

**Verandering van de immuunrespons van
varkensdarmepitheel cellen onder invloed
van fytostoffen, voedingszuren
en pathogene bacteriën.**

Met behulp van de invasie-assay en realtime PCR.

Naam: Simone Adolfse
Stagebegeleiders: dr. S.A. Burt & dr. R.R. Santos
Schoolbegeleider: Mevr. C. Booijsink
Stageperiode: november 2010-juni 2011
Bedrijf: Universiteit Utrecht, IRAS
Divisie Veterinaire Volksgezondheid
Divisie Veterinaire Farmacologie
Datum: mei 2011
Plaats: Utrecht

**Verandering van de immuunrespons van varkensdarmepitheel
cellen onder invloed van fytostoffen, voedingszuren en
pathogene bacteriën**

Met behulp van de invasie-assay en realtime PCR.

Afstudeerverslag

November 2010 – juni 2011

Simone Adolfse

Hogeschool Utrecht – FNT

Institute for Life Sciences & Chemistry

F.C. Dondersstraat 65

3572 JE Utrecht

Stagebegeleiders

Dr. S.A. Burt – Divisie Veterinaire Volksgezondheid (VPH)

Dr. R.R. Santos – Divisie Veterinaire Farmacologie (VFFT)

Institute for Risk Assessment Sciences

Universiteit Utrecht

Yalelaan 2

3584 CM Utrecht

Voorwoord

Deze afstudeeropdracht is uitgevoerd om mijn studie Life Sciences met specialisatie Medische microbiologie aan de Hogeschool Utrecht af te ronden. Dit was mijn researchstage. Nu mijn afstudeeropdracht is afgerond wil ik graag een aantal personen in het bijzonder bedanken. In de eerste plaats mijn stage begeleiders Sara Burt en Regiane Rodrigues dos Santos. In de 7 maanden dat mijn stage duurde heb ik erg veel geleerd van jullie. Ik had van te voren niet gedacht dat ik mijn kennis zo zou kunnen uitbreiden als hier. Ook Betty Jongerius-Gortemaker wil ik bedanken voor het helpen met de proeven. Verder wil ik alle mensen van VPH/VFFT bedanken voor alle gezelligheid en hulp. Ik heb met veel plezier aan mijn afstudeeropdracht gewerkt en kijk er tevreden op terug.

Simone Adolfse
Mei 2011

Samenvatting

Carvacrol en cinnamaldehyde komen voor in oregano en kaneel olie en geven deze oliën hun typische geur. Op dit moment worden deze stoffen gebruikt als kleur of smaakstof in voedingsmiddelen. Carvacrol en cinnamaldehyde staan ook bekend om hun remmende effecten op micro-organismen. Etherische oliën in combinatie met sommige organische zuren hebben een synergetisch effect. IRAS-VPH wil nagaan of de combinatie van organische zuren met carvacrol of cinnamaldehyde de remming op de *Salmonella* invasie in IPEC-J2 cellen nog verder kan verbeteren. Invloed van de stoffen op de bacteriën is onderzocht en verklaart nog niet helemaal hoe de invasie remming werkt. In dit project wordt daarom uitgezocht of het immuunrespons van de cellen door de aanwezigheid van carvacrol of cinnamaldehyde met/zonder organische zuren verandert. De zuren die gebruikt worden zijn cinnamic acid, formic acid, lactic acid en propionic acid.

Er wordt in dit project gewerkt met twee soorten bacteriën. De *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 en de *Escherichia coli* K88 strain 498. *S. Typhimurium* is een gram negatieve, staafvormige bacterie en is onderdeel van de natuurlijke flora van varkens, pluimvee, runderen, huisdieren en reptielen. Normaal gesproken bij de gezonde mens vormt *S. Typhimurium* geen levensbedreigend gevaar. De symptomen van een *S. Typhimurium* infectie zijn diarree, buikkrampen, braken en misselijkheid. Wanneer er door bepaalde fytostoffen de invasie geremd wordt van deze bacterie, betekend dit minder voedselvergiftigingen bij de mens.

De *E. coli* K88 is een groot probleem op de Nederlandse fok bedrijven. Het veroorzaakt diarree onder pas gespeende biggen. De speendiarree wordt veroorzaakt door "K" het capsulaire antigeen. Mocht de aanhechting van deze bacterie geremd kunnen worden door middel van fytostoffen in het voer, dan zal het aantal biggen dat besmet wordt met *E. coli* K88 verminderen.

In dit project worden de Intestinal Porcine Epithelial Cell Jejunum gebruikt. Dit zijn varkensepitheelcellen van de dunne darm. Met deze cellen is de invasieproef met *S. Typhimurium* uitgevoerd en zijn de PCR producten verzameld.

Om te zien of de immuunrespons van de cellen wordt veranderd wordt er gewerkt met de realtime-PCR. De realtime-PCR is een amplificatietechniek waarbij de toename van DNA op elk moment gevolgd kan worden. Door mate van expressie van bepaalde genen te vergelijken, valt na te gaan in hoeverre de aanwezigheid van de fytostoffen en/of bacterie de betreffende genen "aan" of "uit" schakelen. Eerst moeten de monsters verzameld worden. Dit wordt gedaan door de IPEC-J2 cellen confluent te laten groeien in een 12-wells plaat. De fytostoffen en/of de bacterie worden toegevoegd, dit wordt een uur geïncubeerd. Daarna wordt er lysisbuffer aan de wellen toegevoegd, de cellen worden los geschraapt en het product wordt in een eppendorf cup geplaatst. Wanneer de monsters zijn verzameld moet het RNA geïsoleerd worden daaruit. Wanneer dat gedaan is wordt het aantal nanogram per microliter gemeten, door middel van nuclease vrij water worden alle monsters op de dezelfde concentratie gebracht worden. Als dit allemaal gebeurd is kan worden begonnen met de PCR. In dit experiment worden 3 stabiele huishoud genen gebruikt dit zijn de TBP, SDHA en de CAT. De primers die verder gebruikt worden zijn IKBA, HPS27, HSP70, HSP70.2, HIF1A en NRF2.

Uit de resultaten van dit onderzoek is gebleken dat cinnamaldehyde alleen en in combinatie met de zuren een erg hoge expressie geeft op het HSP70 en HSP70.2 gen en de expressie van IKBA gen omlaag brengt. HSP zijn heat shock proteïnen, deze zijn indicatoren voor stress in de cel. Daarom is cinnamaldehyde geen goede behandeling omdat de cellen dus continu in stress staan. Cinnamaldehyde in combinatie met de zuren versterkt dit effect nog meer. Carvacrol geeft geen verhoogde expressie op het HSP70 en HSP70.2 gen. Bij het IKBA gen geeft carvacrol geen expressie, maar als er *S. Typhimurium* of *E. coli* bijkomt, gaat de expressie veel omhoog. In combinatie met zuren is dit effect nog beter.

Summary

Carvacrol and cinnamaldehyde are substances that are a part of oregano oils and cinnamon oils. These compounds give these oils their typical aroma. Now a days these compounds are used as colour or taste substances in food. Carvacrol and cinnamaldehyde are also known for their strong inhibitive effect against micro-organisms. Essential oils have a synergistic effect in combination with some organic acids. IRAS-VPH wants to check if the combination of organic acids with carvacrol or cinnamaldehyde can improve the restraint on the *Salmonella* invasion on IPEC-J2 cells. The influence of these substances itself is investigated. It still doesn't show us how the remedy of this invasion works. This project investigates whether the immune-response of cells change in the presence carvacrol or cinnamaldehyde in combination with organic acids. The acids that are used are cinnamic acid, formic acid, lactic acid and propionic acid.

The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 and the *Escherichia coli* K88 strain 498 are the 2 bacteria used in this project. *S. Typhimurium* is a gram negative, rod-shaped bacteria. This bacteria is a part of the natural flora of pigs, poultry, cattle, pets and reptiles. Usually this bacteria is no life threatening danger for healthy people. The symptoms of a *S. Typhimurium* infection are diarrhea, abdominal cramps, vomiting and nausea. When some fytosubstances restraint the invasion of this bacteria, it means less food poisoning with humans.

The *E. coli* is a big problem among Dutch pig breeding companies. It causes diarrhea among recently weaned piglets. The diarrhea is caused by the capsulaire antigen. Also know as "K". If the attachments of these bacteria can get be reduced by using phytocompounds in the feed, the number of pigs that will get infected with *E. coli* K88 will reduce.

Intestinal Porcine Epithelial Cell Jejunum are used in this project. These are pigs intestinal epithelial cells of the small intestine. These cells are used in the invasion assay with *S. Typhimurium*. They also make sure that the PCR products are gathered.

Working with the realtime-PCR might show us a change in the immune response. The realtime-PCR is an amplification in which the increase of DNA can be followed every minute of the day. By comparing certain expressions of genes, you can determine to what extent the phytocompounds and/or bacteria's can turn those genes off and on. The first thing that has to be done is collecting the samples. This can be done by letting the IPEC-J2 cells grow in a 12-wells plate. When the phytocompounds and/or bacteria are added this has to incubate for one hour. After this the lysisbuffer is added to the well, the cells get scraped off and the product gets placed in an eppendorf. The RNA has to get isolated from these samples. Then you have to measure the amount of Nanogram 1 microliter contains. This is measured by using nuclease free water. When using nuclease free water, all the samples reach the same concentration level. When all of this is done you can start with the PCR. During this experiment, 3 stable housekeeping genes are uses. These 3 stable housekeeping genes are TBP, SDHA and the CAT. Others primers that are used are IKBA, HPS27, HSP70, HSP70.2, HIF1A and NRF2.

The result of this study shows that cinnamaldehyde by itself and in combination with the acids, has a high expression on HSP70 and HSP70.2 genes. This brings the expression off IKBA down. HSP are heat shock proteins. They indicate stress in a cell. This is why cinnamaldehyde

is not a good treatment. Cinnamaldehyde causes a lot of stress in the cells. Cinnamaldehyde in combination with the acids enhances this effect even more.

Carvacrol gives no expression on HSP70 and HSP70.2. Carvacrol by itself gives no expression of IKBA either. When combining carvacrol with *S. Typhimurium* or *E. coli* it does give a high expression. When combining carvacrol with acids the expression of the IKBA gene increases further.

Afkortingenlijst

- C – Cinnamic acid
- CA – Cinnamaldehyde
- CAT - Catalase
- CV – Carvacrol
- ETOH – Ethanol
- F – Formic acid
- FZ – Fysiologisch zout
- HIF1A - hypoxia inducible factor 1
- HSPs – heat shock proteins
- HSP27 – heat shock protein 27
- HSP70 – heat shock protein 70
- HSP70.2 – heat shock protein 70.2
- IKBA - NFkB-inhibitor
- IPEC-J2 – Intestinal Porcine Epithelial Cells jejunum
- kDa - kilodalton
- L – Lactic acid
- LB medium – Luria Bertani medium (bouillon)
- LB-plaat – Luria Bertani agar
- MQ – Aqua dest
- NRF2 - Nuclear factor (erythroid-derived)
- OD – optical density (optische dichtheid)
- P – Propionic acid
- PCR – Polymerase chain reaction
- PFZ – Pepton fysiologisch zout
- P / S - penicilline en streptomycine
- Rpm – Revolutions per minute (omwentelingen per minuut)
- SDHA - Succinate dehydrogenase
- TBP – TATA-box binding protein

Inhoudsopgave

Voorwoord.....	7
Samenvatting.....	9
Summary.....	10
Afkortingenlijst	13
1. Inleiding	17
1.1. Carvacrol & Cinnamaldehyde.....	17
1.2. Organische Zuren	18
1.3. <i>Salmonella</i> typhimurium ATCC 14028	18
1.4. <i>Escherichia coli</i> K88 strain 498	19
1.5. IPEC-J2	19
1.6. Real-time PCR.....	19
1.7. Genen.....	21
2. Materiaal en Methoden	23
2.1. Bacteriën	23
2.1.1 <i>Salmonella</i> typhimurium ATCC 14028.....	23
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> K88 strain 498	23
2.2. Bioscreen, voor het meten van de groeicurve van bacteriën.....	23
2.3. Celcultuur	24
2.3.1 Celcondities	24
2.3.2 Onderhouden van de cellijn	24
2.4. Invasie-assay, voor het bepalen van het percentage geïnvadeerde bacteriën in IPEC-J2 cellen	24
2.5. PCR, voor het meten van de inductie van immuun respons eiwitten in IPEC-J2 cellen	25
2.5.1 Oogsten van IPEC-J2 cellen voor de PCR analyse	25
2.5.2 RNA isolatie	26
2.5.3 RT-reactie	27
2.5.4 PCR-reactie.....	28
3. Resultaten.....	29
3.1. Groeicurve <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 Bioscreen	29
3.2. <i>S. Typhimurium</i> invasie in IPEC-J2 cellen	30
3.3. PCR-reactie.....	30
3.3.1 Expressie van genen met <i>S. Typhimurium</i>	30
3.3.2 Expressie van genen met <i>E. coli</i>	36
4. Discussie	41
5. Conclusie	43
6. Literatuurlijst	44
7. Bijlage	45

1. Inleiding

De VWA (voedsel en waren autoriteit) kreeg in 2009, 458 meldingen van consumenten over voedselinfecties. De werkelijke omvang van voedselinfecties en vergiftigingen is geschat op 300.00 tot 750.000 per jaar [1]. Dit wordt onder andere veroorzaakt door de bacterie *Salmonella*. Deze besmetting kan optreden door bijvoorbeeld het eten van niet goed bereid varkensvlees [2]. Wanneer varkens besmet zijn met *Salmonella* zijn er vrijwel bijna nooit symptomen. De varkens zijn dus drager van deze bacterie.

