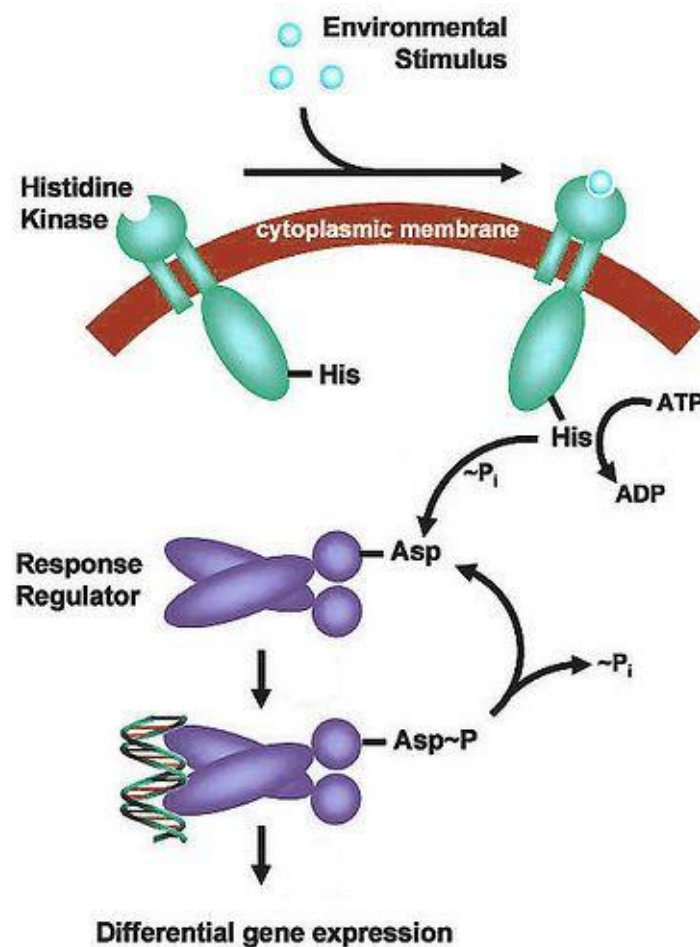


De karakterisatie van een *Campylobacter jejuni* twee component systeem

The characterisation of
a *Campylobacter jejuni*
two component system



De karakterisatie van een *Campylobacter jejuni* twee component systeem

The characterisation of
a *Campylobacter jejuni*
two component system

Naam: Nathan Groenendijk

Datum: Mei 2013

Opleiding:

Hogeschool Utrecht
Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek
Specialisatie Medische Microbiologie
F.C. Dondersstraat 65, Utrecht

Begeleider:

Ing. M.M. Immink MSc

Stageplek:

Universiteit Utrecht
Diergeneeskunde
Infectiebiologie
Yalelaan 1, Utrecht

Begeleider:

Dr. M.M.S.M. Wösten



Universiteit Utrecht



Figuur voorkant: Overzicht van de werking van een twee component systeem¹⁸

Voorwoord

Deze afstudeeropdracht is uitgevoerd ter afsluiting van de opleiding Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek met als specialisatie Medische Microbiologie, aan de Hogeschool Utrecht. De opdracht is uitgevoerd aan de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht op de afdeling van de Infectiebiologie. Op dit laboratorium wordt al vele jaren actief onderzoek gedaan naar de moleculaire biologie, pathogenese en preventie van bacteriële infecties. Het organisme waar vooral mee gewerkt wordt is *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*). Ook mijn aangewezen onderzoek ging over deze ziekteverwekker. Mijn onderzoek is een vervolg onderzoek in een groot project dat al meerdere jaren loopt. Al vele jaren is geprobeerd om de werking van het twee component systeem Cj1491/1492 te ontdekken maar tot nu toe is nog lang niet alles bekend. De bedoeling is om met dit onderzoek weer een stap dichterbij de werking van dit systeem te komen.

Naast het hoofdonderzoek over het Cj1491/1492 twee component systeem is er nog een extra onderzoek uitgevoerd om tijdens de stage periode zoveel mogelijk technieken te kunnen leren. Ook dit onderzoek zal in dit verslag besproken worden als project 2. De nadruk zal wel blijven liggen op het hoofdonderzoek.

Het doel van deze afstudeeropdracht was voor mij om zoveel mogelijk technieken te leren en een goede kijk te krijgen hoe fundamenteel onderzoek er in de praktijk aan toe gaat. Graag wil ik alle collega's van de infectiebiologie afdeling bedanken voor de hulp en gezelligheid die ik heb mogen ervaren tijdens de zeven maanden dat ik stage heb gelopen. In het bijzonder wil ik daarnaast meneer M. Wösten bedanken voor de goede begeleiding vanaf de stage plek en mevrouw M. Immink voor de aansturing vanuit de Hogeschool Utrecht.

Samenvatting

Campylobacter jejuni is een van de grootste veroorzakers van gastro-enteritis bij de mens. Voor pluimvee is deze bacterie echter een commensaal. *C. jejuni* moet zich goed kunnen aanpassen om te kunnen overleven in verschillende gastheren en externe milieus. Mechanismen die daarbij een rol spelen zijn de twee component systemen. Deze systemen bestaan uit een sensor en een response regulator. In dit onderzoek is het twee component systeem Cj1491/1492 nader onderzocht. De Cj1491 mutant, waarvan het gen Cj1491 gedeeltelijk is verwijderd, geeft een verminderde persistentie in kippen. Met behulp van groeicurves en Western blotting is *in vitro* onderzocht waarom deze mutant in kippen niet kon persisteren. Ontdekt is dat het heatshock eiwit GroEL anders wordt gereguleerd in deze mutant. Meer kennis over de werking van deze chaperonne kan leiden tot meer kennis rondom de werking van het twee component systeem Cj1491/1492.

Een tweede onderzoek is uitgevoerd om de functie van het operon Cj0727-733 van *C. jejuni* te achterhalen. De promotor voor dit operon wordt gereguleerd door het twee component systeem PhosS/PhosR wat geactiveerd wordt door lage externe fosfaat concentraties. Een mutant is gecreëerd waarin dit operon grotendeels is verwijderd. Deze mutant alsmede de wildtype zijn getest op hun vermogen om fosfonaten om te zetten. *C. jejuni* zou in staat moeten zijn om phenylphosphonate te gebruiken, maar dit kon niet gereproduceerd worden.

Summary

Campylobacter jejuni is one of the leading causes of severe gastroenteritis in humans. In poultry, however this bacterium is a commensal. To survive in different hosts *C. jejuni* needs to be able to adapt to changing environments. Mechanisms that play an important role in these adaptations are two component systems. These systems consist of a sensor and a response regulator. In this study the two component system Cj1491/1492 is studied in more detail. Previous results showed that a Cj1491 mutant, in which the gene Cj1491 is partly deleted, is less persistence in chickens. To obtain an *in vitro* phenotype growth curves are generated and Western blotting is used to examine why this mutant could not persist in chickens. Results show that the heatshock protein GroEL might be regulated by this system. More knowledge about this chaperone might lead to better understanding of the regulation of the two component system Cj1491/1492.

A second subject is performed to address the function of the operon Cj0727-733 of *C. jejuni*. The promoter in front of this operon is regulated by the two component system PhosS/PhosR which is activated by low external phosphate concentrations. A mutant is created in which almost the complete Cj0727-733 operon is mutated. This mutant as well as the parent strain are tested to grow on phosphonates as sole phosphate source. *C. jejuni* should be able to use phosphonates but this could not be reproduced.

Inhoudsopgave

Voorwoord	3
Samenvatting	4
Summary	4
Afkortingenlijst	7
Hoofdstuk 1. Inleiding	8
1.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	8
Hoofdstuk 2. Theorie	9
2.1 Twee component systemen	9
2.2 Elektronen uitwisseling	10
2.3 Twee-component systeem Cj1491/1492	10
2.4 Fosfonaat regulatie (Project 2)	11
Hoofdstuk 3. Materiaal en methode	12
3.1 Bacterie stammen en groeicondities	12
3.2 Creëren van groeicurves	13
3.3 RNA-Isolatie	13
3.4 SYBR Green RT-qPCR	13
3.5 Polymerase chain reaction	14
3.6 API Campy	14
3.7 TTC Assay	15
3.8 SDS-PAGE	15
3.9 Twee-Dimensionale gel elektroforese	15
3.10 Western Blots	15
3.11 Zilverkleuring	16
3.12 Agar platen bereiden	16
3.13 Complementatie constructie	17
3.14 Transformatie naar <i>E.coli</i> DH5a (project 2)	17
3.15 Restrictie analyse	17
3.16 Natuurlijke transformatie	17
3.17 Constructie Cj0727-733 mutant	17
3.18 Gedefinieerde media	18
Yeast Nitrogen Base medium	18
ACES medium	18
3.19 Groeicondities testen	19
3.20 Flagelkleuring	19

Hoofdstuk 4. Resultaten	20
4.1 Fenotype Cj1491 mutant	20
4.2 RT-qPCR laat zien dat <i>torA</i> en <i>torC</i> genen worden gereguleerd door Cj1491	21
4.3 Complementatie van de Cj1491	21
4.4 Defect in de tor genen van de wildtype	22
4.5 Wildtype bevat deleties in <i>torA</i> en <i>torC</i>	23
4.6 Cj1491 zet minder Triphenyl tetrazolium chloride om	23
4.7 Antilichaam titer bepaling kippen sera	23
4.8 Identificatie immunogene eiwitten gereguleerd door het Cj1491/1492 twee-component systeem	24
4.9 Transcriptie regulatie groEL	27
4.10 Controle constructie Cj0727-733 mutant (Project 2)	28
4.11 YNB medium heeft een effect op de flagel	28
 Hoofdstuk 5. Discussie en conclusie	 30
5.1 Hoofdproject	30
5.2 Project 2	32
 Literatuur	 34
Bijlages	36
Bijlage 1. Uitgevoerde condities Bioscreen	36
Bijlage 2 Ingrediënten ACES medium	37

Afkortingenlijst

ATP	= Adenosine TriPhosphate
bp	= Baseparen
<i>C. jejuni</i>	= <i>Campylobacter jejuni</i>
DMSO	= Dimethyl sulfoxide
DNA	= Desoxyribonucleïnezuur
dNTP	= Desoxyribonucleotidetrifosfaat
DTT	= Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
EDTA	= Ethyleendiaminotetra-azijnzuur
EGTA	= Ethyleen glycol tetra-azijnzuur
Fig.	= Figuur
HI	= Heart Infusion
HPK	= Histidine proteïne Kinase
Kbp	= Kilobaseparen
kDa	= KiloDalton
LB	= Luria Broth
MH	= Mueller-Hinton
Momp	= Major outer membrane protein
NADH	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide
OD	= Optische Dichtheid
PAGE	= Polyacrylamide gel electroforese
PBS	= Phosphate Buffered Saline
PCR	= Polymerase Chain Reaction
RNA	= Ribonucleïnezuur
RT-qPCR	= Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction
SDS	= Sodium Dodecyl Sulfate
TCS	= Twee Component Systeem
TMAO	= Trimethyl amino N-Oxide
TTC	= Triphenyltetrazolium chloride

Hoofdstuk 1. Inleiding

1.1 *Campylobacter jejuni*

C. jejuni behoort tot de grootste veroorzakers van gastro-enteritis bij de mens, resulterend in diarree, koorts en buikkrampen. Daarnaast kan bij één op de duizend *C. jejuni* infecties het Guillain-Barré syndroom zich ontwikkelen, een neurodegeneratieve ziekte waarbij zenuwen niet meer in staat zijn om te functioneren, in enkele gevallen kan dit tot de dood leiden. *C. jejuni* komt als commensaal in vele warmbloedige dieren voor. De grootste aantallen *C. jejuni* bacteriën worden gevonden in de caeca, de blinde darm, van pluimvee. Een *C. jejuni* infectie kan ontstaan wanneer pluimvee producten niet goed worden verhit, maar ook wanneer verzorgers van dieren die dragers zijn niet goed de hygiëne regels naleven.^{1,2} De infectie dosis van *C. jejuni* ligt erg laag vergeleken bij andere darmpathogenen, voor sommige personen is 500 bacteriën al genoeg om een infectie op te lopen.³

C. jejuni is een Gram-negatieve, slanke en spiraalvormige staaf (Figuur 1), welke zeer beweeglijk is door de twee flagellen aan beide polen van de cel. De bacterie vermenigvuldigt zich bij een temperatuur tussen 30-44°C en heeft een optimum temperatuur bij 42°C. *C. jejuni* groeit het beste onder microaerofiele omstandigheden maar overleeft ook bij lagere zuurstof concentraties van 0,3%.^{1,2}

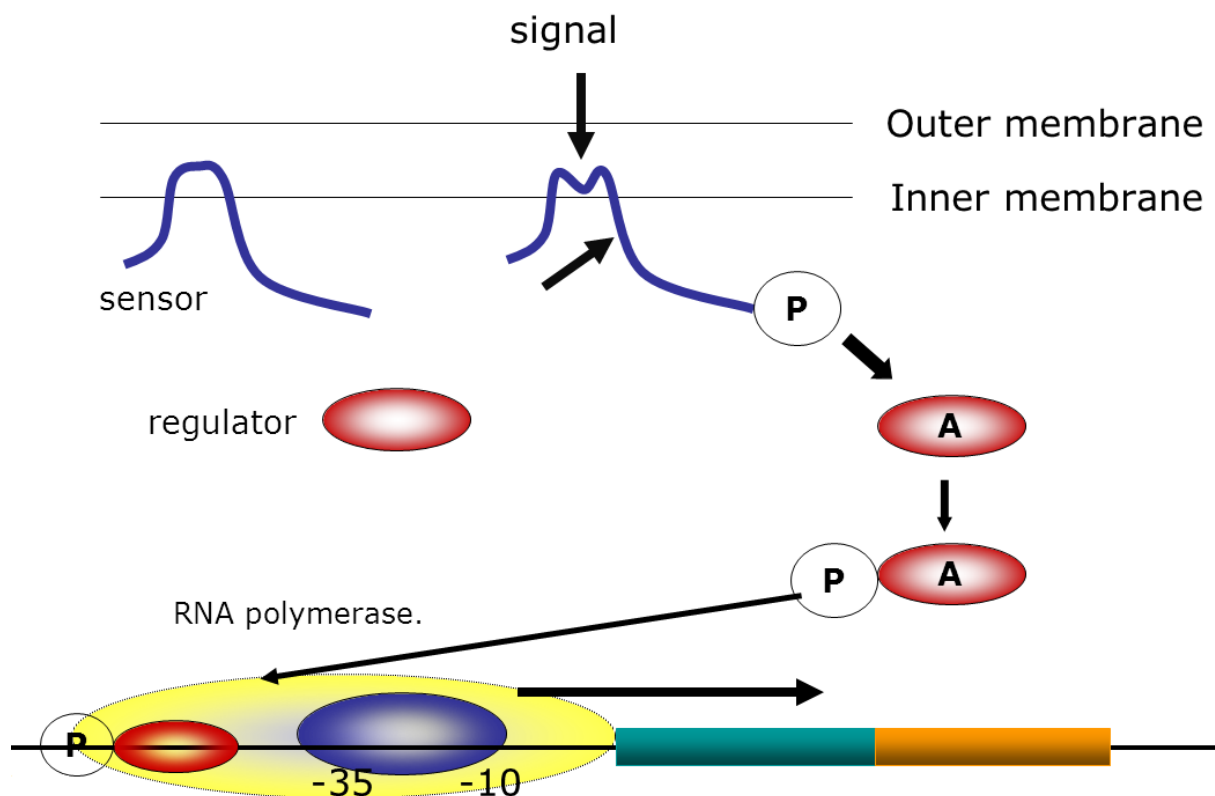


Figuur 1. *C. jejuni*

Hoofdstuk 2. Theorie

2.1 Twee component systemen

C. jejuni is in staat om zich aan te passen aan een aantal verschillende milieus en condities. Systemen die hierbij een belangrijke rol spelen zijn de zogenaamde twee component systemen (TCS). Bacteriën met veel van dit soort systemen hebben een grotere niche doordat ze zich aan meerdere milieus kunnen aanpassen en daarmee makkelijker kunnen overleven bij wisselende omstandigheden. Een TCS bestaat altijd uit twee eiwitten, een sensor en een response regulator (Figuur 2). De sensor is meestal geïntegreerd in het cytoplasma membraan en kan geactiveerd worden door een specifiek signaal. Enkele voorbeelden van dit soort activatie signalen zijn concentraties van zouten, ijzer of zuurstof of aan/afwezigheid van licht, suikers of peptiden. Activering van de sensor leidt tot autofosforilatie van het histidine kinase domein op de sensor, indien Adenosine TriPhosphate (ATP) aanwezig is. De sensor communiceert op zijn beurt met de response regulator door de fosfaat groep te koppelen aan een aspartaat residu van de regulator. Dit zorgt voor de activatie van het DNA-bindende domein van de regulator zodat deze aan een bepaalde regio van het DNA kan binden. Hierdoor wordt de transcriptie van een of meerdere genen geïnitieerd.

