

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP





# Forord

Denne oppgaven ble utført i gruppa for Molekylær cellebiologi ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM), universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB), Ås.

Først vil jeg takke min veileder, professor Tor Lea, for god hjelp i forbindelse med oppgaven.

Takk til Trine Eker Christoffersen og Charlotte Kleiveland for god hjelp og veiledning.

Takk til Lene Therese Olsen Hult for hjelp og oppmuntring, til Ellen Solum Karlstrøm for all praktisk hjelp, og til Kjetil Fosnes for hjelp med qRT-PCR og bioanalyser forsøk.

Jeg vil også takke alle andre masterstudenter og stipendiater på ”laben” og på ”sol og glede”, spesielt Vibeke Olsbu for støtte og gode stunder.

Til slutt vil jeg takke kjæresten og familien min for omsorg, støtte og for avkoblende tanker.

Ås, 12. Mai 2011

---

Lillian Gillesen

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>V</b>
<b>Forkortelser .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Innledning .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tarmepitel og funksjon .....	1
1.2 Peyerske flekker og M-celler.....	4
1.3 Basolateral side og tarmassosiert lymfoid vev .....	4
<b>1.4 Dendritiske celler .....</b>	<b>5</b>
1.4.1 Dendritiske celler .....	5
1.4.2 Dendritiske cellers modning og regulering av immunitet .....	6
1.4.3 Dendritiske celler produserer cytokiner og kjemokiner .....	8
1.4.4 Toveis kommunikasjon mellom epitel og dendritiske celler.....	8
1.5 Mikroflora i tarm.....	9
1.5.1 Mikroflora i tarm. Kommensale, probiotiske og patogene bakterier.....	9
1.5.2 Enterokokker .....	11
1.5.3 Enterococcus faecalis .....	11
1.6 Fibrinogen .....	12
1.7 Prosjekt beskrivelse .....	13
<b>2. Materialer .....</b>	<b>14</b>
2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter .....	14
2.2 Kjemikalier.....	15
2.3 Kit.....	16
2.4 Medier og løsninger.....	16
2.5 Antistoff .....	16
2.6 Primere .....	17
2.7 Bakteriestammer.....	17

<b>3. Metoder .....</b>	<b>18</b>
3.1 Cellekulturarbeid.....	18
3.2 Isolering av mononukleære celler fra perifert blod .....	18
3.3 Magnetisk separasjon av monocytter fra isolerte mononukleære celler.....	19
3.4 Differensiering og stimulering av dendrittiske celler.....	19
3.5 UV-inaktivering av bakterier.....	19
3.6 Kokultivering av bakterier og umodne dendritter .....	20
3.7 Bioassay .....	20
3.8 Fluorescens merking og væskestrømscytometri.....	20
3.9 Caco-2 polarisering .....	21
3.10 Fremføring av prøver til sveipeelektronmikroskopering.....	21
3.11 Basolateral stimulering av epitelceller .....	21
3.12 mRNA isolering, cDNA syntese og real-time PCR .....	21
3.13 Bioanalyser.....	22
<b>4. Resultater .....</b>	<b>23</b>
4.1 Differensiering og stimulering av dendrittiske celler.....	23
4.2 Suboptimale overflatemarkør for påvisning av modne dendrittiske celler.....	24
4.3 V583 er resistent mot gentamicin.....	25
4.4 UV-inaktivering av bakterier.....	26
4.5 Oppregulering av CD80 som følge av UV-inaktiverede bakterier.....	26
4.6 Oppregulering av CD83 etter stimulering med UV-inaktiverede bakterier .....	27
4.7 Påvisning av polariserte epitelceller ved hjelp av SEM .....	29
4.8 Genekspresjon av fibrinogen.....	31
<b>5. Diskusjon.....</b>	<b>35</b>
<b>Referanser .....</b>	<b>41</b>

# Sammendrag

Fordøyelsessystemet utgjør en elementær viktighet for vår helse og velvære. Tarmoverflaten består av et enkelt lag med epitelceller som skiller innholdet i tarmlumen fra kroppens andre vev. I tarmen finnes det ulike typer celler, som blant annet står for absorpsjon av næringsstoffer. Tarmepitelet blir hele tiden utsatt for ulike mikroorganismer, både gjennom tarmens egne bakterier og gjennom kosten som inntas. Immunsystemet må skille mellom eget og fremmed, og mellom fredelige og sykdomsfremkallende mikrober for å unngå sykdommer som matallergi, kronisk inflammatorisk tarmsykdom og tarmkreft.