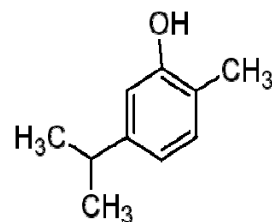
In Nederland sterven jaarlijks tussen de 100.000 en 250.000 biggen aan speendiarree. Speendiarree wordt veroorzaakt door de *E. coli* bacterie, voornamelijk de *E. coli* bacterie die het capsulaire antigeen bevat [3].

In varkensvoer worden op dit moment soms etherische oliën toegevoegd. Etherische oliën stimuleren namelijk de voedselopname, de productie van spijsverteringssappen en de vertering van het voer [4]. Na nader onderzoek is gebleken dat sommige etherische oliën een bacterie dodende en bacteriostatische werking hebben. Lagere concentraties, die de groei van *Salmonella* en *E. coli* niet remmen, remmen wel de invasie van *Salmonella* en de aanhechting van *E. coli* in/aan IPEC-J2 epitheelcellen significant [11,12]. Voorbeelden van deze etherische oliën zijn carvacrol en cinnamaldehyde. Als deze oliën in de juiste concentratie worden toegevoegd aan varkensvoer zou het mogelijk kunnen zijn dat het aantal besmettingen met *Salmonella* bij de consument en het aantal besmettingen met *E. coli* bij biggen te verminderen. Dit is daarom erg interessant voor nader onderzoek [5].

Het doel van dit onderzoek is nagaan of de combinatie van organische zuren met carvacrol of cinnamaldehyde de remming op *Salmonella* invasie in IPEC-J2 cellen nog verder kan verbeteren. Invloed van de stoffen op de bacterie zelf is onderzocht en verklaart niet helemaal hoe de invasie remming werkt. In dit project wordt daarom uitgezocht of het immuunrespons van de cellen door de aanwezigheid van carvacrol of cinnamaldehyde met/zonder organische zuren wordt veranderd.

1.1. Carvacrol & Cinnamaldehyde

Carvacrol [fig.1.] komt voor in verschillende etherische oliën onder andere die van tijm (*Thymus serpyllum*) en oregano (*Oreganum vulgare*). Op dit moment wordt het gebruikt als geur, kleur of smaakstof in voedingsmiddelen. Cinnamaldehyde [fig.2] komt van nature voor in kaneel (*Cinnamomum zeylanicum*). Op dit moment wordt het veruit als meeste gebruikt als smaakstof, ook wordt het aan parfum toegevoegd.



[fig.1 Structuur carvacrol [14]]



Carvacrol en cinnamaldehyde zijn gebruikt bij meerdere studies en staan bekend om de sterke werking tegen micro-organismen. De stoffen hebben een bacteriostatische en bacteriedodende werking. Lagere concentraties van deze stoffen die de groei van bacteriën niet remmen, remmen wel de invasie van de bacteriën in de cellen. Hoe dat precies komt is nog onduidelijk. Deze stoffen zijn daarom dus uiterst interessant voor nader onderzoek [5,11,12].

[fig.2 Structuur cinnamaldehyde [14]]

1.2. Organische Zuren

In dit project gaan we ons onder andere bezig houden met de combinaties van carvacrol of cinnamaldehyde met organische zuren. Dit wordt gedaan om te kijken of de invasie en aanhechting van bacteriën door deze combinaties nog meer wordt geremd. De zuren die gebruikt worden in dit project komen al van nature voor in voedingsmiddelen, formic acid (mierenzuur) is een voorbeeld hiervan. Het E-nummer daarvan is 236 [10]. De combinatie met zuren is interessant omdat uit eerder onderzoek is gebleken dat sommige zuren in combinatie met etherische oliën een synergetisch effect hebben. Dit effect kan verklaard worden door de ionische vormen in de oplossing. Toevoeging van bepaalde organische zuren verhoogt de concentratie H^+ in de oplossing. Bij lage pH (hoge H^+ concentratie) neigt carvacrol naar de hydrofobe moleculaire vorm en kan daarom makkelijker door het plasma membraan van de bacterie of cel [9]. De zuren die gebruikt worden zijn:

- Cinnamic acid → kaneelzuur. Kaneelzuur kan verkregen worden uit de olie van kaneel, maar het kan ook gesynthetiseerd worden. Op dit moment wordt kaneelzuur gebruikt als smaaktoevoeging, maar ook in de parfumbfabricage wordt het vaak gebruikt.
- Formic acid → mierenzuur. Mierenzuur komt voor in dieren en planten. Onder andere mieren maken en gebruiken mieren zuur voor aanval en zelfverdediging. Ook bijen en brandnetels verdedigen zich met mierenzuur. Zuiver mierenzuur wordt als desinfectans en ontkalkend middel gebruikt in reinigingsmiddelen.
- Propionic acid → propionzuur. Propaanzuur komt voor in ethische oliën, zweet en harde kaassoorten. De gaten in kaas worden veroorzaakt door bacteriën die koolstofdioxide en propionzuur maken. Esters van propionzuur worden gebruikt als geurstof, smaakstof en oplosmiddel. Ook is propion een belangrijke uitgangsstof voor de synthese van vele verbindingen, onder andere geneesmiddelen en bestrijdingsmiddelen.
- Lactic acid → melkzuur. Melkzuur is het zuur dat verzuurde melk de zure smaak geeft, en zit ook in gefermenteerde voedingsmiddelen zoals yoghurt en salami. Verder zorgt het voor tijdelijke spierpijn bij zware inspanning door de anaerobe afbraak van suiker [6].

1.3. *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028

Het geslacht *Salmonella* is lid van de familie Enterobacteriaceae. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is een gram negatieve, staafvormige bacterie die onderdeel is van de natuurlijke flora van varkens, pluimvee, runderen, huisdieren en reptielen [fig.3]. *Salmonella* bezit 3 grote antigenen: De "H" het flagellaire antigeen, de "O" het somatische antigeen en de "K" het capsulaire antigeen. De bacterie is toxisch omdat de buitenste membraan lipopolysaccharide (LPS) bevat, die de bacterie beschermt tegen de omgeving. LPS bevat lipide A endotoxine, zodra deze wordt losgelaten kan dat leiden tot een shock.



[fig.3 Gramkleuring *S. Typhimurium* [13]]

In dit project wordt de bacterie *S. Typhimurium* ATCC 14028 gebruikt. Bij de mens is *S. Typhimurium* normaal gesproken niet dodelijk. Alleen voor immuun verzwakte, oudere (>65 jaar) en jongere (<1 jaar) mensen kan deze bacterie levensbedreigend zijn.

Een bacteriële infectie met *S. Typhimurium* wordt gekenmerkt door diarree, buikkrampen, braken en misselijkheid, en duurt tot algemeen 7 dagen.[7]

Bij runderen en sommige andere dieren wordt deze bacterie asymptomatisch gedragen in de darm. Wanneer deze dieren geslacht worden vormt dit een risico voor de gezondheid van de mens. *S. Typhimurium* komt binnen via de orale route, van bijvoorbeeld niet goed bereid besmet vlees. Wanneer de bacteriën de darm bereiken invaderen ze in de epitheelcellen, daar beschadigen ze de microvilli op het oppervlak van de cel tijdelijk. [5] Deze bacterie is daarom erg interessant voor nader te onderzoeken. Als door middel van bepaalde fytochemicaliën de invasie kan worden geremd van *S. Typhimurium*, betekent dit minder voedselvergiftigingen bij de mens.

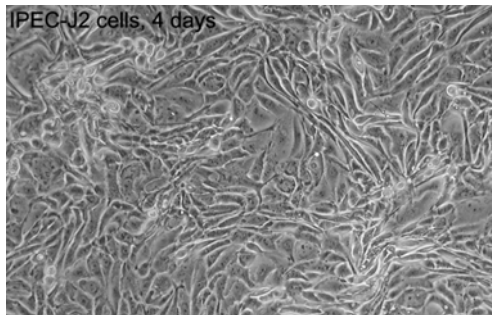
1.4. *Escherichia coli* K88 strain 498

Een groot probleem op de Nederlandse varkens fok bedrijven is het optreden van diarree onder pas gespeende biggen. De problemen ontstaan 4 tot 6 dagen na het spenen. De dieren hebben last van erge diarree, de ogen vallen in en soms treedt er sterfte op bij de dieren door uitdroging. Deze speendiarree wordt veroorzaakt door bepaalde *E. coli* stammen, onder andere ook de *Escherichia coli* K88.

Het geslacht *Escherichia* is lid van de familie Enterobacteriaceae. Het is een gram-negatieve staafvormige bacterie. De *E. coli* bevat 3 antigenen: De "H" het flagellaire antigeen, de "O" het somatische antigeen en de "K" het capsulaire antigeen. Het capsulaire antigeen zorgt dan ook voor de speendiarree. Daarom wordt in dit project de *E. coli* K88 gebruikt.[3]

Mocht de aanhechting van deze bacterie geremd kunnen worden door middel van toediening van fytochemicaliën, dan zal het aantal biggen dat besmet wordt met *E. coli* verminderen.

1.5. IPEC-J2



In dit project worden de Intestinal Porcine Epithelial Cells Jejunum (IPEC-J2) gebruikt [fig.4]. Dit zijn varkensepitheel cellen van de dunne darm. Deze cellijn wordt gebruikt omdat dan de invasie van *S. Typhimurium* en de aanhechting van *E. coli* in/aan varkensdarmcellen kan worden onderzocht. Op deze wijze staan deze cellen model voor de darm van een varken.

[fig.4 IPEC-J2 cellen 100% confluent]

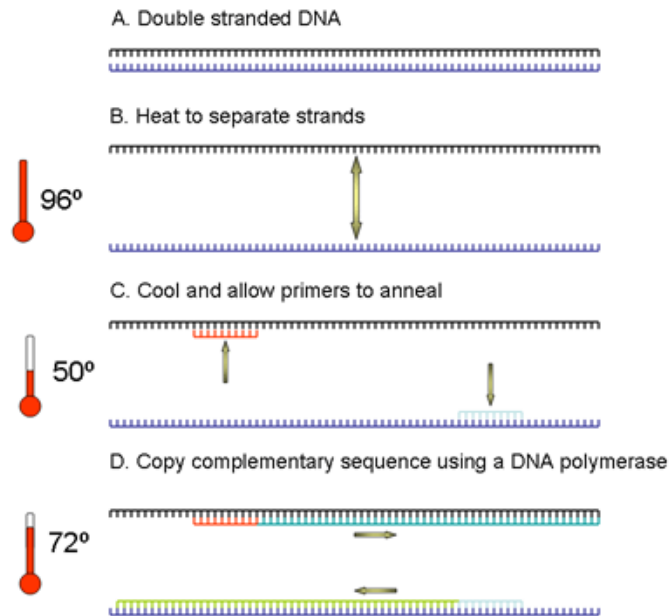
1.6. Real-time PCR

PCR staat voor Polymerase Chain Reaction. De real-time PCR (qPCR) is een amplificatietechniek waarbij de toename van het DNA op elk moment gevolgd kan worden.

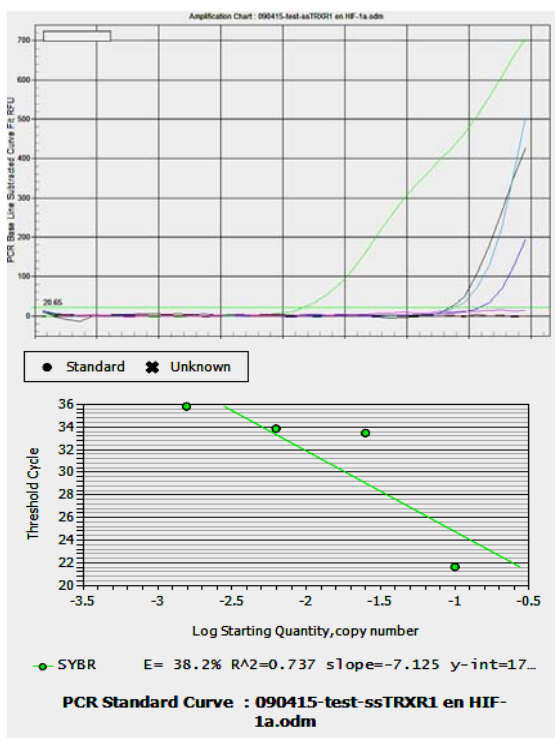
De PCR-reactie bestaat uit 3 fasen:

- Denaturatie → 95 graden. De dubbele strengen van het DNA gaan uit elkaar, zo ontstaan er 2 strengen
- Binding van de primer → 55-65 graden. Bij de juiste temperatuur bindt de primer aan het enkelstrengs DNA. Dit gebeurt met behulp van waterstofbruggen. Primers zijn stukjes enkelstrengs DNA. Eén primer die past op het begin van het gewenste stukje DNA en een tweede primer die past op het andere eind van de streng van de "target".
- Elongatie → 72 graden. Door DNA polymerase wordt de primer in de 5' richting verlengd. Hierdoor ontstaat dus weer dubbelstrengs DNA.

