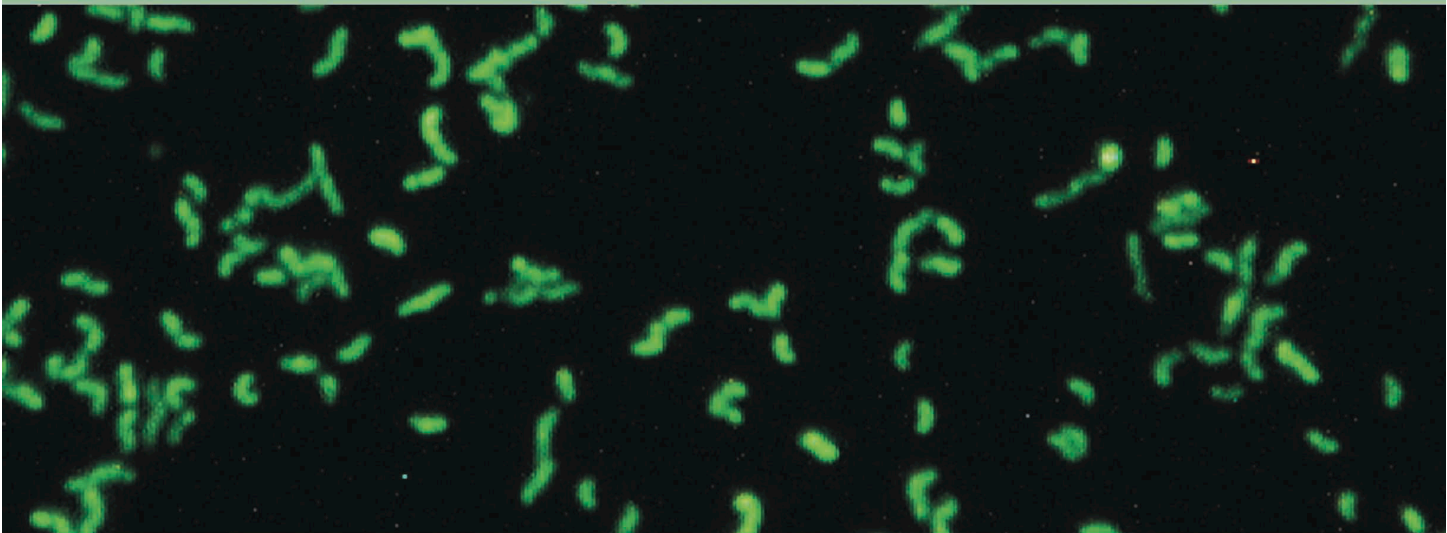

Campylobacter jejuni

~Complementatie van het *cstII* gen~

~Fibronectine binding~



Hans Verhoog
1-6-2006

-Voorwoord-

Mijn afstudeer stage heb ik gelopen bij het Erasmus MC op de afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Research and Development. Voor mij de afsluiting van vier leuke jaren op Hoge School Utrecht en het begin van een nieuw deel in mijn leven. Na enkele omwegen in mijn studiekeuze is gebleken dat het gebied van de Life sciences toch het beste bij mij past. Het project waar ik bij mijn stage aan heb gewerkt was op een gebied waar ik nog weinig ervaring mee had en dit is een van de redenen geweest waarom mijn tijd bij de MMIZ mij zo goed is bevallen. Mij is hiermee de mogelijkheid gegeven om een hoop nieuwe kennis en vaardigheden op te doen. Een andere reden waarom mijn stage een fijne tijd is geweest is de leuke samenwerking met mijn collega's daar en alle goede hulp die ik heb gekregen, mijn dank daarom aan al mijn collega's. Verder wil ik in het bijzonder Astid Heikema, mijn stage begeleidster, bedanken voor alle goede begeleiding die ik bij het uitvoeren van dit project heb gekregen en Alex van Belkum voor het bieden van een stageplek.

Mijn ouders, die het volgen van deze studie mogelijk hebben gemaakt, mogen hierin zeker niet vergeten worden.

I -Summary-

Campylobacter is a slightly bended Gram negative rod shaped bacteria. In the Netherlands about 100.000 infections with *Campylobacter spp.* occur on a yearly basis, that makes *Campylobacter* the leading cause of bacterial enteritis in the Netherlands. Humans get infected by direct contact with infected animals or by the consumption of infected food or water. Most of the infections with *Campylobacter* are caused by *Campylobacter jejuni*. An infection with *Campylobacter* causes enteritis that can hold on for 2 to 5 days. Patients usually restore to health without the need for treatment. A complication that can occur after a *Campylobacter* infection is the development of the Guillain-Barré syndrome. GBS is an illness of the peripheral nerve system that expresses itself by paralysis and loss of reflexes. The most generally accepted hypothesis for the development of GBS is molecular mimicry. In GBS, molecular mimicry implies that structures on the humane peripheral nerves have a similarity to structures on *C. jejuni*. The immune response induced by a *C. jejuni* infection also causes damage to humane peripheral nerve cells.

With the help of knockout mutagenesis research has been done on possible marker genes in *C. jejuni* that conduct in the development of molecular mimicry. A gene that was found is the *cstII* gene (a sialic acid transferase coding gene). The *cstII* gene has an important role in the induction of crossreactive antibodies. To ensure that creating the knockout mutants did not cause damage to surrounding genes, the *cstII* gene is placed back into the knockout mutant, a method called complementation. In this research a method is developed for the insertion of genes into *C. jejuni*, homologous recombination was used for the integration of genes into the chromosomal DNA of *C. jejuni*.

For infection of the intestinal epithelium *C. jejuni* is using adhesion to fibronectin. Fibronectin is a glycoprotein that is common throughout the human body where it can fulfill a role as adhesion molecule. Through binding to fibronectin *C. jejuni* has the possibility to elongate his stay in the intestine. Binding to fibronectin also makes it easier for the bacteria to invade the intestinal epithelium. A well documented fibronectin binding protein in *C. jejuni* is CadF. An other *C. jejuni* gene, with homology to a fibronectine binding protein, is *Cj1349*. The affinity for fibronectine of *C. jejuni* therefore could also be dependent of the *Cj1349* gene. Microarray data have show that expression of the *Cj1349* gene in *C. jejuni* strains isolated from GBS patients is upregulated. A possible increase in affinity for fibronectine of *C. jejuni* isolated from GBS patients in contrast to *C. jejuni* isolated from enteritis patients was assessed with the use of a whole cell fibronectin ELISA.

II -Samenvatting-

Campylobacter is een licht gekromde beweeglijke Gramnegatieve staaf. In Nederland komen per jaar ongeveer 100.000 infecties met *Campylobacter* spp. voor, daarmee is *Campylobacter* de voornaamste veroorzaker van bacteriële enteritis in Nederland. Het grootste deel van de *Campylobacter* infecties wordt veroorzaakt door *Campylobacter jejuni*. Besmetting bij de mens wordt veroorzaakt door direct contact met besmette dieren of door consumptie van besmet voedsel of water. Besmetting met *Campylobacter* veroorzaakt enteritis die 2 tot 5 dagen kan aanhouden. Patiënten genezen in de meeste gevallen zonder dat daar behandeling voor nodig is. Een complicatie die op kan treden na een infectie met *C. jejuni* is het ontstaan van het Guillain-Barré syndroom (GBS). GBS is een aandoening van het perifere zenuwstelsel dat zich uit door spierzwakte en het afwezig zijn van reflexen. De meest gangbare hypothese voor het ontstaan van GBS na een infectie met *C. jejuni* is moleculaire mimicry. Moleculaire mimicry bij GBS houdt in dat structuren op humane perifere zenuwen overeen komen met structuren aanwezig op *C. jejuni*. De antilichamen die wordt opgewekt bij een *C. jejuni* infectie richten zich ook tegen structuren op de humane perifere zenuwcellen waardoor schade ontstaat.

Met behulp van knockout mutagenese zijn mogelijke marker genen in *C. jejuni* onderzocht die verantwoordelijk zijn het ontstaan van moleculaire mimicry. Een gen dat onderzocht is is het *cstII* gen (een gen coderend voor een siaalzuur transferase). Het *cstII* gen levert een belangrijke bijdrage voor het ontstaan van kruisreactieve antilichamen. Om te bewijzen dat bij het maken van de *cstII* knockout mutant geen andere genen zijn aangetast wordt het gen teruggeplaatst in de knockout mutant, een methode die complementatie wordt genoemd. In dit onderzoek is een methode ontwikkeld voor de insertie van genen in *C. jejuni*, hierbij is gebruik gemaakt van homologe recombinatie om genen in het chromosomaal DNA van *C. jejuni* te integreren.

C. jejuni maakt voor infectie van het darmepitheel gebruik van de mogelijkheid om te binden aan fibronectine. Fibronectine is een glycoproteïne dat veelvuldig voorkomt in het lichaam waar het een functie heeft als adhesie molecuul. Door binding aan fibronectine heeft *C. jejuni* de mogelijkheid langer te verblijven in de darmen en een verbeterde kans voor invasie van het darmepitheel. CadF is een veel beschreven fibronectine bindend eiwit in *C. jejuni*. In *C. jejuni* is een ander gen gevonden dat homologie vertoont met een fibronectine eiwit, dit is het *Cj1349* gen. De affiniteit van *C. jejuni* voor fibronectine is dus mogelijk ook afhankelijk van het *Cj1349* gen. Uit microarray data is gebleken dat *C. jejuni* stammen die zijn geïsoleerd uit GBS patiënten een verhoogde expressie hebben van het *Cj1349* gen. Met behulp van een whole cell ELISA is onderzocht of *C. jejuni* stammen geïsoleerd uit GBS patiënten een verhoogde affiniteit voor fibronectine vertonen in verhouding met stammen geïsoleerd uit enteritis patiënten.

III -Inhoudsopgave-

I	Summary	3
II	Samenvatting	4
III	Inhoudsopgave	5
IV	Gebruikte afkortingen	6
1.	Inleiding	7
1.1	<i>Campylobacter jejuni</i>	7
1.2	Guillain-Barré syndroom	8
2.	Complementatie van het <i>cstII</i> gen	10
2.1	Inleiding	10
2.2	Materiaal en methode	12
2.3	Resultaten	15
2.4	Conclusie & discussie	19
3.	Fibronectine binding	20
3.1	Inleiding	20
3.2	Materiaal en methode	21
3.3	Resultaten	23
3.4	Conclusie & discussie	27
4.	Referenties	29
	Literatuur	29
	Afbeeldingen	30
	Bijlagen	31
	Bijlage 1: Gebruikte primers	32
	Bijlage 2: ELISA protocol	33
	Bijlage 3: ELISA data	34

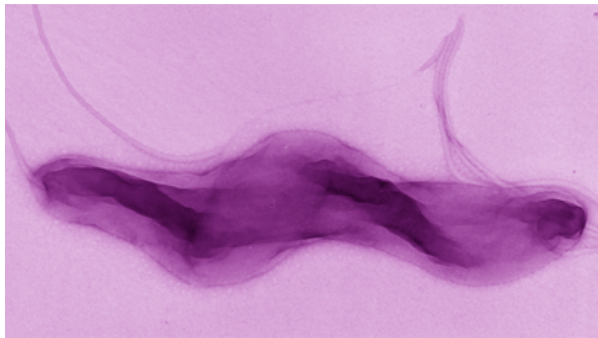
IV -Gebruikte afkortingen-

-AP	:	Alkalische fosfatase
-Bp	:	Basenparen
-C. jejuni	:	Campylobacter jejuni
-CadF	:	<i>Campylobacter</i> adhesion to Fibronectine
-CAT	:	Chloramphenicol AcetylTransferase
-CstII	:	<i>Campylobacter</i> siaalzuur transferase
-DNA	:	Deoxyribonucleïnezuur
- <i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
-ECM	:	Extracellulaire matrix
-ELISA	:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
-GBS	:	Guillain-Barré syndroom
-GM	:	Ganglioside Mimic
-kDa	:	Kilo Dalton
-LOS	:	Lipo oligosaccharide
-MFS	:	Miller Fisher syndroom
-Orf	:	Open reading frame
-PBS	:	Phosphate Buffered Saline
-PCR	:	DNA Polymerase chain reaction
-rRNA	:	Ribosoomaal ribonucleïnezuur
-TMB	:	TetraMethylBenzidine

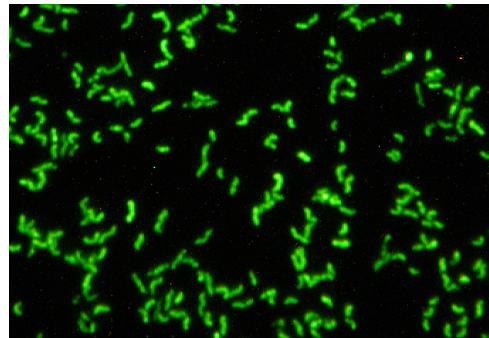
1 -Inleiding-

1.1 -*Campylobacter jejuni*-

De naam *Campylobacter* komt uit het Grieks en is samengesteld uit twee woorden: campylo wat gebogen betekent en bacter wat staaf betekent. De term *Campylobacteriose* is een verzamelnaam voor een aantal ziekten die worden veroorzaakt door bacteriën van het genus *Campylobacter*. In de zeventiger jaren werden er selectieve kweekmedia ontwikkeld waarmee *Campylobacter* uit faeces gekweekt kon worden. Toen pas werd duidelijk dat *Campylobacter spp.* behoren tot de voornaamste verwekker van voedsel gerelateerde bacteriële enteritis. De incidentie van *Campylobacter* infecties in Nederland ligt zelfs hoger dan die van *Salmonella* en *Shigella* samen. Het aantal infecties met *Campylobacter* in Nederland wordt geschat op 100.000 per jaar. Uitbraken die worden veroorzaakt door *Campylobacter* komen zelden voor. *Campylobacter* is een licht gekromde, beweeglijke gramnegatieve staaf met een of meerder flagellen aan de polen. (fig1,2)



