

# **Bio-Ingenieurswetenschappen Bachelorproef**

# Potentieel van levende therapeutica onderzoeken door gerichte genetische manipulatie

Alita D'hoore<sup>a</sup>, Marie Geraerts<sup>a</sup>, Lore De Sitter<sup>a</sup>, Charlotte Van Moorleghem<sup>a</sup>, Dieter Vandenheuvel<sup>a</sup>, Eline Cauwenberghs<sup>a</sup>, Jelle Dillen<sup>a</sup>, Nele Van de Vliet<sup>a</sup>, Sarah Lebeer<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departement Bio-ingenieurswetenschappen, Labo voor Toegepaste Microbiologie en Biotechnologie, Universiteit van Antwerpen, Groenenborgerlaan 171, 2020 Antwerpen, België.

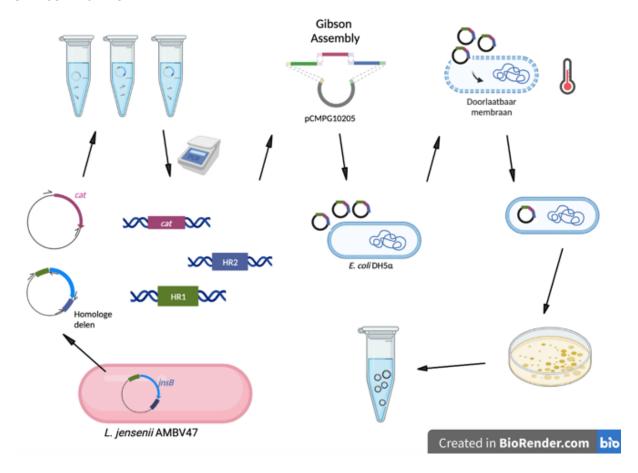
## Kernwoorden

Vaginaal microbioom Lactobacillus jensenii Dubbele homologe recombinatie Knock-out mutant Probiotica

# **Abstract**

Antibioticaresistentie is een groeiend probleem in onze maatschappij. Het vaginaal microbioom wordt hier ook door getroffen waardoor vaginale infecties steeds moeilijker te behandelen zijn. In deze omgeving zijn lactobacillen, zoals *Lactobacillus jensenii*, veelvoorkomende bacteriën. Deze bacterie heeft mogelijk een gezondheidsbevorderend effect door het uitscheiden van antimicrobiële componenten. Echter, de functie van de genen betrokken in de productie van deze antimicrobiële componenten kan worden uitgeschakeld via dubbele homologe recombinatie. Na het maken van de *knock-out* mutant, kan de functie bevestigd worden. Door *L. jensenii* beter te begrijpen, kunnen er meer gerichte probiotische behandelingen ontwikkeld worden, die als alternatief kunnen dienen voor een antibioticabehandeling.

#### **GRAFISCH ABSTRACT**



#### **INLEIDING**

Antibiotica worden wereldwijd ingezet om bacteriële infecties te bestrijden. Ook wordt er nog vaak antibiotica voorgeschreven bij verkoudheden, griepsymptomen en bronchitis. Deze infectieziekten worden meestal veroorzaakt door virussen die niet bestreden kunnen worden met antibiotica.[1] Dit zorgt voor een overconsumptie van antibiotica, wat de ontwikkeling van antibioticaresistentie bevordert. Naar schatting sterven er jaarlijks zo'n 533 mensen aan een infectie door een antibioticaresistente bacterie in België.<sup>[2]</sup> Als deze consumptie van antibiotica niet vermindert, zal dit in 2050 stijgen tot 22500 slachtoffers per jaar in België.[3] Dit toont aan dat er nood is aan alternatieve behandelingen, waardoor antibiotica vermeden kan worden en ook resistente pathogenen bestreden kunnen worden.

Niet enkel antibioticaresistentie is een gevolg van de overconsumptie van antibiotica, maar ook de verstoring van het natuurlijke microbioom, waaronder het vaginaal microbioom, is een gevolg. Belangrijke bacteriën, die van nature in de vagina voorkomen, worden gedood waardoor het evenwicht verstoord wordt. De omgeving verzwakt en de vagina wordt meer vatbaar voor pathogenen. Enkele voorbeelden van de meest voorkomende bacteriën in de vagina van vrouwen Lactobacillus, gezonde zijn: Streptococcus, Proteobacteria, Actinobacteria Bacteroides. [4] Het aandeel aan bacteriën in de vagina verschilt van vrouw tot vrouw en het is ook afhankelijk van onder andere de hormonale status en de leeftijd. Uit onderzoek blijkt dat lactobacillen, waaronder L. jensenii, bij 89,7% van de witte vrouwen, 59,6% van de donkere vrouwen en 91% van de Aziatische vrouwen dominant aanwezig zijn.<sup>[5]</sup> Deze bacteriën zijn in staat om afbraakproducten van glycogeen, zoals maltose, maltotriose en  $\alpha$ -dextrines, om te zetten naar melkzuur, wat dan weer zorgt voor een verzuring van de vaginale omgeving tot een pH van drie à vier. Pathogenen kunnen in deze omstandigheden moeilijk overleven en bijgevolg is de vagina beter beschermd tegen ziektes.[6]