Hieronder is schematisch te zien hoe dit eruit ziet:



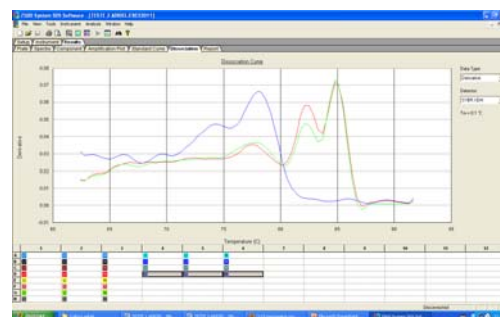
[fig.5 De fasen van de PCR [8]]



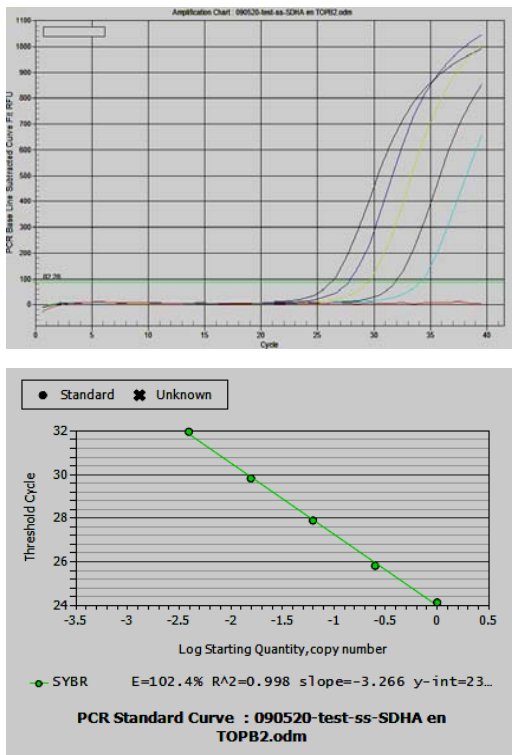
[fig.6 rechts PCR standaard curven]

Voordat er met PCR begonnen kan worden moeten eerst de primers worden getest met de realtime-PCR. Hiernaast in figuur 6 is een voorbeeld hiervan. Dit is niet de juiste primer en het is geen goede standaard, dit is te zien aan de curven die niet gelijk lopen.

Hieronder in figuur 7 is een voorbeeld van de meltingcurve of ook wel smeltcurve genoemd. Duidelijk is te zien dat de piek niet overal hetzelfde is. Dit kan komen door bijvoorbeeld verontreiniging in het monster.

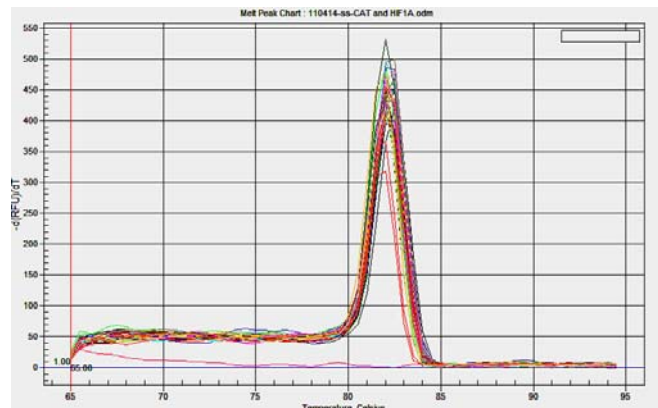


[fig. 7 PCR smeltcurve]



[fig.8 PCR standaard curven]

Hiernaast in figuur 9 is een voorbeeld van de smeltcurve te zien. Hier is te zien dat deze voor al de monsters hetzelfde is.[8]



[fig.9 PCR smeltcurve]

1.7. Genen

In dit project worden primer koppels gebruikt, voor elk gen, te zien in tabel 1 in de bijlage. Primers worden gebruikt om de relatieve expressie van een bepaald gen aan te tonen. Er wordt gebruikt:

- IKBA, is een nucleaire factor voor het kappa light polypeptide gen. Een versterker in de B-cellen remming. Het is de belangrijkste down-regulatie van de NF-KB activering, dit is een multi-component die reguleert de expressie van honderden genen die betrokken zijn bij de celproliferatie, cellulaire stress respons, aangeboren immuniteit en ontsteking.
- HIF1A, dit is hypoxie induceerbare factor 1 (alfa-subunit). HIF1A is een transcriptie factor van honderden genen die betrokken zijn bij cellulaire aanpassing en

overleving onder hypoxische stress en ontsteking. Verhoogde HIF1A expressie is gerelateerd aan inflammatoire darmziekte.

- NRF2, transcriptie factor NF-E2-gerelateerd factor 2. NRF2 is geactiveerd in de respons op elektrofile reactieve zuurstofdeeltjes. NRF2 reguleert de transcriptie van verschillende genen die betrokken zijn bij geneesmiddelen metabolisme, ontgiftiging en antioxidante verdedigingsmechanismen.
- HSPs, dit zijn heat shock proteïnen. Heat shock proteïnen zijn begeleiders die betrokken zijn bij stressgerelateerde situaties. Deze functies worden beschouwd als intracellulaire chaperonnes voor andere proteïnen; eiwit-eiwitinteractie en helpen het stabiliseren van proteïnen. Daardoor is er beschermend vermogen van de cellen tegen cytostatica en stressgerelateerde situaties. HSPs worden vernoemd naar hun molecuul gewicht, bijvoorbeeld HSP27 (27 kilodaltons) en HSP70 (70 kilodaltons). Darmepitheel cellen ondergaan een stress reactie van de inductie van moleculaire heat shock protein (HSP)70 of (HSP)72, glucoseregulerend eiwit 75 (ook bekend als mitochondriale HSP70) en door de activering van NFκB. De heat shock proteïnen die gebruikt worden zijn:
 - 1) HSP27, heat shock protein 27. Deze werkt onder stressomstandigheden en is activator van de afbraak van IκBα. Dit betekent dat HSP27 de activering van NFκB route verbeterd. NFκB route zorgt voor celgroei en ontstekingsrespons.
 - 2) HSP70 en HSP70.2, heat shock gerelateerde 70 kDa en heat shock gerelateerde 70 kDa eiwit 2. HSP70 is lid van de familie van HSPs, ze worden gekenmerkt door expressie bij cellulaire stress, waaronder hyperthermie en ischemie.

De gebruikte primers zijn geselecteerd op basis van specificiteit en efficiëntie door de realtime-PCR analyse van een serie verdunningen. Dit zijn verdunningen van gepoold cDNA bij een temperatuur gradiënt (55-65 graden) voor de primer annealing en de smeltcurve.

2. Materiaal en Methoden

2.1. Bacteriën

2.1.1 *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028

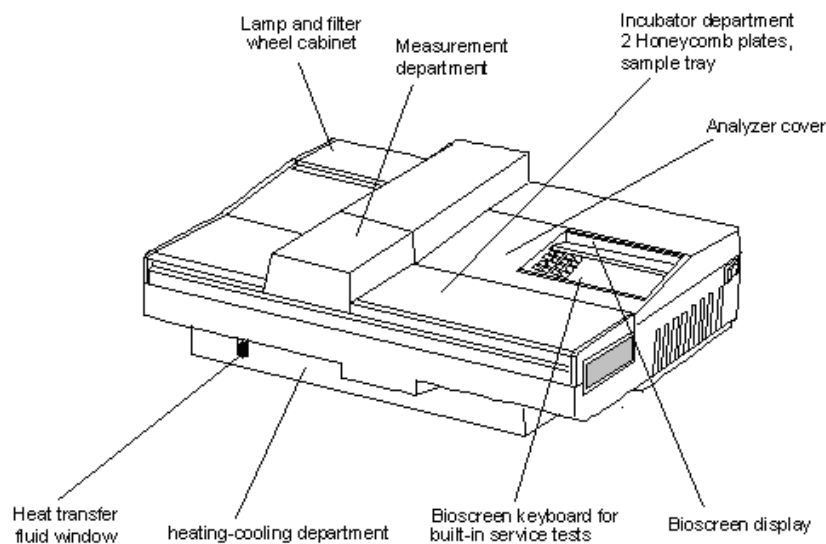
S. Typhimurium wordt gekweekt in Luria Bertani (LB) bouillon of op Luria Bertani agarplaten bij 37 graden. Wanneer de bacterie-cultuur niet wordt gebruikt voor een experiment, wordt deze opgeslagen in een koelkast bij 4 graden op agar-slants. Afhankelijk van het experiment wordt bepaald of de bacteriën tot de log-fase of de stationaire fase moeten groeien. De log-fase wordt bereikt na ongeveer 3 uur groei bij 37 graden. De stationaire fase wordt bereikt wanneer er overnacht bij 37 graden wordt gegroeid.

2.1.2 *Escherichia coli* K88 strain 498

E. coli wordt hetzelfde behandeld als de *S. Typhimurium*. *E. coli* wordt dus ook gekweekt in Luria Bertani (LB) bouillon of op Luria Bertani agarplaten bij 37 graden. Wanneer de bacterie cultuur niet wordt gebruikt voor een experiment wordt deze opgeslagen in een koelkast bij 4 graden op agar-slants. Afhankelijk van het experiment wordt bepaald of de bacteriën tot de log-fase of de stationaire fase moeten groeien. De log-fase wordt bereikt na ongeveer 3 uur groei bij 37 graden. De stationaire fase wordt bereikt wanneer er overnacht bij 37 graden wordt gegroeid.

2.2. Bioscreen, voor het meten van de groeicurve van bacteriën

De bioscreen (bioscreen C, type FP-1100-C) is een machine die de dichtheid (OD = optical density) van vloeistoffen meet [fig.10]. Wanneer een bacterie cultuur groeit in vloeibaar medium, stijgt de dichtheid van de vloeistof. Bij meting van de OD op regelmatige intervallen kan de groei van de bacterie gevolgd worden.



[Fig. 10 Bioscreen]

Methode

De dag voordat de bioscreen-assay uitgevoerd gaat worden wordt er een overnacht cultuur ingezet van de bacterie die getest gaat worden, in dit geval is dat *S. Typhimurium*. Deze suspensie wordt de volgende ochtend 1000 keer verdund in LB.

In LB medium worden verschillende soorten oplossingen gemaakt met de te testen stof erin. In een 100-wells plaat wordt per well 100µl van de te testen oplossing geplaatst en 100µl van de bacterie suspensie. Per well is dat 10^5 bacteriën. De 100-wells plaat wordt vervolgens in het apparaat geplaatst. Het apparaat wordt ingesteld op 37 graden, één keer vooraf schudden begin van de assay, 550 nm en OD meten om de 10 minuten. De volgende dag kan het resultaat worden opgehaald. Dit is een Excel bestand met daarin de OD elke 10 minuten per monster. Deze resultaten worden verwerkt tot groeicurven.

Dit experiment is al meerdere keren uitgevoerd, nu wordt het alleen gedaan ter bevestiging van die resultaten.

2.3. Celcultuur

2.3.1 Celcondities

Deze intestinal porcine epithelial cellijn (IPEC-J2) wordt gekweekt in Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12, daarbij is 10 % foetaal kalf serum (FCS), 5% glutamine, penicilline en streptomycine (P/S) toegevoegd. De P/S wordt toegevoegd om de kans op bacteriële besmettingen te verminderen. De cellen groeien in een incubator, deze is ingesteld op 37 graden met 5% toegevoegde CO₂.

2.3.2 Onderhouden van de cellijn

De IPEC-J2 cellen worden gekweekt in een 25 cm² flask. Er wordt gewacht tot deze flask 100% confluent is. Wanneer dat het geval is worden de cellen doorgezet. Dit gebeurt door de cellen eerst te wassen met DPBS. Vervolgens wordt er 1.5 ml trypsine aan de flask toegevoegd, dit moet +/- 10 minuten incuberen in de incubator van 37 graden. Trypsine zorgt ervoor dat de cellen los van het oppervlak en los van elkaar raken. Na het incuberen wordt de suspensie geneutraliseerd met 4.5 ml DMEM-F12 medium. Vervolgens wordt uit die suspensie 1 ml gehaald en in een nieuwe 25 cm² flask gebracht, hierbij wordt ook 5 ml DMEM-F12 medium toegevoegd. Deze flask gaat de incubator weer in, het duurt +/- 4 dagen voordat de cellen weer 100% confluent zijn en ze weer doorgezet moeten worden. De oude flask kan worden weggegooid in het daarvoor bestemde afvalvat.

