedeelte in het proteïne ook een β -sheet conformatie zoals wordt aangegeven in Figuur 6 door de groene pijl (Garnham *et al.*, 2011).



Figuur 6: Schematische voorstelling van de tyrosine conformatie in het 128 aminozuur lange fragment van het INP van *P. borealis* (overgenomen en aangepast van: Garnham *et al.*, 2011).

Door deze tyrosineladders kan er een **parallel dimeer** van twee dergelijke proteïnefragmenten gevormd worden, waarbij de tyrosineladders naar elkaar toe gericht zijn en de N-terminale uiteindes van beide fragmenten naar dezelfde kant gericht zijn. Dit resulteert in een vlakke structuur aan beide zijden van het dimeer, waarbij de SLTA van het ene fragment en TQTA van het andere fragment, zich aan dezelfde zijde van het dimeer bevinden (Figuur 7). Deze oppervlakten zijn relatief hydrofoob, maar bevatten veel donor- en acceptorgroepen om waterstofbruggen te vormen (Garnham *et al.*, 2011). Waardoor deze oppervlakten, gevormd door het centraal repeterend domein, waarschijnlijk dienst doen als template voor de oriëntering van watermoleculen in een ijsnucleus (Garnham *et al.*, 2011). Door Wu *et al.* (2009) wordt verondersteld dat één van de vlakke zijden van het dimeer dienst doet als een complementair oppervlak voor interactie met andere INP moleculen voor het vormen van aggregaten.

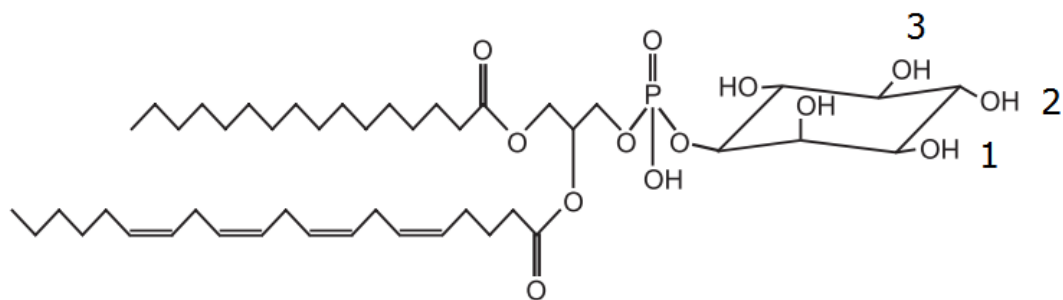


Figuur 7: A) Dwarsdoorsnede van het dimeer van 128 aminozuur lange fragmenten van het INP van *P. borealis*. De actieve SLTA en TQTA motieven zijn aangeduid. **B)** Boven aanzicht van het INP dimeer. De N-terminale uiteinden van beide monomeren (N_a en N_b) zijn aangeduid (overgenomen en aangepast van: Garnham *et al.*, 2011).

1.2.5 Post-translationele modificaties en planaire structuur bepalen de activiteit van het INP

Om het InaZ proteïne, afkomstig van *P. syringae*, verder te bestuderen werd het in *E. coli* tot overexpressie gebracht en opgezuiverd. De moleculaire massa (153 kDa) bleek echter hoger te zijn dan de 118 kDa die voorspeld werd op basis van de *inaZ* sequentie (Li *et al.*, 1995). Uit verschillende studies blijkt dat de ijsnucleatiestructuur niet alleen bestaat uit proteïnen, maar ook uit koolhydraten en fosfolipiden die posttranslationeel worden toegevoegd (Hine *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995). Deze posttranslationele modificaties zijn belangrijk omdat deze kritisch blijken te zijn voor de ijsnucleatie-activiteit (Turner *et al.*, 1991). Deze niet-proteïne componenten zijn eveneens belangrijk voor de verankering van de proteïnen aan het uitwendig membraan van de cellen (Turner *et al.*, 1991). Uit de onderzoeken van Turner *et al.* (1991) en Kozloff *et al.* (1983) blijkt dat de meest actieve nucleatiestructuren **lipoglycoproteïnecomplexen** zijn, waarbij het INP via een complex mannan gebonden is aan fosfatidylinositol (FI) (Figuur 8). Hierbij is het INP gebonden aan mannose in het complex mannan via N-glycosylatie (Asn) of O-glycosylatie (Ser, Thr). Dit werd experimenteel bepaald uit de effecten van specifieke enzymen en chemische probes op de nucleatiestructuren. De exacte opbouw is echter nog niet gekend (Turner *et al.*, 1991; Cochet *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2012).

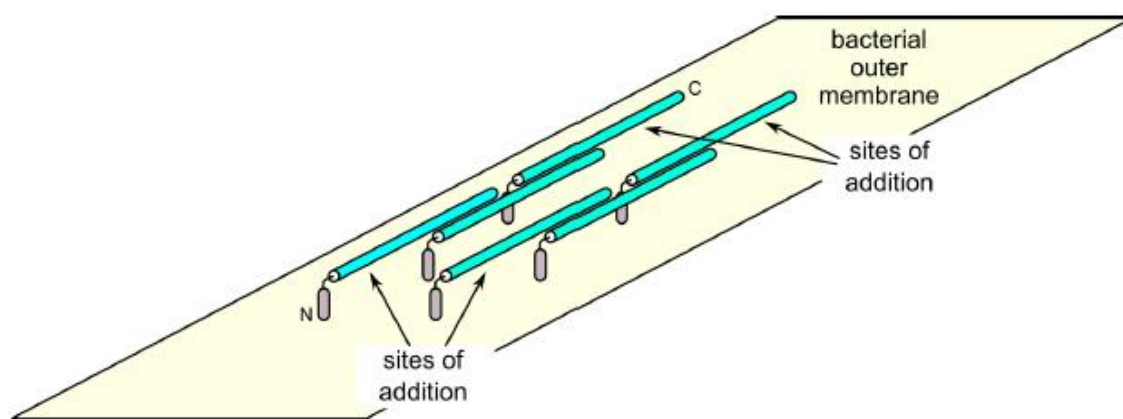
Afhankelijk van de posttranslationele modificatie van het INP, kan de geproduceerde nucleatiestructuur opgedeeld worden in drie types. Slechts 1 op 10^6 cellen in een *P. syringae* populatie bevatten de volledige en meest actieve type I structuur. In de type I structuur is het INP gekoppeld aan FI. De andere bacteriën bevatten het InaZ proteïne, maar niet als een glycoFI complex (Cochet *et al.*, 2000). In de type II structuur is het InaZ proteïne vermoedelijk gebonden aan mannan en glucosaminegroepen, maar zeker niet aan fosfatidylinositol. De structuur van het type III bevat het proteïne gebonden aan enkele mannose residuen, dat gedeeltelijk ingebed is in het uitwendig membraan (Cochet *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 1991). De types van posttranslationele modificatie hebben ook een invloed op de temperatuur waarbij de INP's ijsvorming kunnen induceren. Indien de bacteriën beschikken over de type I nucleï dan zijn ze actief bij -2°C tot -5°C de andere types zijn actief tussen -5°C tot -7°C (type II) en -7°C tot -10°C (type III) (Cochet *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 1991).



Figuur 8: De structuur van fosfatidylinositol. De hydroxylgroepen bij posities 1, 2 & 3 zijn de mogelijke bindingsplaatsen voor het complex mannan (overgenomen en aangepast uit: Skwarek *et al.*, 2009).

Er wordt aangenomen dat de verschillende INP moleculen op een cel, aggregaten kunnen vormen van variabele grootte die gestabiliseerd worden door het membraan. De repeterende aminozuursequenties zorgen voor een periodieke reeks van waterstofbrug donor- en acceptorgroepen op het proteïneoppervlak. Deze kunnen interageren met naburige proteïnes, membraan-lipiden en water buiten de cel. Door deze interacties tussen de repeterende sequenties van de verschillende INP moleculen ontstaan er **planaire aggregaten**. De grootte van het aggregaat of nucleatiekern heeft een invloed op de nucleatietemperatuur. Één enkel INP molecule kan een nucleatiekern vormen met een activiteit bij -12°C , terwijl een aggregaat van 53 INP moleculen nodig is om een activiteit te vertonen bij -3°C (Lagriffoul *et al.*, 2010; Lindow *et al.*, 2007). In dit geval heeft de nucleatiesite een vorm van een platte schijf met een diameter van $300 \text{ \AA}$ (Cochet *et al.*, 2000). De vorming van deze aggregaten is noodzakelijk om voldoende geordende

watermoleculen te groeperen om zo ijsnucleatie te veroorzaken (Davies, 2014). De precieze interacties tussen het bacterieel membraan, proteïnen en het ijskristal zijn nog niet volledig opgehelderd (Lagriffoul *et al.*, 2010; Lindow *et al.*, 2007). In het werk van Garnham *et al.* (2011) wordt verondersteld dat het actieve oppervlak van het aggregatencomplex vergroot wordt door de vorming van meerdere dimeren in een geschrante manier (Figuur 9). Hierbij loopt het centrale domein van het INP parallel met het oppervlak van de bacterie waarbij het N-terminale uiteinde zorgt voor verankering in het membraan (Garnham *et al.*, 2011). Het actieve oppervlak wordt verder vergroot door toevoeging van individuele INP moleculen aan de secties waar de uiteinden van de twee INP's blootgesteld zijn. Meerdere reeksen van deze dimeren zouden het actieve INP oppervlak kunnen vergroten en zo zorgen voor een verhoging in de temperatuur waarbij de nucleatie plaatsvindt (Garnham *et al.*, 2011). Uit studies van Wolber (1992) volgt dat de nucleatieactiviteit van enkel de proteïnefractie plaatsvindt bij lagere temperaturen dan die van de volledige cel.



Figuur 9: Vorming van geschrante dimeren op het oppervlak van een INA bacterie. De INP monomeren worden voorgesteld door de buisjes, met het centraal repeterend domein in het blauw en de N-terminale domeinen in het grijs (Garnham *et al.*, 2011).

De eersten die aantoonde dat de INA-bacterië *P. agglomerans* in staat is om INP's te secreteren, gebonden aan buitenste membraan vesikels (BMV), waren Phelps *et al.* (1986). Deze BMV's zijn kleine circulaire structuren met een grootte van 20 tot 250 nm, die afgescheiden worden van het buitenste membraan. Dit is een algemeen mechanisme van Gram-negatieve bacteriën om onoplosbare moleculen zoals INP's te secreteren. Het is gebleken dat onder bepaalde omstandigheden BMV's met INP's gelijkaardige nucleatie-activiteit vertonen als intacte cellen. De fractie van de BMV's in het medium die nucleatie induceren, is echter nog niet gekend (Santl-Temkiv *et al.*, 2015). Meer recent werd aangetoond dat ook *Pseudomonas spp.* in staat zijn om BMV's met een grootte van 100 nm te secreteren die INA vertonen (Santl-Temkiv *et al.*, 2015).

1.2.6 Beïnvloedende parameters van de Ice Nucleation Activity

In een cel waarbij het gen actief afgeschreven wordt, kunnen er 500 tot 1000 proteïnen op het membraan gevonden worden (Jung *et al.*, 1998; Lindow *et al.*, 2007). Dit is veel minder dan de 10^5 kopijen van de uitwendige membraanproteïnen die typisch aanwezig zijn op Gram-negatieve bacteriën (Lindow *et al.*, 2007). De grootte van de gevormde aggregaten en de verschillende types nucleï die gevormd worden op het uitwendige membraan, zijn afhankelijk van verschillende parameters, waaronder fysicochemische condities en temperatuur. Ten eerste geven meeste studies aan dat het INP vooral stabiel tot expressie wordt gebracht in de stationaire groeifase van de bacteriële cellen (Jung *et al.*, 1998; Nemecek-marshall *et al.*, 1993). Zo wordt de hoogste nucleatie-activiteit bekomen bij het begin van de stationaire groeifase. Daarbij treedt activiteit pas op wanneer de celconcentratie een waarde van 2×10^8 cellen/ml heeft bereikt (Cochet *et al.*, 1994).

Ten tweede heeft de incubatietemperatuur van de bacteriën een invloed op de activiteit en de types nucleï die gevormd worden. In eerste instantie moeten de INA-bacteriën op een hoge temperatuur van ongeveer 30°C opgegroeid worden om een voldoende hoge celdensiteit te bekomen (Lynn *et al.*, 1988). Nemecek-marshall *et al.* (1993) geven aan dat *P. syringae* bij een incubatie op hoge temperatuur van 30°C bij aanvang van de stationaire groeifase, enkel type III nucleï en geen type I en type II nucleï bevatten. Echter na een shift naar een lagere temperatuur worden type I nucleï snel ontwikkeld. Zo wordt aangetoond dat de stationaire celcultuur na een shift van 30°C naar 18°C, het aantal cellen met type I nucleï stijgt van 1×10^7 cellen naar 3×10^7 op 10^9 cellen. Eveneens wordt aangegeven dat de optimale temperatuur voor inductie van de type I nucleï ligt tussen 14°C en 18°C. Daarbij zorgt een snelle afkoeling naar de inductietemperatuur voor een grotere hoeveelheid en een snellere ontwikkeling van type I nucleï. De geïnduceerde type I nucleï kunnen door de cellen behouden worden voor enkele uren tot enkele dagen. Enkel wanneer de cellen terug geïncubeerd worden bij een hogere temperatuur van 30°C, verliezen ze de type I nucleï volledig (Nemecek-marshall *et al.*, 1993).

Ten derde heeft de samenstelling van het groeimedium een invloed op de nucleatie-activiteit van INA-bacteriën. Meerdere studies geven aan dat een stikstoflimitatie in het medium aanleiding geeft tot hogere nucleatie-activiteit (Cochet *et al.*, 1994; Nemecek-marshall *et al.*, 1993). In de studie van Nemecek-marshall *et al.* (1993) wordt aangegeven dat de grootste inductie van type I nucleï (door middel van temperatuurshift) plaatsvindt in een medium met lage stikstof-

en fosforniveaus. Limitatie van de koolstofbron geeft een slechtere groei en zorgt zelfs voor een daling van de activiteit ten opzichte van de controles, die onder normale omstandigheden worden opgegroeid. Cochet *et al.* (1994) geven verder aan dat de stikstoflimitatie met een complexe stikstofbron zoals pepton afkomstig van vlees, zorgt voor een betere biomassaproductie en hogere nucleatie-activiteit dan met een gedefinieerde stikstofbron zoals mononatriumglutamaat.

1.2.7 Toepassingen van het Ice Nucleation Protein

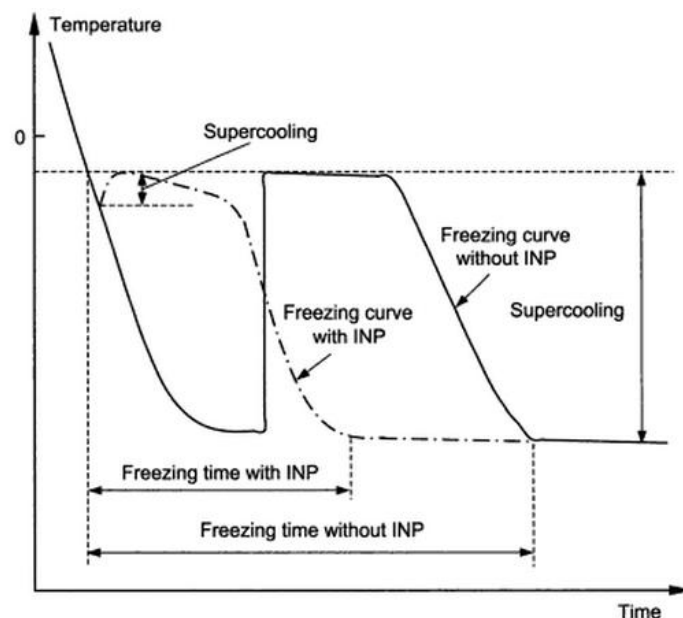
1.2.7.1 Productie van kunstmatige sneeuw

Om kunstmatige sneeuw te produceren wordt supergekoeld water verneveld door het in de lucht sproeien met een sneeuwkanon (Lagriffoul *et al.*, 2010). Onder normale omstandigheden vereist dit de superkoeling van water met perslucht tot -10°C , voordat het water in de lucht kristalliseert en sneeuw wordt gevormd. Deze superkoeling is het meest kostintensieve gedeelte van het aanmaken van kunstmatige sneeuw (Lagriffoul *et al.*, 2010; Skirvin *et al.*, 2000). Zoals reeds uitgelegd kan door ijsnucleators aan het water toe te voegen, de benodigde graad van superkoeling gereduceerd worden. Vroeger gebruikte men hiervoor chemische nucleators zoals jodidezouten van zilver, koper en kwik. Door de negatieve impact op de mens en omgeving werd het gebruik hiervan snel stopgezet (Lagriffoul *et al.*, 2010) en werd er overgeschakeld op het gebruik van *P. syringae* als heterogene ijsnucleator, bij de aanmaak van kunstmatige sneeuw (Woerpel, 1980; Cochet *et al.*, 2000). De meest voorkomende gecommercialiseerde vorm van INA-bacteriën is Snomax® (Cochet *et al.*, 2000). Dit is een gevriesdroogd poeder van *P. syringae* 31a dat verpakt wordt in de vorm van pellets met 10^{11} cellen per gram (Pattnaik *et al.*, 1997; Skirvin *et al.*, 2000). Deze pellets worden doormiddel van gammastraling gesteriliseerd om de bacteriën af te doden, maar de proteïnes en de integriteit van de cellen intact te houden. Dit zorgt er eveneens voor dat de vrijzetting van levende bacteriën in de natuur minimaal is (Ishikawa *et al.*, 2014; Skirvin *et al.*, 2000). Het gebruik van Snomax® zorgt er voor dat de benodigde graad van superkoeling bij de productie van sneeuw gereduceerd is van -10°C tot $-2,8^{\circ}\text{C}$ (Snomax®, 2014). Dit resulteert in een reductie in energieverbruik voor de koeling van water en watergebruik door de sneeuwmachines (Pattnaik *et al.*, 1997; Skirvin *et al.*, 2000). Daarnaast resulteert het gebruik ook in een betere kwaliteit van de sneeuw aangezien standaard sneeuwmachines sneeuw pellets vormen, terwijl met Snomax® vlokken gevormd worden die meer gelijken op natuurlijke sneeuw (Skirvin *et al.*, 2000). Tegenwoordig wordt wereldwijd bij veel kunstmatige sneeuwproducties gewerkt met biologische ijsnucleators (Lagriffoul *et al.*, 2010).

Door sommige instanties wordt echter gevreesd dat het gebruik van deze plantpathogene bacteriën in sneeuw een gevaar kan vormen voor de omgeving en de gezondheid (Skirvin *et al.*, 2000; Lagriffoul *et al.*, 2010). Hierdoor werd het gebruik ervan in Frankrijk opgeschort sinds 2005 (Lagriffoul *et al.*, 2010).

1.2.7.2 Invriezen van voedingsmiddelen

INA-bacteriën en hun INP hebben ook potentiële toepassingen in de voedselindustrie zoals in de productie van diepvriesproducten, vriesdrogen en vriesconcentratie (Widehem *et al.*, 2003). Bij het invriezen van voeding zorgen de INA-bacteriën voor een verhoging van de nucleatietemperatuur en een verhoging van de vriessnelheid (Sun *et al.*, 2006). Door de reductie van de benodigde graad van superkoeling kan de vriestijd van de producten ingekort worden en zo een efficiëntere productie opleveren (Figuur 10) (Sun *et al.*, 2006; Li *et al.*, 1995). Dit betekent dat er op twee aspecten energie kan bespaard worden. Ten eerste kan er energie bespaard worden op de koeling tijdens het vriesproces, omdat de totale vriestijd verkort kan worden. Ten tweede kan er bespaard worden doordat de producten bewaard kunnen worden bij hogere temperatuur, omdat de INA-bacteriën er voor zorgen dat de producten bevroren en bevroren blijven bij een relatief hogere temperatuur (Li *et al.*, 1995; Pattnaik *et al.*, 1997). In Figuur 10 wordt het verschil in temperatuursverloop van een vriesproces met en zonder het gebruik van INP's weergegeven.



Figuur 10: Typische vriescurven bij het bevriezen van producten met (onderbroken lijn) en zonder (volle lijn) het gebruik van INP's (Sun *et al.*, 2006).

Li *et al.* (1995) pasten het principe toe op het invriezen van zalm. Zij vonden dat het gebruik van INA-bacteriën bij het invriezen van zalm, zorgde voor een stijging van de nucleatietemperatuur van $-4,9^{\circ}\text{C}$ naar $-1,5^{\circ}\text{C}$ en dat het zorgde voor een reductie van de totale vriestijd met 33%. De zalm die behandeld werd door deze te besproeien met een *P. syringae* suspensie, bevroor volledig bij -5°C , terwijl een derde van de onbehandelde vis niet bevroor. Chen *et al.* (2002) gebruikten celfragmenten van INA-bacteriën in het partiële vriesproces van scampi bij -3°C en ondervond dat hierdoor de bewaarperiode van de scampi verlengd werd (Zhang *et al.*, 2009). Er werden verder nog significante reducties in de graad van superkoeling bekomen bij het vriesproces van onder andere melk, olie, fruitsappen, roomijs, yoghurt en gehakt (Sun *et al.*, 2006).

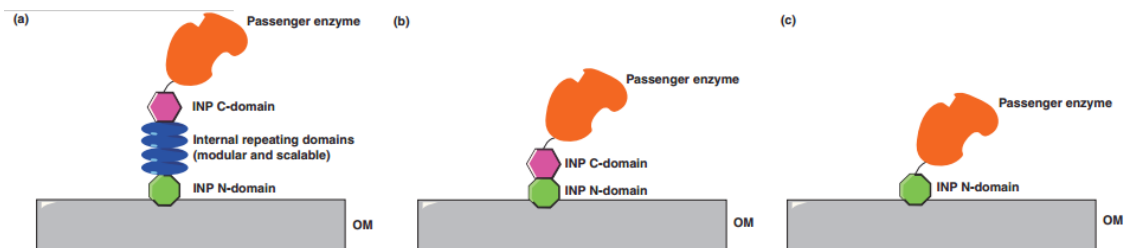
Naast een reductie in energiekosten, kan het gebruik van INA-bacteriën en/of de INP's zorgen voor een wijziging in de textuur van het bevroren voedsel ten opzichte van normaal bevroren voedsel (Zhang *et al.*, 2010). In het onderzoek van Watanabe *et al.* (1994) werd het effect van actieve INA-bacteriën getest op verse voedselproducten zoals rauw eiwit, melk en citroensap. Zij stelden vast dat het gebruik van INA-bacteriën in het vriesproces de textuur en kleur van de producten verbeterden.