Het begrijpen van de functies van de bacteriën in het vaginaal microbioom kan helpen gepersonaliseerde behandelingen met probiotica te ontwikkelen.<sup>[7]</sup> "Probiotica zijn levende microorganismen die bij toediening in voldoende hoeveelheden een gezondheidsbevorderend effect hebben op de gastheer."[8] Dit effect kan bereikt worden op drie manieren. De eerste manier is dat micro-organismen pathogenen inhiberen. Ten tweede kunnen ze een immuunreactie van de gastheer antimicrobiële initiëren. Als laatste kunnen componenten geproduceerd worden.

Er werd reeds beschreven dat *Lactobacillus jensenii* onderdeel uitmaakt van het vaginaal microbioom.<sup>[9]</sup>

Over het genoom van *L. jensenii* is over het algemeen nog weinig bekend. Er wordt vermoed dat de *jns*-gencluster instaat voor de productie van een antimicrobiële component via een enzymatische *pathway*. De gencluster bestaat uit *jnsT, jnsR, jnsB, jnsA* en *jnsC* waarvan *jnsB* vermoedelijk de eerste reactie in deze *pathway* katalyseert. Deze functie kan bevestigd worden door een *knock-out* mutant waarbij *jnsB* wordt uitgeschakeld en de productie van de component wordt geïnhibeerd.

Het uitschakelen van genen kan met verschillende technieken worden uitgevoerd. Met *prime editing* kunnen er gerichte puntmutaties, namelijk indels, ingebouwd worden waardoor het genproduct geïnactiveerd wordt. Deze techniek heeft een hoge efficiëntie door deze gerichte indels. Met homologe recombinatie daarentegen kan het gen volledig verwijderd worden. Homologe recombinatie is een veelgebruikte techniek waardoor er in het verleden al veel succesvolle resultaten mee bereikt zijn. Gezien deze voordelen, werd er gekozen om in deze studie met homologe recombinatie te werken.

In dit project wordt het potentieel van levende therapeutica in de vagina onderzocht. Meer specifiek wordt er gefocust op *jnsB* van *Lactobacillus jensenii* AMBV47. Door het genoom van L. jensenii beter in kaart te brengen en te begrijpen wat deze genen als effect hebben in de vagina, wordt gezondheidsbevorderende werking duidelijker. Hierdoor zou deze bacterie ingezet kunnen worden om de algemene gezondheid van de vagina te bevorderen en om een effectief alternatief te bieden voor antibiotica.

## **MATERIAAL EN METHODEN**

# Bacteriële stammen en plasmiden

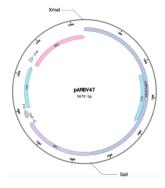
Er werd gebruik gemaakt van L. jensenii AMBV47 (Lab of Applied Microbiology and Biotechnology), deze bacterie werd opgegroeid in een De Man, Rogosa en Sharpe (MRS)-medium bij 37 °C. Het plasmide, namelijk pCMPG10205, diende als backbone. Dit werd uit *Escherichia coli* geïsoleerd. *E. coli* DH5lpha werd al schuddend gekweekt bij 37 °C in Lysogeny Broth (LB)-medium. De volgende antibiotica werden gebruikt: erythromycine [130 µg/mL] voor E. coli DH5 $\alpha$ ; chlooramfenicol [25 µg/mL] voor *E. coli* DH5 $\alpha$ en [5 μg/mL] voor *L. jensenii*. De selectiemerker chlooramfenicol acetyltransferase (cat) werd geïsoleerd uit pNZ5319.[10]

# **Knock-out** mutant ontwerpen

Upstream en downstream van jnsB werden twee homologe regio's van ongeveer één kilobasen, respectievelijk homologe regio 1 (HR1) en homologe regio 2 (HR2), geselecteerd uit het genoom van L.

jensenii AMBV47. Cat, geïsoleerd uit pNZ5319, gebruikt werd selectiemerker. Met behulp van Gibson Assembly konden de drie fragmenten geligeerd worden in het plasmide (pCMPG10205). plasmide bevat erythromycineresistentie (ery).

resistentie (*ery*).
Hierdoor kon met de combinatie van chlooramfenicol en erythromycine de juist



Figuur 1. Genetische kaart van de geassembleerde vector. Gemaakt met Biorender.

geassembleerde vector opgegroeid worden via selectiedruk.