Figuur 1: *Campylobacter*



Figuur 2: Fluorescent gelabelde *Campylobacter*

Veruit de meeste infecties met *Campylobacteraceae* worden veroorzaakt door *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) die bij een groot aantal diersoorten kan worden gevonden. Er zijn nog een aantal *Campylobacteraceae* die pathogeen zijn voor mensen waaronder *Campylobacter coli* (varkens, kippen), *Campylobacter lari* (watervogels, schelpdieren) en *Campylobacter upsaliensis* (honden). [1]

Besmetting bij de mens wordt veroorzaakt door direct contact met besmette dieren of door consumptie van besmet voedsel of water. *C. jejuni* wordt veel gevonden in producten zoals kip en rauwe melk. *C. jejuni* kan zich in tegenstelling tot bijvoorbeeld *Salmonella* niet vermenigvuldigen in voeding. [2] Na orale opnamen van bijvoorbeeld besmet voedsel moet *C. jejuni* de maagpassage overleven. Als de bacteriën de maag zijn gepasseerd zullen deze met behulp van hun flagel de mucuslaag van de darmen binnendringen om zich aan het darmepitheel te hechten. Eenmaal aan het epitheel gehecht kan de *C. jejuni* het darmepitheel invaderen. [1] De incubatie periode van *Campylobacter* bedraagt 2 tot 5 dagen en begint dan met hoge koorts, hoofdpijn en algehele malaise. Feces kunnen leukocyten en bloed bevatten en zijn waterig of slijmerig. In de meeste gevallen geneest de patiënt zonder dat daar behandeling voor nodig is. De klachten kunnen 2 tot 5 dagen aanhouden. [2] Om *C. jejuni* uit feces te kweken wordt gebruik gemaakt van selectieve media, op deze manier wordt de groei van de commensale

darmflora geremd. De meest gangbare media voor het kweken van *Campylobacter* is bloedagar met toegevoegde antibiotica. Bijna alle *Campylobacter* stammen zijn gevoelig voor penicilline, cloxacilline, cefalosporine, lincomycine, sulfonamide en trimethoprim. De optimale kweektemperatuur ligt voor de meeste *Campylobacteraceae* bij 42 °C, er wordt in de meeste gevallen uit gegaan van 48 uur kweek. Alle *Campylobacter spp.* zijn obligaat micro-aërofiel en groeien optimaal bij een verlaagde zuurstofspanning (5-15%). Na 24-48 uur incubatie groeit *Campylobacter* tot een grijze glanzende kolonie. *Campylobacter spp.* zijn door hun beweeglijkheid in staat om over de gehele, of delen van de voedingsbodem te zwermen. [2]

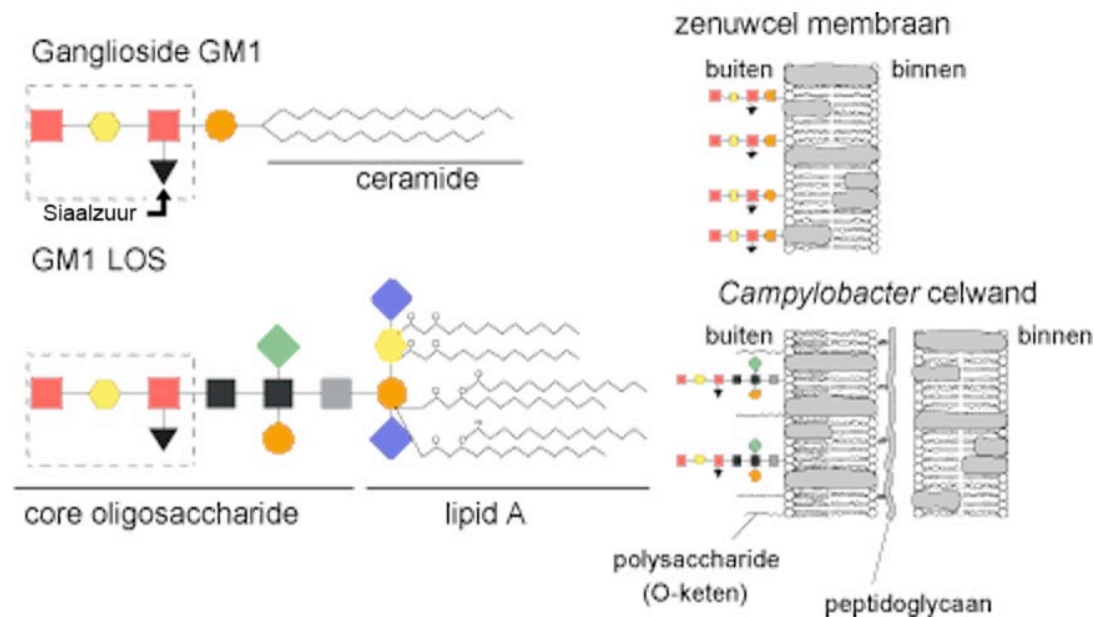
1.2 -Guillain-Barré Syndroom-

Het Guillain-Barré syndroom (GBS) is een aandoening van de perifere zenuwen. GBS uit zich bij patiënten in spierzwakte en het afwezig zijn van reflexen. De symptomen kunnen variëren van lichte gevoelloosheid in het uiteinde van de ledematen tot algehele verlamningsverschijnselen. Daarnaast vertonen de patiënten vaak ook stoornissen in het autonome zenuwstelsels, zoals hartritmestoornissen en variatie in de bloeddruk. Een variant van GBS is het Miller Fisher-syndroom (MFS), hierbij beperkt de spierzwakte zich tot de spieren die betrokken zijn bij de oogbolmotoriek en hebben de patiënten last van ataxie en afwezige reflexen. [3]

Door middel van een epidemiologische studie in Nederland is aangetoond dat de incidentie van GBS ongeveer 1 op 100.000 inwoners per jaar bedraagt. Daarbij neemt de incidentie geleidelijk toe bij een stijgende leeftijd en zijn mannen vaker aangedaan dan vrouwen. [4] Ook is gebleken dat bij een groot deel van de patiënten met GBS respiratoire en/of gastro-intestinale klachten voorkwamen. Uit case-controlstudies is gebleken dat infecties met *Campylobacter ssp.* (14-66%), Cytomegalovirus (5-15%), Epstein-Barr virus (0-10%) en *Mycoplasma pneumoniae* (1-11%) significant vaker voorkomen bij GBS patiënten. De neurologische verschijnselen van GBS uiten zich enkele weken na het verdwijnen van de klachten van de infectie.

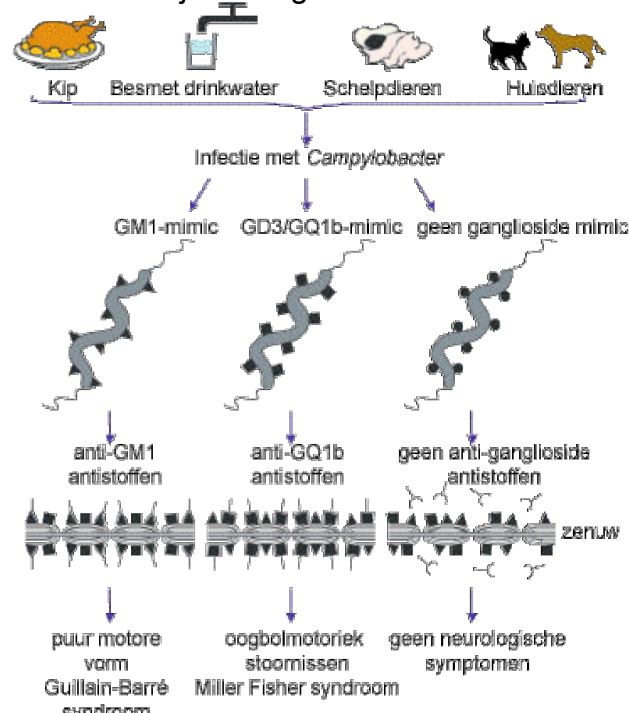
C. jejuni infecties vormen de belangrijkste factor voor het ontstaan van GBS. De meest gangbare hypothese voor het ontstaan van GBS na een infectie met *C. jejuni* is moleculaire mimicry. Dit wil zeggen dat er een overeenkomst is tussen de structuren aanwezig op de *Campylobacter* en structuren op humane perifere zenuwen. De immuunrespons die opgewekt wordt na een infectie richt zich ook tegen de humane zenuwcellen. Dit is indirect bewezen door kruisreactiviteit van antilichamen en T-cellen tegen zowel *C. jejuni* als structuren van de humane perifere zenuwen. Er kan dus gesteld worden dat GBS een postinfectieuze immuungerelateerde neuropathie is. De componenten die mimicry vertonen zijn voor zowel de gastheer als *C. jejuni* geïdentificeerd. Het Lipo-oligosaccharide (LOS) van *C. jejuni* en gangliosiden op perifere zenuwen hebben een sterk overeenkomende structuur. Beide moleculen hebben een oligosaccharide keten met daarin één of meerder siaalzuur moleculen, zoals te zien in figuur 3. Genen die betrokken zijn bij LOS biosynthese liggen gecodeerd in een zogenaamd LOS biosynthese locus. Van dit locus bestaan verschillende klassen met verschillende genen die in het locus aanwezig zijn. Na een *C. jejuni* infectie is er een verhoogde kans

op ontstaan van GBS als de bacterie stam een LOS klasse A heeft. GM1 is een type ganglioside structuur aanwezig op humane zenuwen. Een stam met type A LOS heeft vaak een GM1 mimic, zie figuur 3. Een belangrijke factor bij de mimicry is de aanwezigheid van een siaalzuurgroep, siaalzuur is een belangrijk epitoom voor kruisreactieve antilichamen.



Figuur 3: Structuur membraan zenuwcel en celwand *Campylobacter*

De structuur van het LOS in *C. jejuni* kan variëren en zo ook de specificiteit van de antistoffen tegen humane gangliosiden. Of een *C. jejuni* infectie zich ontwikkelt tot een postinfectieuze immuungerelateerde neuropathie is afhankelijk van de specificiteit van de geïnduceerde immuunrespons. [3] In afbeelding 4 is schematisch te zien hoe het ontstaan van GBS of MFS na infectie in zijn werk gaat.

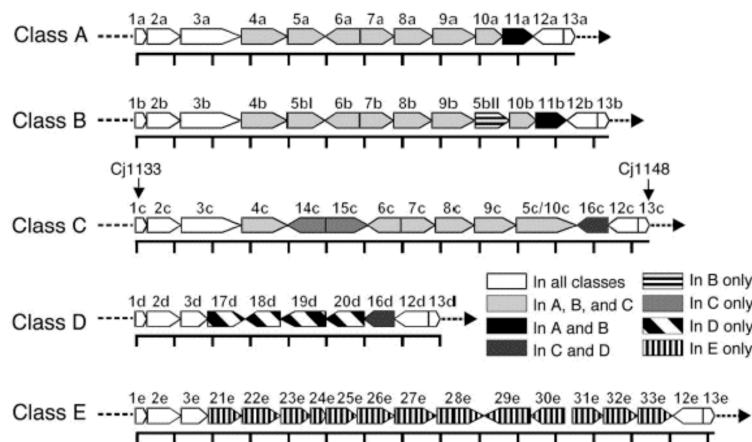


Figuur 4: Moleculaire mimicry

2 -Complementatie van het *cstII* gen-

2.1 -Inleiding-

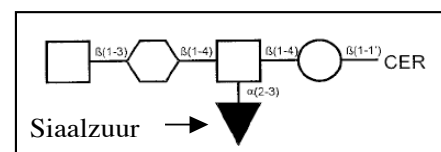
In dit onderzoek heb ik geprobeerd een systeem op te zetten voor het complementeren van genen in *C. jejuni*. In een eerder onderzoek ("The crucial role of *C. jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome [5]) is met behulp van knockoutmutagenese gekeken naar mogelijke marker genen die bijdragen ganglioside mimics. In die studie werd ook gevonden dat er verschillen zijn tussen de LOS loci van stammen geïsoleerd uit GBS patiënten en enteritis controle stammen.



Figuur 5: LOS klassen in *C. jejuni*.

Hierbij is vooral de LOS klasse A geassocieerd met GBS en klasse B met MFS. Het ontstaan van GBS is afhankelijk van de samenstelling van het LOS van de *C. jejuni* en daarmee dus van het type LOS locus. De klassen A, B en C delen enkele overeenkomstige genen die markers kunnen zijn voor het ontstaan van ganglioside mimicry, drie van deze genen zijn onderzocht op hun potentie om kruisreactieve antilichamen te induceren in GBS patiënten. Met behulp van knockout mutagenese zijn van *orf7* (*open reading frame7*), *orf10* en *orf11/orf10* knockout mutanten gemaakt door een chloramphenicol resistentie cassette (CAT) in het gen te plaatsen. Deze cassette bestaat uit een *chloramphenicol acetyltransferase* gen. *Orf7*, een siaalzuur transferase (*cstII*) gen, bleek een cruciale rol te spelen in het induceren van kruisreactieve antilichamen bij GBS patiënten.

