



KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN

FACULTEIT WETENSCHAPPEN

Departement Biologie, Afdeling Moleculaire Fysiologie van Planten
en Micro-Organismen

FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen (M²S), Centrum
voor Moleculaire en Plantengenetica

CONSTRUCTIE EN KARAKTERISATIE VAN *RFAG* MUTANT IN
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG (LGG)

door

Hanne TYTGAT

Promotor: Prof. Dr. J. Winderickx
Co-promotor: Dr. Ir. S. De Keersmaecker
Begeleider: Drs. Ir. I. Claes

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master in de Biochemie & Biotechnologie

Academiejaar 2009-2010

Dit proefschrift is een examenstuk dat na verdediging niet gecorrigeerd werd voor eventueel vastgestelde fouten. Gebruik als referentie in publicaties is toegelaten na inwinning van het advies van de promotor, vermeld op de titelbladzijde.



KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN

FACULTEIT WETENSCHAPPEN

Departement Biologie, Afdeling Moleculaire Fysiologie van Planten
en Micro-Organismen

FACULTEIT BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Departement Microbiële en Moleculaire Systemen (M²S), Centrum
voor Moleculaire en Plantengenetica

CONSTRUCTIE EN KARAKTERISATIE VAN *RFAG* MUTANT IN
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG (LGG)

door

Hanne TYTGAT

Promotor: Prof. Dr. J. Winderickx
Co-promotor: Dr. Ir. S. De Keersmaecker
Begeleider: Drs. Ir. I. Claes

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master in de Biochemie & Biotechnologie

Academiejaar 2009-2010

DANKWOORD

Het maken van dit proefschrift vormde een mooi einde van vijf prachtige studie jaren. Het was een heel leerrijke ervaring om alle theorie om te kunnen zetten in de praktijk en daarbij terecht te komen in een toffe en gepassioneerde groep. Dit werk zou dan ook niet gemaakt kunnen zijn zonder de hulp en steun van enkele mensen, die ik bij deze graag wil bedanken.

Op de eerste plaats wil ik mijn promotoren bedanken, Prof. Dr. Joris Winderickx en Dr. Ir. Sigrid De Keersmaecker. Prof. Winderickx wil ik bedanken voor zijn steun doorheen de afgelopen jaren. Sigrid, bedankt voor je steun, je nooit aflatend enthousiasme, dat je potentieel in me zag, je leerrijke adviezen en tips, de toffe tijd ... voor alles. Verder wil ik Prof. Dr. Ir. Jos Vanderleyden bedanken voor de kans om dit onderzoek uit te voeren in het CMPG, de goede adviezen en de interesse die hij betoonde.

Mijn begeleider, Ingmar, wil ik bedanken voor alle uitleg, hulp, motivatie en advies. Bedankt voor het toffe jaar en de goede samenwerking.

Ik wil bij deze ook het hele CMPG-team bedanken voor de toffe sfeer. In het bijzonder gaat mijn dank uit naar de S&P-groep. Het was heel boeiend om een jaar mee te mogen draaien in jullie midden. Er zijn nog enkele mensen van de groep die ik hier speciaal wil vermelden: Sarah, Tine, Geert en Mariya. Zonder deze mensen was het me nooit gelukt: hun hulp bij experimenten, adviezen en kadering was van heel groot belang voor me. Sarah wil ik nog even extra bedanken voor alle feedback op mijn onderzoek. Ook Jos en André wil ik vermelden voor de technische ondersteuning. Ik wil zeker ook mijn mede-thesisstudenten bedanken voor het leuke jaar.

Verder wil ik ook mijn vrienden bedanken voor de vijf jaar vol onvergetelijke momenten! Bedankt voor de ontspannende avonden, de toffe reisjes, de pokeravonden, de gezellige etentjes... en cafébezoekjes! In het bijzonder wil ik hier Eline, Maarten, Valerie, Pieter, Lies en Jeroen bedanken.

Tenslotte een woord van dank voor mijn ouders. Bedankt voor al jullie geduld en steun gedurende het maken van dit werk en om me de kans te geven te studeren in Leuven en me vijf jaar lang te mogen toelagen op wat me echt boeit. Zonder jullie was ik hier niet geraakt, merci!

Hanne

INHOUDSOPGAVE

DANKWOORD	IV
INHOUDSOPGAVE	V
LIJST VAN FIGUREN	VII
LIJST VAN TABELLEN	VIII
LIJST MET AFKORTINGEN	IX
INLEIDING	1
DEEL I: LITERATUURSTUDIE	2
1 PROBIOTICA	2
1.1 DE MICROBIOTA.....	2
1.2 HET HUMAAN MICROBIOOM.....	2
1.3 PROBIOTICA.....	3
1.4 CRITERIA VAN GORBACH EN GOLDIN.....	4
1.5 <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG.....	6
2 CELOPPERVLAKTESTRUCTUREN VAN LACTOBACILLI	13
2.1 PEPTIDOGLYCAAN.....	14
2.2 TEICHOÏNEZUREN.....	14
2.3 EXOPOLYSACCHARIDEN.....	16
2.4 PROTEÏNEN OP HET CELOPPERVLAK.....	17
2.5 GRAM-POSITIEVE PILI.....	17
3 FOCUS: TEICHOÏNEZUREN	18
3.1 ADHESIE EN ROL IN HET IMMUUNSYSTEEM.....	18
3.2 D-ALANYLATIE VAN LTA.....	20
3.3 GLYCOSYLATIE.....	20
DEEL II: MATERIAAL & METHODEN	22
1 MATERIALEN	22
1.1 BACTERIESTAMMEN.....	22
1.2 PLASMIDEN.....	22
1.3 MEDIA EN MEDIUMADDITIEVEN.....	23
1.4 MOLECULAIRE DNA-METHODEN.....	23

1.5 OVERDRACHT VAN PLASMIDEN.....	26
1.6 EPS-B EXTRACTIE.....	26
1.7 CELWANDPROTEÏNEN.....	26
1.8 BIOFILM EN ADHESIE-EXPERIMENTEN.....	28
1.9 IMMUUNEXPERIMENTEN.....	29
2 METHODEN.....	30
2.1 OPGROEIEN BACTERIESTAMMEN.....	30
2.2 DNA-ANALYSE.....	30
2.3 BIOSCREEN.....	35
2.4 EXTRACTIE VAN CELWANDPOLYSACHARIDEN.....	36
2.5 CELWANDPROTEÏNEN ANALYSE.....	36
2.6 ADHESIE-EXPERIMENTEN.....	39
2.7 <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTEN: PERSISTENTIE IN MUIZEN.....	41
2.8 IMMUUNEXPERIMENTEN.....	42
<u>DEEL III: RESULTATEN.....</u>	<u>44</u>
1 AANMAAK EN SITUERING <i>RFAG</i> MUTANT.....	44
1.1 HET <i>RFAG</i> GEN.....	44
1.2 CONSTRUCTIE VAN EEN <i>RFAG</i> KNOCK-OUT MUTANT.....	44
2 GROEI-EIGENSCHAPPEN VAN DE <i>RFAG</i> MUTANT IN DIVERSE CONDITIES.....	47
3 WAT GLYCOSYLEERT <i>RFAG</i>?.....	50
3.1 ANALYSE VAN DE CW-PS VAN DE <i>RFAG</i> MUTANT.....	50
3.2 MINDER CELWANDPROTEÏNEN BIJ DE <i>RFAG</i> MUTANT?.....	53
4 ROL VAN <i>RFAG</i> IN ADHESIE, BIOFILMVORMING EN PERSISTENTIE.....	55
4.1 BIOFILMVORMING EN ADHESIE.....	55
4.2 EFFECT VAN DE <i>RFAG</i> MUTATIE OP OVERLEVING <i>IN VIVO</i>	57
5 IMMUOMODULATIE: LAGERE IL-8 INDUCTIE DOOR DE <i>RFAG</i> MUTANT.....	60
<u>DEEL IV: DISCUSSIE.....</u>	<u>63</u>
<u>DEEL V: CONCLUSIE.....</u>	<u>68</u>
<u>SAMENVATTING.....</u>	<u>70</u>
<u>SUMMARY.....</u>	<u>71</u>
<u>REFERENTIES.....</u>	<u>72</u>

LIJST VAN FIGUREN

FIGUUR I-1: MECHANISTISCH BEELD VAN PROBIOTISCHE EN ADAPTATIEFUNCTIES VAN LACTOBACILLI.	9
FIGUUR I-2: ARCHITECTUUR VAN HET CELOPPERVLAK VAN LACTOBACILLI EN GRAM-POSITIEVE BACTERIËN.	13
FIGUUR III-1: HOMOLOGE RECOMBINATIE BIJ CONSTRUCTIE VAN <i>RFAG</i> MUTANT.	45
FIGUUR III-2: PRIMERS VOOR AANMAAK EN CONTROLE VAN <i>RFAG</i> MUTANT.	46
FIGUUR III-3: KOLONIE PCR UITGEVOERD MET PRO-2600 EN PRO-2601 OP MUTANTE KOLONIES.....	47
FIGUUR III-4: BIOSCREENDATA VOOR WILD TYPE, <i>YKC/B</i> MUTANT EN <i>RFAG</i> MUTANT.	48
FIGUUR III-5: TOTALE CW-PS SUIKERFRACTIES AANWEZIG BIJ DE VERSCHILLENDE STAMMEN.	51
FIGUUR III-6: MONOMEERANALYSES VAN DE CW-PS VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN.	52
FIGUUR III-7: SYPRO RUBY TOTAL STAIN ANALYSE VAN 1D-SDS-PAGE.	53
FIGUUR III-8: WESTERN BLOTS BEHANDELD MET P75 ANTILICHAAM.	54
FIGUUR III-9: ANAËROBE BIOFILM.	56
FIGUUR III-10: PROCENTUELE ADHESIE VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN AAN CACO-2 CELLEN.....	57
FIGUUR III-11: AANWEZIGHEID VAN DE <i>RFAG</i> MUTANT IN FAECESSTALEN.	59
FIGUUR III-12: COMPETITIEVE INDEX VAN DE <i>RFAG</i> MUTANT IN DE INHOUD VAN HET GIT.	59
FIGUUR III-13: ADHESIE VAN DE <i>RFAG</i> MUTANT AAN GIT WEEFSELS <i>IN VIVO</i>	60
FIGUUR III-14: IL-8 PRODUCTIE ZOALS DEZE GEÏNITIEERD WERD IN CACO-2 CELLEN DOOR VERSCHILLENDE LGG MUTANTEN.	61

LIJST VAN TABELLEN

TABEL II-1: GEBRUIKTE BACTERIESTAMMEN.	22
TABEL II-2: GEBRUIKTE PLASMIDEN.	22
TABEL II-3: GROEIMEDIA AANGEWEND VOOR DE VERSCHILLENDE STAMMEN.	23
TABEL II-4: ANTIBIOTICA DIE TOEGEVOEGD WERDEN AAN DE MEDIA VOOR SELECTIEVE GROEI.....	23
TABEL II-5: BENODIGDE BUFFERS VOOR DNA-GELELEKTROFOERERE.	24
TABEL II-6: COMPONENTEN VAN EEN PCR-REACTIE.	24
TABEL II-7: IN DIT WERK GEBRUIKTE PRIMERS.	24
TABEL II-8: DNA-ISOLATIEKITS.	25
TABEL II-9: BENODIGDHEDEN VOOR RESTRICTIE EN LIGATIE VAN DNA.	25
TABEL II-10: GEBRUIKTE COMPETENTE CELLEN.....	26
TABEL II-11: BENODIGDHEDEN VOOR ELEKTROPORATIE VAN PLASMIDEN NAAR LGG.....	26
TABEL II-12: BENODIGDE SUBSTANTIES VOOR EPS-B EXTRACTIE.....	26
TABEL II-13: BENODIGDHEDEN VOOR DE EXTRACTIE VAN CELWANDPROTEÏNEN.....	26
TABEL II-14: BENODIGDHEDEN 1D SDS-PAGE.	27
TABEL II-15: COMPONENTEN REHYDRATATIE-OPLOSSING.	27
TABEL II-16: EQUILIBRATION-OPLOSSING SDS-PAGE.....	27
TABEL II-17: BENODIGDHEDEN WESTERN BLOT.....	28
TABEL II-18: BENODIGDHEDEN VOOR DETECTIE WESTERN BLOT.....	28
TABEL II-19: OPLOSSINGEN NODIG BIJ HET KLEUREN VAN BIOFILMPLATEN.	28
TABEL II-20: MEDIA NODIG VOOR ADHESIE-EXPERIMENTEN MET CACO-2 CELLEN.	29
TABEL II-21: BENODIGDHEDEN VOOR ISOLATIE VAN RNA UIT CACO-2 CELLEN EN AANMAAK VAN cDNA.....	29
TABEL II-22: SAMENSTELLING PCR-REACTIEMENGSELS.	32
TABEL II-23: GETESTE CONDITIES IN BIOSCREENANALYSE.	35
TABEL II-24: RUNPROTOCOL ISO-ELEKTRISCHE FOCUSING.....	38
TABEL II-25: GETESTE CONDITIES IN DE BIOFILMASSAY.....	40

LIJST MET AFKORTINGEN

A.D.	Aqua Distillata
Ap	Ampicilline
AP	Alkalisch Fosfatase
BCIP	Bromochoro-indolyfosfaat
BSA	Bovine Serum Albumine
CFU	‘Colony Forming Units’
CW-PS	Celwandpolysachariden
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
EPS	Exopolysachariden
Ery	Erythromycine
GALT	‘Gut Associated Lymphoid Tissue’
GIT	‘Gastrointestinal Tract’
GRAS	‘Generally Recognized As Safe’
IBD	‘Inflammatory Bowel Disease’
LB	Luria-Bertani
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LRR	‘Leucine Rich Repeats’
LTA	‘Lipoteichoic Acid’
MRS	de Man-Ragosa-Sharpe
mTSB	modified Tryptic Soy Broth
NBT	Nitroblue-tetrazolium
MAMP	‘Microorganism-Associated Molecular Patterns’
PBS	‘Phosphate Buffered Saline’
PG	Peptidoglycaan
PMF	‘Proton Motive Force’
PRR	‘Pattern Recognition Receptor’
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
RV	Reactievolume
SDP	‘Sortase-Dependent Proteins’
TA	‘Teichoic Acid’
Tc	Tetracycline
TCA	Trichloroacetaat
TLR	‘Toll Like Receptor’
(T)TBS	(‘Tween’) ‘Tris Buffered Saline’
WTA	‘Wall Teichoic Acid’

INLEIDING

Micro-organismen worden door het overgrote deel van de mensen vooral geassocieerd met negatieve aspecten, zoals het ontstaan van allerlei ziektes. Vroeger bestond er dan ook een grote scepsis rond het gebruik van bepaalde soorten micro-organismen in voedsel en andere gezonde applicaties. Meer en meer groeit het besef dat bepaalde bacteriën een gunstig effect kunnen uitoefenen op de menselijke fysiologie.

Probiotica worden gedefinieerd als bacteriën die een positief effect kunnen uitoefenen op hun gastheer. Probiotica zouden in de toekomst een grote rol kunnen spelen in de behandeling en het voorkomen van een hele rits immuunziekten, allergieën en darmaandoeningen, zoals ‘Inflammatory Bowel Diseases’ (IBD).

Op dit moment is het inschakelen van probiotische bacteriën ter preventie en genezing van deze ziekten echter nog toekomstmuziek. Tegenwoordig worden er al verschillende probiotica toegevoegd aan voedingsmiddelen en wordt er geclaimd dat deze een gunstig effect uitoefenen op het gastro-intestinaal kanaal (GIT). Deze claims dienen echter met de nodige omzichtigheid benaderd te worden. Op dit moment is er namelijk nog geen sluitend antwoord hoe probiotica werken en welke moleculaire mechanismen precies verantwoordelijk zijn voor de gunstige effecten ervan.

De dag van vandaag worden er verschillende stammen aangewend als probiotica, met elk hun eigen specifieke voordelen en toepassingen. Gorbach en Goldin zijn op zoek gegaan naar de meest geschikte probiotische bacterie en de stam *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) werd door hen het meest geschikt bevonden. Wereldwijd zijn wetenschappers LGG en andere stammen aan het onderzoeken om de fundamentele werking van probiotica te achterhalen. Naast LGG worden onder andere ook *L. casei* Shirota, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium breve* en *B. longum* veel bestudeerd.

Om te achterhalen wat nu precies de oorzaak is van de gunstige effecten die probiotica met zich mee brengen, moet waarschijnlijk gekeken worden naar mediators op het oppervlak van de bacteriën of moleculen die door de micro-organismen worden vrijgezet in het extracellulair milieu. Bacteriën moeten in staat zijn om te interageren met de epitheelcellen van het GIT of met andere componenten, zoals dendritische cellen, aanwezig in het GIT om een modulerend effect uit te oefenen op het immuunsysteem. Vandaar dat de celwand en secretie-producten de meest interessante kandidaten zijn voor verder onderzoek.

In het CMPG-labo wordt meegewerkt aan het achterhalen van de rol van de verschillende oppervlaktmoleculen in de functionaliteit van probiotische bacteriën. Eén van de manieren waarop dit vraagstuk aangepakt wordt, is het aanmaken van verschillende mutanten, waarbij telkens een gen uitgeschakeld wordt dat mogelijk verband houdt met de moleculaire basis van de gunstige probiotische effecten. Deze thesis kadert in dit onderzoek en er werd een nieuwe mutant aangemaakt en partieel gekarakteriseerd.

DEEL I: LITERATUURSTUDIE

1 PROBIOTICA

1.1 DE MICROBIOTA

Doorheen de jaren is het duidelijk geworden dat de mens in nauw contact leeft met duizenden bacteriën. Deze micro-organismen zijn overal in het lichaam terug te vinden: van de longen, over het gastro-intestinaal kanaal, tot de huid. Het merendeel situeert zich in het verteringsstelsel: microbiota of darmflora. Zowel autochtone – aanwezig vanaf de geboorte – als allochtone – via de voeding opgenomen – bacteriën resideren in het gastro-intestinaal kanaal en vervullen er belangrijke functies (Walter, 2005).

Aandoeningen van het gastro-intestinaal kanaal zijn vaak de oorzaak van ernstige medische klachten bij patiënten. Wetenschappers begonnen dan ook te onderzoeken of er een link is tussen deze aandoeningen en de microbiële bewoners van de menselijke darmmicrobiota. Er werd vastgesteld dat een verstoring van het natuurlijk evenwicht in de samenstelling van de microbiota aan de basis ligt van enkele darmziektes, zoals ‘Inflammatory Bowel Diseases’ (IBD) (Dunne & Shanahan, 2002).

De organismen van de darmflora leven in nauw contact met de gastheer: ze resideren op de epitheelcellen van de darmwand. De bacteriën zijn er ideaal gesitueerd om nutriënten op te nemen uit het lumen van de darm en kunnen in veel gevallen onverteerbare vezels omzetten in bruikbare nutriënten voor de menselijke gastheer. De microbiota vervult dus verschillende taken die noodzakelijk zijn voor de menselijke fysiologie. Een evenwichtige darmflora blijkt dan ook van groot belang te zijn voor het welzijn van de mens (Shanahan, 2004a).

De microbiota voert ook meer gespecialiseerde taken uit: ze beschermt de mens tegen infiltratie van pathogenen, speelt een rol in reacties van het immuunsysteem en in de regulatie van vetopslag en stimuleert bovendien angiogenese in de ingewanden (Bäckhed *et al.*, 2005). Deze plethora aan functies is echter moeilijk te bestuderen, aangezien er in de microbiota een grote diversiteit aan micro-organismen terug te vinden is. Het is een uitdaging om te bepalen welke rol de verschillende soorten micro-organismen precies spelen in de fysiologie van de gastheer. Bovendien verschilt de samenstelling van de microbiota van mens tot mens (Lebeer *et al.*, 2008b).

1.2 HET HUMAAN MICROBIOOM

Een microbioom kan gedefinieerd worden als de verzameling van alle micro-organismen binnen een bepaald domein. Het humaan microbioom groepeerde alle bacteriën aanwezig in de verschillende niches van het menselijk lichaam. Het humaan microbioom bevat enorme

aantallen bacteriën: het gastro-intestinaal kanaal alleen al telt er 10^{14} (Preidis & Versalovic, 2009).

De hoogste dichtheid is terug te vinden in het colon. Daar resideren tot 10^{12} cellen per gram: de microbiota. In de darmflora kunnen tot 500 verschillende soorten bacteriën teruggevonden worden. De voornaamste vertegenwoordigers in het gastro-intestinaal kanaal zijn leden van de genera *Bacteriodes* en *Firmicutes*. Dit laatste genus bevat Gram-positieve micro-organismen, met als belangrijkste species *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* en *Staphylococcus* (Kleerebezem & Vaughan, 2009).

Een baby wordt geboren zonder darmflora, maar het gastro-intestinaal kanaal wordt al snel gekoloniseerd door micro-organismen. Tijdens de geboorte al komt de baby voor de eerste keer in contact met bacteriën in de vagina en faeces van de moeder. Via verticale transmissie van moeder naar kind komen de eerste micro-organismen in het lege gastro-intestinaal kanaal terecht. Deze kolonisatie is van groot belang voor de ontwikkeling van het lymfweefsel dat geassocieerd is met het gastro-intestinaal kanaal: het zogenaamde ‘Gut Associated Lymphoid Tissue’ systeem (GALT), wat een belangrijk onderdeel is van de immunologische signaalwegen in de mens. Eens de microbiota een staat van homeostase bereikt heeft, tracht het lichaam gedurende de rest van het leven deze te behouden (Mackie *et al.*, 1999).

Het ‘NIH Human Microbiome Project’ is een globaal project dat opgericht werd om wetenschappers van over de hele wereld samen te brengen in een poging om de samenstelling van het humaan microbiom te ontrafelen. De enorme diversiteit en hoeveelheid aan micro-organismen vormde echter een enorme uitdaging. De opkomst van genoom-gebaseerde technologieën en de ontdekking van de soortspecifiteit van 16SrRNA maakte dit soort onderzoek mogelijk (Preidis & Versalovic, 2009).

Het humaan microbiom project hangt nauw samen met de term ‘metagenomics’: het onderzoek van alle genetisch materiaal aanwezig in een bepaalde staalname. Via deze methode kan bepaald worden welke micro-organismen er precies aanwezig zijn in de microbiota. Het doel van het NIH project is om na te gaan of er een ‘Core Human Microbiome’ bestaat dat alle mensen gemeen hebben, ondanks het feit dat elk individu over een uniek microbiom beschikt. Metagenomics kan helpen om tot nog toe onbekende soorten micro-organismen met probiotische eigenschappen te ontdekken (Preidis & Versalovic, 2009).

1.3 PROBIOTICA

Probiotica situeren zich ter hoogte van de microbiota in het gastro-intestinaal kanaal (GIT) en spelen een rol in de homeostase van de microbiota. De meeste probiotica zijn micro-organismen die ook terug te vinden zijn in een gezonde microbiota (Shanahan, 2004a). Probiotica worden omschreven als ‘levende micro-organismen, die, indien ze in voldoende hoeveelheden worden opgenomen, een positief gezondheidseffect hebben op de gastheer’

(FAO/WHO, 2001). Volgens de definitie van de 'World Health Organization' is het dus zo dat endogeen aanwezige bacteriën niet bestempeld worden als probiotica, tenzij ze geïsoleerd, gecultiveerd en toegediend worden aan de gastheer (Kleerebezem & Vaughan, 2009).

Probiotica werden voor het eerst ontdekt door Nobelprijswinnaar Elie Metchnikoff rond 1900. Hij stelde vast dat het innemen van bepaalde micro-organismen positieve gezondheidseffecten kon hebben, vooral dan om gastro-intestinale aandoeningen te behandelen. Metchnikoff legde immers het verband tussen de heel hoge leeftijden van Bulgaarse boeren en hun inname van yoghurt die gezonde bacteriën bevat (Metchnikoff, 1907). Bijna een eeuw later stelde een Britse microbioloog, Roy Fuller, dat deze gezondheidseffecten te wijten waren aan een verbetering van de microbiële balans in het gastro-intestinaal kanaal (Preidis & Versalovic, 2009).

De eigenlijke term probiotica werd in 1965 de eerste keer gebruikt door Lilly en Stillwell om stoffen te beschrijven die door het ene organisme worden gesecreteerd en op die manier de groei van een ander organisme stimuleren (Lilly & Stillwell, 1965). Intussen is de term verder geëvolueerd en meer toegepast op micro-organismen die een positief effect uitoefenen op hun gastheer.

Recent onderzoek suggereert dat probiotica interessante mogelijkheden bieden als alternatieve therapie om darmaandoeningen te behandelen. Op dit moment worden aandoeningen van het gastro-intestinaal kanaal vaak behandeld met antibioticatherapie en irradiatie. Deze klassieke behandelingsmethoden zouden echter de homeostase van de darmmicrobiota verstoren. Probiotica zouden een rol kunnen spelen in het herstel van de homeostase van de microbiota en op die manier alleen of samen met een klassieke behandeling kunnen ingezet worden ter behandeling van verstoringen van het gastro-intestinaal kanaal. Hoewel het probiotisch effect van bacteriën nog steeds ter discussie staat en nog niet sluitend bewezen werd, denken sommige wetenschappers al aan probiotica als middel om ziektes te genezen of te voorkomen (Gupta & Garg, 2009).

Probiotica zijn ook een heel interessante topic voor fundamenteel wetenschappelijk onderzoek, aangezien ze een unieke manier bieden om de interacties tussen de microbiota en de gastheer te onderzoeken. Probiotica leven in symbiose met de epitheelcellen van de darm en gebruiken daarbij gelijkaardige mechanismen als de reeds aanwezige micro-organismen van de darmflora. Vele probiotica zijn bovendien een onderdeel van de natuurlijke microbiota en zijn dus uitermate geschikt om de signaaltransductiewegen en specifieke interacties tussen gastheer en micro-organismen in de darm in kaart te brengen (Shanahan, 2004b).

1.4 CRITERIA VAN GORBACH EN GOLDIN

In vele gevallen wordt voor de ontwikkeling van nieuwe probiotica gekeken naar de aanwezige diversiteit in de microbiota. Dit is een heel accurate methode van werken omdat men op die manier al van in het begin zeker is dat de probiotische bacteriën over alle

eigenschappen beschikken om hun rol uit te oefenen in het gastro-intestinaal kanaal. Probiotische stammen zijn dus veelal stammen die ook terug te vinden zijn in een normale microbiota (Shanahan, 2004b).

In 1985 stelden Gorbach en Goldin, de ontdekkers van *Lactobacillus rhamnosus* GG, een aantal criteria op waaraan de ideale probiotische stam volgens hen moest voldoen, nl.:

- Resistentie tegen maagzuur en galzouten. Probiotica worden vaak oraal ingenomen en moeten de zeer zure maag en de secreties van de gal overleven op hun doortocht naar het colon.
- Adhesie aan epitheelcellen. De bacteriën moeten kunnen interageren met de epitheelcellen van de darmwand. Indien ze niet in staat zijn om te adheren aan de muceuze darmwand worden ze namelijk weggewassen door de voorbijkomende vloeistoffen in het lumen en is hun effect van heel korte duur.
- Tijdelijke kolonisatie van de menselijke ingewanden. De probiotische bacteriën moeten in staat zijn om te overleven in het colon en daar stabiel aanwezig te blijven in grote aantallen. Bovendien kan kolonisatie, samen met adhesie, een belangrijke rol spelen in de competitieve exclusie van pathogenen. Deze kolonisatie is waarschijnlijk geen echte vereiste voor een probiotische stam, maar draagt wel in grote mate bij tot de werking ervan.
- Productie van antimicrobiële substanties. Probiotica zijn in staat om de gastheer te beschermen tegen kolonisatie, o.a. door de productie van antimicrobiële substanties.
- Snelle en voldoende groei. Het is van cruciaal belang dat de stam niet alleen goed overleeft in de darm, maar ook in staat is om er goed en snel te groeien. Zoniet wordt de persistentie van de probiotische stam ernstig in het gedrang gebracht.
- Gunstige effecten op de menselijke gezondheid. Om een probioticum genoemd te worden, moet de stam een positief effect hebben op de toestand van de microbiota en de patiënt. Dit betekent onder andere een voldoende interactie met het immuunsysteem (GALT) en beïnvloeding van de lokale metabole activiteiten.

Gorbach en Goldin ontwikkelden deze criteria tijdens hun zoektocht naar de optimale probiotische *Lactobacillus* stam. Eerder hadden ze namelijk vastgesteld dat de stammen die traditioneel gebruikt werden in de zuivelindustrie (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*) niet geschikt waren als probiotica (Doron *et al.*, 2005).

De meeste van de criteria die ze opgeeft hebben om hun ideale probiotische stam mee te definiëren, gelden echter ook voor pathogenen die de darm willen binnendringen. Pathogenen moeten namelijk ook in staat zijn om te overleven in de extreme condities die heersen in de maag door de lage pH en in de dunne darm door galsecreties, om zich uiteindelijk vast te

kunnen zetten op het darmepitheel. Er is dan ook een analogie te zien tussen factoren die de eigenschappen van probiotica bepalen en virulentiefactoren van pathogenen (Medzhitov, 2007).

Het lijstje met criteria waaraan probiotische stammen moeten voldoen, kan nog uitgebreid worden met enkele punten. De stam in kwestie moet beschikken over het ‘Generally Recognized As Safe’ of GRAS label, vooraleer deze in aanmerking kan komen om toegediend te worden aan patiënten. Dit impliceert dat het niet mag gaan om een stam met pathogene eigenschappen tegenover zijn gastheer, de mens (Gupta & Garg, 2009).

De door Gorbach en Goldin opgestelde criteria postuleren onder andere dat een probiotische stam in staat moet zijn om te overleven in het gastro-intestinaal kanaal, zodat de bacteriën uiteindelijk het darmepitheel kunnen koloniseren. Enkele jaren geleden stelde men echter vast dat componenten van de probiotische cel voldoende kunnen zijn om een significant effect uit te oefenen op de gastheer. CpG DNA fragmenten, korte ongemethyleerde DNA-sequenties in bepaalde bacteriële en virale genomen, blijken voldoende te zijn om het immuunsysteem te activeren (Rachmilewitz *et al.*, 2004).

1.5 LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG

In wat volgt wordt dieper ingegaan op de effecten die probiotica kunnen hebben op de fysiologie van de gastheer en de verschillende functies die ze voor hun rekening nemen in de gastheer. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) wordt beschouwd als een modelorganisme voor probiotica in het algemeen en dit organisme vormt dan ook de rode draad doorheen deze studie. Alle principes en functies hieronder aangehaald zijn ook van toepassing op andere probiotische stammen, maar worden hier geïllustreerd aan de hand van LGG.