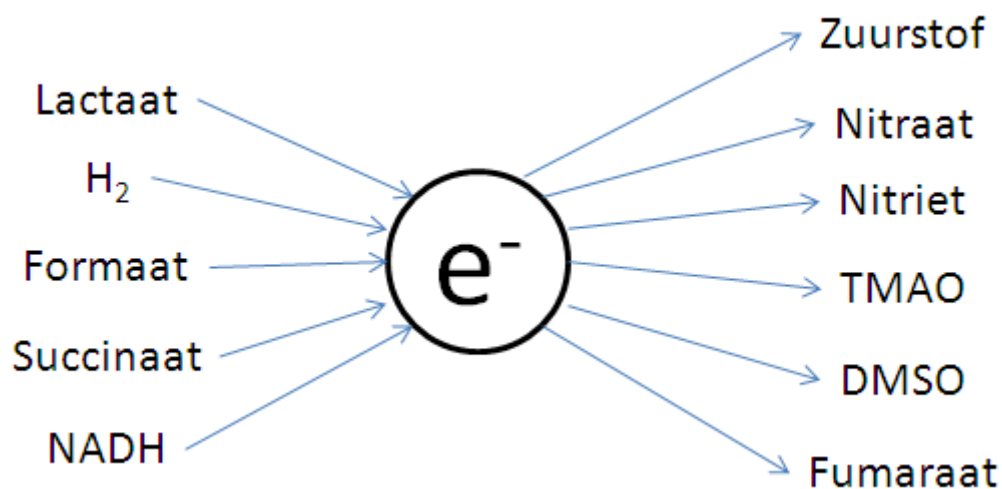


Figuur 2. Schematisch weergave van de werking van een twee component systeem. De sensor bevindt zich in de binnenmembraan en kan geactiveerd worden door een specifiek signaal. De regulator wordt op zijn beurt door de sensor ook geactiveerd en kan daardoor aan een specifiek stuk DNA binden waardoor transcriptie gestart wordt.

Een TCS kan gemiddeld 30 verschillende genen reguleren, deze genen kunnen verantwoordelijk zijn voor bijvoorbeeld chemotaxis, sporulatie, celdeling of bepaalde productieprocessen. Het aantal twee component systemen verschilt sterk in verschillende bacterie soorten. In *Mycoplasma genitalium* zijn deze systemen bijvoorbeeld niet ontdekt, terwijl bij *Nostoc punctiformis* op dit moment 147 sensoren en 92 response regulatoren bekend zijn. Bij *Campylobacter* is het aantal twee component systemen beperkt, er zijn slechts zeven sensoren en twaalf response regulatoren bekend.¹² Dit betekent dat nog niet voor elke regulator de bijbehorende sensor is gevonden.

2.2 Elektronen uitwisseling

Eén van de processen waar vaak twee component systemen bij zijn betrokken is de elektronen uitwisseling. Om te kunnen overleven heeft *C. jejuni* elektronen nodig. Deze elektronen krijgt hij van donoren zoals lactaat, formaat, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), succinaat en waterstof. Naast donoren zijn er ook acceptoren nodig om de elektronen weer kwijt te raken. De belangrijkste elektronen acceptor is zuurstof, maar die is niet altijd in voldoende mate aanwezig. In de ceaca van kippen is er bijvoorbeeld maar een beperkte hoeveelheid zuurstof aanwezig. Wanneer er te weinig zuurstof aanwezig is zijn er stoffen die ook als acceptor kunnen dienen. Voorbeelden van andere elektronen acceptoren zijn nitraat, nitriet, trimethylamine N-Oxide (TMAO), dimethyl sulfoxide (DMSO) en fumaraat (Figuur 3). Volledig de zuurstof vervangen is echter niet mogelijk, wanneer een volledig anaeroob milieu wordt gebruikt kan *C. jejuni* niet groeien ondanks toevoeging van een van de andere acceptoren.⁴



Figuur 3. Een aantal elektronen donoren(links) en acceptoren(rechts) die *C. jejuni* kan gebruiken.

2.3 Twee-component systeem Cj1491/1492

Eén van de systemen die bij *C. jejuni* mogelijk een rol speelt bij het overleven onder verschillende condities is het hypothetische twee component systeem Cj1491/1492. Op basis van homologie wordt aangenomen dat deze twee genen samen een TCS vormen, maar dit is nog niet wetenschappelijk bewezen. Bekend is dat Cj1492 een sensor is van 48,1 kDa, en dat Cj1491 een response regulator is met een grootte van 26,6 kDa. Beide eiwitten bevinden zich in het cytoplasma. Uit eerdere resultaten is gebleken dat een mutant waarbij een deel van het gen Cj1491 vervangen is door een chlooramfenicol resistentie gen leidt tot een verminderde kolonisatie persistentie van deze mutant in kippen. Zowel *C. jejuni* wildtype als de Cj1491 mutant waren in staat kippen te koloniseren tot 10^9 bacteriën/g caecale mest. Echter na 14 dagen namen in tegenstelling tot de *C. jejuni* wildtype de aantallen Cj1491 mutant bacteriën in de ceaca van kippen sterk af. Na 21 dagen waren de meeste kippen zelfs volledig vrij van deze gemuteerde *C. jejuni*. Herinfectie van enkele *C. jejuni* vrije kippen met wildtype bacteriën was niet mogelijk. Er is een mogelijkheid dat de Cj1491 mutant gebruikt kan worden als levend vaccin voor kippen. Van alle kippen is serum afgenomen om te achterhalen waarom de Cj1491 mutant niet kan persisteren. Tevens is het RNA van de Cj1491 mutant en wildtype bacteriën geïsoleerd uit de ceaca van kippen. Dit RNA is met micro-arrays geanalyseerd. Belangrijke genen die verschillende activiteit gaven tussen de mutant en wildtype zijn weergegeven in Tabel 1.

Tot op heden is het signaal waar het twee component systeem Cj1491/1492 op reageert alsmede de genen die gereguleerd worden door dit systeem nog niet bekend. Het doel van dit onderzoek is dan ook om *in vitro* een verschil te vinden tussen de Cj1491 mutant en de isogene wildtype *C.*

jejuni zodat bepaald kan worden wat de functie van dit twee component systeem is en waardoor de gemuteerde bacteriën uit de kip verdwenen na verloop van tijd.

Tabel 1. Resultaten van een eerder uitgevoerde micro array met de verhoging of verlaging in de Cj1491 mutant.

Gen nummer	Vershil	Naam	Beschrijving
Cj0087	-5,247	<i>aspA</i>	Aspartate ammonia-lyase
Cj0147c	-5,82	<i>trx</i>	Thioredoxin
Cj0284c	-7,38	<i>cheA</i>	Chemotaxis protein CheA
Cj0334	-8,786	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase AhpC/TsaA family
Cj0408	-7,093	<i>frdC</i>	Fumarate reductase, cytochrome b subunit
Cj0547	-8,552	<i>flaG</i>	Possible flagellar protein
Cj0720c	-7,208	<i>flaC</i>	Flagellin
Cj0758	-5,184	<i>grpE</i>	Heat shock protein GrpE
Cj0780	-5,386	<i>napA</i>	Periplasmic nitrate reductase, large subunit
Cj0913c	-10,93	<i>hup</i>	DNA-binding protein HU homolog
Cj0936	-11,66	<i>atpE</i>	ATP synthase F0 sector, subunit C
Cj1221	-6,951	<i>groEL</i>	60 kDa chaperonin (cpn60)
Cj1259	-28,77	<i>porA</i>	Major outer membrane protein (Momp)
Cj1382c	-5,447	<i>fldA</i>	Flavodoxin
Cj1490c	-5,867	<i>ccoN</i>	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I
Cj1568c	-9,068	<i>nuoL</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase, subunit L
Cj0564	38,07	Cj0564	Conserved hypothetical integral membrane protein
Cj0600	5,761	Cj0600	Conserved hypothetical protein

2.4 Fosfonaat regulatie (Project 2)

Fosfoor is een belangrijke component voor alle levende organismen, zo ook voor *C. jejuni*.¹⁰ Fosfaat kan direct opgenomen worden uit de omgeving maar kan ook verkregen worden door het afbreken van verbindingen die fosfaat bevatten. Een van de stoffen die *C. jejuni* kan gebruiken als fosfaat bron is fosfonaat.⁹ Het operon bestaande uit de zeven genen Cj0727-733 wordt gereguleerd door het twee component systeem PhosS/PhosR wat geactiveerd wordt door lage fosfaat concentraties.¹⁰ Sommige genen van het Cj0727-733 vertonen homologie met fosfonaat genen van andere bacteriën⁹. In dit project zal onderzocht worden door onder ander een mutatie van deze genen of dit operon betrokken is bij de fosfonaat metabolisme.

Hoofdstuk 3. Materiaal en methode

3.1 Bacterie stammen en groeicondities

De stammen, plasmiden en primers die tijdens het onderzoek zijn gebruikt zijn weergegeven in tabel 2.

Tabel 2. Stammen, plasmiden en primers die bij het onderzoek gebruikt zijn.

Stammen	Eigenschappen	Resistentie	Bron (stock nummer)
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116	Wildtype (Stock uit 2012)	-	Palmer et al. ¹¹
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116 Cj1491::cm	Mutant met gedeeltelijke deletie van gen Cj1491	Chlooramfenicol	M. Wosten
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116	Wildtype (Stock uit 2008)	-	Palmer et al. ¹¹
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116	Wildtype, passage door kip 1 dag	-	M. Wösten
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116	Wildtype, passage door kip 2 dagen	-	M. Wösten
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116	Oorspronkelijke Wildtype	-	Palmer et al. ¹¹
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116 Cj1491::cm	Mutant passage door kip	Chlooramfenicol	M. Wosten
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116 Cj1491::cm + pMA1 Cj1491-1493	Gecomplementeerde Cj1491 mutant	Chlooramfenicol Kanamycine	Dit project
<i>E. coli</i> S17 pMA1 Cj1491-1493	Met conjugatie plasmide pMA1-Cj1491-Cj1493	Kanamycine	M. Wösten
<i>Campylobacter jejuni</i> 81116 Cj0727-733::km	Mutant met gedeeltelijke deletie van genen Cj0727-733	Kanamycine	Dit project
<i>Campylobacter jejuni</i> phosR::cm	Mutant met gedeeltelijke deletie van <i>phosR</i>	Chlooramfenicol	M. Wosten
<i>E. coli</i> DH5a	Gebruikt voor kloneren	-	NCCB
Plasmiden	Eigenschappen	Bron	
pMA1 Cj1491-1493	<i>C. jejuni</i> / <i>E. coli</i> shuttle conjugative expression vector, bevat Cj1491-1493, Km ^r	M. Wosten	
pJET	Amp ^r , kloneringsvector	Fermentas, Germany	
RT Primers	Sequentie	Naam	
55	AATGTCACAAGAATGTAAAG	Cj1491start	
60	CACCACTGTAAATTAAGTT	Cj1491end	
262	GCAGGCCAAGCATTAGCTGTA	Cj265Ftaq (<i>torC</i>)	
263	TTTGTAATAACTGCGGAATTTGC	Cj265Rtaq (<i>torC</i>)	
457	GCAAAGGATTTGCTTGATGTTTT	Cj0758Ftaq (<i>grpE</i>)	
458	CACTCCTTCTTTGATTTTAAAGCTAATTC	Cj0758Rtaq (<i>grpE</i>)	
465	TGGGTGCTTCACTCGTAAGAGA	Cj1221Ftaq (<i>groEL</i>)	
466	AACCGTTGCAGTAGTTGTTCCA	Cj1221Rtaq (<i>groEL</i>)	
832	ATCAGTGCTTGGCCTTTTGAG	RpoAftaq	
833	TGCTAGTGTAAGTAAACGGCGTAA	RpoArtaq	
1023	GGGGATCAAGCCTGATTGGGAGA	Km1-1368	
1031	AGGAAAAAATGAGTAAGAAATTTTCTT	Cj0727 start	
1032	CTTAAAAAGTTAAATTTTCATATTTTCTCT	Cj0733 end	
1033	TAGGATCCAATTACAATATTTTAAAGTCCTAA	Cj0732 <i>bam</i> HI F	
1034	CGGATCCAAATAAAACACTGCAAAGCATAGCA	Cj0728 <i>bam</i> HI R	
1072	TGCTGTCATACCACCGATCAC	Cj0264Ftaq (<i>torA</i>)	
1073	AGGAGGTGGTTTTGGACTAAGCT	Cj0264Rtaq (<i>torA</i>)	

De stammen worden bewaard bij -80°C in aanwezigheid van 50% glycerol. *C. jejuni* wordt routinematig opgegroeid op Saponine agar platen (Biotrading), bij een temperatuur van 37°C onder microaerofiele omstandigheden (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Indien nodig werd 20 µg/ml chlooramfenicol of 50 µg/ml kanamycine toegevoegd.

3.2 Creëren van groeicurves

Stammen zijn overnacht schuddend opgegroeid in 5ml HI Broth medium (Biotrading) onder microaerofiele omstandigheden bij 37°C. De volgende dag is 250 µl suspensie overgebracht in 5ml voorverwarmd HI Broth medium (42°C) en voor 6 uur schuddend (150rpm) geïncubeerd bij 42°C onder een microaerofiel klimaat. Groeicurves zijn vervolgens gemaakt met de Bioscreen C (Labsystems Oy, Helsinki), een plaat lezer gemaakt om celgroei te meten. De Bioscreen is in zijn geheel in een anaerobe kamer geplaatst waardoor het klimaat naar keuze anaeroob of microaerofiel gemaakt kan worden. De groei van de *C. jejuni* wildtype en de Cj1491 mutant zijn gemeten in aanwezigheid van een groot aantal verschillende stoffen in verschillende concentraties. Groei werd gevolgd bij 37°C of 42°C onder microaerofiele of anaerobe (0,3% O₂, 10% CO₂, 90% N₂) omstandigheden. Geteste stoffen zijn: Formaat, Fumaraat, Succinaat, Lactaat, TMAO, DMSO, NADH, Nitraat, Ureum, Propionaat, Butyraat, Acetaat, Pyruvaat, Glucose, Ethanol, Desoxycholaat, Galzouten, Citraat, Sulfaat, Sulfaat, IJzersulfide, Natriumchloride, Waterstofperoxide, Lactose, Ethyleendiaminotetra-azijnzuur (EDTA) en Ethyleen glycol tetra-azijnzuur (EGTA). De combinaties en concentraties van alle geteste condities zijn te vinden in Bijlage 1.