Orf7 zorgt voor de inbouw van een siaalzuur groep aan het *Campylobacter* LOS, zie figuur 5. [5] Inmiddels is er nog een LOS klasse geïdentificeerd, klasse F, maar deze heeft geen van de onderzochte genen. [6]



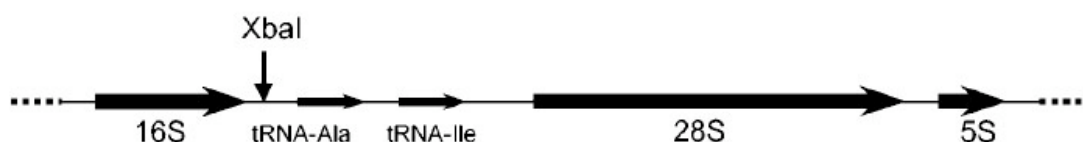
Figuur 5: *Campylobacter* LOS

De *C. jejuni* stam die gebruikt is voor het maken van een *cstII* knockout mutant is GB11, dit is een stam met LOS klasse A die geïsoleerd is uit een patiënt met een door *C. jejuni* veroorzaakte GBS. Om te bewijzen dat bij het maken van de *cstII* knockout mutant geen omliggende genen zijn aangetast wordt het gen dat is uitgeschakeld in de knockout mutant terug geplaatst,

een methode die complementatie wordt genoemd. Als bij het maken van de knockout alleen het *cstII* gen is uitgeschakeld en het gen wordt met succes teruggeplaatst zal het wild-type fenotype worden hersteld. Een voor de hand liggende methode om dit te doen is het plaatsen van het gen in een plasmide samen met een resistentie cassette. De resistentie cassette wordt hierbij meegenomen voor screening of het plasmide is opgenomen. Deze methode is echter niet bruikbaar bij de *C. jejuni* stammen die bij dit onderzoek zijn gebruikt omdat in deze stammen geen plasmiden kunnen repliceren. Daarom moet een andere methode gebruikt worden om het *cstII* gen in *Campylobacter* terug te brengen.

Door middel van homologe recombinatie is het mogelijk om DNA in het genoom van *C. jejuni* te integreren. Op deze wijze worden ook knockout mutanten gemaakt. Aan beide kanten van het gen dat geïntereerd wordt is een DNA sequentie die homoloog is aan de plek in het chromosomaal DNA van de gastheer waar het gen geplaatst moet worden. Op deze manier kunnen behalve genen worden uitgeschakeld ook genen worden terug geplaatst. Voor het maken van het complementatie construct gebruiken we een erythromycine cassette. Voorheen waren er twee cassettes voorhanden, de CAT cassette en een Kanamycine cassette. De CAT cassette is al gebruikt voor het maken van de knockout mutant en kan dus niet meer worden gebruikt. De Kanamycine cassette blijkt na testen niet werkzaam in *C. jejuni*. Een andere resistentie cassette was nodig om te kunnen screenen op succesvolle plaatsing van het complementatie gen in de *C. jejuni* *cstII* knockout mutant. Daarvoor maken we gebruik van een erythromycine resistentie cassette. Als deze cassette werkzaam is in *C. jejuni* is dat een goede aanvulling op het aantal werkzame resistentie cassettes. Omdat het om een nieuwe resistentie cassette gaat is het nodig deze vooraf te testen.

Bij een eerder beschreven methode voor het maken van gecomplementeerde *C. jejuni* stammen werd het gen ingebouwd in een gencluster dat codeert voor rRNA. *C. jejuni* heeft drie kopieën van dit cluster. Als één van de rRNA coderende genen wordt uitgeschakeld treden er geen grote fenotypisch veranderingen op omdat de andere twee genen de functie alsnog uitvoeren. Het gen wordt hierbij geplaatst in een niet coderend spacer deel van de rRNA coderende sequentie.

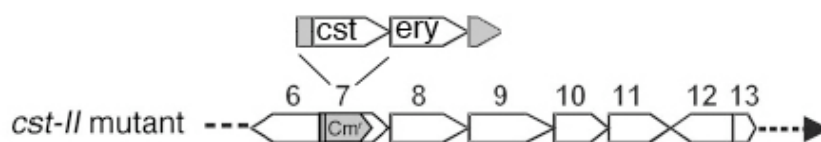


Figuur 6: rRNA coderende sequentie

De in de sequentie aanwezige XbaI restrictie site kan gebruikt worden bij het maken van het construct. Een nadeel van deze methode is dat er nog steeds een gen wordt uitgeschakeld en dat er dus alsnog bijkomstige effecten kunnen optreden. [7] Omdat echter van deze methode beschreven is dat hij werkt gebruiken we deze om de nieuwe erythromycine cassette te testen in *C. jejuni*.

Een elegantere methode voor complementatie, die de voorkeur heeft, is het integreren van het complementatie gen in de knockout site. Dit is een nieuwe

methode die eerder succesvol is gebleken bij *Helicobacter pylori*. Bij deze methode wordt het gen geplaatst in de resistentie cassette die gebruikt is om de knockout te maken. Op deze manier worden er geen andere genen in de *Campylobacter* aangetast. Door het complementatie gen te flankeren met sequenties van de CAT cassette kan het construct door middel van homologe recombinatie in het chromosomale DNA worden opgenomen (fig. 7). Omdat deze methode minimale verstoring geeft in het chromosomaal DNA van *C. jejuni* gebruiken we deze voor de complementatie van het *cstII* gen. [8]



Figuur 7: Insertie van *cstII* en erythromycine in *C. jejuni*

2.2 -Materiaal en methode-

-Gebruikte bacterie stammen-

Voor de complementatie van het *cstII* gen en het testen van de erythromycine cassette is gebruik gemaakt van GB11 en de GB11-*cstII* knockout mutant (GB11 *cstII*). Deze *C. jejuni* stammen zijn gebruikt voor *Campylobacter* transformaties in dit onderzoek. Voor het opwerken van plasmiden zijn een aantal *Escherichia coli* (*E. coli*) stammen gebruikt:

- JM109 chemisch competente *E. coli*, promega
- K147, DAM negatieve *E. coli*
- Top10 chemisch competente *E. coli*, invitrogen

E. coli stammen zijn opgekweekt in 2YT medium. Voor selectie is gebruikt gemaakt van de volgende antibiotica concentraties.

- Erythromycine 250 µg/ml
- Ampiciline 100 µg/ml

-Algemene methoden-

-DNA isolatie-

Genomisch DNA is geïsoleerd met behulp van Promega Wizard® genomic DNA purification kit. Plasmide isolatie is gedaan met Promega wizard® plus sv minipreps DNA purification system. Promega Wizard® SV gel and PCR clean-up system is gebruikt voor isolatie en purificatie van DNA uit elektroforese gel.

-Gel elektroforese-

De scheiding van DNA op basis van grootte is gedaan door deze te runnen op een elektroforese gel. Afhankelijk van de grootte van het fragment is gebruik gemaakt van een 1 of 0,8% agarose gel.

-Transformatie in een niet methylerende *E. coli* stam-

De *E. coli* stammen JM109 en Top10 die voor transformatie gebruikt zijn bevatten beiden het *dam* gen wat zorgt voor methylatie van adenine in GATC

sequenties. Voor het maken van het construct is gebruik gemaakt van digesties met het methylase gevoelige XbaI restrictie enzym. Om gebruik te kunnen maken van dit enzym is waar nodig plasmide getransformeerd naar K147, *dam* negatieve *E. coli*.

-Alkalische fosfatase behandeling-

Om zelfsluiting te voorkomen zijn lineair geknipte plasmiden behandeld met alkalische fosfatase (AP). Met dit enzym wordt bij lineair DNA de fosfaat groep verwijderd van de 5' terminal, dit voorkomt zelfsluiting van het geknipte plasmide.

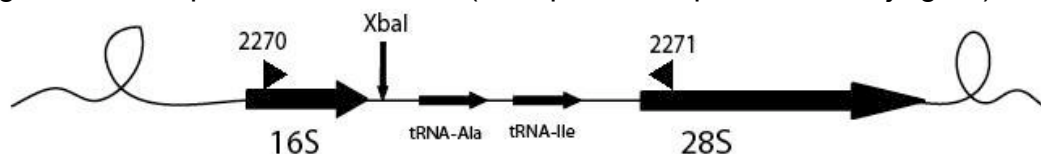
-Transformatie-

Transformaties van *E. coli* zijn gedaan volgens het pGEM-T and pGEM-T easy vector systems (Promega) protocol. Waar nodig is de heatshock tijd aangepast aan de gebruikte *E. coli* stam. *C. jejuni* transformatie is gedaan met behulp van electroporatie. Hiervoor zijn GB11 en GB11-*cstII* electrocompetent gemaakt.

-rRNA gen knockout construct-

-pGEM Ribo vector-

Genomisch DNA van *C. jejuni* stam GB11 is geïsoleerd en met PCR is een deel van ~1600 bp uit het *rRNA* gencluster geamplificeerd, hierbij is gebruik gemaakt van primers 2270-2271 (voor primer sequenties zie bijlage 1).



Figuur 8: rRNA gencluster

Het PCR product is geligeerd in een pGEM-T Easy plasmide (Promega) en getransformeerd in chemisch competente *E. coli* JM109. Met blauw wit screening zijn kolonies geselecteerd met het pGEM-Ribo plasmide (pGEM-T Easy met Ribosomaal gencluster) en de voorkweken van de kolonies is plasmide geïsoleerd. Een PCR is gedaan met primers 2270-2271 om de aanwezigheid van het *rRNA* gencluster te bevestigen. Met een EcoRI digestie en XhoI-NdeI dubbeldigestie is het *rRNA* gencluster uit de plasmide geknipt en op electroforese gel gerund om nogmaals de ligatie te controleren.

-pGEM-Ribo-Ery construct-

Met een XbaI digestie is de erythromycine cassette uit de vector pDH20 geknipt. Het pGEM-Ribo plasmide is met een XbaI digestie lineair geknipt en AP behandeld. De DNA fragmenten zijn op gel gerund en na zuivering met elkaar geligeerd. Na transformatie zijn de gegroeide kolonies opgekweekt en DNA is geïsoleerd. Met behulp van een XmnI digestie is de oriëntatie van de erythromycine cassette in het pGEM-Ribo-Ery construct ten opzichte van de flankerende *rRNA* delen bepaald.



Figuur 9: Ribo-Ery construct

-Plaatsing van het Ribo-Ery construct in GB11 en GB11-cstII-

Het pGEM-Ribo-Ery plasmide is geplaatst in GB11 en GB11-cstII. Op aanwezigheid van de erythromycine cassette is gescreend door de cellen uit te platen op bloedplaten met 5 en 10 µg/ml erythromycine. Van kolonies die op deze platen groeide is genomisch DNA geïsoleerd, hierop is een PCR met primers 2270-2271 is gedaan om de aanwezigheid van de erythromycine cassette te bevestigen.

-CstII complemetatie-

-pGEM-CAT plasmide-

Om het *cstII* gen en de erythromycine cassette te kunnen plaatsen is een BamHI en XbaI restrictie site geïntroduceert in de CAT cassette. Dit is gedaan door de cassette in 2 delen met PCR te amplificeren, dit is gedaan met primers 2280-2283 en 2281-2282. De primers 2282 en 2283 zijn met enkele baseparen verlengd, in deze sequentie zit de restrictie site voor BamHI en XbaI. Na elektroforese en zuivering is een PCR gedaan met de primers 2280-2281 om de beide delen met daar tussenin de restrictie sites weer samen te voegen. Na opzuivering is het PCR product geligeerd in een pGEM-T Easy vector. Het pGEM-CAT (pGEM-T Easy met CAT-BamHI/XbaI cassette) is getransformeerd naar *E. coli* JM109 en opgezuiverd.

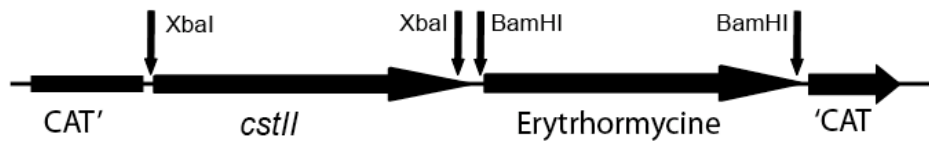
-pGEM-cstII plasmide-

Met een PCR is uit opgezuiverd genomisch DNA van *C. jejuni* GB11 het *cstII* gen geamplificeerd. Hierbij is gebruik gemaakt van de primers 1496-1555, met behulp van deze primers zijn BamHI restrictie sites geïntroduceerd aan beide uiteinden. Het PCR product is geligeerd in een pGEM-T-Easy vector en getransformeerd naar *E. coli* JM109. Uit de getransformeerde kolonies is het plasmide opgezuiverd en met een BamHI digestie is de aanwezigheid van het *cstII* gen bevestigd. Omdat het van belang is dat het *cstII* gen werkzaam is, is het *cstII* deel van het plasmide gesequenced. De sequentie van het *cstII* gen uit het plasmide wordt vergeleken met de sequentie van *cstII* uit GB11, deze twee sequenties moeten overeenkomen. Het *cstII* gen is gesequenced in vier delen, hierbij is gebruik gemaakt van primers 1496-2292, 2291-2294, 2293-2296 en 2295-1555.

-pGEM-CEC plasmide-

Met een XbaI digestie is de erythromycine cassette uit de vector pDH20 geknipt. Het pGEM-CAT plasmide is met een XbaI digestie lineair geknipt en AP behandeld. De DNA fragmenten zijn op gel gerund en na zuivering met elkaar geligeerd. Na transformatie in top 10 cellen zijn de kolonies opgekweekt en is DNA geïsoleerd. Om de oriëntatie van de erythromycine cassette in pGEM-CE (CAT Ery) ten opzichte van de flankerende CAT delen

te bepalen is een dubbeldigest gedaan met de enzymen XmnI en HindIII. Met een BamHI digestie is de pGEM-CE plasmide lineair geknipt en AP behandeld. Het *cstII* gen is met een BamHI digestie uit het pGEM plasmide geknipt en geligeerd in de pGEM-CE vector. Voor opwerking van de pGEM-CEC (*CAT Erythromycine CstII*) plasmide is deze geplaatst in top10 cellen. De oriëntatie van het *cstII* gen is bepaald met een XmnI digestie.