Dendrittiske celler har svært viktige funksjoner ved igangsettelse av immunrespons i tarm. Dendrittene på de dendrittiske cellene kan forlenges og trenge mellom epitelcellene slik at de kommer i direkte kontakt med innholdet i tarmlumen. Dendrittiske celler vil kjenne igjen fremmede mikroorganismer. De vil da modnes og migrere til lymfeknuter, hvor de vil stimulere T-celler.

Man ville i denne studien undersøke om dendrittiske celler eksponert for patogene, probiotiske og kommensale *Enterococcus faecalis* stammer, induverte til ulik ekspresjon av overflatemolekylene og modningsmarkørene CD80 og CD83. De ulike *E. faecalis* stammene viste ingen forskjeller i evnen til å modne dendrittiske celler.

Kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for probiotiske, kommensale og patogene bakterier ble påført den basolaterale siden av polarisert tarmepitel. Tidligere resultater fra en transkriptomanalyse (mikromatrise) hadde vist en kraftig nedregulering av fibrinogen. Man ville verifisere dette ved å bruke real time-PCR, men kunne ikke finne noen markant regulering av uttrykt fibrinogen.

# Abstract

The gastrointestinal tract has a fundamental impact on our health and well-being. The intestinal surface consists of a simple layer of epithelial cells that separates the intestinal luminal content from the other tissues in the body. In the intestine, you can find many different cell types that among other things are responsible for absorption of nutrition. The intestinal epithelium is continuously exposed to different microorganisms, both through the intestines own bacteria and trough food ingested. The immune system have to segregate between its own and foreign material, and between unharmful and disease promoting microorganisms to avoid diseases like food allergy, intestinal bowel disease and intestinal cancer.

Dendritic cells have a central function in the initiation of an immune response in the intestine. The dendrites on the dendritic cells can extend between the epithelial cells, to get in contact with the content of the intestinal lumen. Dendritic cells will recognize foreign microorganisms and subsequently mature and migrate to lymph nodes, where they will stimulate T-cells.

In this study, we wanted to investigate if dendritic cells exposed to a pathogen, a probiotic and a commensal bacteria strain, all *E. faecalis* strains, induced to differences in the expressions of the surface molecules and maturation markers CD80 and CD83. The different *E. faecalis* strains didn't show any differences in their ability to mature dendritic cells.

Conditioned medium from dendritic cells exposed to probiotic, commensal and pathogen bacteria strains, was applied on the basolateral side of the polarized intestinal epithelium. Earlier results from a transcriptome analysis (microarray) had shown a strong down-regulation of fibrinogen. We wanted to verify this by using real time-PCR, but could not find any pronounced regulations of expressed fibrinogen.

# Forkortelser

<b>Forkortelser</b>	<b>Forklaring</b>
APC	Antigen presenterende celler
BSA	Bovint serumalbumin
DC	Dendrittiske celler
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDTA	Etylendiamintetraacetic syre
FCS	Føtalt kalveserum
GALT	Tarmassosiert lymfoid vev
GM-CSF	Granulocytt makrofag koloni stimulerende faktor
IL	Interleukin
INF- $\alpha$	Interferon $\alpha$
LL	Under til venstre
LPS	Lipopolysakarid
LR	Under til høyre
M-celler	Microfold-celler
M-CSF	Makrofag stimulerende faktor
MHC	Hovedvevsforlikelighetsantigenkompleks
MLN	Messentrisk lymfeknute
MyD88	Myeloid differentiation primary-response gene 88
NLR	Nukleotid oligomerisering domene-lignende reseptor
OD	Optisk tetthet
PBS	Fosfatbufret saltvann
qRT-PCR	Kvantitativ real time polymerase chain reaction
RIN	RNA integritet nummer
RPLP0	Ribosomal Protein, large, P0
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
TCR	T-celle reseptor
TH celle	T-hjelpe celle
TGF- $\beta$	Transforming vekstfaktor $\beta$
TLR	Toll lignende reseptor