# PCR van HR1, HR2 en cat

Voor de amplificatie van HR1, HR2 en cat werd een mastermix voorbereid, zoals aangegeven in Tabel 1. Deze werd verdeeld over 12 reacties zodat een gradiënt-PCR uitgevoerd kon worden met behulp van Mastercycler<sup>™</sup> Nexus thermal Cycler (Eppendorf $^{TM}$ , Hamburg, Duitsland) waarbij verschillende annealingstemperaturen getest werden, gaande van 48 °C tot 68 °C. Het gebruikte PCR-profiel wordt weergegeven in Tabel 2 en de gebruikte primers worden voorgesteld in Tabel 3.

Tabel 1. Mastermix compositie met Q5 DNA-polymerase. Er werd aangelengd met nuclease-vrij water tot een totaalvolume van 25  $\mu$ L.

Component	1x
Q5 buffer [5x]	5 μL
dNTPs [10 mM]	0,5 μL
Forward primer [10 μM]	1,25 μL
Reverse primer [10 μM]	<b>1,25</b> μL
Q5 DNA-polymerase [2 U/μL]	0,25 μL
Nuclease-vrij water (NVW)	x μL
Template-DNA	50 - 100 ng
Totaalvolume	25 μL

Bovendien werd er voor elk fragment nog een negatieve controle toegevoegd waarbij template-DNA werd vervangen door nuclease-vrij water (NVW).

**Tabel 2. PCR-profiel met Q5 DNA-polymerase.** De stappen denaturatie, annealing en elongatie werden 30 keer herhaald.

	T (°C)	Tijd
Initiële denaturatie	98	30"
Denaturatie	98	10"
Annealing	48 - 68	30"
Elongatie	72	1'
Finale extensie	72	10'

# Gelelektroforese van HR1, HR2 en cat

Visualisatie van de DNA-fragmenten, werd uitgevoerd m.b.v. een 1% agarosegel, gemaakt met de TAE-buffer (40 mM tris, 20 mM azijnzuur, 10 mM EDTA) en 1  $\mu$ L/10 mL 10000x gelred (biotium, San Francisco, Verenigde Staten). De gel werd dan geladen met een 6  $\mu$ L mengsel bestaande uit het PCR-product en 6x Tri track DNA *loading dye* (Thermo Fisher scientific, Massaschusetts, Verenigde Staten) in een 5:1 verhouding. Ter referentie werd er in het eerste laantje 3  $\mu$ L 1 kb DNA ladder *ready-to-use* (Thermo Fisher Scientific, Massaschusetts, Verenigde Staten) geladen.

Tabel 3. Primer design voor de Gibson Assembly.

Naam	Sequentie	T <sub>m</sub> (°C)
HR1_F	GCATGCCTGCAGGTCGAGTCCCTGTATCAGATAATACACCACC	69,0
HR1_R	ACGACCTTAACGCCTAAGACCCATAAACATTGCAAAAACATACAC	64,9
HR2_F	TGATGATTGGTTCGGAAGGCGCATACTTGATTTCTAATATAGGACC	64,8
HR2_R	AATTCGAGCTCGGTACCCGGATAAATCGTTGTTTCGGTTGG	67,1
CAT_F	TGTTTTTGCAATGTTTATGGGTCTTAGGCGTTAAGGTCGTT	64,5
CAT_R	ATATTAGAAATCAAGTATGCGCCTTCCGAACCAATCATC	61,3

# Opzuivering van PCR-producten en plasmiden

Succesvolle PCR-amplicons werden bij elkaar gevoegd en vervolgens werd DNA opgezuiverd met de NucleoSpin® Gel en PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Duitsland) volgens het protocol van de producent. Het plasmide (pCMPG10205), dat gebruikt werd als vector, werd uit *E. coli*-cellen geïsoleerd. De plasmide-isolatie werd uitgevoerd met de Monarch Plasmid Miniprep Kit

Protocol Card (NEB, Massachusetts, Verenigde Staten) volgens de instructies van de producent. Er was een groot volume aan plasmide, daarom werd het volume verdeeld over twee reactietubes. De miniprep werd als gevolg hiervan tweevoudig uitgevoerd. De concentratie werd gemeten met NanoDrop One<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Massaschusetts, Verenigde Staten).

# Competente E. coli DH5α-cellen maken

E. coli DH5α werd overnacht aeroob opgegroeid in 10 mL LB-medium. [11] 250 μL van de overnachtcultuur werd overgebracht in 25 mL LB en schuddend geïncubeerd voor twee uur bij 37 °C. Daarna werd de cultuur afgekoeld door deze 10 minuten op ijs te zetten. In de volgende stappen werd er altijd op ijs cultuur werd gecentrifugeerd gewerkt. De (15 minuten, 4 °C, 2000 g), supernatans werd verwijderd en de pellet werd geresuspendeerd in 10 mL ijskoude CaCl2 [0,1 M] door op en neer te pipetteren. Deze suspensie werd 30 minuten op ijs gezet en opnieuw gecentrifugeerd (4 °C, 2000 g, 10 minuten). Het supernatans werd verwijderd en de pellet werd geresuspendeerd in 1 mL ijskoude CaCl<sub>2</sub> [0,1 M] gesupplementeerd met glycerol [20%]. De cellen werden gealiquoteerd per 100 µL en meteen gebruikt of ingevroren bij -80 °C.