Figuur 10: pGEM-CEC plasmide

Het pGEM-CEC plasmide is in *C. jejuni* GB11-*cstII* geplaatst door middel van electroporatie.

2.3 -Resultaten-

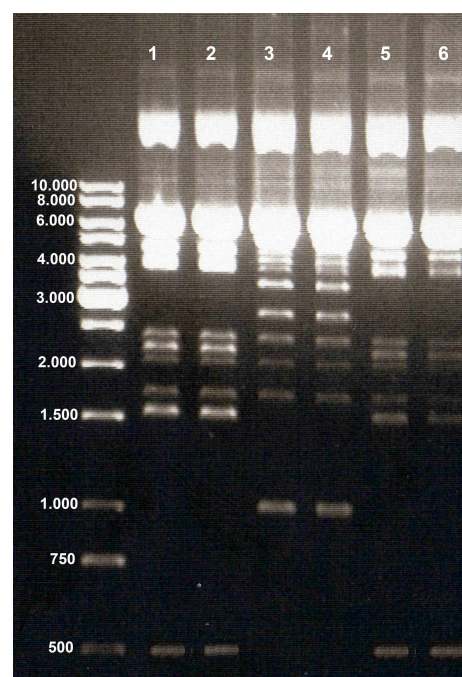
-rRNA gen knockout construct-

De oriëntatie van de erythromycine cassette ten opzichte van de flankerende *rRNA* delen kan mogelijk van invloed zijn op de transcriptie van het gen. Om de oriëntatie te bepalen is een digestie gedaan met XmnI op het pGEM-Ribo plasmide. De digestie met het XmnI restrictie enzym geeft voor elke mogelijke oriëntatie van de erythromycine cassette een aantal restrictie fragmenten die uniek zijn in grootte. Er zijn twee mogelijke oriëntaties van de erythromycine cassette ten opzichte van de flankerende *rRNA* sequenties. De cassette kan in dezelfde richting als de transcriptie van het *rRNA* gen zitten (sense, s), waarbij de cassette gebruik kan maken van de promoter van het *rRNA* gen, of hij zit tegen de transcriptie richting in (antisense, as) waarbij de cassette afhankelijk is van de eigen promotor sequentie. Ook de oriëntatie van het gehele construct in het plasmide is bepaald hoewel deze niet van invloed is op de homologe recombinatie.

PGEM -Ribo-Ery	XmnI	
oriëntatie Ribo	oriëntatie Ery	Fragmenten (bp)
s	s	1054+1029+1635+2381
s	as	513+1570+1635+2381
as	s	802+1281+1408+2608
as	as	740+1343+1408+2608

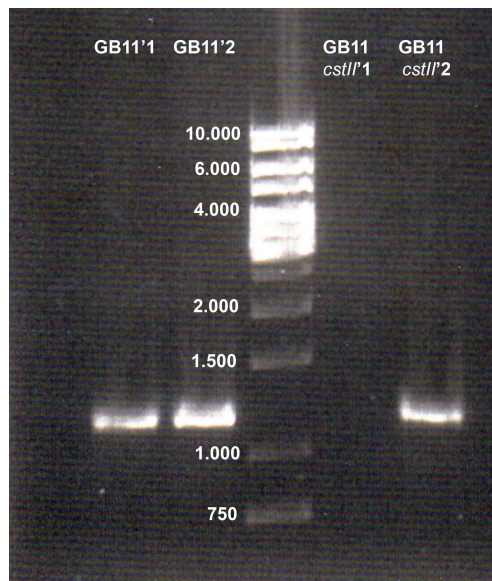
Tabel 1: XmnI digestie fragmenten

In tabel 1 zijn de oriëntaties te zien met de bijbehorende fragment groottes. Figuur 11 geeft de gel weer die met het digestie product is gerund. Zoals te zien in figuur 11 is het Ribo-Ery construct aanwezig in 2 oriëntaties, sense/sense (3,4) en sense/antisense (1,2,5,6).



Figuur 11: Electroforese gel XmnI digestie

C. jejuni stammen GB11 en GB11-*cstII* zijn getransformeerd met pGEM-Ribo-Ery plasmiden waarin de erythromycine cassette zowel in de sense als in de antisense oriëntatie zit ten opzichte van het *rRNA* gen. Na transformatie was enkel groei te zien op de agar platen bij de pGEM-Ribo-Ery transformanten waarbij de erythromycine cassette in de sense oriëntatie zat.



De electroforese gel van de PCR die uitgevoerd is om de insertie van de erythromycine cassette in GB11 en GB11-*cstII* te bevestigen is te zien in figuur 12. Hierbij zijn de '1 kolonies genomen van de 5 µg/ml erythromycine bloedagar platen en de '2 kolonies van de 10 µg/ml erythromycine bloedagarplaten. Op de gel zijn bandjes aanwezig met een grootte van ongeveer 1300 baseparen, dit komt overeen met de grootte van de geëmplificeerde erythromycine cassette. GB11-*cstII*'1 geeft echter geen product, mogelijke oorzaak zou een fout in de PCR of in DNA opzuivering kunnen zijn.

Figuur 12: Erythromycine PCR

Bij GB11'1, GB11'2 en GB11-*cstII*'2 is op gel PCR product te zien, dit bevestigt een succesvolle insertie van de erythromycine cassette in deze stammen.

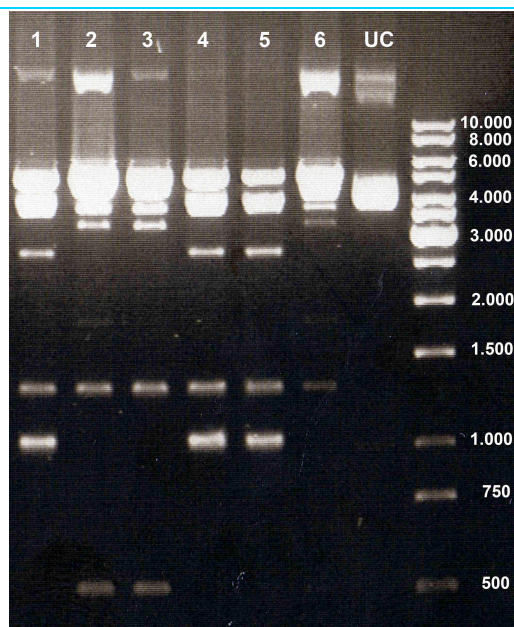
-CstII complementatie-

Zowel de oriëntatie van het *cstII* gen en de erythromycine cassette ten opzichte van de flankerende CAT sequenties kan van belang zijn op de transcriptie van het complementatie construct. De drie componenten kunnen een aantal verschillende oriëntaties ten opzichte van het pGEM-T Easy plasmide hebben. De oriëntaties van de componenten van het construct zijn in twee keer onderzocht. Na ligatie van de erythromycine cassette in het pGEM-CAT plasmide is een dubbeldigestie gedaan met XmnI en HindIII restrictie enzym om zo de oriëntatie van de componenten ten opzichte van het pGEM-T Easy plasmide te onderzoeken. Door digestie met XmnI en HindIII ontstaan fragmenten die voor de verschillende oriëntaties verschillende groottes hebben, zie tabel 2.

pGEM-CAT-Ery	XmnI/HindIII	
Oriëntatie CAT	Oriëntatie Ery	Fragmenten
s	s	480+2168+2340
s	as	1092+1663+2182
as	s	1092+1309+2662
as	as	480+1309+3211

Tabel 2: XmnI/HindIII digestie fragmenten

In figuur 13 is de gel te zien die gerund is van de digestie producten, UC staat hierin voor UnCut (ongeknipt plasmide). Hieruit is op te maken dat de monsters plasmide bevatten in de as/s en as/as oriëntatie. Het *cstII* gen is geligeerd in plasmide met het construct in beide oriëntaties. De oriëntatie van het *cstII* gen in het pGEM-CE plasmide is na ligatie bepaald met behulp van een *XmnI* digestie. Digestie met *XmnI* levert verschillende restrictie fragmenten op die per oriëntatie in grootte verschillen. In tabel 3 is de grootte van de fragmenten per oriëntatie te zien.

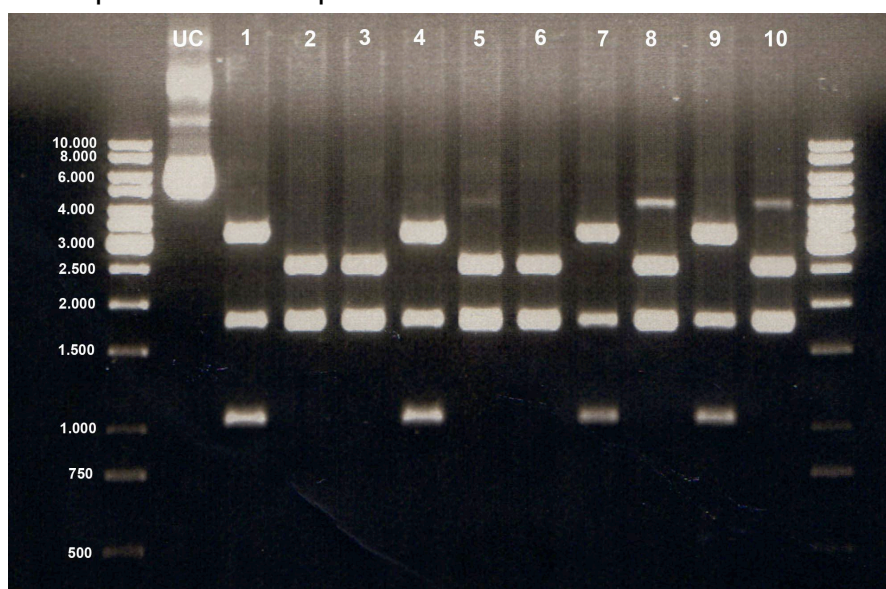


Figuur 13: Electroforese gel *XmnI/HindIII* digestie pGEM-CE

pGEM-CEC	<i>XmnI</i>	
Oriëntatie CE	Oriëntatie <i>cstII</i>	Fragmenten
as	s	1789+1840+2537
as	as	1061+1794+3331
s	s	1244+2339+2583
s	as	516+2339+3311

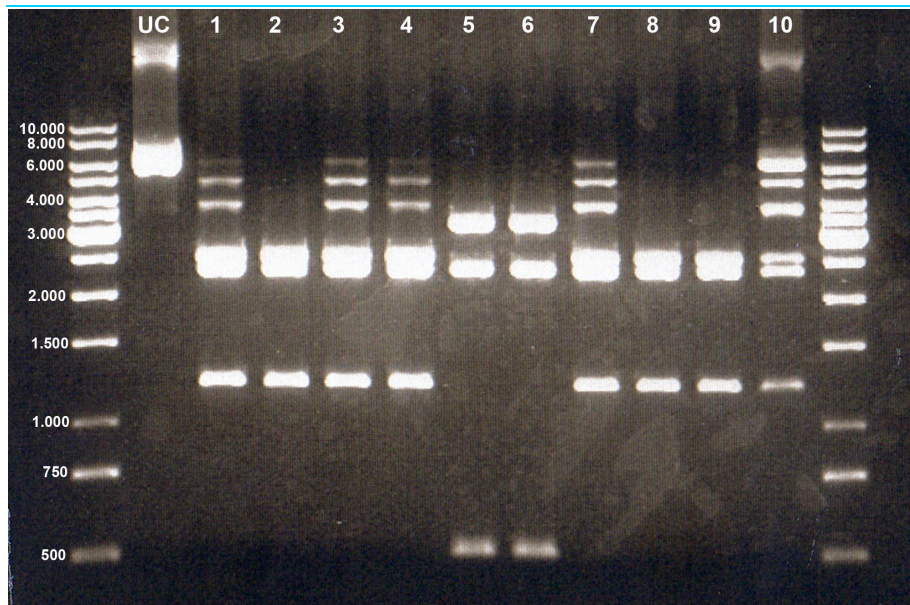
Tabel 3: *XmnI* digestie fragmenten

In figuur 14 en 15 is de electroforese gel te zien van de *XmnI* digestie. Figuur 14 geeft de *XmnI* digestie weer van het pGEM-CEC plasmide waarbij het *cstII* gen is geligeerd in het pGEM-CE as/as plasmide. Figuur 15 geeft de *XmnI* digestie weer van het pGEM-CEC plasmide waarbij het *cstII* gen is geligeerd in het pGEM-CE as/s plasmide.



Figuur 14: *XmnI* digestie pGEM-CE(as/as)C

Uit figuur 14 is op te maken dat monsters 1, 4, 7, en 9 plasmiden bevatten met CAT-Erythromycine-*CstII* in as/as/as oriëntatie en monsters 2, 3, 5, 6, 8 en 10 bevatten het construct in as/as/s oriëntatie.



Figuur 15: *XmnI* digestie pGEM-CE(as/s)C

Uit figuur 15 is op te maken dat monsters 1, 2, 3, 4, 7, 8 en 9 plasmide bevatten met CAT-Erythromycine-*CstII* in as/s/s oriëntatie en monsters 5 en 6 bevatten het construct in as/s/as oriëntatie.

GB11-*cstII* is getransformeerd met plasmiden waarin de componenten in elk mogelijke oriëntatie ten opzichte van elkaar inzitten. De oriëntatie van het gehele construct ten opzichte van het pGEM-T plasmide is hierbij niet van belang omdat door homologe recombinatie enkel het Cat-Ery-*CstII* gedeelte van het plasmide wordt geïnserteerd. Dit levert de volgende combinaties van erythromycine-*CstII* oriëntaties ten opzichte van de flankerende CAT sequenties op:

-Erythromycine	- <i>CstII</i>
-sense	-sense
-sense	-antisense
-antisense	-sense
-antisense	-antisense

Na transformatie is er echter bij geen van de vier mogelijke oriëntaties van het insert groei van GB11-*cstII* geconstateerd. Het complementatie construct blijkt niet door GB11-*cstII* te zijn opgenomen.