Voor experimenten worden 12-wells platen gemaakt en gebruikt. Dit gebeurt tegelijk met het doorzetten. Na het neutraliseren wordt er 2 ml van de suspensie in een steriele buis geplaatst, hierbij wordt 11 ml DMEM-F12 zonder P/S toegevoegd. Dit wordt goed gemengd en vervolgens wordt in elke well 1 ml van deze suspensie gebracht. Het duurt ongeveer +/- 3 dagen voordat deze 12-wells platen gebruikt kunnen worden voor een experiment.

2.4. Invasie-assay, voor het bepalen van het percentage geïnvideerde bacteriën in IPEC-J2 cellen

Om te bepalen of stoffen zoals carvacrol en cinnamaldehyde de invasie van *S. Typhimurium* remmen in de IPEC-J2 cellen wordt de invasie-assay gebruikt.

Methode

Bij deze invasie-assay worden de IPEC-J2 cellen gebruikt. Deze proef wordt uitgevoerd in een 12-wells plaat. Voor dit experiment worden platen gebruikt die 3 dagen in de incubator hebben gestaan met de IPEC-J2 cellen. De wellen zijn dan voor 100% confluent.

De dag voordat de proef wordt uitgevoerd, wordt er een overnacht-cultuur van *S. Typhimurium* of *E. coli* ingezet. Deze wordt de volgende ochtend 100 keer verdund, en

teruggeplaatst in de 37 graden stoof. Na ongeveer 2 uur wordt er gekeken of de suspensie de juiste OD (OD 0.7) heeft. Dit wordt gemeten bij 550 nm. In de tussentijd worden de wellen drie keer gewassen met plain DMEM/F12 (advanced DMEM/F12, reduced serum medium (1:1) 1x) en de te testen stoffen toegevoegd aan de wellen. Wanneer de OD 0.7 is staat dat gelijk aan ongeveer $2 \cdot 10^8$ kolonievormende eenheden. Zodra de OD juist is wordt in elke well 50µl van de bacterie suspensie toegevoegd. Dit wordt een uur lang bij 37 graden gezet in de stoof. De cellen worden daarna drie keer gewassen met plain DMEM/F12. Daarna wordt er aan elke well 1ml colistine (Colistine sulfate salt) toegevoegd, dit wordt 2 uur geïncubeerd in de 37 graden stoof. Colistine is een antibioticum, het zorgt er dus voor dat alle bacteriën die aan de cel gehecht zijn dood gaan. Colistine kan niet door de celwand heen, dus alle bacteriën die in de cel zijn geïnvadeerd blijven in leven. Na het incuberen met colistine worden de cellen drie keer gewassen met plain DMEM/F12. Na deze stap wordt er 250µl Triton-X toegevoegd in elke well, dit om cellen te lyseren en bacteriën vrij te maken. Met DPBS wordt de Triton-X verdund zodat de reactie stopt. De inhoud van elke well wordt verplaatst in een eppendorf cup, hiervan worden verdunningsreeksen gemaakt die uitgeplaat worden op LB-platen. Deze platen worden overnacht in de 37 graden stoof gezet. De volgende ochtend worden de kolonies geteld en zo kan er berekend worden hoeveel bacteriën zijn geïnvadeerd in de IPEC-J2 cellen. Dit wordt uitgedrukt in percentages waarbij de controle als 100% wordt genomen.

Dit experiment is al meerdere keren uitgevoerd, dit wordt nu alleen gedaan ter bevestiging van die resultaten.

2.5. PCR, voor het meten van de inductie van immuun respons eiwitten in IPEC-J2 cellen

Voordat met de PCR begonnen wordt, moet eerst een hoop voorbereidt worden. Eerst moeten de monsters die getest gaan worden, worden geoogst. Wanneer dat gedaan is wordt begonnen met de isolatie van het RNA daarvan. Vervolgens wordt dan van het RNA cDNA gemaakt, daarna kan er begonnen worden met de PCR.

2.5.1 Oogsten van IPEC-J2 cellen voor de PCR analyse

Voordat er getest kan worden op de immuunrespons van de IPEC-J2 cellen met behulp van de realtime-PCR, moeten eerst de monsters daarvoor verzameld worden.

Methode

De cellen kunnen geoogst worden wanneer ze 100% confluent zijn. De methode is precies hetzelfde als in de invasie-assay. Bij de invasie-assay wordt na een aantal stappen colistine toegevoegd. Hier wordt dat echter niet gedaan, er wordt eerst 1x gespoeld met plain DMEM/F12 en daarna wordt er lysis buffer aan de wellen toegevoegd. Per well wordt er 100µl lysis buffer toegevoegd. Deze lysis buffer zorgt ervoor dat de cellen openbreken. Vervolgens wordt er met een schraper de cellen los geschraapt. Daarna wordt de inhoud van elke well in een eppendorf cup verplaatst.

De bacteriën die hiervoor gebruikt worden, zijn *S. Typhimurium* en *E. coli*. Alles wordt in tweevoud uitgevoerd.

De wellen worden als volgt ingedeeld:

1. zonder stoffen en zonder bacteriën (negatieve controle)
2. zonder stoffen en met bacteriën (positieve controle)
3. met stoffen en zonder bacteriën
4. met stoffen en met bacteriën

Dit wordt gedaan met de volgende stoffen:

- Carvacrol
- Cinnamaldehyde
- Cinnamic acid
- Formic acid
- Lactic acid
- Propionic acid
- Carvacrol & Cinnamic acid
- Carvacrol & Formic acid
- Carvacrol & Lactic acid
- Carvacrol & Propionic acid
- Cinnamaldehyde & Cinnamic acid
- Cinnamaldehyde & Formic acid
- Cinnamaldehyde & Lactic acid
- Cinnamaldehyde & Propionic acid

2.5.2 RNA isolatie

Voordat er met de PCR begonnen wordt, moet eerst al het RNA uit de monsters worden geïsoleerd. Dit wordt gedaan met RNA isolatie volgens protocol Promega.

Methode

Het monster wordt eerst uit de -80 graden vriezer gehaald en op ijs gezet, dit moet langzaam ontdooien. Zodra het ontdooit is wordt er bij het monster 350 µl RNA verdunning buffer gepipetteerd. Dit wordt een paar keer gemixt, vervolgens worden de monsters in een warmteblok gezet van 70 graden. Na 3 minuten worden de monsters uit het blok gehaald en 10 minuten gecentrifugeerd bij 12.000 rpm.

Na het centrifugeren wordt het supernatant in een nieuwe eppendorf cup gepipetteerd, hierbij wordt 200 µl 95% ethanol toegevoegd. Ethanol zorgt voor het precipiteren van het RNA. Deze vloeistof wordt verplaatst in een spin column, deze bestaat uit een bovenste membraan tube + een inzamelings tube. Dit wordt 1 minuut gecentrifugeerd, daarna wordt de vloeistof uit de inzamelings tube gehaald. Er wordt 600 µl RNA Wash solution in de kolom toegevoegd, dit wordt een minuut gecentrifugeerd. De inzamelings tube wordt daarna weer geleegd, er wordt op het membraan 50 µl DNase mix toegevoegd. Na een kwartier incuberen wordt er 200 µl DNase stop solution toegevoegd, dit wordt 1 minuut gecentrifugeerd. Vervolgens wordt er aan de kolom 600 µl RNA wash solution toegevoegd, dit wordt ook weer 1 minuut gecentrifugeerd. De collection tube wordt geleegd. Daarna wordt er 250 µl RNA wash solution toegevoegd, dit wordt 1 minuut gecentrifugeerd. Vervolgens word de membraan tube op een elution tube geplaatst, in de membraan tube wordt 40 µl Rnase vrij water gepipetteerd, dit wordt 2 minuten geincubeerd op kamertemperatuur, dit wordt daarna ook weer 1 minuut gecentrifugeerd. De membraantube wordt verwijderd en de eppendorf cup met monster eluaat wordt bewaard op ijs.

De concentratie (ng/µl) van het eluaat wordt gemeten met de nanodrop (ND 1000). Er wordt 1.5 µl opgebracht en de hoeveelheid nucleic acid wordt gemeten bij 260 nm. De hoeveelheid moet gemeten worden in verband met de RT-reactie. Belangrijk voor het geïsoleerde RNA is, is dat het vrij moet zijn van eiwitten, DNA en PCR remmers.

Voorbeeld van gemeten RNA:

Sample	Date	time	ng/ μ l	A260	A280	260/280	260/230
CV	8-4-2011	1:03 PM	90,84	2,271	1,111	2,04	1,81

A260 = nucleic acid

A280 = eiwit

A230 = guanidine

Voor RNA geldt 1 OD₂₆₀ unit = 40 μ g/ml van RNA. De concentratie is berekend door middel van de volgende formule:

$$\begin{aligned} \text{A260} \times 40 &= [\text{RNA}] \mu\text{g/ml (ng}/\mu\text{l)} \\ &= 2,271 \times 40 = 90,84 \end{aligned}$$

A260/A280:

- Puur RNA zal bij A260/280 verhouding tussen de 1.8 en de 2.4 zijn
- Wanneer dit lager is dan 1.7 zal er waarschijnlijk vervuiling zijn in het monster

A260/A230:

- Goed gezuiverd RNA zal bij de A260/A230 verhouding tussen de 1.8 en de 2.0 zijn
- Wanneer de verhouding lager is dan 1.7 betekent dit dat er eiwit vervuiling in het monster is

Voor verder gebruik worden de monsters bewaard in de -80 graden vriezer.

2.5.3 RT-reactie

Bij de RT-reactie wordt van het geïsoleerde RNA cDNA gemaakt. Dit wordt gedaan met de iScript™ cDNA Synthesis kit (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

Methode

Voordat de mix gemaakt wordt moet van al het RNA de concentratie gelijk zijn. Er wordt 15 μ l RNA template gebruikt voor alles. Om te berekenen hoeveel water daaraan toegevoegd moet worden wordt de volgende som gebruikt:

$$(15 \times \text{RNA template} / 66,67) - 15$$

De 66,67 is omdat 1 μ g = 1000 ng, 1000/15=66,67

Voorbeeld:

Er is 90,84 ng/ μ l RNA geïsoleerd.

$$(15 \times 90,84 / 66,67) - 15 = 5,4$$

Aan 15 μ l RNA moet dus 5,4 μ l nuclease-vrij water worden toegevoegd.

Dit wordt berekend van alle monsters en de oplossingen worden gemaakt in een 96 wells plaat die op ijs staat.

Vervolgens wordt er uit die 96 wells plaat 15 μ l van elk welletje over gepipetteerd naar een nieuwe 96 wells plaat. De mix wordt hieraan toegevoegd.

De mix is als volgt gemaakt:

Component	Volume per reaction
5x iScript reaction mix	4 μ l
iScript reverse transcriptase	1 μ l
nuclease vrij-water	x μ l
RNA template	x μ l
Totaal volume	20 μ l

Deze plaat gaat vervolgens in het PCR apparaat, daar gebeurt het volgende:

5 minuten	25 graden
30 minuten	42 graden
5 minuten	85 graden

De plaat wordt weer uit het apparaat gehaald, het cDNA is nu gemaakt. Dit is erg geconcentreerd dus dit wordt verdund. Totaal zit in elke wel 20 μ l, hierbij wordt 180 μ l nuclease-vrij water gedaan. Het DNA is nu verdund naar een concentratie van 30 ng/ μ l.

Er worden nu meerdere platen gemaakt. In elke plaat wordt 10ul van het verdunde DNA in een welletje gepipetteerd. Zo kunnen er ongeveer hiervan 19 platen gemaakt worden. Deze worden ingevroren bij -20 graden.

2.5.4 PCR-reactie

Quantitative PCR-reactie

Voordat er met de realtime-PCR begonnen kan worden wordt eerst de mastermix gemaakt. De reactie-mix voor de realtime-PCR bevat 10 μ l van het verdunde cDNA, dat wordt gemixt met 15 μ l iQSYBR Green supermix (Bio rad Laboratories Inc., USA), primers (uiteindelijke concentratie van 0.4 pmol/ μ l voor elke primer) en steriel water volgens de instructies van de fabrikant.

Component	Volume per reactie
IQ SYBR Green supermix	12.5 μ l
Primer F	0.75 μ l
Primer R	0.75 μ l
Nuclease free-water	1 μ l
cDNA template	10 μ l
Totaal volume	25 μ l

De realtime-PCR wordt uitgevoerd met eenkleurig realtime-PCR detectie systeem (Bio-rad, hercules, CA) en MyIQ systeemsoftware versie 1.0.410 (Bio-rad Laboratories Inc., USA). Amplificatie-efficiëntie wordt bepaald per plaat met behulp van linRegPCR [13]. Data worden geanalyseerd met behulp van de efficiënte gecorrigeerde Delta-Delta-Ct methode [14].

De Fold-change van de genen van interesse worden genormaliseerd met behulp van gegevens van de huishoud genen. Om de beste huishoud genen te selecteren, wordt er getest of er significante verschillen in de expressie zijn tussen de groepen.