Voor het inzetten van de Bioscreen werd een 100-wells plaat eerst gevuld met de juiste hoeveelheid te testen stof. Vervolgens zijn de wellen aangevuld met een te testen bacterie cultuur (300 µl) met een optische dichtheid 550nm (OD₅₅₀) van 0,01. De bacterie cultuur was verdund in voorverwarmd HI (42°C). De gevulde plaat werd in de Bioscreen geplaatst en de OD₄₂₀₋₅₈₀ van de bacterie suspensie werd gedurende 24 tot 72 uur elke vijftien minuten gemeten. Tijdens het groeien stond de Bioscreen C ingesteld op een hoge schudsnelheid.

3.3 RNA-Isolatie

RNA werd geïsoleerd uit 4,5 ml *C. jejuni* cultuurtjes waar eerst de OD₅₅₀ van was bepaald. De 4,5 ml bacteriesuspensie is 15 minuten bij 14500 rpm afgedraaid. De pellet is opgenomen in 1 ml RNA-Bee (RNA Isolation Reagent, Amsbio) en 0,2 ml chloroform. Na rustig schudden en 5 minuten op ijs gestaan te hebben is het monster afgedraaid voor 15 minuten met 14500 rpm bij 4°C. Het supernatant is gemengd met 0,5 ml isopropanol en voor minimaal 7 uur bij -20°C gehouden. Daarna zijn de monsters afgedraaid voor 15 minuten bij 14500 rpm bij 4°C, waarna de pellet eenmaal is gewassen met 75% ethanol in DEPC water. Na drogen is de pellet opgelost in 50 µl DEPC water en bewaard bij -80°C. De RNA concentratie is bepaald met de NanoDrop (Thermo Scientific) en vervolgens zijn de RNA monsters DNA vrij gemaakt met behulp van DNase I kit (Fermentas), waarbij 3 µg RNA is gebruikt in een mix van totaal 33 µl.

3.4 SYBR Green RT-qPCR

SYBR Green RT-qPCR is uitgevoerd met Briljant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR & QRT-PCR Master Mixes(Agilent). DNase behandeld RNA (2 µl) is gemengd met 10 µl Sybr-Green mix, 0,2 µl 100mM DTT, 1 µl Reverse transcriptase, 4,8 µl DEPC water en 1 µl van de benodigde primers (25pmol). De RT-qPCR is uitgevoerd op de Light Cyclers 480 (Roche). Het *rpoA* gen is gebruikt als normalisatie gen en DNA besmetting is gecontroleerd met behulp van *rpoA* primers zonder toevoeging van reverse transcriptase. De cycli die gebruikt zijn voor de RT-qPCR staan vermeldt in Tabel 3.

Tabel 3. Cyclus RT-qPCR.

Program name	Cycles	Analysis mode	Acquisition mode	Ramp Rate (°C/s)	Hold time	Temperature
Reverse transcription	1	None	None	4.4	10 min	50°C
Denaturation	1	None	None	4.4	3 min	95°C
Amplification	45	Quantification	None	4.4	5 sec	95°C
			Single	2.2	10 sec	60°C
Melting curve	1	Melting curves	None	4.4	5 sec	95°C
			None	2.2	1 min	65°C
			Continuous	0.11	-	97°C
Cooling	1	None	None	2.2	30 sec	40°C

3.5 Polymerase chain reaction

Twee verschillende polymerases zijn gebruikt voor de polymerase chain reactions (PCR). De eerste polymerase is de Dreamtaq DNA polymerase (Thermo Scientific) welke geen proofreading bezit. De tweede polymerase was de Phusion Hot Start II (Thermo Scientific) met proofreading. De gebruikte mixen zijn zichtbaar in Tabel 4. De keuze van de polymerase hangt af van het doel van het product. Wanneer het PCR product verder gebruikt gaat worden voor bijvoorbeeld een transformatie is proofreading benodigd en zal de Phusion polymerase gebruikt worden. Wanneer de PCR uitgevoerd wordt voor een controle van de lengte van het stuk en proofreading niet belangrijk is zal Dreamtaq polymerase gebruikt worden.

Tabel 4. Gebruikte mixen bij PCR.

	Dreamtaq	Phusion Hot Start II
Water	41	36
20mM dNTP's	0,5	0,5
Primer 1 (25pmol)	1	1
Primer 2 (25pmol)	1	1
Polymerase	0,5	0,5
Bijbehorende buffer	5	10
DNA	1	1

De PCRs zijn uitgevoerd op de MyCycler, Thermal Cycler (Biorad). De gebruikte cyclus verschilt per soort primer, de lengte van het fragment en de keuze van de polymerase. Wanneer een PCR werd uitgevoerd met de Dreamtaq polymerase werd de cyclus begonnen met 30s op 94°C, bij de Phusion polymerase was dit op 98°C. Vervolgens werd de temperatuur verlaagd naar 48-54°C, afhankelijk van de smelttemperatuur van de primers, deze temperatuur dient altijd een paar graden lager te zijn dan de smelttemperatuur. Deze temperatuur werd vastgehouden voor 20s, om vervolgens weer te stijgen naar 72°C. De lengte van deze temperatuur was afhankelijk van de lengte van het fragment. Per 1000 baseparen (bp) was er minimaal een minuut nodig, dus bij 3000 bp werd de temperatuur bijvoorbeeld voor 3,5 minuten vastgehouden. Na deze stap werd er terug gegaan naar 20s op 94°C en begon de cyclus weer opnieuw. Nadat de cyclus 40 maal was uitgevoerd werd er voor 10 minuten een temperatuur van 72°C aangehouden om daarna het product te koelen naar 4°C waarin het bewaard kon blijven.

3.6 API Campy

Testen met API Campy(Biomérieux) zijn uitgevoerd volgens het bijgeleverde protocol.

3.7 TTC Assay

Triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) is een redox indicator welke gebruikt wordt om redox reacties aan te tonen. De stof is normaal gesproken wit van kleur maar wanneer er redox reacties plaatsvinden verandert de kleur naar rood. Een assay is opgezet om de redox reacties in de wildtype en Cj1491 mutant te vergelijken in aanwezigheid van verschillende stoffen. Eerst zijn bacteriën overnacht microaerofiel opgegroeid in HI medium bij 37°C. De volgende dag zijn deze bacterie culturen verdund in HI tot een OD₅₅₀ van 0,25 en is er opnieuw geïncubeerd voor zes uur. De zes uur oude cultuurtjes zijn vervolgens afgedraaid en de bacterie pellet is opgenomen in 3 ml HEPES buffer (20 mM Hepes acid, 0.4g/L KCl, 8.5g/L NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). Een 96 wells plaat werd gevuld met 150µL bacteriesuspensie in HEPES buffer per well, met toevoeging van 15µL 1% TTC, 10µL HEPES buffer en 15µL van de te testen stof met een concentratie van 1M. De geteste stoffen zijn: formaat, succinaat, malaat, serine, aspartaat, pyruvaat, succinaat, lactaat, proline en threonine. De 96 wells plaat is 1-2 uur microaerofiel bij 37°C geïncubeerd en daarna is de verandering in kleur gemeten met de FLUOstar Omega (BMG Labtech).

3.8 SDS-PAGE

Bacteriën zijn gelyseerd door ze op te nemen in 3X Laemmli buffer en twee minuten te verwarmen bij 100°C. De bacterie lysaten zijn op een 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elektroforese (SDS-PAGE) gel geladen met een stack van 4% acrylamide en gedurende zestig minuten geelectroforeerd bij 150 Volt.

3.9 Twee-Dimensionale gel elektroforese

C. jejuni stammen zijn overnacht schuddend (140rpm) opgegroeid in 5 ml HI Broth medium bij 42°C onder microaerofiele omstandigheden. De overnacht suspensie is 15 minuten afgedraaid bij 4500 x g waarna de pellet twee keer is gewassen met aquadest en daarna opgelost in 3 ml aquadest. De cellen zijn zes keer 30 seconden gesoniceerd bij 80Hz met een Vibra Cell (Sonics & Materials INC.) en vervolgens is de eiwit concentratie bepaald met de BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Na het bepalen van de eiwit concentratie is 100 µg eiwit opgezuiverd met behulp van de 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). Na het zuiveren van het eiwitmonster is de pellet opgenomen in 250 µl Rehydration solution (RHS) (10.5g Ureum, 3.8g Thiouream, 1.0g Chaps, 75mg Dithiothreitol (DTT), kleine hoeveelheid Broomfenolblauw, aanvullen tot 25ml met water). Isoelectric focusing is uitgevoerd met Immobiline Drystrips pH 3-10NL 13cm op een IPGPhor (GE Healthcare). Het eiwitmonster in 250µl RHS is gemengd met 4ul protease remmer en 5ul IPG Buffer pH 3-10NL (GE Healthcare). De run is vervolgens uitgevoerd met de volgende tijd en spanning: 13h 30V, 1h 1000V, 1h 5000V, 4h 8000V, 2h 500V. Nadat de eerste dimensie klaar was zijn de strips 15 minuten geïncubeerd in DTT (10mg/ml) opgelost in equilibratie buffer (10ml 10% SDS, 1.675ml 1.5M Tris/HCL pH 8.8, 18.025 g Ureum, 17.2g glycerol (87% oplossing) aangevuld tot 50ml met water). Vervolgens zijn de stripjes overgeplaatst in iodoacetamide 25mg/ml in equilibratie buffer, waarin ze ook 15 minuten zijn geïncubeerd. De tweede dimensie is uitgevoerd met een 10% SDS-PAGE gel waarbij de stripjes en markers worden afgesloten met behulp agarose sealing solution (20mL Tris buffer, 0.5ml SDS, kleine hoeveelheid Broomfenolblauw). De gel is gerund bij 15V/gel voor 15 min en 30V/gel tot de toegevoegde broomfenol blauw de onderkant van de gel bereikte.

3.10 Western Blots

Western blotting is uitgevoerd met behulp van de Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs en het bijbehorende Transfer System(Bio-Rad). Vanwege de grootte werden 2-D gelen in tweeën gesplitst voordat ze geblot werden. Gekozen is voor de optie Mixed MW, waarbij de transfer gebeurd voor 7 minuten bij 2,5A en 25V. Na het electro blotten zijn de membranen voor een half uur geïncubeerd in 5% blockbuffer (5% melkpoeder(Elk, Campina) in Phosphate Buffered Saline (PBS) en 0.05% TWEEN 20(Sigma-Aldrich) in PBS). Daarna is het membraan 5 minuten gewassen met wasbuffer (2% melkpoeder en 0,05% TWEEN 20 in PBS). Vervolgens is overnacht de blot in het eerste antilichaam geïncubeerd, bestaand uit vijftig maal verdund kippenserum in wasbuffer.

De volgende dag zijn de membranen twee maal gewassen met wasbuffer en vervolgens een uur geïncubeerd met het tweede antilichaam, IgG geit anti-kip (AbD Serotec), in een verdunning van 1:5000 in wasbuffer. Na deze laatste incubatie stap zijn de membranen gewassen met wasbuffer en vervolgens met PBS. Tot slot zijn de blots behandeld met Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) en zijn de eiwitten gedetecteerd in een Chemidoc (Bio-Rad).

3.11 Zilverkleuring

Om eiwitten zichtbaar te maken werd een zilverkleuring toegepast. Bij de zilverkleuring werden de gellen afwisselend in verschillende oplossingen geïncubeerd. Het protocol met de oplossingen en incubatietijden van deze kleuring is weergegeven in Tabel 5. Oplossing E dient enkele keren verversd te worden en kan gestopt worden met oplossing F wanneer een duidelijk bruinkleuring zichtbaar is.

Tabel 5. Werkwijze zilverkleuring

Oplossing	Eindconcentraties	Incubatietijd
A	50% Methanol 10% Azijnzuur	60 minuten
B	5% Methanol	15 minuten
	Wassen met water	3 x 5 minuten
C	0,2g/L natriumthiosulfaat	2 minuten
	Wassen met water	3x snel
D	2g/L Zilvernitraat	25 minuten
	Wassen met water	3x snel
E	30g/L Natriumcarbonaat 500uL/L Formaldehyde (37%) 20ml/L Oplossing C	3-6 minuten
F	14g/L Natrium2-EDTA	10 minuten
	Water	Bewaren

3.12 Agar platen bereiden

Voor transformaties werden verse zelfbereide platen gebruikt, welke gemaakt worden volgens onderstaande procedure:

Saponine agar

Bij het maken van saponine platen werd 20g Blood Agar Base No.2 (Oxoid) opgelost in 500 ml aquadest H₂O. Dit werd geautoclaveerd en vervolgens in een waterbad weer afgekoeld tot 50°C. Tijdens het afkoelen is 20 ml paardenbloed gelyseerd met 1 ml 10% Saponine (Sigma), daar werd vervolgens een flesje Haemophilus Test Medium Supplement (Oxoid) aan toegevoegd en wanneer nodig ook de antibiotica. Gebruikte antibiotica zijn kanamycine en chlooramfenicol. Platen zijn vervolgens gegoten met 25 ml agar per plaat.

Mueller-Hinton(MH) agar

Voor de MH platen is 10,5g Mueller-Hinton Broth (Oxoid) en 8,5 g Bacto Agar (Difco) in 500ml aquadest H₂O gemengd. Dit is geautoclaveerd en na kort afkoelen zijn er platen van 25ml gegoten.

Heart Infusion agar

HI agar werd gemaakt door 12,5g Heart Infusion Broth (Difco) en 8,5g Bacto-agar te mengen in 500 ml aquadest H₂O, dit te autoclaveren en vervolgens zijn 2ml epjes gevuld met 1 ml agar welke gebruikt kunnen worden bij de natuurlijke transformatie.

3.13 Complementatie constructie

Het plasmide benodigd voor de complementatie van de Cj1491 mutant bevond zich in een *Escherichia coli* S17 stam. Met behulp van conjugatie is geprobeerd het complementatie plasmide in de Cj1491 mutant te transformeren. Hiertoe werd *E. coli* S17 met de plasmide overnacht opgegroeid in Luria-Broth (LB) medium bij 37°C met toevoeging van 50 µg/µl kanamycine. De Cj1491 mutant werd in HI onder microaerofiele omstandigheden opgegroeid bij 37°C zonder antibiotica. De volgende dag werd het *E. coli* cultuurtje verdund tot een OD₅₅₀ van 0,05 in LB zonder antibiotica en de Cj1491 mutant werd in HI verdund tot een OD₅₅₀ van 0,5. Beide cultuurtjes zijn voor 2,5 uur opnieuw geïncubeerd onder dezelfde omstandigheden als overnacht is gebeurt. Vervolgens is 1 ml van het *Campylobacter* cultuurtje 10 minuten afgedraaid bij 5000x g. De pellet werd daarna opgenomen in 1 ml *E. coli* cultuur en uitgespreid op een vers gegoten Mueller-Hinton plaat. De plaat is vijf uur microaerofiel bij 37°C gezet. Vervolgens zijn alle bacteriën op de MH plaat verzameld en uitgespateld op een verse saponine plaat met chlooramfenicol en kanamycine. Deze plaat is opgekweekt en losliggende kolonies zijn geïsoleerd. De controle van de complementatie is uitgevoerd met een PCR op de geïsoleerde plasmides en het geïsoleerde DNA van de stam met behulp van primers 55 en 60. DNA isolatie is uitgevoerd met de High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Plasmide isolatie is uitgevoerd m.b.v. de GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

3.14 Transformatie naar *E.coli* DH5α (project 2)

De transformatie van plasmiden naar *E. coli* is uitgevoerd met behulp van een heatshock. Hiertoe werd 50µl competente cellen en 10µl DNA bij elkaar gevoegd en voor dertig minuten op ijs bewaard. Vervolgens is er een heatshock gegeven bij 42°C voor twee minuten waarna de mix weer terug op ijs is gezet. Na drie minuten is 1ml SOB medium (Biotrading) toegevoegd om daarna een uur te incuberen bij 37°C. Na de incubatie is 50µl suspensie op een LB plaat met de juiste antibiotica gebracht en is de overige suspensie afgedraaid om het supernatant gedeeltelijk te verwijderen. De pellet werd opgelost in het beetje overgebleven medium en vervolgens uitgestreken op een tweede LB plaat met antibiotica. Na een dag incuberen bij 37°C werden gegroeide kolonies geïsoleerd.