# Restrictie en clean-up pCMPG10205

De restrictie van pCMPG10205 met Sall en Xmal werd uitgevoerd zoals beschreven in Anza Restriction Enzyme Cloning System (Thermo Fisher Scientific, Massaschusetts, Verenigde Staten). De reactiemix werd gemaakt zoals aangegeven in Tabel 4. Vervolgens werd de reactiemix geïncubeerd bij 37 °C voor 15 minuten. Hierna werd het restrictieproduct gevisualiseerd door middel van gelelektroforese. In het eerste laantje werd de ladder geladen, in het tweede laantje werd 2  $\mu L$  geladen waardoor de twee fragmenten goed onderscheiden konden worden. In het derde laantje werd 38  $\mu L$  geladen zodat het juiste fragment, namelijk die van 2768 basenparen, behouden kon worden.

Ten slotte werd een clean-up van het plasmide uitgevoerd. Het protocol werd gevolgd zoals beschreven in NucleoSpin® Gel en PCR Clean-up kit. De concentratie werd gemeten met NanoDrop One<sup>TM</sup>.

#### **Gibson Assembly**

Het fragment van het geknipte pCMPG10205, beide homologe delen (HR1 en HR2) en *cat* werden dan aan elkaar gekoppeld via Gibson Assembly om zo een vector te verkrijgen zoals voorgesteld in Figuur 1. Hierbij werd het protocol gevolgd zoals beschreven in BioLabs: Gibson Assembly® Master Mix – Assembly E2611 (NEB, Massaschusetts, Verenigde Staten). Er werden vier fragmenten geassembleerd. Hiervoor

werd 200 ng van zowel HR1, HR2 als cat toegevoegd aan de reactiemix. Van de vector werd er 100 ng toegevoegd. De reactiemix werd aangevuld met 10  $\mu$ L Gibson Assembly Master Mix [2x] en 5  $\mu$ L NVW. Zo werd een totaalvolume van 20  $\mu$ L bekomen. Er werd ook een positieve controle uitgevoerd, waarvoor 10  $\mu$ L NEBuilder positive control (NEB, Massaschusetts, Verenigde Staten) en 10  $\mu$ L NVW werden samengevoegd. Deze reactiemixen werden geïncubeerd voor één uur bij 50 °C.

**Tabel 4. Reactiemix voor de restrictie van pCMPG10205.** Er werd aangelengd met nuclease-vrij water tot een totaalvolume van 20 µL.

1x	Component		
2 μL	Anza red buffer [10x]		
1 μg	DNA		
1 μL	Sall [10 U/μL]		
1 μL	Xmal [10 U/μL]		
χ μL	Nuclease-vrij water		
20 μL	Totaalvolume		
	<u> </u>		

#### Transformatie naar E. coli

geassembleerde plasmiden werden getransformeerd naar de competente E. coli DH5 $\alpha$ -cellen. Het protocol werd gevolgd zoals beschreven in BioLabs: Gibson Assembly® Chemical Transformation Protocol E2611. Eerst werden de competente *E. coli* DH5α-cellen ontdooid op ijs. Dan werd er in drie 1,5 mL microcentrifuge tubes 50 µL van deze cellen overgebracht. Er werd 2 µL en 10 µL van de reactiemix en 2 µL van de positieve controle toegevoegd aan de competente cellen. Het mengsel werd rustig op en neer gepipetteerd en vervolgens voor 30 minuten op ijs gezet. De hitteschok werd voor 45 seconden bij 42 °C uitgevoerd. Vervolgens werden de tubes voor twee minuten op ijs gezet. Er werd dan 950 µL Super Optimal Broth medium toegevoegd en de tubes werden voor twee uur bij 37 °C geïncubeerd in aerobe omstandigheden. Vervolgens werd er 100 µL van de getransformeerde cellen uitgeplaat. De platen bevatten LB-medium met erythromycine [130 µg/mL] en chlooramfenicol [25 μg/mL]. Er werd een verdunningsreeks gemaakt van 10°, 10<sup>-1</sup> en 10<sup>-2</sup> met een fosfaatgebufferde zoutoplossing voor zowel de getransformeerde cellen met 2 μL reactiemix als 10 μL reactiemix. De plaat met positieve controle bevatte ampicilline [150 µg/mL]. Van de positieve controle werd een verdunningsreeks van 10° tot 10-5 gemaakt. Na ongeveer 20 uur incuberen bij 37 °C werd het aantal kolonies geteld.