2.4 -Conclusie & Discussie-

-Conclusie-

Het plaatsen van genen in *C. jejuni* door insertie in het *rRNA* gen blijkt een succesvolle methode. Door de aanwezigheid van drie kopieën van het *rRNA* gen treedt er een minimale verandering van het fenotype op omdat de twee resterende genen de functie van het uitgeschakelde gen over kunnen nemen. Met behulp van deze methode was het mogelijk een erythromycine cassette te plaatsen in het genoom van *C. jejuni*. Op die manier is getest op transcriptie van de cassette en daarmee dus de werkzaamheid. Door *C. jejuni* te transformeren en vervolgens te screenen op erythromycine resistentie is de werkzaamheid van de cassette bewezen. De bruikbaarheid van de erythromycine cassette in *C. jejuni* is een belangrijke aanwinst, voorheen was enkel de CAT cassette beschikbaar voor bepaalde *C. jejuni* stammen. Met de erythromycine cassette is de insertie van genen en resistentie screening mogelijk in *C. jejuni* knockout stammen die de CAT cassette bevatten.

Genen plaatsen in *C. jejuni* door insertie in de resistentie cassette van een knockout mutant blijkt niet succesvol. De complementatie van het *cstII* gen in een GB11-*cstII* knockout mutant is met deze methode niet gelukt. De *cstII* knockout mutant is gemaakt door het plaatsen van een CAT cassette in het *cstII* gen. Geprobeerd is om een construct te maken dat met homologe recombinitie in de CAT cassette wordt geplaatst. Door de insertie van genen in deze CAT cassette worden er geen andere genen van *C. jejuni* aangetast, zo blijft het wildtype fenotype zo veel mogelijk intact. Transformatie van GB11-*cstII*, en zo de complementatie van het *cstII* gen, in de CAT cassette is in dit onderzoek niet werkzaam gebleken.

-Discussie-

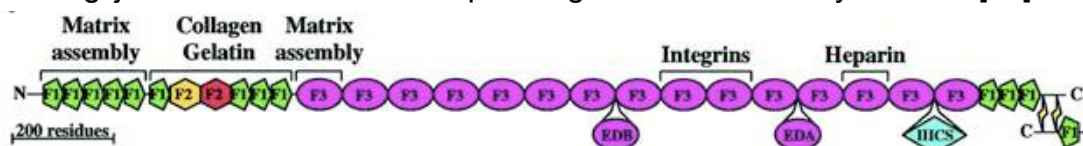
C. jejuni lijkt het complementatie construct dat in dit onderzoek is gemaakt niet op te nemen. Een mogelijke oorzaak hiervoor is dat de lengte van de flankerende CAT sequenties niet lang genoeg zijn om het gen door middel van homologe recombinitie op te nemen. Dit kan opgelost worden door deze sequentie te verlengen. Als niet alleen de CAT cassette maar ook nog een deel van de omliggende genen gebruikt worden is de sequentie mogelijk lang genoeg voor homologe recombinitie. Een andere mogelijkheid is het maken van de *cstII* knockout met behulp van de erythromycine cassette en de CAT cassette gebruiken in het complementatie construct. De sequentie van de erythromycine cassette bedraagt ~1300 baseparen en die van de CAT cassette 800 baseparen. Door de erythromycine cassette nu als flankerende sequentie te gebruiken is de homologie tussen het genoom van *C. jejuni* en het construct groter en kan het mogelijk beter opgenomen worden. Het is jammer dat deze methode niet lijkt te werken, de insertie van genen in een resistentie cassette maakt dat een construct gebruikt kan worden voor de transformatie van verschillende stammen.

3 -Fibronectine binding-

3.1 -Inleiding-

Veel pathogene bacteriën zijn voor infectie afhankelijk van binding aan het weefsel van de gastheer. Ook *C. jejuni* maakt gebruik van binding aan het darmweefsel voor infectie. Zonder deze binding zal *C. jejuni* door de peristaltische beweging van de darmen snel uit het lichaam worden verwijderd. Binding aan gastheer weefsel maakt het mogelijk langer in de darmen te verblijven, op deze manier heeft *C. jejuni* een grotere kans om te kunnen invaderen in het darmepitheel. De effectiviteit waarmee *C. jejuni* aan het darmepitheel kan binden is bepalend voor de virulentie van de stam. Om aan het darmweefsel van de gastheer te binden wordt er gebruik gemaakt van diverse adhesines. Één van de best omschreven adhesie mechanismen van *C. jejuni* is de adhesie aan fibronectine. [9]

Fibronectine, een 220 kDa glycoproteïne, komt veelvuldig in het gehele lichaam voor. Zo is het ook aanwezig in het darmepitheel en heeft daar een functie als adhesie molecuul. Fibronectine bindt de cellen aan collageen en extracellulaire matrix (ECM) componenten. Fibronectine kan door zijn vorm aan meerdere adhesie eiwitten binden. Schematisch gezien lijkt het op een lange “ketting” met diverse peptide “kralen” (figuur 8). Elk deel van de ketting heeft de mogelijkheid aan een ander fibronectine bindend molecuul te adheren. Fibronectine heeft in het lichaam invloed op de vorm en beweeglijkheid van de cellen en op de organisatie van het cytoskelet. [10]



Figuur 16: Fibronectine

C. jejuni maakt gebruik van fibronectine om zich aan het darmepitheel te hechten. Deze binding aan het darmepitheel maakt het voor *C. jejuni* mogelijk om beter te invaderen in het darmepitheel. Een veel beschreven receptor eiwit in *C. jejuni* is CadF (*Campylobacter* adhesion to Fibronectin). In een proefdier model is bewezen dat CadF knockout mutanten de mogelijkheid om het ceacum van kippen kuikens te koloniseren verliezen [9]. CadF is dus een belangrijk adhesie eiwit in *C. jejuni*. De affiniteit van *C. jejuni* voor fibronectine is een belangrijke factor voor het succesvol kunnen invaderen van het darmepitheel, als de affiniteit van een *C. jejuni* stam voor fibronectine groter is zal deze stam beter kunnen invaderen.

Cj 1349 is een *C. jejuni* gen dat homologie heeft met een gen dat codeert voor een fibronectine bindend eiwit. Er is echter nog niet bewezen dat het genproduct van *Cj1349* ook echt aan fibronectine bindt. Uit microarray data is gebleken dat *Cj1349* meer tot expressie wordt gebracht in GB11. Als een *C. jejuni* stam een grotere affiniteit vertoont voor fibronectine is deze beter in staat te invaderen in het darmepitheel, als deze stam beter invadeert is er een grotere mogelijkheid om GBS te kunnen induceren. Als een *C. jejuni* stam wel een LOS klasse heeft die moleculaire mimicry met humane gangliosiden vertoont, maar door een lagere expressie van *Cj1349* verminderde affiniteit

voor fibronectine heeft en zo minder invadeert in het darmepitheel is de kans dat deze stam GBS induceert mogelijk kleiner. Een verschil in affiniteit voor fibronectine zou een verklaring kunnen zijn waarom niet alle *C. jejuni* stammen met een overeenkomstig LOS GBS veroorzaken. Met behulp van een Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) heb ik gekeken naar binding van GBS en enteritis geassocieerde *C. jejuni* stammen aan fibronectine. Hiervoor heb ik een whole cell ELISA opgezet en geoptimaliseerd. Een aantal factoren zijn hierbij onderzocht:

- Methode om *C. jejuni* te coaten aan de ELISA plaat.
- Concentratie fibronectine die gebruikt wordt bij incubatie.
- Incubatietijd met fibronectine.

Het bepalen van de concentratie en incubatietijd is gedaan om eventuele verschillen in bindingskinetiek tussen *C. jejuni* stammen te bepalen. Op deze manier kan gekeken worden of een *C. jejuni* stam sneller of bij kleinere concentraties aan fibronectine kan binden dan een andere stam. Dit verschil in kinetiek zou verklaard kunnen worden door de verhoogde expressie van het *Cj1349* gen in GBS stammen. Om die reden is de affiniteit voor fibronectine van *C. jejuni* stammen geïsoleerd uit GBS patiënten vergeleken met enteritis controle stammen.

3.2 -Materiaal en methode-

-Gebruikte *C. jejuni* stammen-

Voor de optimalisatie van de fibronectine ELISA hebben we bij “coating methode” en “fibronectine concentratie bepaling” gebruik gemaakt van *C. jejuni* stam 11168. Voor het bepalen van de incubatietijd hebben we 11168 en GB11 gebruikt. Na optimalisatie is de ELISA uitgevoerd op de stammen: GB1, GB2, GB3, GB4, GB5, MF6, GB11, GB13, GB14, GB15, GB16, GB17, GB18, GB20, GB22, GB23, GB24, GB25, GB26, GB27, GB28, GB29, GB30, GB31, GB31, GB33, GB35, GB36, GB37, GB38, P1, P4, P10, P19, P36, 961095, 11168, 9138, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R8, R9, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, R18, R19, R21, R22, R23, R24, R26, R27, R28, R29, R30, R31, R32.

De GB stammen zijn stammen geïsoleerd uit GBS patiënten, de P stammen zijn Penner stammen, Penner maakt onderscheid tussen GBS en enteritis stammen op basis van serotype in plaats van LOS klasse. De R stammen zijn stammen geïsoleerd door het RIVM uit enteritis patiënten.

-Fibronectine ELISA-

Een overnacht cultuur van *C. jejuni* wordt opgenomen in PBS (phosphate buffered saline, fosfaat buffer pH 7,2 en NaCl) en verdunt tot een OD600 (optische dichtheid bij 600 nm) van ~0,2, dit correspondeert met een concentratie van 5×10^8 cellen/ml. De ELISA platen (Nunc-Immuno MaxiSorp 96 microwell plates, zie afb 9) worden geïncubeerd met 100 µl/well van de bacterie suspensie. De platen worden 4x gewassen met 150 µl/well PBS met 1% BSA (Bovine Serum Albumine). Per well wordt nu 100 µl fibronectine in PBS met 2 mM CaCl_2 en 2 mM MgCl_2 toegevoegd en 1 uur geïncubeerd bij 37 °C. De platen worden vervolgens 4x gewassen met 150 µl/well PBS + 0,05% Tween 20. Er wordt nu per well 100 µl konijn-anti-fibronectine antilichaam toegevoegd (1:5000 in PBS +1%BSA) en 1 uur geïncubeerd bij

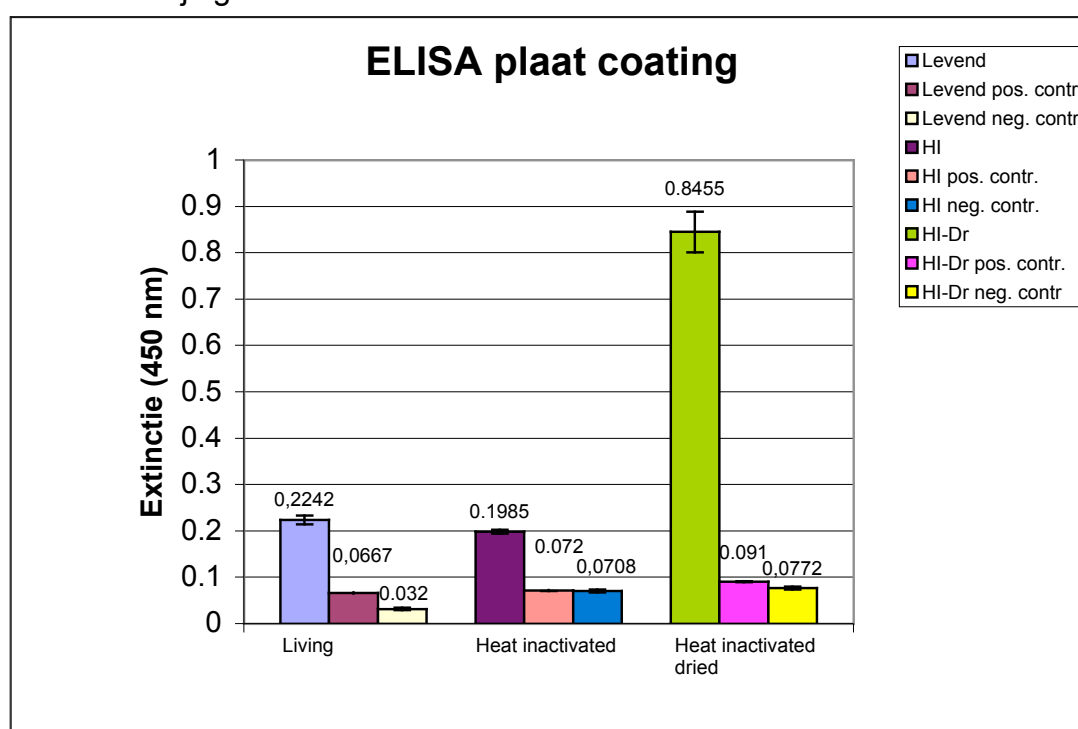
-Fibronectine incubatietijd bepaling-

Voor deze bepaling is gebruik gemaakt van ELISA platen met hitte geïnactiveerde en gedroogde *C. jejuni* stammen 11168 en GB11. Er is hier gebruik gemaakt van een fibronectine concentratie van 5 µg/ml. De meting is gedaan bij een incubatietijd van 15, 30, 45 en 60 minuten bij 37 °C.

3.3 –Resultaten-

-ELISA plaat coating-

De bepaling is uitgevoerd in viervoud. Als negatieve controles zijn ook 4 wells met bacteriën maar zonder primair antilichaam en 8 wells met PBS als coating meegenomen. De resultaten zijn vermeld in grafiek 1, de data staat vermeld in bijlage 2.