3.15 Restrictie analyse

Voor de restrictie analyse worden restrictie enzymen gebruikt van Fast Digest (Thermo Scientific). De restrictie werd uitgevoerd in een totale hoeveelheid van 20µl, met daarin 3 µl DNA product, maximaal 10% aan restrictie enzymen en bijgeleverde buffer. Restrictie gebeurde gedurende 5-10 minuten bij 37°C. De reactie werd gestopt afhankelijk van het soort restrictie enzym volgens bijgeleverd protocol. Producten werden gecontroleerd op een 1% agarose gel.

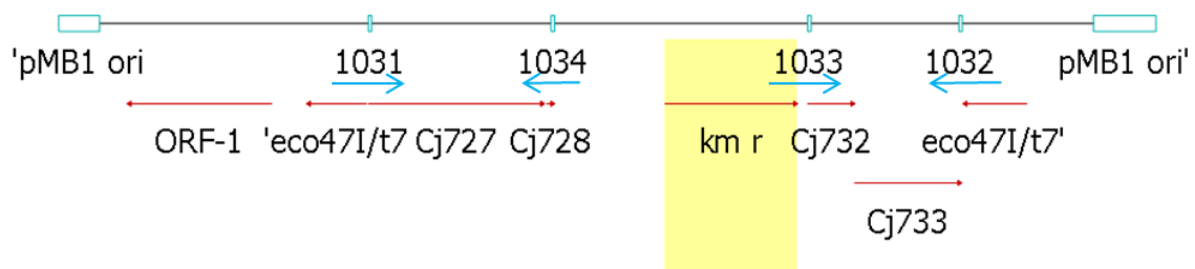
3.16 Natuurlijke transformatie

Voor de natuurlijke transformatie werd *C. jejuni* overnacht opgegroeid op verse saponine platen microaerofiel bij 42°C. De gegroeide bacteriën zijn verzameld en opgelost in 1 ml HI. Vervolgens is 200 µl van deze suspensie overgebracht in een 2 ml epje met HI agar. Gaatjes zijn in de dop geprikt en de epjes zijn voor drie uur microaerofiel bij 37°C gezet. Na die drie uur is 10 µl plasmide toegevoegd om vervolgens opnieuw drie uur onder dezelfde condities te incuberen. Na de tweede incubatie is de vloeistof op de HI agar overgebracht op saponine platen met het antibiotica waar de plasmide op selecteert. Kolonies die binnen drie dagen ontstonden zijn geïsoleerd en gecontroleerd met behulp van plasmide isolatie en een PCR op het insert.

3.17 Constructie Cj0727-733 mutant

Voor het maken van een Cj0727-733 mutant is een PCR met primers 1031 en 1032 uitgevoerd op het genoom van *C. jejuni*. Dit product wat de genen Cj0727-733 bevat is in een pJET plasmide geligeerd waar een ampicilline resistentie gen in aanwezig is. Het plasmide is getransformeerd naar een *E. coli* DH5α stam door middel van een heat shock en deze stam is opgegroeid op een Luria Broth(LB) plaat met ampicilline (Biotrading). Het plasmide is vervolgens geïsoleerd van verschillende kolonies en gecontroleerd met een PCR met de primers 1031 en 1032 waarna het

product geknipt is met restrictie enzymen *Xba*I, *Bgl*II en *Xho*I. De plasmide die het juiste insert bevatte is vervolgens in een PCR geplaatst met primers 1033 en 1034. Deze primers liggen op de genen Cj0732 en Cj0728 en zijn naar buiten gericht. Door deze ligging wordt niet het insert gekopieerd, maar juist het plasmide met aan beide uiteinden een stukje van het oorspronkelijke insert. Ook hebben de primers een toegevoegde *Bam*HI restrictie site waardoor de uiteindes van het PCR product een *Bam*HI restrictie site kregen. Het plasmide is dicht geligeerd en vervolgens getransformeerd in een *E. coli* DH5 α stam met behulp van een heatshock. Na deze stam opnieuw op te groeien op een LB ampicilline plaat is het plasmide geïsoleerd van verschillende kolonies. Een controle is uitgevoerd met primers 1031 en 1032 en de plasmide met het juiste insert werd vervolgens geknipt met *Bam*HI op restrictie site die daarvoor was aangebracht. Door middel van een ligatie reactie werd vervolgens een Kanamycine resistentie gen, met aan beide zijden ook een *Bam*HI site, in het construct geligeerd. Dit plasmide is opnieuw getransformeerd in *E. coli* DH5 α met een heatshock en opgegroeid op een kanamycine plaat. Na isolatie van het plasmide is met behulp van restrictie analyse met *Bam*HI in combinatie met *Pst*I of in combinatie met *Xba*I gecontroleerd in welke richting het kanamycine gen lag. De plasmide met het kanamycine gen in dezelfde richting als de genen Cj0727-Cj0733 is vervolgens met behulp van natuurlijke transformatie in *C. jejuni* 81116 gebracht. Met behulp van een spontane dubbele cross-over zijn de genen Cj0727-Cj0733 vervangen door het insert van het plasmide. Op deze manier is van het operon Cj0727-Cj0733 enkel nog de buitenste genen over en zijn de binnenste genen vervangen door een kanamycine resistentie gen. Figuur 4 geeft het uiteindelijke construct weer wat in *C. jejuni* is getransformeerd.



Figuur 4. Weergave van het Cj0727-733 deletie construct. In het geel is het kanamycine resistentie gen weergegeven met aan beide zijden de overgebleven genen van het Cj0727-733 operon. Daarboven zijn met blauwe pijlen de verschillende primers weergegeven en de richting van deze primers

3.18 Gedefinieerde media

Yeast Nitrogen Base medium

Yeast Nitrogen Base (YNB) medium (MP Biomedicals) bevat geen fosfaat (Mendz. Et al. 2005).⁹ Aan het YNB medium (5,7g/l) worden aminozuren (1,9g/L SC-URA (MP Biomedicals)) en 100mg/l NaCl toegevoegd. Vervolgens wordt het medium gesteld op een pH van 7,4 en geautoclaveerd. Na afkoelen was het medium klaar voor gebruik en door de afwezigheid van fosfaten kon er naar keuze een fosfaat bron toegevoegd worden.

ACES medium

Een tweede soort gedefinieerd medium dat is gebruikt is het ACES medium. Alle ingrediënten voor dit medium staan beschreven in Bijlage 2. Om dit medium te maken dienden alle stoffen in de juiste hoeveelheid opgelost te worden in water met uitzondering van de heamin. Vervolgens werd de pH ingesteld op 7,4 m.b.v. 20% KOH. Na het instellen van de pH kon ook de heamin in de juiste concentratie toegevoegd worden en vervolgens werd het medium gefiltreerd door een 0,22 μ m filter. Hierna moest er minimaal twee dagen gewacht worden tot het medium klaar was voor gebruik.

3.19 Groeicondities testen

De fosfaatbronnen die de Cj0727-733 mutant kan gebruiken zijn getest met behulp van de Bioscreen en groei in kweekflesjes in aanwezigheid van verschillende fosfaat bronnen. Gebruikte fosfaatbronnen zijn: KH_2PO_4 als positieve controle, phosphonoacetate, phenylphosphonate en α -aminomethylphosphonate. Alle testen zijn gedaan in concentraties van 10mM en 100mM. De groeitesten met de Cj0727-733 mutant werden grotendeels op dezelfde manier voorbereid als hoe de Bioscreen werd voorbereid bij de Cj1491 mutant. Een verschil was alleen dat de cultuurtjes na het opgroeien eerst werden afgedraaid en gewassen met gedefinieerd medium zonder fosfaat. Zo werd er begonnen met zo weinig mogelijk fosfaat aanwezig. Hierna zijn de bacteriën verdund in het medium dat gewenst was om vervolgens microaerofiel in kweekflesjes of in de Bioscreen te groeien waarbij gekeken werd of de mutant in staat was om te groeien met de toegevoegde fosfaat bron. Naast de mutant werd de wildtype *C. jejuni* 81116 gebruikt als positieve controle en werd een PhosR mutant ook gebruikt om eventuele resultaten mee te vergelijken.

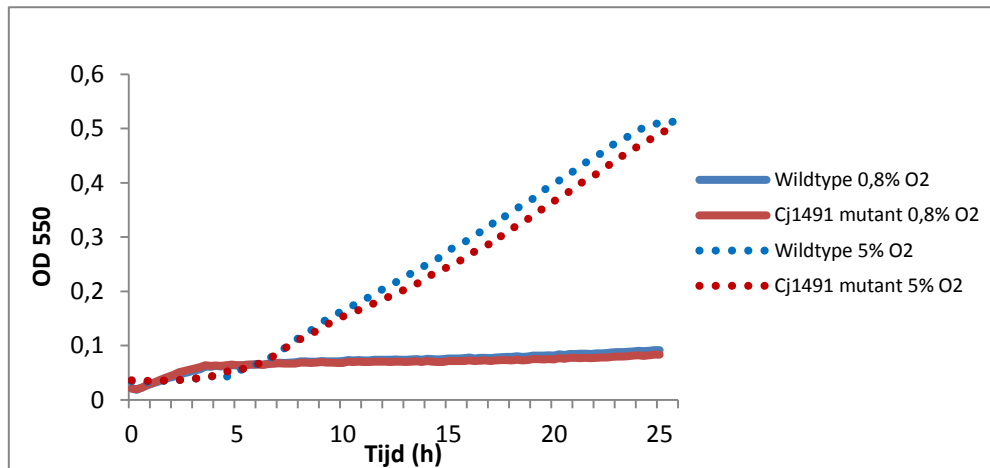
3.20 Flagelkleuring

Een flagelkleuring is gestart vanuit een vloeibaar cultuurtje waarbij 10 μ l bacteriesuspensie op een preparaat geplaatst werd. Door het preparaat schuin te houden werd de druppel verdeeld over het glazen oppervlak. Nadat de druppel goed gedroogd was is het preparaat twee minuten gekleurd met de Flagella Stain (Becton, Dickinson and company). Vervolgens zijn de preparaten afgespoeld met water en kan het preparaat bekeken worden.

Hoofdstuk 4. Resultaten

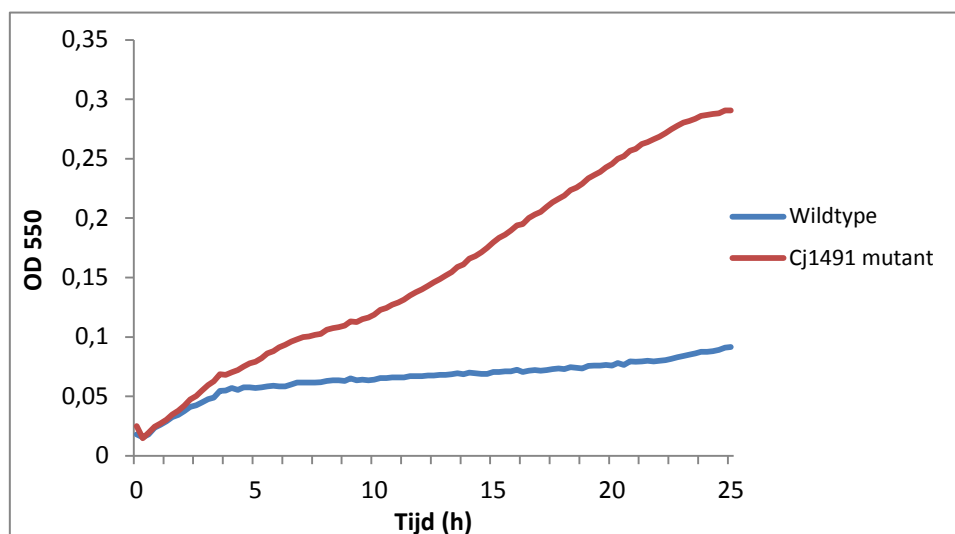
4.1 Fenotype Cj1491 mutant

Uit eerder onderzoek is vast komen te staan dat de Cj1491 mutant in tegenstelling tot de wildtype *C. jejuni* zich niet kon handhaven in de darm van kippen. Mogelijk belangrijke omgevingscondities in de kippendarm zijn nader onderzocht door groeicurves van de wildtype en de Cj1491 mutant te genereren m.b.v. de Bioscreen C onder invloed van in de darm voorkomende condities. Alle geteste condities zijn te zien in bijlage 1. Alleen resultaten welke belangrijk voor het onderzoek zijn worden besproken. Als eerste is de groei van de wildtype en Cj1491 mutant getest zonder toevoeging van stoffen bij een microaerofiel klimaat en bij een zuurstof concentratie van 0,8% (Figuur 5).



Figuur 5. Groeicurve van de *C. jejuni* wildtype (blauw) en de Cj1491 mutant (rood) in aanwezigheid van 5% O₂ (stippellijn) of 0,8% O₂ (doorgetrokken lijn) bij 42°C, gegenereerd met de bioscreen C in een anaerobe kamer. De getoonde curves zijn het gemiddelde van 3 onafhankelijk groeicurves.

Duidelijk is dat *C. jejuni* niet in staat is om bij lage zuurstof condities te groeien als er geen andere elektronen acceptor aanwezig is. Geprobeerd is om de elektronen acceptor zuurstof te vervangen door andere stoffen zoals nitraat, nitriet, DMSO en fumaraat. Deze stoffen waren in staat om *C. jejuni* toch te laten groeien ondanks dat er maar weinig zuurstof aanwezig was. Een andere elektronen acceptor die *C. jejuni* normaal gesproken ook kan gebruiken is TMAO. De groei van *C. jejuni* bij een lage zuurstofconcentratie in aanwezigheid van 20mM TMAO is gemeten en is te zien in figuur 6.

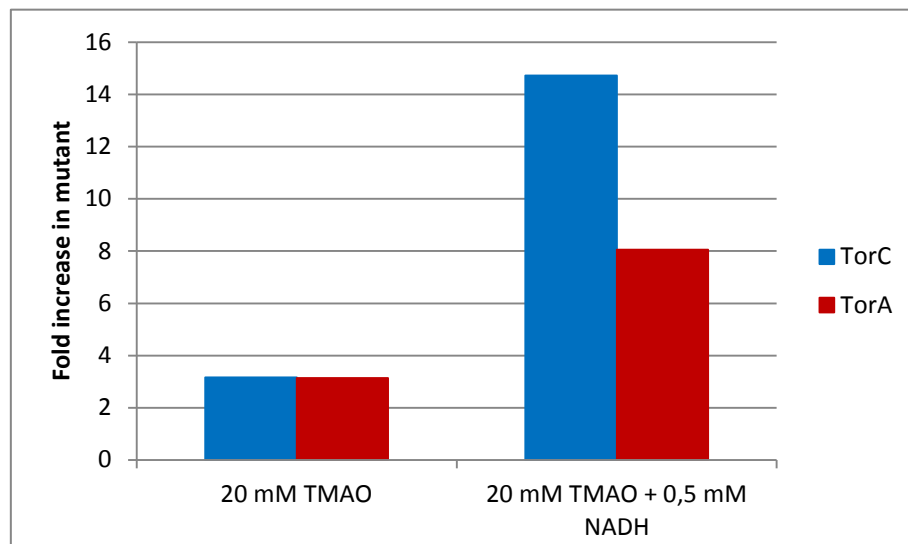


Figuur 6. De groei van de *C. jejuni* wildtype (blauw) en de Cj1491 mutant (rood) in aanwezigheid van 0,8% zuurstof en 20mM TMAO bij 42°C. De getoonde curves zijn het gemiddelde van 3 onafhankelijk groeicurves.