De plaat wordt in het apparaat geplaatst. Daar kan de reactie beginnen. Er gebeurt het volgende:

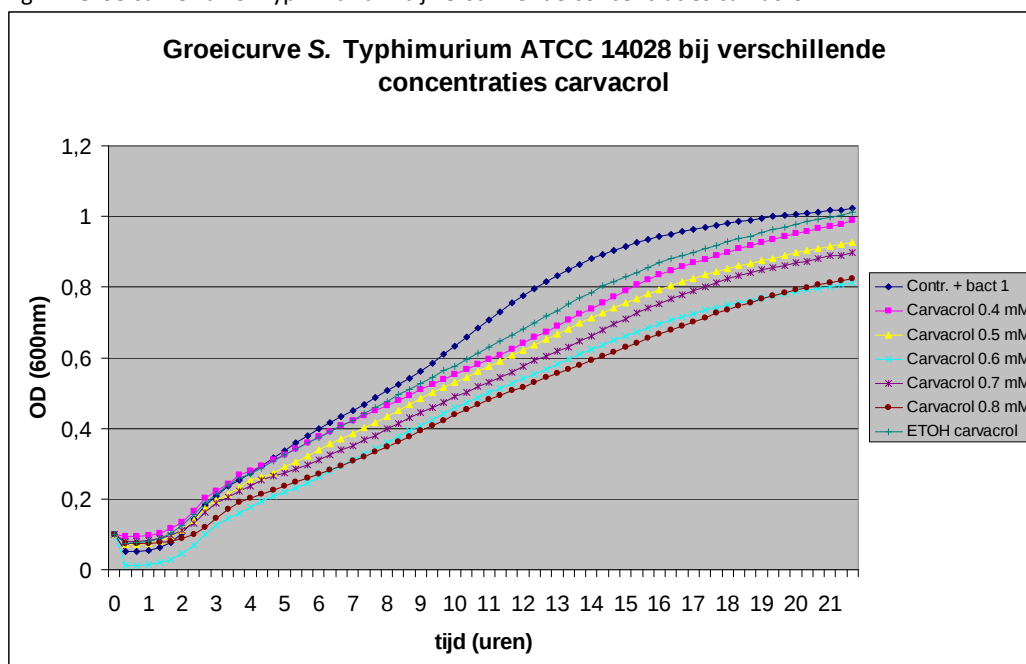
- Denaturatie $\rightarrow$ 95 graden
- Primer annealing $\rightarrow$ 55-65 graden
- Elongatie $\rightarrow$ 72 graden

3. Resultaten

3.1. Groeicurve *S. Typhimurium* ATCC 14028 Bioscreen

De fytostof moet niet toxisch zijn voor de bacterie. De groeicurven worden vergeleken met de controle, wanneer een groeicurve gelijk loopt met de controle laat zien dat die concentratie van die fytostof geen toxische effecten heeft op de bacterie.

Fig. 11 Groeicurve van *S. Typhimurium* bij verschillende concentraties carvacrol



In figuur 11 is te zien dat geen één concentratie van carvacrol gelijk met de controle loopt. Alle concentraties die hier getest zijn hebben invloed op de groei van *S. Typhimurium*.

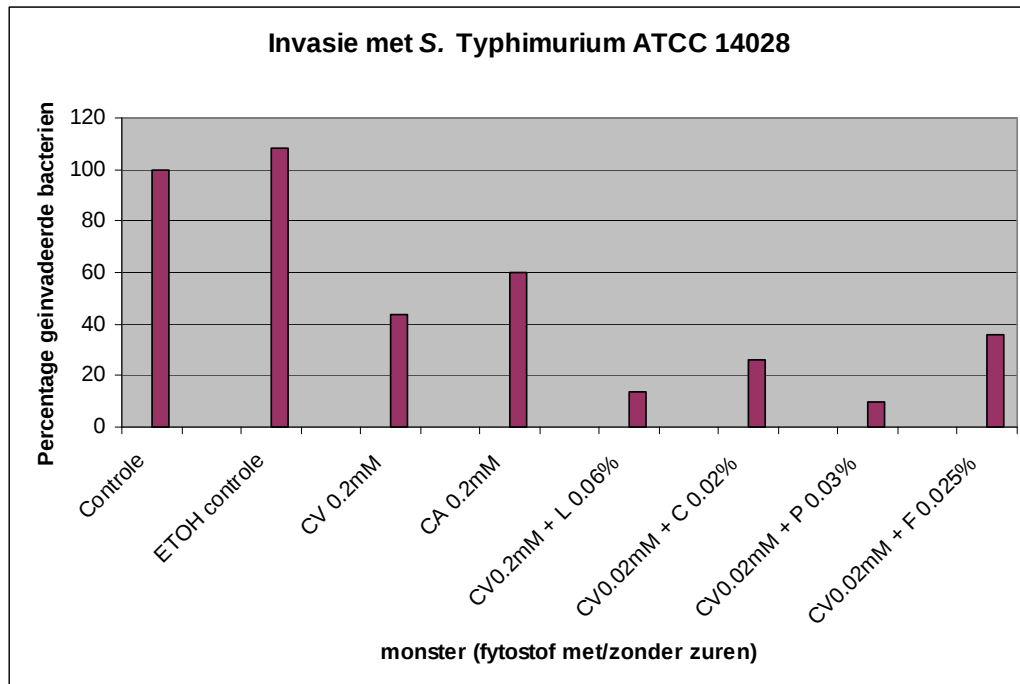
Voor de vervolg proeven zijn concentraties gekozen die niet toxisch zijn voor de cel en de bacterie. Dit is dus gedaan met behulp van de bioscreen en eerder uitgevoerd onderzoek. De concentraties waarmee gewerkt gaat worden zijn:

Stof	Concentratie
Carvacrol	0.2 mM
Cinnamaldehyde	0.2 mM
Cinnamic acid	0.02%
Formic acid	0.025%
Lactic acid	0.06%
Propionic acid	0.03%

3.2. *S. Typhimurium* invasie in IPEC-J2 cellen

De volgende grafiek laat het percentage aantal geïnvadeerde bacteriën in IPEC-J2 zien met verschillende behandelingen van fytostoffen.

Fig. 12 Percentage geïnvadeerde bacteriën in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren



In figuur 12 is de controle als 100% genomen. Er is te zien dat de ethanol geen effect heeft. Carvacrol en cinnamaldehyde hebben een remmend effect op de invasie van *S. Typhimurium*, bij carvacrol in combinatie met zuren wordt dit effect nog meer versterkt.

3.3. PCR-reactie

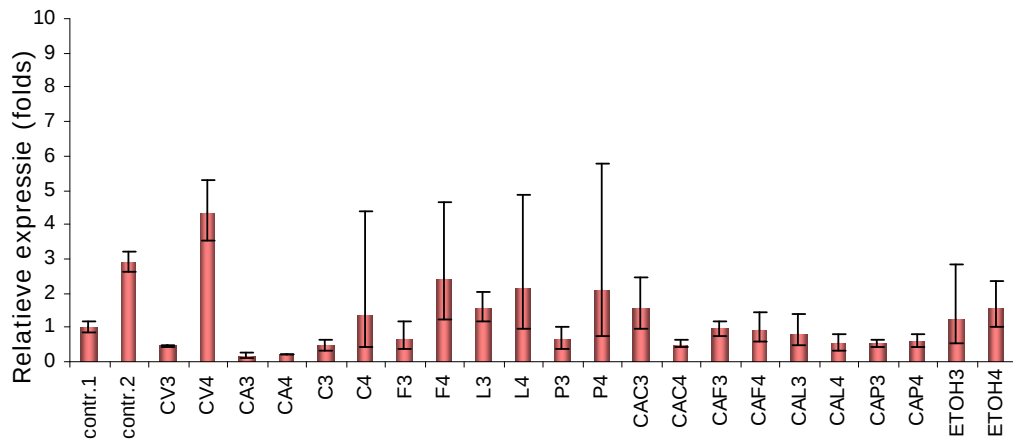
3.3.1 Relatieve expressie van genen met *S. Typhimurium*

De volgende grafieken laten zien hoe de relatieve expressie is van verschillende genen in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium* ATCC 14028. De expressie van de genen is bepaald aan de hand van controle 1, voor deze is altijd 1 genomen. Aan de hand daarvan kan de expressie van de genen worden vergeleken.

In deze grafieken staan Contr.1 en Contr.2 voor controle 1 (zonder fytostoffen & zonder bacterie) en controle 2 (zonder fytostof & met bacterie). Het cijfer 3 staat voor met fytostof & zonder bacterie, het cijfer 4 staat voor met fytostof & met bacterie. Hierbij staat op de X-as het soort monster en op de Y-as de expressie.

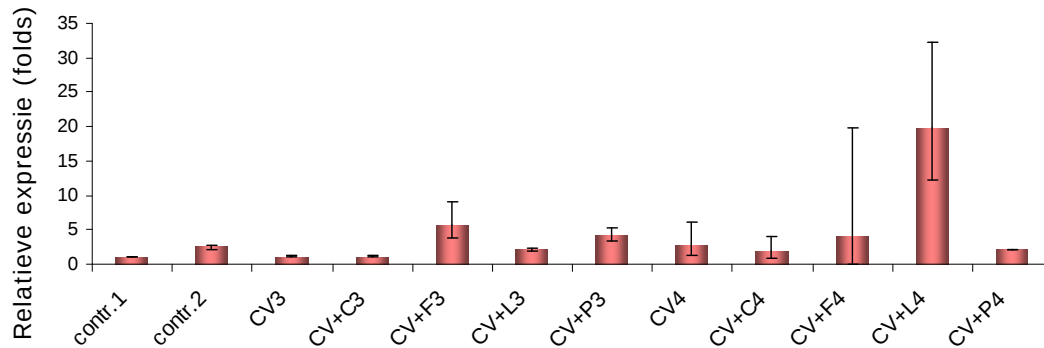
Ethanol controles zijn ook getest en deze hebben in geen van de grafieken een effect.

Fig. 13a Relatieve expressie van het gen IKBA in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



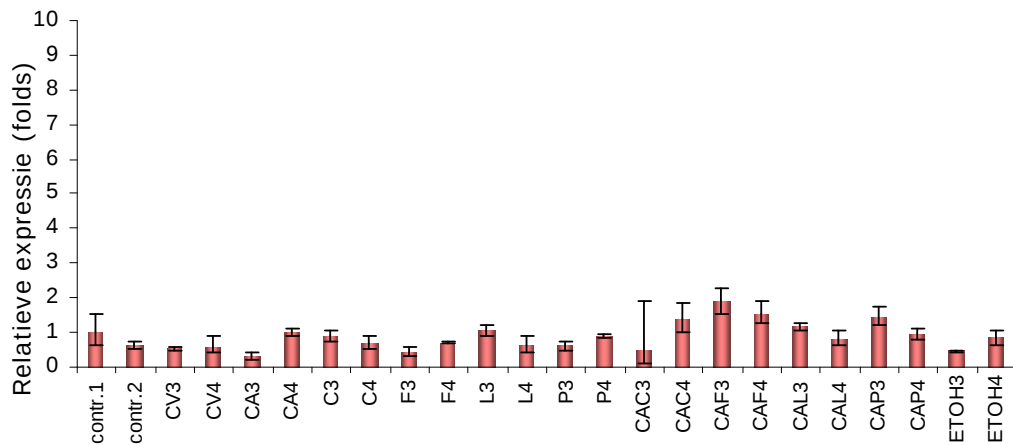
In figuur 13a is te zien dat de expressie van het IKBA gen 4-5x omhoog gaat bij carvacrol in combinatie met de bacterie. Cinnamaldehyde verlaagt de expressie van het IKBA gen, ook in combinatie met de zuren.

Fig. 13b Relatieve expressie van het gen IKBA in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



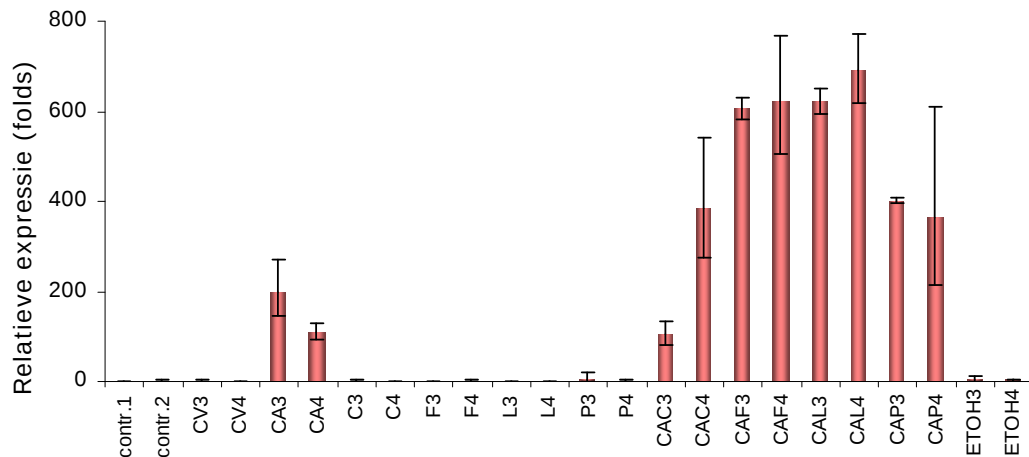
In figuur 13b is te zien dat de fytostoffen alleen niet veel expressie geven op het IKBA gen, carvacrol in combinatie met formic acid geeft wel verhoging in expressie op het IKBA gen. Wanneer *S. Typhimurium* in combinatie met carvacrol en lactic acid is, is de expressie op het IKBA gen 20x zo hoog.