Vriesconcentratie is een proces waarbij een oplossing bestaande uit water en andere componenten wordt opgeconcentreerd door het aanwezige water te bevriezen en af te zonderen van de rest van de oplossing (Widehem *et al.*, 2003). In het huidige proces wordt de oplossing supergekoeld waarna er kleine ijskristallen als primaire nucleï toegevoegd worden. Om de benodigde graad van superkoeling voor dit proces te verminderen kunnen INA-bacteriën toegevoegd worden als heterogene nucleï (Widehem *et al.*, 2003). Hierbij kunnen de cellen aan de oplossing toegevoegd worden na sterilisatie of door immobilisatie in calcium alginaat. Met deze techniek werd onder andere melk en citroensap succesvol geconcentreerd met beter behoud van smaak (Li *et al.*, 1995).

Een belangrijk punt in de voedingstoepassingen van INA-bacteriën is dat de gebruikte bacteriële nucleators veilig moeten beschouwd worden voor het milieu, niet-toxisch, niet-pathogeen en eetbaar zijn. Als er volledige cellen worden gebruikt is het belangrijk dat de organismen volledig afgedood zijn, maar voor voedingstoepassingen is het vermoedelijk aangewezen het INP te isoleren alvorens het toe te voegen (Sun *et al.*, 2006).

1.2.7.3 INP als carrierproteïne voor oppervlakte-expressie

Het INP kan gebruikt worden voor oppervlakte-expressie van recombinante proteïnen op het uitwendige membraan van Gram-negatieve bacteriën, zoals *P. syringae* en *E. coli* waarbij de activiteit van de recombinante proteïnes behouden blijft (Yang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2003). Het INP is immers een transmembraan gebonden proteïne. Oppervlakte-expressie van het gewenste proteïne (passenger) wordt gerealiseerd door het genetisch fuseren van de passenger met de INP-carrier. Dit zorgt er vervolgens voor dat de passenger getransporteerd wordt naar en verankerd wordt op het uitwendig membraan van de bacterie (van Bloois *et al.*, 2011). Er zijn verschillende mogelijkheden om deze fusie te realiseren (Figuur 11); (i) met het volledige INP; (ii) met een gedeelte van het INP die het N-terminale en C-terminale uiteinde bevat waarvan enkele peptide units verwijderd zijn; of (iii) enkel met het N-terminale uiteinde van het INP (Wu *et al.*, 2006). Het INP is een groot proteïne waardoor verkorte versies van het INP beter zijn voor de oppervlakte-expressie van grote proteïnen (Li *et al.*, 2003). Doordat de passenger tot expressie gebracht wordt aan het oppervlak van het organisme, heeft het proteïne directe toegang tot extern toegevoegd substraat en is membraantransport van het substraat niet meer noodzakelijk (van Bloois *et al.*, 2011).



Figuur 11: Schematische voorstelling van verschillende mogelijkheden van oppervlakte-expressie van een passenger proteïne door fusie met het INP. (a) Volledig INP of het INP met verwijderde repeterende units in het centrale domein. (b) N- en C-terminale domeinen van het INP zonder het centraal repeterend domein. (c) Enkel het verankerend N-terminale domein van het INP (van Bloois *et al.*, 2011).

Het INP is succesvol gebruikt als carrierproteïne voor de oppervlakte-expressie op *E. coli* van verschillende proteïnen zoals carboxymethylcellulase, salmoline, groen fluorescent proteïne, chitinase en NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (Yang *et al.*, 2008). De voordelen van INP als carrierproteïne zijn; (i) de stabiele expressie van het INP op het uitwendige membraan in de stationaire fase en (ii) de modulaire lengte van het centraal repeterend domein aan de hand van de repeterende peptide units (Li *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 1998). De repeterende peptide units zijn ideale spacer units om de afstand tussen het

passengerproteïne en het uitwendig celmembraan te reguleren (van Bloois *et al.*, 2011). Het gebruik van INP als carrierproteïne heeft verschillende potentiële toepassingen zoals de ontwikkeling van vaccins, de constructie en screening van eiwitbanken en de ontwikkeling van biokatalysatoren, biosensoren en biosorbenten (Li *et al.*, 2012).

2 Doelstelling van de masterproef

Het hoofddoel van deze masterproef was de ontwikkeling van een nieuw, induceerbaar expressiesysteem voor de recombinante expressie van het INP in *E. coli* als gastheer. In een eerste gedeelte van deze masterproef was het doel de cultuurcollectie te screenen op de aanwezigheid van INA-bacteriën. Om op deze manier een INA-bacterië te vinden met een *ina*-gen, dat zorgt voor de expressie van een INP met hoge activiteit. Hiervoor werd de detectie van *ina*-genen via PCR geoptimaliseerd. De INA van deze stammen werd verder geëvalueerd aan de hand van verschillende activiteitstesten. Ten tweede was het doel het *ina*-gen tot expressie te brengen en te produceren in *E. coli*. Hiervoor werd getracht een induceerbaar expressiesysteem te ontwikkelen door het *inaZ* te kloneren in een pPro24 en pET24 vectorsysteem. Om op deze manier het INP gecontroleerd tot expressie te brengen om de INA verder te analyseren.

3 Materiaal & methode

3.1 Gebruikte bacteriële stammen

Voor het kloneringswerk in deze masterproef werd gebruik gemaakt van *E. coli* TOP10 (Invitrogen), *E. coli* BL21 (NEBiolabs) chemisch competente cellen en *E. coli* TOP10F' cellen (iGEM). Deze werden schuddend opgegroeid bij 37°C in Luria-Bertani (LB) medium (10 g/l trypton (Fluka), 5 g/l gistextract (Fermtech) en 10 g/l NaCl). Indien nodig werd hieraan een geschikte concentratie ampicilline (100 µg/ml), chlooramfenicol (30 µg/ml) of kanamycine (50 µg/ml) aan toegevoegd. Tabel 2 geeft een overzicht van alle bacteriële stammen die gebruikt en gescreend werden in deze masterproef. Alle gebruikte bacteriële stammen waren afkomstig uit de collectie van PME-BIM (KULeuven), waar deze bewaard worden bij -80°C (LB-medium, 25% glycerol). Dit wordt aangegeven door de specifieke STRI-nummer bij elke stam. Daarbij waren meeste organismen afkomstig uit plantennectar (PME-BIM, KULeuven). Deze stammen hebben een STRI-nummer beginnende met ST14.12. Alle stammen werden opgegroeid op Trypton Soya Agar/Broth (TSA/B) (Oxoid) met uitzondering van *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Deze stam werd opgegroeid op YPGA. Dit medium bestond uit 7 g/l gist extract (Fermtech), 7 g/l peptone (BD), 7 g/l glucose en 15 g/l technische agar (Oxoid).

Tabel 2: De gebruikte bacteriële stammen in deze masterproef met bijhorende STRI-nummer en de groeitemperatuur.

Gebruikte stammen	STRI-nummer	Groei temperatuur
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Bacillus cereus</i>	ST10.09/026	25°C
<i>Pantoea agglomerans</i>		
<i>Pantoea agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/001	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/002	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> HY 5080	ST14.12/024	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> HY 5080	ST14.12/125	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> DSM 3493	ST14.12/131	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> KB64	ST14.12/133	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> KB64	ST14.12/142	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> LMG 2764	ST14.12/148	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> KB38	ST14.12/150	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> HY 5080	ST14.12/160	30°C

<i>Pantoea agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/164	30°C
<i>Pantoea agglomerans</i> CJ-G-R2A5	ST14.12/214	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ST12.11/005	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain PW88	ST12.11/040	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F6	ST14.12/042	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC 15841	ST14.12/003	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC 15841	ST14.12/004	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KB6	ST14.12/165	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 12568	ST14.12/170	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ST12.14/519	30°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ST12.14/520	30°C
<i>Peusomonas fluorescens</i>	ST12.14/524	30°C
<i>Pseudomonas poae</i>		
<i>Pseudomonas poae</i>	ST12.14/526	30°C
<i>Pseudomonas spp.</i>		
<i>Pseudomonas sp.</i>	ST12.11/007	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> BLH-11D4	ST14.12/020	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> S8Fb11	ST14.12/021	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> SGb410	ST14.12/028	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> Q16	ST14.12/029	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> WR7-41	ST14.12/031	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> E9	ST14.12/035	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> Fa3	ST14.12/043	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> PX7_S1	ST14.12/055	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> G62	ST14.12/062	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> YXE2-g	ST14.12/067	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> E9	ST14.12/069	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> PX7_S1	ST14.12/082	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> E9	ST14.12/084	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> R11-45-07	ST14.12/092	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> Fa3	ST14.12/093	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> JM14 16S	ST14.12/097	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> PG-2010-28	ST14.12/100	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> JM14 16S	ST14.12/103	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> 4_C16_18	ST14.12/104	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> R4-30-08	ST14.12/146	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> SGb149	ST14.12/152	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> E9	ST14.12/155	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> ZBC1	ST14.12/161	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i> SGb149	ST14.12/163	30°C
<i>Pseudomonas sp.</i>	ST14.12/166	30°C

<i>Pseudomonas</i> sp. G62	ST14.12/173	30°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SAP34_1	ST14.12/181	30°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGb149	ST14.12/191	30°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGb149	ST14.12/204	30°C
<i>Pseudomonas</i> sp. Fa3	ST14.12/205	30°C
<i>Pseudomonas</i> sp. PDD-32b-42	ST14.12/215	30°C
<i>Pseudomonas</i> sp. G62	ST14.12/229	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i>		
<i>Pseudomonas syringae</i> NW-17	ST12.11/037	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> NW-17	ST12.11/081	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/019	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/020	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/023	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/024	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> cit7	ST08.14/008	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> 31R1	ST08.14/009	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> ina citDel1b	ST08.14/010	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> KFB 68	ST14.12/036	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/049	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> M209	ST14.12/059	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> NBRC 14076	ST14.12/071	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> NBRC 14077	ST14.12/078	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/085	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> PDD-33b-2	ST14.12/095	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> KFB 86	ST14.12/109	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> IPpBC	ST14.12/117	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/132	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/143	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> IPpBC	ST14.12/153	30°C
<i>Pseudomonas syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/226	30°C
<i>Xanthomonas spp.</i>		
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Armoraciae</i>	ST03.13/055	30°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	ST03.13/056	20°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Pelargonii</i>	ST03.13/057	30°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Raphani</i>	ST03.13/058	30°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>	ST03.13/059	20°C
<i>Xanthomonas fragariae</i>	ST03.13/060	20°C
<i>Xanthomonas gardneri</i>	ST03.13/061	30°C
<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	ST03.13/062	30°C
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	ST03.13/063	20°C
<i>Xanthomonas pisi</i>	ST03.13/064	30°C

3.2 Gebruikte vectoren

Tabel 3 geeft een overzicht van de vectoren die gebruikt worden in deze masterproef. Hierbij wordt eveneens de relevante informatie over de vector en de bron weergegeven.

Tabel 3: Gebruikte plasmiden in deze masterproef met hun relevante eigenschappen en referentie.

Vector	Relevante eigenschappen	Bron
pPro24	Kloneringvector: pBR322 ori, <i>Amp</i> ^R , propionaat induceerbare promotor (<i>P</i> _{prpB}), <i>rnnB</i>	Lee en Keasling (2005)
pET24	Kloneringvector: <i>Kan</i> ^R , IPTG induceerbare T7 promotor, <i>lac</i> operator, His-tag, T7 terminator	Invitrogen
pSB1C3 – BBa_K584024	Bevat Biobrick BBa_K584024: RBS, <i>inaZ</i> van <i>P. syringae</i> S203	iGEM (2011)
pSB1C3 – BBa_K584027	Bevat Biobrick BBa_K584027: Constitutieve promotor, RBS, <i>inaZ</i> van <i>P. syringae</i> S203	iGEM (2011)

In de Bijlagen C, D, E en F kunnen de vectormaps voor de vectoren pPro24, pET24, pSB1C3 – BBa_K584024 en pSB1C3 – BBa_K584027 respectievelijk gevonden worden. De nucleotidesequenties van de Biobrick onderdelen BBa_K584024 en BBa_K584027 kunnen teruggevonden worden in de bijlagen A en B respectievelijk.

3.3 Consensussequentie voor subdomeinen 2 & 3 van *ina*

Voor de creatie van de consensussequenties voor subdomeinen twee en drie (Figuur 4, p. 10) van het *ina* voor verschillende soorten INA-bacteriën, werd gebruik gemaakt van Multiple Em for Motif Elicitation (MEME). Dit aan de hand van nucleotidesequenties van de *ina*-genen van *P. syringae* (gb|EPF65740.1), *P. fluorescens* (sp|P09815.1), *X. campestris* (pir||S11672), *P. ananatis* (gb|AAK70465.1) en *P. agglomerans* (gb|AAA24823.1|). Deze tool ontdekt nieuwe motieven (terugkerende patronen met vaste lengte) die geen gaps vertonen in proteïnesequenties. Daarbij splitst het, de patronen van variabele lengtes op in meerdere afzonderlijke motieven. In de data submission form van de MEME-tool werd als eerste “Normal mode” geselecteerd als het type van motif discovery. Hierna werd de aminozuursequentie van het INP in de query box ingebracht. Bij

site distribution werd aangegeven dat de motieven meerdere malen in de sequentie kunnen voorkomen. Hierna werd aangegeven dat de tool moet zoeken naar vijf motieven om een onderscheid te kunnen maken tussen de vier subdomeinen en het N- en C-terminaal uiteinde. Ten slotte werd onder "Advanced options" aangeduid dat het motief een lengte heeft van exact 48 aminozuren.

3.4 Isolatie en opzuivering van DNA

3.4.1 Isolatie van genomisch DNA

Het genomische DNA van alle bacteriële stammen werd geïsoleerd aan de hand van een fenol-chloroform extractie. Voor elk staal werd een 2 ml microcentrifuge tube voorbereid. Hieraan werden glazen beads toegevoegd voor de mechanische lysis. Er werden ongeveer 75 µl beads van 212-300 µm diameter (Sigma) toegevoegd en vijf beads (Sigma) van 3 mm. Aan dit geheel werd telkens 300 µl lysisbuffer (2,5 M LiCl; 50 mM Tris HCl op pH 8,0; 4% Triton X-100; 62,4 mM Na₂-EDTA op pH 8,0) toegevoegd. Dit zorgde voor de chemische lysis van de cellen. Aan elke tube werd aseptisch met een entnaald enkele kolonies toegevoegd aan de inhoud van de microcentrifuge tube. Ten slotte werd hieraan 300 µl van een fenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)-oplossing toegevoegd. Na de homogenisatie met Precellys®24 voor 20 seconden bij 5500 rpm en centrifugatie (5 minuten bij 10000 rpm) werd ongeveer 250 µl van de bovenste waterlaag overgebracht in een Eppendorf tube van 1,5 ml. Aan dit supernatans werden twee volumes koude 100% ethanol (-20°C) toegevoegd. Dit werd voor minstens 15 minuten bij -20°C geplaatst om het DNA te laten neerslaan. Na centrifugatie en verwijdering van het supernatans werd het DNA gewassen met 70 % ethanol (-20°C). Ten slotte werd deze DNA-pellet gedroogd aan de lucht en opgelost in 50 µl 10 mM Tris pH 8,0.

3.4.2 Isolatie van plasmide DNA

De extractie van plasmide DNA werd uitgevoerd aan de hand van een QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Allereerst werden de gewenste cellen overnacht schuddend opgegroeid in LB-medium bij 37°C. Na het oogsten van de bacteriële cellen aan de hand van centrifugatie, werden de cellen gelyseerd door middel van alkalische lysis. Na een neutralisatie werden de celresten afgezonderd door centrifugatie. Dit werd aangebracht op een QIAprep Spin Miniprep silica-kolom voor het binden van het DNA. Hierna werd de kolom gewassen voor het verwijderen van aanwezige

onzuiverheden. Ten slotte werd het zuivere plasmide DNA geëluëerd in 30 – 50 µl mQ water.

3.4.3 Opzuivering van een fragment uit gel

DNA-fragmenten werden geëxtraheerd uit gel aan de hand van QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Hierbij werd het uitgesneden stukje gel met DNA aangebracht in een volume QG-buffer (agarose oplosbuffer). Dit volume was drie maal het volume van het stukje gel (100 mg ~ 100 µl). Dit geheel werd geïncubeerd bij 50°C totdat de gel volledig opgelost was. Hieraan werd één gelvolume isopropanol toegevoegd en het DNA werd gebonden op een QIAquick opzuiveringskolom met een silicamembraan. Hierna werd het DNA achtereenvolgens gewassen met QG-buffer en PE-buffer (wasbuffer met ethanol). Ten slotte werd het DNA geëluëerd met 30 µl mQ water.

3.4.4 Opzuivering van een fragment via ethanol precipitatie

Aan het op te zuiveren DNA-staal werd eerst 1/10 volume van 3 M natriumacetaat pH 5,2 toegevoegd om een geschikte zoutconcentratie van 0,3 M te bekomen. Hieraan werd vervolgens twee volumes koude 100% ethanol (-20°C) aan toegevoegd. Dit werd voor minstens 15 minuten bij -20°C geplaatst om het DNA te laten neerslaan. Het DNA werd afgezonderd door middel van centrifugatie en het supernatans werd verwijderd. Hierna werd het DNA gewassen met koude 70% ethanol (-20°C) en werd de DNA-pellet gedroogd aan de lucht. Ten slotte werd het DNA opgelost in 30 µl mQ water.

3.4.5 Bepaling van DNA concentratie

De DNA concentratie werd gemeten aan de hand van NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific). Dit toestel meet aan de hand van kleine volumes (1 – 2 µl) staal, de concentratie aan DNA door middel van UV-VIS spectrofotometrie. Allereerst wordt de vloeistof, die gebruikt wordt om het DNA op te lossen, gemeten als blanco. Daarna meet de Nanodrop ND-1000 de absorbantie bij 260 nm en 280 nm. Hieruit wordt de DNA-concentratie in ng/µl gemeten en kan de zuiverheid van het DNA worden bepaald.

3.5 Polymerase chain reaction (PCR)

3.5.1 Amplificatie van doelwitgen voor *ina*-detectie

Voor de screening naar de aanwezigheid van *ina*-genen werd een PCR-mengsel aangemaakt, bestaande uit 1x Titanium Taq PCR buffer (Clontech), 0,15 mM van elke dNTP (Invitrogen), 0,5 µM forward primer (IDT), 0,5 µM reverse primer (IDT), 1x Titanium Taq DNA polymerase (Clontech), 5 ng/µl template DNA en mQ water tot een eindvolume van 20 µl. De lijst van gebruikte primers is weergegeven in Tabel 4. Als negatieve controle werd mQ water toegevoegd in plaats van template DNA. In het geval van een kolonie PCR werd er geen verdund DNA-staal toegevoegd, maar werden opgepikte kolonies rechtstreeks aan het reactiemengsel toegevoegd. Deze bereide oplossingen werden in een T100 Thermal cycler (Biorad) geplaatst en het juiste PCR-programma werd ingesteld (Tabel 5).

Tabel 4: Gebruikte primers met hun sequentie, smelttemperatuur, targetgen waarop ze binden en bron. De onderlijning wijst op de aanwezigheid van een *EcoRI* of een *XhoI* restrictiesite in de primer.

Primer	Sequentie (5' → 3')	T _m (°C)	Target gen	Bron
3076F	AGYTCGCTGATTGCGGGNC	60,9	<i>ina</i>	Hill <i>et al.</i> (2014)
3308F	GGCGATMGVAGCAAactsac	56,8	<i>ina</i>	Hill <i>et al.</i> (2014)
3463R	STGTAVCKTTTNCCGTCCCA	56,5	<i>ina</i>	Hill <i>et al.</i> (2014)
<i>inaZF</i>	GCAGACTGCGGGTTATGAGAGC	60,2	<i>inaZ</i>	Nejad <i>et al.</i> (2006)
<i>inaZR</i>	CGCCGGTCAGTTTGCTTCTATC	58,3	<i>inaZ</i>	Nejad <i>et al.</i> (2006)
<i>inaWF</i>	GCAGTACGCAGACGGCACAG	57,7	<i>inaW</i>	Nejad <i>et al.</i> (2006)
<i>inaWR</i>	TTTCGTAGCCAGCAGTTGATGTG	61,1	<i>inaW</i>	Nejad <i>et al.</i> (2006)
HRE-INP-FW1	NCGAATTCGAAAGAGGAGAAATACTAGATG	56,6	<i>inaZ</i>	Dit werk
HRE-INP-Rev1	AGCTCGAGCTTTACCTCTATCCAGTCATCG	62,1	<i>inaZ</i>	Dit werk

Tabel 5: PCR-programma.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Aantal cycli
Initiële denaturatie	94	2 min	x1
Denaturatie	94	45 sec	x34
Annealing	58 - 64	45 sec	
Extensie	72	45 sec	
Finale Extensie	72	10 min	x1
Hold	10	∞	x1

De annealingtemperatuur die in het PCR-programma werd ingesteld, was afhankelijk van het primerpaar dat gebruikt werd. Voor het 3076F-3463R primerpaar werd een annealingtemperatuur van 58°C gebruikt. Met het 3308F-3463R primerpaar werd enkel een gradiënt PCR tussen 54°C – 64°C uitgevoerd. Voor het *inaZF-inaZR* primerpaar werd een annealingtemperatuur van 64°C gebruikt. Voor *inaWF – inaWR* werd 63,5°C genomen.