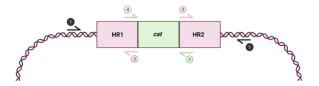
#### **Kolonie-PCR**

Er werden 15 geïsoleerde kolonies uitgekozen om als template-DNA te dienen voor de kolonie-PCR met de Mastercycler<sup>TM</sup> Nexus thermal Cycler. Elke kolonie werd gesuspendeerd in 10 μL NVW waarna ze tweemaal voor 90 seconden in de microgolf werden geplaatst op 800 Watt. Een mastermix werd voorbereid zoals aangegeven in Tabel 5.

Tabel 5. Mastermix compositie met Taq DNA-polymerase. Er werd aangelengd met nuclease-vrij water tot een totaalvolume van 25  $\mu$ L.

Component	1x
VWR buffer [10x]	2,5 μL
dNTPs [10 mM]	0,5 μL
Forward primer [10 μM]	2,5 μL
Reverse primer [10 μM]	2,5 μL
Taq DNA-polymerase [5 U/μL]	0,2 μL
Nuclease-vrij water	χ μL
Template-DNA	50 - 100 ng
Totaalvolume	25 μL

Als positieve controle werd het plasmide zonder *insert* gebruikt en er werd ook een negatieve controle toegevoegd, waarbij template-DNA werd vervangen door NVW. De PCR-reactie staat aangegeven in Tabel 6. De gebruikte primers zijn weergegeven in Tabel 7. In Figuur 2 wordt de locatie en oriëntatie van de gebruikte primers verduidelijkt. De DNA-fragmenten werden tot slot gevisualiseerd op gel zoals eerder beschreven.



**Figuur 2. Duidende figuur over de primer benamingen.** Gemaakt met BioRender.

#### Sangersequencing

Om te controleren of de fragmenten juist waren ingebouwd, werd de sequentie onderzocht door Sangersequencing. De plasmiden die in elke kolonie-PCR een bandje vertoonden, werden 1:10 verdund en in een 96-well plaat gepipetteerd. De

gebruikte primers werden in een concentratie van 5  $\mu$ M toegevoegd. Vervolgens werd de 96-well plaat afgesloten en opgestuurd voor sequencing (Neuromics Support Facility, University Antwerp). Na manuele controle van de sequenties met Geneious<sup>TM</sup> werden de getransformeerde kolonies die de juiste *inserts* bevatten, overgeënt in LB-medium met chlooramfenicol [25  $\mu$ g/mL] en erythromycine [130  $\mu$ g/mL].

**Tabel 6. PCR-profiel met Taq DNA-polymerase.** De stappen denaturatie, annealing en elongatie werden 30 keer herhaald. Ter uitzondering werd de elongatiestap van de 1-1 reactie (Figuur 2) drie minuten uitgevoerd.

	T (°C)	Tijd
Initiële denaturatie	95	2′
Denaturatie	95	30"
Annealing	50	30"
Elongatie	72	1'
Finale extensie	72	5′

# Transformatie naar L. jensenii

Het geassembleerde plasmide werd opgezuiverd uit E. coli met behulp van de Monarch Plasmid Miniprep Kit Protocol Card en de concentratie werd gemeten met NanoDrop One™. Een overnachtcultuur van *L. jensenii* AMBV47 werd geresuspendeerd in 25 MRS-medium met glycine [2%] en geïncubeerd bij 37 °C. ongeveer 16 uur werd elektroporatieprotocol gevolgd zoals beschreven in Luchansky electroporation protocol, met enkele aanpassingen. De cellen van L. jensenii AMBV47 werden gecentrifugeerd (4000 g, 4 °C, 10 minuten) en vervolgens werd het supernatans verwijderd. Daarna werd de pellet twee keer gewassen met 5 mL ijskoude SMEB [1 M sucrose, 25 mM MgCl<sub>2</sub>], na elke wasstap werden de cellen gecentrifugeerd (4000 g, 4 °C, 10 minuten) en werd het supernatans verwijderd. Het volume werd gealiquoteerd en daarna werden deze aliquots gecentrifugeerd op 6000 g en werd de pellet geresuspendeerd in 50 µL SMEB. Eén aliquot werd reeds uitgeplaat op MRS voor de elektroporatie om de initiële celconcentratie te kunnen zien. Dan werd per aliquot 5 µL van het opgezuiverd plasmide [106,6 ng/µL] toegevoegd, deze werden daarna geëlektroporeerd (25 μF, 200 Ω) bij verschillende voltages. Er werd gestart bij 2,0 kV en elke volgende elektroporatie werd uitgevoerd op 0,1 kV lager dan de vorige schok. Ook werd er een elektroporatie (25 μF, 200  $\Omega$ , 1,5 kV) uitgevoerd van een positieve controle, dit was een aliquot aangevuld met 1 µL pNZ123. Een