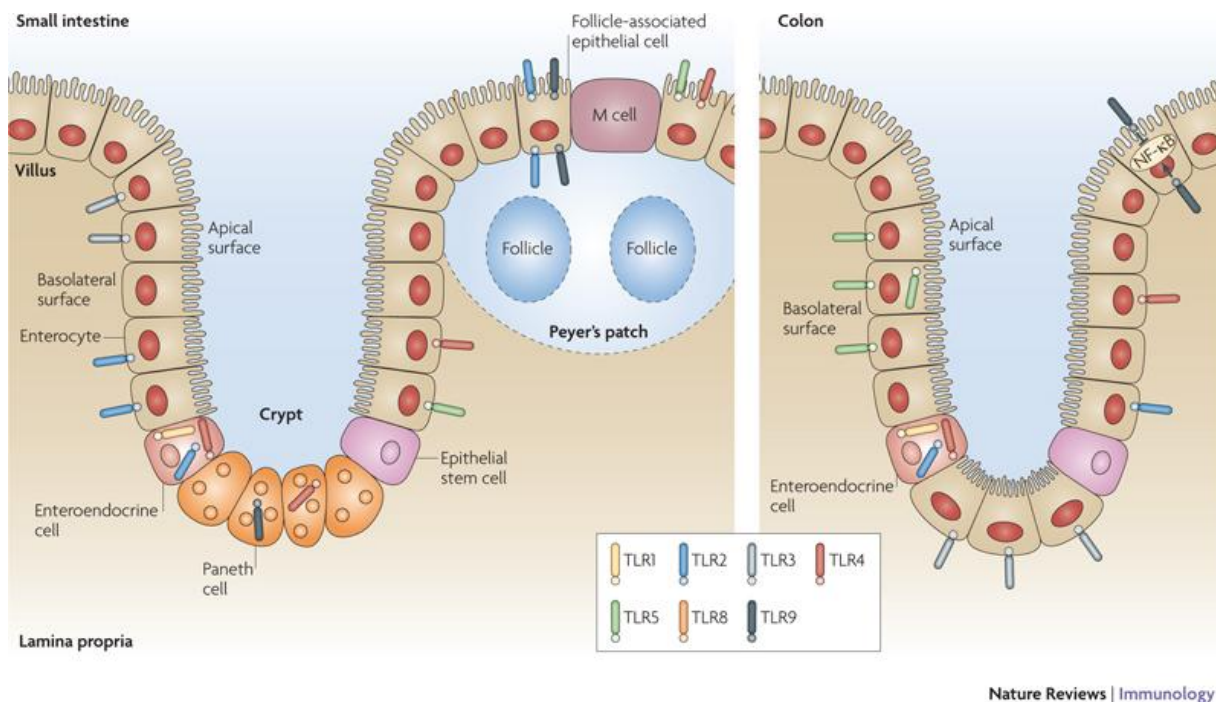
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TMTC	For mange å telle (>300)
UR	Øverst til høyre
UL	Øverst til venstre

# 1 Innledning

## 1.1 Tarmepitel og funksjon

Tarmoverflaten, som er ca 100 m<sup>2</sup>, består av et enkelt lag med epitelceller som skiller innholdet i tarmlumen fra kroppens andre vev. Alt epitel er strukturelt polarisert, og fungerer som en selektiv gjennomtrengelig barriere. Polariserte epitelceller har en apikal (overside) og en basolateral (underside) side (se figur 1).