1.5.1 BACTERIOLOGIE

Lactobacillus rhamnosus GG is een Gram-positieve, anaërobe, staafvormige melkzuurbacterie. Het is deze stam die door Gorbach en Goldin aanzien werd als de ideale probiotische bacterie en die ze isoleerden uit menselijke faeces. De aanwezigheid van LGG in humane faeces wijst erop dat de stam deel uit maakt van het humaan microbioom, wat impliceert dat deze voldoet aan de criteria voor de ultieme probiotische stam die de twee wetenschappers vooropstelden. LGG kan bijvoorbeeld heel goed adhereren aan epitheelcellen, wat werd getest met behulp van een menselijke epitheelcellijn: Caco-2 cellen. De lijst van gunstige karakteristieken waarover LGG beschikt, is nog veel langer en zal in wat volgt uitgebreid besproken worden. LGG is dan ook de stam die wereldwijd het meest gebruikt wordt om een nieuwe generatie probiotica te ontwikkelen. Andere probiotische stammen beschikken meestal over een groot deel van de opgelijste eigenschappen en worden ook aangewend om nieuwe probiotische middelen aan te maken (Doron *et al.*, 2005).

Probiotische stammen die geïsoleerd worden uit de microbiota bieden vele voordelen voor de wetenschappers: men is namelijk op voorhand al zeker dat de stammen voldoen aan de

gewenste criteria. Dit brengt echter ook enkele problemen met zich mee. Het wordt namelijk heel moeilijk om een onderscheid te maken tussen bacteriën die al aanwezig waren in de darm en deze die toegevoegd werden via de behandeling met probiotica. De uitdaging om een onderscheid tussen beide soorten te maken wordt nog vergroot door de grote variabiliteit tussen de microbiota van verschillende gastheren en de verschillende locaties waar de probiotica kunnen voorkomen in het gastro-intestinaal kanaal (Walter, 2005).

1.5.2 ADAPTATIEFACTOREN

Probiotica doen een beroep op een samenspel van diverse factoren om hun gunstige effecten tot stand te brengen in de gastheer. Deze factoren kunnen onderverdeeld worden in adaptatie- en probiotische factoren (Fig. I-1). Adaptatiefactoren zijn alle eigenschappen van een probiotische stam die er toe bijdragen dat deze zich optimaal kan aanpassen aan een bepaalde niche in de gastheer. Deze factoren hebben op zich geen probiotische functie, maar dienen eerder ter ondersteuning ervan. Deze eigenschappen zijn van belang voor het overleven van de probiotica in het gastro-intestinaal kanaal (GIT): resistentie tegen diverse stressfactoren in het GIT, aanpassing aan de gastheer en adhesie aan het darmepitheel van de gastheer (Lebeer *et al.*, 2008b). Probiotische factoren verzamelen de mechanismen die op een directe manier bijdragen aan de gezondheidseffecten en worden verderop uitgebreid besproken (zie 1.5.3) (Lebeer *et al.*, 2008b).

1.5.2.1 STRESSRESISTENTIE

Het is op de eerste plaats van groot belang dat de micro-organismen heelhuids hun bestemming bereiken, nl. hun niche in de darm. De meeste probiotica worden oraal toegediend en moeten op hun reis doorheen het GIT zowel langs de zure condities van de maag als de galsecreties ter hoogte van de dunne darm. De zure condities in de maag, met pH 1,5 à 3, zijn een grote bron van stress voor de bacteriën aangezien lactobacillen neutrofielen zijn. De 'Proton Motive Force' (PMF) wordt daarom in het gedrang gebracht door de zuurtegraad van de maag. Deze PMF is van primordiaal belang bij het transport van stoffen over het membraan. Als de pH binnenin de probiotische cel ook zou beginnen dalen, kan er ernstige schade toegebracht worden aan de aanwezige enzymen, proteïnen en DNA (van de Guchte *et al.*, 2002).

Een tweede bron van stress zijn de secreties van de galblaas. Deze bestaan voornamelijk uit galzouten en cholesterol. Per dag wordt tot één liter gal gesecreteerd in de dunne darm, waar dit kan optreden als een soort detergent met antimicrobiële werking. Galzouten blijken ook verantwoordelijk te zijn voor het intracellulair verzuren van probiotische cellen. Zowel de maagzuren als de galzouten dreigen dus de interne pH van de probiotische cellen te verzuren en de cellen hebben dan ook stressresistentiemechanismen ontwikkeld. Andere bronnen van stress in het GIT zijn osmotische en oxidatieve stress (van de Guchte *et al.*, 2002). Stressresistentie is een multifactorieel concept, waarin zowel specifieke als aspecifieke

processen een rol spelen. Specifieke mechanismen zijn onder andere gespecialiseerde sensors en exportsystemen. Deze exportsystemen bestaan uit verschillende enzymen en enzysystemen die in staat zijn om de stress veroorzakende factoren – zoals gal, verzurende proteïnen en zuren – uit de cel te verwijderen. Aspecifieke factoren trachten mee de celwand intact te houden, beschadigde proteïnen en DNA te herstellen en DNA te beschermen tegen degradatie. Chaperonnes zijn dus een belangrijk voorbeeld van deze aspecifieke mechanismen om de cellen tegen stress te beschermen (Lebeer *et al.*, 2008b).

1.5.2.2 ADAPTATIE AAN NUTRIËNTEN GASTHEERCONDITIES

Eens de probiotische bacteriën aangekomen zijn op hun bestemming in het GIT, is het belangrijk dat ze hier ook kunnen overleven en persisteren gedurende een langere periode. De bacteriën moeten in staat zijn om de aanwezige voedingsstoffen op te nemen en te metaboliseren: in het GIT zijn vooral eenvoudige suikers terug te vinden. Deze suikers zijn afkomstig uit complexere suikerstructuren die in hogere gelegen delen van het GIT afgebroken werden. Daarnaast is er ook nog een fractie complexe suikerstructuren aanwezig, die voor de gastheer onverteerbaar zijn. Lactobacillen zijn allemaal stammen die over vele suikertransporters beschikken, wat hen in staat stelt om ook complexe suikerstructuren op te nemen. Dit verklaart waarom deze stammen vooral voorkomen in de proximale delen van het GIT (Fisseha & Arigoni, 2005).

In welke mate de lactobacillen in staat zijn om suikers te fermenteren, is bepalend voor hun overleving te midden van andere commensalen in de darm en hun persistentie. Hierin kadert de ontwikkeling van prebiotica: dit zijn onverteerbare voedingscomponenten die positief zijn voor de gastheerfysiologie door de groei en activiteit van bepaalde probiotica te stimuleren in het colon (Delzenne *et al.*, 2003). Samen met probiotica stimuleren ze een gezonde microbiota en bevorderen ze de persistentie van probiotische bacteriën (Lebeer *et al.*, 2008b).

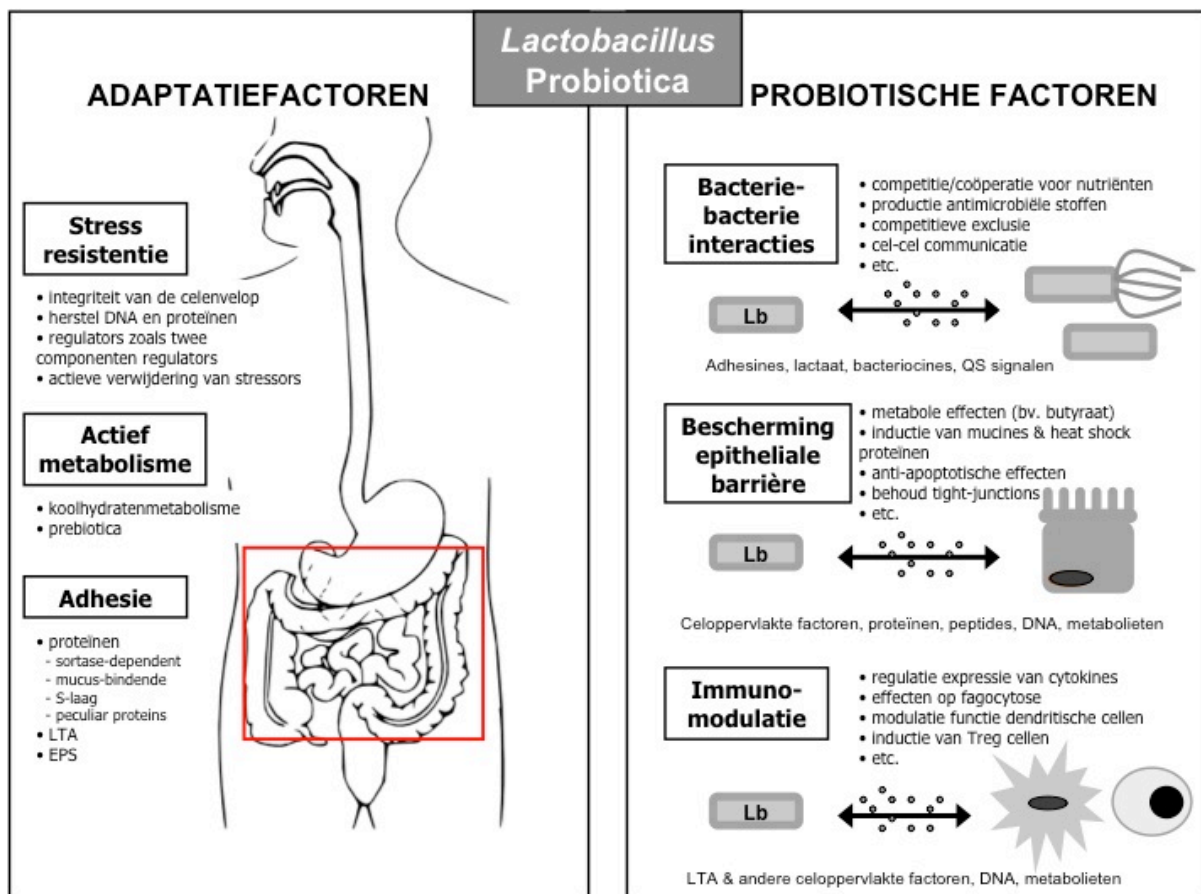
1.5.2.3 ADHESIE

Het is belangrijk dat de probiotische bacteriën kunnen persisteren in de microbiota gedurende een voldoende lange termijn opdat ze gunstige effecten kunnen hebben op de gastheer. Lactobacillen moeten dan ook in staat zijn om goed te adhereren aan het epitheel van de gastheer, zodat ze langer aanwezig kunnen blijven en beter in competitie kunnen treden met pathogenen. Bovendien zorgen probiotica via een sterke interactie met het darmepitheel voor bescherming van de darmwand en kunnen ze op deze manier het immuunsysteem stimuleren (Servin, 2004).

In vivo testen hebben aangetoond dat elke niche in het gastro-intestinaal kanaal bevolkt kan worden door heel specifieke, goed geadapteerde bacteriële stammen. Een gezonde microbiota is dan ook stabiel en resistent tegen kolonisatie door nieuwe, exogene soorten. Dit betekent onder andere dat probiotica maar voor korte tijd aanwezig kunnen blijven in het gastro-intestinaal kanaal voor ze onherroepelijk verwijderd worden. Permanente kolonisatie van het

GIT is enkel mogelijk bij neonatale baby's die nog niet beschikken over een darmflora (Walter, 2005).

De capaciteit om te adhereren aan de epitheliale darmcellen kan *in vitro* getest worden met behulp van epitheelcellijnen, zoals de Caco-2 cellen en door bacteriën te laten binden op mucus en moleculen die deel uitmaken van de extracellulaire matrix. Via deze experimenten bekomen resultaten dienen wel nog steeds bevestigd te worden *in vivo*: men dient namelijk rekening te houden met het afweersysteem van de gastheer en de competitie tussen reeds aanwezige bacteriën en de toegediende probiotica voor nutriënten en ruimte (Perea Vélez *et al.*, 2007b).



FIGUUR I-1: MECHANISTISCH BEELD VAN PROBIOTISCHE EN ADAPTATIEFUNCTIES VAN LACTOBACILLI. Moleculaire studies proberen factoren te identificeren belangrijk in overleving, adaptatie en kolonisatie van de gastheer (adaptatiefactoren) en factoren van belang voor de gezondheidseffecten (probiotische factoren). Aan de rechterzijde zijn de drie grote categorieën te zien waarin deze gezondheidseffecten onderverdeeld worden. (Aangepast volgens Lebeer *et al.*, 2008b)

1.5.3 PROBIOTISCHE FACTOREN

Naast de adaptatiefactoren die de kernfuncties van probiotica ondersteunen, zijn er ook de probiotische factoren: deze dragen rechtstreeks bij aan de gezondheidseffecten die de micro-organismen kunnen uitoefenen. Deze voordelen voor de gezondheid van de gastheer kunnen onderverdeeld worden in drie grote categorieën, die ook worden weergegeven in figuur I-1:

- Inhibitie van pathogenen en herstel van de microbiële homeostase

- Verbetering van de epitheliale barrièrefunctie
- Modulatie van immuunresponsen

De bovenstaande gezondheidseffecten van probiotica zijn heel uiteenlopend en ook heel complexe functies. Het is dan ook niet verwonderlijk dat verschillende probiotische stammen andere effecten hebben op de fysiologie van de gastheer (Lebeer *et al.*, 2008b).

De nood aan moleculaire studies van probiotica is daarom groot: moleculaire studies kunnen de fylogenetische, fenotypische en ecologische diversiteit die aanwezig is binnen de familie van de lactobacillen aan het licht brengen. Deze studies zijn van groot belang om de condities te bepalen die het beste rendement voor een bepaalde probiotische stam opleveren en kunnen de identificatie en selectie van nieuwe probiotische stammen aanzienlijk bevorderen (Kleerebezem *et al.*, 2010).

1.5.3.1 INTERACTIES TUSSEN MICRO-ORGANISMEN

In het GIT kunnen probiotica interageren met andere, reeds aanwezige bacteriën. Dit kunnen zowel pathogenen, als onschadelijke bacteriën zijn. Probiotica zullen er in competitie treden met aanwezige pathogenen en de gastheerfysiologie op die manier gunstig beïnvloeden.

Het feit dat de probiotica gewoon al aanwezig zijn in de microbiota is voor de pathogenen een bedreiging: de bacteriën zullen namelijk in competitie treden voor ruimte en voedsel. Zowel probiotische als pathogene bacteriën consumeren suikercomponenten die aanwezig zijn in de darm. Een hogere vertegenwoordiging van gezonde bacteriën brengt dus onvermijdelijk een grotere consumptie van nutriënten met zich mee. Bovendien kunnen verschillende probiotische stammen samenwerken om suikers te consumeren. Vooral in de lagere gedeeltes van het colon werken bacteriën samen: de ene soort kan complexe suikerstructuren afbreken en zet eenvoudige suikerstructuren vrij welke andere stammen als voedselbron kunnen gebruiken (Lebeer *et al.*, 2008b).

Sommige lactobacillen zijn in staat om antimicrobiële componenten te produceren die nefast zijn voor de viabiliteit van een aantal concurrerende stammen en virussen. Er werd bijvoorbeeld aangetoond dat lactaat geproduceerd door LGG in staat is om onder andere *Salmonella*, *E. coli* en *Clostridium* te doden (Silva *et al.*, 1987 & De Keersmaecker *et al.*, 2006a). Lactaat doet de pH dalen en zou een permeabilisatie van het celmembraan van Gram-negatieve stammen kunnen veroorzaken. Hoe de antimicrobiële werking van lactaat precies tot stand wordt gebracht, blijft voorlopig een raadsel. Vele lactobacillen secreteren bacteriocines, dit zijn stoffen die actief zijn tegen nauw verwante micro-organismen die vaak in dezelfde niche leven. Bacteriocines zijn kleine, hitte-stabiele proteïnen met een hoog iso-elektrisch punt. De inwerking van bacteriocines kan vooral ter hoogte van het membraan gesitueerd worden: de stoffen kunnen het membraan van hun concurrenten permeabiliseren (Eijsink *et al.*, 2002).

Lactobacillen bedreigen pathogenen ook via het principe van competitieve exclusie. Er werd bijvoorbeeld aangetoond dat *E. coli*, een intestinale pathogeen, gebruik maakt van bepaalde

oligosaccharidereceptoren in het GIT. Probiotica (*in casu*: *L. helveticus* en LGG) lijken deze sites ook te kunnen gebruiken om zich vast te zetten op het mucosaal epitheeloppervlak en treden dus in competitie met *E. coli* voor deze receptoren (Johnson-Henry *et al.*, 2007 & 2008).

Tenslotte kunnen de verschillende stammen die deel uitmaken van de microbiota ook onderling met elkaar communiceren om hun activiteiten te coördineren. ‘Quorum sensing’ is een proces dat hierin een belangrijke rol speelt: de micro-organismen communiceren via chemische signalen, zogenaamde auto-inducers (Lebeer *et al.*, 2007a).

1.5.3.2 INTERACTIES MET HET DARMEPITHEEL

Probiotica zouden ook een effect uitoefenen op de epitheliale barrière. De epitheelcellen van het GIT worden gezien als één van de belangrijkste doelwitten van probiotische bacteriën: vooral wat betreft het versterken van deze barrière en het bevorderen van voedselopname via de epitheelcellen (Lebeer *et al.*, 2008b).

Lactobacillen zijn in staat om metabole interacties aan te gaan met de epitheelcellen van de darm en moduleren zo de opname van voedsel. Recent onderzoek toonde aan dat probiotica, door hun modulerende interacties met het darmepitheel, ook een invloed hebben op het lipidenmetabolisme van de lever (Martin *et al.*, 2008). Verschillende metabole wegen worden beïnvloed door de aanwezigheid van probiotica en de concentraties van metabolieten veranderen dan ook significant. Sommige van deze concentratieschommelingen kunnen verklaard worden doordat lactobacillen zelf ook in staat zijn om deze stoffen te metaboliseren. De metabole effecten van probiotica worden op dit moment verder onderzocht. Het is namelijk heel moeilijk om deze effecten precies af te lijnen. Nieuwe kennis omtrent dit topic kan een doorbraak betekenen in de behandeling van metabole aandoeningen, zoals diabetes, obesitas en colonkanker (Lebeer *et al.*, 2008b).

Probiotica zijn eveneens van belang om de barrière gevormd door de epitheelcellen te versterken en te ondersteunen. Veranderingen in deze barrière zijn namelijk de oorzaak van verschillende ernstige darmaandoeningen: IBD, voedselallergie en infecties (Shanahan, 2001). Lactobacillen lijken in staat te zijn om deze barrière te versterken door de inductie van mucine secretie, de tight-junctions tussen de cellen te versterken, de expressie van heat-shock proteïnen te stimuleren en het voorkomen van apoptose van de epitheelcellen. Welke moleculen precies verantwoordelijk zijn voor deze effecten van lactobacillen is nog niet geweten. Belangrijke kandidaten zijn componenten van het celwandoppervlak en moleculen die gesecreteerd worden door de cel (Lebeer *et al.*, 2008b).

1.5.3.3 IMMUNOMODULATORISCHE EIGENSCHAPPEN

Probiotische cellen beïnvloeden op verschillende manieren het immuunsysteem door interacties met de intestinale epitheelcellen en met dendritische cellen. Epitheelcellen, dendritische cellen en macrofagen werken samen om de omgeving van de darm continu te

scannen op mogelijke bedreigingen en kunnen verschillende mechanismen activeren om de darm te beschermen. Probiotica kunnen onder andere een invloed uitoefenen op de cytokine-signalwegen in de mucosa (Shanahan, 2001).

Het eerste systeem dat in actie treedt, is het aangeboren immuunsysteem dat vooral werkzaam is door de productie van antimicrobiële defensines en secretie van chemokines. Chemokines zijn actieve componenten die in staat zijn om fagocyten te rekruteren die de bedreigende bacteriën kunnen verteren. De mens beschikt ook nog over een verworven immuunsysteem dat in staat is om veel specifiek te werken. Het GALT is daar een onderdeel van dat ter hoogte van de darm werkt via antilichaam-antigeenherkenning en in staat is om heel specifiek pathogenen te herkennen en uit te schakelen. Probiotica zijn in staat om invloed uit te oefenen op de dendritische cellen, welke de voornaamste antigeen-presenterende cellen zijn. Bovendien kunnen ze regulatorische T-cellen induceren en inwerken op de T-helpercellen balans en zo het immuunsysteem verder activeren (Lebeer *et al.*, 2008b).

Lactobacillen zijn mogelijk ‘old friends’ die noodzakelijk zijn om de immunresponsen te reguleren en regulatorische dendritische cellen en T-cellen te induceren. De recente toename in het aantal gevallen van IBD en allergieën is waarschijnlijk te wijten aan de stijgende hygiëne in de huidige samenleving. De mens komt daardoor niet meer voldoende in contact met micro-organismen en wordt hypersensitief voor de aanwezigheid ervan. Deze ‘hygiene hypothesis’ kan de hoge prevalentie van darmaandoeningen verklaren (Rook, 2008; Shanahan & Bernstein, 2009).

1.5.4 MEDISCHE VOORDELEN

De enterische afkomst van LGG in acht genomen, is het niet verwonderlijk dat de meeste aangetoonde gezondheidseffecten van LGG zich daar situeren. Er werd reeds aangetoond dat LGG kan ingezet worden in de behandeling en preventie van infecties van het darmkanaal, de bestrijding van diarree en het verminderen van door *Clostridium difficile* veroorzaakte diarree (Doron *et al.*, 2005). Er zijn ook aanwijzingen dat LGG ingeschakeld kan worden bij het voorkomen en genezen van IBD (Shanahan, 2001). Ook andere delen van het lichaam kunnen positief beïnvloed worden door de toepassing van probiotica: LGG zou onder andere urogenitale ziekten, vaginaal gerelateerde problemen en cariës kunnen helpen voorkomen en behandelen (Doron *et al.*, 2005).

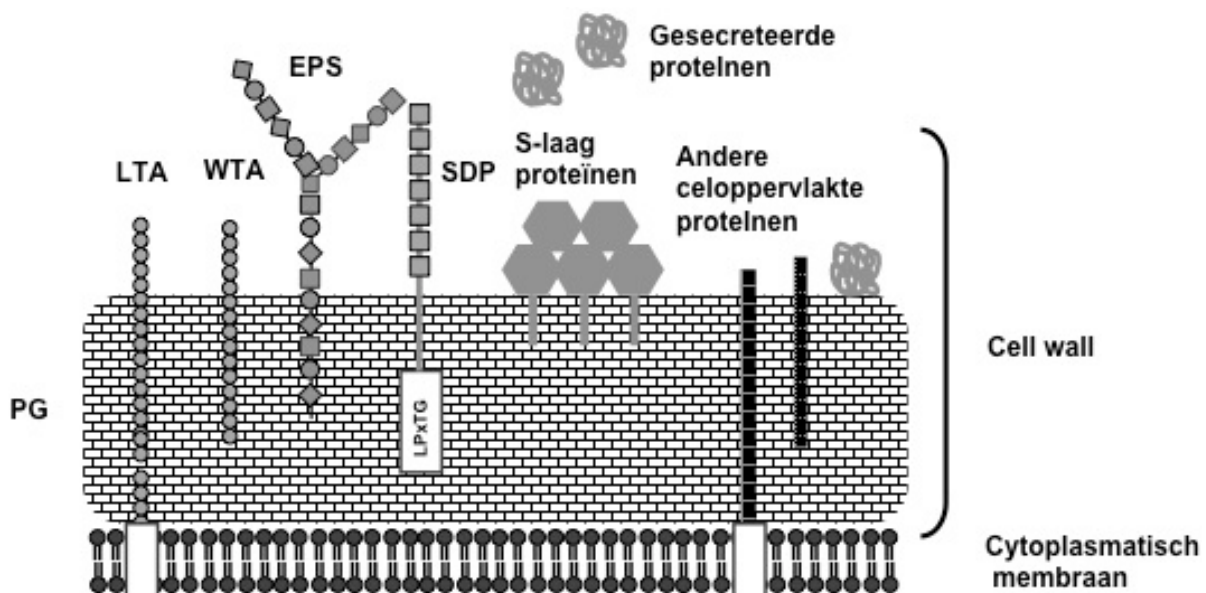
Een overzicht van de aandoeningen waar LGG als therapie kan aangewend worden en welke effecten deze behandeling met zich mee kan brengen, is op dit moment onmogelijk te maken. Toch zien wetenschappers vele klinische applicaties (Doron *et al.*, 2005). Op dit moment is er echter nog een te grote variatie tussen de resultaten van de verschillende klinische trials en sommige studies spreken elkaar ook tegen, om LGG in te schakelen als vaste therapie (Lebeer *et al.*, 2008b).

2 CELOPPERVLAKTESTRUCTUREN VAN LACTOBACILLI

Over de celwand van Gram-positieve bacteriën in het algemeen is al relatief veel geweten. De exacte samenstelling van de celwand van LGG is echter nog onbekend. Aangezien in deze thesis een mutant aangemaakt en gekarakteriseerd werd die geraakt is in een celwandoppervlaktemolecule, volgt hieronder een overzicht van de op dit moment vergaarde kennis hieromtrent.

Opdat LGG zijn probiotische functies kan uitvoeren, moet de bacterie op één of andere manier contact maken met de gastheer. De meest logische kandidaten voor deze interactie zijn de componenten die terug te vinden zijn op het celoppervlak van LGG of door de celwand gesecreteerde proteïnen. De onderdelen van de celwand zelf kunnen dus waarschijnlijk optreden als probiotische of adaptatiefactoren. Een beter begrip van de architectuur van de celwand van LGG kan dus de sleutel zijn tot het ontrafelen van de probiotische werking ervan.

De celwand van verschillende Gram-positieve species bevat een grote verzameling macromoleculen in verschillende verhoudingen. Het is deze diversiteit aan oppervlaktemoleculen die de eigenschappen van elke soort bepaalt. In de celwand van LGG zijn, net als bij Gram-positieve bacteriën in het algemeen, enkele grote bouwstenen terug te vinden (Fig. I-2): een dikke, meerlagige peptidoglycaanlaag met proteïnen, teichoïnezuren en polysacchariden. In sommige soorten is er ook een S-laag terug te vinden die vooral bestaat uit proteïnen, bij LGG is deze echter afwezig (Lebeer *et al.*, 2008b).



FIGUUR I-2: ARCHITECTUUR VAN HET CELOPPERVLAK VAN LACTOBACILLI EN GRAM-POSITIEVE BACTERIËN. Boven het cytoplasmatisch membraan is de peptidoglycaanlaag (PG) te zien waar alle andere celwandcomponenten in verankerd zijn. Links zijn de teichoïnezuren WTA en LTA te zien, met daarnaast de exopolysaccharidenstructuren (EPS). Verder zijn de proteïnenstructuren ook weergegeven: de Sortase-Dependent Proteins (SDP), de proteïnen van de S-laag en proteïnen die door de bacterie gesecreteerd worden in het extracellulair milieu. (Aangepast volgens Lebeer *et al.*, 2008b)

2.1 PEPTIDOGLYCAAN

De dikke peptidoglycaanlaag (20 tot 100 nm) die de cel helemaal omgeeft wordt ook wel de mureïne sacculus genoemd en is van belang om de structurele integriteit van de cel te bewaren (Fig. I-2). De laag is opgebouwd uit glycaanketens die bestaan uit herhalingen van N-acetylglucosamine dat via een $\beta(1-4)$ binding gelinkt is aan N-acetylmuraminezuur. Het N-acetylmuraminezuur wordt gemodificeerd door de aanhechting van een pentapeptide, dat bestaat uit D- en L-aminozuren. Bij sommige lactobacillen (o.a. *L. casei*) wordt dit pentapeptide nog eens gesubstitueerd met D-lactaat (Delcour *et al.*, 1999).

De peptidoglycaanlaag kan vergeleken worden met het chitine exoskelet van insecten, maar is resistenter tegen mechanische stress doordat deze laag bestaat uit sterke covalente crosslinks tussen een enorm aantal monomere subunits. Tussen de verschillende concentrische, covalent gelinkte lagen peptidoglycaan zijn er nog eens extra radiale bindingen om het geheel bijeen te houden. De hele celwand bestaat dus eigenlijk uit een gigantische covalent gebonden macromolecule met indrukwekkende elastische eigenschappen: turgordrukken tot 20 atm kunnen weerstaan worden. De sacculus kan door deze vele interne links tussen de verschillende subunits gezien worden als een net en functioneert dus niet enkel als een omhulsel voor de cel, maar ook als een soort zeef met poriegroottes van 4 nm. Dit betekent dat globulaire proteïnen tot 25 kDa vrij kunnen diffunderen doorheen de celwand. In realiteit is de cel echter onderhevig aan grote turgordrukken en kan dit oplopen tot 55 kDa. De andere onderdelen van de celwand van Gram-positieve bacteriën zijn op covalente en non-covalente manier verankerd in deze peptidoglycaanlaag (Fig. I-2) (Delcour *et al.*, 1999).

Aangezien peptidoglycaan de belangrijkste bouwsteen van de celwand van Gram-positieve bacteriën is, wordt de biosynthese ervan streng gereguleerd: op die manier kan er een correcte deling en groei van de bacteriën plaatsvinden. Verschillende nucleotide precursoren met suikers erop gebonden komen tussen in de synthese van peptidoglycaan. Deze precursoren binden op een lipid carrier: bactoprenol, en worden zo mee getransporteerd van de cytoplasmatische naar de exoplasmatische zijde van het celmembraan. Op de buitenkant van de celwand polymeriseren de verschillende aangebrachte monomere subunits en worden alle crosslinks tussen de bouwstenen gesynthetiseerd, via transpeptidatie en transglycosylatie processen. De lege bactoprenol carrier keert dan terug naar het cytoplasma, waar deze opnieuw een suikerdragend nucleotide kan oppikken om te incorporeren in de groeiende peptidoglycaanlaag aan exoplasmatische zijde van de celwand. Deze peptidoglycaansynthese is heel geconserveerd binnen de verschillende Gram-positieve species (Scheffers & Pinho, 2005).

2.2 TEICHOÏNEZUREN

De tweede meest abundant aanwezige componenten in de Gram-positieve celwand zijn de teichoïnezuren. Teichoïnezuren zijn anionische polymeren die opgebouwd zijn uit

polyglycerolfosfaat of polyribitolfosfaat en werden vijftig jaar geleden ontdekt door Baddiley. Er zijn twee soorten teichoïnezuren: ‘wall’ teichoïnezuren die covalent gebonden zijn aan peptidoglycaan, en lipoteichoïnezuren die verankerd zijn in het cytoplasmatisch membraan via een lipidenanker (Fig. I-2). Beide soorten zijn meestal bezet met glycosyl of D-alanyl esters (Neuhaus & Baddiley, 2003).

Over de functie, compositie, aanwezigheid en abundantie van teichoïnezuren in LGG is nog veel niet geweten. Op dit moment lijkt het erop dat LGG enkel beschikt over LTA en niet over WTA (Perea Vélez *et al.*, 2007a). Het overzicht hieronder is dan ook van toepassing op Gram-positieve stammen in het algemeen.

De abundante aanwezigheid van teichoïnezuren in nagenoeg alle Gram-positieve bacteriën wijst erop dat belangrijke functies kunnen toegeschreven worden aan deze moleculen. Bovendien spendeert de cel een belangrijke hoeveelheid van haar energie aan de synthese van deze polymeren. Teichoïnezuren zijn dan ook van groot belang voor de functionaliteit van de celwand. Door hun opbouw uit glycerol- en ribitolfosfaten vormen ze een fosfaatreservoir waaruit fosfaat kan worden gemobiliseerd wanneer nodig (Delcour *et al.*, 1999).