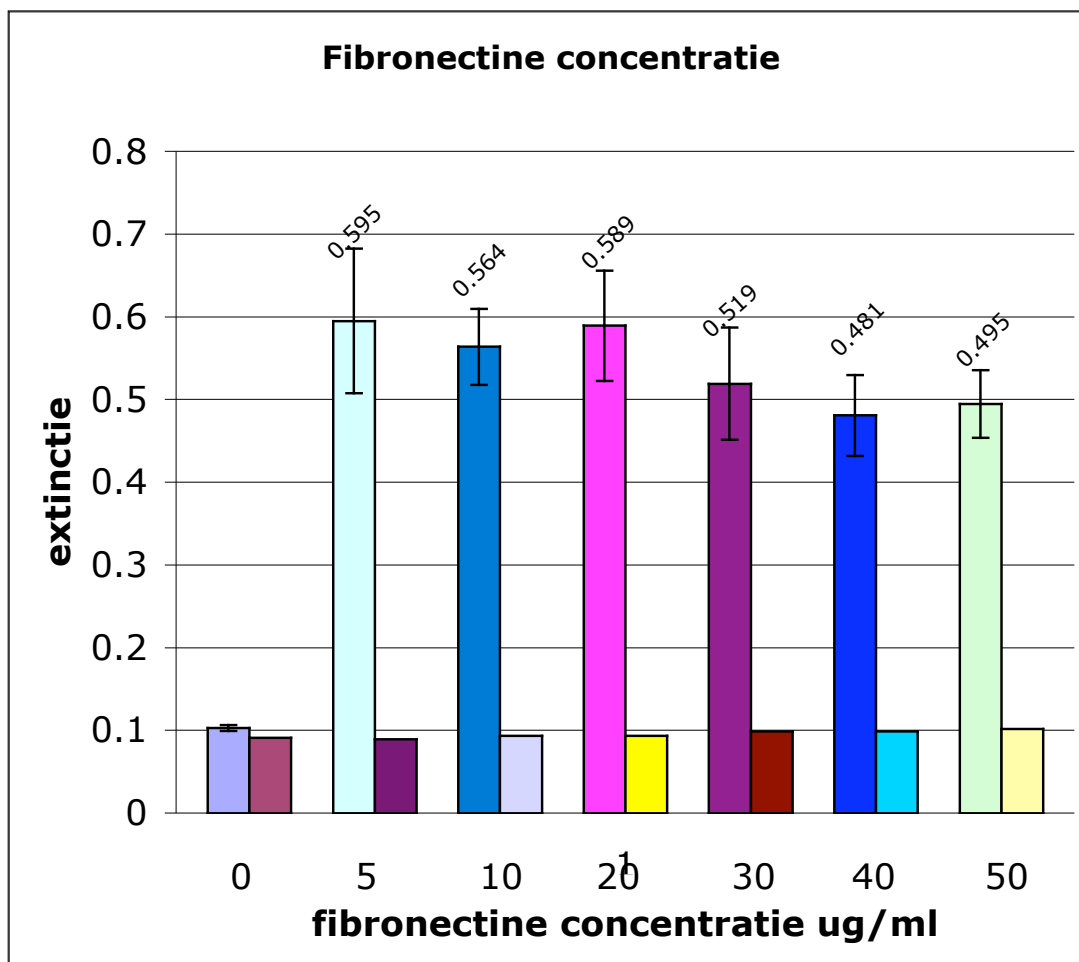


Grafiek 1: ELISA plaat coating

In de grafiek is duidelijk te zien dat de plaat met hitte-geïnactiveerde en gedroogde *C. Jejuni* een hoger signaal geeft dan de platen met levende en hitte-geïnactiveerde cellen. Er is gekozen om de ELISA uit te voeren met hitte-geïnactiveerde en gedroogde platen omdat dit het beste signaal geeft. Met een hoger signaal is het makkelijker onderscheid maken tussen de meting en de controles.

-Optimale fibronectine concentratie bepaling-

De bepaling is voor elk monster in viervoud gedaan. Als negatieve controle zijn 4 wells zonder primair antilichaam meegenomen. Met de wells waar geen fibronectine aan is toegevoegd kan worden gecontroleerd of het primaire antilichaam geen aspecifieke binding vertoont met *C. jejuni*. In grafiek 2 zijn de resultaten van de bepaling te zien, de data staat vermeld in bijlage 3.

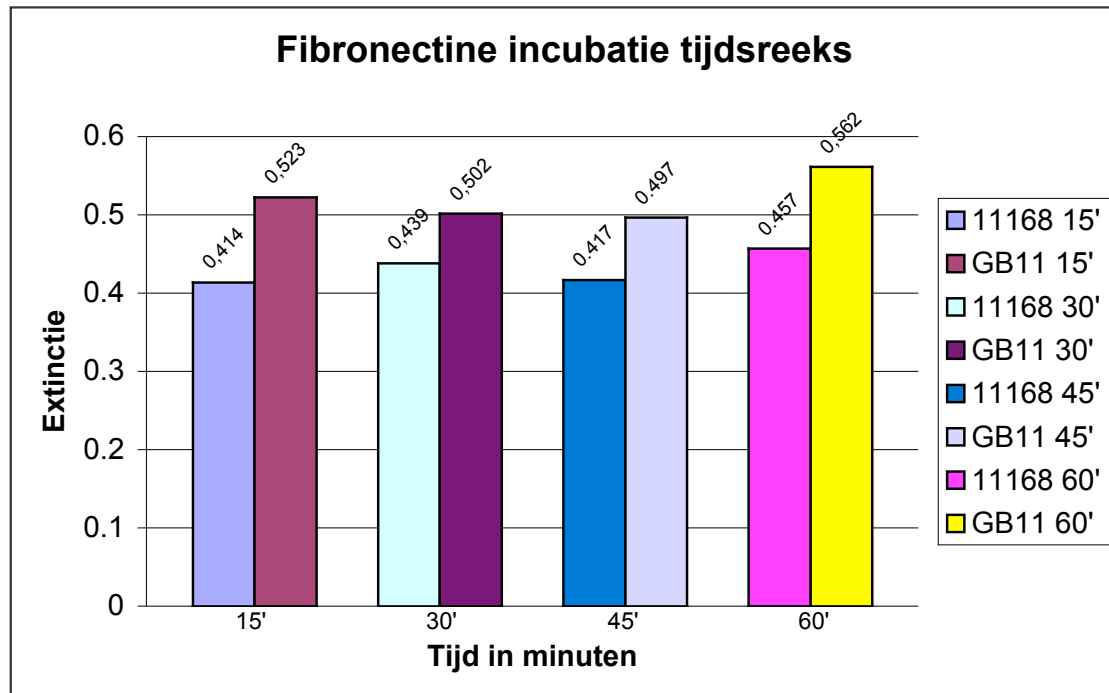


Grafiek 2: Fibronectine concentratie bepaling

Uit de grafiek is op te maken dat een hogere concentratie fibronectine niet zorgt voor een grotere binding aan *C. jejuni*. De verwachting was dat er kinetiek te zien zou zijn in de fibronectine binding, op die manier kan de concentratie zo gekozen worden dat er geen overmaat aan fibronectine wordt toegevoegd. *C. jejuni* lijkt al verzadigd te zijn bij een concentratie van 5 $\mu\text{g/ml}$ fibronectine. Daarom is gekozen om de fibronectine ELISA uit te voeren met een concentratie van 5 $\mu\text{g/ml}$ fibronectine, lagere concentraties zouden door het doorverdunnen te onnauwkeurig worden.

-Fibronectine incubatietijd bepaling-

De bepaling van de optimale incubatietijd met fibronectine is gedaan met de stammen 11168 en GB11 en is uitgevoerd in triplo. Per bepaling is een triplo controle meegenomen zonder primair antilichaam en een duplo controle met PBS zonder bacteriën. De resultaten van de bepaling zijn te zien in grafiek 3, de data zijn te zien in bijlage 3.



Grafiek 3: Fibronectine incubatie tijdsreeks

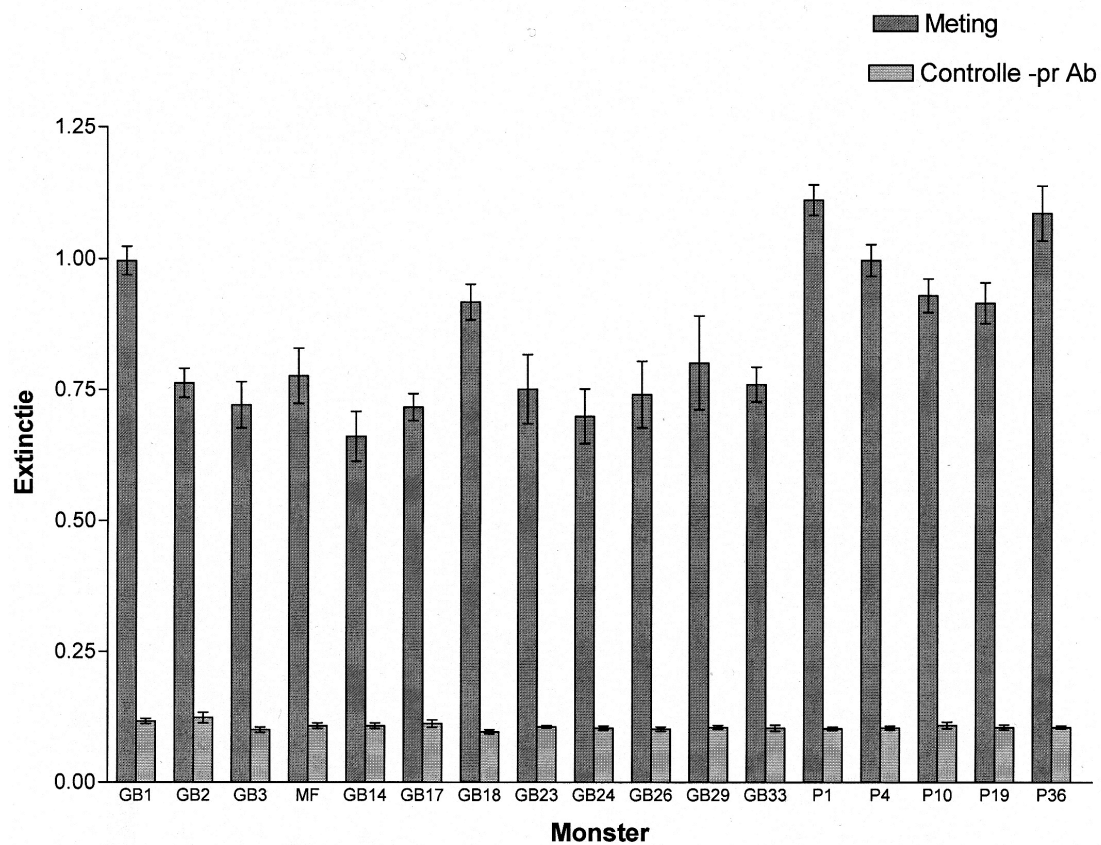
In de grafiek zijn geen grote verschillen zichtbaar tussen de verschillende incubatietijden. Na 15 minuten lijkt *C. jejuni* al volledig te zijn gebonden aan fibronectine. Ook hier is geen kinetiek te zien tussen de incubatietijd en de fibronectine binding. Omdat de incubatietijd van de antilichamen 60 minuten is, is er voor gekozen om de incubatietijd met fibronectine ook op 60 minuten te zetten, dit om de incubatietijden door het protocol heen gelijk te houden.

-Fibronectine binding van *C. jejuni*-

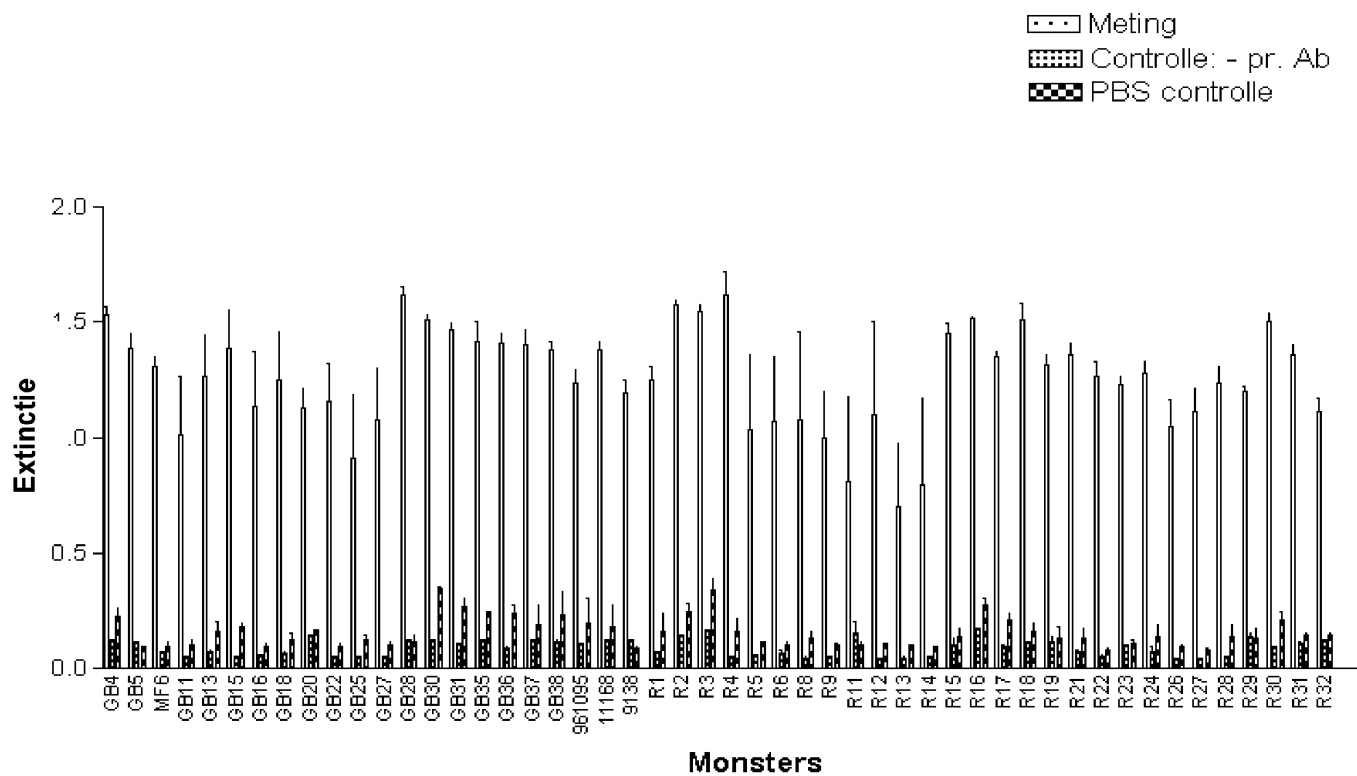
Met behulp van de voorgaande proeven kan het protocol voor de fibronectine ELISA opgemaakt worden. Hierbij gebruiken we de volgende condities:

- Platen geïncubeerd met hitte geïnactiverde en gedroogde cellen.
- Een fibronectine concentratie van 5 µg/ml.
- Een incubatietijd met fibronectine van 60 minuten.