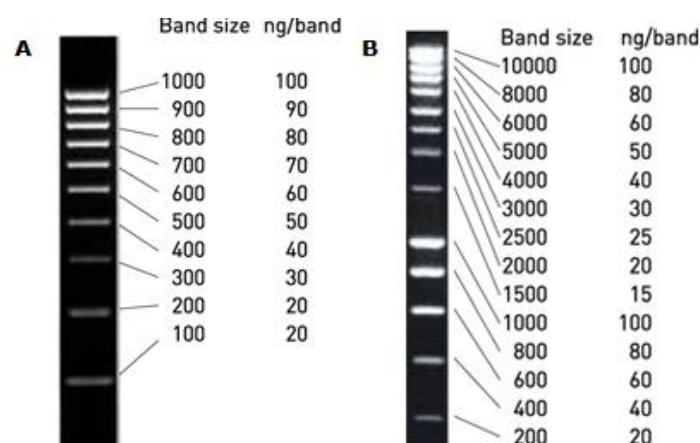
Voor kloneringsdoeleinden werd het volledige *inaZ*-gen uit BBa_K584027 geamplificeerd met de primers HRE-INP-FW1 en HRE-INP-Rev1. Hiervoor werd een PCR-mastermix aangemaakt bestaande uit 2x Platinum *Pfx* amplification buffer (Invitrogen), 0,30 mM van elke dNTP (Invitrogen), 0,3 µM forward primer (IDT), 0,3 µM reverse primer (IDT), 1 unit Platinum *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen), 2x enhancer-oplossing (Invitrogen), 1 mM MgSO₄-oplossing (Invitrogen), 5 ng/µl template DNA en mQ water tot een eindvolume van 20 µl. Als template werd er gebruik gemaakt van een geknipt en hitte geïnactiveerd BBa_K584027 fragment. Als negatieve controle werd mQ water toegevoegd in plaats van template DNA. Deze bereide oplossingen werden in een T100 Thermal cycler (Biorad) geplaatst en het juist PCR-programma werd ingesteld (Tabel 6). Hierbij werd een annealingtijd genomen van 4 minuten (~1 min per 1000 bp) om het relatief grote fragment van 3635 bp te kunnen amplificeren.

Tabel 6: PCR-programma.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	Aantal cycli
Initiële denaturatie	94	2 min	x1
Denaturatie	94	45 sec	x34
Annealing	62	45 sec	
Extensie	68	4 min	
Finale Extensie	68	10 min	x1
Hold	10	∞	x1

3.6 Agarosegelelektroforese

Afhankelijk van de grootte van het DNA-fragment dat werd gevisualiseerd, werd een 1% of 1,5% (w/v) agarosegel gebruikt. Een 1,5% agarosegel werd bereid in een volume van 150 ml 1x TAE-buffer (40 mM Tris, 20 mM azijnzuur, 1 mM EDTA). Aan de geloplossing werd 4,5 μ l van 10 mg/ml ethidiumbromide (EtBr) toegevoegd. De gel voor ongeveer 30 minuten gestold in een tray voorzien van een kam om de wells te vormen. Om de elektroforese uit te voeren werd de tray met de gel in een elektroforese-tank geplaatst. Aan de DNA-stalen (20 μ l) werd telkens 4 μ l 6x loading-dye (30% (v/v) glycerol, 0,25% (w/v) bromofenolblauw) toegevoegd. Van deze stalen werd 5 μ l - 24 μ l geladen afhankelijk van de gewenste hoeveelheid. Als referentiemerker werd er 5 μ l SmartLadder small fragments (Eurogentec, figuur 12A) of SmartLadder (Eurogentec, figuur 12B) toegevoegd. De elektroforese werd uitgevoerd bij een spanning van 135 V (max. 200 mA) voor 1 uur. Het DNA in gel werd door middel van het EtBr gevisualiseerd met Epi Chemi II darkroom (UVP) en Labworks.



Figuur 12: Groottes en concentraties van de DNA fragmenten in de SmartLadder small fragments (**A**) en SmartLadder (**B**) die gebruikt werden als referentiemerker.²

3.7 SDS-PAGE

Sodium DodecylSulfaat PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) is een courant gebruikte techniek voor het scheiden van proteïnen. In deze techniek worden proteïnen gedenateerd door middel van hoge temperatuur en een reducerend agens, β -mercapto-ethanol. Het aanwezige SDS in de gel bindt met de

² <https://secure.eurogentec.com/product/research-smartladder.html>

<https://secure.eurogentec.com/product/research-smartladder-sf.html?country=usa>

proteïnen waardoor deze een negatieve lading krijgen. Hierdoor kunnen de proteïnen onafhankelijk van hun netto lading gescheiden worden op basis van hun moleculair gewicht. Dit verloopt meestal via een discontinu buffersysteem. Hierbij worden de stalen in een stacking gel geconcentreerd tot een fijne band, om daarna de eigenlijke scheiding uit te voeren in een scheidende gel.

3.7.1 Bereiding van de polyacrylamide gels

Voor het scheiden van de proteïnen werd 20 ml van een 10% scheidende gel aangemaakt. De reagentia voor één scheidende gel zijn weergegeven in Tabel 7. Nadat de volumes TEMED en 10% APS aan het geheel werden toegevoegd werd de polymeriserende gel in de gietskassette aangebracht. Hierop werd een hoeveelheid isobutanol aangebracht voor het creëren van een recht gelfront, het verwijderen van luchtballen en voor het afsluiten van de gel van de buitenlucht. Dit geheel werd gepolymeriseerd gedurende 45 minuten. Hierna werd 5 ml van een 4% stacking gel bereid. De reagentia voor één stacking gel zijn eveneens weergegeven in Tabel 7.

Tabel 7: Reagentia voor de bereiding van 10 ml 10% scheidende gel en 2,5 ml 4% stacking gel.

Reagens	Volume [scheidende gel]	Volume [stacking gel]
30% Acrylamide/Bisacrylamide 37,5:1	3,33 ml	330 µl
10% SDS	100 µl	25 µl
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	625 µl
mQ water	3,93 ml	1,5 ml
TEMED	5 µl	2,5 µl
10% Amonium persulfaat (APS)	100 µl	25 µl

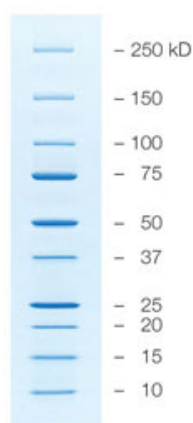
De stacking gel werd aangebracht bovenop de gepolymeriseerde, scheidende gel en er werd een kam geplaatst tussen de glasplaten voor het vormen van de wells. De gel werd gepolymeriseerd gedurende 45 minuten. Hierna werd de kam verwijderd en de gel gereinigd met gedemineraliseerd water.

3.7.2 Staalvoorbereiding

De te scheiden stalen werden op twee verschillende manieren voorbereid. In een eerste stap werden voor alle stalen de cellen geoogst door deze te centrifugeren bij 5000 rpm voor 5 minuten. Het supernatans werd verwijderd. In de eerste voorbereidingsmethode werd 50 µl Bacterial Protein Extraction Reagent (B-PER) (Thermoscientific) toegevoegd per 1000 µl afgecentrifugeerde cultuur. B-PER is een niet-ionische, detergent gebaseerde oplossing voor het lyseren van de cellen en het oplossen van de aanwezige proteïnen (Thermo Fisher Scientific, 2015). Bij de tweede voorbereidingsmethode werden de cellen geresuspendeerd in 50 µl 50 mM Tris pH 8,0. Hierna werd aan alle stalen van beide voorbereidmethoden 50 µl ladingsbuffer (47,5 µl Native Sample Buffer (Biorad), 2,5 µl β-mercapto-ethanol) toegevoegd. De stalen werden vervolgens 4 minuten bij 100°C geplaatst voor cellysis en denaturatie van de proteïnen.

3.7.3 Elektroforese

De glasplaten met de gels werden in het elektroforeseapparaat geplaatst. Het apparaat en het reservoir tussen de glasplaten werd gevuld met de gewenste hoeveelheid elektroforesebuffer (25 mM Tris, 192 mM glycine (Biorad), 0,1% SDS). In de wells werd telkens 25 µl staal aangebracht. Als referentiemerker werd 20 µl van ongekleurde Precision Plus Protein™ Standards (Biorad) (Figuur 13) aan telkens één well van elke gel toegevoegd. De gel werd gerund voor 45 min bij 200 V (max. 60 mA).



Figuur 13: Groottes van de proteïne fragmenten in Precision Plus Protein™ Standards (Biorad) referentiemerker.³

³ <http://www.bio-rad.com/en-mx/sku/161-0363-precision-plus-protein-unstained-standards>

3.7.4 Kleuring

Na elektroforese werd de gel gekleurd aan de hand van een Coommasie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) kleuroplossing (225 ml water, 225 ml methanol, 50 ml azijnzuur, 1 g CBB R-250). De gel werd voor 30 minuten in de kleuroplossing ondergedompeld op een traag bewegende schudplaat. Hierna werd de gel ontkleurd door de gel onder te dompelen in een ontkleuringsoplossing (240 ml water, 225 ml methanol, 35 ml azijnzuur) op een traag bewegende schudplaat. Na 15 minuten werd de ontkleuringsoplossing vervangen. Na een verdere ontkleuring van 30 minuten werd de oplossing opnieuw vervangen. Hierna werd de gel bewaard in een plastic map.

3.8 *Standaard moleculaire technieken*

Restrictiereacties werden uitgevoerd in een totaal volume van 20 µl met restrictie-enzymen (NEBiolabs) volgens de richtlijnen van de fabrikant. Voor dubbeldigesten *NheI/PstI* en *EcoRI/XhoI* werd telkens de meest optimale buffer gekozen, i.e. NEBuffer 2.1 voor beide digesten. Het restrictiemengsel van de vectoren bevatte telkens 1000 ng DNA. De digest oplossingen werden voor de knipreactie voor 1,5 – 2 uur geïncubeerd bij 37°C. Indien nodig werd een hitte inactivatie uitgevoerd door de restrictie digest voor 20 minuten te incuberen bij 65°C.

Voor de ligatiereacties werd gebruik gemaakt van het T4 DNA ligase (NEBiolabs) volgens de richtlijnen van de fabrikant. Het ligatiemengsel bevatte steeds 190 ng – 550 ng DNA met een vector/insert verhouding van 1/2, 1/3 of 1/5 in een totaal volume van 20 µl of 30 µl. Als controle werd een ligatiemengsel aangemaakt met enkel opengeknipt vector DNA. Deze oplossingen werden voor 16 uur geïncubeerd bij 16°C. Voor extra ligase-activiteit werd na deze incubatie de ligatie-oplossing 1 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur.

3.9 *Transformatie*

E. coli TOP10 of *E. coli* BL21 werden eerst competent gemaakt aan de hand van een calciumchloride protocol. Hierbij werd 1 ml overnacht cultuur van de cellen geïnoculeerd in 50 ml LB-medium. Dit werd voor 2-3 uur schuddend geïncubeerd bij 37°C tot een optische densiteit (OD_{600nm}) van 0,2 – 0,4 ($2-5 \times 10^8$ cellen/ml) bereikt werd. De cellen werden geoogst door 10 minuten te centrifugeren bij 6000 rpm. De cellen werden geresuspendeerd in 10 ml steriel, koud 0,1 M $CaCl_2$ en voor 10 minuten op ijs geplaatst. De cellen werden opnieuw geoogst en

geresuspendeerd in 2 ml steriel, koud 0,1 M CaCl₂. Deze competente cellen werden bewaard bij -80°C (LB-medium, 25% glycerol) tot gebruik.

Voor de transformatie werden de competente *E. coli* TOP10 en *E. coli* BL21 cellen ontdooid op ijs. Aan 100 µl competente cellen werd 5 µl ligatiemengsel toegevoegd. Vervolgens werden de cellen 30 minuten op ijs geïncubeerd met het DNA. Hierna ondergingen de cellen een heat-shock door 2 minuten incubatie bij 37°C. Daarna werden de cellen 5 minuten terug op ijs geplaatst. Ten slotte werd aan de cellen 900 µl LB-medium toegevoegd en werden ze minstens 1 uur schuddend geïncubeerd bij 37°C. Als controle werd er eveneens een transformatie van de cellen uitgevoerd met ongeknipt vector DNA. Van elke transformatie werd 200 µl en 100 µl uitgeplaat op LB-medium met ampicilline (100 µg/ml) voor vectoren gebaseerd op pPro24 en met kanamycine (50 µg/ml) voor vectoren gebaseerd op pET24.

3.10 Sequencing

Plasmide DNA-stalen van getransformeerde klonen werden opgestuurd naar Macrogen voor sequencing ter controle van de klonering. Hiervoor werd 20 µl DNA van het pPro24 - *inaZ* of pET24 - *inaZ* construct (~100 ng/µl) opgestuurd. De gewenste primers voor sequencing werden opgegeven voor sequencing van 5' en 3' uiteindes van het insert. Hiervoor werd gebruik gemaakt van pPro forward (5'-CTGAAACGTAACTGAAACGC-3'), pBad rev (5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'), voor vectoren gebaseerd op pPro24 en pET-24a (5'-GGGTTATGCTAGTT ATTGCTCAG-3'), T7 promoter primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') voor vectoren gebaseerd op pET24. De stalen werden gesequeneerd aan de hand van de Sanger dideoxy chain termination methode.

3.11 Ice Nucleation Activity assays

Het testen van de ijsvormingactiviteit bij een gewenste temperatuur werd uitgevoerd op twee verschillende manieren. Om de resultaten van deze PCR-screening te bevestigen, werden de stammen in TSB medium overnacht opgegroeid. Deze cellen werden vervolgens geoogst door ze 5 minuten te centrifugeren bij 5000 rpm. Vervolgens werden ze gewassen in fysiologisch water (0,9% NaCl). Daarna werden de cellen opnieuw geoogst en geresuspendeerd in fysiologisch water. Hiervan werd 100 – 300 µl toegevoegd aan een proefbuis met 5 ml gedemineraliseerd water, die geplaatst werd in het koelbad bij een bepaalde temperatuur. In een tweede wijze, voor de semi-kwantitatieve bepaling van de INA werden initieel alle celsuspensies op eenzelfde OD_{600nm} van 0,200 gebracht. Hierna

werd van deze stammen een seriële 1 op 4 verdunningsreeks aangemaakt. Hiervoor werden eerst zeven verdunningen en een blanco gemaakt bestaande uit medium. Van deze verdunningen werden in drievoud druppels van 10 µl aangebracht op het deksel van een microtiterplaat. Deze plaat werd vervolgens op een koelbad geplaatst bij een temperatuur van -8°C. Na 10 minuten werd visueel waargenomen hoeveel druppels bevroren waren bij elke verdunning. Indien er ijsvorming bij elke verdunning optrad, werd een verdere seriële verdunningsreeks aangemaakt. Deze methode is gebaseerd op de droplet freezing assay beschreven door Vali *et al.* (1971) en Lindow *et al.* (1978).

Voor deze INA assays werd gebruik gemaakt van een koelbad met 50% ethyleenglycol als koelvloeistof. Deze koelvloeistof werd door middel van een Polyscience Recirculating Chiller 6000 op temperatuur gebracht en gecirculeerd in een open systeem. Hierbij werd een vast volume koelvloeistof gekoeld tot een gewenste temperatuur en continue aan- en afgevoerd in een open koelbad, waardoor een constant volume behouden werd in het koelbad. Op deze manier konden stabiel temperaturen aangehouden worden tussen -10°C en 0°C, voor het uitvoeren van de activiteitstesten. De temperatuur in het koelbad werd gemeten en gecontroleerd aan de hand van een PicoScope USB TC-08 thermokoppel.

4 Resultaten & discussie

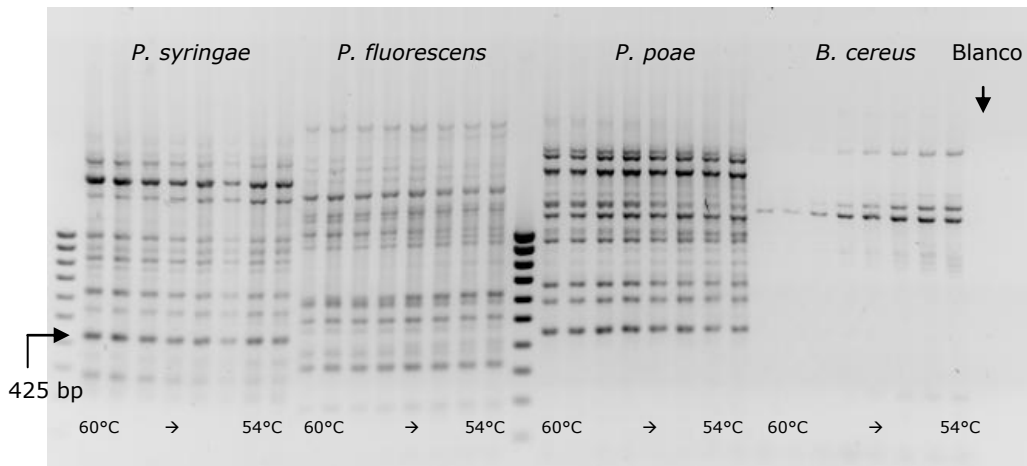
4.1 Screening naar bacteriën met Ice Nucleation Activity

Uit de literatuur blijkt dat INA-bacteriën vooral terug te vinden zijn in de genera *Pseudomonas*, *Xanthomonas* en *Pantoea*, maar niet alle INA-bacteriën vertonen activiteit bij dezelfde temperatuur. Daarom werd in een eerste deel van deze masterproef de eigen cultuurcollectie gescreend op de aanwezigheid van bacteriën met INA. De focus lag hierbij op bacteriën van de hoger genoemde genera. Deze screening gebeurde zowel op moleculair niveau met behulp van een PCR voor de detectie van *ina*-genen, als met een INA assay.

4.1.1 Detectie van *ina*-genen met behulp van PCR

Hill *et al.* (2014) ontwikkelden universele primers voor de detectie van *ina*-genen op basis van geconserveerde gebieden in subdomein vier van het *ina*-gen. In een eerste stap werd de universele screening via PCR aan de hand van het 3076F – 3463R primerpaar (Hill *et al.*, 2014) geoptimaliseerd. Hiervoor werden in het begin verschillende gradiënt PCR's uitgevoerd voor de optimalisatie van de annealingtemperatuur. Deze gradiënt PCR's werden uitgevoerd met een annealingtemperatuur gaande van 54°C tot 64°C en van 54°C tot 60°C op DNA-stalen van de stammen *P. fluorescens* (ST14.12/003), een *Pseudomonas poae* ST12.14/526) en *P. syringae* (ST14.12/036). Doordat nog geen DNA van een gekende INA-bacterie ter beschikking was, werd geen positieve controle meegenomen. Als negatieve controle werd het DNA-staal van *Bacillus cereus* (ST10.09/026) meegenomen. Deze werd gekozen omdat deze stam geen nauwe verwantschap heeft met de INA-bacteriën. Een voorbeeld van een resultaat van dergelijke gradiënt PCR is weergegeven in Figuur 14.

Het gebruikte primerpaar moest het gewenste fragment met een grootte van 425 bp amplificeren (Hill *et al.*, 2014). Een fragment van deze grootte was terug te vinden bij *P. syringae*. Voor *P. poae* werd een fragment van ongeveer dezelfde grootte gedetecteerd. Voor *P. fluorescens* en de negatieve controle *B. cereus* werd het doelwitfragment niet geamplificeerd. Daarnaast is in Figuur 14 te zien dat de reactie zeer specifiek was. Daarbij werd er zelfs amplificatie waargenomen bij *B. cereus*, die geen nauwe verwantschap vertoont met INA-bacteriën.



Figuur 14: Gradient PCR voor de amplificatie van het *ina*-fragment met een annealingtemperatuur gaande van 54°C – 60°C met het universele primerpaar 3046F – 3463R op DNA van *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. poae* en *B. cereus*.

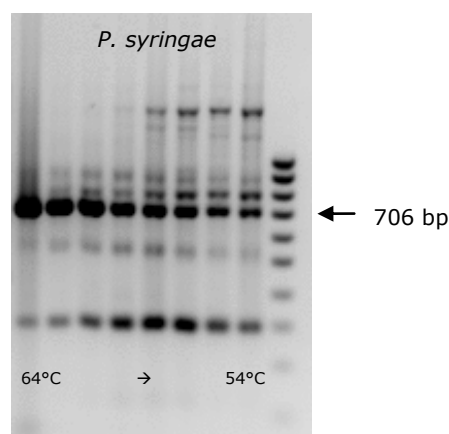
Om de aspecifieke amplificatie te reduceren, werd de annealingtemperatuur verder verhoogd tot 64°C, maar dit zorgde niet voor een verbetering van de specificiteit van de reactie (data niet getoond). Om de specificiteit van deze universele PCR te verhogen werden ook een aantal andere parameters in de PCR-reactie gewijzigd. Zo werd een gradiënt PCR uitgevoerd met andere polymerase enzymen (Ex Taq Polymerase (Clontech), GoTaq DNA Polymerase (Promega)), 5% DMSO werd toegevoegd aan de reactiemengsels en kortere denaturatie- en elongatietijden werden ingesteld, maar telkens zonder het gewenste resultaat. Daarom werd de specificiteit van de gebruikte primers *in silico* nagegaan. Het 3076F – 3463R primerpaar is een gedegenereerd primerpaar dat rekening houdt met de intersoortelijke variatie van de *ina*-genen. Uit het *in silico* onderzoek op nucleotidesequenties van het *inaZ* en *inaW* bleek dat deze primers slechts in beperkte mate overeenkomen met de nucleotidesequenties van de *ina*-genen. Dit verklaart waarom de wijziging van de annealingtemperatuur niet zorgde voor een duidelijkere en specifiekere reactie. Daarnaast kon uit het *in silico* onderzoek afgeleid worden dat specifieke delen van de primers op verschillende plaatsen terug kwamen in de *ina*-genen. De combinatie van de degeneratie van de primers en het repetitief karakter van de *ina*-genen zorgde ervoor dat de primers konden binden op meerdere plaatsen in het gen. Dit verklaart het groot aantal geamplificeerde fragmenten in de uitgevoerde PCR-reacties. Om toch een idee te krijgen van mogelijke kandidaten van INA-bacteriën werd toch een universele detectie uitgevoerd op alle *P. syringae*, *Pseudomonas spp.* en *P. agglomerans*. De test was echter niet bruikbaar omdat door de aspecificiteit van de reactie, niet met zekerheid het gewenste fragment kon worden gedetecteerd.

Volgens de studie van Hill *et al.* (2014) is het mogelijk om een specifieke amplificatie in qPCR te krijgen met het universele primerpaar 3308F – 3463R. Daarom werd er een gradiënt PCR met dit universele primerpaar uitgevoerd. In tegenstelling van wat aangegeven werd door Hill *et al.* (2014), leverde dit primerpaar geen specifieke amplificatie op. Dit is eventueel te verklaren door een verschillend polymerase enzyme en een andere template DNA-concentratie die gebruikt werden in de reactie. Daarbij werd het genomische DNA op een andere wijze geëxtraheerd. Doordat in deze studie geen specifieke amplificatie van één fragment via PCR bekomen kon worden met beide universele primerparen, was het niet mogelijk om een universele detectie van *ina*-genen uit te voeren op de cultuurcollectie. Daarom werd overgestapt van een universele PCR naar een soortspecifieke PCR voor de detectie van *ina*-genen.