De Cj1491 mutant is in staat om TMAO te gebruiken en groeit beter dan de wildtype *C. jejuni*. Deze resultaten doen vermoeden dat Cj1491 mogelijk de genen reguleert die betrokken zijn bij de reductie van TMAO.

4.2 RT-qPCR laat zien dat *torA* en *torC* genen worden gereguleerd door Cj1491

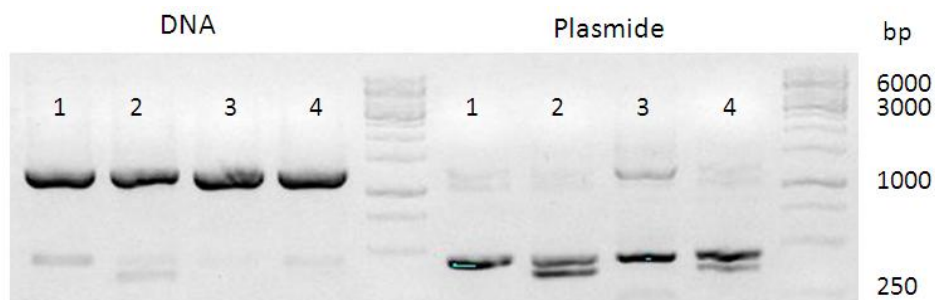
In *C. jejuni* wordt TMAO gereduceerd door de TorA en TorC eiwitten. Om aan te tonen dat Cj1491 mogelijk de *tor* genen reguleert is een RT-qPCR uitgevoerd op RNA wat geïsoleerd is uit de wildtype en de mutant opgegroeid in HI bij een lage zuurstof concentratie (0,3%) en in aanwezigheid van 20mM TMAO. Naast de *tor* genen zijn in RT-qPCR een aantal genen meegenomen die bij de eerder beschreven micro-array grote verschillen gaven. De genen die een groot verschil in expressie in de micro-array hadden laten zien deden dat niet in de RT-qPCR (data niet getoond). De genen *torA* en *torC* gaven echter wel een verschil. In de mutant waren deze genen ongeveer drie maal opgereguleerd in vergelijking met de wildtype. Het verschil in expressie tussen de wildtype en de mutant werd groter als RNA werd gebruikt dat was geïsoleerd uit bacteriën opgegroeid in de aanwezigheid van 20 mM TMAO en 0,5mM van de elektronendonator NADH (Figuur 7). Bij deze condities was mRNA voor het *torC* gen bijna vijftien keer meer aanwezig in de mutant dan in de wildtype. Voor het gen *torA* was dit acht keer.



Figuur 7. RT-qPCR op de genen *torC* (blauw) en *torA* (rood). RNA was geïsoleerd van de wildtype en Cj1491 mutant opgegroeid in aanwezigheid van 0,8% zuurstof en 20mM TMAO (links) of met extra toevoeging van 0,5mM NADH (rechts).

4.3 Complementatie van de Cj1491

Er is geprobeerd de Cj1491 mutant te complementeren door de genen Cj1491-1493 op een conjugatie plasmide in een Cj1491 mutant te brengen. Vier gegroeide kolonies zijn geselecteerd en het plasmide en DNA is geïsoleerd om vervolgens een PCR uit te voeren met de primers 55 en 60. Figuur 8 geeft de producten van de PCR weer na elektroforese op een 1% agarose gel.

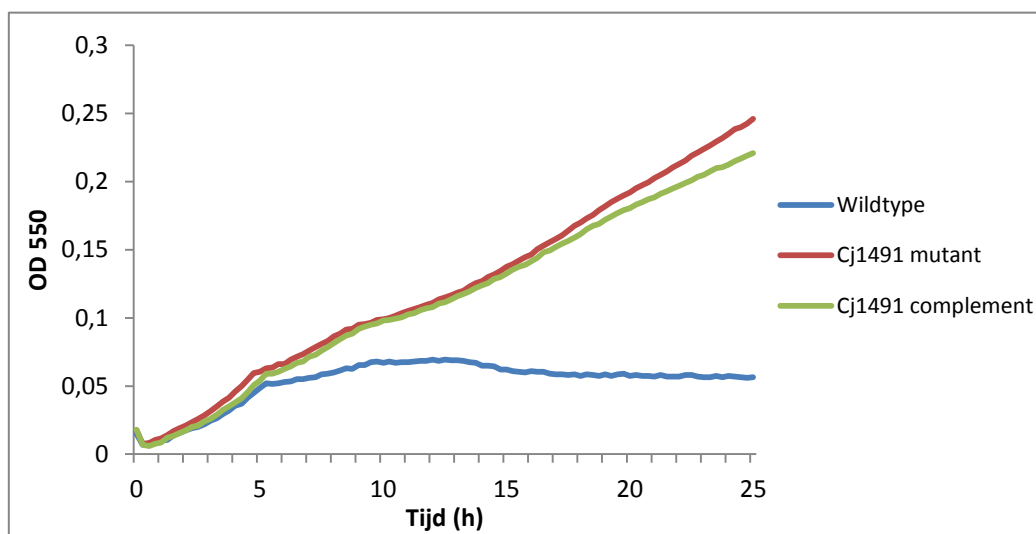


Figuur 8. PCR producten van DNA (links) en plasmide (rechts) van vier verschillende kolonies met primers 55 en 60.

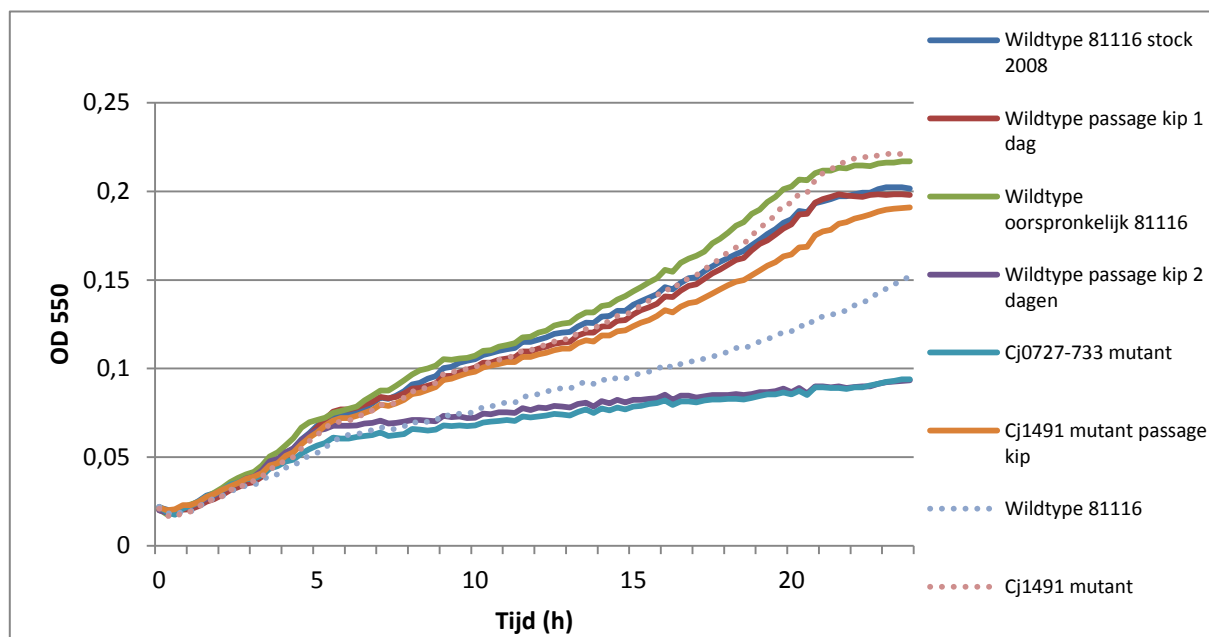
Bij alle DNA monsters is een bandje van ongeveer 1100 bp zichtbaar, wat overeenkomt met het chlooramfenicol insert. Bij de PCR producten van de plasmiden komen de monsters niet helemaal overeen. Er zou één product zichtbaar moeten zijn van ongeveer 400 bp. Alleen monsters 1 en 3 voldoen aan deze eis en zullen als een nieuwe stock bij -80°C bewaard worden. Bij alle testen zijn ook wat extra bandjes vaag zichtbaar wat erop wijst dat plasmide en DNA niet goed gescheiden zijn.

4.4 Defect in de *tor* genen van de wildtype

Om er zeker van te zijn dat het fenotype van de Cj1491 ook daadwerkelijk komt door de mutatie in het Cj1491 gen is een groeicurve gegenereerd met de gecomplementeerde Cj1491 mutant in aanwezigheid van 20mM TMAO (figuur 9). Tegen de verwachting in geeft de gecomplementeerde stam een vrijwel gelijke groeicurve als de Cj1491 mutant wat mogelijk erop kan duiden dat de wildtype een mutatie heeft ondergaan. Om dit te testen zijn meerdere 81116 wildtypes, de Cj0727-733 mutant en een andere Cj1491 mutant stock getest door middel van het maken van een groeicurve (Figuur 10).



Figuur 9. Groeicurve van de *C. jejuni* wildtype, Cj1491 mutant en de gecomplementeerde Cj1491 mutant in aanwezigheid van 20mM TMAO en 0,8% O₂. De getoonde curves zijn het gemiddelde van twee onafhankelijke curves.

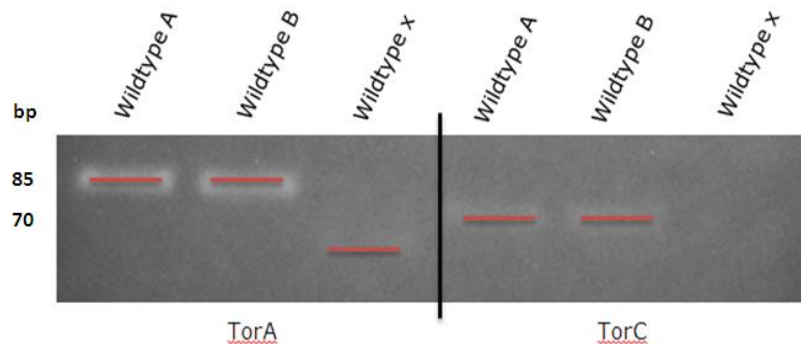


Figuur 10. Groeicurve van verschillende *C. jejuni* 81116 wildtypes, de Cj0727-733 mutant en twee Cj1491 mutanten in aanwezigheid van 0,8% zuurstof en 20mM TMAO. De wildtype en mutant die eerder waren gebruikt zijn weergegeven met stippellijnen. De getoonde curves zijn het gemiddelde van twee onafhankelijke curves.

De vier andere 81116 wildtype stocks lieten een wisselend beeld zien. Drie wildtypes lieten een zelfde groei patroon zien als de Cj1491 mutanten, terwijl een wildtype en de zelfgemaakte Cj0727-733 mutant nauwelijks met TMAO kon groeien. Beide stammen zijn gemaakt vanuit de wildtype 81116 stock uit 2012, de stock die ook gebruikt is als wildtype bij de groeiexperimenten. Het is mogelijk dat deze stock een spontane mutatie heeft gekregen in de genen die de TMAO omzetting reguleren.

4.5 Wildtype bevat deleties in *torA* en *torC*

Om te achterhalen waardoor het komt dat sommige wildtypes niet meer groeien op TMAO is een PCR uitgevoerd op de genen *torA* en *torC*. De PCR is uitgevoerd op het chromosomaal DNA van drie verschillende wildtypes, twee wildtypes die TMAO kunnen gebruiken (wildtype A en B) en een wildtype die geen TMAO kan gebruiken (wildtype X). Het product is bekeken met behulp van een agarose gel, een foto hiervan is te zien in Figuur 11. Na elektroforese van het *torA* PCR product op een agarose gel bleek dat het PCR product van de wildtype die geen TMAO kan gebruiken een stuk kleiner was dan bij de andere wildtypes. Het gen *torC* gaf geen product bij de TMAO negatieve wildtype terwijl de TMAO positieve wildtypes wel een bandje gaven rond de juiste grootte. Dit wijst erop dat de tot nu toe gebruikte wildtype vermoedelijk een deletie heeft in de *tor* genen wat het fenotype van deze wildtype verklaard.



Figuur 11. PCR producten na amplificatie van een deel van het *torA* gen (links) en een deel van het *torC* gen (rechts). Wildtype X is de wildtype die gebruikt is voor de experimenten tot nu toe. Wildtype A en B zijn twee eerdere stocks van *C. jejuni* 81116.

4.6 Cj1491 zet minder Triphenyl tetrazolium chloride om

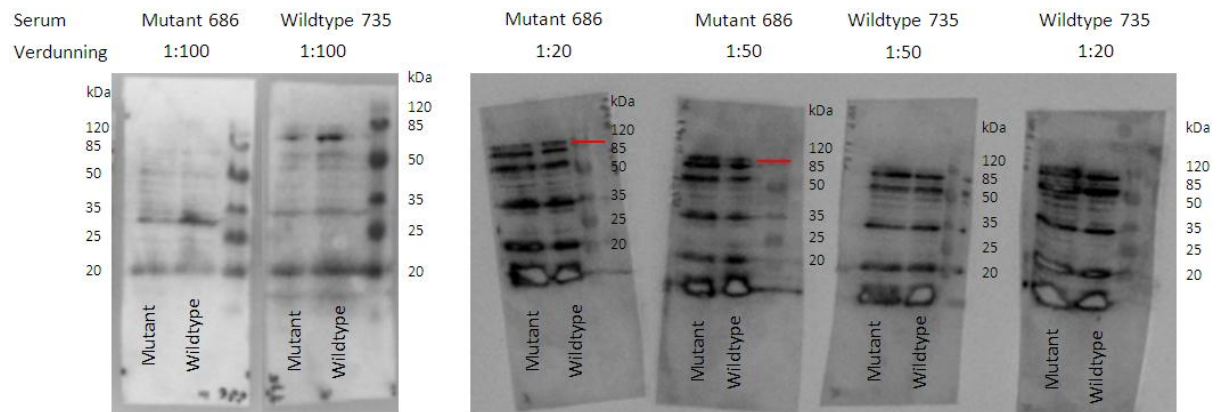
Om alsnog een verschil in fenotype te vinden tussen de *C. jejuni* wildtype en de Cj1491 mutant is een API campy test uitgevoerd. Er konden geen grote verschillen ontdekt worden tussen de mutant en de wildtype. Een klein verschil was te zien bij de Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) test. Tetrazoliumchloride is een redox indicator die rood kleurt wanneer er een redox reactie plaats vindt. Bij de wildtype was het welletje geschat op 70% rood, terwijl het welletje van de mutant veel minder rood was, ongeveer 30%. Het is mogelijk dat de mutant en de wildtype verschillen in de omzetting van TTC. In een TTC assay zijn vervolgens een aantal reductoren (elektronen donoren) toegevoegd en gekeken of deze van invloed waren op de reductie van TTC. Geteste reductoren zijn serine, aspartaat, malaat, pyruvaat, fumaraat, succinaat, lactaat, NADH, proline, formaat en threodine. Er werden geen verschillen gevonden tussen de Cj1491 mutant en de wildtype. Doordat het niet commercieel bekend is welke stoffen er in de API Campy aanwezig zijn was het niet mogelijk om de TTC assay uit te voeren onder de condities zoals aanwezig in de API Campy test.