Fig.14 Relatieve expressie van het gen HSP27 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



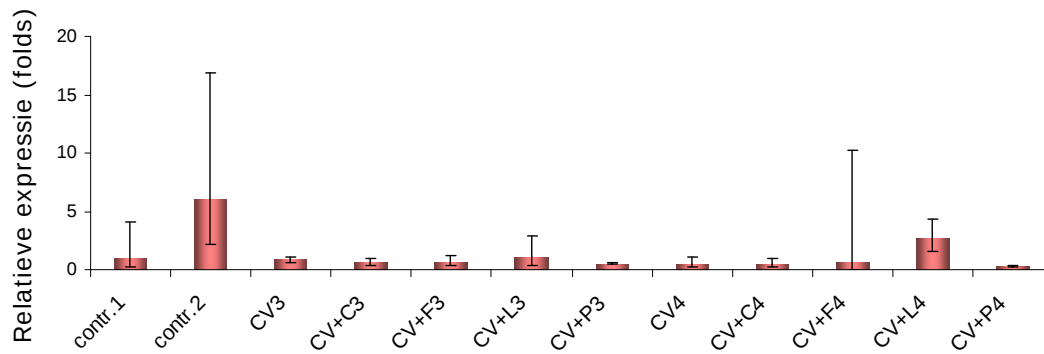
In figuur 14 heeft cinnamaldehyde alleen en in combinatie met de zuren een verhoogde expressie van het gen HSP27, dit is echter niet heel veel. Er is bijna geen verschil te zien in de fytostoffen alleen en in de fytostoffen in combinatie met de bacterie. Carvacrol geeft helemaal geen verhoogde expressie van het HSP27 gen.

Fig. 15a Relatieve expressie van het gen HSP70 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



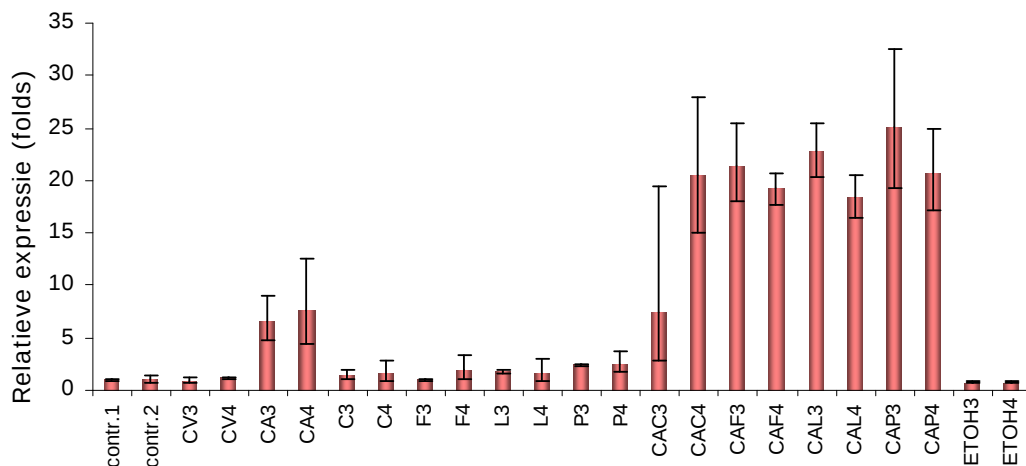
In figuur 15a is te zien dat alleen de fytostof cinnamaldehyde zorgt al voor een 200x hogere expressie van het HSP70 gen, in combinatie met de zuren is deze expressie nog hoger. Carvacrol en de zuren apart hebben hier geen verhoging in expressie van het HSP70gen.

Fig. 15b Relatieve expressie van het gen HSP70 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



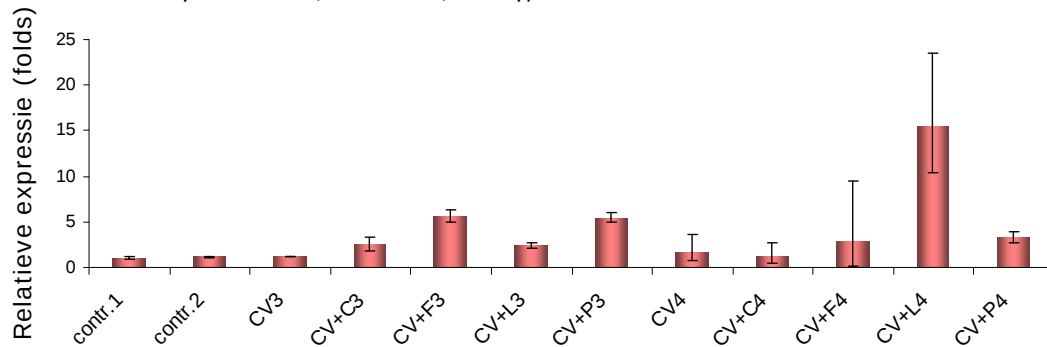
In figuur 15b is geen duidelijk verschil in expressie van het HSP70 gen onder invloed van de verschillende fytostoffen. Alleen bij blootstelling aan *S. Typhimurium* is er duidelijk een hogere expressie van het HSP70 gen.

Fig. 16a Relatieve expressie van het gen HSP70.2 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



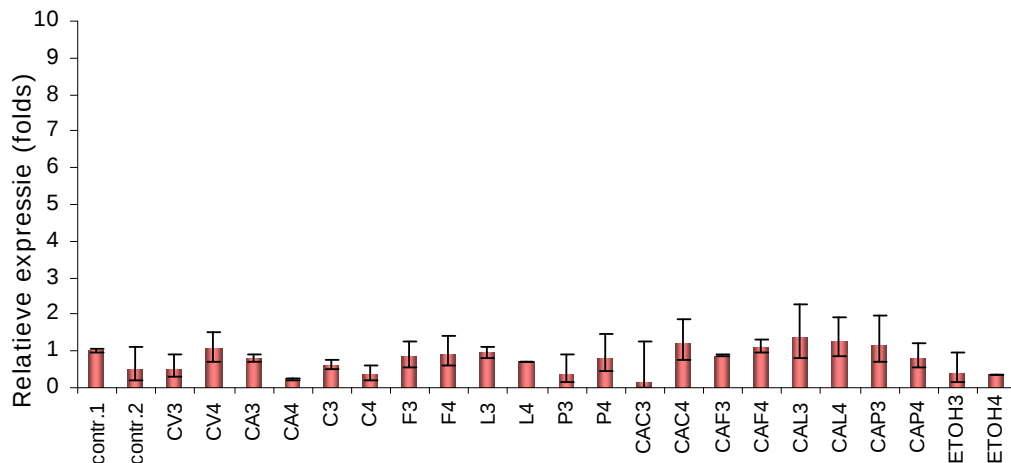
In figuur 16a is te zien dat de fytostof cinnamaldehyde zorgt voor een 200x hogere expressie van het HSP70.2 gen, in combinatie met de zuren is deze expressie nog hoger. Carvacrol en de zuren apart hebben hier geen verhoging in expressie van het HSP70.2 gen.

Fig.16b Relatieve expressie van het gen HSP70.2 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



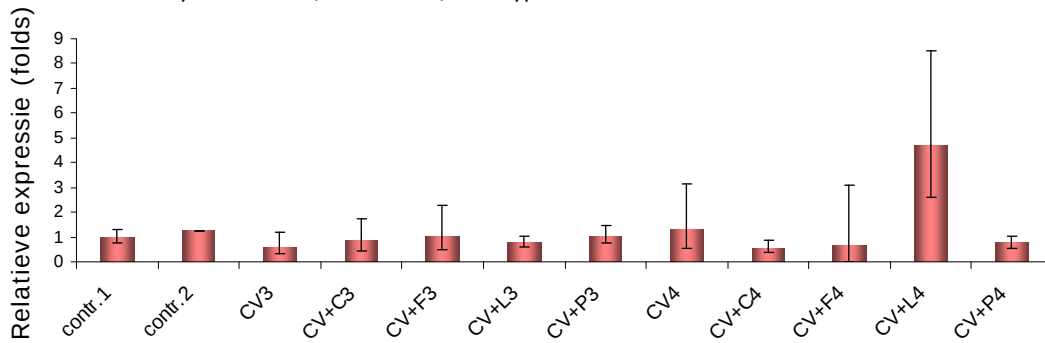
In figuur 16 b is te zien dat wanneer carvacrol gecombineerd wordt met formic acid de expressie van het HSP70.2 gen een klein beetje omhoog gaat, ongeveer 5x zo hoog als de controle 1. Wanneer carvacrol gecombineerd wordt met lactic acid en er vervolgens *S. Typhimurium* bijkomt wordt de expressie van het HSP70.2 gen 15x zo hoog.

Fig. 17a Relatieve expressie van het gen HIF1A in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



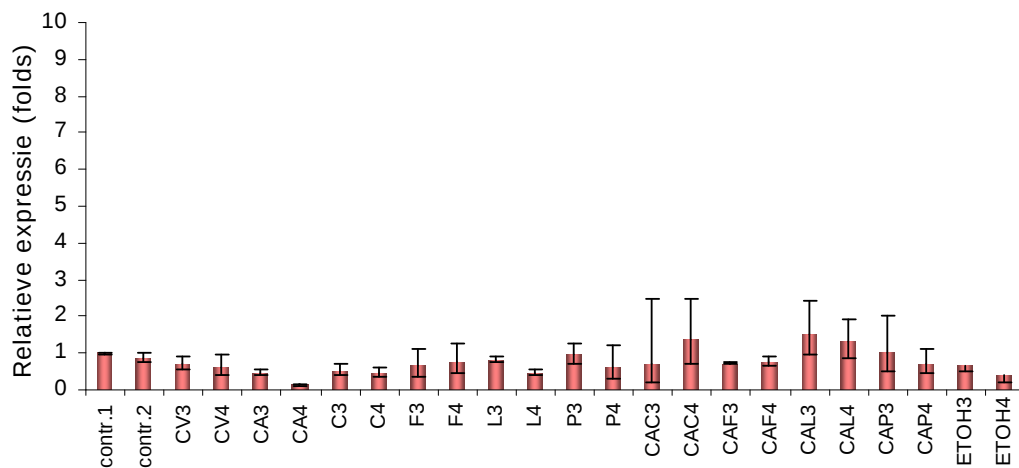
In figuur 17a is geen duidelijk verschil in expressie van het HIF1A gen onder invloed van de verschillende fytostoffen.

Fig. 17b Relatieve expressie van het gen HIF1A in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



In figuur 17b is alleen bij *S. Typhimurium* met carvacrol in combinatie met lactic acid de expressie van het HIF1A gen 5x verhoogt. Verder zijn er geen duidelijke verschillen tussen de verschillende behandelingen.

Fig. 18 Relatieve expressie van het gen NRF2 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *S. Typhimurium*



In figuur 18 is geen duidelijk verschil in expressie van het NRF2 gen onder invloed van de verschillende fytostoffen.

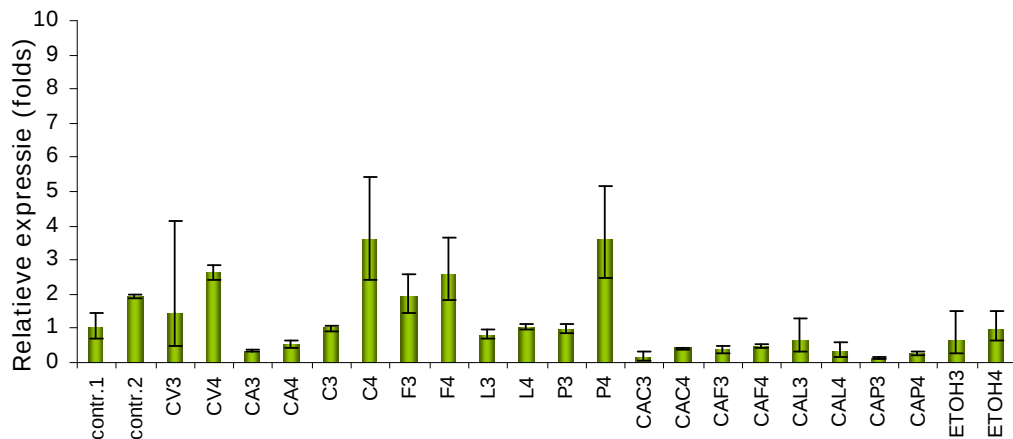
3.3.2 Relatieve expressie van genen met *E. coli*

De volgende grafieken laten zien hoe de expressie is op verschillende genen met de *E. coli* K88. De expressie van de genen is bepaald aan de hand van controle 1, voor deze is altijd 1 genomen. Aan de hand daarvan kan de expressie van de genen worden vergeleken.