Teichoïnezuren zijn anionische polymeren die (bivalente) kationen, waaronder ook protonen, kunnen binden en op die manier een pH kunnen uitbouwen over de celwand heen, wat van groot belang is voor het behoud van het energiemetabolisme van de cel. De teichoïnezuren zouden ook een rol kunnen spelen in de activiteit van autolysines en adsorptie van fagen (Delcour *et al.*, 1999 & Rahman *et al.*, 2009).

Studies in *S. aureus* en *B. subtilis* hebben uitgewezen dat vooral LTA noodzakelijk is voor de viabiliteit van de cel. WTA deleties hebben namelijk quasi geen invloed op de overlevingskansen van de bacterie (D’Elia *et al.*, 2006). Bovendien werd aangetoond dat de structuur van de verschillende teichoïnezuren heel variabel is. Bacteriestam, groeistadium, pH van het medium en de voorhanden koolstofbron zijn maar enkele van de factoren die een invloed hebben op de structuur en abundantie van teichoïnezuren. Deze twee feiten in acht genomen, kan geconcludeerd worden dat teichoïnezuren waarschijnlijk eerder een indirecte rol spelen in interacties tussen de cel en externe componenten (Delcour *et al.*, 1999).

Over één ding zijn alle onderzoekers het eens: teichoïnezuren spelen een belangrijke rol in de bescherming van de celwand van Gram-positieve bacteriën. Samen met de peptidoglycaan sacculus zorgen ze voor een stevige mechanische barrière die de celinhoud beschermt tegen pathogene substanties. Teichoïnezuren kunnen deze rol zowel op een indirecte (aanwezigheid van extra beschermende lagen), als op een directe manier invullen. De directe manier kan onderverdeeld worden in verschillende soorten: teichoïnezuren kunnen de resterende poriën tussen de peptidoglycaansubunits opvullen en zo de diffusie van kleine substanties tegengaan, of ze kunnen de fysiochemische eigenschappen van de celwand volledig veranderen (Weidenmaier & Peschel, 2008). Deze theorie wordt ondersteund door praktische resultaten:

mutanten die geraakt zijn in hun celwandsamenstelling zijn gevoeliger aan de inwerking van antibiotica en antimicrobiële stoffen (Peschel *et al.*, 1999).

Ook de D-alanine substituties op de LTA en WTA structuren spelen een functionele rol. Door de anionische polymeren te bezetten met positief geladen D-alanine structuren, worden de cellen namelijk deels resistent tegen de inwerking van kationische antimicrobiële agentia. Stammen die gemuteerd zijn in het *dltABCD* operon, dat de genen bundelt die instaan voor de D-alanylatie van LTA, zijn dan ook gevoeliger voor de aanwezigheid van kationische moleculen en antibiotica (Peschel *et al.*, 1999 & specifiek voor de *dltD* mutant van LGG: Perea Vélez *et al.*, 2007a).

LTA blijkt een belangrijke rol te spelen in het correct sturen van de celdeling, wat verklaart waarom mutanten geraakt in LTA niet levensvatbaar zijn. Experimenten wijzen erop dat LTA ervoor lijkt te zorgen dat alle componenten van de celdelingsmachine correct gepositioneerd zijn door met al deze onderdelen te interageren (Weidenmaier & Peschel, 2008).

2.3 EXOPOLYSACCHARIDEN

Naast teichoïnezuren vinden we ook suikerstructuren terug op de peptidoglycaanlaag: de exopolysacchariden (EPS). Deze exopolysacchariden kunnen onderverdeeld worden in twee groepen: de capsulaire en de celgebonden exopolysacchariden. De capsulaire exopolysacchariden vormen een dikke laag rondom de cel en zijn meestal covalent gebonden aan de celwand. De andere, celgebonden polysacchariden zijn op een veel lossere manier gebonden aan de celwand. In de extracellulaire matrix zijn er ook gesecreteerde polysacchariden terug te vinden. Het is vaak moeilijk om een onderscheid te maken tussen deze verschillende soorten polysacchariden en daarom wordt zowel aan de gebonden als aan de gesecreteerde polysacchariden gerefereerd met de algemene term exopolysacchariden (Fig. I-2) (Lebeer *et al.*, 2008b).

EPS-structuren kunnen heel divers en complex zijn: zowel de monomeren als de verbindingen ertussen kunnen variëren. In lactobacillen zijn over het algemeen heteropolysacchariden terug te vinden die opgebouwd zijn uit glucose, galactose, rhamnose, glucosamine en N-acetylglucosamine. De suikergroepen zijn soms ook gebonden aan glycerol-, acetyl- en pyruvylgroepen. Zoals de meeste celwandgerelateerde, complexe structuren worden de EPS-structuren stapsgewijs gesynthetiseerd met behulp van suikers gebonden op nucleotidencarriers en glycosyltransferase-enzymen (Lebeer *et al.*, 2008b).

De synthese van de EPS-structuren start aan de cytosolaire kant van het membraan. Een bactoprenol carrier wordt stap voor stap beladen met suikermonomeren die samen de basisstructuur vormen van EPS. Bij elke suikergroep die toegevoegd wordt, komt er een glycosyltransferase tussen. Eens de volledige basisstructuur gevormd is, wordt deze met behulp van een flippase en na enkele fosforylatieprocessen naar de extracellulaire kant van het membraan gebracht. Daar vindt de assemblage tot een EPS-polymeer plaats. Via een nog

onbekend mechanisme wordt de EPS-structuur losgekoppeld van de bactoprenol carrier en migreert deze naar zijn uiteindelijke bestemming in de celwand van LGG. De bactoprenol carrier wordt gerecycleerd naar de cytosolaire kant van het celmembraan (Stingele *et al.*, 1996).

De synthese van EPS is bovendien sterk afhankelijk van de omgevingscondities: er komt onder andere een fosforylatiecascade aan te pas om de synthese en ketenlengte van de EPS te reguleren. De EPS-structuren blijven na synthese of via elektrostatische interacties gebonden aan de celwand of worden gesecreteerd in het extracellulair medium (Lebeer *et al.*, 2008b).

2.4 PROTEÏNEN OP HET CELOPPERVLAK

Op de celwand van Gram-positieve bacteriën zijn ook heel wat proteïnen terug te vinden. Deze kunnen op verschillende manieren hieraan verankerd zijn en bestaan meestal uit herhalingen van bepaalde domeinen. Andere proteïnen worden gesecreteerd en staan in voor interacties met andere cellen, zonder dat er echt contact tussen de cellen nodig is.

In lactobacillen zijn vooral de ‘Sortase-Dependent Proteins’ (SDPs) en proteïnen van de S-laag goed bestudeerd (Fig. I-2). SDPs beschikken over een signaalpeptide waardoor ze afgeleverd worden op de celwand. Eens de SDPs daar aangekomen zijn, wordt dit sorteringssignaal eraf geknipt door een sortase enzym en worden de proteïnen gebonden aan het peptidoglycaan. Een gelijkaardig mechanisme dat ook gebruikt maakt van sortases komt terug bij de synthese van pili en fimbriae (Lebeer *et al.*, 2008b).

Sommige soorten lactobacillen worden omringd door een S-laag die bestaat uit proteïnen die een parakristallijne monolaag vormen rond de cel. Over de biosynthese van deze S-laag is nog niet veel geweten, wel is het duidelijk dat het gaat om een complex en nauwgezet gereguleerd proces. De hoeveelheid proteïnen wordt onder andere bepaald door de groeisnelheid van de bacterie en is in balans met de productie van de andere celwandcomponenten zoals peptidoglycaan (Schäffer & Messner, 2005). LGG beschikt niet over zo’n S-laag, maar de celwand lijkt wel bezet te zijn met glycoproteïnen (Francius *et al.*, 2008).

2.5 GRAM-POSITIEVE PILI

Adhesie speelt een belangrijke rol in de probiotische actie van LGG, de moleculaire basis ervoor is echter nog onbekend. Naast EPS, teichoïnezuren en proteïnen, zouden pili hierin ook een belangrijke rol kunnen spelen. In Gram-positieve pathogenen werd eerder al aangetoond dat pili van belang zijn voor adhesie en kolonisatie (Wu & Fives-Taylor, 2001). Recent onderzoek in LGG toont aan dat dit ook geldt voor de pili van lactobacillen: Gram-positieve pili kunnen interageren met de mucus van de gastheer volgens een nog onbekend mechanisme (Kankainen *et al.*, 2009 & von Ossowski *et al.*, 2010).

Pili zijn structuren op het oppervlak van de celwand die opgebouwd zijn uit proteïnenpolymeren. Ze meten amper 1-10 nm in diameter, maar kunnen tot meer dan een 1

µm lang zijn. De structuur van de pilus kan gezien worden als een heterotrimeer bestaande uit verschillende pilins (Mandlik *et al.*, 2008).

Bij de opbouw van Gram-positieve pili komt een pilin-specifiek sortase tussen dat de verschillende pilinsubeenheden covalent aaneenhangt met isopeptide bindingen. Vervolgens komt een ander, membraangebonden sortase tussen om de pilus covalent aan de peptidoglycaanlaag te hechten (Proft & Baker, 2009).

De drie subeenheden van pili en het pilin-specifiek sortase worden bij Gram-positieve bacteriën gecodeerd door genen die verzameld liggen op dezelfde locus onder de vorm van een genencluster (Mandlik *et al.*, 2008).

3 FOCUS: TEICHOÏNEZUREN

De exacte rol van het gen dat in LGG uitgeschakeld werd in het kader van deze thesis, is nog onbekend. Het genoom van LGG werd pas in 2009 ontrafeld en geannoteerd (Kankainen *et al.*, 2009 & Morita *et al.*, 2009). Het is evident dat nog niet alle genen gekoppeld konden worden aan een bepaald product of functie. Het gemuteerde gen, *rfaG* (LGG_01069), codeert volgens de eerste annotatie voor een ‘teichoic acid glycosyltransferase’ of een ‘polysacharide glycosyltransferase’. In wat volgt zal dieper ingegaan worden op de teichoïnezuren van de Gram-positieve celwand.

3.1 ADHESIE EN ROL IN HET IMMUUNSYSTEEM

Gezien de probiotische rol van LGG en het belang van adhesie hierin, is het van belang om dieper in te gaan op de mogelijke rol die teichoïnezuren hierin spelen.

In *S. aureus* werd aangetoond dat WTA noodzakelijk is voor adhesie van de bacteriën aan de epitheelcellen en de kolonisatie ervan. WTA speelt een belangrijke rol in adhesieve processen, aangezien een deletie van WTA hetzelfde nefaste effect heeft op adhesie als verstoring van de gehele teichoic acid structuur (Weidenmaier *et al.*, 2005). Ook LTA speelt een rol in het binden van cellen aan de gastheer, zoals werd aangetoond in enkele Gram-positieve stammen.

Er zijn sterke aanwijzingen dat de teichoïnezuren interageren via receptorgemedieerde, specifieke interacties, maar de identificatie van deze receptoren zit nog in een beginstadium. Basis voor deze hypothese is onder andere een test uitgevoerd met latex parels gecoat met WTA van *S. aureus*: deze beads bleken heel specifiek en op een dosisafhankelijke manier te interageren met menselijke epitheel- en endotheelcellen. Beads waarop WTA zonder D-alanine substituties was aangebracht, konden niet adhereren aan deze cellen (Weidenmaier *et al.*, 2004).

Het immuunsysteem is gespecialiseerd in het herkennen van vreemde bacteriën die het lichaam binnenkomen en kan geactiveerd worden als het gaat om pathogenen. Het immuunsysteem maakt daarvoor gebruik van een groot aantal ‘Pattern Recognition

Receptors' (PRRs), die in staat zijn om geconserveerde microbiële moleculen en structuren te herkennen. Deze structuren zijn vaak specifieke oppervlaktemoleculen van pathogenen of gesecreteerde substanties en worden 'Microorganism-Associated Molecular Patterns' (MAMPs) genoemd (Weidenmaier & Peschel, 2008). Een voorbeeld van een PRR zijn de 'Toll Like Receptors' (TLRs), zoals TLR2, die heel specifiek MAMPs kunnen detecteren en als reactie een hele signaalcascade in gang zetten (Kang *et al.*, 2009).

Het is heel waarschijnlijk dat probiotische Gram-positieve, commensale bacteriën op een gelijkaardige manier interageren met het immuunstelsel als pathogene bacteriën. Probiotica interageren namelijk met epitheelcellen en dendritische cellen in het GIT en doen dit ook via PRRs, die snel kunnen reageren na herkenning van oppervlaktemoleculen van vreemde bacteriën. De TLRs bestaan bijvoorbeeld uit vele 'Leucine Rich Repeats' (LRR) die instaan voor het herkennen van liganden, waarna de ectodomeinen van de receptor dimeriseren en de signaalcascade in gang wordt gezet. Welke signaalcascade precies geactiveerd wordt, is sterk afhankelijk van het type micro-organisme dat herkend wordt en de reactiviteit van de gastheercellen. Deze specifieke interacties in het GIT zijn een interessant doelwit voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën om IBD te behandelen (Lebeer *et al.*, 2010).

Er werd aangetoond dat de meeste teichoïnezuren kunnen interageren met de TLR2 receptor in mensen en dat vooral LTA hierin een rol lijkt te spelen (Kang *et al.*, 2009). Zoals eerder vermeld, bestaat LTA uit een membraananker (lipidenstructuur die LTA verankert in het membraan) met daarop een grotere structuur die opgebouwd is uit herhalingen van monomere structuren, en het zijn de lipidenstructuren die de PRRs kunnen activeren. Naast PRRs zijn er ook lectines aanwezig: dit zijn suikerbindende proteïnen die ook een rol spelen in het herkennen van LTA. Lectines kunnen ook signaaltransductiewegen activeren na herkenning van de suikereenheden aanwezig op teichoïnezuren. Deze twee herkenningsmechanismen beschermen de gastheer tegen vreemde bacteriën en behoren tot het aangeboren immuunstelsel (Weidenmaier & Peschel, 2008).

Teichoïnezuren zouden een belangrijke rol spelen in het ontwijken van de specifieke gastheerresponsen van het verworven immuunstelsel, door de antigenen op het oppervlak van de bacteriën af te schermen of door de structuur van het oppervlak te modificeren zodanig dat antilichamen de antigenen niet meer kunnen herkennen (Weidenmaier & Peschel, 2008).

Aangezien Gram-positieve darmbacteriën over grote hoeveelheden LTA beschikken, heeft het darmepitheel een manier moeten ontwikkelen om niet te reageren op de aanwezigheid van LTA structuren op 'goede' micro-organismen in de microbiota. Epitheelcellen brengen daarom maar een heel kleine hoeveelheid LTA receptoren en coreceptoren tot expressie. Bovendien worden specifieke inhibitoren van de TLR signaalcascade geproduceerd, zoals het Tollip proteïne (Otte *et al.*, 2004).

3.2 D-ALANYLATIE VAN LTA

Zoals hierboven beschreven is LTA een belangrijk onderdeel van de celwand van Gram-positieve bacteriën, dus ook van LGG (Perea Vélez *et al.*, 2007a). LTA is via een anker van glycolipiden verbonden met het peptidoglycaan en bestaat voor de rest nog uit een keten van polyglycerolfosfaat. Deze fosfaatketen is bezet met D-alanyl esters en/of glycosyl units die van groot belang zijn voor de lading en functie van LTA. Er werd aangetoond dat het verstoren van het D-alanylatie proces nefast is voor de functie van LTA (Neuhaus & Baddiley, 2003).

Er zijn vier proteïnen nodig om de D-alanylatie van LTA in goede banen te leiden en deze zijn samen terug te vinden in het *dlt* operon. *dltA* codeert voor een D-alanyl carrier protein ligase (Dcl), dit enzym activeert D-alanine met behulp van ATP. Het Dcp proteïne is een carrier die gecodeerd wordt door *dltC* en die het geactiveerde D-alanine naar de correcte locatie kan meenemen. DltB is waarschijnlijk een transmembraan proteïne dat helpt om het geactiveerd D-alanyl-Dcp complex over de glycerolfosfaateenheden van LTA te transporteren. Het laatste proteïne van het operon, DltD, maakt deel uit van het membraan en zorgt ervoor dat de Dcp carrier makkelijk kan binden voor ligatie met D-alanine en bovendien is DltD ook een thioesterase dat instaat voor het verwijderen van foutgeladen carriers (Perego *et al.*, 1995; Debabov *et al.*, 2000; Perea Vélez *et al.*, 2007a).

Door de nauwe samenwerking tussen deze vier genen is elke mutatie in dit operon nefast voor de hoeveelheid D-alanyl esters op LTA. Sommige mutaties kunnen ervoor zorgen dat er zelfs helemaal geen D-Ala esters meer terug te vinden zijn. D-Ala deficiënte mutanten vertonen nogal wat fenotypische veranderingen die vooral te wijten zijn aan de ladingsverandering op het oppervlak van de mutant. Dit heeft onder andere gevolgen voor de elektromechanische eigenschappen van de celwand, resistentie tegen peptiden, adhesie, biofilmvorming en immuunrespons (Neuhaus & Baddiley, 2003).

3.3 GLYCOSYLATIE

Hoewel de teichoïnezuren van Gram-positieve bacteriën vaak bezet zijn met glycosylsubstituties, is er nog heel weinig geweten over glycosylatieprocessen in lactobacillen en aanverwanten. De glycosylatie van oppervlaktemoleculen zou vooral belangrijk zijn bij resistentie tegen fagen – bacteriën met ongeglycosyleerde teichoïnezuren zijn resistent tegen fagen –, andere fenotypische veranderingen werden nog niet waargenomen (Delcour *et al.*, 1999).

Glycosylatie van alle teichoïnezuren vereist de productie van drie enzymen: fosfoglucomutase (vorming van glucose-1-P uit glucose-6-P), UDP-glucose fosforylase (UDP-glucose uit glucose-1-P) en UDP-poly- α -glycosyltransferase (UDP-glucose overhevelen naar TA). Bij de synthese komt een lipidencarrier kijken, wat ervoor zorgt dat de glycosylatie van TA gekoppeld is aan andere syntheseprocessen die tegelijk plaatsvinden in het membraan

(Delcour *et al.*, 1999). Het mechanisme voor deze glycosylatie van teichoïnezuren werd onderzocht in *B. subtilis* en *S. aureus* en is waarschijnlijk geconserveerd in andere Gram-positieve stammen gezien het feit dat homologe sequenties werden teruggevonden (Xia *et al.*, 2010).

In *S. aureus* werd de glycosylatie van ‘wall’ teichoïnezuren dus al iets beter bestudeerd. De suikerm modificaties aanwezig op WTA zouden van belang zijn bij gevoeligheid van de bacteriën aan de inwerking van fagen en bij specifieke antilichaam responsen. Er kon een enzyme geïdentificeerd worden dat verantwoordelijk is voor de transfer van N-acetylglucosamine naar WTA: TarM. Homologen van het *tarM* gen konden terug gevonden worden in andere bacteriën die over WTA beschikken, wat doet vermoeden dat het enzym deel uit maakt van een algemene syntheseweg in Gram-positieve bacteriën. Verder onderzoek kon aantonen dat de glycosylatie door TarM plaatsvindt voordat de WTA-precursor getransporteerd wordt naar de buitenkant van het cytoplasmatisch membraan. In tegenstelling tot D-alanylatieprocessen vindt glycosylatie dus plaats in het cytoplasma en niet op de celwand (Xia *et al.*, 2010).

DEEL II: MATERIAAL & METHODEN

1 MATERIALEN

1.1 BACTERIESTAMMEN

TABEL II-1: GEBRUIKTE BACTERIESTAMMEN.

Stam	Eigenschappen	Bron/Referentie
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)	Wild type stam, geïsoleerd uit humane faeces	ATCC 53103
CMPG10206	<i>rfaG</i> mutant (LGG_01069) in LGG, TcR cassette	Dit werk
CMPG5540	<i>dltD</i> mutant in LGG, TcR cassette	Perea Velez <i>et al.</i> , 2007a
CMPG5354	<i>welE</i> mutant in LGG, Ery ^R , mutant geraakt in priming glycosyltransferase noodzakelijk voor aanmaak EPS	Lebeer <i>et al.</i> , 2009
CMPG10102	<i>spaCBA</i> mutant in LGG, Ery ^R	Kankainen <i>et al.</i> , 2009
CMPG5413	<i>luxS</i> mutant in LGG, TcR cassette, Ery ^R , secundaire spontane mutatie	Lebeer <i>et al.</i> , 2007a
CMPG5370	<i>ykC/B</i> mutant, mutant geraakt in een glycosyltransferase	T. Verhoeven & S. Lebeer
CMPG10200	p75 mutant in LGG, Ery ^R	I. Claes
CMPG5430	Integragant van LGG-Rif ^R ATCC53103, Tc ^R , Ery ^R , Rif ^R	S. Lebeer & T. Verhoeven
<i>E. coli</i> Top10'F	Competente <i>E. coli</i> cellen voor heat shock	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5- α	Competente <i>E. coli</i> cellen voor heat shock	Gibco-BRL
CMPG5728	<i>Salmonella thyphimurium</i> SL1344, wild type	Hoseith & Stocker, 1981

1.2 PLASMIDEN

TABEL II-2: GEBRUIKTE PLASMIDEN.

Plasmide	Relevante eigenschappen	Referentie/Bron
pCR®II-TOPO®	Kloneringsvector voor PCR-producten aangemaakt met <i>Taq</i> polymerase	Invitrogen™

pEM40	pUC19E-afgeleide integratie vector met Ap ^R en Ery ^R cassette	Alvarez <i>et al.</i> , 1998
pLAB1301	Shuttle vector voor <i>Lactobacilli</i> en <i>E. Coli</i> , efficiënte elektroporatie in LGG, Ery ^R	E. Mulkers
pFAJ5301/TcR	Vector gebruikt voor de aanmaak van rfaG mutant met Tc ^R en Ery ^R cassette, zonder ori	I. Claes
pEM40/dlt promoter	pEM40 vector met functionele <i>dltD</i> promoter	T. Verhoeven

1.3 MEDIA EN MEDIUMADDITIEVEN

TABEL II-3: GROEIMEDIA AANGEWEND VOOR DE VERSCHILLENDE STAMMEN.

Medium	Samenstelling	Species
LB (Luria-Bertani) meidum	10 g trypton (LAB M TM), 10 g NaCl, 5 g Yeast Extract (LAB M TM) in 1 L A.D.	<i>E. coli</i>
MRS (de Man-Ragosa-Sharpe) medium	55 g MRS (Difco) in 1 L A.D.	<i>Lactobacillus</i> species
Modified Tryptic Soy Broth (mTSB) medium	15 g TSB (Difco), 20 g Bacto Protease Peptone N°3 (BDSciences) in 1 L A.D.	<i>Lactobacillus</i> species
AOAC	38 g AOAC(Difco) in 1 L A.D.	<i>Lactobacillus</i> species

De commerciële media AOAC en MRS werden gesteriliseerd in een handmatig te bedienen sterilisatiepot: 20 minuten op 121°C. Dit werd gedaan om Maillard reacties te beperken.

TABEL II-4: ANTIBIOTICA DIE TOEGEVOEGD WERDEN AAN DE MEDIA VOOR SELECTIEVE GROEI.

Antibiotica	Stock	Finale concentratie (µg/mL)
Ampicilline (Ap)	1000x	10
Tetracycline (Tc)	1000x	10
Erythromycine (Ery)	1000x	5

1.4 MOLECULAIRE DNA-METHODEN

1.4.1 DNA-GELELEKTROFERESE

Op elke agarosegel werd ook een groottemerker aangebracht: SmartLadder van Eurogentec. De fragmenten aanwezig in de ladder hebben een grootte van 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 800, 600, 400 en 200 baseparen.

TABEL II-5: BENODIGDE BUFFERS VOOR DNA-GELELEKTROFOERSE.

Buffer	Samenstelling
TBE-buffer (10x)	108 g Tris-base, 55 g boorzuur, 9,3 g Na ₂ -EDTA, 1 L A.D.
Gel-ladingsbuffer (6x) 'blue juice'	0,25% bromofenolblauw, 0,25% xyleencyanol FF, 40% sucrose, oplossen in TBE
Agarose gel	0,7% à 1,5% agarose, oplossen in TBE buffer (200 mL/gel)
Ethidiumbromide (EtBr) (Amresco)	0,625 mg/mL stock: 0,5 µg/mL agarosegel

1.4.2 PCR-AMPLIFICATIE

TABEL II-6: COMPONENTEN VAN EEN PCR-REACTIE.

Benodigheden	Bron
PLATINUM®- <i>Pf</i> α-DNA-polymerase (2,5 U/µL)	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA polymerase (2 U/µL)	Roche
dNTP's: ATP, CTP, GTP en TTP (10 mM stock)	Roche

Hieronder een overzicht van de gebruikte primers. Indien een herkenningssequentie voor een restrictie-enzym aanwezig is in de sequentie, wordt deze vermeld tussen haakjes en onderstreept in de sequentie.

TABEL II-7: IN DIT WERK GEBRUIKTE PRIMERS.

Primer	Sequentie (5' → 3')
pro-2412 (Sal I)	<u>ATGTCGACCCGCA</u> ACCGCAACCATTAGCATTG
pro-2413 (NotI)	<u>ATGCGGCCGCGG</u> TTCTCCAAGGGACTTTTCAGC
pro-2409 (SpeI)	<u>ATACTAGTCGAAA</u> AGAAGGAACGCAGATGAGC
pro-2410 (XmaI)	<u>ATCCCGGGCCGCT</u> ACCGTTCAAACACAAGTGC
pro-2600	AGCTGAAAAGTCCCTTGGAGAACC
pro-2601	GCTCATCTGCGTTCCTTCTTTTCG
pro-249	GACATCTAATTATTTGTTCCCGCTATC
pro-250	ATCCGAACGCTGTTCCGGACA

1.4.3 ISOLEREN EN BEWAREN VAN DNA

TABEL II-8: DNA-ISOLATIEKITS.

Moleculair biologische kit	Gebruik
Qiaprep® Spin Mini Kit (Qiagen)	Isoleren van plasmide DNA (Miniprep)
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)	DNA-fragmenten opzuiveren na gelelectroferese
QIAquick PCR purification Kit (Qiagen)	Opzuiveren van PCR producten

Het opgezuiverde DNA werd nadien bewaard in de elutiebuffer van de gebruikte kit.

1.4.4 RESTRICTIE EN LIGATIE VAN DNA

TABEL II-9: BENODIGDHEDEN VOOR RESTRICTIE EN LIGATIE VAN DNA.

Enzym/Kit	Gebruik	Bron
Restrictie-endonucleasen (10 U/ μ L)	Digest van DNA-fragmenten op welbepaalde herkenningssequenties	Roche, New England Biolabs
T4-DNA-ligase (1 U/ μ L)	Ligeren van DNA-fragmenten	Invitrogen
Klenow DNA polymerase (2 U/ μ L)	'Blunt' maken van 5' overhangende uiteinden	Roche
Antarctic fosfatase (5 U/ μ L)	Verwijderen van 5'-fosfaat van een gelineariseerde vector om zelfligatie te voorkomen	New England Biolabs
Bovine Serum Albumine Buffer	Buffer nodig voor de werking van restrictie-endonucleasen van New England Biolabs	New England Biolabs
Buffer H	Buffer nodig voor de werking van restrictie-endonucleasen van Roche	Roche
Buffer 1,2,3,4	Buffer nodig voor de werking van restrictie-endonucleasen van New England Biolabs	New England Biolabs

1.5 OVERDRACHT VAN PLASMIDEN

1.5.1 CHEMISCHE TRANSFORMATIE *E. COLI*

TABEL II-10: GEBRUIKTE COMPETENTE CELLEN.

Competente cellen	Bron
<i>E. coli</i> DH5 α	Aanmaak volgens methode van Hanahan (1985)
<i>E. coli</i> TOP10 β F	Invitrogen

1.5.2 ELEKTROPORATIE NAAR LGG

TABEL II-11: BENODIGDHEDEN VOOR ELEKTROPORATIE VAN PLASMIDEN NAAR LGG.

Oplossingen, media en additieven	Samenstelling (finale concentraties)
20% glycine (10x)	20 g/100 mL glycine in A.D.
Cultuurmedium	MRS, 2% glycine
Elektroporatiebuffer = wasbuffer	0,5 M sucrose, 7 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4), 1 mM MgCl ₂
Regeneratiemedium	MRS, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM CaCl ₂

1.6 EPS-B EXTRACTIE

TABEL II-12: BENODIGDE SUBSTANTIES VOOR EPS-B EXTRACTIE.

Oplossing	Gebruik
NaCl 0,9%	Wassen pellet
Ethanol	Precipitatie suikers

1.7 CELWANDPROTEÏNEN

1.7.1 EXTRACTIE CELWANDPROTEÏNEN

TABEL II-13: BENODIGDHEDEN VOOR DE EXTRACTIE VAN CELWANDPROTEÏNEN.

Stof/Buffer	Samenstelling
PMSF	Protease-inhibitor, 1 mM
EDTA	5 mM
TE-buffer	50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8
TES-buffer	TE-buffer + 20% sucrose
Mutanolysine	Stock 5000U/ml

1.7.2 1D SDS-PAGE

TABEL II-14: BENODIGDHEDEN 1D SDS-PAGE.

Benodigdheden	Bron
NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels	Invitrogen
Sypro Ruby Total Stain	Invitrogen

1.7.3 2D-GELELEKTROFORESE

1.7.3.1 ISO-ELEKTRISCHE FOCUSING

TABEL II-15: COMPONENTEN REHYDRATATIE-OPLOSSING.

Component	Concentratie
Ureum	8 M
Detergent: Triton X-100 of CHAPS	0,5 tot 4%
DTT	20-100 mM
IPG buffer	Eigen aan gebruikte strip

1.7.3.2 SDS-PAGE

TABEL II-16: EQUILIBRATION-OPLOSSING SDS-PAGE.

Component	Concentratie
Tris-HCl	50 mM, pH 8,8
Ureum	6 M
Glycerol	30 %
DTT	100 mg / 10 mL
Iodoacetamide	250 mg / 10 mL
SDS	2 %
Bromofenolblauw (tracking dye)	0,002 %

Er werd gewerkt met Novex® Tris –Glycine Gels van Invitrogen.

1.7.3.3 WESTERN BLOT

TABEL II-17: BENODIGDHEDEN WESTERN BLOT.

Component/Buffer	Samenstelling
CAPS-stock	2,21 g CAPS / 1 L H ₂ O, pH 11
CAPS-buffer	25 mL CAPS-stock, 25 mL methanol, 200 mL water

1.7.3.4 DETECTIE WESTERN BLOT

TABEL II-18: BENODIGDHEDEN VOOR DETECTIE WESTERN BLOT.

Component/Buffer	Samenstelling
TTBS-buffer	0,05 % Tween 20, 50 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 7,5
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
AP-buffer	100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5
NBT	50 mg/mL Dimethylformamide 70 %
BCIP	50 mg/mL H ₂ O
STOP-buffer	7,4g EDTA / 1 L PBS

1.8 BIOFILM EN ADHESIE-EXPERIMENTEN

1.8.1 BIOFILM

TABEL II-19: OPLOSSINGEN NODIG BIJ HET KLEUREN VAN BIOFILMPLATEN.