4.1.2 Soortspecifieke detectie van *ina*-genen

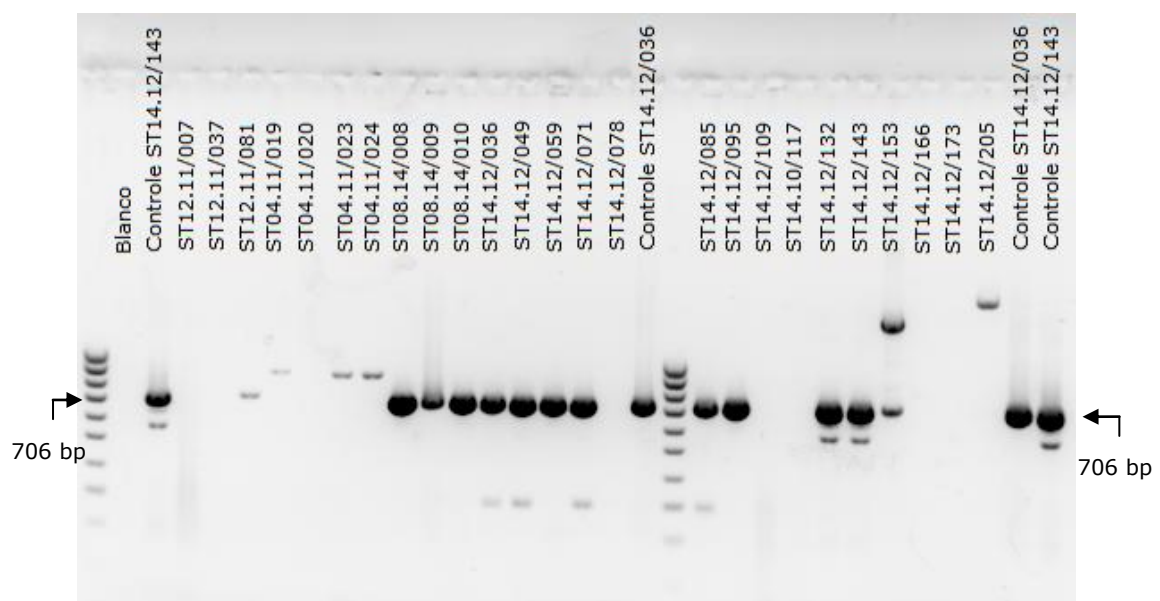
4.1.2.1 *P. syringae* en *Pseudomonas spp.*

In eerste instantie werd de detectie van *inaZ* in *P. syringae* geoptimaliseerd. Uit *in silico* onderzoek op nucleotidesequenties van *inaZ*-genen bleek dat het primerpaar *inaZF* – *inaZR* zorgt voor de amplificatie van een fragment met een grootte van 706 bp. Hieruit bleek eveneens dat deze primers voor de meeste, maar niet alle, *inaZ*-genen exact overeen kwam met de gensequenties. Aan de hand van dit primerpaar werd eerst een gradiënt PCR uitgevoerd op het DNA-staal van *P. syringae* (ST14.12/036) voor optimalisatie van de annealingtemperatuur (Figuur 15). Hierbij werd de annealingtemperatuur gevarieerd van 54°C tot 64°C. De *P. syringae* (ST14.12/036) stam werd hier gekozen omdat deze in de universele PCR een fragment gaf van de verwachte grootte.



Figuur 15: Gradient PCR voor de amplificatie van het *inaZ*-fragment met een annealingtemperatuur gaande van 54°C – 64°C met het primerpaar *inaZF* – *inaZR* op het DNA-staal van *P. syringae* (ST14.12/036).

Uit Figuur 15 blijkt duidelijk dat de reactie eveneens niet specifiek was bij lagere annealingtemperaturen. Toch was deze reactie duidelijk meer specifiek in vergelijking met de universele primers. De meest specifieke reactie werd verkregen bij een annealingtemperatuur van 64°C. Bij deze temperatuur werd er met de ST14.12/036 stam wel nog een vaag aspecifiek fragment geamplificeerd ter hoogte van 200 bp. Eveneens was de amplificatie van het gewenste fragment het hoogst bij deze annealingtemperatuur. Dit valt af te leiden uit de hogere intensiteit van het geamplificeerde fragment. Hierdoor werd de geoptimaliseerde annealingtemperatuur vastgelegd op 64°C. Vervolgens werd de rest van de *P. syringae* en *Pseudomonas spp.* uit de PME-BIM cultuurcollectie (PME-BIM, KULeuven) gescreend met het geoptimaliseerde protocol voor detectie van *ina*-genen. Een voorbeeld van een resultaat hiervan is weergegeven in Figuur 16. Hierbij werden de DNA-stalen van de *P. syringae* (ST14.12/036) en *P. syringae* (ST14.12/143) stammen gebruikt als positieve controle omdat deze uit vorige screenings met de universele primers vermoedelijk positief testten op de aanwezigheid van het *ina*-gen.



Figuur 16: PCR detectie van *ina*-genen in *P. syringae* en *Pseudomonas spp.* stammen met het *ina*ZF – *ina*ZR primerpaar.

Als eerste valt op te merken dat de specificiteit van de PCR-reactie voldoende hoog is om de mogelijke aanwezigheid van het *ina*-gen te detecteren. De positieve stammen geven een duidelijk, zeer intens geamplificeerd fragment ter hoogte van 706 bp. In Figuur 16 is ook te zien dat de stam ST12.11/081 een minder intens PCR-fragment vertoont in vergelijking met andere positieve stammen. Dit wijst er op dat deze stam mogelijk positief is. De lagere intensiteit kan het gevolg zijn van

een slechtere amplificatie door fenol-contaminatie van het DNA-staal of door moeilijkere annealing van de primers door mutaties in de annealingsite. Ondanks het feit dat meeste stammen een specifieke amplificatie opleveren van het gewenste fragment, zijn er toch bij enkele stammen aspecifieke fragmenten waar te nemen, die niet wijzen op de aanwezigheid van het *inaZ*. Hierbij werd bij enkele negatieve stammen zoals ST04.11/019, ST04.11/023, ST04.11/024 en ST14.12/205 een ongewenst fragment gedetecteerd. Sommige positieve stammen vertonen naast de amplificatie van het doelwitfragment, eveneens een aspecifiek fragment dat kleiner of groter is dan het doelwitfragment. Toch was het met deze reactie mogelijk om de aanwezige *P. syringae* en *Pseudomonas spp.* specifiek te screenen op de aanwezigheid van het *inaZ*. De resultaten van deze screening zijn opgelijst in Tabel 8.

Om de resultaten van deze PCR-screening te bevestigen werden met alle geteste stammen een INA assay uitgevoerd. Hiervoor werd 100 – 300 µl van de gewassen celsuspensies toegevoegd aan proefbuizen met 5 ml gedemineraliseerd water bij een bepaalde temperatuur in het koelbad. Optimaal zouden de assays uitgevoerd moeten geweest zijn bij -7°C of lager om ijsvorming door de drie types nucleï mogelijk te maken. Bij temperaturen tussen de -5°C en -7°C kunnen enkel de types I en II nucleï zorgen voor ijsvorming. Door technische problemen met de koelinstallatie en tijdsgebrek was het niet mogelijk om alle stammen te kunnen testen bij een temperatuur lager dan -7°C. De resultaten van de INA assays op de *P. syringae* en *Pseudomonas spp.* stammen zijn opgelijst in Tabel 8.

Tabel 8: Resultaten van de PCR-screening op de aanwezigheid van *inaZ* in *P. syringae* en *Pseudomonas spp.* en de resultaten van de INA assays. Hierbij wordt de testtemperatuur en getest volume celsuspensie weergegeven. + wijst op de waarneming van ijsvorming en - wijst op de afwezigheid van ijsvorming.

Soort	STRI nummer	PCR (<i>inaZ</i>)	Ijs- vorming	Testvolume	Temp.
<i>P. syringae</i>					
<i>P. syringae</i> strain NW-17	ST12.11/037	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> NW-17	ST12.11/081	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>P. syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/019	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/020	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>P. syringae</i> pv. <i>porri</i>	ST04.11/023	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>P. syringae</i> pv. <i>Porri</i>	ST04.11/024	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>P. syringae</i> (cit7)	ST08.14/008	+	+	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> (31R1)	ST08.14/009	+	+	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> (citDel1b)	ST08.14/010	+	-	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> KFB 68	ST14.12/036	+	+	100 & 300 µl	-8°C

<i>P. syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/049	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> M209	ST14.12/059	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> NBRC 14076	ST14.12/071	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> NBRC 14077	ST14.12/078	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/085	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>p. syringae</i> PDD- 33b-2	ST14.12/095	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> KFB 86	ST14.12/109	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> IPpBC	ST14.12/117	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/132	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/143	+	+	100 & 300 µl	-8°C
<i>P. syringae</i> IPpBC	ST14.12/153	+	+	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. syringae</i> XJKEL-1	ST14.12/226	-	-	100 & 300 µl	-8°C
<i>Pseudomonas</i> spp.					
<i>Pseudomonas</i> sp.	ST12.11/007	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. BLH-11D4	ST14.12/020	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. S8Fb11	ST14.12/021	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGB410	ST14.12/028	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. Q16	ST14.12/029	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. WR7-41	ST14.12/031	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. E9	ST14.12/035	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. Fa3	ST14.12/043	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. PX7_S1	ST14.12/055	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. G62	ST14.12/062	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. YXE2-g	ST14.12/067	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. E9	ST14.12/069	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. PX7_S1	ST14.12/082	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. E9	ST14.12/084	+/-*	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>Pseudomonas</i> sp. R11-45-07	ST14.12/092	+/-*	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. Fa3	ST14.12/093	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. JM14 16S	ST14.12/097	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. PG-2010-28	ST14.12/100	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. JM14 16S	ST14.12/103	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. 4_C16_18	ST14.12/104	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. R4-30-08	ST14.12/146	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGB149	ST14.12/152	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. E9	ST14.12/155	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. ZBC1	ST14.12/161	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGB149	ST14.12/163	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp.	ST14.12/166	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C

<i>Pseudomonas</i> sp. G62	ST14.12/173	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SAP34_1	ST14.12/181	+/-*	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGb149	ST14.12/191	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. SGb149	ST14.12/204	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. Fa3	ST14.12/205	-	-	100 & 300 µl	-6,5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. PDD-32b-42	ST14.12/215	-	-	100 & 300 µl	-5°C
<i>Pseudomonas</i> sp. G62	ST14.12/229	+/-*	-	100 & 300 µl	-5°C

*Deze stammen testten mogelijks positief met de PCR-screening met een zeer licht geamplificeerd fragment ter hoogte van 706 bp.

Uit de resultaten in Tabel 8 blijkt dat alle stammen die een duidelijk PCR-product opleverden bij de soortspecifieke detectie van *ina*-genen, ook daadwerkelijk ijsvorming konden induceren, met uitzondering van Cit7del1b (ST08.14/010). Dit viel binnen de verwachtingen omdat deze stam een deletiemutant is van Cit7 (ST08.14/008). Cit7del1b vertoont een deletie in het *inaZ* waardoor deze geen actief INP meer kan produceren en dus ook geen nucleatie-activiteit meer vertoont (Buttner en Amy, 1989). In totaal werden er twaalf positieve *P. syringae* stammen gedetecteerd via PCR. Van elf hiervan werd de ijsnucleatie-activiteit bevestigd in de INA assay. De stammen die zorgden voor zeer weinig amplificatie van het doelwitfragment, waaronder ST14.12/084, konden geen ijsvorming induceren. Dit kan het gevolg zijn van het feit dat het geamplificeerde fragment in de screening geen *ina*-gen was en dat deze stammen dus geen INA-bacteriën zijn. Het kan echter ook het gevolg zijn van het feit dat deze stammen onder de geteste condities geen nucleatie-activiteit konden vertonen. Dit doordat de concentratie aan nucleï te laag was of dat de stammen slechts activiteit vertonen bij een lagere temperatuur. Dat geen enkele *Pseudomonas* spp. positief testte bij de PCR-screening en de INA assay, geeft aan dat deze stammen geen INA vertonen. Doordat deze stammen geen INA vertoonden werden deze niet meer meegenomen in een verdere screening met andere soortspecifieke primers.

Niettegenstaande de amplificatie van de aspecifieke fragmenten, bleek de PCR-screening met de *inaZF* – *inaZR* primers toch voldoende betrouwbaar om de aanwezigheid van *ina* te detecteren in *P. syringae*. Van alle stammen die een duidelijk PCR-product opleverden in deze detectie, kon de ijsnucleatie-activiteit bevestigd worden in de INA assays. Om zeker te kunnen zijn van de detectie is dus een bevestiging via een INA assay gewenst.

4.1.2.2 *P. fluorescens*

Vooraleer gestart kon worden met de optimalisatie van een *P. fluorescens*-specifieke PCR voor de detectie van *ina*-genen, werd de collectie gescreend op de aanwezigheid van *P. fluorescens* stammen met INA. Dit was noodzakelijk om een actieve *P. fluorescens* in de PCR optimalisatie mee te kunnen nemen als positieve controle. De ijsvormingactiviteit van de *P. fluorescens* stammen werd getest door een gewenste hoeveelheid cultuur toe te voegen aan 5 ml gedemineraliseerd water bij -10°C. De resultaten hiervan zijn weergegeven in Tabel 9. Uit deze resultaten bleek dat geen enkel van de aanwezige *P. fluorescens* in de cultuurcollectie activiteit vertoont bij de geteste omstandigheden. Dit geeft aan dat deze stammen vermoedelijk geen *inaW* bezitten. Dit viel binnen de verwachtingen vermits uit de literatuur volgt dat er slechts weinig actieve *P. fluorescens* werden geïdentificeerd. Dit wordt voor een deel aangetoond doordat slechts één *inaW* beschikbaar is in GenBank. Door de afwezigheid van een actieve *P. fluorescens* was het niet mogelijk om de PCR met de *inaWF* – *inaWR* primers te optimaliseren. Toch werd er een PCR uitgevoerd met deze primers om de eventueel actieve stammen mogelijk te kunnen identificeren. Uit *in silico* onderzoek op nucleotidesequenties van *inaW* werd bepaald dat het primerpaar zorgt voor de amplificatie van een fragment met een grootte van 506 bp. De resultaten van de PCR-reactie zijn eveneens weergegeven in Tabel 9.

Tabel 9: Resultaten van de PCR-screening op de aanwezigheid van *inaW* in *P. fluorescens* en de resultaten van de INA assay. Hierbij wordt de testtemperatuur en getest volume celsuspensie weergegeven.

Soort	STRI nummer	PCR (<i>inaW</i>)	Ijs-vorming	Testvolume	Temperatuur
<i>P. fluorescens</i>	ST12.11/005	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i> strain PW88	ST12.11/040	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i> F6	ST14.12/042	+/-*	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	ST14.12/003	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i> NBRC 15841	ST14.12/004	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i> KB6	ST14.12/165	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i> 12568	ST14.12/170	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i>	ST12.14/519	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i>	ST12.14/520	-	-	100 & 300 µl	-10°C
<i>P. fluorescens</i>	ST12.14/524	-	-	100 & 300 µl	-10°C

*Deze stam testte mogelijk positief met de PCR-screening met een zeer licht geamplificeerd fragment hoogte van 506 bp.

Slechts bij één stam van de *P. fluorescens* stammen werd het *inaW* doelwitfragment geamplificeerd. De stam zorgde echter nog voor de amplificatie van verschillende aspecifieke fragmenten. Uit de INA assay bleek dat deze stam zelfs geen nucleatie-activiteit vertoont bij -10°C. Bij dergelijk lage temperatuur geven ook type II en type III nucleï aanleiding tot de inductie van ijsnucleatie. Doordat dit niet waargenomen werd in deze INA assay, kan besloten worden dat deze stam vermoedelijk geen INA-bacterië is. Daarnaast kan de afwezigheid van activiteit bij deze stam het gevolg zijn van het feit dat deze stam geen INA vertoont onder de geteste condities. Het is mogelijk dat de *P. fluorescens* andere cultivatiecondities vereist om het INP tot expressie te brengen. Een te lage concentratie aan nucleï kon er eveneens voor gezorgd hebben dat deze stam geen ijsvorming kon induceren. Een andere mogelijkheid is dat deze stam een mutatie in het *ina*-gen bevat waardoor deze geen activiteit kan vertonen, maar wel kan zorgen voor de amplificatie van een fragment ter hoogte van 506 bp. Ten slotte is het ook mogelijk dat het geamplificeerde fragment niet afkomstig is van het *inaW*-gen, wat mogelijk is gezien de aspecificiteit van de PCR-detectie en de lage intensiteit van het geamplificeerde fragment.

4.1.2.3 *Xanthomonas spp.* en *P. agglomerans*

Doordat er geen gekende INA stam van *P. agglomerans* en *Xanthomonas spp.* ter beschikking was, werden de aanwezige stammen in de collectie eerst getest op ijsvormingactiviteit. De resultaten van deze test zijn weergegeven in Tabel 10 en Tabel 11, respectievelijk. Voor de stammen van *P. agglomerans* werd eveneens een PCR uitgevoerd aan de hand van de universele 3076F – 3463R primers, voor een eventuele identificatie van mogelijk positieve stammen. Deze resultaten zijn eveneens weergegeven in Tabel 10.

Geen enkel van de geteste *P. agglomerans* en *Xanthomonas* stammen vertoonden INA onder de geteste condities. De universele PCR op de *Pantoea* stammen leverde geen specifieke amplificatie op. Sommige stammen amplificeerden toch een fragment met een grootte van ongeveer 425 bp. De negatieve resultaten uit de INA assay gecombineerd met de aspecificiteit van de PCR-reactie, geeft aan dat deze fragmenten vermoedelijk niet afkomstig zijn van *ina*-genen. Volgens de literatuur behoren de INA-stammen voor *Xanthomonas* vooral tot *Xanthomonas campestris*. Desalniettemin testten geen van de aanwezige *Xanthomonas campestris* isolaten uit de cultuurcollectie positief volgens de INA assays.

Tabel 10: Resultaten van de screening via PCR met 3076F – 3463R op de aanwezigheid van *ina* in *P. agglomerans* en de resultaten van de INA assay. Hierbij wordt de testtemperatuur en getest volume celcultuur weergegeven.

Soort	STRI nummer	PCR (3076F-3463R)	Ijs-vorming	Test-volume	Temp.
<i>P. agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/001	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/002	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> HY 5080	ST14.12/024	+/-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> CJ-G-R2A5	ST14.12/046	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> Pag-1	ST14.12/074	+/-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/076	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> HY 5080	ST14.12/125	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> DSM 3493	ST14.12/131	+/-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> KB64	ST14.12/133	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> s KB64	ST14.12/142	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> LMG 2764	ST14.12/148	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> KB38	ST14.12/150	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> HY 5080	ST14.12/160	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> 1.2244	ST14.12/164	-	-	300 µl	-7°C
<i>P. agglomerans</i> CJ-G-R2A5	ST14.12/214	+/-	-	300 µl	-7°C

Tabel 11: Resultaten van de INA assay met *Xanthomonas* spp. Hierbij wordt de testtemperatuur en getest volume celcultuur weergegeven.

Soort	STRI nummer	Ijs-vorming	Testvolume	Temperatuur
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Armoraciae</i>	ST03.13/055	-	100 µl & 300 µl	-6°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestris</i>	ST03.13/056	-	100 µl & 300 µl	-6°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Pelargonii</i>	ST03.13/057	-	100 µl & 300 µl	-6°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Raphani</i>	ST03.13/058	-	100 µl & 300 µl	-6°C
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Vesicatoria</i>	ST03.13/059	-	100 µl & 300 µl	-7°C
<i>Xanthomonas fragariae</i>	ST03.13/060	-	100 µl & 300 µl	-7°C
<i>Xanthomonas gardneri</i>	ST03.13/061	-	100 µl & 300 µl	-6°C
<i>Xanthomonas hyacinthi</i>	ST03.13/062	-	100 µl & 300 µl	-6°C
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	ST03.13/063	-	100 µl & 300 µl	-7°C
<i>Xanthomonas pisi</i>	ST03.13/064	-	100 µl & 300 µl	-6°C

Het is duidelijk dat niet alle bacteriële stammen van de geteste genera INA-activiteit vertonen. In de screening van de mogelijk positieve kandidaten uit de cultuurcollectie werden elf actieve *P. syringae* stammen gedetecteerd. Hierdoor kon de soortspecifieke detectie van *inaZ* via PCR geoptimaliseerd worden. Andere soorten vertoonden geen INA waardoor verdere optimalisatie van soortspecifieke detectie niet mogelijk was. Over het algemeen was er een goede correlatie tussen de resultaten van de INA-assay en de resultaten van de soortspecifieke PCR-detectie.

4.2 Verdere evaluatie van de Ice Nucleation Activity van INA⁺-stammen

4.2.1 Invloed van incubatietemperatuur op INA

Deze test werd uitgevoerd om te bepalen vanaf welke temperatuur de verschillende positieve *P. syringae* stammen in staat zijn om ijsvorming te induceren onder verschillende groeiomstandigheden. Nemecek-marshall *et al.* (1993) geven aan dat een temperatuurschift naar een lagere temperatuur na opgroei van de stammen, zorgt voor de toename van het aantal type I nucleï. Daarom werd een deel van de cultuur van de overnacht opgegroeide stammen voor 1,5 uur geïncubeerd bij 15°C. Een ander deel werd overnacht geïncubeerd bij 4°C. Als controle werd de overnacht cultuur getest. Al deze stalen werden op dezelfde OD_{600nm} van 0,200 gebracht. Vervolgens werd van elke cultuur 300 µl toegevoegd aan tubes met 5 ml gedemineraliseerd water van -2°C. Dit zorgde voor geen enkele stam voor de inductie van ijsvorming. Vervolgens werden de stalen afgekoeld tot de temperaturen -2,5°C; -2,75°C; -3,0°C; -4,0°C; -5,0°C; -6°C en -7°C. Bij elke temperatuur werden de stalen minstens 10 minuten geïncubeerd vooraleer afgekoeld werd tot de volgende temperatuur. De hoogste temperatuur waarbij ijsvorming bij de verschillende stammen optrad werd bepaald en opgelijst in Tabel 12.

Tabel 12: Bepaling van de temperatuur waarbij ijsvorming optreedt door toevoeging van overnachtcultuur, overnachtcultuur 1,5 uur geïnduceerd bij 15°C en overnachtcultuur overnacht geïnduceerd bij 4°C aan supergekoeld, gedemineraliseerd water.