Om te bepalen of onder invloed van *cj1349* de affiniteit voor fibronectine van *C. jejuni* GBS stammen groter is dan die van enteritis stammen zijn er een groot aantal stammen door middel van deze ELISA getest. De ELISA is in 2 keer uitgevoerd, deze gegevens zijn niet bij elkaar in één grafiek gezet. De ELISA is een methode omdat beide niet even lang zijn geïncubeerd met TMB, hierdoor zijn deze waarden niet met elkaar te vergelijken. De resultaten van hiervan zijn te zien in grafiek 4 en 5, de data is te zien in bijlage 3.



Grafiek 4: Fibronectine ELISA 1



Grafiek 5: Fibronectine ELISA 2

3.4 -Conclusie & discussie-

-Conclusie-

Met behulp van drie experimenten hebben we kunnen vaststellen wat voor de fibronectine ELISA de optimale omstandigheden zijn om deze uit te voeren. Daarin zijn we op grond van deze experimenten en het aanwezige materiaal tot de volgende condities gekomen.

- Voor coating wordt gebruik gemaakt van hitte geïnactiveerde en gedroogde *C. jejuni*.
- Een fibronectine concentratie van 5 µg/ml wordt gebruikt
- Er wordt 60 minuten geïncubeerd met fibronectine.

Met deze condities kon de fibronectine ELISA gebruikt worden voor het onderzoek naar eventuele verhoogde affiniteit van *C. jejuni* GBS stammen voor fibronectine. Hiervoor zijn een groot aantal GBS en enteritis stammen met behulp van de ELISA getest op hun binding aan fibronectine. Uit deze ELISA's is gebleken dat er geen significant verschil bestaat tussen de affiniteit voor fibronectine van *C. jejuni* GBS stammen en enteritis stammen.

-Discussie-

Bij de bepaling van de fibronectine concentratie en de incubatietijd met fibronectine zijn geen duidelijke verschillen naar voren gekomen. Hier is uit af te leiden dat *C. jejuni* in korte tijd al aan lage concentraties fibronectine kan binden. Doordat *C. jejuni* al bij een lage concentratie fibronectine verzadigt lijkt te zijn is het niet mogelijk te bepalen hoe groot de overmaat is aan fibronectine die wordt toegevoegd. Als een overmaat fibronectine wordt toegevoegd zullen cellen die minder affiniteit voor fibronectine hebben door de grote hoeveelheid sneller geneigd zijn om te binden, hierdoor wordt het moeilijk om een verschil aan te tonen in affiniteit voor fibronectine. Er is echter toch gekozen om de concentratie fibronectine niet verder te verlagen om de concentraties werkbaar te houden. Dit geldt ook voor de tijdscurve van fibronectine binding, *C. jejuni* is bij een concentratie 5 µg/ml in staat fibronectine zeer snel aan zich te binden. Omdat een zeer korte incubatietijd niet praktisch is werd er in dit geval gekozen om 60 minuten te incuberen, dit om de incubatietijden in het protocol uniform te houden.

Uit de ELISA blijkt dat met deze methode het niet mogelijk is om aan te tonen dat *C. jejuni* GBS stammen door de verhoogde expressie van het *cj1349* gen een grotere affiniteit hebben dan enteritis stammen. Een veel beschreven fibronectine bindend eiwit in *C. jejuni* is CadF, als dit eiwit, in verhouding met het eiwit waar *Cj1349* voor codeert, veelvuldig aanwezig is in *C. jejuni* kan het zijn de invloed van *Cj1349* niet meetbaar is. De invloed van CadF kan geëlimineerd worden door de ELISA uit te voeren op *C. jejuni* CadF knockout mutanten of door het blokkeren van de CadF. Echter als *Cj1349* maar een zeer geringe invloed heeft op de affiniteit van *C. jejuni* voor fibronectine in welke mate kan een verhoogde expressie van dit gen dan bijdragen in bijvoorbeeld een betere invasie van het darmepitheel?

In het lichaam zouden vele vormen fibronectine voor kunnen komen, als het fibronectine (fibronectin from human plasma) wat voor deze ELISA is gebruikt niet aan het eiwit bindt waar *Cj1349* voor codeert is het niet mogelijk aan te tonen of *C. jejuni* GBS stammen een verhoogde affiniteit hebben voor fibronectine. Door *Cj1349* tot expressie te brengen en een ELISA uit te voeren op het eiwitproduct hiervan kan worden onderzocht of dit eiwit daadwerkelijk fibronectine bindt en welke vorm fibronectine het bindt. Een ELISA gedaan met fibronectine afkomstig uit diverse weefsels of cellen, zoals uit het darmepitheel, monocyten, macrofagen, T-cellen en uit de milt, zou aan kunnen tonen voor welke fibronectine typen *C. jejuni* GB onder invloed van het *Cj1349* gen een verhoogde affiniteit hebben. Helaas zijn deze materialen niet voorhanden.

Cj1349 vertoont homologie met een gen dat codeert voor een fibronectine bindend eiwit. Dit wil echter niet zeggen dat het eiwit waar *Cj 1349* voor codeert ook daadwerkelijk deze functie heeft in *C. jejuni*. Dit zou onderzocht kunnen worden door *Cj1349* in een vector te plaatsen en tot expressie te brengen, met het eiwit product kan onderzocht worden of het een fibronectine bindende functie heeft.

4 -Referenties-

-Literatuur-

1. RIVM, *Campylobacter* www.rivm.nl/cib/infectieziekten/, 2007. **A04.5**.
2. L. Doornbos, N.M.K., C.L. Jansen, J.A.E.M. Mutsaers, *Bacteriologie voor laboratorium en kliniek* 2. 2001. **4e druk**: p. 246-251.
3. C.W. Ang, P.C.R.G., H.Ph. Endtz, *Het syndroom van Guillain-Barré na infectie met Campylobacter jejuni*. Infectieziekten bulletin, 2003. **jaargang 14** (nummer 8): p. 285-288.
4. R. van Koningsveld, P.A.v.D., P.I.M. Schmitz, C.W. Ang, F.G.A. van der Meche, *Mild forms of Guillain-Barré syndrome in an epidemiologic survey in the Netherlands*. Neurology, 2000. **54**(3): p. 620-625.
5. Peggy C.R. Godschalk, A.P.H., Michel Gilbert, Tomoko Komagamine, C. Wim Ang, Jobine Glerum, Denis Brochu, Jianjun Li, Nobuhiro Yuki, Bart C. Jacobs, Alex van Belkum, Hubert P. Endtz, *The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**: p. 1659-1665.
6. Graig T. Parker, S.T.H., Michel Gilbert, William G. Miller, David L. Woodward, Robert E. Mandrell, *Comparison of Campylobacter jejuni Lipooligosaccharide biosynthesis Loci from a variety of sources*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(6): p. 2271-2281.
7. A.V. Karlyshev, B.W.W., *Development and application of an insertional system for gene delivery and expression in Campylobacter Jejuni*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**(7): p. 4004-4013.
8. Daiva Dailidienė, G.D., Dangeruta Kersulyte, Douglas E. Berg, *Constraselectable Streptomycin susceptibility determinant for genenitc manipulation and analysis of Helicobacter pylori*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(9): p. 5908-5914.
9. Michael E. Konkel, J.E.C., Amy M. Keech, Marshall R. Monteville_, John D. Klenna_, Steve G. Garvis, *Identification of a fibronectin-binding domain within the Campylobacter jejuni CadF protein*. Molecular Microbiology, 2005. **57**(4): p. 1022-1035.
10. Lodish, B., Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell, *Molecular cell biology*. 2003(5): p. 220-223.

-Afbeeldingen-

1. <http://www.mcg.edu>: <http://www.mcg.edu/bmb/thompson/C.jejuni.jpg>
2007 **Bewerkt door Hans Verhoog**
2. Hans Verhoog – Erasmus MC 2007
3. C.W. Ang, P.C.R.G., H.Ph. Endtz, *Het syndroom van Guillain-Barré na infectie met Campylobacter jejuni*. Infectieziekten bulletin, 2003.
4. C.W. Ang, P.C.R.G., H.Ph. Endtz, *Het syndroom van Guillain-Barré na infectie met Campylobacter jejuni*. Infectieziekten bulletin, 2003.
5. Peggy C.R. Godschalk, A.P.H., Michel Gilbert, Tomoko Komagamine, C. Wim Ang, Jobine Glerum, Denis Brochu, Jianjun Li, Nobuhiro Yuki, Bart C. Jacobs, Alex van Belkum, Hubert P. Endtz, *The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**: p. 1659-1665.
6. Graig T. Parker, S.T.H., Michel Gilbert, William G. Miller, David L. Woodward, Robert E. Mandrell, *Comparison of Campylobacter jejuni Lipooligosaccharide biosynthesis Loci from a variety of sources*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(6): p. 2271-2281.
7. Peggy C.R. Godschalk, A.P.H., Michel Gilbert, Tomoko Komagamine, C. Wim Ang, Jobine Glerum, Denis Brochu, Jianjun Li, Nobuhiro Yuki, Bart C. Jacobs, Alex van Belkum, Hubert P. Endtz, *The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré*. The Journal of clinical investigation, 2004. **114**: p. 1659-1665. **Bewerkt door Hans Verhoog**
8. Hans Verhoog - 2007
9. Hans Verhoog - 2007
10. Hans Verhoog - 2007
11. Hans Verhoog – Erasmus MC 2007
12. Hans Verhoog – Erasmus MC 2007
13. Hans Verhoog – Erasmus MC 2007
14. Hans Verhoog – Erasmus MC 2007
15. Hans Verhoog – Erasmus MC 2007
16. www.nature.com:
<http://www.nature.com/emboj/journal/v20/n7/images/7593655f1.jpg>
2007
17. Hans Verhoog – 2007

-Bijlagen-

1 -Gebruikte primers-

Nr.	Datum	Omschrijving	Sequentie	Organisme
1496	24/07/03	comp.B.f	cgcggatcccttctattgcccttgctat	Campylobacter
1555	22/09/03	comp.CstII.B.r	cgcggatcccctatttcaggcacgactaa	Campylobacter
2270	10/11/06	AK231	ctggaactcaactgacgctaag	Campylobacter
2271	10/11/06	AK232	ctcttgacattgcagtcctac	Campylobacter
2280	23/11/06	pAV35-mcs f	ctgctcggcgggtgttcctt	Campylobacter
2281	23/11/06	pAV35-mcs-r	ctgcgccctttagttcctaaa	Campylobacter
2282	23/11/06	PAV35 fusie XbaI/BAM	Cttgctacacagttttcataaggatc ctctagaactgaaaccttttcgagtatttgg	Campylobacter
2283	23/11/06	PAV35 fusie XbaI/BAM	Ccaaatactcgaaaagggttcagttctag aggatccttatgaaaaactgtgtagcaag	Campylobacter
2291	21/12/06	cstII-seq1-fw	tttgaagataaatactatcttgg	campylobacter
2292	21/12/06	cstII-seq1-rv	taaatgttttaagtgtagtattgc	campylobacter
2293	21/12/06	cstII-seq2-fw	cacgaaatttattcaatcaaag	campylobacter
2294	21/12/06	cstII-seq2-rv	gataaaaatcaattcccgaag	campylobacter
2295	21/12/06	cstII-seq3-fw	ctatattgcttatgtcctaataag	campylobacter
2296	21/12/06	cstII-seq3-rv	cactagaaggtaggtatgc	campylobacter
2388	28/03/07	Ery-Xba-f	tcctctagagtcgacctgcaggcatgc	Campylobacter
2389	28/03/07	Ery-Xba-r	atatctagatctgcgattcacaaaaaatagg	Campylobacter

2 -ELISA Protocol-

-Fibronectin ELISA

- Nunc Maxisorp ELISA plates
- Overnight *Campylobacter* culture
- PBS
- PBS + 2mM Ca and Mg
- PBS + 1% BSA
- PBS + 0,05% Tween
- Fibronectin 5 µg/ml in PBS + 2mM CaCl₂ and 2mM MgCl₂
- Rabbit anti fibronectin 1:5000 in PBS + 1% BSA
- Goat anti rabbit 1:5000 in PBS + 1% BSA
- TMB (take from fridge after adding secondary antibody)
- TMB buffer (take what you need from fridge after adding secondary antibody)
- 2 M H₂SO₄

Procedure

- Harvest bacteria, wash 1 time with PBS and spin down for 5 minutes at 4000 rpm and dilute till 5x10⁸ cells/ml in PBS + Ca and Mg.
- Heat inactivate the cells for 30' at 56 °C.
- Add 100 µl per well and dry overnight at 37 °C.
- Wash 4 times with 150 µl/well PBS.
- Block 1h at 37 °C with 150 µl/well PBS + 1% BSA.
- Wash 4 times with 150 µl/well PBS.
- Add 100 µl/well fibronectin and incubate 1h at 37 °C.
- Wash 4 times with 150 µl/well PBS + 0,05% Tween.
- Add 100 µl/well rabbit anti fibronectin 1:5000 and incubate at 37 °C.
- Wash 4 times with 150 µl/well PBS + 0,05% Tween.
- Add 100 µl/well goat anti rabbit 1:5000 and incubate at 37 °C.
- After adding the goat anti rabbit take TMB from fridge, wrap in tinfoil and thaw. Take TMB buffer and adjust to room temperature.
- Wash 4 times with 150 µl/well PBS + 0,05% Tween.
- Dilute 1 aliquot of TMB (1,3 ml) in 11,7 ml room temperature TMB buffer.
- Add 100 µl/well diluted TMB.
- Stop the reaction by adding 100 µl/well 2 M H₂SO₄. (after about 2 to 3 minutes)
- Measure OD at 450 nm.