Den apikale siden på epitelcellene, som vender inn mot tarmlumen i tynntarmen, har tarmtotter (villi) med børstesøm (mikrovilli) (se figur 1). Epitelcellene er dekket av et tykt slimlag (mucin) og glykosylerte membranproteiner. I tynntarmen er det omtrent 40-50 tarmtotter per mm<sup>2</sup>, og de er fra 0,5 til 1,5 mm lange. Epitelcellelaget i tykktarmen er ikke organisert i tarmtotter, men apikal side er dekket med børstesøm (Abreu, 2010).

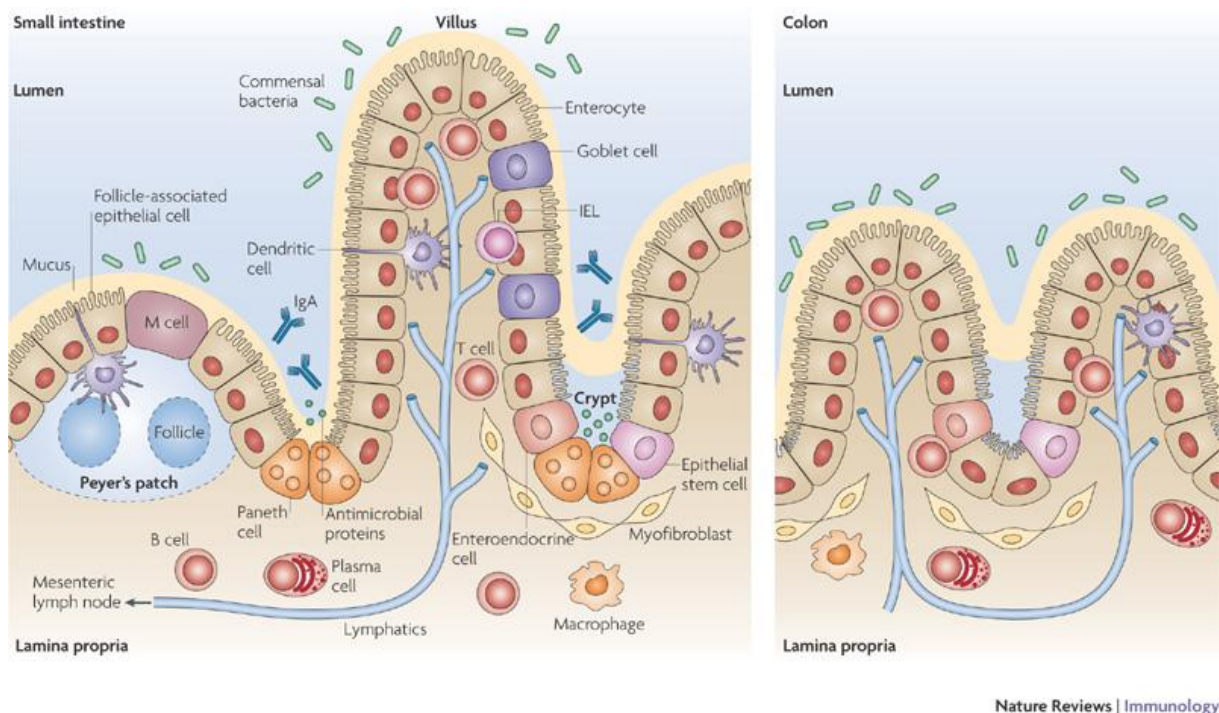


**Figur 1:** Figuren illustrerer oppbygningen av epitel i tynn- ("small intestine") og tykktarm ("colon"). Den viser apikal og basolateral side. (Abreu, 2010).