4.7 Antilichaam titer bepaling kippen sera

Mogelijk is het immuunsysteem van de kip betrokken bij de verminderde persistentie van de Cj1491 mutant. Serum afkomstig van kippen die geïnfecteerd waren met wildtype en Cj1491 mutant zijn daarom getest op *Campylobacter* lysaten in de hoop immunogene eiwitten te detecteren, die gereguleerd worden door het Cj1491/Cj1492 twee-component systeem. Eerst is SDS-PAGE uitgevoerd met gelijke hoeveelheden lysaat van de Cj1491 mutant en van de wildtype. Deze gelen zijn vervolgens geblot en gedetecteerd met verdunningen van serum van 1:20, 1:50

en 1:100. Serum is afkomstig van een kip geïnficeerd met wildtype *C. jejuni* (kip 735) en de Cj1491 mutant (kip 686) (Figuur 12). De meeste immunogene eiwitten met zo weinig mogelijk achtergrond werden gedetecteerd door een verdunning van 1:50 te gebruiken.

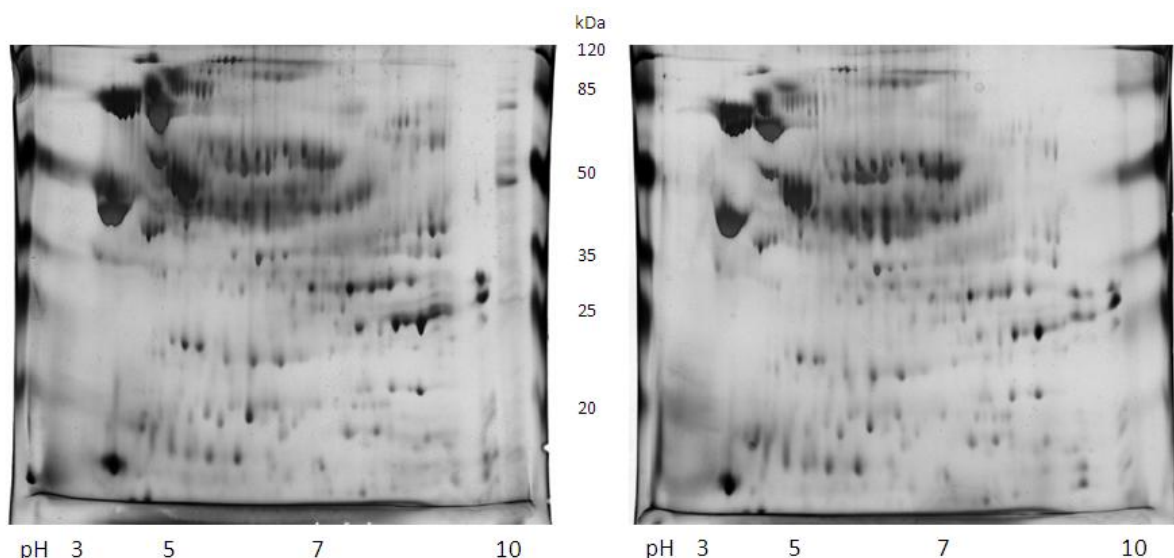
Tussen de twee verschillende lysaten is geen verschil in bandenpatroon zichtbaar. Wanneer er gekeken wordt naar verschillen tussen de twee soorten serum is er een extra bandje zichtbaar bij de blots gedetecteerd met serum afkomstig van kip 686 die geïnficeerd is met de Cj1491 mutant. Dit bandje bevindt zich op een grootte van ongeveer 85 kDa.



Figuur 12. Zes verschillende blots gedetecteerd met serum afkomstig van kippen geïnficeerd met wildtype (735) of mutant (686) *C. jejuni*. Elke blot bestaat uit lysaat van de wildtype, lysaat van de mutant en een marker. Het rode streepje geeft een extra bandje aan welk alleen zichtbaar is wanneer gedetecteerd wordt met serum van kip 686.

4.8 Identificatie immunogene eiwitten gereguleerd door het Cj1491/1492 twee-component systeem

Om de eiwitten die herkend worden door de kippen sera te kunnen identificeren zijn gezuiverde lysaten van de wildtype en Cj1491 mutant gescheiden met behulp van 2D-electrophorese. Van beide stammen werden bij elke test twee gelen gemaakt waarvan er één gekleurd werd met een zilverkleuring en de ander geblot en gedetecteerd met behulp van kippenserum. Gekeken is naar verschillen tussen de gelen gekleurd met de zilverkleuring, verschillen tussen twee blots met hetzelfde serum en verschillen bij gebruik van verschillende soorten serum. Er zijn geen duidelijke reproducerende verschillen waargenomen tussen de gelen die gekleurd zijn met de zilverkleuring (figuur 13).



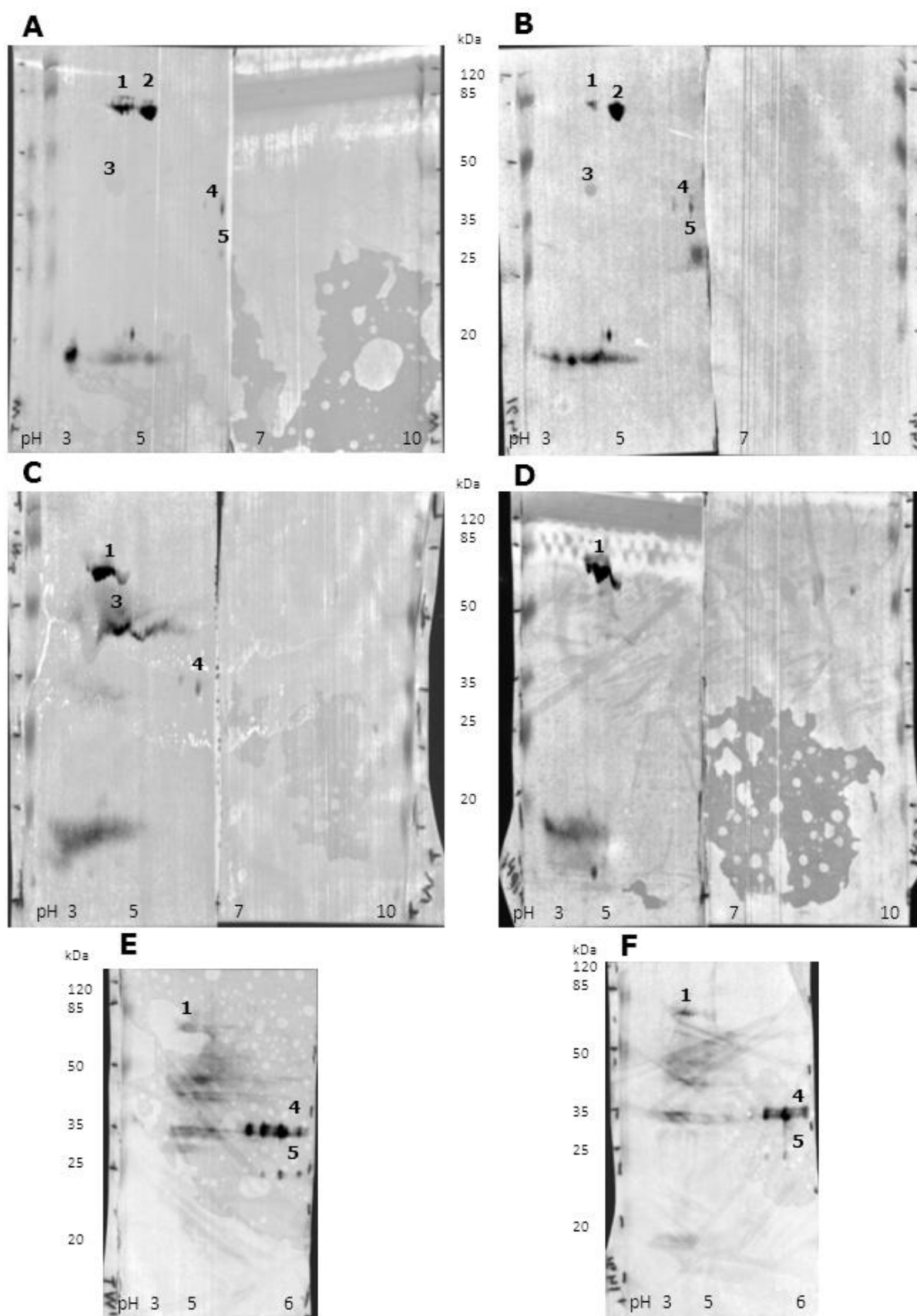
Figuur 13. Een zilverkleuring van een 2D-gel van de *C. jejuni* wildtype (links) en mutant (rechts). De samples zijn in totaal twaalf maal getest met zilverkleuring.

In figuur 14 zijn de blots weergegeven welke zijn gemaakt van de 2D elektroforese gelen. Als eerste is er een blot gemaakt met behulp van serum afkomstig van kip 672 welke geïnfecteerd was met de Cj1491 gemuteerde *C. jejuni*. Op deze blots zijn direct een aantal duidelijke spots zichtbaar (Fig. 14 A en B). Wanneer er serum wordt gebruikt van kip 735 welke geïnfecteerd is met wildtype *C. jejuni* zijn er iets minder spots zichtbaar (Fig. 14 C en D). Naast serum van de geïnfecteerde kippen is er ook serum van de kippen afgenomen voordat deze geïnfecteerd werden. Serum van kip 672 afgenomen voor de infectie met *C. jejuni* is gebruikt om te testen welke antilichamen niet door *C. jejuni* opgewekt worden (Fig. 14 E en F). Van de geïdentificeerde spots zijn er vijf spots uitgekozen en uitgesneden die interessant kunnen zijn. De uitgesneden spots zijn in Figuur 14 met cijfers aangegeven. Tabel 6 geeft een overzicht weer van deze spots met de vermoedelijke naam van het eiwit plus de grootte en Pi die bij dat eiwit hoort, daarnaast is ook te zien bij welke blots dit eiwit herkend wordt.

Spot nummer 1 bestaat vermoedelijk uit de flageleiwitten, de positie en typisch repeterende vorm komt overeen met al eerdere gepubliceerde 2D gelen.⁸ De flageleiwitten worden in elke blot herkend, ook voordat een kip geïnfecteerd is met *C. jejuni*. Spot nummer twee is vermoedelijk het eiwit groEL. Dit eiwit wordt enkel herkend als een kip geïnfecteerd is geweest met de Cj1491 mutant. Het derde eiwit is vermoedelijk het Major outer membrane protein (MomP), dit eiwit wordt met behulp van het mutanten serum in mindere mate herkend bij beide stammen. Het wildtype serum herkent alleen het MomP van de wildtype en niet dat van de mutant. Met het serum van een kip welke niet geïnfecteerd is met *C. jejuni* kan niet met volle zekerheid bepaald worden of dit eiwit gedetecteerd wordt, dit komt omdat er veel vegen en strepen zichtbaar zijn op dit gebied. De eiwitten die als nummer vier en vijf zijn genoteerd kunnen niet direct gekoppeld worden aan een reeds bekend eiwit. Beide eiwitten worden herkend wanneer gedetecteerd wordt met serum van de kip geïnfecteerd met de Cj1491 mutant en wanneer gedetecteerd wordt met serum van de ongeïnfecteerde kip. Eiwit nummer vier wordt daarnaast ook nog herkend bij de wildtype met wildtype serum.

Tabel 6. Overzicht met eigenschappen van de vijf geïsoleerde eiwitten.

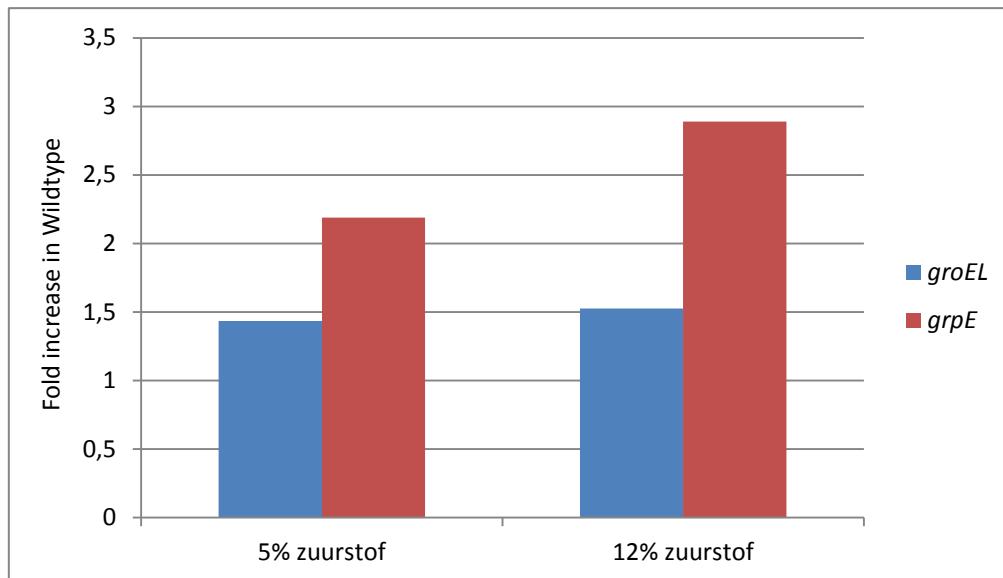
Spot	Vermoedelijke naam	Grootte	Pi	Mutant serum		Wt serum		Pre infectie serum	
				Wt	Mutant	Wt	Mutant	Wt	Mutant
1	FlaA/B	59 kDa	5,4	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
2	GroEL	58 kDa	5,0	Ja	Ja	Nee	Nee	Nee	Nee
3	MomP	46 kDa	4,7	Ja	Ja	Ja	Nee	?	?
4	Onbekend	35 kDa	6,5	Ja	Ja	Ja	Nee	Ja	Ja
5	Onbekend	25 kDa	6,5	Ja	Ja	Nee	Nee	Ja	Ja



Figuur 14. Blots van 2D-gelen gemaakt van lysaat van wildtype(A, C, E) en mutant(B, D, F) *Campylobacter jejuni*, gedetecteerd met serum afkomstig van kippen geïnfecteerd met de Cj1491 mutant(A, B), wildtype *Campylobacter*(C, D) of voor de infectie met *C. jejuni*(E, F (enkel het linker gedeelte van de blot)).

4.9 Transcriptie regulatie *groEL*

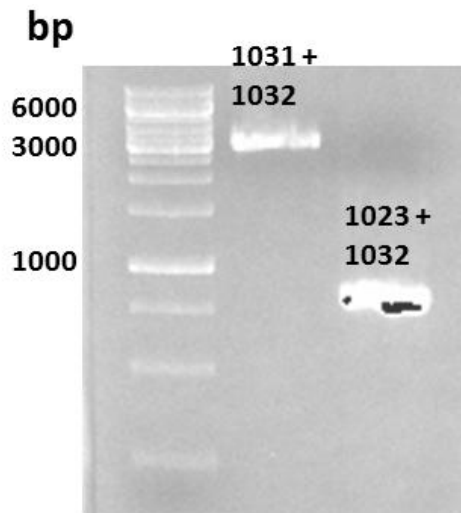
Uit zowel de 2D gelelectroforese en de microarray resultaten is naar voren gekomen dat *groEL* gereguleerd wordt door het twee-component systeem Cj1491/1492. Het gen *groEL* wordt in *C. jejuni* onder andere geactiveerd door hoge zuurstof concentraties.⁵ Een RT-qPCR uitgevoerd op het mRNA van *groEL* waarbij *C. jejuni* is geïncubeerd bij 12% O₂ heeft echter geen significante verandering in genexpressie kunnen aantonen tussen de wildtype en mutant (figuur 15). Naast *groEL* is ook het gen *grpE* meegenomen, een vergelijkbaar heatshock eiwit dat ook grote verschillen gaf in de micro array die eerder besproken is. Het gen *grpE* gaf ook geen significante verandering wanneer *C. jejuni* wordt opgegroeid bij 12% zuurstof.