Oplossingen	Samenstelling
PBS (Phosphate Buffered Saline) (zelf gemaakt of Invitrogen)	1,24 g/L K ₂ HPO ₄ , 0,39 g/L KH ₂ PO ₄ , 8,8 g/L NaCl, A.D.
Kristalviolet (onderdelen in correcte volgorde toevoegen)	0,1 g kristalviolet oplossen in 5 mL isopropanol, 5 mL methanol, aanlengen met PBS tot 100 mL

1.8.2 CACO-2 CELLEN

TABEL II-20: MEDIA NODIG VOOR ADHESIE-EXPERIMENTEN MET CACO-2 CELLEN.

Medium	Gebruik	Bron
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Culturen Caco-2 cellen opgroeien (Starvation)	Invitrogen
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 1x)	Wassen Caco-2 cellen	Invitrogen
DMEM/FBS (DMEM met Fetal Bovine Serum)	Opgroeien Caco-2 celculturen	Invitrogen

1.9 IMMUUNEXPERIMENTEN

TABEL II-21: BENODIGDHEDEN VOOR ISOLATIE VAN RNA UIT CACO-2 CELLEN EN AANMAAK VAN cDNA.

Enzym/Kit	Gebruik	Bron
High Pure RNA Isolation Kit	Isoleren van RNA uit Caco-2 cellen	Roche
SuperScript® III Reverse Transcriptase (200 U/μL)	Aanmaak cDNA vertrekkende van RNA	Invitrogen
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Inhibitie RNases	Invitrogen
DTT (Dithiothreitol, 0,1 M)	Voorkomen vormen van DNA-dimeren	Invitrogen
dNTP mix (10 mM)	Noodzakelijk voor goede efficiëntie cDNA-aanmaakreactie	Invitrogen
First Strand Buffer (5x)	Buffer nodig voor werking van SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen
Oligo dT (pro-2508)	Nodig voor efficiënte cDNA-aanmaak	Eurogentec
RT-PCR Grade Water	RNase vrij water voor qPCR	Ambion

2 METHODEN

2.1 OPGROEIEN BACTERIESTAMMEN

Lactobacillen werden opgegroeid onder microaërobe condities: de culturen werden stilstaand op 37°C geïncubeerd in vloeibaar MRS- of AOAC-medium. Indien nodig werd een antibioticum toegevoegd aan het medium. Lactobacillen konden ook opgegroeid worden in petrischalen met MRS-agar gedurende 48 uur. Lactobacillen species konden tot twee weken bewaard worden op vast medium op 4°C. Indien de stammen langere tijd bewaard dienden te worden, werden ze in de -80°C diepvries geplaatst als glycerolstocks. Glycerolstocks bestaan uit een 50% glyceroloplossing en eenzelfde volume vloeibare cultuur van de stam.

E. coli stammen werden overnacht opgegroeid in LB-medium of op LB-agarplaten, waaraan eventueel antibiotica toegevoegd werd. Vloeibare culturen worden overnacht in de schudincubator (200 rpm) geplaatst op 37°C: *E. coli* heeft namelijk aërobe condities nodig voor groei.

De groei van vloeibare culturen kon gevolgd worden door het meten van de optische dichtheid bij 595 nm (OD₅₉₅). In het labo werd dit gedaan met behulp van een Genesys UV-VIS spectrometer (Thermo Electron Corporation).

2.2 DNA-ANALYSE

2.2.1 PLASMIDE OPZUIVERING

Om plasmide-DNA op te zuiveren uit *E. coli* en LGG, werd gebruik gemaakt van commercieel beschikbare miniprep kits (zie 1.4.3), waarbij de instructies van de fabrikant werden gevolgd. Het basisprincipe voor deze opzuivering is een alkalische lysis van de cellen waarna het plasmide-DNA selectief gebonden wordt op een glasvezelfilter. Na het wegwassen van overbodige en vervuilende componenten, kan het DNA geëluëerd worden met behulp van de bijhorende elutiebuffer.

2.2.2 DNA-CONCENTRATIEBEPALING

De concentratie van nucleïnezuren in oplossing kon bepaald worden via agarose gelelektroforese (zie 2.2.3) of met behulp van de Nanodrop. Dit toestel kan via een spectrofotometrische methode de concentratie van het aanwezige DNA bepalen. Purines en pyrimidines absorberen namelijk in het UV-licht en de absorptiespectra van DNA en RNA bereiken dan ook een maximum bij 260 nm.

Om de concentratie te meten, werd eerst een blanco aangebracht: 1 µL van de vloeistof waarin de nucleïnezuren zijn opgelost. Daarna werd van elke DNA-oplossing 1 µL aangebracht op het toestel om de concentratiebepaling te doen.

2.2.3 DNA-GELELEKTROFORESE

Agarose gelelektroforese is een techniek om de grootte, concentratie en zuiverheid van DNA-fragmenten te bepalen. Agarose is een natuurlijk lineair polysaccharide dat oplost in TBE-buffer bij verwarming en bij kamertemperatuur polymeriseert tot een semi-vaste gel. Nucleïnezuren zijn polyanionisch en migreren in deze gel van de negatieve naar de positieve pool wanneer een elektrisch veld aangelegd wordt. De snelheid van deze migratie is omgekeerd evenredig aan de grootte van het fragment en de agaroseconcentratie, die in deze thesis meestal 0,9% bedroeg. De DNA-stalen werden gemengd met Blue Juice (1:6 verhouding), een gekleurde laadbuffer.

Eens de stalen op de gel waren aangebracht, werd hierover een elektrisch veld aangelegd van 120 V met een stroomsterkte van 500 mA gedurende één uur. Door bij het gieten van de gel enkele druppels ethidiumbromide (EtBr), een intercalerend agens, toe te voegen, konden na migratie de verschillende fragmenten DNA bekeken worden onder UV-licht. Met behulp van een merker met fragmenten van gekende grootte en concentratie (SmartLadder) kon de lengte van de fragmenten geverifieerd worden.

2.2.4 ISOLATIE DNA UIT AGAROSEGEL

Om een bepaald fragment DNA uit een gel op te zuiveren, werd dit heel precies uitgesneden. Met behulp van de 'QIAquick Gel Extraction kit' van Qiagen en de bijgeleverde instructies konden de DNA-fragmenten opgezuiverd worden. Het DNA werd daarbij gebonden op een silicagelmembraan, waardoor onzuiverheden in verschillende stappen konden weggewassen worden. Op het einde van deze procedure kon het DNA dan geëluëerd worden met de meegeleverde elutiebuffer.

2.2.5 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) is een techniek om specifieke DNA-sequenties te amplificeren. Door twee specifieke oligonucleotidenprimers te gebruiken die aanhechten op het matrijs-DNA aan weerszijden van het te amplificeren stuk, kan het tussenliggend gebied, of amplicon, in grote hoeveelheden aangemaakt worden.

Een volledige PCR-reactie bestaat uit een dertigtal cycli van telkens drie stappen. De eerste stap is de denaturatie van het dubbelstrenging matrijs-DNA bij hoge temperatuur (94°C). Daarna gebeurt de aanhechting van de specifieke primers ('annealing') aan hun complementaire sequenties. De annealing vindt bij een lagere temperatuur plaats die afhankelijk is van de lengte en het GC-gehalte van de primers. Ten slotte stijgt de temperatuur tot 72°C voor de synthese van de nieuwe DNA-strengen door het polymerase. Deze laatste stap heeft een snelheid van ongeveer 1 kb per minuut. Voor gewone PCR-reacties ter controle, werd gebruik gemaakt van het *Taq* polymerase, dat geen proefleesactiviteit bezit. Voor het aanmaken van nieuwe mutanten en belangrijke PCR-reacties werd het *Pfx* polymerase gebruikt dat wel over proefleesactiviteit beschikt. Wanneer gewerkt werd met *Pfx* was het wel noodzakelijk om de temperatuur in de laatste stap te verlagen tot 68°C. Voordat deze dertig cycli werden geïnitieerd, werd het mengsel

eerst 4 minuten opgewarmd tot 94°C om zeker te zijn dat alle dubbelstrengig DNA gedenatureerd werd. In het geval van colony-PCR op *Lactobacillus* cellen was een extra stap van 3 minuten in een microgolfoven op maximaal vermogen noodzakelijk. Na deze extra stappen konden de dertig PCR-cycli van start gaan.

De PCR-reacties werden uitgevoerd in een ‘Eppendorf Master Cycler Personal’ of ‘iCycler’ PCR toestel. De samenstelling van de verschillende PCR-reactiemengsels is weergegeven in onderstaande tabel (finale concentraties).

TABEL II-22: SAMENSTELLING PCR-REACTIEMENGSELS.

Component	<i>Taq</i> polymerase reactie	<i>Pfx</i> polymerase reactie
Primer 1	0,5 µM	0,3 µM
Primer 2	0,5 µM	0,3 µM
dNTPs	0,1 mM	0,3 mM
Buffer	0,1 µL/µL RV	0,1 µL/µL RV
DNA polymerase	0,02 U/µL	0,075 U/µL
Enhancer	-	0,1 µL/µL RV
MgSO ₄	-	1 mM
Matrijs-DNA	5 à 10 ng plasmide-DNA of 1 geïsoleerde kolonie	
Totaal Reactievolume (RV)	25 µL	50 µL

2.2.6 OPZUIVEREN VAN PCR-FRAGMENTEN

Na een PCR-reactie werden de geamplificeerde DNA fragmenten eventueel opgezuiverd met behulp van de ‘QIAquick PCR purification kit’ van Qiagen. De instructies van de fabrikant werden hierbij gevolgd en de werking is gebaseerd op dezelfde principes als deze van de kit om DNA-fragmenten op te zuiveren uit een agarosegel (zie 2.2.4).

2.2.7 RESTRICTIE DIGEST

Restrictie-endonucleasen zijn commercieel verkrijgbaar, samen met een bufferoplossing (10x) waarvan de samenstelling (ionische concentratie en pH) optimaal is voor de werking van het enzym. Ook de optimale incubatietemperatuur voor maximale enzymatische activiteit en de inactivatietemperatuur worden vermeld.

Het reactiemengsel voor een restrictiedigest bestaat uit DNA, milliQ water, restrictie-enzym en de bijbehorende buffer. In dit eindwerk werd meestal gewerkt in een reactiemengsel van 20 µL met een maximum van 1 µL enzym per 10 µL reactiemengsel. Om een volledige restrictie van het DNA te verkrijgen, werd het reactiemengsel minimum 1 uur op de optimale temperatuur geïncubeerd.

2.2.8 LIGATIE

2.2.8.1 'BLUNT' MAKEN VAN RESTRICTIEFRAGMENTEN

Het 5' uitstekende ('sticky') uiteinde van een restrictiefragment moest soms omgezet worden in een 'blunt' uiteinde met behulp van het Klenow polymerase. Dit enzym bezit polymerase- en 3'-5' exonuclease-activiteit, maar geen 5'-3' exonuclease-activiteit. Dit betekent dat 5' uitstekende uiteinden omgezet worden in een 'blunt' of even uiteinde door een invulreactie vanaf het 3' uiteinde. Om deze uiteinden 'blunt' te maken werd aan opgezuiverde DNA-fragmenten met 5' sticky uiteinden, 0,5 mM dNTPs, 0,1 µL polymerasebuffer per totaal volume (µL) en 0,05 U Klenow DNA polymerase per µL toegevoegd. Dit reactiemengsel werd gedurende 15 minuten geïncubeerd op 37°C, waarna het enzym geïnactiveerd werd door het mengsel 10 minuten te incuberen op 75°C.

2.2.8.2 DEFOSFORYLATIE VAN GELINEALISEERD VECTOR-DNA

Antarctic fosfatase is in staat om de 5' fosfaatgroepen af te splitsen, zodat de vector niet meer op zichzelf kan sluiten. Defosforylatie werd rechtstreeks op het digest uitgevoerd, na inactivatie van het gebruikte restrictie-enzym of na geleextractie. Aan het mengsel werd 0,1 µL defosforylatiebuffer en 0,4 U Antarctic fosfatase per µL totaal reactievolume toegevoegd, aangevuld met TE buffer. De defosforylatiemix werd gedurende 30 minuten geïncubeerd bij 37°C. Hierna werd het enzym geïnactiveerd door het toevoegen van 18 mM EDTA aan het mengsel en dit 15 minuten te incuberen op 65°C.

2.2.8.3 LIGATIE VAN DNA-FRAGMENTEN

Om DNA-fragmenten aaneen te koppelen is het noodzakelijk dat beide fragmenten complementaire of 'blunt' uiteinden hebben en dat één van beide uiteinden een 5'-fosfaatgroep bezit. Het T4-DNA-ligase is het enzym dat deze reactie katalyseert door te helpen bij de vorming van een fosfodiësterbinding tussen de uiteinden van beide dubbelstrengige DNA-moleculen: concreet tussen de 5'-fosfaat en de 3'-OH-groep. Bij het ligase wordt door de fabrikant een 5x ligatiebuffer geleverd, die optimale activiteit van het enzym garandeert.

Voor de ligatie van een insert in een vector is een optimale verhouding van beide componenten vereist. Bij het ligeren van 'blunt' uiteinden bedraagt deze verhouding 5/1, bij 'sticky ends' 4/1: 'blunt' ligatie heeft een veel lagere efficiëntie. Er moet ook rekening gehouden met de grootte van de te ligeren fragmenten, vandaar dat gewerkt wordt volgens volgende formule:

$$\frac{\text{insert (ng)}}{\text{vector (ng)}} = 5 (4) \times \frac{\text{MW}_{\text{insert}} (\text{bp})}{\text{MW}_{\text{vector}} (\text{bp})}$$

De nodige hoeveelheden vectoren en insert werden aangevuld met 0,05 µL ligasebuffer per µL reactievolume (15 of 20 µL) en 0,5 U ligase per µL. Het mengsel werd overnacht op kamertemperatuur geïncubeerd.

2.2.9 OVERDRACHT VAN PLASMIDEN

2.2.9.1 OVERDRACHT VAN PLASMIDEN NAAR *E. COLI* VIA CHEMISCHE TRANSFORMATIE

Transformatie is een proces waarbij DNA opgenomen wordt door cellen die competent gemaakt zijn: de celwanden van de meeste cellen zijn van nature niet permeabel voor DNA-moleculen. *E. coli* DH5 α cellen werden competent gemaakt met behulp van de ‘rubidiumchloride methode’ (Hanahan, 1985). De competente DH5 α cellen werden bewaard op -80°C. Er kon ook gewerkt worden met commerciële *E. coli* TOP10’F cellen. Aan 100 μ L cellen werd een gekozen hoeveelheid DNA toegevoegd (meestal 50 à 100 ng plasmide of maximum 10 μ L ligatiemengsel). De cellen werden 15 minuten geïncubeerd op ijs, waarna de cellen getransformeerd werden via ‘heat shock’. Dit betekent dat de cellen 5 maal afwisselend 30 seconden op 37°C en 30 seconden op ijs werden geplaatst. Na een tweede incubatie op ijs gedurende 15 minuten, werd 250 μ L SOC-medium toegevoegd. Daarna werden de cellen een uur schuddend op 37°C geïncubeerd, wat toeliet om de proteïnen noodzakelijk voor de antibioticumresistentie tot expressie te laten komen. Hierna werden verschillende volumes uitgeplaat op selectief medium en overnacht opgegroeid op 37°C.

2.2.9.2 OVERDRACHT VAN PLASMIDEN NAAR LGG VIA ELEKTROPORATIE

Voor de elektroporatie van plasmiden naar LGG werd het geoptimaliseerde protocol van De Keersmaecker *et al.* (2006b) gebruikt.

Om nieuw DNA in te brengen in LGG is het nodig om telkens verse competente cellen aan te maken. Hiervoor werd vertrokken van een pre-precultuur van LGG in 10 mL vloeibaar MRS-medium op 37°C. Deze werd de volgende dag overgeënt naar een precultuur in 10 mL MRS-medium waaraan 2% glycine werd toegevoegd. Glycine dient om de peptidebindingen in de celwand te verzwakken. Er werd een verdunningsreeks van de pre-precultuur aangemaakt: 100 μ L, 10 μ L, 1 μ L en 0,7 μ L. De volgende ochtend werden de OD₅₉₅ waarden gemeten van de vier culturen, waarbij MRS met 2% glycine als blanco werd gebruikt. Een exponentieel groeiende cultuur met een OD₅₉₅ tussen 0,7 en 1 werd gekozen en 5 mL ervan werd overgeënt in 100 mL voorverwarmde MRS met 2% glycine. Deze cultuur werd opgegroeid op 37°C, terwijl op regelmatige tijdstippen de OD₅₉₅ werd bepaald. Eens een OD-waarde van 0,2 bereikt, werd er ampicilline toegevoegd in een finale concentratie van 10 μ g/mL om de celwand extra te verzwakken. Wanneer de OD₅₉₅ een waarde van 0,3 à 0,4 bereikte (dit moest binnen de 3 à 4 uur gebeuren, om de elektroporatie-efficiëntie te garanderen), kon de cultuur gecentrifugeerd worden (15 min, 6000 rpm, 4°C). Hierna werden de cellen gewassen met eenzelfde hoeveelheid wasbuffer, waarbij de pellet voorzichtig terug werd opgelost. Hierna volgde opnieuw een centrifugatiestap, waarna het wassen nogmaals werd herhaald. De bekomen pellet werd opgelost in 1 mL wasbuffer en het mengsel werd verdeeld in aliquots van 100 μ L, die onmiddellijk gebruikt werden om een hoge efficiëntie te garanderen.

Voor de eigenlijke elektroporatie naar LGG werden de verse competente LGG cellen 20 minuten op ijs geïncubeerd. Vervolgens werd 200 à 2000 ng DNA (in een maximaal volume van 10 µL) aan deze cellen toegevoegd en werd het geheel overgebracht in gekoelde elektroporatiecuvetten (elektrode-opening van 2 mm). De elektroporatie werd uitgevoerd bij 1,7 kV, 200 Ω, 25 µF (Gene Pulser, Biorad). Er werd onmiddellijk recuperatiemedium aan de cellen toegevoegd, waarna deze 3 uur op 37°C werden geïncubeerd. Vervolgens werden de cellen uitgeplaat op selectief MRS-medium.

2.2.9.3 SELECTIE VAN RECOMBINANTEN

Om een onderscheid te kunnen maken tussen cellen die het plasmide hadden opgenomen (recombinanten) en cellen die het plasmide niet bevatten, werden de getransformeerde kolonies uitgeplaat op selectief medium. Op het ingebrachte plasmide was steeds een gen aanwezig dat codeerde voor een antibioticumresistentie die niet eigen was aan de gastheercel. Door toevoeging van het antibioticum aan het groeimedum konden enkel de correct gerecombineerde cellen geselecteerd worden. In de meeste gevallen werd nog een controle PCR uitgevoerd om zeker te zijn dat de correcte recombinante stam bekomen was.

2.3 BIOSCREEN

De verschillende stammen werden in het toestel (Bioscreen C, LabSystems Ltd. Oy) opgegroeid en om de 15 minuten werd een OD-meting uitgevoerd op 600 nm. Net voordat de OD gemeten werd, werden de platen even geschud om de stalen te homogeniseren en een accurate meting van de OD₆₀₀ te bekomen (Perea Vélez *et al.*, 2007a).

Concreet werden overnachtculturen van de bestudeerde stammen die ongeveer 10⁸-10⁹ CFU/mL bevatten, 15000 keer verdund in MRS-medium. Van deze verdunding werd telkens 3 µL toegevoegd aan elke well. Een bioscreenplaat bestaat uit 100 wells en per well wordt er 300 µL medium aangebracht. Per geteste conditie werd een blanco aangebracht en elke stam werd per conditie in drievoud herhaald.

TABEL II-23: GETESTE CONDITIES IN BIOSCREENANALYSE.

Conditie	Aard	Concentratie
MRS	Groeimedum	-
AOAC	Groeimedum	-
mTSB	Groeimedum	-
AOAC + bile	Conditie gal nabootsen	0,2%
mTSB + mucin	Conditie maag nabootsen	2,5 g/L
MRS pH 5 (mbv HCl)	Zure condities maag	-
MRS + Nisin	Kationisch peptide	1,5 µg/mL

MRS + Lysozyme	Peptidoglycaan hydrolase	20 µg/mL
MRS + SDS	Anionisch detergent	0,015%
MRS + Bacitracin	Antibiotisch polypeptide	10 µg/mL

2.4 EXTRACTIE VAN CELWANDPOLYSACHARIDEN

Om de exopolysachariden (EPS-b) aanwezig op de celwand van LGG te extraheren kan gebruikt gemaakt worden van twee verschillende methoden: sonicatie en EDTA-precipitatie (beschreven door Tallon *et al.*, 2003).

Bij de weergegeven resultaten werd gebruikt gemaakt van sonicatie. Daartoe werden preculturen van de te testen stammen opgegroeid in MRS en de volgende ochtend overgeënt in 300 mL AOAC (minder achtergrond van polysachariden uit het medium). De dag erop werd de OD₅₉₅ van de culturen gemeten en werd een staal van 1 mL genomen voor het bepalen van de CFU's. De 300 mL-culturen werden gecentrifugeerd op 9500 rpm gedurende 15 minuten op 4°C. De bekomen pellet werd gewassen met 125 mL NaCl (0,9%) en opnieuw volgde een centrifugestap. Hierna werd de pellet geresuspendeerd in 10 mL NaCl (1 M) en de stalen werden gedurende één uur op ijs geplaatst. Alle stalen werden twee keer een minuut gesoniceerd op 60 W en één keer één minuut op 90 W. Waarna deze opnieuw werden gecentrifugeerd, dit keer gedurende 30 minuten op 7250 rpm en 4°C. De supernatans van deze stalen werden overgebracht in nieuwe centrifugeerbuisjes en aangevuld met 2 volumes ijskoude ethanol (100%). Het geheel werd overnacht stilstaand geïncubeerd op 4°C. De volgende dag werden, na centrifugatie, de pellets geresuspendeerd in 2 mL milliQ water en werden deze gedurende twee dagen gedialyseerd (membraan met cut-off van 6-8000 kDa) tegen 5 L gedestilleerd water met enkele verversingen per dag. Ten slotte werd de concentratie (hoeveelheden glucose per 10⁹ CFU) bepaald van de bekomen CW-PS extracten via de fenol/zwavelzuur methode van Dubois (1956) met een glucose standaard. Voor een suikermonomeeranalyse werden de stalen opgestuurd voor een HPLC-analyse.

2.5 CELWANDPROTEÏNEN ANALYSE

2.5.1 EXTRACTIE CELWANDGEASSOCIEERDE PROTEÏNEN

Er werd vertrokken van een precultuur in MRS, die overgeënt werd naar 300 mL AOAC. De volgende dag werden de cellen geogst door 20 minuten te centrifugeren op 7500 rpm en 4°C. De pellet werd een vijftal minuten op ijs geplaatst vooraleer deze gewassen werd met 16 mL van een oplossing met NaCl (0,9%), 1 mM PMSF (protease inhibitor) en 5 mM EDTA. Het geheel werd enkele uren op ijs geïncubeerd vooraleer dit 20 minuten gecentrifugeerd werd op 7500 rpm en 4°C. De bekomen pellet werd geresuspendeerd in 5 mL koude TES buffer met 50 µL PMSF (100x). Opnieuw volgde een centrifugatiestap, waarna de pellet werd geresuspendeerd in 1 mL koude TES buffer. Daaraan werd 100 µL lysozyme, 10 µL PMSF (100x) en 50 µL mutanolysine

toegevoegd en dit mengsel werd gealiquoteerd. De microcentrifugeerbuisjes werden gedurende een uur schuddend geïncubeerd op 37°C. Daarna werden deze vijf minuten gecentrifugeerd op 11000 rpm bij kamertemperatuur. De bekomen supernatans werden gealiquoteerd en bewaard bij -20°C. Om de concentratie te bepalen van de bekomen celwandproteïnen werd gebruikt gemaakt van de 2-D Quant Kit van Amersham.

2.5.2 1D SDS-PAGE

De eerder bereide stalen werden volgens grootte gescheiden op commerciële ‘NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels’ (Invitrogen) met behulp van het ‘XCell SureLock™ systeem’ (Invitrogen). De stalen werden voorbereid volgens het protocol dat geleverd werd bij de gels. De gels werden een vijftigtal minuten gerund bij een constant voltage van 200 V. De stroom over elke gel bedroeg bij de start van de run 100-125 mA, naar het einde toe was dit nog 60-80 mA. Nadien werden de gels gekleurd met ‘Sypro Ruby Total Stain’ (Invitrogen).

2.5.3 2D-GELELEKTROFORESE EN WESTERN BLOT

2.5.3.1 EERSTE DIMENSIE: ISO-ELEKTRISCHE FOCUSING

Vooraleer de proteïnestalen op gel werden gezet, werd een TCA-precipitatie uitgevoerd om contaminaties te verwijderen die zouden kunnen interfereren met de elektroforese. Daartoe werd er 1 volume 100% TriChloroAcetaat (TCA) toegevoegd aan 4 volumes proteïnestaal. Na dit tien minuten te incuberen op 4°C, werden de stalen gecentrifugeerd gedurende vijf minuten (14000 rpm). De bekomen pellet werd geresuspendeerd in 200 µL koude aceton en opnieuw werd dit gecentrifugeerd. Deze wasstap werd nogmaals herhaald en de residuele aceton werd nadien verwijderd door het centrifugeerbuisje een tiental minuten op 95°C te zetten.

De stalen werden nadien geladen op klaargemaakte IPG strips (Immobiline DryStrip gels, Amersham) met een pH-gradiënt van 4 tot 7. Deze strips dienen voor gebruik gerehydrateerd te worden. De rehydratatie-oplossing bestond uit: ureum om de proteïnen op te lossen en te denatureren, detergent om hydrofobe proteïnen op te lossen en ongewenste aggregatie van proteïnen tegen te gaan, dithiothreitol (DTT) om de disulfidebruggen te breken zodat alle proteïnen volledig denatureren (reductans) en IPG Buffer (Amersham). IPG buffer is een mengsel van amfolyt en zorgt voor een optimale scheiding van de aanwezige proteïnen. Bovendien lossen de stalen beter op in de gel, is het experiment minder gevoelig aan zouten en stijgt de conductiviteit in de gel. De IPG buffer is specifiek voor de pH-range van de gebruikte strip. De gelstrip werd een nacht passief gerehydrateerd (zonder elektrisch veld) in de rehydratatie-buffer, het geheel werd bedekt met olie om vorming van kristallen en uitdrogen tegen te gaan.

De volgende dag werd de olie weggewassen in gedestilleerd water en konden de strips geladen worden. De strips werden op het Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System geplaatst. Aan de uiteinden van elke strip werd telkens een ‘electrode pad’ aangebracht: dit is een stukje dik filterpapier dat bevochtigd werd in gedestilleerd water. Deze pads absorberen het overtollige

water dat vrijkomt tijdens de iso-elektrische focusing. De stalen konden geladen worden via speciale ‘samplecups’, waarin de stalen (100 μ L) makkelijk konden worden gepipeteerd. Bovenop de stalen en de gelstrips werd opnieuw een olie-achtige substantie aangebracht om verdamping te voorkomen.

Iso-elektrische focusing is een proces dat plaatsvindt bij hoge voltages (tot 8000 V) en een eerder lage stroom per strip (50 μ A/strip), dit is vooral te wijten aan de lage ionische sterkte die heerst in de IPG strips. Terwijl de proteïnen naar hun iso-elektrisch punt migreren, zal de stroom dalen en het voltage stijgen. Bij de afgebeelde strips werd gewerkt met onderstaand runprotocol (Tabel II-20).

TABEL II-24: RUNPROTOCOL ISO-ELEKTRISCHE FOCUSING.

Stap	Voltage	Vhr
1: constant	300 V	200 Vhr
2: gradiënt	1000 V	300 Vhr
3: gradiënt	5000 V	4000 Vhr
4: constant	5000 V	2000 Vhr

Na het uitvoeren van deze 1D proteïnenscheiding kunnen de strips eventueel bewaard worden op -20°C .

2.5.3.2 TWEDE DIMENSIE: SDS-PAGE

SDS-PAGE of SDS-PolyAcrylamideGelElektroforese is een methode om polypeptiden te scheiden volgens hun moleculair gewicht. SDS of natrium dodecyl sulfaat is een anionisch detergent dat globulaire micellen vormt en zo complexen kan vormen met proteïnen. Hoe groter het proteïne, hoe meer SDS ermee zal binden.

Vooraleer de strips klaar waren om de proteïnen in een tweede dimensie te scheiden, moesten deze behandeld worden met SDS Equilibration Buffer. Deze buffer bevat componenten die essentieel zijn voor een goede 2D-scheiding: Tris-HCl met een pH 8,8 om de scheiding in de eerste dimensie stabiel te houden, ureum en glycerol om een goede transfer van de proteïnen van de eerste naar de tweede dimensie te garanderen, SDS om de proteïnen te denatureren en tracking dye om de elektroforese visueel te kunnen volgen.

Elke strip wordt gewassen in 10 mL SDS Equilibration buffer waar 100 mg DTT aan toegevoegd werd. DTT zorgt ervoor dat de proteïnen volledig gereduceerd en gedeneureerd blijven. Nadien werden alle strips nogmaals gewassen in 10 mL SDS Equilibration bufer met 250 mg iodoacetamide. Iodoacetamide zal de thiolgroepen van de proteïnen alkyleren zodat deze niet kunnen oxideren tijdens de elektroforese, bovendien worden ongewenste reacties van cysteine residus tegengegaan. Tijdens het wassen werden de strips gedurende een kwartier langzaam geschud.

De strips werden aangebracht op commerciële ‘Novex® Tris-Glycine gels’ (Invitrogen) en geladen volgens het bijgevoegde protocol. De run nam een negentigtal minuten in beslag bij een constant voltage van 125 V en de stroom per gel bedroeg 30-40 mA bij aanvang en 8-12 mA naar het einde van de run toe.

2.5.3.3 WESTERN BLOT

Eerst werd een polyvinylidenedifluoride (PVDF) membraan zo geknipt dat het even groot was als de polyacrylamide gel, evenals 2 stukjes Wattman 3MM papier. Het PVDF-membraan werd enkele seconden bevochtigd in methanol, waarna alle methanol werd weggewassen in gedestilleerd water. Het membraan werd tenslotte enkele minuten in CAPS-buffer geplaatst. Ook de Wattman-papierjes, enkele sponsjes en de 2D-gel werden enkele minuten in CAPS-buffer bevochtigd.

Er werd gewerkt met de ‘XCell II™ Blot Module’ (Invitrogen). Per blotmodule konden telkens twee gels aangebracht worden om te blotten. Het geheel werd een uur gerund op 50 mA per gel, 100 mA per systeem dus en bij een constant voltage van 25 V.