aliquot met 5 µL water, als negatieve controle, werd ook geëlektroporeerd (25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 1,5 kV). Na elke elektroporatie werden de cellen onmiddellijk verdund in 200 µL regeneratiebuffer (MRS, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>) en geïncubeerd voor twee uur bij 37 °C. Tot slot werd een verdunningsreeks gemaakt van 10°, alle en 10<sup>-2</sup> van aliquots met een fosfaatgebufferde zoutoplossing om dan telkens 100 µL uit te platen. Hierbij werd één aliquot uitgeplaat op enkel MRS-medium. Alle andere aliquots, waaronder de controles, werden uitgeplaat op MRS-medium met chlooramfenicol [5 μg/mL]. De platen werden tenslotte geïncubeerd bij 37 °C voor 72 uur.

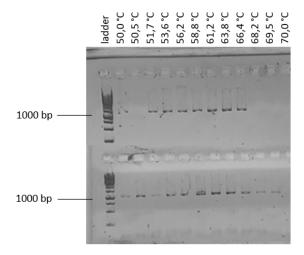
Tabel 7. Lijst van de gebruikte primers voor kolonie-PCR.

Sequentie	T <sub>m</sub> (°C)
GGCGATTAAGTTGGGTAAC	51
GCATACTTGATTTCTAATATAGGACC	51,3
GTGTATGTTTTTGCAATGTTTATGG	51,9
GGCTCGTATGTTGTGG	53,5
CCATAAACATTGCAAAAACATACAC	51,9
GGTCCTATATTAGAAATCAAGTATGC	51,3
	GGCGATTAAGTTGGGTAAC  GCATACTTGATTTCTAATATAGGACC  GTGTATGTTTTTGCAATGTTTATGG  GGCTCGTATGTTGTGTGG  CCATAAACATTGCAAAAACATACAC

# **RESULTATEN EN DISCUSSIE**

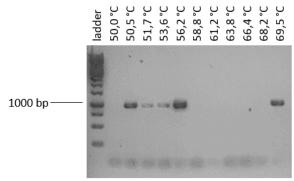
Als eerste werd een vector ontworpen met pCMPG10205 als backbone en selectiemerker cat met een homologe regio langs elke kant (Figuur 1). Vervolgens werd elk fragment geamplificeerd door middel van een PCR-reactie. Alle PCR-producten werden gevisualiseerd met behulp gelelektroforese (Figuur 3). Op deze gel is te zien dat voor HR1 de annealingstemperaturen van 50 °C tot en met 66,4 °C tot een succesvol resultaat hebben geleid met uitzondering van de annealingstemperatuur van 50,5 °C. Voor HR2 geldt hetzelfde voor temperaturen van 50 °C tot en met 69,5 °C. Vervolgens werd de concentratie gemeten met behulp van NanoDrop One<sup>TM</sup>. De resultaten hiervan zijn te vinden in Tabel 8. Voor cat was de gradiënt-PCR succesvol en werd er een bandje van de juiste lengte waargenomen bij temperaturen tussen 50,5 °C en 56,2 °C, ook was er een bandje te zien bij 69,5 °C. Dit is opmerkelijk aangezien er verwacht wordt dat er vanaf een bepaalde temperatuur geen effectieve basenparen

gevormd kunnen worden tussen het primer-matrijscomplex waardoor het DNA-fragment niet geamplificeerd kan worden.



Figuur 3. Gradiënt-PCR van HR1 (bovenaan) en HR2 (onderaan).

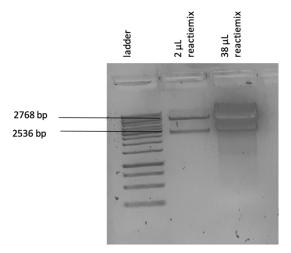
Er was ook een backbone nodig om al deze fragmenten aan elkaar te koppelen. Dit werd gedaan in pCMPG10205. Als eerste werd het plasmide opgezuiverd, dit werd in twee aliquots uitgevoerd door de grote hoeveelheid PCR-product. De resultaten van deze opzuivering zijn te vinden in Tabel 8. Vervolgens werd de restrictie uitgevoerd met Sall en Xmal. Daarna werd het restrictieproduct op gel gezet. De gelelektroforese toonde aan dat de restrictie goed gelukt was (Figuur 5). De gel vertoonde twee bandjes. Eén bandje van 2536 basenparen en één bandje van 2768 basenparen. Ten slotte werd restrictieproduct van 2768 basenparen opgezuiverd uit het derde laantje van de gel. De bekomen resultaten worden weergegeven in Tabel 8.



Figuur 4. Gradiënt-PCR van cat.

Via Gibson Assembly werden de fragmenten (HR1, HR2, cat en een deel van pCMPG10205 als backbone) aan elkaar gekoppeld.