Figuur 15. RT-qPCR op de genen *groEL* (blauw) en *grpE* (rood). RNA was geïsoleerd van de Wildtype en Cj1491 mutant opgegroeid in aanwezigheid van 5% zuurstof (links) en 12% zuurstof (rechts).

4.10 Controle constructie Cj0727-733 mutant (Project 2)

Voor het bepalen van de functie van het operon Cj0727-733 is geprobeerd een mutatie in dit operon aan te brengen. Om een mutatie in het Cj0727-733 operon te creëren is het knockout plasmide pJET m.b.v. natuurlijke transformatie naar *C. jejuni* 81116 getransformeerd. Van de opgekomen kolonies is DNA geïsoleerd en er zijn twee PCRs uitgevoerd op dit DNA. De eerste PCR bestaat uit primers 1023 en 1032, de tweede PCR bestaat uit de primers 1031 en 1032. Primer 1023 bevindt zich op het kanamycine resistentie gen. De producten van deze reactie zijn te zien in Figuur 16. De PCR met de primers 1031 en 1032 geeft een product van ongeveer 3500bp wat overeenkomt met de overgebleven genen van het operon en het insert. Primers 1023 en 1032 geeft na een PCR een product rond de 900bp, wat hier ook verwacht wordt.

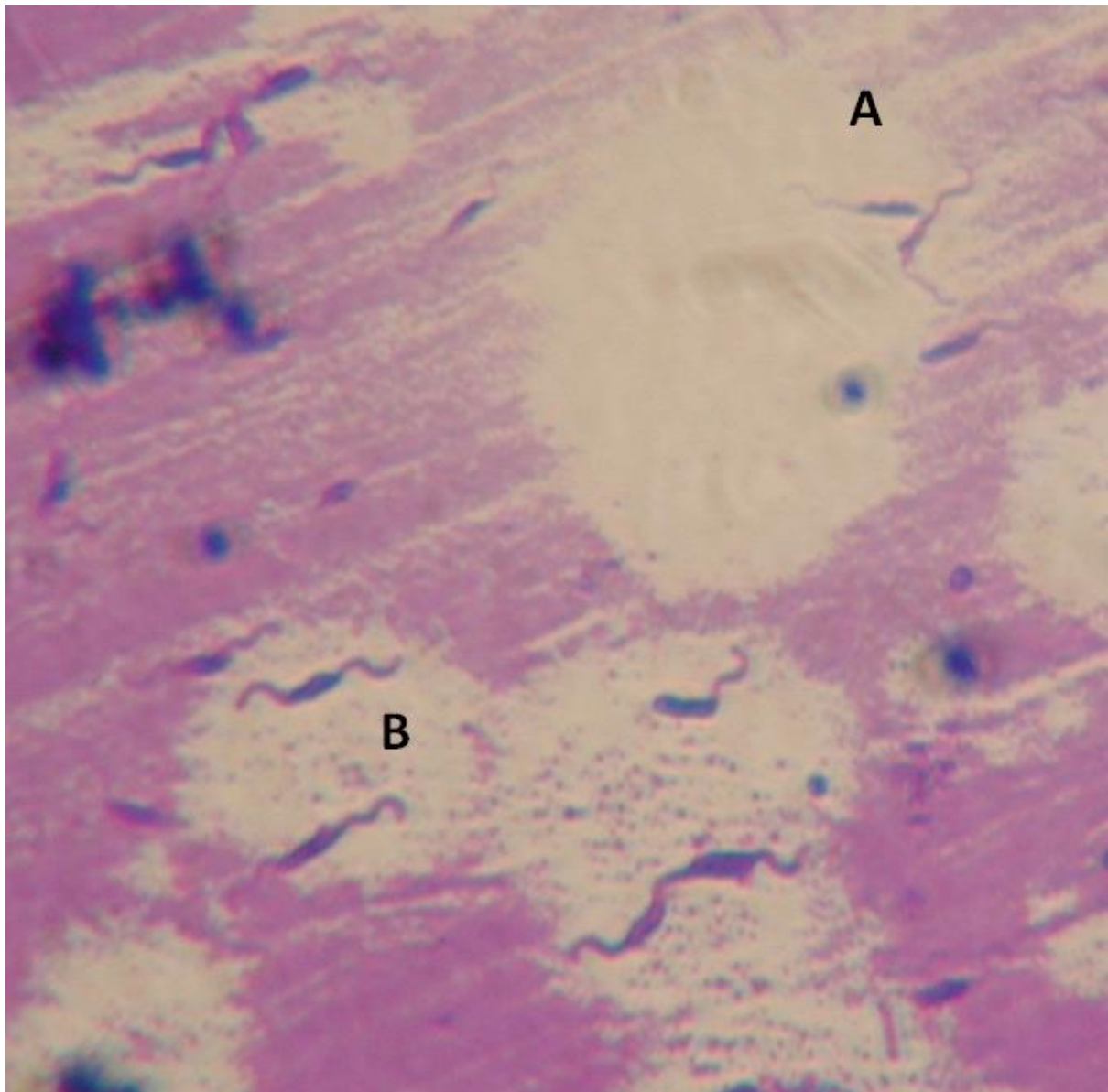


Figuur 16. PCR producten van de Cj0727-733 mutant met primers 1031+1032 en 1023+1032.

Nadat de mutant goed bleek te zijn is gekeken op welke fosfaat bronnen de mutant kon groeien. Hiertoe werden groeicurves van de wildtype 81116, de Cj0727-733 mutant en de phosR mutant gegenereerd in twee verschillende soorten gedefinieerde fosfaat arme media. Er kon echter in geen van beide media groei waargenomen worden, ook niet met de positieve controle KH_2PO_4 , waardoor terug is gegaan naar groei in kweekflesjes in anaerobe potten. In de anaerobe potten is het gelukt om alle drie de stammen te laten groeien wanneer KH_2PO_4 werd toegevoegd. Wanneer een van de andere fosfaat bronnen werd toegevoegd kon echter geen groei waargenomen worden, niet bij de twee mutanten maar ook niet bij de wildtype *C. jejuni*. De drie geteste stoffen phosphonoacetate, phenylphosphonate en α -aminomethylphosphonate waren niet in staat om als fosfaat bron te fungeren, niet in het ACES medium, maar ook niet in het YNB medium.

4.11 YNB medium heeft een effect op de flagel

De cultuurtjes die wel waren gegroeid in het YNB medium werden nader bekeken onder een microscoop. De cultuurtjes bestonden volledig uit *C. jejuni*, maar de bacteriën waren onbeweeglijk. Normaal bewegen de bacteriën altijd actief maar nu leken alle staven aan het glas geplakt te zijn. Mogelijk heeft het YNB medium een effect op de flagel. Daarom is een flagel kleuring uitgevoerd om te kijken of er iets aan de flagel structuur verandert is (figuur 17). Twee soorten flagellen waren zichtbaar, een gedeelte van de bacteriën had een normale dunne flagel (figuur 17A) terwijl een ander deel van de staven een dikke flagel had welke soms even dik is als de bacterie zelf (figuur 17B).



Figuur 17. Een flagelkleuring van wildtype *C. jejuni* opgegroeid in YNB medium bekeken bij een 1000x vergroting

Hoofdstuk 5. Discussie en conclusie

5.1 Hoofdproject

In dit onderzoek is het twee component systeem Cj1491/1492 van *Campylobacter jejuni* nader onderzocht. Uit eerder onderzoek is gebleken dat dit systeem noodzakelijk is voor *C. jejuni* om zich te kunnen handhaven in het darmstelsel van de kip. Een aantal kippen waren 21 dagen na een infectie met een Cj1491 mutant weer volledig vrij van *Campylobacter*, terwijl de wildtype *C. jejuni* zonder problemen in de kip kon overleven. In dit project is met name gezocht naar een *in vitro* fenotype voor de Cj1491 mutant door het genereren van groeicurves onder verschillende condities en er is gekeken of er verschillen zijn tussen de immunogene eiwitten van wildtype en Cj1491 mutant bacteriën door gebruik te maken van kippen sera afkomstig van kippen geïnfecteerd met wildtype of de Cj1491 mutant.

Groeicurves zijn uitgevoerd bij 42°C doordat bij die temperatuur in de kip fenotypische verschillen zijn waargenomen tussen de wildtype en Cj1491 mutant. Uit analyse van de groeicurves van de *C. jejuni* wildtype en de Cj1491 mutant getest op hun vermogen te groeien in aan- of afwezigheid van verschillende stoffen kwam naar voren dat alleen de elektronen acceptor TMAO een duidelijk verschil te zien gaf tussen deze twee stammen. De wildtype was niet in staat om TMAO te gebruiken als elektronen acceptor terwijl de Cj1491 mutant dit wel kon. RT-qPCR liet zien dat de genen *torA* en *torC*, welke nodig zijn voor de TMAO omzetting, in de wildtype minder waren opgereguleerd dan in de mutant. Dit is geen verwacht resultaat aangezien er werd gezocht werd naar een verandering die negatief is voor de Cj1491 mutant, daarnaast zou *C. jejuni* in staat moeten zijn om TMAO te gebruiken als elektronen acceptor.⁴ Een extra controle is daarom uitgevoerd waarbij een gecomplementeerde Cj1491 mutant getest werd op zijn vermogen om TMAO te gebruiken als elektronen acceptor. De gecomplementeerde stam zou zich moeten gedragen als de wildtype, maar duidelijk werd dat deze stam hetzelfde groeide als de mutant. Na deze bevinding zijn een aantal stocks van deze wildtype stam alsmede ook andere *C. jejuni* wildtypes, de Cj0727-733 mutant en een andere Cj1491 mutant na een passage door een kip getest op hun vermogen in het gebruik van TMAO. Duidelijk werd dat op een stock van de wildtype en de Cj0727-733 mutant na alle stammen in staat waren TMAO te gebruiken. De twee stocks die niet in staat waren TMAO om te zetten waren oorspronkelijk afkomstig van dezelfde wildtype stock die tot nu toe gebruikt was. De gebruikte wildtype stock die bij -80°C bewaard wordt bestaat dus uit *C. jejuni* met een spontane mutatie die ervoor zorgt dat TMAO niet meer gebruikt kan worden als elektronen donor.

Geprobeerd is om met behulp van een PCR de omvang van deze mutatie op te zoeken. Duidelijk werd dat er in de twee genen *torA* en *torC*, welke de TMAO omzetting reguleren, een grote deletie is ontstaan, waarvan de exacte grote met een PCR niet bepaald kon worden. Groeiexperimenten met de Cj1491 mutant en de isogene wildtype stam die niet gemuteerd was in de *tor* genen gaven geen verschil te zien onder de condities die vervolgens nog getest zijn.

Als alternatief voor de groei experimenten met de Bioscreen is er ook een API Campy test uitgevoerd waarbij vele fenotypen getest worden in één makkelijk uit te voeren test. De Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) test in de API Campy test gaf een klein verschil te zien tussen de wildtype en de Cj1491 mutant. De wildtype *C. jejuni* was in staat TTC te reduceren terwijl de Cj1491 dat in veel mindere mate kon. Vervolgens is er een TTC assay opgezet die de TTC in de API Campy test zoveel mogelijk nabootste. Echter de exacte TTC condities in de API test zijn wegens octrooien niet bekend. In de opgezette TTC test zijn tot op heden niet de verschillen waargenomen zoals in de API Campy test.

Om te zien of de Cj1491 mogelijk andere eiwitten produceert dan de wildtype stam zijn kippen sera afkomstig van kippen geïnfecteerd met de wildtype of Cj1491 stam getest op totale eiwitpreparaten van de wildtype en Cj1491 mutant. Een banden patroon met kleine verschillen

was zichtbaar bij gebruik van verschillende sera op Western blots gemaakt van 1D SDS-PAGE gellen. Wanneer kipperserum werd gebruikt van een kip die geïnfecteerd was met de Cj1491 mutant was er een bandje zichtbaar dat niet herkend werd wanneer serum gebruikt werd van een kip die met wildtype *C. jejuni* geïnfecteerd was. Om een betere scheiding van de eiwitten te verkrijgen werd overgegaan op 2-dimensionale gellen en blots. Door de ontdekking van de TMAO mutant moesten een groot aantal 2-dimensionale gellen opnieuw worden gedaan wat uiteindelijk leidde tot de isolatie van 6 eiwit spotjes.

De bedoeling was om eiwitten die verschillen gaven uit te snijden en vervolgens te laten analyseren met behulp van massa spectrometrie. Doordat het laboratorium waar dit normaal gedaan wordt niet meer beschikbaar was is het tot nu toe niet mogelijk geweest om deze eiwitten te laten analyseren. Met behulp van 2D gellen van een andere onderzoeker waarbij alle spots zijn geanalyseerd en geïdentificeerd is er geprobeerd om de eiwitten te identificeren.⁸ Doordat eiwitten verschillende gekoppelde groepen kan hebben en daardoor de grootte en pI erg kan verschillen is het soms lastig om de volledig geïdentificeerde gel te vergelijken met de zelfgemaakte gellen. Voor een aantal eiwitten is er op deze manier wel met enige zekerheid vastgelegd om welk eiwit het gaat, maar een identificatie met behulp van massa spectrometrie is nodig om dit te bevestigen.

Een van de spots die een duidelijk verschil liet te zien is hoogst waarschijnlijk GroEL. Vermoedelijk dat dit eiwit ook al een verschil te zien gaf op de 1D SDS PAGE. Het gen dat codeert voor dit eiwit was ook in de microarray al naar voren gekomen omdat het in de mutant bijna zeven keer minder is geactiveerd vergeleken bij de wildtype. GroEL is een heatshock eiwit, dit zijn eiwitten die zorgen voor de juiste vouwing van andere eiwitten. Bij stresscondities zoals een hoge temperatuur, hoge zuurstofcondities of een verkeerde pH worden heatshock eiwitten geactiveerd aangezien op dat moment eiwitten sneller verkeerd zullen vouwen. Ook GroEL wordt bij dit soort omstandigheden geactiveerd.^{5, 6} Bekend is dat in mensen GroEL een van de belangrijkste immunogene eiwitten is.¹⁶

Tegen GroEL zijn in kipperserum alleen antilichamen aanwezig wanneer de kip geïnfecteerd is met de Cj1491 mutant. De mutant induceert dus duidelijk een immuunrespons tegen het eiwit GroEL. Dat kan bijvoorbeeld doordat er een bepaalde structuur in het eiwit veranderd is door de mutatie waardoor GroEL meer immunogeen is geworden. Een andere mogelijkheid is dat een grote hoeveelheid van het eiwit GroEL uitgescheiden wordt door de Cj1491 mutant terwijl dat niet of nauwelijks gebeurt bij de wildtype.⁶ Door het uitscheiden van GroEL kan het immuunsysteem in staat zijn te reageren en kan *C. jejuni* direct bestreden worden door de aangemaakte antilichamen. De werkelijke oorzaak van het verschil in antilichamen is nog niet bekend. Met massa spectrometrie analyse moet eerst met zekerheid vast komen te staan dat het daadwerkelijk om GroEL gaat en mogelijk valt er ook mee te bepalen of het GroEL gemodificeerd is in de Cj1491 mutant.