2.5.3.4 DETECTIE WESTERN BLOT MET P75 ANTILICHAAM

De blots werden eerst gerehydrateerd in methanol en in gedestilleerd water. De eerste stap is de blocking stap: daarbij werden de blots twee uur geïncubeerd op een schudincubator (30 rpm) in in TTBS-buffer met Ca^{2+} , Mg^{2+} en 3 % BSA. Daarna werden de blots drie maal vijf minuten al schuddend gewassen in TTBS-buffer met Ca^{2+} en Mg^{2+} . Nadien konden de blots behandeld worden met het primair antilichaam, nl. het p75 antilichaam (1/10000) dat werd opgelost in TTBS. Het geheel werd een uur op een schudplaat geplaatst, waarna de membranen opnieuw drie maal gewassen werden met TTBS buffer met Ca^{2+} en Mg^{2+} . Hierna kon het secundair antilichaam aangebracht worden: Goat-anti-Rabbit opgelost in TTBS. Dit secundaire antilichaam is geconjugeerd met Alkalisch Fosfatase. De membranen werden een uur al schuddend geïncubeerd met dit tweede antilichaam. Nadien werden de membranen opnieuw gewassen in TTBS met Ca^{2+} en Mg^{2+} . Om de membranen te ontwikkelen werd het substraat toegevoegd waarop het Alkalisch Fosfatase werkzaam is: Alkalisch Fosfatase buffer (AP-buffer) waaraan NBT en BCIP als substraat werd toegevoegd. De membranen werden in deze vloeistof geïncubeerd tot alle spots duidelijk zichtbaar werden op de gels. Om de kleurreactie te stoppen werden de membranen een tiental minuten te weken gelegd in STOP-buffer. Ten slotte werden de membranen gedroogd op Wattman papier.

2.6 ADHESIE-EXPERIMENTEN

2.6.1 MICRO-AËROBE BIOFILMVORMING

Er werd een biofilmassay uitgevoerd waarbij de stammen in verschillende condities geënt werden in 96-well platen (Nunc), waarin een deksel met polystyreenkegeltjes (Nunc) kon

gehangen worden. Het is op deze kegeltjes dat de stammen zich konden aanhechten en biofilm vormen. Na 72 uur incubatie (met drie verversingen) werden de biofilms gekleurd met kristalviolet en de mate van biofilmvorming werd uitgelezen met behulp van een spectrofotometer. Op die manier konden de stammen ten opzichte van elkaar vergeleken worden in de verschillende condities. Er werden telkens ook blanco-stalen van elk medium aangebracht. Daar er gewerkt werd met LGG, een anaërobe stam, werden de microtiterplaten geïncubeerd in speciale luchtdichte containers (BBL), waar een Gaspack (BBL) werd in geplaatst om de condities binnenin de container zoveel mogelijk anaëroob te maken.

Een biofilmassay nam een vijftal dagen in beslag. Op de eerste dag werden de precultuur geënt in MRS-medium en overnacht geïncubeerd op 37°C. De tweede dag worden de 96-well platen geënt. De overnachtcultuur werd 1/100^e verdund in elk medium dat getest werd. In elke well werd 200 µL van elke cultuur aangebracht, waarbij het belangrijk was om van elke conditie genoeg herhalingen te voorzien en een blanco als negatieve controle. Eens geënt, kon het deksel met kegels op de plaat gezet worden en volgde incubatie op 37°C. De volgende dag werd het medium verversst in een nieuwe steriele microtiterplaat en werd het deksel met de kegels gewoon op de nieuwe plaat geplaatst. Opnieuw volgde incubatie overnacht, waarna de volgende dag dit verversingsproces herhaald werd. De vijfde dag werden de kegels even gewassen in een microtiterplaat met 200 µL PBS en daarna 30 minuten in een microtiterplaat met 200 µL kristalvioletoplossing (vers gemaakt) gehangen. De kegels werden daarna gewassen in een plaat met A.D. De deksels werden dan met de kegels naar boven gericht aan de lucht te drogen gelegd gedurende een dertigtal minuten. Ten slotte werden de kegels ontkleurd in een microtiterplaat met 30% azijnzuur en werd de OD₅₇₀ uitgelezen met een microtiterplaatlezer (Versamax).

TABEL II-25: GETESTE CONDITIES IN DE BIOFILMASSAY.

Conditie	Aard	Concentratie
MRS	Groeimedium	-
AOAC	Groeimedium	-
mTSB	Groeimedium	-
AOAC + bile (Sigma Aldrich)	Conditie gal nabootsen	0,2%
mTSB + mucin	Conditie GIT nabootsen	2,5 g/L

2.6.2 ADHESIE AAN CACO-2 CELLEN

De Caco-2 cellen werden opgegroeid in speciale 12-well platen (Greiner) tot ze een tweetal weken oud waren. Per stam die werd getest, werden er drie herhalingen (3 wells met 'cellmonolayers') uitgevoerd.

Er werd vertrokken van een precultuur van de testen stammen, waarvan de OD₆₀₀ gemeten werd. Aan de hand van de OD₆₀₀ kon de hoeveelheid van de overnachtcultuur berekend worden die

nodig was voor het experiment, nl. 6×10^7 CFU (voor 3 wells). Daarbij kon er vanuit gegaan worden dat een OD_{600} van 0,25 ongeveer overeenkomt met 10^8 CFU/mL.

De berekende hoeveelheid cultuur werd overgebracht in microcentrifugeerbuisjes en gedurende 5 minuten gecentrifugeerd op 8000 rpm. De bacteriën werden daarna gewassen met 200 μ L PBS (1x, pH 5,8) en opnieuw 5 minuten gecentrifugeerd op 8000 rpm. De pellet werd geresuspendeerd in 6 mL DMEM zonder FBS (voor 4 wells, overmaat). De bacteriën werden nadien op 4°C bewaard tot de start van het experiment.

De Caco-2 cellen werden twee keer gewassen met voorverwarmd PBS (1x, 37°C). Per well werd 1,5 mL aangebracht. Het is daarbij van belang om de vloeistof tegen de rand te pipeteren en nooit rechtstreeks op de cellen, om de laag Caco-2 cellen niet te beschadigen. Na deze wasstappen werden de bacteriën toegevoegd: 1,5 mL/well van de eerder aangemaakte 10^7 CFU/mL oplossing. Een halve milliliter van deze oplossing werd bijgehouden en verdund in PBS (verdunningsreeks tot 10^{-5}), waarvan de verdunningen 10^{-3} tot 10^{-5} in drievoud werden uitgeplaat. Deze controlestep was nodig om te bepalen hoeveel bacteriën exact toegevoegd werden aan de Caco-2 cellen.

De bacteriecellen en de Caco-2 cellen werden 1 uur geïncubeerd op 37°C in de CO₂ incubator. Nadien werden de cellen opnieuw twee maal gewassen met voorverwarmd PBS (1x, 37°C). Aan elke well werd vervolgens 100 μ L trypsine toegevoegd. De platen werden 10 minuten met deze oplossing geïncubeerd op 37°C. Ten slotte werd overal 900 μ L PBS (1x) aangebracht en werden de Caco-2 cellen losgemaakt door goed op en neer te pipeteren. Van dit mengsel werd opnieuw een verdunningsreeks gemaakt en uitgeplaat. Op die manier kon nagegaan worden hoeveel bacteriecellen effectief konden adhereren aan de epitheelcellen.

2.7 IN VIVO EXPERIMENTEN: PERSISTENTIE IN MUIZEN

Er werd gewerkt met vier vrouwelijke Balb/c muizen van zes tot acht weken oud. De experimenten werden goedgekeurd door het ethisch comité van de K.U.Leuven dat experimenten met proefdieren superviseert (Projectnummer: 027/2008). Aan elke muis werd gedurende drie dagen een gavage toegediend met daarin gelijke hoeveelheden van wild type LGG (CMPG5430) en de *rfaG* mutant (CMPG10206). Het speciale aan de gebruikte wild type stam (CMPG5430) is dat deze beschikt over een tetracycline en een erythromycine resistentiecassette. De *rfaG* mutant beschikt enkel over een tetracycline resistentiecassette. Op die manier kon makkelijk een onderscheid gemaakt worden tussen een wild type kolonie en een mutante kolonie.

Het is van groot belang dat de gavagestalen die de muizen toegediend krijgen, goed uitgebalanceerd zijn en bestaan uit evenveel mutante als wild type bacteriën. Daartoe werd van beide stammen een precultuur opgezet in MRS, die de dag nadien overgeënt werd in 50 mL MRS. De volgende ochtend werd de OD_{595} van beide culturen gemeten en werd het aantal CFU's berekend. Het uiteindelijke doel was om zowel 10^9 wild type cellen als 10^9 mutante cellen in elk staal te bekomen. Daartoe werden de 50 mL-culturen afgedraaid en werden de

pellets gewassen met 20 mL PBS. Na centrifugatie werd de pellet opgelost in de berekende hoeveelheid PBS om het correcte aantal cellen te bekomen. De twee culturen werden samengebracht, zodat een mix ontstond met exact evenveel *rfaG* mutanten als wild type micro-organismen. Deze mix werd gealiquoteerd in microcentrifugeerbuisjes: 1 mL per gavage. Aan elke muis werd elke dag, gedurende drie dagen, 100 μ L toegediend (10^9 CFU's van elke stam). Om na te gaan of deze mix die toegediend werd aan de muizen, goed in balans was, werd van elk gavagestaal ook een beetje genomen om te verdunnen en uit te platen. De stalen werden verdund tot 10^{-7} en uitgeplaat op MRS met tetracycline en op MRS met erythromycine. Door de kolonies te tellen op beide platen en deze te vergelijken, kon de verhouding wild type over mutant bepaald worden.

Zo'n zes uur na de eerste gavage werd van elke muis een faecesstaal geïncubeerd, wat werd gewogen en opgelost in PBS met glycerol. Ook van deze stalen werd een verdunningsreeks gemaakt die uitgeplaat werd op MRS platen met tetracycline. Na telling werden van deze platen tweehonderd kolonies aangestipt en overgezet op grote vierkante platen met MRS-Tc en MRS-Ery. Op die manier kon gescreend worden hoeveel van de kolonies wild type waren en hoeveel er mutant waren. De faecesstaalnames werden herhaald op verschillende tijdstippen: 24 uur, 30 uur en 48 uur na de eerste gavage.

Na drie gavages of zo'n vijftig uur na de eerste gavage, werden de muizen gedood via cervicale dislocatie. Er werd een dissectie uitgevoerd waarbij de maag, het ileum, het caecum en het colon werden geïncubeerd. Daarnaast werd ook de inhoud van bovengenoemde organen verzameld. Deze stalen werden gewogen en opgelost in PBS met glycerol. De organen werden met een steriel scalpel in heel kleine stukjes gesneden, zodat de micro-organismen die aangehecht zijn op de verschillende onderdelen van het GIT vrijkwamen. Opnieuw werden verdunningsreeksen gemaakt van deze stalen en deze werden uitgeplaat op MRS met tetracycline. Alle kolonies op deze platen werden geteld en ook hier werden telkens tweehonderd kolonies overgezet op platen met MRS-Tc en MRS-Ery. Door beide platen te vergelijken kon het percentage *rfaG* mutanten ten opzichte van wild type LGG bepaald worden op verschillende plaatsen in het GIT.

2.8 IMMUUNEXPERIMENTEN

Er werd opnieuw gewerkt met Caco-2 cellen die geïncubeerd waren aan 12 well-platen. Per stam werden er twee herhalingen uitgevoerd. Er werd ook een *Salmonella*-stam meegenomen (SL1344) als positieve controle. Als negatieve controle werd DMEM-medium zonder FBS meegenomen.

Twee dagen voor het experiment werd een pre-precultuur aangemaakt van de te testen stammen in MRS. De dag voor het experiment werd uitgevoerd, werd het medium van de Caco-2 cellen veranderd naar DMEM zonder FCS. De preculturen in MRS werden de volgende dag overgeënt naar AOAC.

De dag van het experiment zelf werd een OD₆₀₀ meting uitgevoerd. Voor 3 wells (1 well overmaat) was het nodig om 6×10^7 CFU mee te nemen. Bij *Salmonella* komt een OD₆₀₀ van 1 overeen met ongeveer 5×10^8 CFU/mL. De juiste hoeveelheid overnachtcultuur werd overgebracht in microcentrifugeerbuisjes en gedurende 5 minuten gecentrifugeerd op 8000 rpm. De bacteriën werden daarna gewassen met 100 µL PBS (1x) en terug 5 minuten gecentrifugeerd op 8000 rpm. De cellen werden nadien geresuspendeerd in DMEM-medium zonder FBS. De bacteriën waren op dat moment klaar voor incubatie met de Caco-2 cellen en werden op 4°C bewaard tot het experiment van start ging.

Het DMEM-medium werd verwijderd van de Caco-2 cellen en deze werden twee keer gewassen met voorverwarmd PBS (1x, 37°C). Het was belangrijk om tegen de rand van de wells te pipeteren en niet rechtstreeks op de Caco-2 cellen om de epitheellaag niet te beschadigen. Per well werd 1,5 mL van de testen stammen aangebracht en de platen werden 1,5 uur geïncubeerd in de CO₂ incubator op 37°C. Daarna werden de cellen opnieuw gewassen met voorverwarmd PBS (1x, 37°C). Per well werd 200 µL PBS toegevoegd om de cellen in op te lossen.

Met behulp van de 'High pure RNA isolation kit' (Roche) werd een RNA-isolatie uitgevoerd volgens het meegeleverde protocol. cDNA werd aangemaakt met behulp van Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) en het meegeleverde protocol. Zowel RNA- als cDNA-stalen werden nadien bewaard op -20°C.

De bekomen cDNA-stalen werden meegenomen in een qPCR-reactie. Per staal werden twee herhalingen uitgevoerd en elk staal werd telkens getest met primers voor een housekeeping gen (PPiA) en met primers voor IL-8. Als negatieve controle werd water meegenomen.

DEEL III: RESULTATEN

1 AANMAAK EN SITUERING *RFA*G MUTANT

1.1 HET *RFA*G GEN

Om de opbouw en functionaliteit van de celwand van LGG te ontrafelen, worden er in het CMPG verschillende knock-out mutanten gemaakt. Deze mutanten moeten helpen om de moleculaire mechanismen op te helderen die aan de basis liggen van bepaalde probiotische effecten. Deze mutanten zijn telkens geraakt in een gen dat verband houdt met de opbouw van de celwand. De vergelijking van de eigenschappen van deze mutanten met de eigenschappen van LGG wild type kan meer inzichten opleveren over de precieze opbouw van de celwand van LGG en de moleculaire werking van probiotica.

Glycanen (op eiwitten, teichoïnezuren, andere macromoleculen of als exopolysachariden) met hun grote verscheidenheid in monomeerbouwstenen, lengte, vertakking... dragen bij tot belangrijke stamspecifieke structurele verschillen in de celwandstructuur van verschillende probioticastammen. Ze vormen met andere woorden de ideale macromoleculen om specifieke verschillen tussen probioticastammen te gaan verklaren (Lebeer *et al.*, 2008b) In het CMPG-labo zijn we dan ook geïnteresseerd in de functionaliteit van suikermoleculen aanwezig op de oppervlaktmoleculen. Dit onderzoek moet uiteindelijk meer inzicht brengen in de rol die suikermoleculen spelen bij de interactie van probiotica met de gastheer.

Het is in dit onderzoek dat de *rfaG* mutant, die in deze thesis werd ontwikkeld, kadert. Het *rfaG* gen (LGG_01069) werd daarbij uitgeschakeld in wild type LGG. Het genoom van LGG werd nog maar recent gepubliceerd (Kankainen *et al.*, 2009). Volgens de huidige annotatie van het *rfaG* gen zou het coderen voor een 'putative glycosyltransferase linked to the modification of wall teichoic acid'. Hierbij moet de kanttekening gemaakt worden dat tot nog toe niet bewezen kon worden dat LGG over WTA beschikt, de aanwezigheid van LTA op het celwandoppervlak van LGG kon wel worden aangetoond (Perea Vélez *et al.*, 2007a). Op basis van BLAST analyses kon wel een grote analogie waargenomen worden tussen de *rfaG* sequentie in LGG en deze van glycosyltransferases in andere, verwante species.

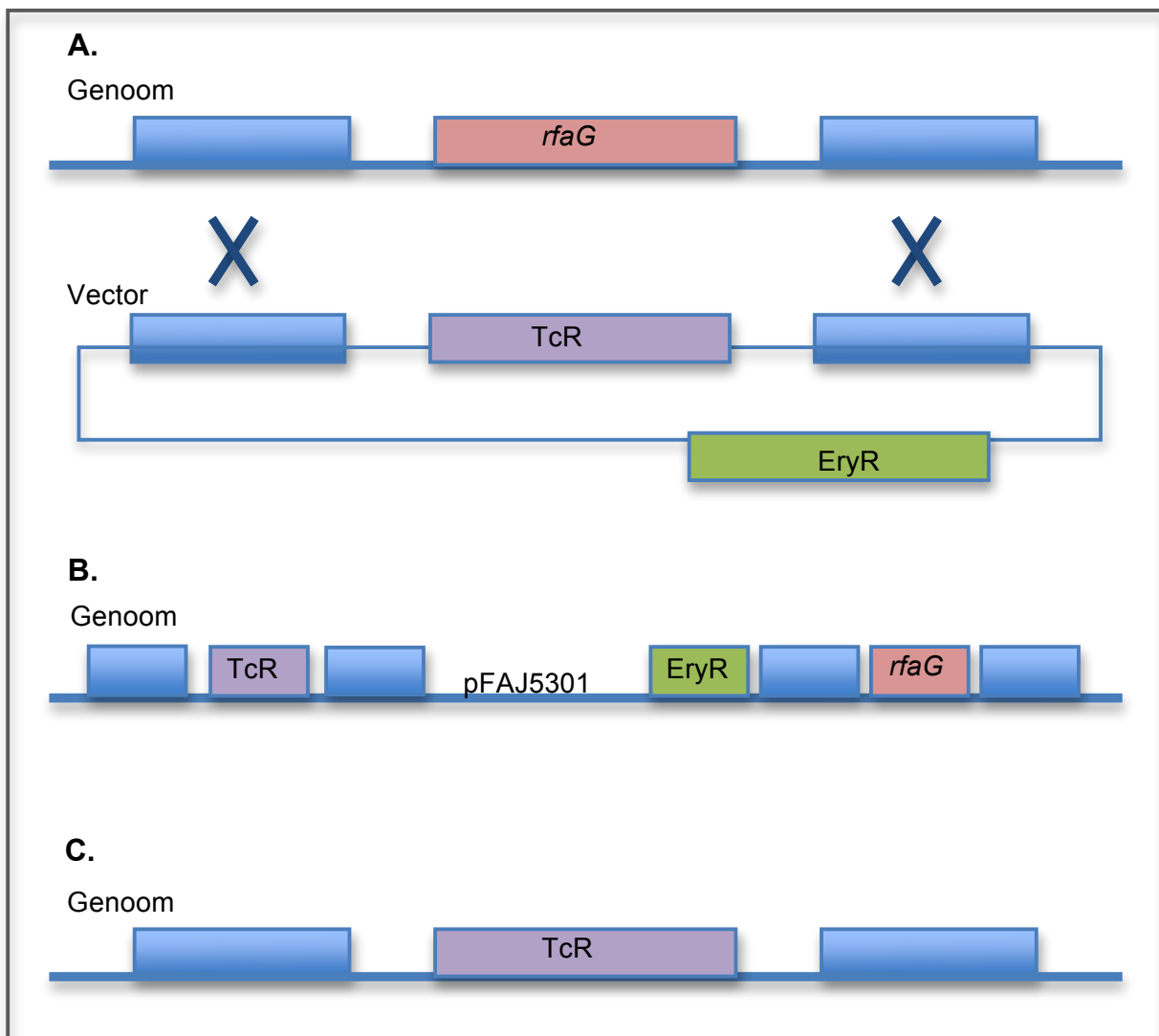
De nieuwe *rfaG* mutant zal verderop in deze thesis vergeleken worden met eerder aangemaakte mutanten van LGG. De meeste van deze LGG mutanten zijn al grotendeels gekarakteriseerd: er is geweten welk gen precies uitgeschakeld werd en wat de impact daarvan is op bepaalde aspecten van de functionaliteit van LGG.

1.2 CONSTRUCTIE VAN EEN *RFA*G KNOCK-OUT MUTANT

De *rfaG* mutant werd aangemaakt met behulp van het principe van dubbele homologe recombinatie. Dit houdt in dat het gen uitgewisseld werd met een tetracycline

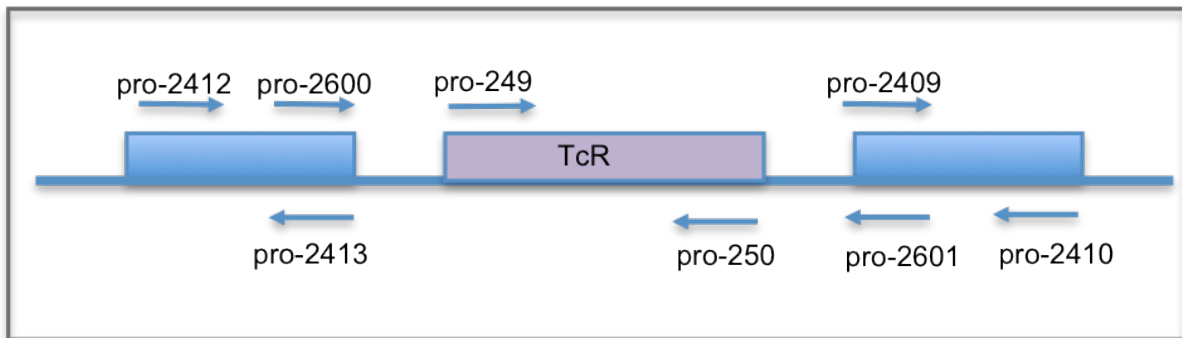
resistentiecassette aanwezig op een zelfmoordplasmide. Doordat het gen en de resistentiecassette geflankeerd werden door exact dezelfde genensequenties kon er een ‘crossing-over’ gebeuren van het genetisch materiaal.

Bij dubbele homologe recombinatie zal het genetisch materiaal tussen beide homologe sequenties uitgewisseld worden (Fig. III-1, situatie A en C). De tetracyclinecassette wordt daarbij geïntegreerd in het genoom, terwijl het uitgeschakelde gen samen met het zelfmoordplasmide uit de cel verdwijnt. Afhankelijk van de efficiëntie waarmee recombinatie optreedt – sommige stukken DNA lenen zich beter tot recombinatie dan andere – komt ook enkelvoudige homologe recombinatie voor. Daarbij is er één ‘crossing-over’ tussen de beide strengen, waardoor de vector mee geïntegreerd wordt in het genoom (Fig. III-1, situatie B).



FIGUUR III-1: HOMOLOGE RECOMBINATIE BIJ CONSTRUCTIE VAN *rfaG* MUTANT. (A) Detail van principe van dubbele homologe recombinatie. Zowel het targetgen (rood) als de tetracycline resistentiecassette (paars) worden geflankeerd door dezelfde homologe sequenties (blauw), er kan dus ‘crossing-over’ optreden. (B) Enkelvoudige homologe recombinatie. Als er slechts ‘crossing-over’ is bij één van de homologe sequenties, wordt de vector grotendeels geïntegreerd in het genoom. (C) Dubbele homologe recombinatie. Het *rfaG* gen werd volledig vervangen door de tetracycline resistentiecassette, dit is de beoogde situatie bij de constructie van de mutant.

Er werd gewerkt met het zelfmoordplasmide pFAJ5301 die zowel een tetracycline als een erythromycine resistentiecassette bevat. Door gebruik te maken van een zelfmoordplasmide dat niet kan repliceren in de gastheer, werd de vector verwijderd uit LGG bij onsuccesvolle recombinatie. Met behulp van primers die herkenningssequenties bevatten voor restrictie-enzymen konden de homologe sequenties links en rechts van de tetracyclinecassette worden aangebracht (links: pro-2412 en pro-2413, rechts: pro-2409 en pro-2410) (Fig. III-2).



FIGUUR III-2: PRIMERS VOOR AANMAAK EN CONTROLE VAN *rfaG* MUTANT. De primers pro-2412, 2413, 2410 en 2409 werden aangewend om het homologe construct aan te maken in pFAJ5301. Het construct werd gecontroleerd met behulp van het primerkoppel pro-2600 en pro-2601. pro-249 en pro-250 zijn primers die annealen op de tetracycline cassette zelf en ook ter controle konden aangewend worden. Primers pro-2600 en pro-2601 werden ook gebruikt om het complementatieconstruct aan te maken.

Na verificatie van het construct met PCR, kon het plasmide via elektroporatie geïntroduceerd worden in LGG. Om na te gaan of de dubbele homologe recombinatie succesvol was, waren er enkele criteria waaraan de mutante kolonies moesten voldoen:

- De kolonies zijn tetracycline resistent: dit betekent dat het *rfaG* gen succesvol uitgewisseld werd voor de resistentiecassette (Fig. III-1, situatie A & C). Wild type LGG kan niet groeien op medium met tetracycline. Dit kenmerk alleen is niet genoeg, want enkelvoudige recombinanten zijn ook tetracycline resistent (Fig. III-1, situatie B).
- De kolonies zijn erythromycine sensitief: bewijs van dubbele homologe recombinatie. Er is geen incorporatie geweest van andere delen van de vector (Fig. III-1, situatie A & C).
- Controle met PCR met primers (pro-2600 en pro-2601) die annealen op de homologe sequenties (Fig. III-2). Bij enkelvoudige recombinatie worden in theorie twee bandjes bekomen (vaak zal enkel het kleinste fragment geamplificeerd worden), want er zijn zowel homologe sequenties die de tetracyclinecassette als het *rfaG* gen flankeren (Fig. III-1, situatie B). Er zal ook een veel duidelijker bandenpatroon te zien zijn, aangezien er nu een bandje verwacht wordt met een lengte van 1,5 kb. Bij dubbele homologe recombinatie wordt maar één bandje verkregen van iets minder dan 3 kb (tetracyclinecassette van 2,5kb en een stuk homologe sequenties). Dit laatste

bandje van 3 kb zal door de lengte ervan ook een stuk minder scherp te zien zijn: de amplificatie-efficiëntie van fragmenten langer dan 2 kb ligt namelijk een stuk lager dan bij kortere stukken DNA.

Na screening van de bekomen kolonies, kon een kolonie geïdentificeerd worden die aan alle voorwaarden voldeed. Op figuur III-3 is de agarosegel te zien van de kolonie PCR die werd uitgevoerd ter verificatie.



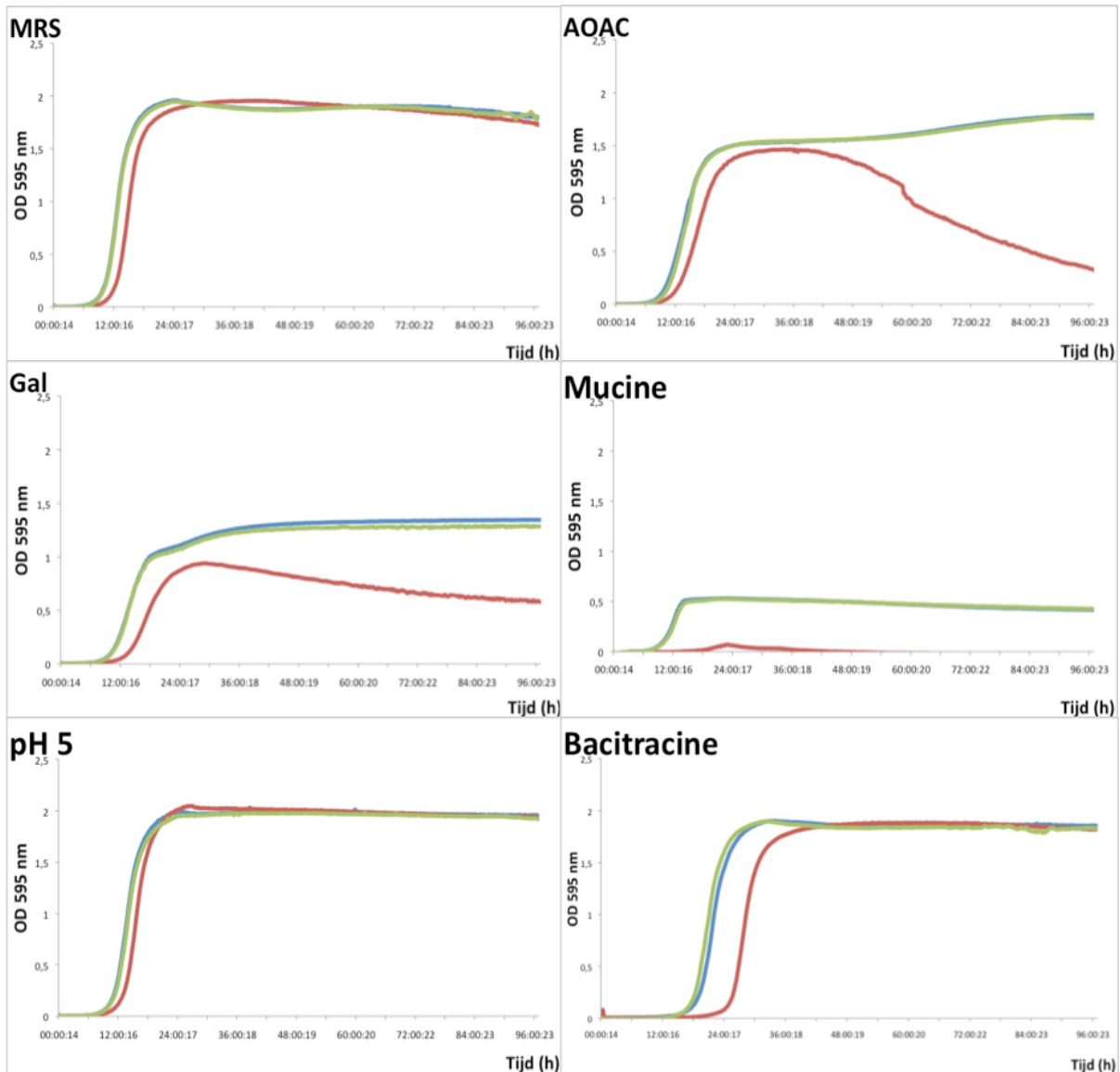
FIGUUR III-3: KOLONIE PCR UITGEVOERD MET PRO-2600 EN PRO-2601 OP MUTANTE KOLONIES. In de eerste laan is de SmartLadder te zien. In de tweede en derde laan zijn *rfaG* mutanten te zien. Er is maar één bandje op te merken, dat zoals verwacht iets hoger dan 2,5 kb ligt. Onderaan in laan 2, 3 en 4 zijn primerdimeren te zien. In de vierde laan is genomisch DNA te zien ter controle, zoals verwacht annealen de primers hier niet.

Tijdens het uitvoeren van deze thesis werd begonnen aan de constructie van een complementatieconstruct. Helaas kon dit niet meer op tijd afgerond worden en dit werd dan ook weggelaten uit dit werk.

2 GROEI-EIGENSCHAPPEN VAN DE *RFAG* MUTANT IN DIVERSE CONDITIES

Aan de hand van een bioscreen werd de groeicurve van de *rfaG* mutant bepaald in de meest gebruikte groeimedia voor LGG: MRS en AOAC. Daarbij werd deze vergeleken met de *ykC/B* mutant (CMPG5370): een recent ontwikkelde mutant waarbij andere mogelijke glycosyltransferases werden uitgeschakeld, die gecodeerd worden door LGG_00695 en LGG_00697 (Verhoeven & Lebeer, ongepubliceerd). Het is interessant om deze te vergelijken met de *rfaG* mutant aangezien het hier volgens de voorlopige annotatie waarschijnlijk ook om een defect gaat in een glycosyltransferase.

Op de x-as werden de tijdstippen uitgezet (metingen om het kwartier) tegenover de groei (OD_{595}) (Fig. III-4). In het blauw is telkens de groei van wild type LGG weergegeven, in het rood deze van de *rfaG* mutant en in het groen deze van de *ykC/B* mutant.