	Overnachtcultuur	1,5 uur incubatie bij 15°C	Overnacht inductie bij 4°C
ST08.14/008	-2,5°C	-2,5°C	-2,5°C
ST08.14/009	-2,5°C	-2,5°C	-2,5°C
ST14.12/036	-7,0°C	-7,0°C	> -4,0°C
ST14.12/049	-5,0°C	-3,0°C	> -4,0°C
ST14.12/059	-3,0°C	-2,5°C	> -4,0°C
ST14.12/071	-2,75°C	-4,0°C	> -4,0°C
ST14.12/085	-2,75°C	-2,5°C	> -4,0°C
ST14.12/095	-5,0°C	-3,5°C	> -4,0°C
ST14.12/132	-7,0°C*	-7,0°C*	-5,0°C
ST14.12/143	-6,0°C	-6,0°C	> -4,0°C
ST14.12/153	-4,0°C	-4,0°C	> -4,0°C

* Deze stam vereiste een extra toevoeging van cultuur voordat ijsvorming optrad.

Als eerste valt op dat de positieve stammen niet bij dezelfde temperaturen nucleatie-activiteit vertonen. Hierbij vertonen de twee stammen ST08.14/008 en ST08.14/009 een activiteit bij de hoogste temperatuur van $-2,5^{\circ}\text{C}$ bij de controle overnacht cultuur. Dit wijst er op dat deze stammen vermoedelijk al type I nucleï vormen bij een opkweek bij 25°C . Daar tegenover vertoonden de stammen ST14.12/036 en ST14.12/132 pas een activiteit bij een temperatuur van -7°C , zowel bij de overnacht cultuur als na een temperatuurshift naar 15°C . Dit geeft aan dat deze twee stammen onder de geteste omstandigheden waarschijnlijk enkel type III nucleï kunnen aanmaken. Daarbij vereiste de stam ST14.12/132 nog een extra toevoeging van cultuur om ijsvorming te kunnen induceren. Dit geeft aan dat deze het minst in staat is actieve nucleï aan te maken van de onderzochte stammen en hierdoor de laagste INA heeft. Om de nucleatie-activiteit van *P. syringae* ST14.12/049 te illustreren, wordt er met de QR-code in Figuur 17 verwezen naar een video. Hierin is te zien hoe deze stam 600 ml gedemineraliseerd water van -7°C doet bevriezen, onder toevoeging van minder dan 100 μl cultuur.



Figuur 17: QR-code die verwijst naar de video waarin minder dan 100 μl cultuur van ST14.12/036 600 ml gedemineraliseerd water van -7°C doet bevriezen⁴.

Wanneer de cellen na opkweek geïnduceerd werden bij 15°C vertoonden sommige stammen INA bij een hogere temperatuur. Hierbij was vooral een duidelijke stijging in nucleatietemperatuur waar te nemen bij ST14.12/049, ST14.12/059 en ST14.12/095. Bij de ST14.12/071 stam werd echter een daling in nucleatietemperatuur waargenomen. De stammen ST14.12/036 en ST14.12/132 met de laagste nucleatietemperatuur bij de controle, vertoonden hier geen stijging. Enkel na een temperatuurshift naar 4°C waren de ST14.12/036 en ST14.12/132 stammen in staat om ijsvorming te induceren bij hogere temperaturen. De ST14.12/036 stam was zelfs in staat ijsvorming te induceren vanaf -4°C . Eveneens vertoonden andere stammen na deze temperatuurshift INA bij hogere temperaturen. Door een weerhoudend defect van de koelinstallatie was het wegens tijdsgebrek niet meer mogelijk, de stammen geïncubeerd bij 4°C , verder te testen bij hogere temperaturen dan -4°C .

⁴ https://www.youtube.com/watch?v=hKT_SGK2qtY

Toch kunnen hieruit al enkele conclusies getrokken worden. De overnacht incubatie bij 4°C zorgt duidelijk voor een opmerkelijke stijging in de nucleatietemperatuur. Dit geeft aan dat voor deze stammen een temperatuurshift naar 4°C aanleiding geeft tot een verhoogde INP expressie en zo een positieve invloed heeft op de INA. Enkel de ST14.12/008 en ST14.12/009 vertoonden geen stijging in nucleatietemperatuur. Dit is waarschijnlijk het gevolg van het feit dat in deze stammen het INP al in grote mate tot expressie gebracht wordt bij de opgroei bij 25°C. Beide temperatuursinducties hebben een effect op de nucleatietemperatuur en dus een positief effect op INA. Dit effect trad echter minder op na een temperatuurshift naar 15°C. Hieruit volgt dat de overnacht incubatie bij 4°C een betere behandeling is om de type I nucleï tot expressie te brengen en zo de nucleatietemperatuur van INA-bacteriën te verhogen. Dit is in tegenstelling met de literatuur, waarin wordt aangegeven dat de temperatuurshift naar 15°C zorgt voor de meest optimale expressie van type I nucleï. Hierin werd aangegeven dat een korte incubatie bij lagere temperatuur na snelle koeling, zorgt voor een opmerkelijke stijging in type I nucleï (Nemecek-Marshall *et al.*, 1993). Het is mogelijk dat de stammen tijdens de test niet snel genoeg gekoeld konden worden tot 15°C, waardoor de type I nucleï niet zo sterk tot expressie konden worden gebracht. Een langere incubatie bij 15°C zou getest moeten worden om te kunnen evalueren of dit een beter effect zou hebben op de INA van de stammen. Verschillende studies geven aan dat een incubatie bij 4°C zorgt voor een verhoogde expressie van de type I nucleï. Dit komt overeen met de resultaten van dit experiment.

Algemeen bevestigt deze test dat de expressie van het INP en daarmee de nucleatietemperatuur van de verschillende stammen positief beïnvloed wordt door een temperatuurshift naar lagere temperaturen na opgroei.

4.2.2 Invloed van lysis op INA

Om de invloed van lysis op de INA na te gaan, werden INA assays uitgevoerd op alle actieve *P. syringae* stammen en hun supernatans, die verschillende behandelingen hebben ondergaan. De overnacht culturen van alle stammen werden overnacht geïncubeerd bij 4°C voor maximale expressie van type I nucleï. De cellen werden enerzijds gelyseerd met 0,5% SDS en anderzijds door opkoken (100°C) gedurende 10 minuten. Als positieve controle werd onbehandelde cultuur meegenomen. Voor de INA assay werd van deze stalen telkens 300 µl toegevoegd aan 5 ml gedemineraliseerd water bij -7°C. Indien deze toevoeging geen aanleiding

gaf tot ijsvorming werd een tweede maal 300 µl toegevoegd. Hierna werden alle stalen 15 minuten gecentrifugeerd bij 14000 rpm om de cellen of celresten neer te slaan en een helder supernatans te bekomen. Hiervan werd eveneens 300 µl toegevoegd aan 5 ml gedemineraliseerd water bij -7°C. Indien deze toevoeging geen aanleiding gaf tot ijsvorming werd een tweede maal 300 µl toegevoegd. De resultaten van deze test zijn weergegeven in Tabel 13.

Tabel 13: Bepaling van nucleatie-activiteit van alle actieve *P. syringae* stammen met cultuur, cultuur behandeld met 0,5% SDS, cultuur geïncubeerd bij 100°C en het supernatans (sup.) bij -7°C.

Stam	Cultuur	Sup. cultuur	0,5% SDS	Sup. 0,5% SDS	Cultuur 100°C	Sup. Cultuur 100°C
ST08.14/008	+	+	+	+	-	-
ST08.14/009	+	+	+	+	-	-
ST14.12/036	+	-	-	-	-	-
ST14.12/049	+	+	+	+	-	-
ST14.12/059	+	+	+	+	-	-
ST14.12/071	+	+	+	+	-	-
ST14.12/085	+	+	+	+	-	-
ST14.12/095	+	+	+	+	-	-
ST14.12/132	+	-	-	-	-	-
ST14.12/143	+	-	+	-	-	-
ST14.12/153	+	-	+	-	-	-

* Deze stammen vereisten een extra toevoeging van 300 µl staal.

Alle positieve stammen vertoonden zoals verwacht ijsvorming bij de positieve controle. Na toevoeging van het supernatans van de positieve controle vertoonden de meeste stammen ijsvorming. Het supernatans van zeven van de elf positieve stammen waren in staat ijsvorming te induceren bij de geteste omstandigheden. Dit wijst er op dat er in het medium nucleï aanwezig waren. Dit geeft aan dat deze stammen vermoedelijk in staat zijn om actief INP's te secreteren in de vorm van buitenste membraan vesikels (BMV). Deze BMV's zijn kleine circulaire structuren met een grootte van 20 tot 250 nm, die afgescheiden worden van het buitenste membraan. Dit is een algemeen mechanisme van Gram-negatieve bacteriën om onoplosbare moleculen zoals INP's te secreteren. De ST14.12/036 en ST14.12/132 stammen vertonen geen ijsvorming meer bij toevoeging van het supernatans. Dit kan mogelijk het gevolg zijn van een te lage concentratie aan nucleï om ijsvorming te induceren. Daarnaast kan dit ook het gevolg zijn van het feit dat deze stammen niet in staat zijn om BMV's met INP's te vormen.

De meeste geteste stammen vertoonden ook ijsvorming na lysis met 0,5% SDS. Enkel de twee minst actieve stammen ST14.12/036 en ST14.12/132 konden geen ijsvorming induceren. Zelfs niet wanneer 600 µl van de gelyseerde cultuur werd toegevoegd. Deze test geeft aan dat geen intacte cellen noodzakelijk zijn om ijsvorming te induceren. Vermoedelijk zijn celfragmenten met daarop INP moleculen voldoende om ijsvorming te realiseren. De laatste drie positieve stammen vereisten bij deze test wel een extra toevoeging van de gelyseerde cultuur om ijsvorming te laten plaatsvinden. Dit geeft aan dat de activiteit van de celfragmenten lager ligt dan van intacte cellen. Dit is mogelijk het gevolg van het feit dat door losse celfragmenten er waarschijnlijk minder aggregaatcomplexen gevormd kunnen worden ten opzichte van intacte cellen. Dit bevestigt mogelijk de veronderstelling in de literatuur dat de INA afhankelijk is van de vorming van aggregaatcomplexen aan het celoppervlak van de INA-bacteriën (Davies, 2014, Garnham *et al.*, 2011). Na een centrifugatie stap kon het supernatans van de meeste culturen nog steeds zorgen voor ijsvorming. Dit viel binnen de verwachtingen mits kleine celfragmenten niet neerslaan bij centrifugatie. Echter is het ook mogelijk dat eventueel nog aanwezige BMV's zorgen voor de nucleatie-activiteit. Het supernatans van de gelyseerde ST14.12/143 en ST14.12/153 stammen kon echter geen ijsvorming meer induceren. Dit kan het gevolg zijn van het neerslaan van de grotere celfragmenten tijdens centrifugatie, waardoor er niet voldoende nucleï meer aanwezig waren in het supernatans om INA te vertonen. Tenslotte kon geen enkel staal dat geïncubeerd werd bij 100°C zorgen voor de inductie van ijsvorming. Dit is te verklaren doordat de incubatie bij deze hoge temperatuur zorgt voor denaturatie en dus het verlies van de ruimtelijke structuur van de INP's, die cruciaal is voor INA.

4.3 Ontwikkeling van een expressiesysteem voor de productie van het INP

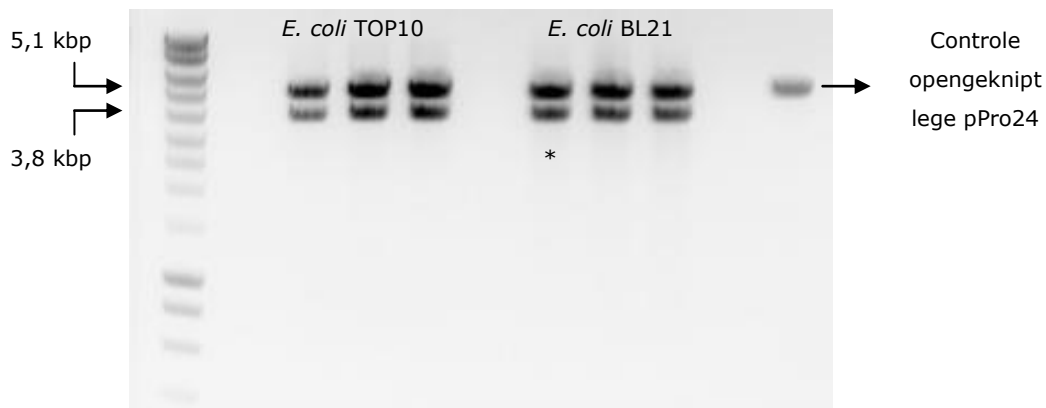
Voor het gebruik van het INP in verschillende toepassingen, is het wenselijk dat het snel en in grote mate geproduceerd kan worden. De productie van het INP in *P. syringae* is echter afhankelijk van verschillende omgevingsfactoren. Daarom werd in het tweede gedeelte van deze masterproef een expressiesysteem ontwikkeld om het *inaZ* tot overexpressie te brengen in *E. coli*. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een induceerbaar expressiesysteem gebaseerd op pPro24 en pET24. Doordat *E. coli* K584027 de hoogste activiteit vertoonde in een INA assay, werd het *inaZ* van deze stam gebruikt voor de kloneringsdoeleinden. Het voordeel aan deze stam was dat het pSB1C3-BBa_K584027 construct een RBS bevat voor het *inaZ*.

4.3.1 Klonering van *inaZ* in expressievector pPro24

In eerste instantie werd voor de ontwikkeling van een expressiesysteem voor de productie van het INP, het *inaZ*-gen gekloneerd in pPro24. Het voordeel aan dit expressiesysteem is dat het kan gebruikt worden voor regulatie van de genexpressie in *E. coli* aan de hand van een relatief goedkope inducer, namelijk propionaat. Hierbij kan een hoog niveau van expressie bekomen worden en het bezit een goede dosis-respons relatie, waardoor verschillende niveaus van INP expressie gerealiseerd kunnen worden (Lee en Kealsing, 2005).

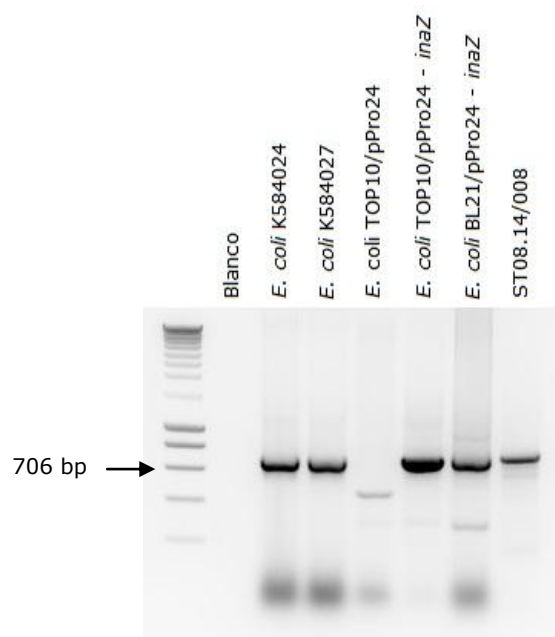
Voor de ontwikkeling van dit expressiesysteem werd allereerst het *inaZ*-fragment geknipt uit pSB1C3-BBa_K584027. Dit werd gerealiseerd met de restrictie-enzymen *NheI* en *PstI*. De *PstI* site is aanwezig in de BioBrick suffix. De *NheI* site is aanwezig in de constitutieve promotor J23119 van het BBa_K584027-fragment. Hierdoor bevatte het uitgeknipte fragment het *inaZ* met het startcodon, een ribosoombindende site (RBS) en twee terminators. Tegelijkertijd werd de pPro24-vector opengeknipt in de multiple cloning site met dezelfde restrictie-enzymen. Door het gebruik van *NheI*, werd het startcodon en de RBS uit pPro24 uitgeknipt. Dit was noodzakelijk mits deze al aanwezig waren in het *inaZ*-fragment. De resulterende restrictiefragmenten werden vervolgens gescheiden op basis van grootte aan de hand van agarosegelelektroforese. Voor de opengeknipte pPro24 vector werd een fragment van 5,1 kb opgezuiverd uit gel. De digest van pSB1C3-BBa_K584027 resulteerde in een fragment van 3,8 kb en 2,1 kb. Het 3,8 kb fragment, dat het *inaZ*-gen bevatte, werd eveneens opgezuiverd uit gel. Vervolgens werd getracht het *ina*-gen in pPro24 te ligeren. Hiertoe werden verschillende vector/insert verhoudingen getest. Aan het eerste ligatiemengsel werd 135 ng DNA toegevoegd met een vector/insert verhouding van 1:3. Aan een tweede ligatiemengsel werd 225 ng DNA toegevoegd met een vector/insert verhouding van 1:5. Ten slotte werd nog een derde ligatiemengsel getest met 190 ng DNA en een vector/insert verhouding van 1:2. Zowel *E. coli* TOP10 als *E. coli* BL21 werden getransformeerd met 5 µl van deze ligatiemengsels. Enkel de transformatie met het derde ligatiemengsel zorgde voor groei van kolonies op LB-medium met ampicilline. De transformatie met ligatiecontrole die bestond uit enkel opengeknipte vector, vertoonde geen groei.

Om te controleren of de vectoren in de transformanten het gewenste insert bevatten, werd allereerst het plasmide DNA van de transformanten geïsoleerd. Aan de hand van dit plasmide DNA werd een controle digest uitgevoerd. Dit werd gerealiseerd met de restrictie-enzymen *NheI* en *PstI*. Het resultaat hiervan werd gevisualiseerd met een agarosegelelektroforese (Figuur 18).



Figuur 18: Resultaat van de controle digest met *NheI* en *PstI* op het geïsoleerd plasmide DNA van de verkregen *E. coli* BL21 en *E. coli* TOP10 transformanten uit het ligatiemengsel met 190 ng DNA en een vector/insert verhouding van 1:2. Als controle werd een geknipte, lege pPro24 meegenomen. *Het opgezuiverd plasmide DNA van deze transformant werd ter controle gesequeneerd.

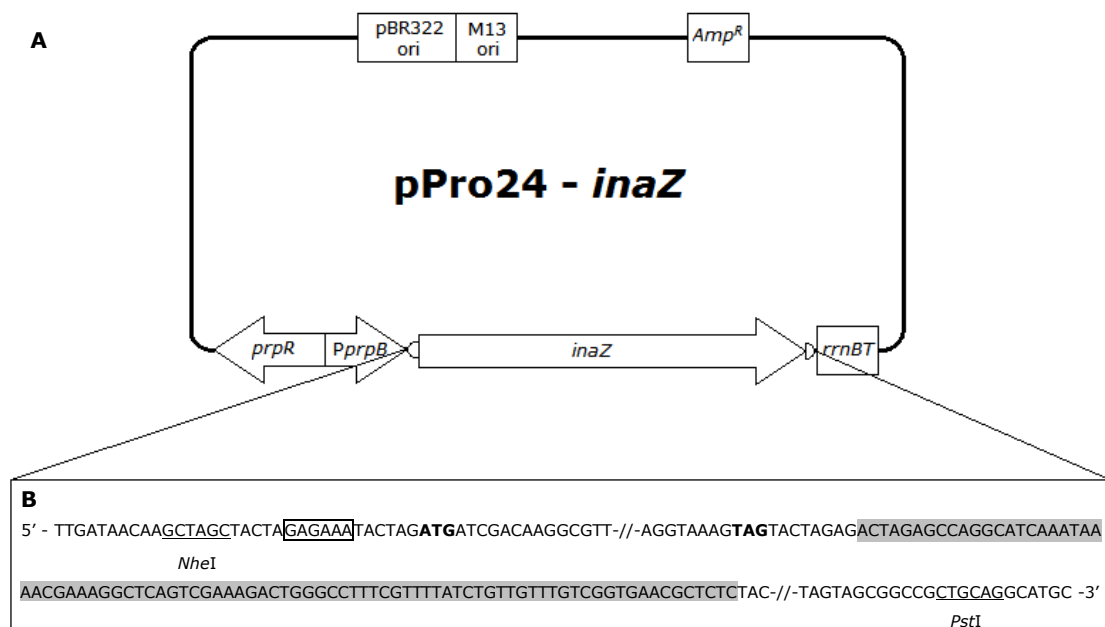
In Figuur 18 is te zien dat zowel de *E. coli* TOP10 als de *E. coli* BL21 transformanten de vector met het gewenste fragment bevatten. Dit geeft aan dat vermoedelijk het gewenste *inaZ*-fragment succesvol in pPro24 geligeerd werd. Om dit te bevestigen werd een kolonie PCR met het primerpaar *inaZF* - *inaZR* uitgevoerd op de transformanten met het pPro24 - *inaZ* construct. Hierbij werden de *E. coli* K584024 & K584027 stammen en ST08.14/008 als positieve controle meegenomen. Als negatieve controle werd een *E. coli* TOP10/pPro24 meegenomen. De resultaten van deze kolonie PCR zijn weergegeven in Figuur 19.



Figuur 19: Resultaat van de kolonie PCR met *inaZF* - *inaZR* op de *E. coli* TOP10/pPro24 - *inaZ* en *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten.

De positieve controles vertoonden beide het gewenste fragment ter hoogte van 706 bp. Bij de negatieve controle met een lege pPro24 vector was er geen amplificatie waar te nemen, mits deze geen *inaZ* bevat. De geteste transformanten vertoonden elk een duidelijk PCR-fragment met de gewenste grootte. Hieruit kan besloten worden dat *inaZ* aanwezig is in de *E. coli* TOP10/pPro24 - *inaZ* en *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten.

Om uiteindelijk te bevestigen of het *inaZ*-fragment juist gekloneerd werd in de pPro24 - *inaZ* constructen, werd één opgezuiverd plasmide DNA-staal van de *E. coli* BL21 transformanten gesequeneerd. Figuur 20 geeft een schematische weergave van het pPro24 - *inaZ* construct met de gesequeneerde 5' en 3' uiteinden van het insert.



Figuur 20: Schematische weergave van het pPro24 - *inaZ* construct **(A)** bestaande uit een gen coderend voor de transcriptionele activator (*prpR*), een propionaat induceerbare *prpBCDE* promotor (*P_{prpB}*), een transcriptionele terminator (*rrnBT*), een Ampicilline resistentiegen (*Amp^R*), een origin of replication (*pBR322*), een intragenische region voor faag packaging (*M13 ori*), het *inaZ* open leesraam. De DNA sequentie ter hoogte van de kloneringssite is weergegeven **(B)** met onderlijnd de aanduiding van de restrictiesites *NheI* en *PstI*, omkaderd de RBS; het start- en stopcodon in vet; en de *rrnB* terminator in grijs gearceerd.