De geassembleerde plasmiden werden dan getransformeerd met een hitteschoktransformatie naar competente  $E.\ coli$  DH5 $\alpha$ -cellen. Deze getransformeerde cellen werden in verschillende concentraties op platen aangeënt.



Figuur 5. Restrictieproduct op een agarosegel.

Na 24 uur incubatie bij 37 °C werden er kolonies waargenomen bij de onverdunde concentratie. Hieruit kon besloten worden dat er wel degelijk bacteriën waren die het ontworpen plasmide hadden opgenomen. Dit kon gesteld worden omdat de platen de antibiotica chlooramfenicol en erythromycine bevatten. Enkel bacteriën die hiervoor een resistentiemerker droegen, konden overleven en delen. Aangezien E. coli DH5α-cellen zelf deze resistentiemerker niet dragen, zullen enkel de cellen, die het juist geassembleerde plasmide met daarop de twee resistentiemerkers hebben, overleven en delen. Omdat er geen groei te zien was op de verdunde culturen, werd er besloten om de rest van de transformaties ook uit te platen. Deze werden opnieuw bij 37 °C voor 24 uur geïncubeerd.

Tabel 8. Concentratiebepalingen van verschillende DNA-fragmenten.

DNA-fragment	Concentratie (ng/μL)	
HR1	384,8	
HR2	404,7	
cat	209,9	
pCMPG10205	300,8 en 217,8	
Restrictieproduct	33	
Geassembleerde vector	106,6 en 84,7	

Na de incubatie gaven de tellingen van de kolonies (Tabel 9) aan dat de transformatie efficiënt was verlopen. Op de platen van de positieve controle was er groei waarneembaar, hieruit kon besloten worden dat de Gibson Assembly kit werkt. De platen van de bacteriën, waar 2 µL plasmide werd toegevoegd bij de hitteschok transformatie, vertoonden ook meer groei dan de culturen waar 10 µL plasmide werd toegevoegd. Op het eerste gezicht is dit resultaat contra-intuïtief. Er zou verwacht worden dat de kans dat de bacteriën een plasmide opnemen uit hun omgeving stijgt met de concentratie van dat plasmide in deze omgeving. Uit deze proef blijkt dat dit niet het geval is. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat te veel plasmiden ervoor zouden kunnen zorgen dat de cel overbelast geraakt. Hierdoor wordt er waarschijnlijk aanbevolen door de kit om slechts 2 μL toe te voegen.

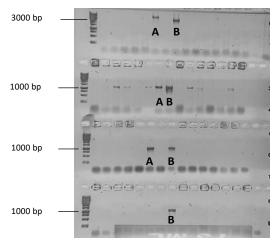
Tabel 9. Tellingen van de kolonies met getransformeerde cellen.

	00	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5
2 μL	Plaat 1: 41,90 cfu/µg Plaat 2: 31,43 cfu/µg	654,73 cfu/μg	47,14 cfu/μg	/	/	/
10 μL	0,21 cfu/μg	Plaat 1: 0,21 cfu/μg Plaat 2: 0,42 cfu/μg	0,95 cfu/μg	/	/	/
Positieve controle	0 cfu/μg	0 cfu/μg	0 cfu/μg	13,09 cfu/μg	28,81 cfu/μg	5,24 cfu/μg

Vervolgens werd er een kolonie-PCR uitgevoerd om na te gaan of alle *inserts* op een correcte manier geligeerd waren. Omdat de fragmenten die aan elkaar verbonden werden ongeveer 1000 basenparen groot waren, werden de reacties opgesplitst in verschillende deelreacties. Elke *insert* werd apart geamplificeerd en er werden verschillende kolonies over de verschillende platen getest. In totaal was er maar één kolonie (Figuur 6, kolonie B) die alle *inserts* bevatte. Een andere kolonie (Figuur 6, kolonie A) bevatte HR1 en *cat*, maar geen HR2. Dit kon te wijten zijn aan de PCR-reactie die slecht verlopen was.

De correcte fragmenten van beide kolonies werden opgestuurd voor Sangersequencing. Met behulp van Geneious™ werden de sequenties vergeleken met het ontworpen plasmide (Figuur 1). Kolonie A (Figuur 6) bleek alle *inserts* te bevatten, dus er is mogelijk iets misgelopen tijdens de PCR-reactie van HR2. Er werd echter een *insert* van 43 basenparen opgemerkt in de promoter van *cat* (Figuur 1, P32) bij zowel kolonie A als B (Figuur 6). Dit is mogelijk een vergissing van de producent waarvan de vector werd verkregen. Desalniettemin waren de kolonies resistent tegen

chlooramfenicol, wat erop wijst dat de eiwitsynthese van chlooramfenicol acetyltransferase wel heeft plaatsgevonden. Verder werden er nog een aantal verschillen opgemerkt bij kolonie B. Dit kon daadwerkelijk een mutatie zijn die was opgetreden doorheen het opgroeien van de bacteriën. Het kon ook zo zijn dat deze verschillen fouten waren in de Sangerdata.