FIGUUR III-4: BIOSCREENDATA VOOR WILD TYPE, *YK C/B* MUTANT EN *RFA G* MUTANT. In het blauw wordt wild type LGG weergegeven, in het groen de data voor mutant. In het blauw wordt wild type LGG weergegeven, in het groen de data voor *YK C/B* mutant en in het rood deze voor de *rfa G* mutant.

Bij groei in MRS-medium zijn er niet zoveel verschillen te zien tussen de verschillende stammen (Fig. III-4, MRS). De *rfaG* mutant vertoont op het eerste zicht een iets langere lagfase dan de andere stammen, waardoor de hele groeicurve van de mutant iets naar rechts is verschoven, maar qua vorm komt deze overeen met de curves voor wild type en *ykC/B*.

Wanneer de stammen opgegroeid werden in AOAC-medium (Fig. III-4, AOAC), een medium dat minder rijk is dan MRS-medium, zijn de verschillen tussen de stammen merkbaar groter. Opnieuw vertonen wild type LGG en de *ykC/B* mutant dezelfde groeitrend. Het duurt opnieuw iets langer voor de *rfaG* mutant de exponentiële groeifase in te zetten, maar het gaat hier in tegenstelling tot de groei in MRS-medium, niet om een gewone verschuiving van de groeicurve. Na een vierentwintigtal uur groeien in AOAC-medium neemt de viabiliteit van de

rfaG mutant namelijk drastisch af. Dit is waarschijnlijk te verklaren door de lagere voedingswaarde van het medium, wat voor de *rfaG* mutant duidelijk een groter probleem vormt in vergelijking met de twee andere stammen. Deze resultaten kunnen erop wijzen dat de *rfaG* gevoeliger blijkt te zijn aan stresscondities.

Groei van de stammen in AOAC-medium waaraan gal werd toegevoegd, kan een goede indicatie geven van hoe goed de mutanten in staat zijn om te overleven in aanwezigheid van gal. Gal is een grote stressfactor voor micro-organismen in het GIT (van de Guchte *et al.*, 2002). Zoals te zien is op de groeicurves in aanwezigheid van gal (Fig. III-4, Gal), is de groei van wild type LGG en de *ykC/B* mutant opnieuw heel gelijklopend. De groeicurve is echter vertekend, wat er op wijst dat de twee stammen toch gevoelig zijn aan de aanwezigheid van gal. Waar er bij de *rfaG* mutant al een verminderde groei waar te nemen was in AOAC-medium (Fig. III-4, AOAC), wordt dit effect nog versterkt door de toevoeging van gal aan het medium (Fig. III-4, Gal). Er is een langere lagfase en een merkkelijk kortere exponentiële groeifase. De viabiliteit van de mutant in aanwezigheid van gal neemt na enkele uren drastisch af. Deze resultaten wijzen erop dat de *rfaG* mutant beduidend gevoeliger is aan de inwerking van gal. In welke mate deze slechtere groei te wijten is aan het AOAC-medium en in welke mate aan de aanwezigheid van gal, is moeilijk te bepalen uit deze data.

Op de weg die micro-organismen doorheen het gastro-intestinaal kanaal afleggen, komen ze niet alleen in aanraking met gal, maar ook met andere stressfactoren zoals de zure omstandigheden van de maag. Op figuur III-4 wordt onder andere ook het gedrag van de geteste stammen weergegeven in condities met lage pH in MRS-medium (Fig. III-4, pH 5) en in aanwezigheid van mucine in mTSB-medium (Fig. III-4, Mucine).

Mucine is de verzameling van alle geglycosyleerde proteïnen die geproduceerd worden door de epitheelcellen doorheen het gastro-intestinaal kanaal. Mucine vormt een soort gel in de darm die een rol speelt bij signaaltransductie, het vormen van een chemische barrière en het glad maken van het darmoppervlak om een vlotte passage van de voeding te garanderen (West *et al.*, 2009). In de bioscreen werd de viabiliteit van de stammen getest in mTSB-medium, waaraan mucine werd toegevoegd (Fig. III-4, Mucine) om de muceuze context van het GIT te simuleren. Wild type LGG en de *ykC/B* mutant hebben op het eerste zicht weinig moeite met de aanwezigheid van mucine in het groeimedium, na verloop van tijd echter daalt de viabiliteit van deze stammen toch licht en kan er niet echt gesproken worden van een stationaire fase.

De *rfaG* mutant heeft duidelijk meer moeite om tot groei te komen. Er is een heel lange lagfase en een korte poging tot exponentiële groei, maar al snel sterft de mutant af. In gewoon mTSB-medium zonder mucine, ligt de groei van de *rfaG* mutant al beduidend lager (data niet weergegeven), wat nog versterkt wordt door de aanwezigheid van mucine. Opnieuw rijst de vraag in hoeverre de slechte groei van de *rfaG* mutant te wijten is aan mucine en in hoeverre

dit te verklaren valt door het mTSB-medium waarin de mutant al een lagere viabiliteit vertoont. De resultaten bevestigen echter de verlaagde stressresistentie van de *rfaG* mutant.

Niet alleen de muceuze omgeving van het gastro-intestinaal kanaal is een stressfactor voor micro-organismen, ook de lage pH die heerst in de maag is een belangrijke uitdaging voor de overleving van de stammen. Op figuur III-4 is ook de viabiliteit van de verschillende stammen te zien in MRS-medium met een pH 5 (Fig. III-4, pH 5). Wild type LGG en de *ykC/B* mutant vertonen geen groeivertraging en doorlopen de normale bacteriële groeifases. Initieel lijkt de *rfaG* mutant meer moeite te hebben met de lagere pH-condities, wat zich vertaalt in een langere lagfase. Na enkele uren echter vat de mutant toch de exponentiële groeifase aan en worden alle groeifases normaal doorlopen.

Mutanten die geraakt zijn in moleculen op hun celwandoppervlak zijn vaak gevoeliger aan de inwerking van antibiotica. Op de grafiek is de groei van de verschillende stammen te zien in MRS-medium waaraan bacitracine werd toegevoegd (Fig. III-4, Bacitracine). Bacitracine is een polypeptide met een antibiotische werking (Eijsink *et al.*, 2002).

Wild type LGG en de *ykC/B* mutant worden duidelijk gehinderd in hun groei: de lagfase die de stammen doormaken is een stuk langer dan normaal. Uiteindelijk vatten de bacteriën toch de exponentiële groeifase aan en worden alle fasen van normale bacteriële groei doorlopen. De *rfaG* mutant heeft meer moeite met de aanwezigheid van bacitracine en de lagfase van de stam is nog enkele uren langer. Daarna worden alle fasen van de bacteriële groei normaal doorlopen.

De groei van de *rfaG* mutant werd verder nog getest in aanwezigheid van lysozyme, nisine en SDS in MRS-medium (data niet weergegeven). De *rfaG* mutant leek niet al teveel moeite te hebben om te groeien in medium met lysozyme en vertoonde nagenoeg hetzelfde groeipatroon als de andere stammen. Nisine, een kationisch peptide, zorgde wel voor een significante groeivertraging bij de *rfaG* mutant. SDS, tenslotte, een anionisch detergent, vertraagde eveneens de groei van de *rfaG* mutant.

3 WAT GLYCOSYLEERT RFAG?

3.1 ANALYSE VAN DE CW-PS VAN DE RFAG MUTANT

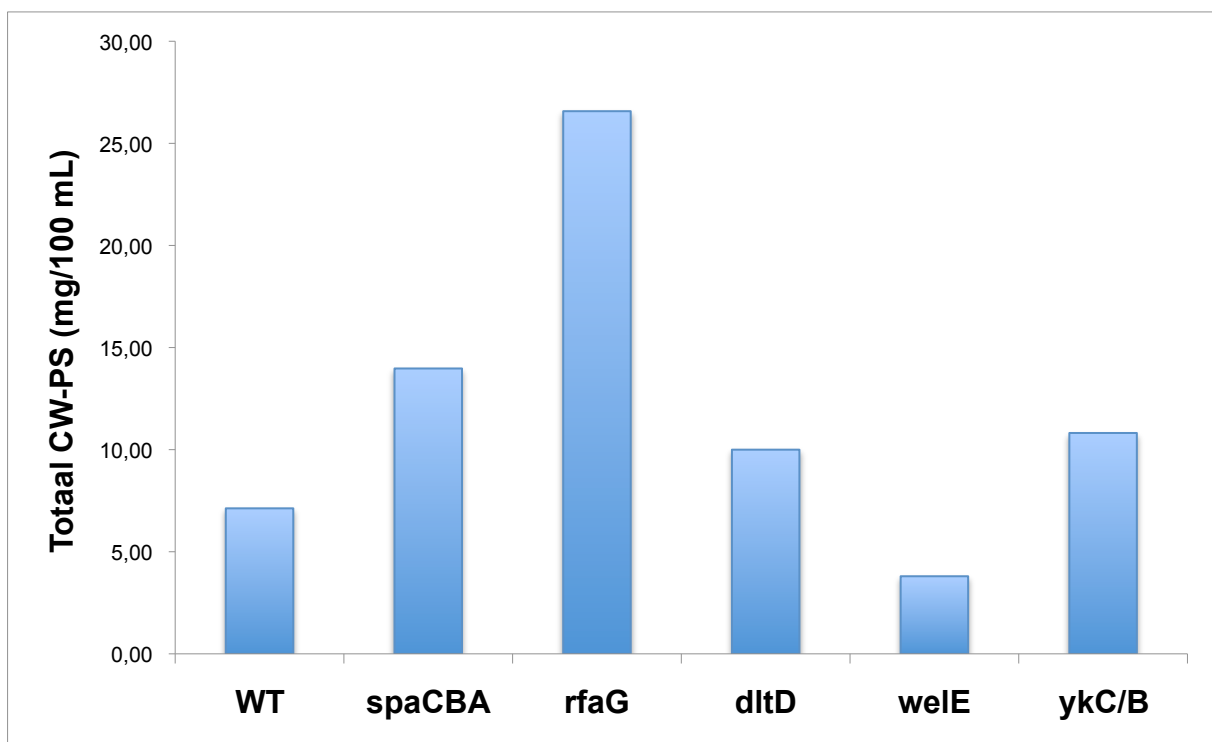
Een belangrijk onderdeel van de celwand zijn de polysachariden daar aanwezig: de celwandpolysachariden, waar de exopolysachariden een onderdeel van vormen. Daar het *rfaG* gen mogelijk codeert voor een glycosyltransferase, werden de CW-PS fracties geïsoleerd. Deze fracties bestaan uit grote galactoserijke en kleinere glucoserijke suikerstructuren (Lebeer *et al.*, 2009). De genencluster die codeert voor de lange galactoserijke EPS-moleculen in deze fractie werd reeds geïdentificeerd (Lebeer *et al.*, 2009). Over de kortere glucoserijke

polysachariden, voor het eerst beschreven in Francius *et al.* (2008), is echter nog niet zoveel geweten.

De weergegeven resultaten (Fig. III-5 en III-6) werden bekomen via een CW-PS extractie die gebruikt maakt van sonicatie. Dit is een ruwe techniek en het was dan ook moeilijk om deze resultaten te bevestigen. In de toekomst zullen verdere analyses volgen, die meer duidelijkheid moeten scheppen. De hier besproken experimenten en conclusies zijn dus preliminair.

Op figuur III-5 is de totale hoeveelheid CW-PS die kon geëxtraheerd worden, weergegeven. De *welE* mutant is hierbij een belangrijke stam om de *rfaG* mutant mee te vergelijken: de *welE* mutant beschikt namelijk enkel nog over glucoserijke EPS-b structuren (Lebeer *et al.*, 2008). De totale hoeveelheid suikers van de *welE* mutant ligt dan ook laag.

De totale hoeveelheid suikers die terug te vinden zijn op het oppervlak van wild type LGG en van de *dltD* mutant is zeer gelijkend. De *spaCBA* en de *ykC/B* mutant blijken over iets meer suikers te beschikken. De onderliggende rationale hiervoor moet nog verder onderzocht worden. De *rfaG* mutant tenslotte lijkt over meer CW-PS op het celwandoppervlak te beschikken.



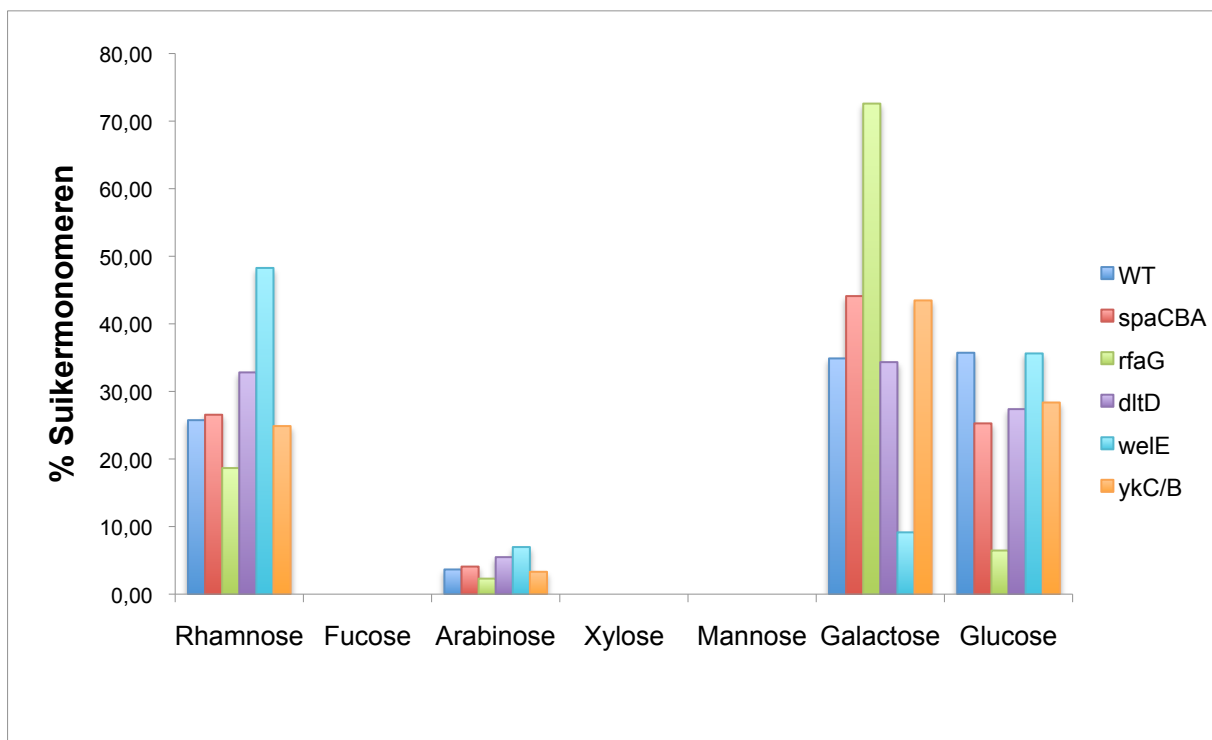
FIGUUR III-5: TOTALE CW-PS SUIKERFRACTIES AANWEZIG BIJ DE VERSCHILLENDE STAMMEN.

Wanneer naar de totale CW-PS fracties van de stammen gekeken wordt, kunnen trends waargenomen worden. Het is echter noodzakelijk om na te gaan uit welke monomeren en in welke ratio's deze suikerfracties opgebouwd zijn. Zoals uit onderstaande figuur blijkt (Fig. III-6) verschilt dit sterk van stam tot stam.

Zoals verwacht beschikt de *welE* mutant vooral over glucoserijke fracties en is deze deficiënt in galactoserijke EPS-b-structuren. Wild type LGG, de *spaCBA*, de *ykC/B* en de *dltD* mutant blijken over gelijkaardige fracties glucose, galactose, rhamnose en arabinose te beschikken. Of hier significante verschillen uit afgeleid kunnen worden, moet duidelijk gemaakt worden door verdere analyses.

De *rfaG* mutant vertoont ook hier heel interessante resultaten. Qua hoeveelheden rhamnose en arabinose is er weinig verschil te bemerken met de andere stammen. Wanneer echter gekeken wordt naar de waarden voor galactose en glucose, zijn de verschillen met de andere stammen groot. De *rfaG* mutant vertoont de omgekeerde trend als de *welE* mutant: rijk aan galactose EPS-b fracties, terwijl de *rfaG* mutant quasi deficiënt is in glucoserijke fracties.

In geen enkele van de stammen kon er fucose, xylose of mannose gemeten worden. Dit kan te wijten zijn aan de gebruikte kolom bij de HPLC-analyse.



FIGUUR III-6: MONOMEERANALYSES VAN DE CW-PS VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN. Er is telkens weergegeven over hoeveel procent van elke suiker elke mutant beschikt.

De mechanismen die schuilen achter dit interessante fenotype van de *rfaG* mutant moeten in de toekomst verder uitgeklaard worden. De hier beschreven analyses zullen zeker herhaald worden en ook een AFM-studie, zoals reeds beschreven bij de *welE* mutant (Francius *et al.*, 2008), zou meer informatie kunnen opleveren over de karakteristieken van het celwandoppervlak van de *rfaG* mutant.

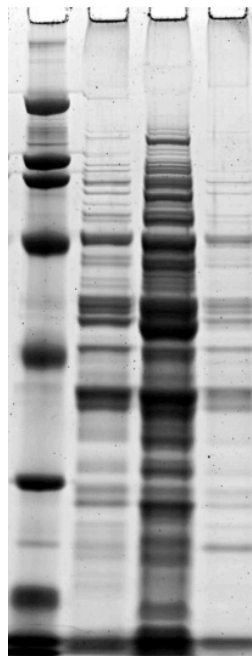
3.2 MINDER CELWANDPROTEÏNEN BIJ DE *RFA*G MUTANT?

3.2.1 1D-SDS PAGE

Om na te gaan of het RfaG glycosyltransferase betrokken is bij de aanmaak van glycaanstructuren op glycoproteïnen, werd deze behandeld met een mengsel van lysozyme en mutanolysine. Een behandeling met lysozyme alleen bleek niet voldoende. Deze beide stoffen zorgen er samen voor dat de celwandproteïnen loskomen uit hun normale conformatie en kunnen gescheiden worden op gel.

Wanneer de *dltD* mutant vergeleken wordt met wild type LGG, valt op dat deze op het eerste zicht gevoeliger blijkt te zijn aan de inwerking van lysozyme en mutanolysine (Fig. III-7, laan 3). Onderstaande resultaten kunnen echter ook verklaard worden door een hoger aantal proteïnen op het celwandoppervlak. De *dltD* mutant is gemuteerd in een gen dat verantwoordelijk is voor de D-alanylatie van LTA. Deze mutant werd al grotendeels gekarakteriseerd en het *dlt* operon bleek een belangrijke rol te spelen in de vorm van de cel en de celdeling (Perea Vélez *et al.*, 2007a).

De *rfaG* mutant daarentegen levert veel minder celwandproteïnen op (Fig. III-7, laan 4). Dit kan betekenen dat de *rfaG* mutant over minder celwandproteïnen beschikt of dat deze mutant minder gevoelig is aan de inwerking van lysozyme en mutanolysine. In de toekomst zijn er verdere analyses (oa. grote 2D-gels) nodig om meer duidelijkheid te scheppen omtrent de celwandproteïnen van de *rfaG* mutant.

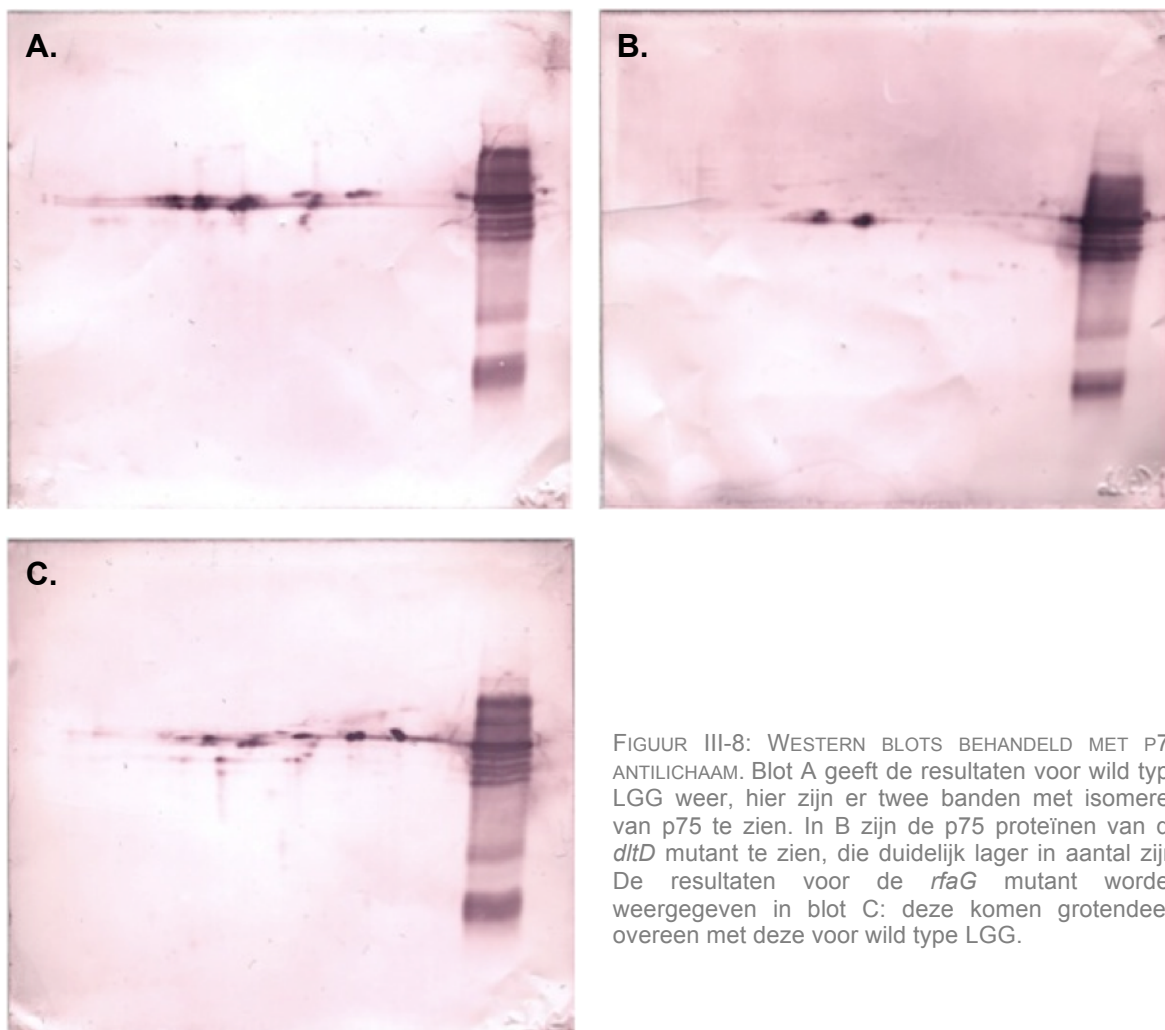


FIGUUR III-7: SYPRO RUBY TOTAL STAIN ANALYSE VAN 1D-SDS-PAGE. In de eerste laan is de ladder te zien: Bio-Rad Broad Range Marker. In de tweede laan de resultaten voor wild type LGG, daarnaast de *dltD* mutant en als laatste de *rfaG* mutant.

3.2.2 WESTERN BLOT MET P75-ANTILICHAAM

Om na te gaan welke moleculaire interacties aan de basis liggen van de probiotische werking van bacteriën, wordt vaak vertrokken vanuit de hypothese dat de modulerende moleculen terug te vinden zijn op het celwandoppervlak of gesecreteerd worden door de bacteriecellen in de extracellulaire matrix. p75 is een voorbeeld van zo'n gesecreteerd proteïne (Yan *et al.*, 2007). Door een western blot uit te voeren met een antilichaam gericht tegen p75, kon nagegaan worden of dit proteïne geraakt was in de *rfaG* mutant.

In wild type LGG is een dubbele band van enkele isomeren van p75 te zien (Fig. III-8, A). De *dltD* mutant beschikt duidelijk over minder p75 isomeren en de totale hoeveelheid van p75 proteïnen zal bij deze mutant dan ook lager liggen (Fig. III-8, B). De *rfaG* mutant tenslotte vertoont grotendeels hetzelfde patroon als wild type LGG, toch zijn er enkele verschillen waar te nemen (Fig. III-8, C). Of deze verschillen significant zijn en of er andere p75 isomeren tot expressie gebracht worden bij de *rfaG* mutant, zal verder moeten onderzocht worden op grotere 2D-gels.



FIGUUR III-8: WESTERN BLOTS BEHANDELD MET P75 ANTILICHAAM. Blot A geeft de resultaten voor wild type LGG weer, hier zijn er twee banden met isomeren van p75 te zien. In B zijn de p75 proteïnen van de *dltD* mutant te zien, die duidelijk lager in aantal zijn. De resultaten voor de *rfaG* mutant worden weergegeven in blot C: deze komen grotendeels overeen met deze voor wild type LGG.

4 ROL VAN RFA^G IN ADHESIE, BIOFILMVORMING EN PERSISTENTIE

4.1 BIOFILMVORMING EN ADHESIE

Adhesie is van primordiaal belang voor de probiotische bacteriën om een goede interactie op te bouwen met het GIT en hun gunstige effecten op de fysiologie van de gastheer te kunnen ontplooien. Op dit moment beschikt men echter over een heel fragmentarische kennis van de moleculaire basis die achter deze adhesieprocessen schuilt. Om meer inzicht te krijgen in welke oppervlaktemoleculen hierin een rol spelen, worden de mutanten getest op hun capaciteiten om biofilm te vormen en te adhereren aan Caco-2 cellen. In een later stadium zal de *rfaG* mutant, net als de al langer bestaande mutanten, ook getest worden op adhesie in aanwezigheid van mucus *in vitro* en de adhesiecapaciteit van de mutant aan geïmmobiliseerde extracellulaire matrices (Perea Vélez *et al.*, 2007b).

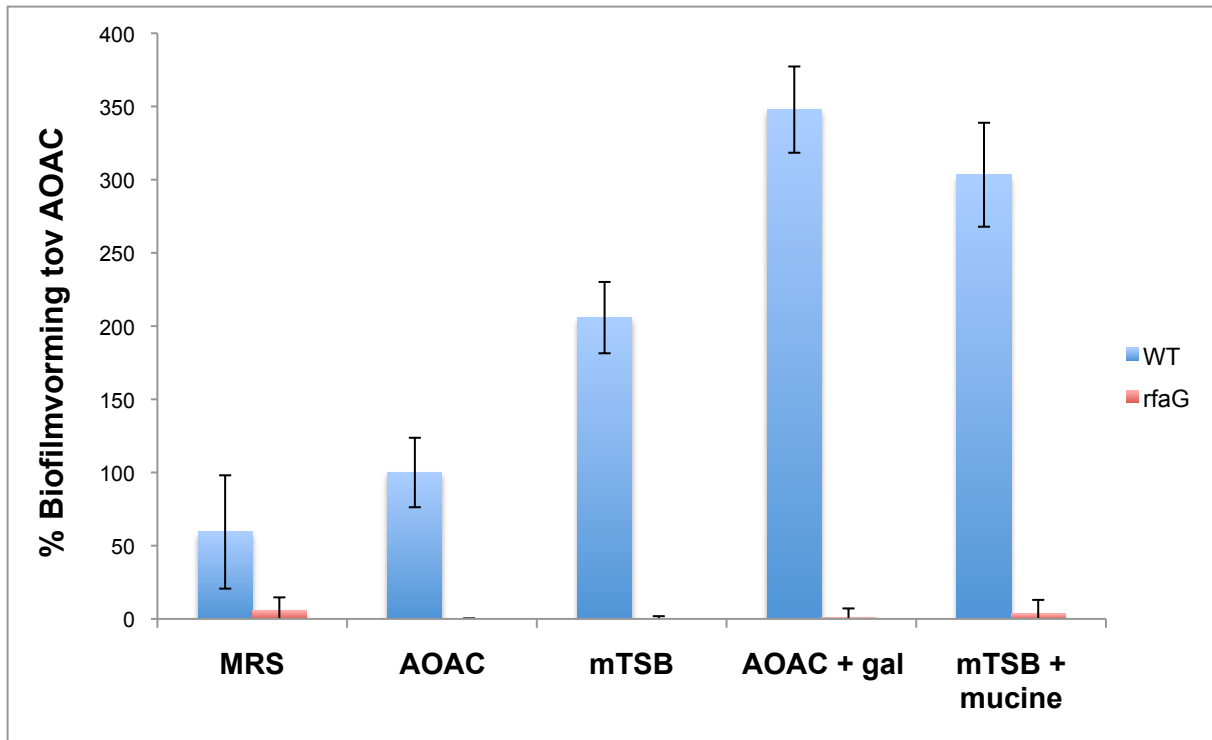
4.1.1 DE RFA^G MUTANT HEEFT EEN DEFECT IN BIOFILMVORMING

Om na te gaan in hoeverre de stammen in staat zijn om te adhereren aan een polystyreenoppervlak en biofilm te vormen, werd een biofilmassay uitgevoerd. Een biofilmassay geeft tevens een indicatie van de stressrestentie van een bepaalde stam.

Daar lactobacillen facultatief anaërobe of microaërobe organismen zijn, is het belangrijk om deze assay uit te voeren in een milieu met lage concentraties zuurstof. De mate waarin de *rfaG* mutant in staat is om biofilm te maken, werd vergeleken met wild type LGG. Net zoals in de bioscreen werden verschillende media getest, waaronder de meest gebruikte: MRS- en AOAC-medium; mTSB-medium, AOAC-medium waaraan gal werd toegevoegd (om de condities van de darm te simuleren) en mTSB-medium met mucine (simulatie van de condities doorheen het gastro-intestinaal kanaal). De gemeten OD₅₇₀ waarden voor de biofilmassays werden gestandaardiseerd naar AOAC-medium: de waarde voor wild type LGG in AOAC werd daarbij gelijkgesteld aan 100%. De resultaten werden bevestigd bij een onafhankelijke herhaling van het hier beschreven experiment.

Wild type LGG is in staat om biofilm aan te maken in de verschillende media (Fig. III-9). In AOAC-medium is er een iets hogere biofilmvorming als in MRS-medium door de lagere voedingswaarde van dit medium dat de bacteriecellen meer stress bezorgt. In mTSB-medium is er een duidelijke verhoging van de biofilmvorming waar te nemen. Gal blijkt de vorming van biofilm sterk te stimuleren en ook mucine heeft een gunstig effect op de biofilmvorming (Lebeer *et al.*, 2007b).

De *rfaG* mutant is duidelijk geraakt in zijn vermogen om biofilm te maken. In geen enkele van de geteste media is er enige vorming van biofilm.



FIGUUR III-9: ANAËROBE BIOFILM. Biofilmvorming van wild type LGG in AOAC werd gelijkgesteld aan 100%.