Uit de resultaten van de sequencing bleek dat het volledige *inaZ*-gen werd gekloneerd in pPro24. Dit werd aangetoond door het feit dat het begin en het einde van het *inaZ*-fragment correct in pPro24 gekloneerd werden. Echter bleek slechts een deel van de RBS van het Biobrick onderdeel BBa_K584027 aanwezig te zijn. Zo was volgens de sequencing resultaten enkel het stuk 5'-GAGAAA-3' aanwezig.

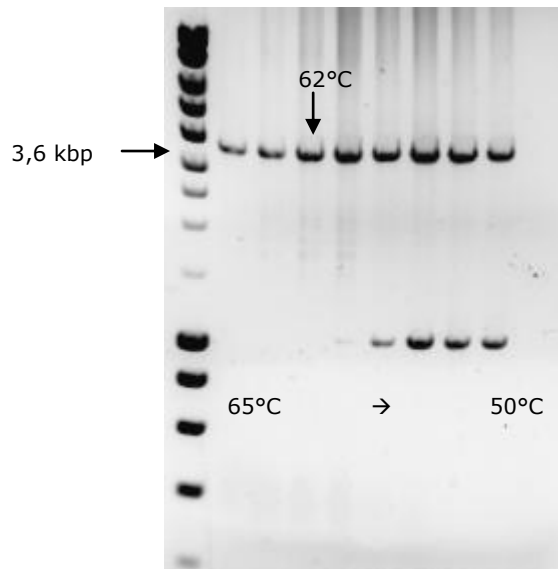
Terwijl volgens iGEM (2011) de volledige RBS (5'-AAAGAGGAGAAA-3') aanwezig zou moeten zijn. De overige restrictie sites, het startcodon, het stopcodon en terminators waren wel aanwezig. Doordat de RBS in de gekloneerde vector korter is dan voorzien, kan dit zijn effect hebben op de opbrengst van de INP-productie. Mogelijk zorgt dit voor een verlaagde nucleatie-activiteit. De bevestiging van de nucleatie-activiteit wordt aangetoond verder in deze masterproef (4.3.3).

4.3.2 Klonering van *inaZ* in expressievector pET24

Een tweede expressiesysteem werd ontwikkeld door het *inaZ* te kloneren in pET24. Het voordeel aan dit expressiesysteem is dat de overexpressie van het INP in *E. coli* kan gereguleerd worden aan de hand van de inducer isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Daarnaast bevat pET24 ook een DNA-sequentie die zorgt voor een His-tag aan het C-terminale uiteinde van het INP. Dit maakt het mogelijk het geproduceerde INP eenvoudig te isoleren en op te zuiveren aan de hand van een nikkelkolom. Het nadeel van dit systeem is dat IPTG een kostelijke inducer is.

Voor de klonering van het *inaZ*-fragment in pET24 waren geen geschikte restrictie sites aanwezig in het pSB1C3-BBa_K584027. Daarom moest dit fragment voorzien worden van geschikte restrictie sites. Hiervoor werden de restrictie sites *EcoRI* en *XhoI* gekozen die ook aanwezig zijn in de multiple cloning site van pET24. Om dit te kunnen realiseren werden de primers HRE-INP-FW1 en HRE-INP-Rev1 ontwikkeld op basis van de beschikbare nucleotidesequentie van BBa_K584027 (Bijlage B). Bij de ontwikkeling van deze primers werden aan de 5' uiteindes de gewenste restrictiesites toegevoegd met twee extra nucleotiden, voor een hogere restrictie-efficiëntie. De reverse primer werd zo ontwikkeld dat deze kon binden op het template DNA juist voor het stopcodon. Op deze manier zorgde de klonering van het *inaZ* in pET24 ervoor, dat het gen voor een His-tag gekoppeld kon worden aan het genfragment. Met behulp van deze primers werd het *inaZ*-fragment (3635 bp) geamplificeerd en voorzien van de gewenste restrictie sites via een high fidelity PCR. Hiervoor werd *Pfx* DNA polymerase gebruikt om het *inaZ* te kunnen amplificeren met een zo laag mogelijke misincorporatie van baseparen. Het *Pfx* DNA polymerase beschikt over een proofreading (3' $\rightarrow$ 5' exonuclease) activiteit waardoor de misincorporatiefrequentie 26 keer lager ligt dan bij Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, 2015). Als template voor deze PCR werd gebruik gemaakt van het hitte geïnactiveerd *inaZ*-fragment dat uit pSB1C3-BBa_K584027 geknipt werd.

Allereerst werd de annealingtemperatuur voor de ontwikkelde primers geoptimaliseerd aan de hand van een gradiënt PCR met Taq DNA polymerase. Hierbij varieerde de annealingtemperatuur van 50°C tot 65°C. Het resultaat hiervan is weergegeven in Figuur 21.



Figuur 21: Gradiënt PCR met Taq DNA polymerase (50°C – 65°C) met primerpaar HRE-INP-FW1 - HRE-INP-Rev1 met geknipt, hitte geïnactiveerd *inaZ* als template.

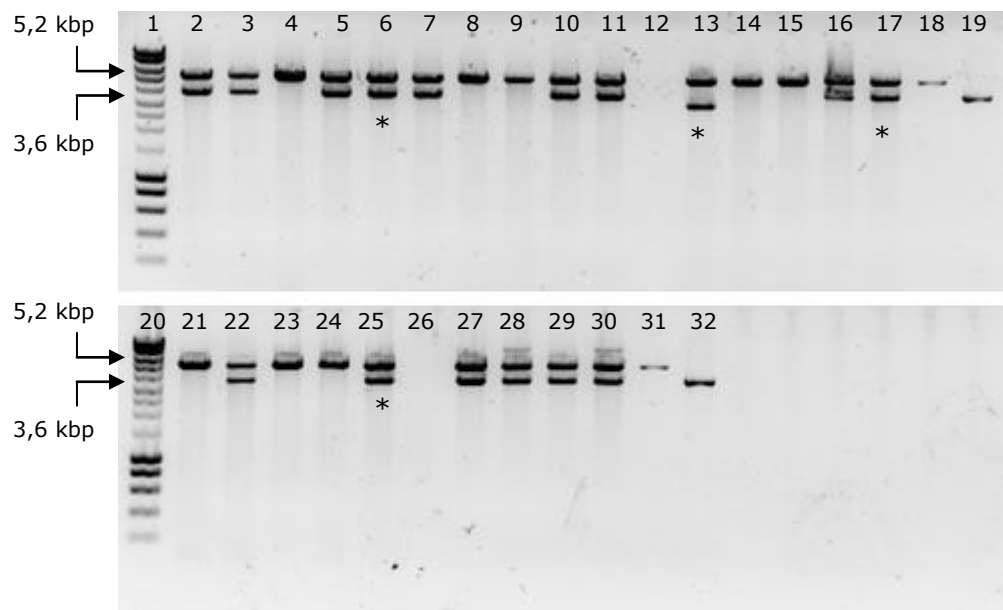
Uit Figuur 21 blijkt dat de amplificatie met deze primers niet specifiek was bij lagere annealingtemperaturen. Deze aspecificiteit verdwijnt bij de hogere annealingtemperaturen. Hoge annealingtemperaturen gaven echter aanleiding tot een verlies aan opbrengst van het gewenste *inaZ*-fragment (3635 bp). Daardoor werd 62°C als optimale annealingtemperatuur vastgelegd. In Figuur 21 is eveneens een "smeur" te zien bij de meeste amplificaties. Daardoor werd een PCR-controle toegevoegd waarbij de PCR-mengsels ofwel een forward ofwel een reverse primer bevatten. Hieruit bleek dat vooral de reverse primer zorgt voor de amplificatie van aspecifieke fragmenten en de ontwikkeling van een smeur. Hierdoor werd in de high fidelity PCR een lagere primerconcentratie van 0,3 μ M gebruikt. Een te lage concentratie aan primers zorgde echter voor een te groot verlies aan opbrengst. Omdat er bij deze primerconcentratie nog steeds smeur visueel waarneembaar was, werden verschillende concentraties template DNA getest gaande van 0,1 ng tot 10 ng. Om geen te lage opbrengst te hebben van het gewenste fragment, werd een uiteindelijke concentratie van 5 ng template vastgelegd. Met deze geoptimaliseerde condities werd het *inaZ*-fragment geamplificeerd met de high fidelity PCR. Hierna werd het volledige PCR-product gescheiden en gecontroleerd via agarosegelelektroforese. Het gewenste fragment werd uitgesneden en opgezuiverd via de QIAquick Gel extraction kit (Qiagen). Dit fragment werd

vervolgens voor 1,5 uur geknipt met *EcoRI* en *XhoI*. Na een hitte inactivatie van de digest werd het DNA opgezuiverd aan de hand van een ethanol precipitatie. Dit werd niet uitgevoerd met een Qiagen-kit om het verlies van DNA zoveel mogelijk te beperken. Tegelijkertijd werd de pET24 onder dezelfde condities opengeknipt met *EcoRI* en *XhoI*. De digest van pET24 werd volledig gescheiden aan de hand van agarosegelelektroforese. Het gewenste fragment (5,2 kbp) werd uitgesneden en opgezuiverd via de QIAquick Gel extraction kit (Qiagen). Omdat de ligatie onder standaardcondities niet meteen succesvol was, werden vijf verschillende ligatiemengsels getest om het *inaZ*-fragment te ligeren in pET24. Hierbij werd eveneens een groter volume (30 µl) ligatiemengsel getest. Dit werd toegepast om de eventueel aanwezige onzuiverheden in het DNA-staal van het *inaZ*-fragment, te verdunnen. De gebruikte hoeveelheden DNA, geteste vector/insert verhoudingen en de volumes van het ligatiemengsel zijn weergegeven in Tabel 14.

Tabel 14: De gebruikte hoeveelheden DNA, geteste vector/insert verhoudingen en de volumes van de uitgevoerde ligatiemengsels.

Ligatiemengsel	Concentratie DNA	Vector/insert	Volume ligatiemengsel
1	145 ng	1/3	20 µl
2	90 ng	1/1	20 µl
3	320 ng	1/3	20 µl
4	550 ng	1/5	30 µl
5	320 ng	1/3	30 µl

Zowel *E. coli* TOP10 als *E. coli* BL21 werden getransformeerd met 5 µl van deze ligatiemengsels. De transformaties met de ligatiemengsels 3, 4 en 5 zorgden voor groei van kolonies op LB-medium met kanamycine. Hieruit blijkt dat een duidelijk hogere hoeveelheid DNA nodig is dan de aanbevolen hoeveelheid (100 – 200 ng), opdat de ligatie succesvol is. Om te controleren of de vectoren in de transformanten het gewenste insert bevatten, werd allereerst het plasmide DNA van deze transformanten geïsoleerd. Hiermee werd een controle digest uitgevoerd met de restrictie-enzymen *EcoRI* en *XhoI*. Hiervoor werden alle kolonies van de *E. coli* BL21 transformanten en vier kolonies van de *E. coli* TOP10 transformanten gecontroleerd. Het resultaat van deze controle digest werd gevisualiseerd met een agarosegelelektroforese (Figuur 22).



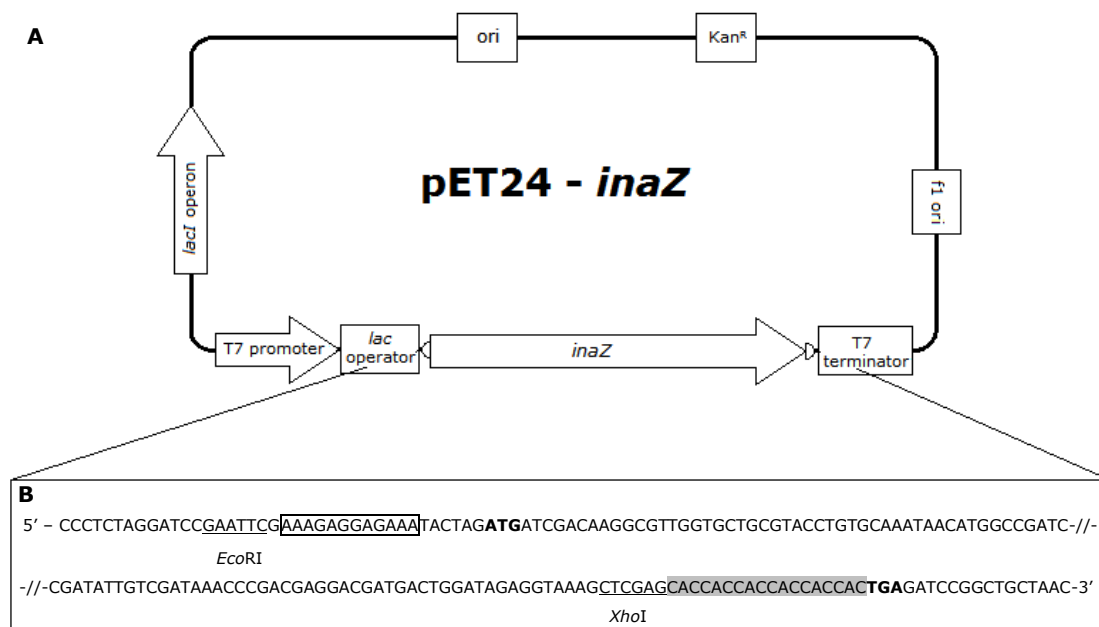
Figuur 22: Controle digest met *EcoRI* en *XhoI* op het geïsoleerd plasmide DNA van de verkregen *E. coli* BL21 transformanten uit ligatiemengsels 3 (laan 2-11), 4 (laan 13-17) en 5 (laan 21-25) en de *E. coli* TOP10 transformanten uit ligatiemengsels 3 (laan 30), 4 (laan 29) en 5 (laan 27-28). Als controle werd een geknipte, lege pET24 (laan 18 & 31) en het *inaZ*-fragment (laan 19 & 32) meegenomen. *Het opgezuiverd plasmide DNA van deze stammen werd gesequeneerd.

Uit de resultaten van de controle digest blijkt dat meeste transformanten, zowel bij de *E. coli* BL21 als de *E. coli* TOP10, een insert met de gewenste grootte (3625 bp) bevatten. Echter waren er ook transformanten die volgens de controle digest een lege pET24 bevatten. Dit kan het gevolg zijn van het dichtliggen van de vector tijdens de ligatie. Dit zou echter niet mogen gezien de twee restrictie sites niet complementair zijn met elkaar. Ten slotte bleek de *E. coli* BL21 transformant in laan 13 (Figuur 22) een insert te bevatten met een kleinere grootte dan het gewenste *inaZ*-fragment.

Om de aanwezigheid van het *inaZ* te bevestigen, werd een kolonie PCR met het primerpaar *inaZF* - *inaZR* uitgevoerd op een *E. coli* BL21/pET24 - *inaZ* transformant. Hierbij werden de *E. coli* K584024 en K584027 stammen als positieve controle meegenomen. Als negatieve controle werd een *E. coli* BL21/pET24 transformant meegenomen. Ten slotte werd nog de *E. coli* BL21 transformant met een pET24 construct meegenomen uit ligatiemengsel 4, die een korter insert vertoonde dan het gewenste *inaZ*-fragment (laan 13, Figuur 22). In de resultaten hiervan (data niet getoond) vertoonden beide positieve controles het gewenste fragment ter hoogte van 706 bp. Bij de negatieve controle met een lege pET24 vector was er geen amplificatie waar te nemen. Hieruit kan besloten worden dat het *inaZ* aanwezig is in de *E. coli* BL21/pET24 - *inaZ* transformant. Bij de

transformant met het kortere insert werd eveneens het gewenste fragment geamplificeerd. Gezien de bindingssites van de *inaZF* - *inaZR* primers zich situeren op het einde van het *inaZ*, bevat deze transformant vermoedelijk het einde van het *inaZ*-gen. Ten slotte vertoonden de geamplificeerde fragmenten een lagere intensiteit dan de controles. Dit is te verklaren door het lage kopijenaantal van pET24.

Om finaal te bevestigen of het *inaZ*-fragment juist gekloneerd werd in de pET24 - *inaZ* constructen, werden vier opgezuiverde plasmide DNA-stalen van de *E. coli* BL21 transformanten gesequeneerd (laan 6, 13, 17 & 25, Figuur 22). Figuur 23 geeft een schematische weergave van het pET24 - *inaZ* construct met de gesequeneerde 5' en 3' uiteinden van het insert (laan 6, Figuur 22).



Figuur 23: Schematische weergave van het pET24 - *inaZ* construct **(A)** bestaande uit een *lacI*-operon, een ColE1 origin of replication (*ori*), een kanamycine resistentiegen (*Kan^R*), een *f1* origin of replication (*f1 ori*), een IPTG induceerbare T7 promoter, een *lac* operator, een T7 terminator en het *inaZ* open leesraam. De DNA sequentie ter hoogte van de kloneringssite is weergegeven **(B)** met onderlijnd de aanduiding van de restrictiesites *EcoRI* en *XhoI*, omkaderd de RBS; het start- en stopcodon in vet; en de His-tag in grijs gearceerd.

Uit de sequencing resultaten bleek dat alle gecontroleerde transformanten het correcte begin en einde van het *inaZ*-fragment bevatten in het pET24 - *inaZ* construct. Zelfs de *E. coli* BL21 transformant met het kortere insert (laan 13, Figuur 22) had zowel het correcte begin als einde van het *inaZ*-fragment in het pET24 construct. Dit werd gecontroleerd door de nucleotidesequenties van de gesequeneerde fragmenten te aligneren met de sequentie van het *inaZ* van *P. syringae* S203 (emb|X03035.1). Hierbij vertoonde alle gesequeneerde fragmenten,

van zowel het begin als het einde van het insert, 100% identiteit met dit gen. Vermits het volledige insert niet gesequeneerd kon worden is er geen zekerheid over correctheid van het centrale gedeelte van het *inaZ*-fragment. Hierdoor mist deze transformant vermoedelijk een centraal gedeelte van het *inaZ*. Verdere activiteitstesten en eventueel een SDS-PAGE op deze transformanten moeten uitwijzen of het juiste, actieve proteïne tot expressie wordt gebracht. Uit de DNA-sequenties bleek eveneens dat alle constructen beschikten over de volledige RBS. Dit komt doordat de RBS volledig vervat zit in de HRE-INP-FW1 primer. Uit de sequencing resultaten van de pPro24 - *inaZ* constructen bleek dat het Biobrick onderdeel BBa_K584027 niet het volledige RBS bevatte. Hierdoor konden slechts vijftien nucleotiden van de 22 van de HRE-INP-FW1 primer binden op het template DNA. Toch kon de high fidelity PCR zorgen voor amplificatie met deze primer bij een annealingtemperatuur van 62°C. Doordat dit construct nu wel beschikt over de volledige RBS, is het mogelijk dat deze transformanten een hogere activiteit vertonen onder bepaalde inductiecondities dan de transformanten met het pPro24 - *inaZ* construct. Ten slotte toont Figuur 23 dat na de *Xho*I restrictie site de sequentie voor de His-tag gevolgd door een stopcodon, correct gekoppeld werd aan het *inaZ*-fragment.

Dit geheel geeft aan dat het *inaZ* succesvol in het pET24 vectorsysteem gekloneerd werd. Doordat het pET24 - *inaZ* construct in *E. coli* BL21 cellen werd getransformeerd, kon de activiteit niet via een INA assay of SDS-PAGE gecontroleerd worden. De *E. coli* BL21 cellen bevatten namelijk geen gen voor T7 RNA polymerase, dat noodzakelijk is om het *inaZ* in het pET24 construct te kunnen transcriberen en dus tot expressie te brengen. In verder onderzoek zouden de hier aangemaakte constructen kunnen gebruikt worden om *E. coli* BL21 (DE3) cellen te transformeren en op deze manier het INP tot expressie te brengen. Vervolgens zou hiermee de aanwezigheid van het INP gecontroleerd kunnen worden via SDS-PAGE en zou de activiteit bij verschillende inductieconcentraties en inductietijden gecontroleerd kunnen worden via een INA assay. Ten slotte zou het INP aan de hand van de His-tag opgezuiverd kunnen worden om de activiteit hiervan (los van de cel) verder te kunnen onderzoeken.

4.3.3 *Semi-kwantitatieve bepaling van Ice Nucleation Activity*

Om de mate van activiteit van een bepaalde INA-stam aan te tonen werd een dose range bepaling uitgevoerd. Hiervoor werden de actieve *P. syringae* stammen ST14.12/008, ST14.12/009, ST14.12/036 en ST14.12/049, de *E. coli* K584024, *E. coli* K584027 stammen en de *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten overnacht

opgegroeid. Een van de *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten werd overnacht geïnduceerd met een finale concentratie van 50 mM propionaat en de andere werd niet geïnduceerd. De overnacht culturen van de actieve *P. syringae* stammen werden overnacht geïncubeerd bij 4°C voor maximale expressie van de type I nucleï. Met deze culturen werd een INA assay uitgevoerd voor de semi-kwantitatieve bepaling van de INA. De resultaten van deze INA assay zijn weergegeven in Tabel 15 & 16.

Tabel 15: Resultaten van de INA assay bij -8°C op ST14.12/008, ST14.12/009, ST14.12/036 en ST14.12/049. + wijst op een bevroren druppel, - wijst op een niet bevroren druppel.

Verduunnings-factor	ST08.12/008			ST08.12/010			ST14.12/036			ST14.12/049		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
64	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
256	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
1024	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
4096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 16: Resultaten van de INA assay bij -8°C op *E. coli* K584024, K584027 stammen en op niet-geïnduceerde en geïnduceerde de *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten. + wijst op een bevroren druppel, - wijst op een niet bevroren druppel.

Verduunnings-factor	K584024			K584027			<i>E. coli</i> BL21/ pPro24 - <i>inaZ</i> niet-geïnduceerd			<i>E. coli</i> BL21/ pPro24 - <i>inaZ</i> geïnduceerd		
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
256	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1024	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4096	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,64 x 10 ⁴	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6,55 x 10 ⁴	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,62 x 10 ⁵	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
1,05 x 10 ⁶	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
4,19 x 10 ⁶	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1,68 x 10 ⁷	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6,71 x 10 ⁷	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2,68 x 10 ⁸	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1,07 x 10 ⁹	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
4,29 x 10 ⁹	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1,72 x 10 ¹⁰	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6,87 x 10 ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De ST08.14/009 en ST14.12/049 stammen kunnen ijsvorming induceren in de laagste verdunning van de geteste, actieve *P. syringae*. Dit geeft aan dat deze stammen het grootste aantal nucleï bevatten om ijsvorming te kunnen induceren bij -8°C. Hieruit kan besloten worden dat ST14.12/049 en ST08.14/009 de meest actieve stammen zijn bij deze temperatuur. De ST14.12/036 stam kon slechts ijsvorming induceren in de onverdunde cultuur. Dit toont aan dat deze stam het minst aantal nucleï bevatte om ijsvorming te induceren bij -8°C en dus de minst actieve geteste stam is.