**Figuur 6.** Agarosegel van Sangerfragmenten. Op rij één staat de 1-1 reactie waar de aanwezigheid van de volledige *insert* gecontroleerd wordt, op rij twee de 1-2 reactie waar de aanwezigheid van HR1 gecontroleerd wordt, op rij drie de 4-4 reactie voor cat en op rij vier de 3-1 reactie voor HR2.

Aangezien uit Sanger bleek dat de transformatie succesvol was, werd het plasmide opgezuiverd (Tabel 8) en geëlektroporeerd naar L. jensenii. De overnachtcultuur gaf een OD600-waarde van 0,07 A, wat duidde op onvoldoende groei. Ondanks deze waarde werd de elektroporatie toch uitgevoerd. Hierbij werden knallen en flitsen waargenomen tijdens de elektrische schok. De positieve controle was hier een uitzondering op. De getransformeerde cellen werden in verschillende verdunningen uitgeplaat. Na de incubatie werd er enkel groei waargenomen op de platen met de originele stam waarop geen elektroporatie was uitgevoerd. Er kon dus besloten worden dat de transformatie naar L. jensenii niet geslaagd was door een te hoog voltage aangezien er zeker levende bacteriën aanwezig waren voor de elektroporatie.

#### **CONCLUSIE**

Een vector voor het uitschakelen van jnsB werd in silico ontworpen. Deze werd succesvol in het labo geassembleerd en getransformeerd naar competente  $E.\ coli\ DH5\alpha$ -cellen. Dit werd bevestigd door de kolonie-PCR, door de aanwezigheid van kolonies op platen met chlooramfenicol en erythromycine en door

Sangersequencing. Deze vector kon echter niet getransformeerd worden naar L. jensenii via elektroporatie. Dit onderzoek kan verdergezet worden door het elektroporatieprotocol optimaliseren zodat de transformatie naar L. jensenii wel succesvol uitgevoerd kan worden. Er kan onderzocht worden of de uitvoering van de elektrische schok bij lagere voltages leidt tot betere resultaten. Wanneer deze transformatie naar L. jensenii gelukt is, dan kan het wild-type vergeleken worden met de knock-out mutant via antipathogene testen. Indien uit deze testen blijkt dat jnsB codeert voor de productie van antimicrobiële componenten, dan kan dit gen geamplificeerd worden om tenslotte gebruikt te worden als probiotica in de vagina. Dit zou alternatief termijn een effectief antibioticabehandelingen tegen vaginale infecties kunnen bieden. Hierdoor zou het ontwikkelen van antibioticaresistente bacteriën afgeremd kunnen worden, wat in de toekomst heel wat mensenlevens zou kunnen redden.

#### **REFERENTIES**

- [1]. sciensano (2023). Diagnose. Online beschikbaar op:
  https://www.sciensano.be/nl/gezondheidsonder
  werpen/antibioticaresitentie/diagnose#hoeworden-antibiotica-voorgeschreven[geraadpleegd op 23/04/2023].
- [2]. fagg (2016). Antibiotica. Online beschikbaar op: https://www.fagg.be/nl/menselijk\_gebruik/gene esmiddelen/geneesmiddelen/goed\_gebruik\_van\_geneesmiddelen/antibiotica [geraadpleegd op 23/04/2023].
- [3]. STATBEL (2023). Doodsoorzaken. Online beschikbaar op: https://statbel.fgov.be/nl/themas/bevolking/ster fte-en-levensverwachting/doodsoorzaken [geraadpleegd op 22/04/2023].
- [4]. Xiaodi C., Y.L., Tao C. and Rongguo L. (2021). The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 15.
- [5]. Kenetta L. Nunna, b.a.L.J.F. (2016). Unraveling the Dynamics of the Human Vaginal Microbiome. YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE, 89, pp.331-337.
- [6]. BJOG (2016). Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? Online beschikbaar op: https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10 .1111/1471-0528.14390 [geraadpleegd op

23/04/2023].

- [7]. Bing Ma1, L.J.F., and Jacques Ravel1,\* (2012). The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. *Annu Rev Microbiol*, 66, 371–389.
- [8]. Lebeer, S. (2020). microbiologie hoofdstuk 3: groei. (Issue),

- [9]. Hidemi S Yamamoto1, Q.X.a.R.N.F. (2013).

  Homeostatic properties ofLactobacillus jenseniiengineered as a live vaginal anti-HIV microbicide. *BMC Microbiology*, 13:4
- [10]. Lambert, J.M., Bongers, R.S. & Kleerebezem, M. (2007). Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in Lactobacillus plantarum. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), 1126-35.
- [11]. Vandenheuvel, D. (2021). Production of chemically competent E. coli cells. (Issue), 2.