4.1.2 VERMINDERDE ADHESIE AAN CACO-2 CELLEN

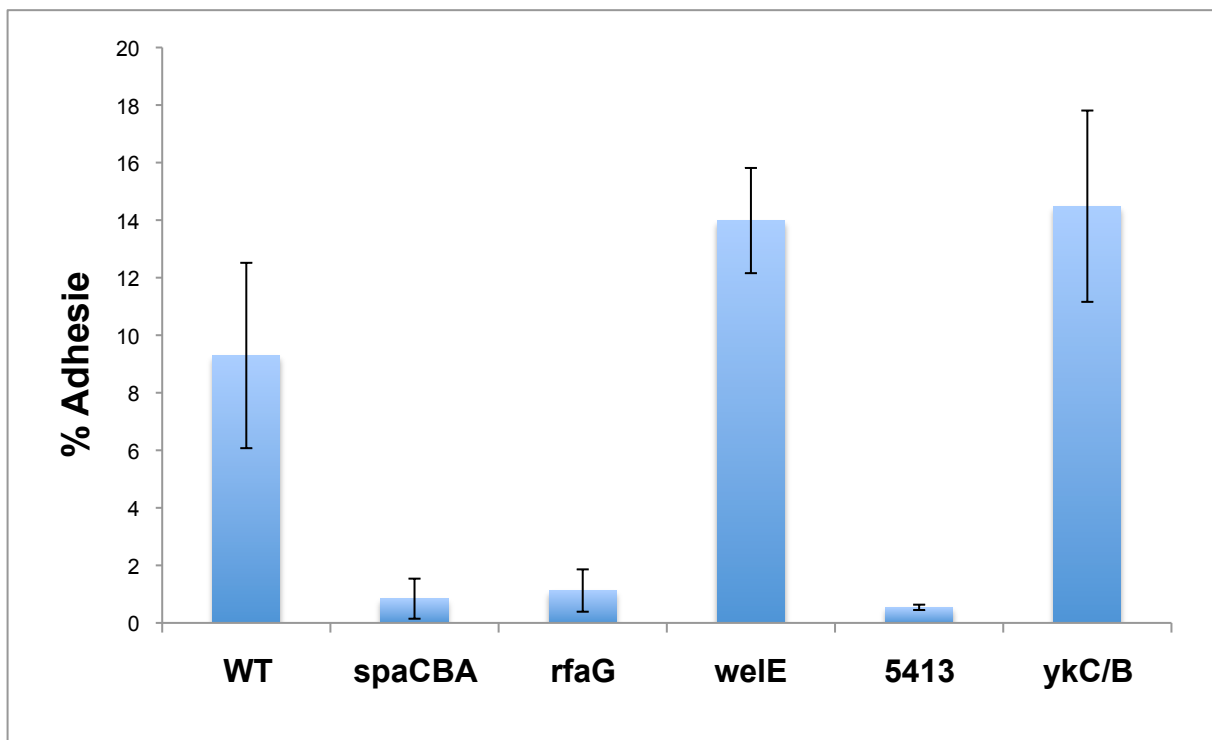
Een biofilmassay levert een eerste indicatie op van hoe het gesteld is met de adhesie-capaciteiten van de mutant, maar het gaat hier om adhesie aan een polystyreenoppervlak. Om een beter zicht te krijgen op de adhesie-capaciteiten *in vivo*, werd de adhesie aan Caco-2 cellen getest, een menselijke epitheelcellijn die de darmwand moet simuleren. Verschillende mutanten werden daarbij vergeleken met elkaar (Fig. III-10). Het hier beschreven adhesie-experiment werd onafhankelijk herhaald en de resultaten konden bevestigd worden.

In deze experimenten werden enkele andere mutanten van LGG meegenomen ter vergelijking. De *spaCBA* mutant (CMPG5357) is een mutant die geraakt is in de synthese van pili en vertoont een beduidend lagere adhesie aan de epitheelcellen vergeleken met wild type LGG (Lebeer *et al.*, ingediend voor publicatie). De SpaCBA bevattende pili blijken namelijk een sleutelrol te spelen in de adhesie-capaciteiten van LGG aan de epitheelcellen. In andere Gram-positieve soorten werd ook reeds aangetoond dat pili een cruciale rol kunnen spelen in adhesie aan gastheercellen (Wu & Fives-Taylor, 2001).

De *rfaG* mutant en de CMPG5413 mutant worden eveneens gekenmerkt door een lage adhesie aan Caco-2 cellen. Deze laatste is een *luxS* mutant (een quorum sensing mutant, Lebeer *et al.*, 2008a) die een extra spontane suppressormutatie heeft opgelopen die zich vermoedelijk localiseert in één of meerdere cruciale genen voor de biosynthese van celwandpolysachariden (CW-PS). De mutant heeft dezelfde groei-eigenschappen als wild type LGG, maar maakt minder CW-PS (galactoserijk EPS en glucoserijke CW-PS) aan (Francius *et al.*, 2008). Doordat deze mutant deficiënt is in verschillende CW-PS, kan deze

waarschijnlijk geen biofilmen meer maken (Lebeer *et al.*, 2008a). Het defect in biofilmvorming kon echter wel gecompenseerd worden door de additie van geïsoleerde CW-PS (Lebeer, 2008). Het gen dat spontaan gemuteerd is, kon echter nog niet geïdentificeerd worden. Op dit moment denkt men dat de mutatie zich vroeg in de synthese van de CW-PS situeert, waardoor deze mutant zowel deficiënt is in de glucoserijke als in de galactoserijke CW-PS-structuren (Lebeer *et al.*, 2007a).

Bij de *welE* mutant werd het priming glycosyltransferase uitgeschakeld, het enzym dat de eerste stap van de biosynthese van galactoserijke EPS-moleculen katalyseert. De afwezigheid van deze lange galactoserijke EPS-moleculen in de mutant, resulteert in een verhoogde adhesie aan Caco-2 cellen en andere substraten. Mogelijk door de verhoogde blootstelling van adhesines, zoals pili, op het celwandoppervlak (Lebeer *et al.*, 2009). Dit is ook terug te vinden op onderstaande figuur (Fig. III-10), waar de *welE* mutant hogere adhesiewaarden vertoont. Ook de *ykC/B* mutant vertoont een hogere adhesie ten opzichte van wild type LGG. Wat precies aan de basis hiervan ligt, zal verder onderzocht worden in de toekomst.



FIGUUR III-10: PROCENTUELE ADHESIE VAN DE VERSCHILLENDE STAMMEN AAN CACO-2 CELLEN.

4.2 EFFECT VAN DE *RFA*G MUTATIE OP OVERLEVING *IN VIVO*

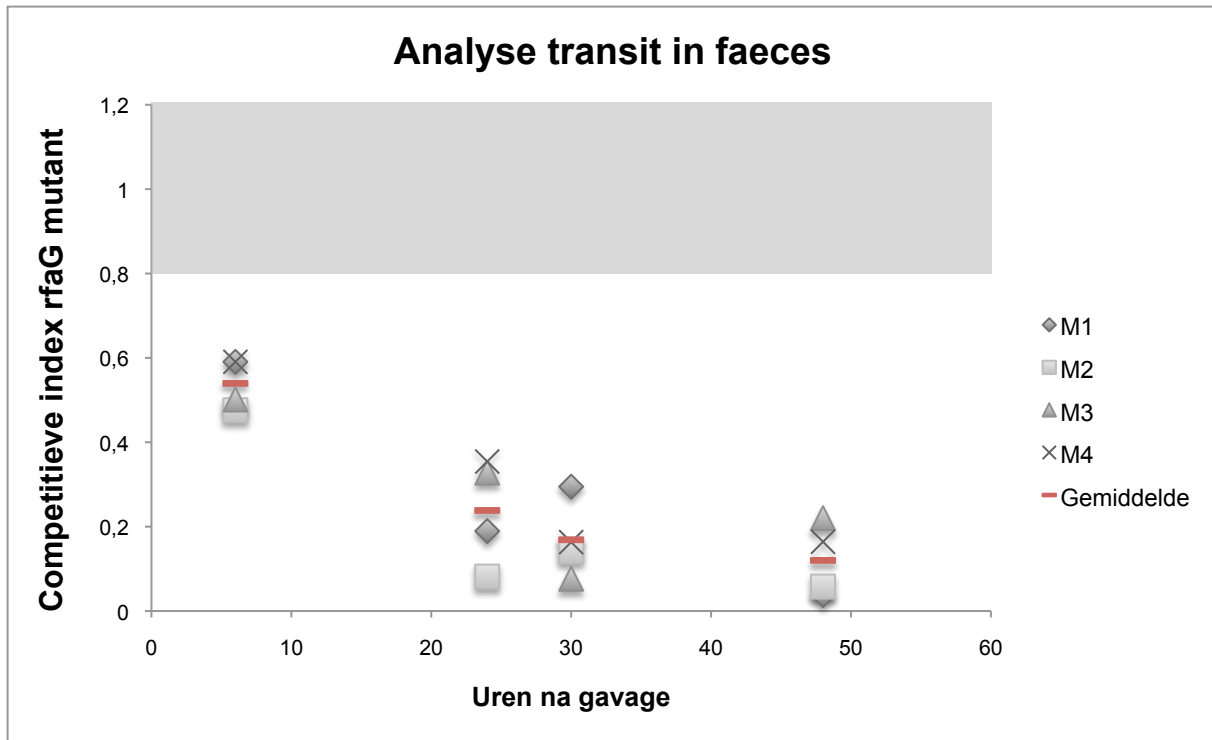
Om meer inzicht te krijgen in het gedrag van de *rfaG* mutant *in vivo* werd deze getest in proefdieren, meer bepaald in vrouwelijke Balb/c muizen. Gedurende drie dagen werd aan deze dieren dagelijks een gavage toegediend met een mengsel van wild type LGG en *rfaG* mutante bacteriecellen in een 1:1 verhouding. Op vaste tijdstippen werden faecesstalen

genomen en na afloop van het experiment werden stalen van de inhoud en het weefsel van het gastro-intestinaal kanaal genomen. Alle stalen werden getest op de aanwezigheid van wild type LGG en *rfaG* mutanten. De resultaten hiervan kunnen belangrijke informatie opleveren in verband met de persistentie van de *rfaG* mutant *in vivo*.

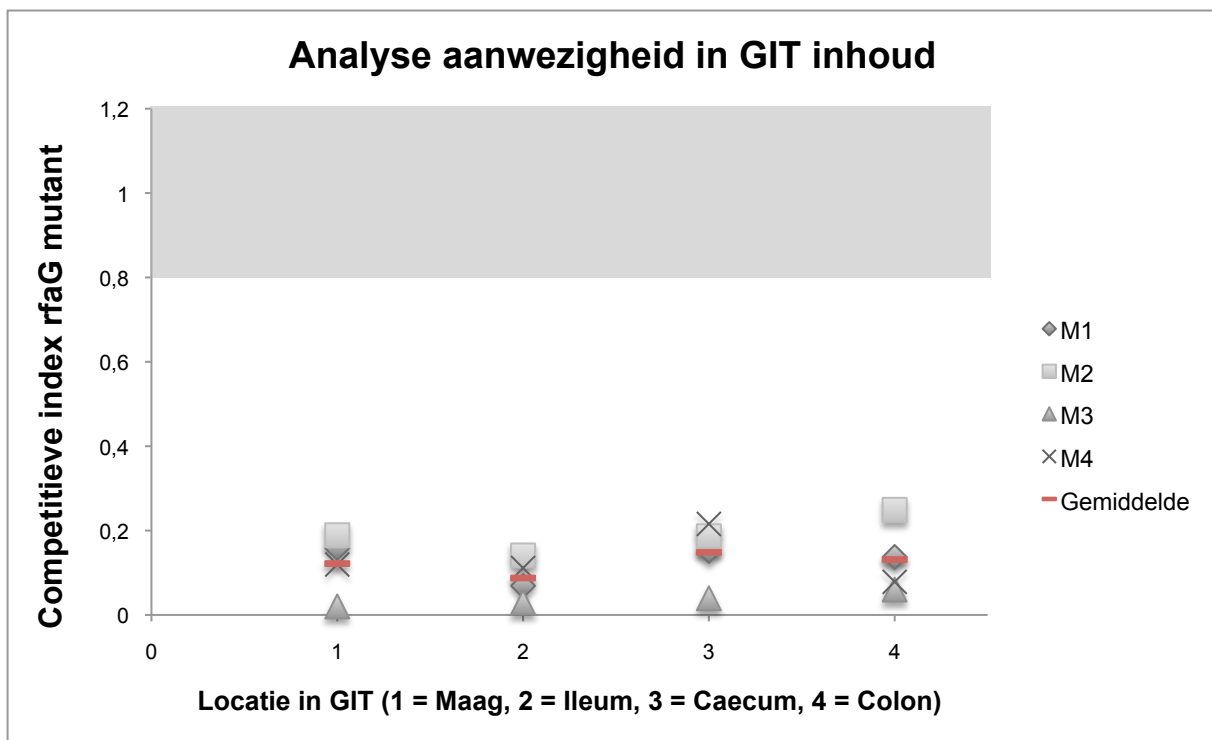
In eerste instantie werd nagegaan in hoeverre de gavages die werden toegediend, voldeden aan een 1:1 verhouding van wild type en mutante cellen, wat overeenkomt met een competitieve index van 1 (zie verder). Daartoe werden deze gavage mengsels verdund en uitgeplaat op medium met tetracycline en op medium met erythromycine. Uit tellingen van de kolonies die resistent waren aan tetracycline en erythromycine, de wild type LGG kolonies dus, kon besloten worden dat alle mengsels ongeveer 50% van elke stam bevatten. In onderstaande analyses werd telkens een correctiefactor in acht genomen om de afwijking van de 1:1 verhouding in rekening te brengen.

Er werden faecesstalen genomen op verschillende tijdstippen na gavage, meer bepaald zo'n 6, 24, 30 en 48 uur na de eerste gavage. Deze stalen werden getest om na te gaan in welke mate wild type LGG en de *rfaG* mutant konden aangetroffen worden. Op figuur III-11 worden deze data weergegeven. De competitieve index is het percentage mutanten aanwezig op een bepaald tijdstip ten opzichte van de initiële ratio van ongeveer 50% mutanten van de totale toegediende bacteriën. Tussen de individuele muizen kan er variatie waargenomen worden, maar de data wijzen allemaal op een daling in de aanwezigheid van *rfaG* mutante micro-organismen. Aan de basis van deze dalende trend kunnen twee oorzaken liggen: of de *rfaG* mutant adhereert beter dan wild type LGG en bevindt zich nog in het GIT, of de *rfaG* mutant overleeft de doortocht door het GIT minder goed dan wild type LGG en komt dus grotendeels afgedood in de faeces terecht.

Er werden stalen genomen van de inhoud van het gastro-intestinaal kanaal. Zowel voor de maag, het ileum, het caecum als het colon werd de inhoud verder geanalyseerd. De stalen werden op dezelfde manier als de faecesstalen getest op de aanwezigheid van *rfaG* mutanten. De variaties tussen de verschillende proefdieren zijn hierbij iets groter, zoals te zien is op figuur III-12. De competitieve index van de *rfaG* mutant ligt echter overal duidelijk onder de 1: de waarde waarbij de twee stammen even competent zijn (zie grijze zone op figuren). Het is duidelijk dat de persistentie van de *rfaG* mutant in de inhoud van het GIT laag ligt.

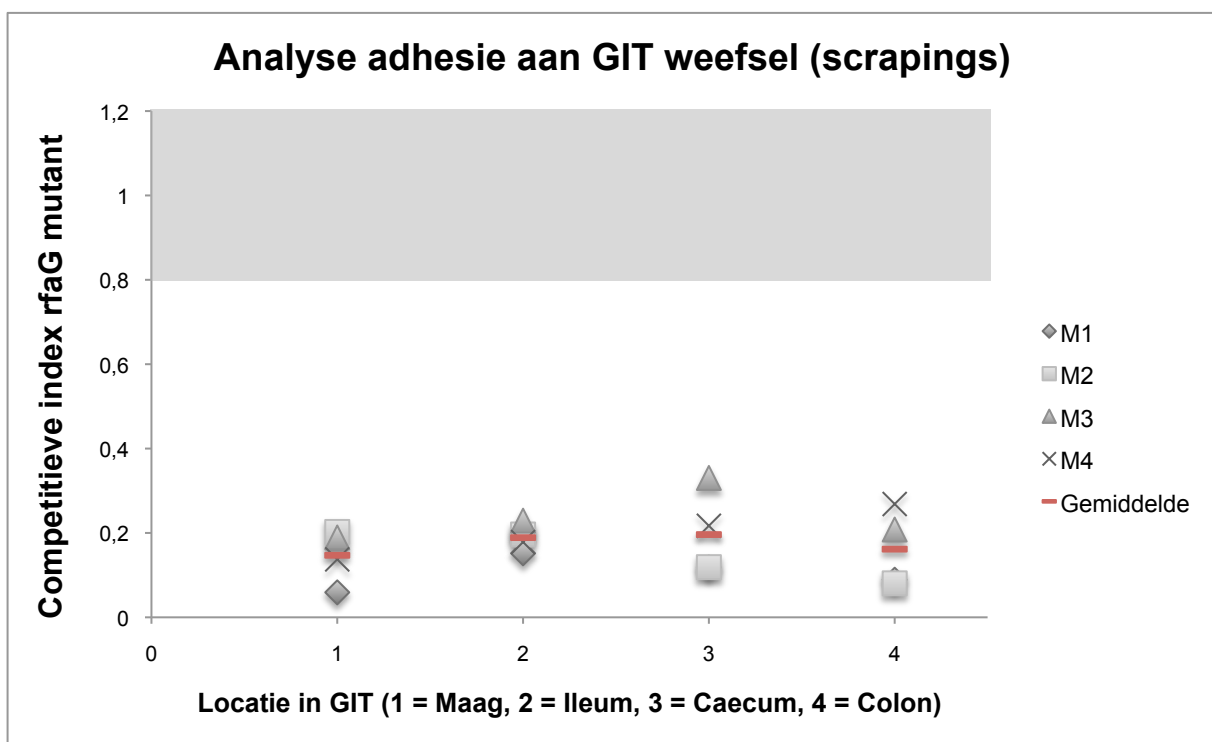


FIGUUR III-11: AANWEZIGHEID VAN DE *rfaG* MUTANT IN FAECESSTALEN. Data van de vier muizen en een gemiddelde waarde werden weergegeven voor elk van de vier momenten van faecesstaalname. De grijze zone duidt het gebied aan waar datapunten verwacht worden, als de *rfaG* mutant even competent zou zijn als wild type LGG. De waarden voor de *rfaG* mutant liggen echter duidelijk lager.



FIGUUR III-12: COMPETITIEVE INDEX VAN DE *rfaG* MUTANT IN DE INHOUD VAN HET GIT. De waarden voor de vier muizen en een gemiddelde werden weergegeven voor de vier locaties in het GIT waar de staalnames werden uitgevoerd. De grijze zone duidt opnieuw de waarden voor een gelijke competentie van wild type LGG en de *rfaG* mutant aan.

De aanwezigheid van de mutant in faecesstalen en in de inhoud van het GIT levert informatie op over de bacteriecellen die niet of maar heel kort interageerden met het darmepitheel. Het is mogelijk dat de lage waarden voor de competitieve index van de *rfaG* mutanten in deze experimenten veroorzaakt werden door een goede adhesie aan de epitheelcellen. Wanneer echter gekeken wordt naar eerdere resultaten van de *rfaG* mutant: de slechte adhesie, de verlaagde viabiliteit in stresscondities en de lage inductie van IL-8 is het waarschijnlijker dat de *rfaG* mutant afgedood wordt in het GIT. Om na te gaan of de *rfaG* mutant nu beter adhereerde of juist minder goed kon overleven in het GIT van de muis, werden de weefsels zelf ook getest. Daartoe werden de micro-organismen die zich op het darmepitheel bevonden vrijgemaakt door de weefsels af te schrapen met een scalpel. Deze stalen werden eveneens getest op groei op medium met tetracycline en erythromycine. De competitieve index van de *rfaG* mutant in de weefselstalen van de muizen wordt hieronder weergegeven (Fig. III-13). Ook hier kunnen schommelingen waargenomen worden tussen de verschillende proefdieren, maar ligt de algemene persistentie van de *rfaG* mutant weer laag.



FIGUUR III-13: ADHESIE VAN DE *rfaG* MUTANT AAN GIT WEEFSELS *IN VIVO*. De competitieve index van de *rfaG* mutant wordt weergegeven, welke bepaald werd aan de hand van de waarden voor de vier proefdieren doorheen het GIT. De waarden die een gelijke competentie van wild type LGG en de *rfaG* mutant aanduiden, worden weergegeven door de grijze balk.

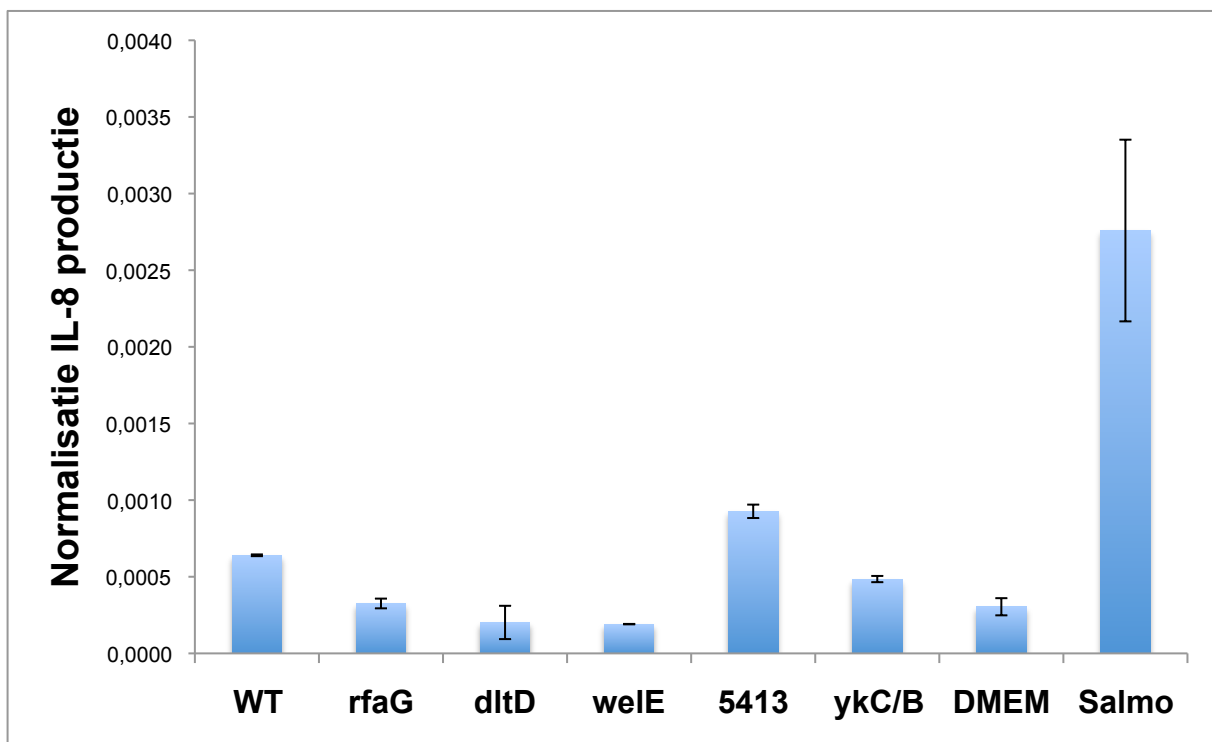
5 IMMUNOMODULATIE: LAGERE IL-8 INDUCTIE DOOR DE *rfaG* MUTANT

Wanneer vreemde micro-organismen in de darm aankomen, lokken deze vaak een immuunrespons uit (Kang *et al.*, 2009). Door Caco-2 cellen te incuberen met verschillende LGG mutanten, kon vergeleken worden in welke mate deze de productie van interleukines (*in*

casu IL-8) beïnvloeden. IL-8 werd gekozen omdat dit een cytokine is dat wordt geproduceerd door epitheelcellen. Na incubatie werd RNA uit de Caco-2 cellen geëxtraheerd en na de aanmaak van cDNA, werd de specifieke aanmaak van IL-8 nagegaan aan de hand van qPCR. Als positieve controle werd *Salmonella* gebruikt, een belangrijke pathogeen van de darm, die een hoge IL-8 productie veroorzaakt (Jung *et al.*, 1995). De negatieve controle was DMEM-medium waarin geen bacteriecellen aanwezig waren. Onderstaande resultaten konden bevestigd worden via onafhankelijke herhalingen van dit experiment, enkel met de *dltD* mutant werden geen rechtlijnige resultaten bekomen.

Wild type LGG en de *ykC/B* mutant volgen hier opnieuw dezelfde trend: beiden wekken een iets hogere immuunrespons op dan de negatieve controle. De *rfaG* en *welE* mutant lokken een respons uit die zelfs lager ligt dan deze van de negatieve controle. De *luxS* mutant met de extra mutatie (CMPG5413) veroorzaakt duidelijk een hogere IL-8 respons dan de rest van de stammen.

Bij de *dltD* mutant is het moeilijk om conclusies te trekken uit de resultaten. Er werden verschillende herhalingen uitgevoerd van dit experiment met de *dltD* mutant en uit deze resultaten kan geen rechtlijnige trend afgeleid worden. Het onderzoek naar de verfijning van de karakterisatie van deze mutant is nog lopend (Claes *et al.*, ongepubliceerd).



FIGUUR III-14: IL-8 PRODUCTIE ZOALS DEZE GEÏNITIEERD WERD IN CACO-2 CELLEN DOOR VERSCHILLENDE LGG MUTANTEN. DMEM dient als negatieve controle, *Salmonella* als een positieve controle.

De in dit werk uitgevoerde testen leveren slechts een eerste indicatie op van de immunomodulerende effecten van de stammen. Er werd voorlopig maar één cytokine (IL-8) getest. Er dient verder onderzocht te worden of de waargenomen trend terug te vinden is bij

andere cytokines. Er moet ook nagegaan worden of dezelfde trend waar te nemen is bij incubatie van de stammen met andere celtypes, zoals dendrietische cellen en monocytten. De verschillende immuunresponsen die de mutanten uitlokken, kunnen aanwijzingen opleveren over welke genen betrokken zijn bij de triggering van het immuunsysteem.

DEEL IV: DISCUSSIE

Lactobacillus rhamnosus GG is een veel bestudeerd probioticum, dat beschouwd wordt als een modelorganisme voor probiotica. LGG voldoet immers aan een hele rits criteria die door Gorbach en Goldin opgesteld werden om een ideale probiotische stam te definiëren (Doron *et al.* 2005).

Probiotica worden nu al vaak toegevoegd aan voedingssupplementen, zuivelproducten en andere levensmiddelen. In de toekomst wensen wetenschappers de gezonde bacteriën echter ook in te schakelen in de behandeling en preventie van bepaalde pathologieën van het gastro-intestinaal kanaal (Gupta & Garg, 2009; Doron *et al.*, 2005).

Het gebrek aan inzicht in de moleculaire basis van de gunstige effecten van probiotica vormt echter een groot struikelblok voor de algemene toepassing van probiotica. Over de hele wereld zijn wetenschappers op zoek naar de moleculaire mechanismen die de werking van probiotica kunnen verklaren. Gestaaft wordt er daarbij vooruitgang geboekt, maar de weg naar een effectieve klinische toepassing is nog lang, vooral ook gezien de verschillende lopende klinische trials elkaar soms tegenspreken. De nood aan fundamentele kennis over de werkingsmechanismen van de goede bacteriën is groot (Lebeer *et al.*, 2008b).

Eén van de manieren om meer te weten te komen over de moleculaire mechanismen van probiotica is verschillende knock-out mutanten aan te maken. In het CMPG laboratorium werden daartoe al enkele mutanten aangemaakt, waarin telkens een gen uitgeschakeld werd dat verband houdt met de correcte opbouw van de celwand van LGG. De moleculaire mediators voor interactie met het darmepitheel en het uitoefenen van de probiotische functies zijn namelijk hoogstwaarschijnlijk onderdeel van de celwand of worden gesecreteerd in het extracellulaire milieu.

Het creëren van mutanten in LGG is echter niet vanzelfsprekend: de standaardmethoden om een plasmide in te brengen in een nieuwe bacteriecel bleken niet te werken bij LGG. Enkele jaren geleden werd in het CMPG een protocol voor elektroporatie geoptimaliseerd dat wel goede resultaten oplevert in LGG (De Keersmaecker *et al.*, 2006b). Sindsdien werden al verschillende mutanten ontwikkeld en gekarakteriseerd, waarmee de nieuwe *rfaG* mutant in deze thesis werd vergeleken.

Ondanks het verbeterde elektroporatie protocol voor LGG is het vaak nog altijd een uitdaging om een nieuwe mutant te ontwikkelen. Om het *rfaG* gen uit te schakelen moest er namelijk nog steeds een dubbele homologe recombinatie optreden met de tetracycline cassette op het zelfmoord plasmide. Dit is een proces met een lage efficiëntie en het kan enkele pogingen vragen voor een goede kolonie kan geselecteerd worden. Vrij snel kon er echter al een correcte kolonie geïdentificeerd worden en de karakterisatie van de *rfaG* mutant kon van start gaan.

Om zeker te zijn dat de waargenomen effecten te wijten zijn aan de inactivatie van het *rfaG* gen, is een complementatieconstruct noodzakelijk. Daarbij wordt het functioneel gen terug ingebracht in de mutant. Dit kon niet binnen het tijdsbestek van deze thesis worden afgerond, maar het construct zal in de nabije toekomst geconstrueerd worden en meegenomen worden in de verdere karakterisatie.

Omdat niet geweten is wat precies de functie is van het *rfaG* gen dat uitgeschakeld werd, was het noodzakelijk om de mutant heel breed te testen. Homologie met glycosyltransferasen in andere species doet vermoeden dat het *rfaG* gen naar alle waarschijnlijkheid een rol speelt bij de glycosylatie van oppervlaktestructuren. Om welke oppervlaktestructuren het hier precies gaat, is echter nog onduidelijk. Daarom werd een aanvang genomen met een grondige microbiologische karakterisatie van de *rfaG* mutant. Een goede karakterisatie vormt de noodzakelijke basis om later te gaan kijken naar de probiotische effecten van de *rfaG* mutant. Dit werk geeft dan ook een overzicht van de verschillende *in vitro* en *in vivo* testen die werden uitgevoerd. Daar de tijd beperkt was, gaat het hier vooral om eerste indicaties en voorlopige conclusies die in de toekomst verder onderzocht en geverifieerd moeten worden.

Een eerste belangrijk concept is de mate waarin de mutant in staat is om de normale fasen van bacteriële groei te doorlopen. Sommige mutaties kunnen namelijk een significante invloed hebben op de groei. Bioscreendata (de optische densiteit van de bacteriën in functie van de tijd) toonden aan dat er toch enige groeidefecten van de *rfaG* mutant konden waargenomen worden afhankelijk van de condities. In AOAC-medium, een medium dat minder voedingsstoffen bevat dan MRS-medium, was de groei van de *rfaG* mutant duidelijk onderhevig aan stress.