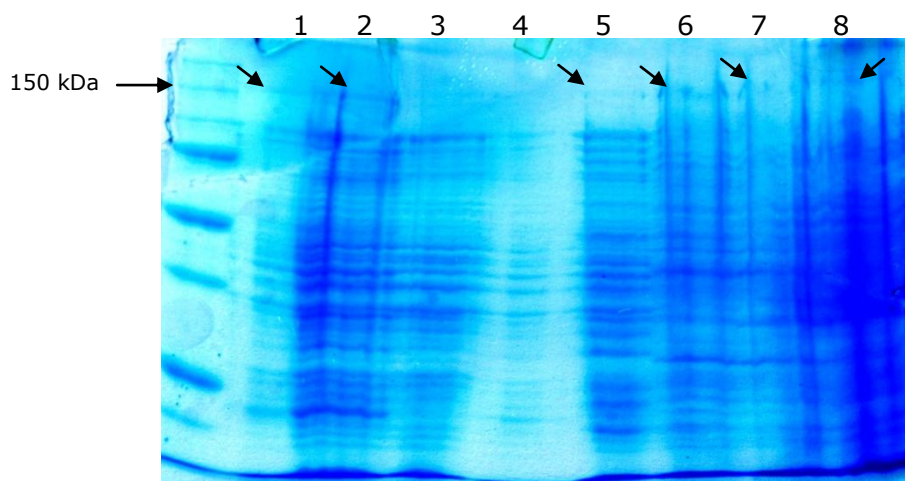
De *E. coli* K584024 bevat het pSB1C3 – BBa_K584024. Deze vector bevat enkel het *inaZ* voorafgegaan door een RBS, gevolgd door twee terminators en dus geen promoter. Toch blijkt dat *E. coli* K584024 een hogere activiteit vertoont dan alle geteste *P. syringae* stammen. Dit is vermoedelijk het gevolg van doorleesactiviteit op de vector. De *E. coli* K584027, die een constitutieve promoter bevat in het pSB1C3–BBa_K854027 construct, vertoont de hoogste activiteit. Deze stam kan nog ijsvorming induceren in een $1/1,72 \times 10^{10}$ verdunning van de cultuur. Dit geeft aan dat deze stam een zeer groot aantal nucleï bevat om ijsvorming te induceren bij -8°C.

De geïnduceerde en de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten vertonen volgens deze resultaten ongeveer dezelfde activiteit. Normaal gezien zou de niet-geïnduceerde stam geen activiteit mogen vertonen, vermits in de afwezigheid van propionaat, het gen normaal niet tot expressie zou kunnen worden gebracht. Dit was echter toch het geval. Dit zou het gevolg kunnen zijn van leaky expressie van de promoter in pPro24. In Lee *et al.* (2005) wordt aangegeven dat pPro24 slechts een zeer beperkte leaky expressie vertoont. Uit deze resultaten blijkt echter dat er veel meer leaky expressie is dan oorspronkelijk gedacht. Daarnaast kan dit ook het gevolg zijn van een inductie van de stam door het groeimedium. Dit is mogelijk doordat het LB-medium een niet-gedefinieerd medium is doordat het gistextract en trypton bevat. Echter zou dan verwacht worden dat de transformant, die geïnduceerd werd met extra propionaat, een hogere activiteit zou vertonen. De geïnduceerde en de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* transformanten vertoonden een hogere activiteit dan *E. coli* K584024. Dit toont aan dat de INA van *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* toch hoger is dan de INA veroorzaakt door de doorleesactiviteit in *E. coli* K584024. Echter vertoont *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* een veel lagere activiteit dan de *E. coli* K584027. Dit kan het gevolg zijn van de propionaat induceerbare promoter, die het INP niet zo hoog tot expressie kan brengen dan de constitutieve promoter van *E. coli* K584027. Een andere verklaring is het feit dat de RBS niet volledig aanwezig is

in het pPro24 – *inaZ* construct. Dit kan gezorgd hebben voor een minder efficiënte translatie van het mRNA van het *inaZ*. In een verder onderzoek zou de activiteit van transformanten met het pPro24 – *inaZ* construct verder onderzocht kunnen worden met een INA assay. Hierbij moet in eerste instantie de inductie geoptimaliseerd worden door verschillende inductieconcentraties en inductietijden te testen, om op deze manier na te gaan of dit een hogere activiteit oplevert. Daarnaast moet de leaky expressie van deze vector verder onderzocht worden, om na te gaan of er door middel van inductie, in eventueel andere media, hogere INA bekomen kunnen worden ten opzichte van de niet-geïnduceerde stam.

4.3.4 Detectie van INP expressie met behulp van SDS-PAGE

Hoewel het *inaZ*-gen in de juiste oriëntatie gekloneerd werd in pPro24, gaven de activiteitstesten van geïnduceerde en niet-geïnduceerde stammen niet de verwachte resultaten. Daarom werd de expressie van het INP in deze stammen ook nagegaan met behulp van SDS-PAGE. In deze test werd gebruik gemaakt van de overnacht culturen van de *P. syringae* stammen ST08.14/008 (Cit7), ST08.14/010 (Cit7del1b), ST14.12/049, *E. coli* K584024, *E. coli* K584027, een *E. coli* BL21/pPro24 (negatieve controle) en een *E. coli* BL21/pPro24 – *inaZ*. De laatste stam werd zowel niet-geïnduceerd als overnacht geïnduceerd met 50 mM propionaat. Deze stalen werden op twee manieren voorbereid. Eén staal werd behandeld met B-PER en van het andere werd het ruw celextract gebruikt. Het resultaat van deze SDS-PAGE op stalen met ruwcel extract is gegeven in Figuur 24.



Figuur 24: Resultaat van SDS-PAGE op de stalen van ruw celextract van de stammen *E. coli* K584024 (1), *E. coli* K584027 (2), *E. coli* BL21/pPro24 (3), niet-geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 – *inaZ* (4), geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 – *inaZ* (5), ST08.14/008 (6), ST08.14/010 (7) en ST14.12/049 (8). De pijltjes zijn indicatief voor de aanwezigheid van een proteïne ter hoogte van 150 kDa.

De pijltjes op Figuur 24 zijn indicatief voor de aanwezigheid van een proteïne ter hoogte van 150 kDa. Dit komt overeen met de verwachte grootte van 153 kDa van het InaZ. De proteïnes met deze grootte zijn bij de ST14.12/008 en ST14.12/010 duidelijk waarneembaar op gels van beide behandelingswijzen. Op de gel van de stalen waarbij het ruw celextract werd gebruikt (Figuur 22) zijn er ook proteïnen waar te nemen bij *E. coli* K584024, *E. coli* K584027, ST14.12/049 en de geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ*. Deze waren echter niet visueel waarneembaar op de gel met de B-PER behandelde stalen. Dit geeft aan dat het gebruik van ruw celextract, de betere manier is voor de visualisatie van de aanwezigheid het INP via SDS-PAGE. De aanwezigheid van de proteïnes bij de stammen ST08.14/008 en ST14.12/049 bevestigt de INA van deze stammen. De aanwezigheid van een proteïne bij de ST14.12/010 (Cit7del1b) wijst er op dat de mutatie in het *inaZ* van deze stam niet heeft gezorgd voor een prematuur stopcodon. Deze stam brengt echter een inactief proteïne tot expressie met eenzelfde lengte als het InaZ. Uit Figuur 24 blijkt dat beide *E. coli* K584024 en *E. coli* K584027 het INP tot expressie brengen. Dit verklaart waarom *E. coli* K584024, zonder promoter voor het *inaZ*-gen, toch ijsvorming kon induceren in de INA assay. De *E. coli* BL21/pPro24 werd meegenomen als negatieve controle en vertoonde geen expressie van het INP. De geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* vertoonde een lichte aanwezigheid van een proteïne ter hoogte van 150 kDa. Dit geeft aan dat deze klonering succesvol was en dat er een proteïne met de gewenste grootte tot expressie werd gebracht. Expressie van het INP werd ook al bevestigd in de INA assay. Van de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* kon niet voldoende staal geladen worden door een te hoge viscositeit van dit staal. Hierdoor is de visualisatie van de proteïnen bij dit staal in Figuur 24, maar zeer licht waarneembaar. Dit maakte het onmogelijk om iets te besluiten over de aan- of afwezigheid van het INP in de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ*. Voor deze stam moet deze test zeker nog herhaald worden om aan te kunnen tonen of de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ* het INP tot expressie brengt. De cultuur van ST14.12/049 was zeer dens en dit heeft gezorgd voor een intense blauwe smeer op het resultaat in Figuur 24. Desalniettemin zijn bij de meeste stalen de proteïnes voldoende zichtbaar om de nodige conclusies te kunnen trekken.

5 Algemeen besluit

In deze masterproef werd in een eerste stap een PCR geoptimaliseerd voor de screening van de cultuurcollectie op de aanwezigheid van *ina*-genen. In eerste instantie werd geprobeerd een universele PCR te optimaliseren. Met de universele primers was het echter niet mogelijk om een specifieke amplificatie te verkrijgen. Daardoor werd er overgestapt op het gebruik van soortspecifieke primers voor de detectie van de *ina*-genen. De soortspecifieke PCR werd succesvol geoptimaliseerd voor de detectie van *inaZ* in *P. syringae*. Om de PCR-resultaten te bevestigen werd de aanwezigheid van nucleatie-activiteit nagegaan aan de hand van een INA assay. Hiermee konden alle duidelijk positief gevonden stammen bevestigd worden. Op deze manier werden er elf INA *P. syringae* gedecteerd in de cultuurcollectie. Verdere optimalisatie van de soortspecifieke PCR voor andere soorten was niet mogelijk, doordat geen INA gedetecteerd werd bij *P. fluorescens*, *P. agglomerans* en *Xanthomonas spp.* uit de cultuurcollectie. Met deze PCR-detectie en de INA assays werd aangetoond dat binnen de genera gekend voor INA, slechts enkele deze activiteit vertonen. De INA assays op de actieve *P. syringae* stammen gaven aan dat niet alle INA-stammen activiteit vertonen bij dezelfde temperatuur. Sommige stammen waren in staat om ijsvorming te induceren bij -2,5°C terwijl andere dit pas konden vanaf -7°C. Deze nucleatietemperatuur kon echter verhoogt worden door de culturen te incuberen bij lagere temperaturen na opgroei. Hierbij bleek de temperatuurshift naar 4°C de meest effectieve manier om de expressie van de type I nucleï te verhogen.

Omdat de INP expressie in *P. syringae* afhankelijk is van een aantal omgevingsfactoren (temperatuur en nutriëntlimitatie) werd een expressiesysteem ontwikkeld op basis van pPro24 en pET24, om het INP tot overexpressie te kunnen brengen in *E. coli*. Hierbij werd het *inaZ*-fragment uit pSB1C3-BBa_K584027 succesvol gekloneerd in pPro24 en pET24. Aan de hand van SDS-PAGE en een INA assay werd aangetoond dat het INP tot expressie gebracht werd in *E. coli* BL21/pPro24 - *inaZ*. Deze transformant vertoonde een hogere activiteit dan de positieve *P. syringae* stammen. De aanwezigheid van het juiste fragment werd bevestigd aan de hand van sequencing.

Met de ontwikkeling van een expressiesysteem en onderzoek naar het INP zijn de eerste stappen gezet in het beter te begrijpen van de werking van het INP. Toekomstige uitdagingen zijn de optimalisatie van de productie van het INP en de opzuivering van het proteïne via de His-tag. Om aan de hand hiervan nieuwe industriële toepassingen van het INP te ontwikkelen.

Literatuurlijst

Ahern, H.E., Walsh, K.A., Hill, T.C.J., en Moffett, B.F. (2007). Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. *Biogeosciences*. 4(1):115-124.

Buttner, M.P., en Amy, P.S. (1989). Survival of Ice Nucleation-Active and genetically engineered non-ice-nucleating *Pseudomonas syringae* strains after freezing. *Applied and environmental microbiology*. 55(7):1690-1694.

Chen, Q.S., Liu, J.H., en Yan, Y.L. (2002). Application of ice nucleation active membrane debris on partially frozen of shrimp. *Food Science*. 23(11):139-143.

Cochet, N., en Clause, D. (1994). Ice nucleation by bacteria : production and activity. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*. 83:187-191.

Cochet, N., en Widehem, P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54(2):153-161.

Davies, P.L. (2014). Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in Biochemical Sciences*. 39(11):548-555.

Edwards, A.R., Van Den Bussche, R.A., Wichman, H.A., en Orser, C.S. (1994). Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 11(6):911-920.

Garnham, C.P., Campbell, R.L., Walker, V.K., en Davies, P.L. (2011). Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC structural biology*. 11(1):36-47.

Hazra, A., Sahaa, M., Dea, U.K., Mukherjee, J., en Goswami K. (2004). Study of ice nucleating characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Aerosol Science*. 35(11):1405-1414.

Hill, T.C.J., Moffett, B.F., DeMott, P.J., Georgakopoulos, D.G., Stump, W.L., en Franc, G.D. (2014). Measurement of ice nucleation-active bacteria on plants and in precipitation by quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology*. 80(4):1256-1267.

iGEM. (2011). iGEM: Registry of Standard Biological Parts. Part:BBa_K584024. http://parts.igem.org/Part:BBa_K584024. Geraadpleegd op 28 april 2015.

iGEM. (2011). iGEM: Registry of Standard Biological Parts. Part:BBa_K584027. http://parts.igem.org/Part:BBa_K584027. Geraadpleegd op 28 april 2015.

Ishikawa M., Kishimoto, T., Kuchitsu, H., Murakawa, H., Price, W.S., Saruwatari, A., Sekozawa, Y., en Yamazaki, H. (2014). High ice nucleation activity located in blueberry stem bark is linked to primary freeze initiation and adaptive freezing behaviour of the bark. *AoB plants*. 6:1-17.

Joly, M., Attard, E., Sancelme, M., Deguillaume, L., Guilbaud, C., Morris, C.E., Amato, P., en Delort, A. (2013). Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water. *Atmospheric Environment*. 70:392-400.

Jung, H., Park, J., Park, S., Lebeault, J., en Pan, J. (1998). Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme and microbial technology*. 22(5):348-354.

Kajava, A.V., en Lindow, S.E. (1993). A Model of the Three-dimensional Structure of Ice Nucleation Proteins. *Journal of Molecular Biology*. 232:709-717.

Kasper, J., en Fries, W. (2011). The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 78(2):248-263.

Kiani, H., en Sun, D. (2011). Water crystallization and its importance to freezing of foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 22(8):407-426.

Kozloff, L., Schofield, M., en Lute, M. (1983). Ice Nucleating Activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology*. 153(1):222-231.

Kumaki, Y., Kawano, K., Hikichi, K., Matsumoto, T., en Matsushima, N. (2008). A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein. *Biochemical and biophysical research Communications*. 371(1):5-9.

Lagriffoul, A., Boudenne, J.L., Absi, R., Ballet, J.J., Berjeaud, J.M., Chevalier, S., Creppy, E.E., Gilli, E., Gadonna, J.P., Gadonna-Widehem, P., Morris, C.E., en Zini, S. (2010). Bacterial-based additives for the production of artificial snow: What are the risks to human health? *The Science of the total environment*. 408(7):1659-1666.

Lee S.K., en Keasling, J.D. (2005). A Propionate-Inducible Expression System for Enteric Bacteria A Propionate-Inducible Expression System for Enteric Bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 71(11):6856-6862.

Li, L., Kang, D., en Cha, H. (2003). Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. *Biotechnology and bioengineering*. 85(2):214-221.

Li, J., en Lee, T. (1995). Bacterial ice nucleation and its potential application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 6:259-265.

Li, Q., Yan, Q., Chen, J., He, Y., Wang, J., Zhang, H., Yu, Z., en Li, L. (2012). Molecular characterization of an ice nucleation protein variant (inaQ) from *Pseudomonas syringae* and the analysis of its transmembrane transport activity in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences*. 8(8):1097-1108.

Lindow, S.E. (1983). The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annual Review of Phytopathology*. 21:363-84.

Lindow, S.E., Arny, D.C., en Upper, C.D. (1978). Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Applied and environmental microbiology*. 36(6):831-838.

Lindow, S.E., Leveau, J.H.J., en Loper, J.E. (2007). Reporter gene systems useful in evaluation in situ gene expression by soil- and plant-associated bacteria. *In: Manual of Environmental Microbiology, Third Edition*. Hurst, C.J., Crawford, R.L., Lipson, D.A., Mills, A.L., en Stetzenbach, L.D. (Eds). p. 734-747. American Society for Microbiology Press, Washington DC.

Lynn, S., Noto, G.D., en Brandes, J. (1988). Fermentation of microorganisms having ice nucleating activity using a defined medium. EU patent0272669A2.

Mizuno, H. (1989). Prediction of the Conformation of Ice-Nucleation Protein by Conformational Energy Calculation. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 5:47-65.

Möhler, O., Georgakopoulos, D.G., Morris, C.E., Benz, S., Ebert, V., Hunsmann, S., Saathoff, H., Schnaiter, M., en Wagner, R. (2008). Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria : new laboratory experiments at simulated cloud conditions. *Biogeosciences*. 5:1425-1435.

Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., en Thompson, B.M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME journal*. 2(3):321-334.

Mullin, J.W. (2001). Primary nucleation. *In: Crystallization, 4th Edition*. p. 182-184. Butterworth-Heinemann, Oxford.

Nejad, P., Ramstedt, M., Granhall, U., Roos, S., en McIvor, I. (2006). Biochemical characterization and identification of ice-nucleation-active (INA) willow pathogens by means of BIOLOG® MicroPlate, INA gene primers and PCR-based 16S rRNA gene analyses. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 113(3):97-106.

Nemecek-marshall, M., Laduca, R., en Fall, R. (1993). High-level expression of ice nuclei in a *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and low temperature. *Journal of bacteriology*. 175(13):4062-4070.

Pattnaik, P., Batish, V.K., Grover, S., en Ahmed, N. (1997). Bacterial nucleation: Prospects and perspectives. *Current Science*. 72(5):316-320.

Phelps, P., Giddings, T.H., Prochoda, M., en Fall, R.A.Y. (1986). Release of Cell-Free Ice Nuclei by *Erwinia herbicola*. *Journal of bacteriology*. 167(2):496-502.

Šantl-Temkiv, T., Sahyoun, M., Finster, K., Hartmann, S., Augustin-Bauditz, S., Stratmann, F., Wex, H., Clauss, T., Nielsen, N.W., Sørensen, J.H., Korsholm, U.S., Wick, L.Y., en Karlson, U.G. (2015). Characterization of airborne ice-nucleation-active bacteria and bacterial fragments. *Atmospheric Environment*. 109:105-117.

Schnell, R.C., en Vali, G. (1976). Biogenic Ice Nuclei: Part I. Terrestrial and Marine Sources. *Journal of The Atmospheric Sciences*. 33:1554-1564.

Skirvin, R.M., Kohler, E., Steiner, H., Ayers, D., Laughnan, A., Norton, M.A., en Warmund, M. (2000). The use of genetically engineered bacteria to control frost on strawberries and potatoes. Whatever happened to all of that research? *Scientia Horticulturae*. 84:179-189.

Skwarek, L.C., en Boulianne, G.L. (2009). Great Expectations for PIP: Phosphoinositides as Regulators of Signaling During Development and Disease. *Developmental Cell*. 16:12-20.

Sun, D., en Zheng, L. (2006). Innovations in Freezing Process. *In: Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. Sun, D. (Ed). p. 175-192. Taylor & Francis Group, New York.

Sundin, G., en Rothwell, N. (2010). Michigan State University Extension, Department of Plant, Soil and Microbial Sciences. Bacterial canker, ice nucleation, frost injury and blossom blast in sweet cherries. http://msue.anr.msu.edu/news/bacterial_canker_ice_nucleation_frost_injury_and_blossom_blast_in_sweet_che. Geraadpleegd op 4 november 2014.

Thermo Fisher Scientific. (2015). B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/78248>. Geraadpleegd op 5 mei 2015.

Thermo Fisher Scientific. (2015). Platinum® Pfx DNA Polymerase. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11708013>. Geraadpleegd op 4 mei 2015.

Turner, M.A., Arellano, F., en Kozloff, M.L. (1991). Components of ice nucleation structures of bacteria. *Journal of Bacteriology*. 173(20):6515-6527.

Vali, G. (1971). Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *Journal of the atmospheric sciences*. 28:402-409.

van Bloois, E., Winter, R.T., Kolmar, H., en Fraaije, M.W. (2011). Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology*. 29(2):79-86.

Wantanabe, M., en Arai, S. (1994). Bacterial ice-nucleation activity and its application to freeze concentration of fresh foods for modification of their properties. *Journal of Food Engineering*. 22(4):453-473.

Warren, G., Corotto, L., en Wolber, P. (1986). Conserved repeats in diverged ice nucleation proteins structural genes from two species of *Pseudomonas syringae*. *Nucleic acids Res*. 14:8047-8060.

Wilson, P.W., Heneghan, A.F., en Haymet, A.D.J. (2003). Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. *Cryobiology*. 46:88-98.

Widehem, P., en Cochet, N. (2003). *Pseudomonas syringae* as an ice nucleator—application to freeze-concentration. *Process Biochemistry*. 39(4):405-410.

Woerpel, M.D. (1980). Snow making. US Patent 4200228.

Wolber, P.K. (1993). Bacterial Ice Nucleation. *In: Advances in Microbial Physiology*, volume 34. Rose, A.H. (Ed). p. 203-235. Academic Press Limited, London.

Wu, P., Giridhar, R., en Wu, W. (2006). Surface Display of Transglucosidase on *Escherichia coli* by Using the Ice Nucleation Protein of *Xanthomonas campestris* and Its Application in Glucosylation of Hydroquinone. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(6):1138-1147.

Wu, Z., Qin, L., en Walker, V. (2009). Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from '*Pseudomonas borealis*'. *Microbiology (Reading, England)*. 155:1164-1169.

Yang, C., Cai, N., Dong, M., Jiang, H., Li, J., Qiao, C., Mulchandani, A., en Chen, W. (2008). Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. *biotechnology and bioengineering*. 99(1):30-37.

Zhang, S., Wang, H., en Chen, G. (2009). Effects of *Pseudomonas syringae* as bacterial ice nucleator on freezing of model food. *Journal of Food Engineering*. 94(4):248-253.