Een ander eiwit wat een verschil te zien gaf in de Western blots is waarschijnlijk PorA of ook wel het major outer membrane protein (MOMP) genoemd. Zoals de naam al zegt bevindt het MOMP zich vooral aan de buitenkant van het membraan waar het vooral een beschermende rol heeft,⁷ vooral bij het aanpassen tussen verschillende gastheren.¹⁷ Daarnaast zorgt het MOMP voor de regulatie van de permeabiliteit van het membraan voor kleine moleculen.¹³ In de mens wordt het MOMP duidelijk herkend door het immuunsysteem.¹⁷ Op de Western blots wordt bij gebruik van het Cj1491 serum van kippen het MOMP van de wildtype minder herkend dan die van de Cj1491 mutant. Bij het wildtype serum wordt het MOMP vooral herkend bij de wildtype, maar dit dient door een hoge achtergrond nog nader geanalyseerd te worden. Ook bij gebruik van serum voor een infectie met *C. jejuni* is door een hoge achtergrond niet helemaal duidelijk of het eiwit herkend wordt. Het gen dat codeert voor *porA* was bij de eerder uitgevoerde micro array ook heel sterk opgereguleerd in de wildtype vergeleken met de Cj1491 mutant, waardoor het nog aannemelijker wordt dat *porA* gereguleerd wordt door het Cj1491/C1492 twee-component systeem.

De andere drie eiwitten die in de blots opvielen blijken na de blot met het serum van voor een *Campylobacter* infectie minder interessant. Voor deze eiwitten zijn duidelijk voor een infectie al antilichamen aanwezig wat dus betekend dat deze antilichamen mogelijk al door andere bacteriën geïnduceerd worden. Bij de blot met het serum van voor de infectie zijn nog een aantal andere spots zichtbaar die niet herkend worden op de andere blots. Een verklaring hiervoor is dat dit maternale antilichamen zijn afkomstig zijn van de moeder kip. Op het moment van afname van de overige serum monsters zijn deze maternale antilichamen waarschijnlijk al verdwenen uit de kip.

De geïsoleerde eiwitten die mogelijk gereguleerd worden door het twee component systeem Cj1491/1492 dienen te worden geïdentificeerd m.b.v. Mass spectrometry. Hierna kan met RT-qPCR geverifieerd worden dat ze gereguleerd worden door het Cj1491/1492 twee component systeem. Het GroEL van *C. jejuni* wordt geactiveerd onder hogere zuurstof condities.⁵ RT-qPCR uitgevoerd met RNA geïsoleerd uit de wildtype en de Cj1491 mutant opgegroeid bij 12% zuurstof liet geen *groEL* transcriptie verschil zien onder deze omstandigheden. Mogelijk dat het Cj1491/Cj1492 systeem onder andere stress omstandigheden zoals een zuur of basisch milieu wel een invloed heeft op *groEL*.

Uit onderzoek is gebleken dat de activiteit van PorA gekoppeld is aan verschillende heatshock eiwitten. Ontdekt is dat overexpressie van PorA in *Bacillus subtilis* leidt tot verhoogde activiteit van verschillende heat shock eiwitten zoals GroEL, DnaK en GrpE.¹⁴ Bij de micro array die vooraf aan dit onderzoek is uitgevoerd was PorA juist minder geactiveerd en hetzelfde gold voor de heatshock eiwitten. Een experiment waarbij PorA in *C. jejuni* tot overexpressie wordt gebracht kan duidelijkheid geven of deze twee genen op dezelfde manier worden gereguleerd als in *B. subtilis*.

In *C. jejuni* is ontdekt dat PorA een van de eiwitten is welke door GroEL juist gevouwen wordt.¹⁵ Gedenatureerd MOMP kon door het GroEL eiwit teruggevouwen worden tot een werkend porine in de celmembraan. Dit bevestigt de bevinding dat bij overexpressie van PorA GroEL ook wordt opgereguleerd, immers moet er bij meer PorA ook meer GroEL zijn om te zorgen dat dit goed gevouwen wordt. De verminderde activiteit van PorA in de Cj1491 mutant leidt dus mogelijk ook tot een lagere activiteit van GroEL en eventuele andere heatshock eiwitten.

De resultaten uit dit onderzoek bevestigen dat GroEL en PorA mogelijk gereguleerd zijn door het twee component systeem Cj1491/1492 en dat dit systeem mogelijk een belangrijke rol speelt bij bepaalde stress condities. Uit de kippen sera is gebleken is dat GroEL, PorA en de flagelines de meest immuno dominante eiwitten in kippen zijn van *C. jejuni*. Doordat GroEL meer herkend wordt door sera afkomstig van kippen geïnfecteerd door de Cj1491 mutant, welke niet kon persisteren in de kip, kan GroEL van de Cj1491 mutant mogelijk antilichamen opwekken die kippen vrij kunnen maken van *C. jejuni*. Nader onderzoek naar de werking van GroEL en PorA in *C. jejuni* in verschillende stressomgevingen kan leiden tot verdere karakterisatie van het Cj1491/1492 twee component systeem.

5.2 Project 2

C. jejuni is in staat om fosfonaten als enige fosfaat bron te gebruiken.⁹ Aangezien een aantal van de genen in het operon Cj0727-733 homologie hebben met fosfonaat genen van andere bacteriën en al deze genen worden gereguleerd door externe fosfaat concentraties is een mutant gemaakt waarbij het merendeel van de Cj727-Cj733 genen gemuteerd zijn. Een van de fosfonaat verbindingen die *C. jejuni* zou moeten kunnen omzetten is phenylphosphonaat.⁹ De stammen zijn getest op het vermogen om fosfonaten te gebruiken door gebruik te maken van de Bioscreen, maar doordat er in het gedefinieerde medium geen elektronen donor aanwezig was konden de stammen niet groeien. De stammen zijn daarna in kweekflesjes microaerofiel opgegroeid met toevoeging van 10% H₂ als elektronendonor. De stammen groeiden prima met KH₂PO₄, maar niet als verschillende concentraties fosfonaat verbindingen werden getest. Zelfs niet als een tweede fosfaat arm medium werd gebruikt. Aangezien de stam die gebruikt is dezelfde is als die van een

andere groep waar ze hebben aangetoond dat *C. jejuni* fosfonaten gebruikt, is het voornamelijk onbekend waarom we deze experimenten niet kunnen herhalen.

Bij vervolg onderzoek moet opgelet worden dat de Cj0727-733 mutant die gemaakt is, ook drager is van de mutatie in de *tor* genen welke bij het hoofdonderzoek ontdekt zijn. Bij eventuele ontdekte verschillen dient er extra goed gecontroleerd te worden of die resultaten niet veroorzaakt wordt door andere mutaties dan de mutatie die bewust is aangebracht.

Een ontdekking die opviel was de onbeweeglijkheid van de bacteriën wanneer ze opgegroeid werden in YNB medium. Bij een flagelkleuring van *C. jejuni* opgegroeid in YNB was te zien dat sommige bacteriën een dikke flagel hadden gekregen. Het is dus mogelijk dat YNB een effect heeft op de flagel waardoor deze onbeweeglijk wordt. Nader onderzoek is zeker interessant om te achterhalen hoe het komt dat de bacteriën niet meer beweeglijk zijn in het YNB medium.

In conclusie is het *C. jejuni* twee component systeem Cj1491/1492 niet betrokken bij het elektronen transport maar reguleert het waarschijnlijk het heat shock eiwit GroEL en het buitenmembraan eiwit PorA. *C. jejuni* kan in tegenstelling tot wat eerder in de literatuur is verschenen geen fosfonaten gebruiken als enige fosfaat bron en het Cj727-Cj733 operon kan waarschijnlijk andere fosfaat bronnen gebruiken dan fosfonaten.

Literatuur

- 1 **Janssen R, Et al.** *Host-pathogen interactions in campylobacter infections: The host perspective.* Clin. Microbial Rev. 2008 July;21(3):505-518
- 2 **Allos BM.** *Campylobacter jejuni infections: update on emerging issues and trends.* Clin. Infect. Dis. 2001 April 15;32(8):1201-1206
- 3 **Hunt JM, Abeyta C, Tran T.** 2001. *Bacteriological analytical manual, chapter 7, Campylobacter.* US Food and Drug Administration.
Te raadplegen op: URL:
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072616.htm>
- 4 **Michael J. Sellars, Et al.** *Growth of Campylobacter jejuni supported respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen.* J. bacterial. 2002 augustus184;15;4187-4196
- 5 **Takata T, Et al.** *The purification of a GroEL-like stress protein from aerobically adapted Campylobacter jejuni.* Microbiol Immunol 1995;39:639-645
- 6 **Wu YL, Et al.** *Heat shock-and alkaline pH-induced proteins of Campylobacter jejuni: characterization and immunological propoperties.* Infect Immun. 1994 Oct;62:4256-4260
- 7 **Islam A, Et al.** *Recombinant PorA, the major outer membrane protein of Campylobacter jejuni, provides heterologous protection in an adult mouse intestinal colonization model.* Clin Vaccine Immunol. 2010 Nov;17;1666-1671
- 8 **Carillo CD, Et al.** *Genome-wide expression analyses of Campylobacter jejuni NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by flhA.* J Biol Chem. 2004;279:20327-20338
- 9 **Mendz GL, Et al.** *Phosphonate catabolism by Campylobacter spp.* Arch Microbiol. 2005;183:113-120
- 10 **Wösten MM, Et al.** *The Campylobacter jejuni PhosS/PhosR operon represents a non-classical phosphate-sensitive two-component system.* Mol Microbiol. 2006 Oct;62:278-291
- 11 **Palmer S, Et al.** *Water-borne outbreak of Campylobacter gastroenteritis.* Lancet 1983;1:287-290
- 12 **Barakat M, Et al.** *P@CS: a two component system resource for prokaryotic signal transduction research.* BMC Genomics 2009;10:315
- 13 **Zhang Q, Et al.** *Sequence polymorphism, predicted secondary structures and surface-exposed conformational epitopes.* Infect. Immun. October 2000;68:5679-5689
- 14 **Jürgen B, Et al.** *Proteome and transcriptome based analysis of Bacillus subtilis cells overproducing an insoluble heterologous protein.* Appl Microbiol Biotechnol 2001;55:326-332
- 15 **Goulhen F, Et al.** *Functional regolding of the Campylobacter jejuni MOMP (major outer membrane protein) porin by GroEL from the samen species.* Biochem. J. 2004;378:851-856

16 **Fujimoto S, Fujita M.** *Serum antibody level against GroEL type heat-shock protein of Campylobacter jejuni in patients with Guillain-Barré syndrome.* Microbiol immunol 1999;43:241-244

17 **Huang S, Et al.** *Infection induced antibodies against the major outer membrane protein of Campylobacter jejuni mainly recognize conformational epitopes.* FEMS microbial let juli 2007;272:137-143

18 Site: <http://www.microbiologybytes.com/blog/2010/02/15/two-component-signal-transduction-in-bacteria/>

Geraadpleegd op 17-05-2013

Bijlages

Bijlage 1. Uitgevoerde condities Bioscreen

Alle testen zijn uitgevoerd bij een microaerofiel milieu en bij beperkte zuurstof (0,8%) bij 42°C.

Combinaties elektron donoren en acceptoren

Donoren	Acceptoren (20 mM)		
Lactaat 20mM			
Lactaat 20mM	Nitraat		
Lactaat 20mM	Nitraat	TMAO	
Lactaat 20mM	Nitraat	TMAO	Fumaraat
Lactaat 20mM		TMAO	Fumaraat
Lactaat 20mM			Fumaraat
Lactaat 20mM	Nitraat		Fumaraat
Lactaat 20mM		TMAO	
Succinaat 20mM			
Succinaat 20mM	Nitraat		
Succinaat 20mM	Nitraat	TMAO	
Succinaat 20mM	Nitraat	TMAO	Fumaraat
Succinaat 20mM		TMAO	Fumaraat
Succinaat 20mM			Fumaraat
Succinaat 20mM	Nitraat		Fumaraat
Succinaat 20mM		TMAO	
NADH 0,5mM			
NADH 0,5mM	Nitraat		
NADH 0,5mM	Nitraat	TMAO	
NADH 0,5mM	Nitraat	TMAO	Fumaraat
NADH 0,5mM		TMAO	Fumaraat
NADH 0,5mM			Fumaraat
NADH 0,5mM	Nitraat		Fumaraat
NADH 0,5mM		TMAO	
Formaat 20mM			
Formaat 20mM	Nitraat		
Formaat 20mM	Nitraat	TMAO	
Formaat 20mM	Nitraat	TMAO	Fumaraat
Formaat 20mM		TMAO	Fumaraat
Formaat 20mM			Fumaraat
Formaat 20mM	Nitraat		Fumaraat
Formaat 20mM		TMAO	
	Nitraat	TMAO	
	Nitraat	TMAO	Fumaraat
		TMAO	Fumaraat
	Nitraat		Fumaraat
			Fumaraat

Overige componenten

Stof	Concentratie (mM)
Lactose	1, 10
Acetaat	10, 30, 90, 180
Glucose	10, 30, 90
Propionaat	5, 10, 20, 30, 90
Succinaat	5, 10, 30, 90
Butyraat	1, 3, 5, 9, 18
Desoxycholaat	1, 3, 9
Formaat	10, 20, 30, 90
TMAO	10, 20, 30, 40, 50
DMSO	0,01; 0,05
Pyruvaat	10, 20, 30, 40, 50
Nitraat	20, 25, 50, 75, 100
Fumaraat	10, 20, 40, 60
NADH	0,5; 1; 2; 5; 10
Citraat	1, 5, 25, 125
Sulfaat	1, 5, 25, 125
NaCl	50, 250, 1250
FeS	0,1; 1; 10
Sulfiet	1, 5, 25, 125
H ₂ O ₂	0,000003-0,3%
galzouten	0,1-1%
EGTA	0,075; 0,25; 1
EDTA	0,075; 0,25; 1
Ureum	5, 10, 20, 25, 50
Ethanol	0,01-1%

Overige combinaties

TMAO (20)	Ureum (5, 25, 50)	
Butyraat (5)	Acetaat (30)	Propionaat (10)
Fumaraat (20)	Zuurstof 10 %	

Bijlage 2 Ingrediënten ACES medium

Stof	mg/l
ACES	10000
KH ₂ PO ₄	220
Na ₂ SO ₄	150
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,56
MgSO ₄ .7H ₂ O	214
NH ₄ VO ₃	1,17
ZnSO ₄ .7H ₂ O	28,75
COCl ₂ .6H ₂ O	0,48
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,03
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,21
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,53
L-alanine	100
L-arginine	100
L-asparagine	100
L-aspartic acid	100
L-glutamine	100
Glycine	100
L-glutamic acid	100
L-histidine	100
L-isoleucine	100
L-leucine	100
L-valine	100

Stof	mg/l
L-lysine.hcl	100
L-methionine	100
L-phenylalanine	100
L-proline	100
L-threonine	100
L-tryptophane	100
L-serine	2000
Calcium pantothenate	2
Sodium pyruvate	1000
Potassium α-ketoglutarate	1000
Inositol	2
Thiamine.HCl	2
Nicotinamide	1
D-biotin	0,1
DL-thiocitic acid	0,1
Coenzyme A	0,1
L-cysteine.Hcl	500 mg
Glutathione	500 mg
L-tyrosine	50 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	40
Heamin	2

Stoffen dienen in de juiste concentratie gemengd te worden in H₂O met uitzondering van de heamin. Vervolgens dient de pH ingesteld te worden op 7,4. Daarna kan de heamin toegevoegd worden en wordt het geheel gefiltreerd door een filter van 0,22µm. Na filtratie dient het medium minimaal twee dagen te rusten voor het gebruikt kan worden.