De resultaten van de bioscreens in media die enkele condities van het GIT simuleren, vertoonden dezelfde trend: de *rfaG* mutant is niet in staat om goed te reageren op aanwezige stressfactoren. Wanneer de resultaten voor gal bekeken worden, valt op dat de mutant kan groeien, maar dat de viabiliteit toch sterk afneemt naarmate de groei vordert. Dit doet vermoeden dat de *rfaG* mutant ook *in vivo* problemen zal ondervinden om te overleven in het GIT. Het celwandoppervlak van de *rfaG* mutant is in die mate gewijzigd, dat hij gevoeliger is voor stress.

In aanwezigheid van mucine, geglycosyleerde proteïnen die geproduceerd worden door de epitheelcellen van het GIT, is de groeirespons nog slechter: de groei wordt amper geïnduceerd. Mucine is aanwezig over de gehele lengte van het GIT en de respons van de *rfaG* mutant hierop is dus van groot belang voor de viabiliteit ervan *in vivo*. De viabiliteit van de *rfaG* mutant blijkt echter zodanig laag, dat mucine nefast is voor de overleving van de mutant *in vitro*.

Met een verlaagde pH heeft de *rfaG* mutant duidelijker minder moeite. In de maag en de proximale delen van het GIT komen probiotica in contact met een verlaagde pH, die vaak een negatieve invloed heeft op de groei van de stammen. De verlaagde pH 5 waaraan de *rfaG* mutant hier werd blootgesteld, bevindt zich in de pH-range (pH 1-6) die voorkomt in de menselijke maag, maar was nog niet zo extreem als de pH die er soms voorkomt (pH 1-3).

Uit de bioscreendata voor de *rfaG* mutant kan besloten worden dat deze in vergelijking met wild type veel minder bestand is tegen de verschillende stresscondities die aanwezig zijn doorheen het GIT. De functie van het *rfaG* gen houdt dus naar alle waarschijnlijkheid verband met de modulatie van oppervlaktemoleculen die van belang zijn voor de stressresistentie van de LGG bacteriën. Deze resultaten worden bevestigd door de groei van de bacteriën in aanwezigheid van bacitracine. Dit antibioticum dat actief is tegen Gram-positieve celwanden, veroorzaakt eveneens een vertraagde groei van de *rfaG* mutant.

Aangezien de voorlopige annotatie van het *rfaG* gen erop wijst dat het gen waarschijnlijk codeert voor een glycosyltransferase, werd ook gekeken naar de aanwezigheid van polysachariden op de celwand. Om een eerste indicatie te krijgen van de aanwezige CW-PS, werden deze geïsoleerd met behulp van een methode waarin een sonicatiestap vervat zit. Deze stap is echter moeilijk te standaardiseren en het bleek dan ook een hele uitdaging om de bekomen resultaten te herhalen. In de toekomst zal het gebruikte protocol verder geoptimaliseerd worden en kan de sonicatiestap vervangen worden door een EDTA-precipitatie.

Wanneer de totale hoeveelheid suikers bekeken wordt, blijkt dat de *rfaG* mutant over meer CW-PS beschikt dan de andere geteste stammen. Nog interessanter zijn de monomeeranalyses: de *rfaG* mutant blijkt over opvallend veel galactoserijke structuren te beschikken en heel weinig glucoserijke fracties. Dit kan een indicatie zijn dat de mutant over meer grote, galactoserijke EPS-b fracties beschikt. Om hierover uitsluitsel te krijgen, zullen er in de toekomst AFM-studies uitgevoerd worden op deze mutant zoals beschreven in Francius *et al.*, 2008.

De celwandproteïnen van de *rfaG* mutant werden eveneens geanalyseerd. De resultaten tonen aan dat de *rfaG* mutant over minder celwandproteïnen lijkt te beschikken in vergelijking met wild type LGG. De *dltD* mutant heeft in verhouding dan weer meer celwandproteïnen. Het is echter moeilijk om rechtlijnige conclusies uit deze analyse te trekken. De resultaten kunnen namelijk zowel verklaard worden door de hoeveelheid proteïnen aanwezig op het celwandoppervlak als door een verschillende gevoeligheid aan de behandeling met lysozyme en mutanolysine. De voorgestelde resultaten leveren enkel een eerste indicatie op over de celwandproteïnen van de *rfaG* mutant. Verdere analyses moeten meer duidelijkheid brengen of de resultaten veroorzaakt worden door een lager aantal proteïnen op het celwandoppervlak

of door een hogere resistentie van de celwand tegen de inwerking van lysozyme en mutanolysine. Uit bioscreenresultaten van de *rfaG* mutant in aanwezigheid van lysozyme (data niet weergegeven), blijkt dat de mutant niet veel moeite heeft met groei in aanwezigheid van lysozyme: de groei verloopt quasi gelijk met deze van wild type LGG.

De huidige hypothese omtrent de gunstige werking van probiotica houdt in dat de probiotische cellen interageren met het GIT via moleculen op hun celwandoppervlak of via moleculen die ze secreteren in het extracellulair milieu. De *rfaG* mutant werd dan ook getest met antilichamen gericht tegen zo'n gesecreteerd proteïne: p75. De *rfaG* mutant vertoonde hierbij geen significante verschillen met wild type LGG. Verdere analyses zijn nodig om te om na te gaan of de *rfaG* mutant geraakt is in een molecule dat een onderdeel vormt van de celwand of in een molecule dat gesecreteerd wordt.

De resultaten van de adhesie-experimenten bevestigen dat de *rfaG* mutant het moeilijk heeft met resistentie tegen diverse stressfactoren. Wild type LGG is in staat om biofilmen te vormen wanneer de bacteriecellen in contact komen met stressfactoren en kan zo zichzelf hiertegen beschermen (Lebeer *et al.*, 2007b). Vandaar dat de biofilmvorming ook sterk verhoogd is in aanwezigheid van stressors, zoals gal en mucine.

De *rfaG* mutant echter vormt in geen enkele van de geteste condities biofilm en is dus niet meer in staat om zichzelf te beschermen. Ook in condities zonder extra stressfactoren, zoals de gewone groeimedia, is er geen biofilmvorming waar te nemen. De *rfaG* mutant heeft dus problemen om te adhereren aan een oppervlak. Adhesie is een proces dat gereguleerd wordt door moleculen op het oppervlak van de micro-organismen, de *rfaG* mutant is dus naar alle waarschijnlijkheid geraakt in de synthese of modificatie van een oppervlaktemolecule. Dit bevestigt de mogelijke rol als glycosyltransferase.

Deze hypothese werd verder onderzocht door de adhesie aan Caco-2 cellen, een menselijke epitheelcellijn, te testen. Ook hier vertoonde de *rfaG* mutant zeer lage adhesiewaarden. In deze assay was het mogelijk om de mutant te vergelijken met andere, reeds gekarakteriseerde mutanten. De *rfaG* mutant blijkt een gelijkaardig patroon te vertonen als de *spaCBA* mutant die geen pili meer heeft. Ook de CMPG5413 mutant die aberrant is in quorum sensing en een extra spontane suppressormutatie bevat, vertoont gelijkaardige waarden. De karakterisatie van de CMPG5413 is nog aan de gang, maar op dit moment wordt gedacht dat de spontane mutatie misschien verband houdt met de genencluster voor de biosynthese van CW-PS. Het is dus mogelijk dat de *rfaG* mutant geraakt is in gelijkaardige oppervlaktemoleculen als deze andere mutanten.

De *in vivo* experimenten met muizen leveren ons meer informatie op over het feitelijke gedrag van de *rfaG* mutant in het GIT. Uit de resultaten blijkt dat de *rfaG* mutant slecht presteert qua persistentie in het GIT.

Wanneer de faecesstalen van de vier proefdieren bekeken worden, is duidelijk te zien dat de aanwezigheid van de *rfaG* drastisch daalt naarmate de tijd verstrijkt. Dit kan twee dingen betekenen: of de *rfaG* mutant adhereert beter dan wild type LGG aan de darmwand en verblijft dus nog in het GIT, of de mutant werd afgedood door de strenge condities die de micro-organismen ontmoeten over de lengte van het GIT. Dit zou opnieuw een indicatie zijn dat de *rfaG* mutant niet goed bestand is tegen stressfactoren en afgedood het GIT verlaat. Om meer inzicht te verwerven in wat er precies gebeurt, werden er ook stalen genomen op specifieke plaatsen in het GIT zelf.

De lage aantallen levende *rfaG* mutanten in de stalen van de inhoud van de maag, het ileum, het caecum en het colon kunnen eventueel verklaard worden door een sterke adhesie aan de darmwand. De lage waarden voor de competitieve index geven echter aan dat het meer waarschijnlijk is dat de *rfaG* mutant de transit doorheen het GIT niet kan overleven door de aanwezige stressors.

Tenslotte werden ook de weefsels van het GIT zelf getest: deze werden dusdanig behandeld dat eventueel geadhereerde bacteriën losgemaakt werden van het epitheel en er een bepaling van de competitieve index mogelijk was. Deze waarden liggen ook hier zeer laag voor de *rfaG* mutant.

Deze slechte *in vivo* persistentie is in overeenstemming met de resultaten *in vitro* (groeiexperimenten, adhesie aan Caco-2 cellen en biofilmvorming). De combinatie van de aanwezigheid van bile, mucine en eventueel de lage pH lijken te extreem voor de *rfaG* mutant.

Een ander belangrijk aspect bij de werking van probiotica is de mate waarin deze een modulatorische invloed kunnen hebben op het immuunsysteem. In dit werk werd dit enkel getest voor de inductie van IL-8, als een indicatie voor de interactie met de epitheelcellen.

De *rfaG* mutant vertoonde een lage IL-8 inductie, die vergelijkbaar was met de negatieve controle. Dit kan er op wijzen dat de *rfaG* mutant doorheen het GIT nauwelijks opgemerkt wordt door het immuunsysteem en er waarschijnlijk niet of nauwelijks mee kan interageren. Dit kan opnieuw een aanwijzing zijn dat de *rfaG* mutant door een gebrekkige interactie met het GIT niet in staat is om zijn probiotische effecten op de fysiologie van de gastheer uit te bouwen.

DEEL V: CONCLUSIE

Waarvoor het uitgeschakelde *rfaG* gen, nu precies codeert is nog niet duidelijk. Wel leverden de tot nog toe uitgevoerde experimenten een heleboel aanwijzingen op om latere, meer diepgaande analyses op te baseren. Uit de bekomen resultaten kan wel geconcludeerd worden dat de *rfaG* mutant geraakt is op zijn oppervlak, wat rechtstreeks of onrechtstreeks verband houdt met de stressresistentie en de adhesie aan oppervlakken.

De grote analogie met enkele resultaten voor de *spaCBA* mutant kunnen misschien een indicatie zijn van een mutatie die verband houdt met de pili of de glycosylatie ervan. Waarschijnlijk is er dus een verandering in suikersubstituties op het celwandoppervlak van de *rfaG* mutant. Dit wordt gestaafd door analogie met de CMPG5413 mutant die waarschijnlijk een extra mutatie heeft opgelopen in de genencluster die codeert voor belangrijke enzymen in de EPS-biosynthese. Ook de analogie van *rfaG* met glycosyltransferases in andere species doet vermoeden dat er iets mank loopt bij de glycosylatie van een cruciaal oppervlaktemolecule. Deze hypothese wordt tevens bevestigd door de lage hoeveelheid glucoserijke EPS-b-structuren die kan teruggevonden worden op het oppervlak van de mutant en de heel hoge fractie galactoserijk EPS-b.

Het is echter nog gissen naar de aard van het oppervlaktemolecule in kwestie: of het hier om suikerstructuren op zich gaat of om de glycosylatie van oppervlaktestructuren van een andere aard, is nog onduidelijk. Een struikelblok is het gebrek aan kennis over de exacte samenstelling van moleculen van de celwand van LGG en hoe deze precies gemodificeerd (substituties, glycosylaties, alanylaties...) zijn. Uit BLAST-data bleek het *rfaG* gen verwant met enzymen van belang bij de glycosylatie van teichoïnezuren in andere species. Ook de voorlopige annotatie van het gen verwijst naar de glycosylatie van 'wall' teichoïnezuren (WTA), maar het is nog lang niet zeker of LGG wel beschikt over dit molecule.

In de toekomst zullen verdere analyses en de constructie van nieuwe mutanten meer licht moeten werpen op de constitutie van de celwand van LGG en of LGG nu al dan niet over WTA beschikt. Bovendien kan er niet uitgesloten worden dat nog andere, tot nog toe onbekende, structuren deel uitmaken van de celwand van LGG. Recent werd namelijk in *Lactococcus lactis* een extra laag polysachariden ontdekt dat de hele celwand omgeeft (Chapot-Chartier *et al.*, 2010). Deze polysacharidenlaag zou bescherming bieden tegen fagocytose door bepaalde macrofagen. De polysachariden worden gecodeerd door een genencluster die losstaat van de synthese van de al langer bekende aanwezige polysachariden. Het is dus op dit moment nog niet duidelijk of dit een fenomeen is dat ook aangetroffen kan worden bij andere Gram-positieve bacteriën (Chapot-Chartier *et al.*, 2010). Misschien beschikt LGG dus ook wel over deze structuur en speelt de nieuwe *rfaG* mutant hierin een rol.

De *rfaG* mutant blijkt perspectieven te bieden qua ontrafelen van nieuwe aspecten van de opbouw van de celwand en nog belangrijker qua inzichten in de moleculaire basis van de probiotische effecten. Gezien de homologie met glycosyltransferases in andere species en de hier beschreven resultaten, zal de *rfaG* mutant vooral een rol kunnen spelen in het uitbreiden van de kennis over glycosylatieprocessen op het oppervlak. De *rfaG* mutant is tevens geraakt in enkele eigenschappen van belang voor de probiotische werking: adhesie en modulatie van het immuunsysteem zijn aangetast. Het is interessant om het huidige, provisorische fenotype van de *rfaG* mutant, onder andere de verlaagde stressresistentie, in verband te kunnen brengen met molecules op het celoppervlak.

In de toekomst is een verdere en meer diepgaande karakterisatie van de *rfaG* mutant opportuun. De verdere vergelijking van bestaande en nieuw aangemaakte mutanten levert stap voor stap meer kennis op over de constitutie van de celwand van LGG en de moleculaire mechanismen die aan de basis liggen van de probiotische functies.

Op langere termijn zal dit mogelijk leiden tot probiotische stammen die geschikt zijn om in te zetten tegen diverse aandoeningen van het GIT. Gezien de complexiteit van de probiotische functies en de complexiteit van klinische aandoeningen, zullen er voor diverse aandoeningen mogelijk specifieke, geoptimaliseerde probiotische stammen bestaan. De ideale probiotische bacterie die een antwoord kan bieden op een plethora aan aandoeningen is waarschijnlijk een utopie. Wel wordt het meer en meer duidelijk dat probiotica een belangrijke rol kunnen spelen in de preventie en genezing van aandoeningen van het GIT.

SAMENVATTING

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) wordt beschouwd als een modelorganisme voor probiotische stammen. Probiotica zijn ‘levende micro-organismen die, indien ze in voldoende hoeveelheden worden opgenomen, een positief gezondheidseffect hebben op de gastheer’. De probiotische invloeden situeren zich vooral ter hoogte van het gastro-intestinaal kanaal. In de toekomst wil men probiotica, waaronder LGG, inzetten ter preventie en genezing van verschillende aandoeningen. De beperkte kennis over de moleculaire mechanismen die aan de basis liggen van de positieve effecten op de gastheer, vormt een groot obstakel. Er wordt aangenomen dat de moleculen, belangrijk voor het probiotisch effect, terug te vinden zijn op het celwandoppervlak van de bacteriën of gesecreteerd worden in het extracellulair milieu.

Om meer te weten te komen over de moleculaire mechanismen en de opbouw van de celwand van LGG, worden er in het CMPG mutanten aangemaakt waarin genen die cruciaal zijn voor de correcte constructie van de celwand werden uitgeschakeld. Na een grondige studie van de huidige kennis omtrent de moleculaire basis van de probiotische werking en de fysiologie van de celwand, werd een nieuwe mutant aangemaakt.

Glycosylatieprocessen zouden een belangrijke rol kunnen spelen bij de specifieke interactie van probiotica met de gastheer. Om de rol van suikermoleculen op het celwandoppervlak van LGG na te gaan, werd het *rfaG* gen uitgeschakeld. Dit gen zou immers, op basis van homologie, coderen voor een glycosyltransferase dat gelinkt kan worden aan de modificatie van ‘wall’ teichoïnezuren. Of LGG al dan niet over deze ‘wall’ teichoïnezuren beschikt, is op dit moment nog niet bewezen.

Na aanmaak van de *rfaG* mutant, werd gestart met een algemene karakterisatie van deze mutant. Groeitesten in media waaraan stressfactoren (o.a. gal en mucines) werden toegevoegd, toonden een duidelijk daling van de viabiliteit van de mutant. Biofilmvorming, dat gezien wordt als natuurlijke bescherming tegen stressfactoren, bleek eveneens geraakt. Een andere belangrijke eigenschap van probiotica is een goede adhesiecapaciteit, aangezien dit de interactie met de gastheer bevordert. Het uitschakelen van het *rfaG* gen resulteerde in een lagere adhesie *in vitro* aan humane epitheelcellen. De lage stressresistentie van de *rfaG* mutant *in vitro*, werd bevestigd in een *in vivo* experiment in muizen. Verder werd er bij deze mutant een grote toename in de fractie galactoserijke en een verlaging van de glucoserijke celwandpolysachariden waargenomen. Dit laatste lijkt de functie van het *rfaG* gen als glycosyltransferase te bevestigen.

In de toekomst zullen wetenschappers verder pogen om meer duidelijkheid te scheppen in de functionaliteit van de celwand en de moleculaire mechanismen die aan de basis liggen van de probiotische werking van LGG en andere bacteriën. De *rfaG* mutant kan door zijn interessant fenotype hier wat meer inzicht in brengen, vooral dan op het gebied van glycosylatieprocessen.

SUMMARY

Over the past few years *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) has become a model organism for other probiotic strains. A probiotic bacterium is defined as ‘a live microorganism that, when administered in adequate amounts, confers a health benefit on the host’. Probiotics are especially active in the gastrointestinal tract. In the future scientists want to use probiotics, including LGG, to prevent and treat various disorders. But there are still some big obstacles to tackle before probiotics can be used in clinical application. Little is known about the molecular mechanisms that form the foundations of the positive effects on the host. Experts assume that the modulating molecules are to be found on the cell wall or that these are secreted in the extracellular medium.

To obtain more knowledge about the molecular mechanisms and the constitution of the cell wall of LGG, mutants are constructed in the CMPG, in which crucial genes for the accurate construction of the cell wall are knocked-out. After performing a study of the current knowledge on the molecular basis of probiotic function and the physiology of the cell wall, a new knock-out mutant was made.

Glycosylation processes seem to be of great importance for the specific interaction of probiotic strains with the host. To obtain more information about the role of sugarmolecules on the cell wall of LGG, the *rfaG* gene was knocked out. Based on homology studies, this gene codes for ‘a putative glycosyltransferase linked to the modification of wall teichoic acid’. Unfortunately it’s not clear at the moment if LGG actually has wall teichoic acids on its cell wall.

Once the *rfaG* mutant was constructed, the characterization could begin. Growth experiments in media where stressors (like bile and mucine) were added, show a distinct decline in the viability of the mutant. Biofilmformation, which is a natural protection mechanism against stressors, was also affected. Another feater that’s important for interactions between the probiotic and the host, is their capacity to adhere. The knock-out of the *rfaG* gene resulted in a decreased *in vitro* adherence capacity to human epithelial cells. The low stress resistance of the *rfaG* mutant *in vitro* was confirmed *in vivo* in an experiment with mice. Furthermore the mutant showed an increase in galactose rich exopolysaccharides and a decrease in glucose rich cell wall polysaccharides. These last results seem to confirm the role of the *rfaG* gene in glycosyltransferase processes.

In the future the existing hypotheses on the molecular foundations of probiotic functionality and the composition of the cell wall will be further examined. The *rfaG* mutant can contribute to this research thanks to its interesting phenotype, especially on glycosylation processes.

REFERENTIES

- Alvarez M.A., Herrero M. & Suarez J.E. (1998). The Site-Specific Recombination System of the *Lactobacillus* Species Bacteriophage A2 Integrates in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Virology*, **250**, 185-193.
- Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A. & Gordon J.I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, **307**, 1915-1920.
- Chapot-Chartier M.-P., Vinogradov E., Sadovskaya I., Andre G., Mistou M.-Y., Trieu-Cuot P., Furlan S., Bidnenko E., Courtin P., Péchoux C., Hols P., Dufrêne Y. & Kulakauskas S. (2010). Cell Surface of *Lactococcus lactis* Is Covered by a Protective Polysaccharide Pellicle. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 14, 10464-10471.
- D'Elia M.A., Millar K.E., Beveridge T.J. & Brown E.D. (2006). Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **188**, 8313-8316.
- De Keersmaecker S.C.J., Verhoeven T.L.A., Desair J., Marchal K., Vanderleyden J. & Nagy I. (2006a). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.*, **259**, 89-96.
- De Keersmaecker S.C.J., Braeken K., Verhoeven T.L.A., Perea Vélez M., Lebeer S., Vanderleyden J. & Hols P. (2006b). Flow Cytometric Testing of Green Fluorescent Protein-Tagged *Lactobacillus rhamnosus* GG for Response to Defensins. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7, 4923-4930.
- Debabov D.V., Kiriukhin M.Y. & Neuhaus F.C. (2000). Biosynthesis of Lipoteichoic Acid in *Lactobacillus rhamnosus*: Role of DltD in D-Alanylation. *Journal of Bacteriology*, **182**, 10, 2855-2864.
- Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E. & Hols P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 159-184.
- Delzenne N., Cherbut C. & Neyrinck A. (2003). Prebiotics: actual and potential effects in inflammatory and malignant colonic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **6**, 581-586.
- Doron S., Snyderman D.R. & Gorbac S.L. (2005). *Lactobacillus* GG: Bacteriology and Clinical Applications. *Gastroenterol. Clin. N. Am.*, **34**, 183-198.
- Dunne C. & Shanahan F. (2002). Role of probiotics in the treatment of intestinal infections and inflammation. *Current Opinion in Gastroenterology*, **18**, 40-45.
- Eijsink V.G.H., Axelsson L., Diep B., Havarstein L.S., Holo H. & Nes I.F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**, 639-654.

- FAO/WHO (2001). Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. WHO, Geneva, Switzerland.
- Fisseha M. & Arigoni F. (2005). Beyond genome sequences: approaches to genome-wide analysis of gut bacteria. *Probiotics & prebiotics: scientific aspects*, 97-128.
- Francius G., Lebeer S., Alsteens D., Wildling L., Gruber H.J., Hols P., De Keersmaecker S., Vanderleyden J. & Dufrêne Y.F. (2008). Detection, Localization and Conformational Analysis of Single Polysaccharide Molecules on Live Bacteria. *ACSNano*, **2**, 9, 1921-1929.
- Gupta V. & Garg R. (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **27**, 3, 202-209.
- Hoiseh S.K. & Stocker B.A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, **291**, 5812, 238-239.
- Johnson-Henry K.C., Hagen K.E., Gordonpour M., Tompkins T.A. & Sherman P.M. (2007). Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, **9**, 356-367.
- Johnson-Henry K.C., Donato K.A., Shen-Tu G., Gordonpour A. & Sherman P.A. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect. Immun.*, **76**, 1340-1348.
- Jung H.C., Eckmann L., Yang S.-K., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E. & Kagnoff M.F. (1995). A Distinct Array of Proinflammatory Cytokines Is Expressed in Human Colon Epithelial Cells in Response to Bacterial Invasion. *J. Clin. Invest.*, **95**, 55-65.
- Kang J.Y., Nan X., Jin M.S., Youn S.-J. Ryu Y.H., Mah S., Han S.H., Lee H., Paik S.-G. & Lee J.-O. (2009). Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like receptor 2 – Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity*, **31**, 1-12.
- Kankainen M., Paulin L., Tynkkynen S., von Ossowski I., Reunanen J., Partanen P., Satokari R., Versterlund S., Hendrickx, A.P.A., Lebeer S., De Keermaecker S.C.J., Vanderleyden J., Hämäläinen T., Laukkanen S., Salovuori N., Ritari J., Alatalo E., Korpela R., Mattila-Sandholm T., Lassig A., Hatakka K., Kinnunen K.T., Karjalainen H., Saxelin M., Laakso K., Surakka A., Palva A., Salusjärvi T., Auvinen P. & de Vos W. (2009). Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *PNAS*, **106**, 40, 17193-17198.
- Kleerebezem M. & Vaughan E.E. (2009). Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity. *Annu. Rev. Microbiol.*, **63**, 269-290.
- Kleerebezem M., Hols P., Bernard E., Rolain T., Zhou M., Siezen R.J. & Bron P.A. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.*, **34**, 199-230.

- Lebeer S., De Keersmaecker S.C.J., Verhoeven T.L.A., Fadda A.A., Marchal K. & Vanderleyden J. (2007a). Functional Analysis of *luxS* in the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG Reveals a Central Metabolic Role Important for Growth and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, **189**, 3, 860-871.
- Lebeer S., Verhoeven T.L.A., Perea Vélez M., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. (2007b). Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 21, 6768-6775.
- Lebeer, S. (2008). Doctoraatsproefschrift KULeuven nr. 817. Molecular study of adaptation and probiotic factors in *Lactobacillus rhamnosus* GG.
- Lebeer S., Claes I.J., Verhoeven T.L.A., Shen C., Lambrichts I., Ceuppens J.L., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. (2008a). Impact of *luxS* and Suppressor Mutations on the Gastrointestinal Transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 15, 4711-4718.
- Lebeer S., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. (2008b). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**, 4, 728-764.
- Lebeer S., Verhoeven T.L.A., Francius G., Schoofs G., Lambrichts I., Dufrêne Y., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. (2009). Identification of a Gene Cluster for the Biosynthesis of a Long Galactose-Rich Exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and Functional Analysis of the Priming Glycosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 11, 3554-3563.
- Lebeer S., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 171-184.
- Lilly D.M. & Stillwell R.H. (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, **147**, 747-748.
- Mackie R.I., Sghir A. & Gaskins R.H. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, **69** suppl., 1035S-1045S.
- Mandlik A., Swierczynski A., Das A. & Ton-That H. (2007). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology*, **16**, 1, 33-40.
- Marco M.L., Pavan S. & Kleerebezem M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 204-210.
- Martin F.P.J., Wang Y., Sprenger N., Yap I.K.S, Lundstedt T., Lek P., Rezzi S., Ramadan Z., van Bladeren P., Fay L.B., Kochhar S., Lindon J.C., Holmes E. & Nicholson J.K. (2008). Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol. Syst. Biol.*, **4**, 157.

- Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, **449**, 819-826.
- Morita H., Toh H., Oshima K., Murakami M., Taylor T.D., Igimi S. & Hattori M. (2009). Complete Genome Sequence of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53105. *Journal of Bacteriology*, **191**, 24, 7630-7631.
- Neuhaus F.C. & Baddiley J. (2003). A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 4, 686-723.
- Otte J.M., Cario E. & Podolsky D.K. (2004). Mechanisms of cross hyporesponsiveness to toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, **126**, 1054-1070.
- Perea Vélez M., Verhoeven T.L.A., Draing C., Von Aulock S., Pfitzenmaier M., Geyer A., Lambrichts I., Grangette C., Pot B., Vanderleyden J. & De Keersmaecker S.C.J. (2007a). Functional Analysis of D-Alanylation of Lipoteichoic Acid in the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 11, 3595-3604.
- Perea Vélez M., De Keersmaecker S.C.J. & Vanderleyden J. (2007b). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, **276**, 140-148.
- Perego M., Glaser P., Minutello A., Strauch M.A., Leopold K. & Fischer W. (1995). Incorporation of D-Alanine into Lipoteichoic Acid and Wall Teichoic Acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 26, 15598-15606.
- Peschel A., Otto M., Jack W.J., Kalbacher H., Jung G. & Götz F. (1999). Inactivation of the *dlt* Operon in *Staphylococcus aureus* Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 13, 8405-8410.
- Preidis G.A. & Versalovic J. (2009). Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology*, **136**, 2015-2031.
- Proft T. & Baker E.N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **66**, 613-635.
- Rachmilewitz D., Katakura K., Karmeli F., Hayashi T., Reinus C., Rudensky B., Akira S., Takeda K., Lee J., Takabayashi K. & Raz E. (2004). Toll-Like Receptor 9 Signaling Mediates the Anti-inflammatory Effects of Probiotics in Murine Experimental Colitis. *Gastroenterology*, **126**, 520-528.
- Rahman O., Dover G.D. & Sutcliffe I.C. (2009). Lipoteichoic acid biosynthesis: two steps forwards, one step sideways? *Trends in Microbiology*, **17**, 6, 219-225.
- Rook G.A.W. (2008). Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*, **126**, 3-11.

- Schäffer C. & Messner P. (2005). The structure of secondary cell wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together. *Microbiology*, **151**, 643-651.
- Scheffers D.J. & Pinho M.G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 585-607.
- Servin A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 405-440.
- Shanahan F. (2001). Inflammatory Bowel Disease: Immunodiagnostics, Immunotherapeutics, and Ecotherapeutics. *Gastroenterology*, **120**, 622-635.
- Shanahan F. (2004a). Probiotics in inflammatory bowel disease – therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 809-818.
- Shanahan F. (2004b). Probiotics and the Immune Response: How Much Can We Expect? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **39**, S748-S749.
- Shanahan F. & Bernstein C.N. (2009). The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, **25**, 301-305.
- Silva M., Jacobus N.V., Deneke C. & Gorbach S.L. (1987). Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**, 8, 1231-1233.
- Stingele F., Neeser J.-R. & Mollet B. (1996). Identification and Characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) Gene Cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology*, **178**, 6, 1680-16890.
- Tallon R., Bressollier P. & Urdaci M.C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*, **154**, 705-712.
- van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D. & Maguin E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 187-216.
- von Ossowski I., Reunanen J., Satokari R., Vesterlund S., Kankainen M., Huhtinen H., Tynkkynen S., Salminen S., de Vos W.M. & Palva A. (2010). Mucosal Adhesion Properties of the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED Pilin Subunits. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 7, 2049-2057.
- Walter J. 2005. The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract. *Probiotics & prebiotics: scientific aspects*, 51-82.
- Weidenmaier C., Kokai-Kun J.F., Kristian S.A., Chanturiya T., Kalbacher H., Gross M., Nicholson G., Neumeister B., Mond J.M. & Peschel A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine*, **10**, 3, 243-245.

- Weidenmaier C., Peschel A., Xiong Y.Q., Kristian S.A., Dietz K., Yeaman M.R. & Bayer A.S. (2005). Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.*, **191**, 10, 1771-1777.
- Weidenmaier C. & Peschel A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 276-287.
- West N.P., Pyne D.B., Peake J.M. & Cripps A.W. (2009). Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exerc. Immunol. Rev.*, **15**, 107-126.
- Wu H. & Fives-Taylor P.M. (2001). Molecular Strategies for Fimbrial Expression and Assembly. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **12**, 2, 101-115.
- Xia G., Maier L., Sanchez-Carballo P., Li M., Otto M., Holst O. & Peschel A. (2010). Glycosylation of wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* by TarM. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**, 18, 13405-13415.
- Yan F., Cao H., Cover T.L., Whitehead R., Washington M.K., Polk D.B. (2007). Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cells Survival and Growth. *Gastroenterology*, **132**, 562-575.