Zhang, S., Wang, H., en Chen, G. (2010). Addition of ice-nucleation active bacteria: *Pseudomonas syringae* pv. *panici* on freezing of solid model food. *Food Science and Technology*. 43(9):1414-1418.

Bijlagen

A *Biobrick onderdeel BBa_K584024 (3758 bp)*

aaagaggagaaa tactagatg aatctcgacaaggcgttggtgctgctgctacctgtgcaaataacatggccgatcactg
cggccttatatgcccgcgtccggcacggtggaatccagatactggcagtcaccaggcggcatgagaatggtctgg
tcggtttactgtggggcgctggaaccagcgcttttctaagcgtgcatgccgatgctcgatggattgtctgtgaagttgcc
gttgcacacatcatcagtctggaagagccgggaatggtcaagtttcgcggggccgaggtggttcagtcggcgacag
gatcagcgcgtcacacttcatttcggcacgtcaggccgaccctgcgtcaacatcaacatcaacgttaacgccaatgcc
cactgccatacccagcccatgcctgcccgtagcaagtgtcacgttacgggtggccgaacaggcccgatgaagtgtt
cgatgtcgcgtcggtcagcgcggctgccgccccagtaaaccctgccggtgacgacgccgcagaatgtgcagacc
gccacttacggcagcacgttgagtggcgacaatcacagtcgtctgattgccggttatggcagtaacgagaccgctgg
caaccacagtgatctaattgccggttatggaagtacaggcaccgcccgtccgacagctggctggctcgctggctatg
gaagcaccagaccgcccgtggggacagcgcgtgacagcgggttacggcagcaccagaccgcccgcgaaggc
agcaacctgacggcagggtagggcagcaccggcacggcaggctcggacagttcgctgatcgccggttacggcagt
actcagacttcggggggggacagctcactcacagcgggttacggcagcacgcaaaccggtcaggaaggcagcaat
ctcaccgctgggtatggcagcaccggcacggcagggtcggacagctccttgatcgccggttatggcagtacacaaac
ctcggggaggcgacagttcgctgaccgcccgtacggcagtagcagacggcccaggagggcagcaatctgacggc
ggggtagggcagcacgggtacagcaggtgtcgacagctctctgatcgccggatacggcagcacgcagacctcggg
aagtgcagcgcctgaccgagggctatggcagcacgcaaaccgcccaggaaggcagcaatctcactgctgggtat
ggcagcaccggcacggcaggttcgacagctcgctgatcgccggttacggcagcacgcaaaccctcgggcagtgaca
gctcgctcacggcggggtagggcagtagcagacgggtcaggaaggcagcattctgacggcggggtagggcagca
cgggtacagcaggtgtcgacagttcgttgatcgccgatatggcagcacgcagacctcgggaagtgcagtgcgct
gacagcgggttacggcagcacgcaaaccgcccaggaaggcagcaacctgacggcggggtacggcagcactggca
cggcaggtgccgacagttcgttgatcgccgatatggcagcacgcagacgtcaggcagcgaagttcgcttaccgc
aggctatggcagtagccagactgccggtgagggcagcacctgacggccgatatggcagtagccgaacagctgg
cgctgacagctcgctgatcgccggttacggcagcacgcaaaccctcgggcagtgaaagctcgctcacggcaggttatg
gcagtagccagaccgcagcagggcagcgtactcacatcaggctatggcagtagcgaacggccgggggtgcc
gtaacctcaccaccggttacggaagtacaggtaccgaggtcacgagagtttcatcattgcgggttatggaagtacac
agacagcggggccacaaaagtatcctgaccgctgggttatggcagtagcagcggccagggacggtagcgacctgat
tgccgggctatggcagtagcgggaaccgagggctcgggcagttcgctgatcgaggttatggcagcaccagaccgcg
agttacagaagcatgctgaccgccggttatggcagtagccagaccgagagaacacagcgacctgtcacaggct
atggcagcacttcaacggcaggggtcaaacagttcgctgatcgccggtatggaagcactcagacggcggggtcaa
aagcactactgaccgccggttacggcagtagccagacggcacaggagcgcagagcctggtcgaggctacggaag
cacgtcgactgcgggctattcagttccttgatcgccggtatggcagcacgcagacggcaggtacgaaagcacgt
tgaccgccggttacggcagtagcgaacccgctcaggaaaacagctcgctcaccacaggttacggaagtacttctact
gcgggctattcagctcgctcatcggggttacggcagtagcgaacggcagggtacgagagcacgttgaccgccg

gttacggtagtagcgaaccgcgaggagcgcagtgatctggtgacaggttatggaagtacctccaccgccggctat
gagagctcgctgattgcgggttatggcagcagcagactgcgggttatgagagcacgttgaccgccggttacggcag
cacgcaaacgcacaggaaaacagctcgctcaccaccgggtacggaagtacctccacagccggctttgccagctcg
ctgatctccgggttatggcagtagcagacagccggctataaaagtacctcacggccgggttacggcagtagctagacc
gcagagtatggaagctcactcactgcgggtacggcagcactgcaacggccgggcaggacagttcattgatagccg
gctatggcagctccctgaccagcgggaatcagaagtttctgacggcaggctatggcagtagcgtgatcgccggacttc
gcagcgttttgatcgccgggttatggcagtagtcttacatcgggcggttcgcagcacgttgactgcgggttatggcagtaa
ccagattgcaagttacggcagctcggtgattgcaggccatgaaagcattcagggtcgccgaaataaaagcatgtgta
tcgccggaagggcagctcgacagcagcaggttttcgcagcacgctgattgccggtgcgggcagtgtaactggc
gggtgatcgacgccggtgattgccggtgcagacagtaatcagaccgccgggtgaccgcagcaactgctggccggt
aataacagttatctgactgccggcgatagaagcaactgaccggccgggcagtgactgcaccctgatggcgggagacc
aaagcagattgaccgctggtgaagaacagtggtcttgacggcaggcgctcgtagcaaactgattggcagtgaggctc
gacgctctcggttgagaagactccatactattttcaggctctgggacgggaagaggtacaggcaactggtcgcca
gaacgggtgagaacggtgttgaggccgacataccgtattacgtgaacgaagatgacgatattgtcgataaaccga
cgaggacgatgactggatagaggtaaagtagtactagagccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaa
gactgggcctttcgttttatctgtgtttgctgggtgaacgctcttactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctt
tctgcgtttata

Legende:

[NNNN]: Ribosoombindende plaats (RBS)

[NNNN]: Start- stopcodon van het *inaZ* gen afkomstig van het *P. syringae* S203
ijsnucleatiegen.

[NNNN]: Transcriptionele T1 terminator van *E. coli* rrnB

[NNNN]: Transcriptionele TE terminator van coliphageT7 voor het *E. coli* RNA
polymerase

B Biobrick onderdeel BBa_K584027 (3801bp)

ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctagctactagagaaagaggagaaaactagatgaatctcgacaagg
cgttggtgctgcgtacctgtgcaaataacatggccgatcactgcggccttatatggcccgcgtccggcacggtggaat
ccagatactggcagtcacccaggcgcatgagaatggctggtcggtttactgtggggcgctggaaccagcgcttttc
taagcgtgcatgccgatgctcgatggattgtctgtgaagttgccgttgacacatcatcagtcctggaagagccgggaa
tggtaagtttccgcggggcgaggtggtcatgtcggcgacaggatcagcgcgctcacacttcatttcggcacgtcagg
ccgacctgcgtcaacatcaacatcaacgttaacgccaatgccactgccataccacgcccattgctgccgtagcaa
gtgtcacgttacgggtggccgaacaggcccgtcatgaagtgttcgatgtcgcgctgggtcagcgcggtgccgccccca
gtaaacaccctgccggtgacgacgcccagagaatgtgcagaccgccacttacggcagcacgttgagtggcgacaatc
acagtcgtctgattgccggttatggcagtaacgagaccgctggcaaccacagtgatctaattgccggttatggaagta
caggcacccggtccgacagctggctggtcgctggctatggaagcaccagaccggtggggacagcgcgct
gacagcggttacggcagcaccagaccgcccgcgaaggcagcaacctgacggcaggttacggcagcaccggga
cggcagggtcgacagttcgctgatcgccggttacggcagtagctcagacttcggggcggggacagctcactcacagcg
ggttacggcagcacgcaaaccggtcaggaaggcagcaatctaccgctgggtatggcagcaccggcacggcaggc
tcggacagctccttgatcgccggttatggcagtacacaaacctcgggagggcagagttcgctgaccgcggttacgg
cagtacgcagacggcccaggaggcagcaatctgacggcggggtacggcagcacgggtacagcaggtgtcgaca
gctctctgatcgcgggatacggcagcacgcagacctcgggaagtgcagcgccctgaccgagggtatggcagcac
gcaaaccgcccaggaaggcagcaatctcactgctgggtatggcagcaccggcacggcaggttcgcagagctcgctg
atcgccggttacggcagcacgcaaacctcgggcagtgcagctcgctcacggcggggtacggcagtagcagacg
gctcaggaaggcagcattctgacggcggggtacggcagcacgggtacagcaggtgtcgacagttcggtgatcgccg
gatatggcagcacgcagacctcgggaagtgcagtgcgctgacagcggttacggcagcacgcaaaccgcccag
gaaggcagcaacctgacggcggttacggcagcactggcacggcaggtgccgacagttcggtgatcgccggatat
ggcagcacgcagacgtcaggcagcgaaagttcgcttacgcagggtatggcagtagccagactgcccgtgagggc
agcaccctgacggccggtatggcagtagccgaacagctggcgctgacagctcgctgatcgccggttacggcagca
cgcaaacctcgggcagtgaaagctcgctcacggcaggttatggcagtagccagaccgcagcagggcagcgtagt
cacatcagggtatggcagtagccaaaccgcccgggtgccagtaacctcaccaccggttacggaagtacaggtacc
gcaggtcacgagagttcatcattcggggttatggaagtacacagacagcgggccacaaaagtatcctgaccgctgg
ttatggcagtagctcagacggccaggacggtagcgacctgattcggggtatggcagtagcgggaaccgaggctcg
ggcagttcgctgatcgaggttatggcagcaccagaccgcaggttacagaagcatgctgaccgcccgttatggcag
taccagaccgcccagagaacacagcgacctgtcacagggtatggcagcacttcaacggcaggggtcaaacagttcg
ctgatcgccggtatggaagcactcagacggcggttcaaaagcatactgaccgcccgttacggcagtagccaga
cggcacaggagcgacgagcctggtcgaggctacggaagcacgtcgactcgggctattccagttccttgatcgcc
ggctatggcagcacgcagacggcagggtacgaaagcacgttgaccgcccgttacggcagtagcgaaccggtcag
gaaaacagctcgctcaccacaggttacggaagtacttctactcggggtattccagctcgctcatcgcggttacggc
agtagcgaaccggcagggtacgagacggttagccgcccgttacggtagtagcgaaccgcgaggagcgagcag
gatctggtgacaggttatggaagtacctccaccgcccgtatgcgagctcgctgattcggggttatggcagcacgca
gactcggggttatgagagcacgttagccgcccgttacggcagcacgcaaaccgcagggaaaacagctcgctcacc

accgggtacggaagtacctccacagccggctttgccagctcgctgatctccggttatggcagtacgcagacagccgg
ctataaaagtaccctcacggccggttacggcagtactcagaccgcagagtatggaagctcactcactgcgggctacg
gcagcactgcaacggccggggcaggacagttcattgatagccggctatggcagctccctgaccagcgggaatcagaag
ttttctgacggcaggctatggcagtacgctgatcgccggacttcgcagcgttttgatcgccggttatggcagtagcttta
catcgggcggttcgcagcacggtgactgcgggttatggcagtaaccagattgcaagttacggcagctcggttgattgcag
gccatgaaagcattcaggtcgccggaaataaaagcatgctgatcgccggcaagggcagctcgagacagcaggttt
tcgcagcacgctgattgccggtgcgggcagtgtaactggcgggtgatcgagccggttgattgccggtgcagaca
gtaatcagaccgcgggtgaccgcagaaactgctggccggttaataacagttatctgactgccggcgatagaagcaa
actgaccggcgggcatgactgcaccctgatggcgggagaccaaagcagattgaccgctggtagaacagtgctcttg
acggcaggcgctcgtagcaaactgattggcagtgaaaggctcgacgctctcggtggagaagactccatactattttc
aggctctgggacgggaagaggtacaggcaactggtcgccagaacgggtgagaacggtgttgaggccgacatacc
gtattacgtgaacgaagatgacgatattgtcgataaaccgcagaggacgatgactggatagaggtaaagtagtac
tagagccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttgtttgtcgggtgaac
gctcttactagagtcacactgggtcaccttcgggtgggcctttctgcgtttata

Legende:

[NNNN]: Constitutieve promoter J23119

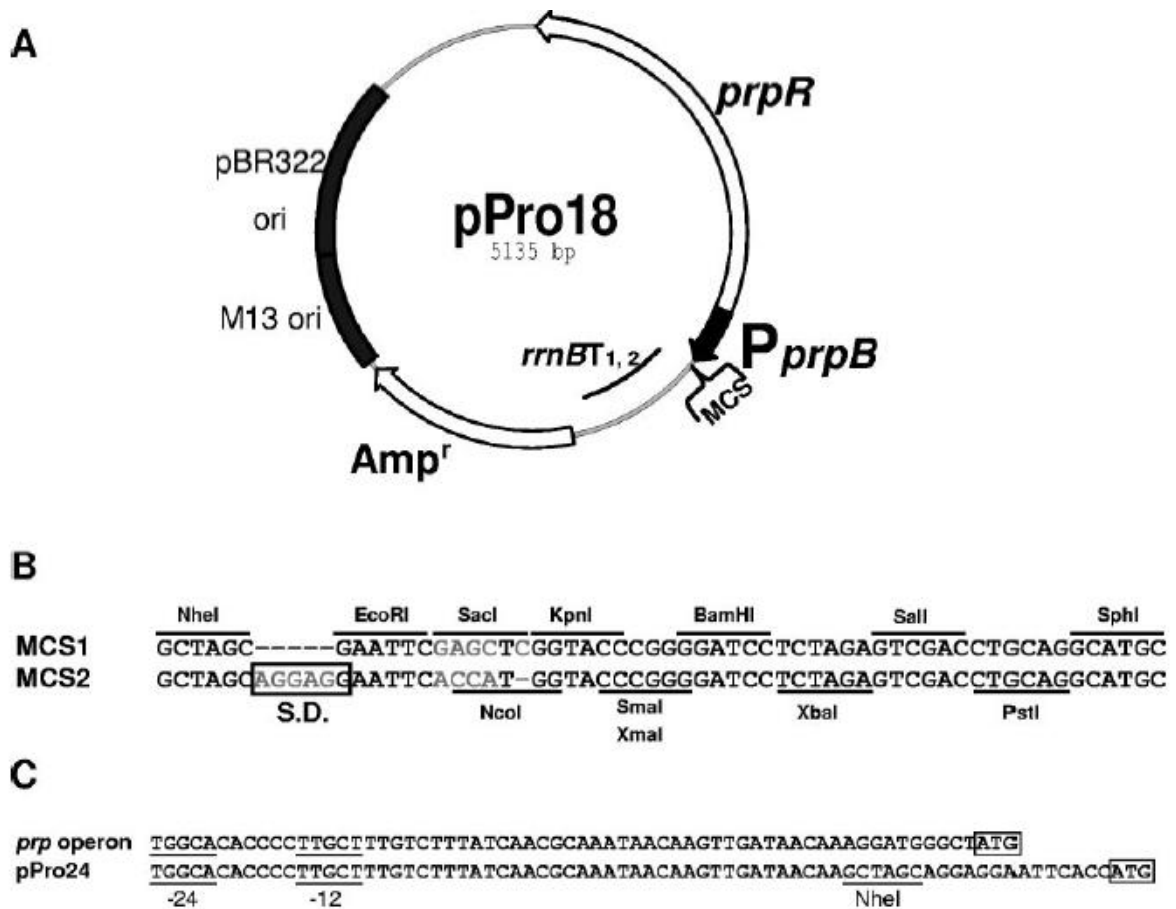
[NNNN]: Ribosoombindende plaats (RBS)

[NNNN]: Start- stopcodon van het *inaZ* gen afkomstig van het *P. syringae* S203
ijsnucleatiegen.

[NNNN]: Transcriptionele T1 terminator van *E. coli* rrnB

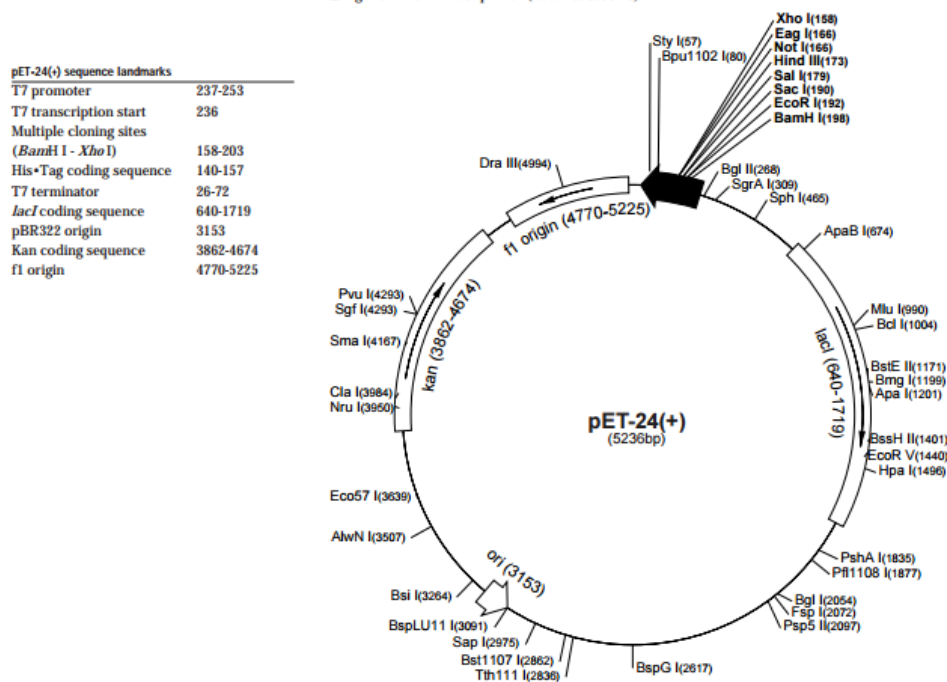
[NNNN]: Transcriptionele TE terminator van coliphageT7 voor het *E. coli* RNA
polymerase

C pPro24



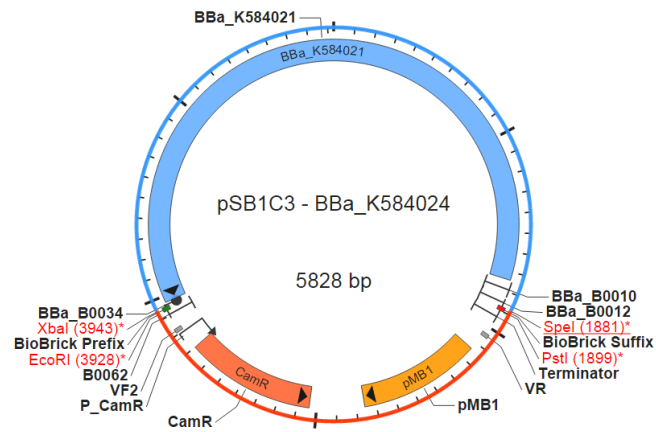
(A) Vectormap van pPro18 en pPro24 vector bestaande uit een transcriptionele activator (*prpR*), een propionaat induceerbare *prpBCDE* promotor (P_{prpB}), een transcriptionele terminator (*rrnBT*), een Ampicilline resistentiegen (Amp^r), een origin of replication (pBR322) en een intergenische regio (M13). **(B)** multiple cloning site 1 (MCS1) voor pPro18 en MCS2 voor pPro24. **(C)** De -12/-24 regio's van de *prpBCDE* promotor en geïntegreerde *NheI* site voor de pPro24 (Lee en Keasling, 2005).

A

**B**

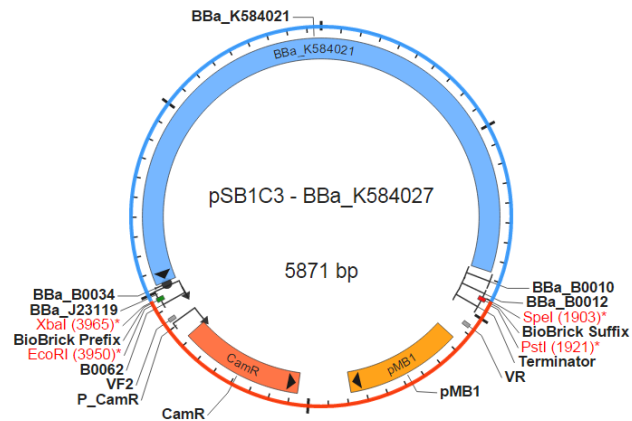
(A) Vectormap van pET24-vector bestaande uit een *LacI*-operon, een, een kanamycine resistentiegen (kan), een ColE1 origin of replication, een f1 origin of replication en een kloneringsgebied. **(B)** Kloneringsgebied van de pET24-vector bestaande uit de T7 promotor, *lac* operator, multiple cloning site, His-tag en T7 terminator (Novagen, 2015).

E *pSB1C3-BBa_K854024*



pSB1C3-BBa_K854024 vector bestaande uit een chlooramfenicol resistentiegen (CamR), een origin of replication (pMB1) en *BBa_K584024* fragment met BioBrick prefix en suffix. Dit *BBa_K584024* fragment bevat een RBS, het *inaZ* uit *P. syringae* S203 en twee terminators (iGEM, 2011).

F *pSB1C3-BBa_K854027*



pSB1C3 -BBa_K854027 vector bestaande uit een chlooramfenicol resistentiegen (CamR), een origin of replication (pMB1) en BBa_K584027 fragment met BioBrick prefix en suffix. Dit BBa_K584027 fragment bevat een constitutieve promoter, eenRBS, het *inaZ* uit *P. syringae* S203 en twee terminators (iGEM, 2011).

© Copyright KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, kan u zich richten tot KU Leuven Technologiecampus De Nayer, Jan De Nayerlaan 5, B-2860 Sint-Katelijne-Waver, +32 15 31 69 44 of via e-mail iiw.denayer@kuleuven.be.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in deze masterproef beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

FACULTEIT INDUSTRIELE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
TECHNOLOGIECAMPUS DE NAYER
Jan De Nayerlaan 5
2860 SINT-KATELIJNE-WAVER, België
tel. + 32 15 31 69 44
iiw.denayer@kuleuven.be
www.iiv.kuleuven.be