3 -Data fibronectine ELISA-

-ELISA plaat coating-

Living				
	monsters	monster -pr ab	neg controle	
	0.237	0.066	0.031	0.029
	0.211	0.067	0.035	0.038
	0.221	0.066	0.032	0.029
	0.228	0.068	0.030	0.032
gem.	0.22425	0.06675	0.032	<=
st. dev.	0.009523	0.000829156	0.002915	<=

Heat inactivated				
	monsters	monster -pr ab	neg controle	
	0.204	0.072	0.078	0.070
	0.193	0.072	0.071	0.070
	0.197	0.073	0.071	0.067
	0.200	0.071	0.070	0.070
gem.	0.1985	0.072	0.070875	<=
st. dev.	0.004031	0.000707107	0.002934	<=

Heat inactivated, dried				
	monsters	monster -pr ab	neg controle	
	0.904	0.092	0.083	0.076
	0.86	0.092	0.078	0.074
	0.782	0.091	0.075	0.074
	0.836	0.089	0.08	0.078
gem.	0.8455	0.091	0.07725	<=
st. dev.	0.044031	0.001224745	0.002947	<=

-Optimale fibronectine concentratie bepaling-

Fibronectine conc. ug/ml	0	5	10	20	30	40	50
	0.106	0.732	0.627	0.699	0.628	0.565	0.565
	0.097	0.609	0.589	0.533	0.513	0.462	0.466
	0.104	0.506	0.519	0.539	0.493	0.455	0.481
	0.106	0.534	0.521	0.587	0.443	0.442	0.468
gem.	0.103	0.595	0.564	0.590	0.519	0.481	0.495
st. dev.	0.00370	0.08747	0.04601	0.06659	0.06776	0.04902	0.04082

Controle: -prim. Ab.	0	5	10	20	30	40	50
	0.101	0.097	0.1	0.101	0.105	0.104	0.118
	0.087	0.09	0.097	0.094	0.097	0.103	0.102
	0.093	0.086	0.092	0.091	0.093	0.098	0.097
	0.085	0.084	0.085	0.089	0.102	0.091	0.091
gem.	0.092	0.089	0.094	0.094	0.099	0.099	0.102
st. dev.	0.00622	0.00496	0.00567	0.00454	0.00460	0.00514	0.01002

-Fibronectine incubatietijd bepaling-

Incubatie met Fibronectine in min	15	30	45	60
11168	0.424	0.467	0.425	0.482
	0.412	0.426	0.419	0.436
	0.405	0.423	0.407	0.453
Gemiddelde =>	0.414	0.439	0.417	0.457
11168-Pr Ab	0.091	0.093	0.098	0.096
	0.090	0.088	0.091	0.092
	0.086	0.09	0.098	0.092
Gemiddelde =>	0.089	0.090	0.096	0.093
PBS-11168	0.092	0.097	0.085	0.096
	0.087	0.091	0.087	0.096
Gemiddelde =>	0.090	0.094	0.086	0.096
GB11	0.550	0.540	0.521	0.589
	0.512	0.501	0.501	0.547
	0.506	0.464	0.469	0.549
Gemiddelde =>	0.523	0.502	0.497	0.562
GB11-Pr Ab	0.118	0.117	0.115	0.107
	0.111	0.107	0.099	0.109
	0.112	0.105	0.106	0.109
Gemiddelde =>	0.114	0.110	0.107	0.108
PBS-GB11	0.081	0.085	0.087	0.087
	0.087	0.095	0.097	0.092
Gemiddelde =>	0.084	0.090	0.092	0.090

-Fibronectine binding van *C. jejuni*-

-Fibronectine ELISA reeks 1-

Stam =>	GB1	GB2	GB3	MF	GB14	GB17	GB18	GB23	GB24
Meting	1.045	0.814	0.808	0.822	0.753	0.736	0.985	0.822	0.802
	0.951	0.755	0.666	0.719	0.596	0.747	0.881	0.698	0.662
	0.992	0.718	0.687	0.727	0.630	0.664	0.886	0.671	0.631
gem.	0.996	0.762	0.720	0.756	0.660	0.716	0.917	0.730	0.698
Controlle - pr Ab'	0.125	0.141	0.108	0.118	0.115	0.119	0.100	0.108	0.107
	0.114	0.120	0.101	0.103	0.110	0.118	0.099	0.107	0.106
	0.109	0.107	0.090	0.101	0.097	0.097	0.088	0.101	0.095
gem.	0.11600	0.12267	0.09967	0.10733	0.10733	0.11133	0.09567	0.10533	0.10267

Stam =>	GB26	GB29	GB33	P1	P4	P10	P19	P36
Meting	0.858	0.972	0.819	1.167	1.056	0.993	0.990	1.190
	0.723	0.762	0.756	1.094	0.967	0.903	0.896	1.039
	0.639	0.668	0.703	1.072	0.965	0.892	0.859	1.028
gem.	0.740	0.801	0.759	1.111	0.996	0.929	0.915	1.086
Controlle - pr Ab	0.107	0.110	0.114	0.107	0.109	0.116	0.112	0.107
	0.103	0.106	0.099	0.101	0.104	0.113	0.105	0.107
	0.093	0.097	0.095	0.097	0.096	0.096	0.096	0.099
gem.	0.10100	0.10433	0.10267	0.10167	0.10300	0.10833	0.10433	0.10433

-Fibronectine ELISA reeks 2-

	GB4	GB5	MF6	GB11	GB13	GB15	GB16	GB18
Pos.	1.582	1.515	1.394	1.342	1.496	1.496	1.473	1.517
	1.546	1.359	1.277	1.183	1.388	1.388	1.264	1.395
	1.459	1.294	1.254	0.513	0.912	0.912	0.657	0.837
Gem.	1.529	1.389	1.308	1.013	1.265	1.265	1.131	1.250
S.D.	0.05163	0.09274	0.06130	0.35923	0.25370	0.25370	0.34609	0.29602
Neg.	0.124	0.118	0.076	0.048	0.079	0.051	0.057	0.067
	0.126	0.119	0.077	0.048	0.077	0.049	0.060	0.059
	0.122	0.120	0.075	0.050	0.074	0.052	0.060	0.082
Gem.	0.124	0.119	0.076	0.049	0.077	0.051	0.059	0.069
S.D.	0.00163	0.00082	0.00082	0.00094	0.00205	0.00125	0.00141	0.00953
Contr.	0.190	0.098	0.081	0.082	0.201	0.119	0.112	0.154
	0.259	0.089	0.116	0.126	0.122	0.160	0.075	0.101

	GB20	GB22	GB25	GB27	GB28	GB30	GB31	GB35
Pos.	1.277	1.481	1.240	1.361	1.682	1.553	1.521	1.577
	1.133	1.012	1.121	1.228	1.616	1.492	1.438	1.370
	0.983	0.976	0.368	0.637	1.563	1.479	1.450	1.308
Gem.	1.131	1.156	0.910	1.075	1.620	1.508	1.470	1.418
S.D.	0.12003	0.23004	0.38608	0.31467	0.04868	0.03226	0.03663	0.11501
Neg.	0.145	0.048	0.050	0.049	0.121	0.129	0.107	0.124
	0.145	0.049	0.048	0.048	0.125	0.124	0.112	0.119
	0.137	0.052	0.049	0.049	0.122	0.124	0.114	0.120
Gem.	0.142	0.050	0.049	0.049	0.123	0.126	0.111	0.121
S.D.	0.00377	0.00170	0.00082	0.00047	0.00170	0.00236	0.00294	0.00216
Contr.	0.165	0.09	0.103	0.086	0.094	0.341	0.224	0.249
	0.165	0.106	0.148	0.116	0.142	0.352	0.308	0.243

	GB36	GB37	GB38	961095	11168	9138
Pos.	1.479	1.448	1.451	1.366	1.456	1.298
	1.423	1.483	1.373	1.242	1.362	1.194
	1.318	1.283	1.318	1.135	1.317	1.079
Gem.	1.407	1.405	1.381	1.248	1.378	1.190
S.D.	0.06673	0.08721	0.05457	0.09439	0.05791	0.08944
Neg.	0.077	0.124	0.123	0.105	0.130	0.127
	0.090	0.114	0.120	0.109	0.123	0.114
	0.094	0.129	0.118	0.111	0.113	0.125
Gem.	0.087	0.122	0.120	0.108	0.122	0.122
S.D.	0.00726	0.00624	0.00205	0.00249	0.00698	0.00572
Contr.	0.202	0.096	0.139	0.082	0.096	0.089
	0.277	0.276	0.330	0.307	0.274	0.093

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R8	R9
Pos.	1.36	1.60	1.48	1.76	1.58	1.60	1.49	1.39
	1.21	1.53	1.59	1.67	1.08	0.97	1.43	0.90
	1.18	1.60	1.56	1.43	0.44	0.63	0.31	0.70
Gem.	1.25	1.58	1.54	1.62	1.03	1.07	1.08	1.00
S.D.	0.07915	0.03206	0.04825	0.13893	0.46452	0.40242	0.54441	0.28703
Neg.	0.076	0.142	0.166	0.051	0.064	0.062	0.047	0.049
	0.077	0.143	0.166	0.054	0.054	0.055	0.047	0.049
	0.073	0.143	0.163	0.053	0.060	0.091	0.049	0.051
Gem.	0.075	0.143	0.165	0.053	0.059	0.069	0.048	0.050
S.D.	0.00170	0.00047	0.00141	0.00125	0.00411	0.01558	0.00094	0.00094
Contr.	0.088	0.218	0.292	0.105	0.120	0.119	0.159	0.095
	0.238	0.282	0.349	0.220	0.113	0.092	0.103	0.111

	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18
Pos.	1.524	1.744	1.251	1.437	1.537	1.529	1.391	1.635
	0.623	1.194	0.492	0.823	1.389	1.505	1.335	1.508
	0.289	0.353	0.356	0.134	1.433	1.509	1.319	1.389
Gem.	0.812	1.097	0.700	0.798	1.453	1.514	1.348	1.511
S.D.	0.52160	0.57200	0.39379	0.53224	0.06205	0.01050	0.03087	0.10045
Neg.	0.212	0.045	0.048	0.048	0.137	0.172	0.095	0.116
	0.201	0.044	0.046	0.052	0.051	0.171	0.102	0.117
	0.051	0.047	0.049	0.047	0.125	0.176	0.097	0.118
Gem.	0.155	0.045	0.048	0.049	0.104	0.173	0.098	0.117
S.D.	0.07344	0.00125	0.00125	0.00216	0.03803	0.00216	0.00294	0.00082
Contr.	0.090	0.110	0.096	0.088	0.105	0.257	0.176	0.123
	0.116	0.108	0.104	0.095	0.176	0.301	0.241	0.197

	R19	R21	R22	R23	R24	R26	R27	R28
Pos.	1.394	1.462	1.391	1.301	1.379	1.222	1.280	1.385
	1.314	1.326	1.228	1.220	1.259	1.090	1.133	1.177
	1.245	1.279	1.184	1.160	1.190	0.843	0.937	1.146
Gem.	1.318	1.356	1.268	1.227	1.276	1.052	1.117	1.236
S.D.	0.06088	0.07760	0.08904	0.05778	0.07809	0.15708	0.14050	0.10612
Neg.	0.138	0.087	0.062	0.098	0.115	0.045	0.048	0.047
	0.076	0.067	0.048	0.099	0.047	0.047	0.045	0.052
	0.142	0.069	0.052	0.100	0.056	0.047	0.046	0.048
Gem.	0.119	0.074	0.054	0.099	0.073	0.046	0.046	0.049
S.D.	0.03021	0.00899	0.00589	0.00082	0.03016	0.00094	0.00125	0.00216
Contr.	0.083	0.082	0.077	0.097	0.085	0.105	0.091	0.192
	0.179	0.178	0.087	0.122	0.190	0.083	0.067	0.081

	R29	R30	R31	R32
Pos.	1.250	1.559	1.441	1.221
	1.179	1.515	1.328	1.098
	1.166	1.445	1.311	1.025
Gem.	1.198	1.506	1.360	1.115
S.D.	0.03692	0.04694	0.05769	0.08088
Neg.	0.144	0.096	0.122	0.123
	0.114	0.093	0.102	0.121
	0.162	0.096	0.108	0.124
Gem.	0.140	0.095	0.111	0.123
S.D.	0.01980	0.00141	0.00838	0.00125
Contr.	0.093	0.250	0.154	0.154
	0.175	0.178	0.141	0.141