Bij deze grafieken geldt ook Contr.1 en Contr.2 staan voor controle 1 (zonder fytostoffen & zonder bacterie) en controle 2 (zonder fytostof & met bacterie). Het cijfer 3 staat voor met fytostof&zonder bacterie, het cijfer 4 staat voor met fytostof&met bacterie. Hierbij staat op de X-as het soort monster en op de Y-as de expressie.

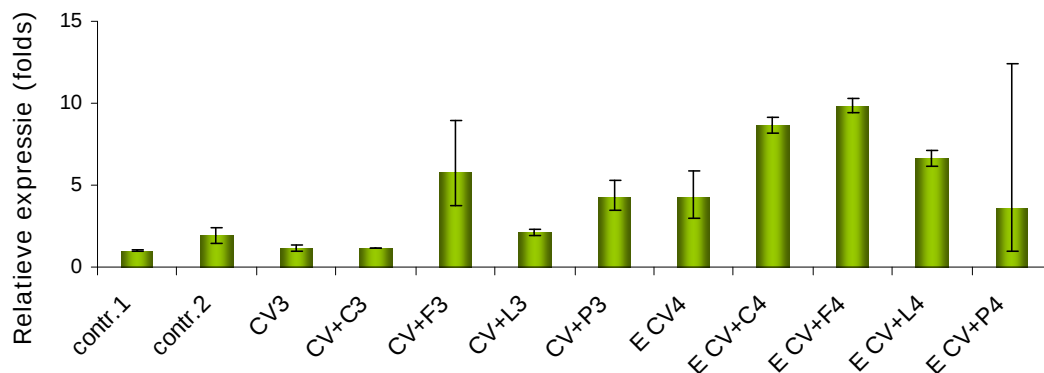
Ethanol controles zijn ook getest en deze hebben in geen van de grafieken een effect.

Fig. 19a Relatieve expressie van het gen IKBA in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



In figuur 19a is te zien dat carvacrol alleen de expressie van het IKBA 2x gen verhoogt. Carvacrol samen met *E. coli* verhoogt de expressie nog meer. Bij de zuren is dit hetzelfde geval. Bij cinnamaldehyde is de expressie van het IKBA gen erg laag, ook in combinatie met de zuren.

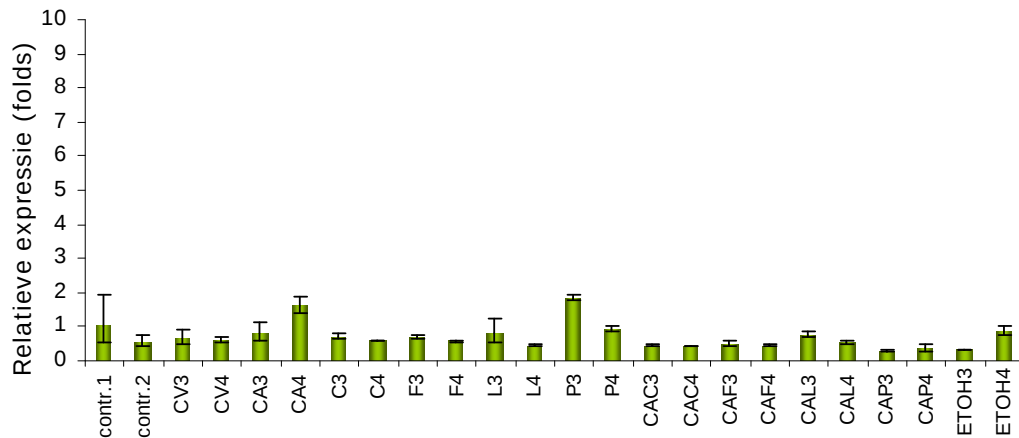
Fig. 19b Relatieve expressie van het gen IKBA in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



In figuur 19b geven de fytostoffen alleen niet of niet veel expressie van het IKBA gen, alleen de carvacrol in combinatie met formic acid geeft verhoging. Wordt er gekeken naar de

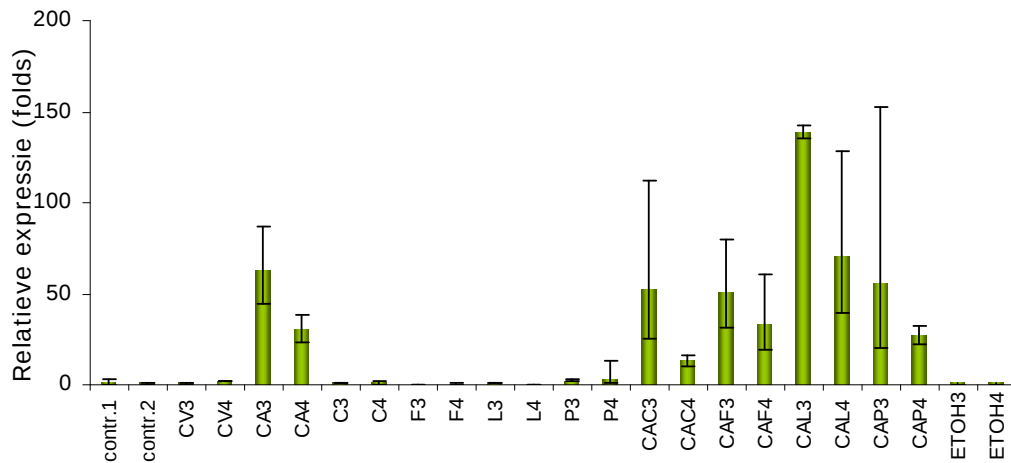
behandelingen carvacrol in combinatie met cinnamic acid, formic acid en lactic acid met *E. coli*, dan gaat de expressie van het IKBA gen 6-10x omhoog.

Fig. 20 Relatieve expressie van het gen HSP27 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



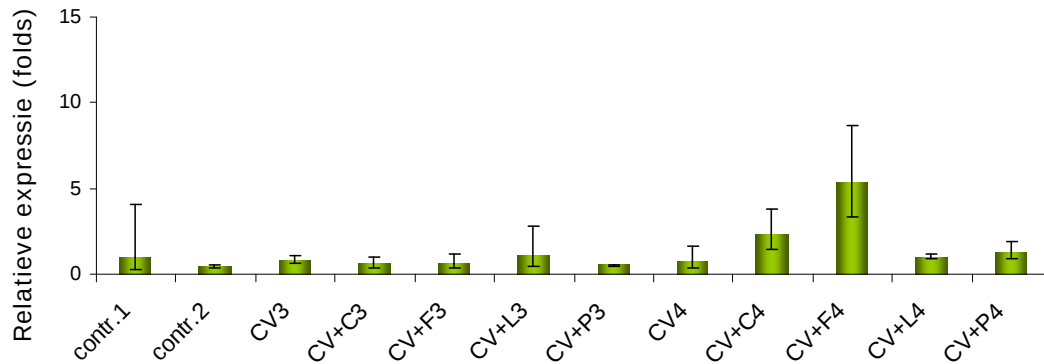
In figuur 20 is geen duidelijk verschil in expressie van het HSP27 gen onder invloed van de verschillende fytostoffen.

Fig. 21a Relatieve expressie van het gen HSP70 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



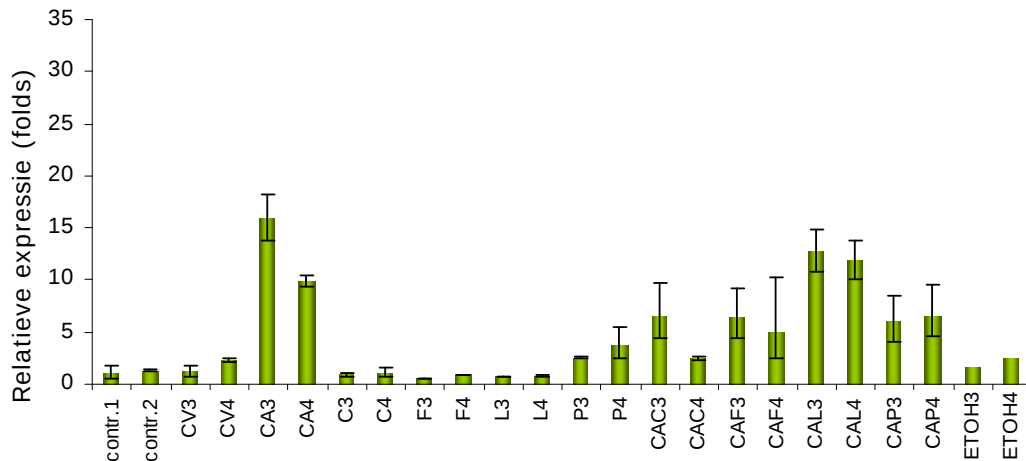
In figuur 21a is te zien dat bij cinnamaldehyde zonder *E. coli* is de expressie van het HSP70 gen hoger is dan bij cinnamaldehyde met *E. coli*. Ditzelfde geldt bij cinnamaldehyde in combinatie met de zuren. Bij carvacrol is er geen verhoging van expressie te zien van het HSP70 gen.

Fig. 21b Relatieve expressie van het gen HSP70 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



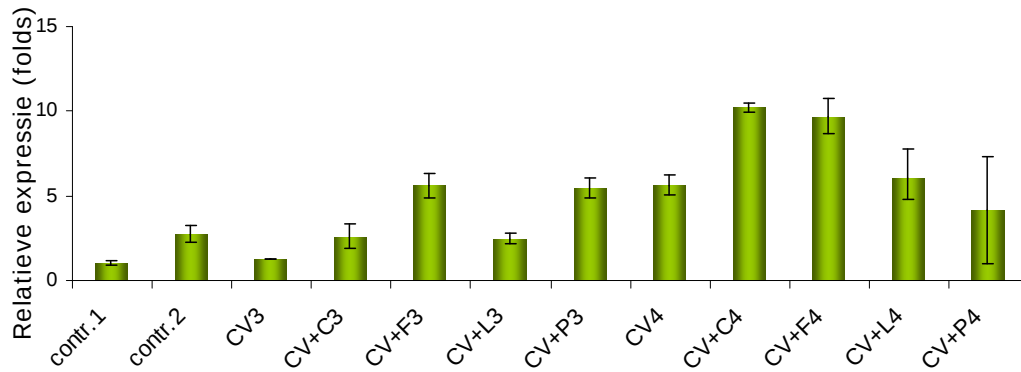
In figuur 21b is te zien dat de fytostoffen alleen allen geen verhoging in expressie hebben op het HSP70 gen. Carvacrol in combinatie met formic acid en *E. coli* verhoogt de expressie van het HSP70 gen 5x.

Fig. 22a Relatieve expressie van het gen HSP70.2 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



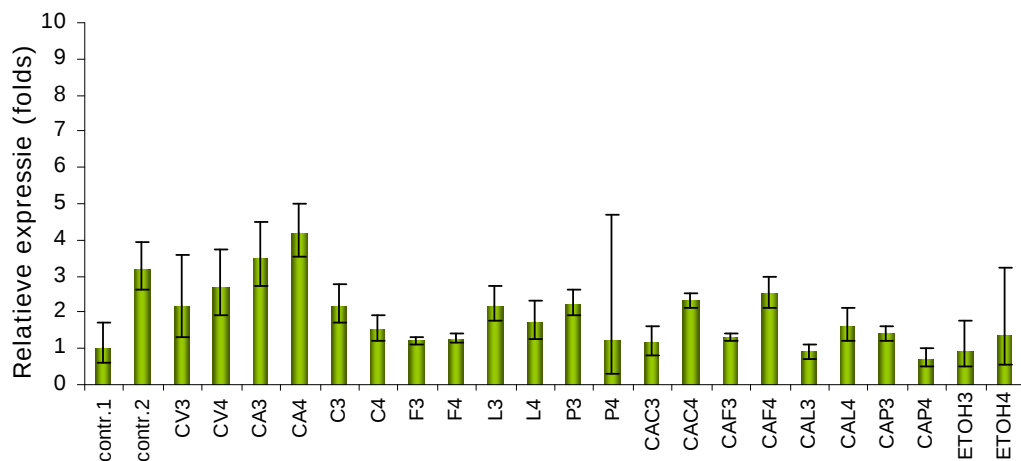
In figuur 22a is te zien dat bij cinnamaldehyde zonder *E. coli* is de expressie van het HSP70.2 gen 1,5x zo hoog is dan bij cinnamaldehyde met *E. coli*. Ditzelfde geldt bij cinnamaldehyde in combinatie met de zuren. Bij carvacrol is er geen verhoging op de expressie van het HSP70.2 gen.

Fig. 22b Relatieve expressie van het gen HSP70.2 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



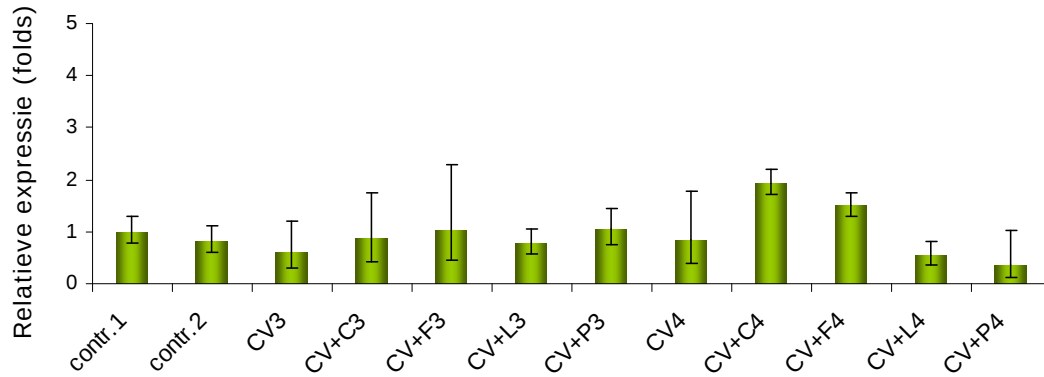
In figuur 22b hebben de fytostoffen alleen allen geen duidelijke verhoging in expressie van het HSP70.2 gen, behalve carvacrol in combinatie met formic acid en propionic acid. Wanneer carvacrol in combinatie is met formic, lactic en cinnamic acid met de *E. coli* gaat de expressie van het HSP70.2 gen 6-10x omhoog..

Fig. 23a Relatieve expressie van het gen HIF1A in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



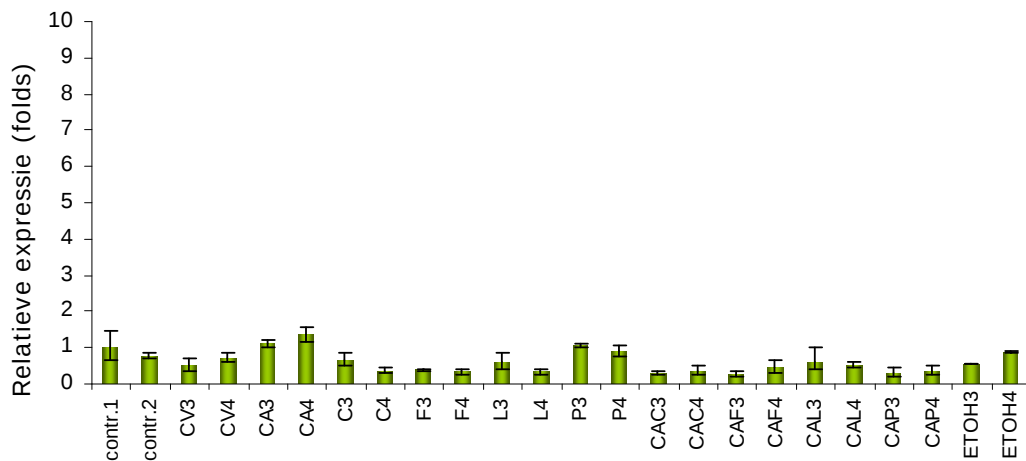
In figuur 23a is geen duidelijk verschil in expressie van het HIF1A gen onder invloed van de verschillende fytostoffen.

Fig. 23b Relatieve expressie van het gen HIF1A in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



In figuur 23b is geen duidelijk verschil in expressie van het HIF1A gen onder invloed van de verschillende fytostoffen.

Fig. 24 Relatieve expressie van het gen NRF2 in IPEC-J2 cellen na 1 uur blootstelling aan verschillende fytostoffen en/of zuren en/of *E. coli*



In figuur 23b is geen duidelijk verschil in expressie van het NRF2 gen onder invloed van de verschillende fytostoffen.

4. Discussie

Uit de invasieproef is duidelijk bevestigd dat carvacrol 0.2mM de invasie van *S. Typhimurium* in IPEC-J2 cellen vermindert. Wanneer carvacrol wordt gecombineerd met zuren is dit effect nog sterker te zien. Cinnamaldehyde 0.2mM remt ook de invasie van *S. Typhimurium* maar in minder mate dan carvacrol [fig.12]. Om te weten waarom de invasie wordt geremd bij *S. Typhimurium*, en waarom in voorgaande onderzoeken de aanhechting van *E. coli* K88 wordt geremd, is er PCR analyse uitgevoerd op de cellen.

Bij de realtime-PCR resultaten is te zien dat alleen de stof cinnamaldehyde een hoge expressie heeft op het HSP70 en het HSP70.2 gen [fig. 15a,16a,21a,22a]. Ook is te zien in de grafieken dat cinnamaldehyde de expressie van het gen IKBA verlaagt, ook in combinatie met de zuren [fig. 13a,19a]. Daarentegen verandert de expressie van HIF1a en het NRF2 gen niet [fig. 17a,18,23a,24]. Met deze resultaten is er een mogelijke verklaring waarom cinnamaldehyde de invasie van *S. Typhimurium* en de aanhechting van *E. coli* vermindert in/aan IPEC-J2 cellen. HSPs zijn heat shock proteïnen, dit zijn indicatoren voor stress in de cel. Uit de gevonden resultaten is gebleken dat cinnamaldehyde een hoge expressie heeft op deze genen, dit betekent dus dat de cellen door deze stof in stress staan. Dit is een mogelijke verklaring waarom bacteriën niet kunnen invaderen of hechten aan de cel, echter het continue voortduren van een stress situatie is nadelig voor de cel.

Carvacrol heeft een hele andere werking op de genen dan cinnamaldehyde. Bij de stof carvacrol alleen en in combinatie met de zuren is te zien dat dit geen verhoogde expressie geeft op de HSPs genen. Dit betekent dus geen continue stress in de cel door de fytostof. Wanneer *S. Typhimurium* of *E.coli* in combinatie met de fytostof carvacrol en/of zuren bij de cel komt is te zien dat de expressie van HSP70 en HSP70.2 wel verhoogd is [fig. 16b,21b,22b]. Dit is de ideale situatie, de expressie van HSP70 en HSP70.2 gaat alleen omhoog als het nodig is. Ook is te zien dat de expressie van het IKBA gen omhoog gaat wanneer *S. Typhimurium* met carvacrol in combinatie met lactic acid in aanraking komt met de cel [fig.13b]. Voor *E. coli* is dit ook het geval met carvacrol in combinatie met cinnamic acid, formic acid en lactic acid [fig.19b]. IKBA is een belangrijke factor voor ontsteking en aangeboren immuniteit. Carvacrol met of zonder zuren hebben geen effect op het HIF1A gen [fig. 17b,23b]. Door deze veranderingen in de cel is mogelijk te verklaren waarom de invasie en aanhechting in/aan IPEC-J2 cellen geremd word, namelijk door de verandering in expressie van het IKBA gen en de HSP70 & HSP70.2 genen.

Echter omdat deze proef maar twee keer is uitgevoerd zal deze proef nog vaker herhaald moeten worden om deze resultaten statistisch vast te stellen. Bovendien zal het interessant zijn voor vervolg onderzoek om de fytostoffen met/zonder zuren 24 uur bloot te stellen aan de IPEC-J2 cellen in plaats van 1 uur. Dit schetst naar mijn mening een meer realistische situatie, dit omdat het uiteindelijke doel is om deze fytostoffen aan het voer toe te voegen.

5. Conclusie

Uit de resultaten van de invasieproef is bevestigd dat de invasie van *S. Typhimurium* in IPEC-J2 cellen wordt geremd bij blootstelling aan de fytostoffen carvacrol en cinnamaldehyde. Enkele voedingszuren in combinatie met deze fytostoffen versterken dit effect nog meer.

Uit de resultaten van de real-time PCR is gebleken dat carvacrol en cinnamaldehyde de immuunrespons van de cellen veranderen. Bij carvacrol in combinatie met de zuren zijn dit vooral veranderingen in de expressie van het IKBA gen. Ook zijn er bij carvacrol veranderingen in de HSP70 en HSP70.2 genen, dit is echter alleen wanneer de cel ook wordt blootgesteld aan de bacterie. Bij cinnamaldehyde in combinatie met de zuren zijn er veranderingen in de expressie van het HSP70 en HSP70.2 gen gevonden.

De beste behandeling bij de *S. Typhimurium* bacterie zou carvacrol in combinatie met lactic acid zijn om de invasie van deze bacterie in IPEC-J2 cellen te remmen. De beste behandelingen bij *E. coli* K88 bacterie is carvacrol in combinatie met cinnamic acid, formic acid of lactic acid om de aanhechting van deze bacterie aan IPEC-J2 cellen te verminderen. Echter omdat deze proef maar twee keer is uitgevoerd zal deze proef nog vaker herhaald moeten worden om deze resultaten statistisch vast te stellen.

6. Literatuurlijst

- (1) Registratie voedselinfecties en –vergiftigingen bij de inspectie voor gezondheidszorg en de voedsel en waren autoriteit, 2009, www.rivm.nl 24-01-2011 11.09
- (2) Salmonellosen, LCI/Gr februari 2006, laatst gewijzigd maart 2009, www.rivm.nl 26-01-2011 12.03
- (3) Bruininx, E.M.A.M., C.M.C van der Peet-Schwering, 1996. Speendiarree bij biggen: de factoren voeding en Escherichia coli. Proefverslag nr P1.159, Praktijkonderzoek Varkenshouderij, Rosmalen, The Netherlands., 52 pp.
- (4) <http://www.greenvalleyinternational.nl> 24-01-2011 15.46
- (5) Burt, S.A., 2007. Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. PhD thesis, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands. ISBN 978-90-393-4661-7.
- (6) www.gielenaroma.nl 01-04-2011 12.05
- (7) Hubbert, W.T., H.V. Hagstad, E. Spangler, M.H. Hinton and K.L. Hughes, 1996. Food Safety and Quality Assurance: Foods of Animal Origin (second edition), Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. ISBN 0-8138-0714-X.
- (8) Hunt, M., 2010. Real time PCR, University of South Carolina, School of Medicine, tutorial. www.pathmicro.med.sc 04-04-2011 11.18
- (9) Zhou, F., B. Ji, H. Zhang, H. Jiang, Z. Yang, J. Li, Y. Ren, W. Yan, 2007. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella* Typhimurium. Journal of Food Protection 70(7): 1704-9.
- (10) Food-Info.net www.food-info.net 10-05-2011 09.47
- (11) Burt, S.A., B.G.M. Jongerius-Gortemaker, M.H.T. Tersteeg-Zijderveld, A.D.J. Timan, B. Berndtsson, 2010. Cinnamaldehyde and organic acids inhibit *Salmonella* invasion of porcine gut cells in vitro. Food Micro, Copenhagen, Denmark, 1 – 4 September 2010 (poster).
- (12) Inamuco, J., A.K.J. Veenendaal, S.A. Burt, J. Tjeerdsma-van Bokhoven, H.P. Haagsman, E.J.A. Veldhuizen., 2010. Carvacrol reduces *Salmonella* motility and invasion of IPEC-J2 epithelial cells., Gut Flora day, Ghent, Belgium, 23 September 2010 (poster).
- (13) Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF, 2009. [Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data](#). Nucleic Acids Res. 37(6):e45. Epub 2009 Feb 22.
- (14) Pfaffl, M.W., 2001. [A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR](#). Nucleic Acids Res. 29(9):e45.
- (15) www.textbookofbacteriology.net 10-04-2011 13.12 (afbeelding)
- (16) www.alanwood.net 10-04-2011 13.14 (afbeelding)

7. Bijlage

Tabel 1. Primers gebruikt bij de Real-time PCR.

Gene	Protein	Ref Seq	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'	Ta
CAT	Catalase	NM_214301	GTGCCAACGAAG ATAATGTC	GACCCGCAATGTT CTCAC	56-63
HIF-1a	Hypoxia inducible factor 1, α subunit	NM_001123124	CAAATCCAGAGTC CCTGGAAC	CACTGGGACTGTT AGGCTCAG	61-64
HSP27	Heat shock protein 27	NM_001007518	GCTGACGGTCAAG ACCAAG	GCAGCGTGATTT TCGAGTG	57-64
HSP70	Heat shock protein 70	NM_001123127	CAGGTGCAAAGTA CAAGACAAG	ATGGGACGACAA ATCTGCT	61-63
HSP70.2	Heat shock protein 70.2	NM_213766	GAGTCGTACGCCT TCAACAT	AAATCACCTCCTG ACACTTGT	59-63
I κ B α	NF κ B-inhibitor	NM_001005150	CTGCACTTGGCCA TCATC	GAGTCTGCTGCAG GTTGTTC	57-58
Nrf2	Nuclear factor (erythroid- derived)-like 2	AK236642	ACATCCCGTCAGA AACCAGTG	GTAGCCGAAGAA ACCTCATTGTC	57-63
SDHA	Succinate dehydrogenase	DQ845177	GCAGGCCAGGAG ATAAAGTTC	GTTCCGTTTCGCAA ATCTCAG	57-63
TBP	TATA-box binding protein	DQ178129	GGTTTAGGTTGCA GCACCAG	CCAAATAGCAGCA CAGTACGAG	56