Mikrovilli er 1 µm lange og forekommer med en tetthet på omtrent 200 000 per mm<sup>2</sup>. Mellom tarmtottene er det innbuktninger som kalles krypter. I tarmen finnes det ulike typer celler, som enterocytter, Paneth celler, begerceller (goblet cells), enteroendokrine celler, microfold celler

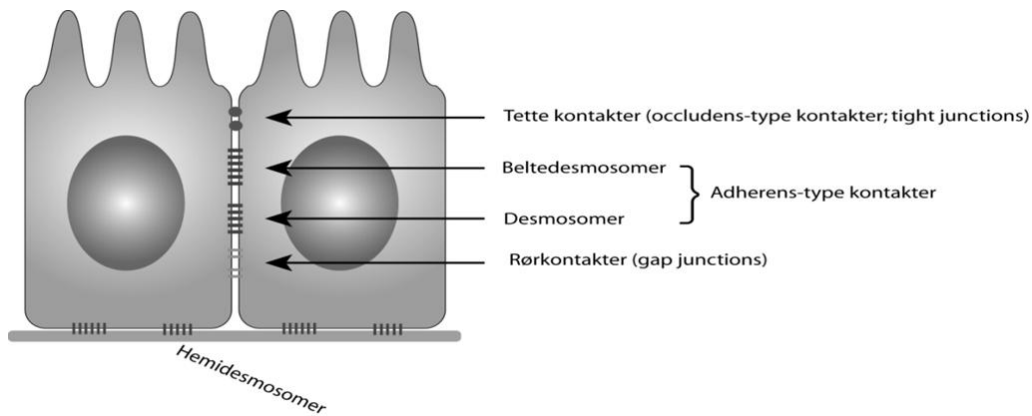
(M-celler), stamceller, lymfocytter, makrofager og dendrittiske celler (se figur 2).

Enterocytter er den dominerende celletypen. De står for absorpsjon av næringsstoffer og syntetiserer og skiller ut proinflammatoriske forbindelser. Enteroendokrine celler er hormonproduserende celler og begerceller er slimproduserende celler. Nederst i kryptene finner man stamcellene og Paneth cellene. Stamcellene sørger for kontinuerlig fornyelse av epitelcellelaget. Paneth cellene produserer antimikrobielle forbindelser, som kan hemme vekst av patogene organismer som bakterier, sopp og parasitter.



**Figur 2: Tynn- og tykktarm inneholder ulike celletyper, og andre omkringliggende celler. Man kan her se beger celler, stamceller, Paneth celler, enteroendokrine celler, M-celler, makrofager og dendrittiske celler. Tynntarmepitel har tarmtotter (villus), og mellom dem er det krypter. I kryptene finner man Panethceller og stamceller. De peyerske flekkene finner man like under epitelcellelaget i tynntarmen. I lamina propria, under de peyerske flekkene og M-cellene, finner man dendrittiske celler, lymfocytter og makrofager. (Abreu, 2010).**

Epitelceller er bundet tett sammen ved hjelp av cellekontakter (se figur 3). Kontaktpunktene mellom celler danner blant annet kommunikasjonsveier som tillater cellene å utveksle signaler som koordinerer deres oppførsel og regulerer deres genuttrykk. Disse kontaktpunktene har forskjellige funksjoner.



**Figur 3: Mellom epitelcellene er det ulike kontaktpunkter. Figuren viser tette kontakter, beltedesmosomer, desmosomer, rørkontakter og hemidesmosomer. Tette kontakter holder nærliggende epitelceller sammen, og sørger for at molekyler ikke kan passere fritt gjennom epitelcellelaget. Desmosomer og beltedesmosomer gir blant annet mekanisk styrke til cellelaget. Rørkontakter sørger for fri passering av molekyler og ioner mellom to epitelceller. Hemidesmosomer binder epitelceller og basalmembranen sammen (Lea, 2011).**

Nærmest den apikale siden, finner man tette kontakter (tight junctions). De holder nærliggende epitelceller sammen, og sørger for at molekyler ikke kan passere fritt gjennom epitelcellelaget. Tette kontakter består av et forgreinet nettverk av transmembranproteiner. Hovedtypene av disse adhesjonsproteinene er claudiner og occludiner (se figur 4). Det finnes mange ulike typer occludiner og claudiner, med ulike funksjoner. Under de tette kontaktene finner man desmosomer og beltedesmosomer (anchoring junctions), som er bundet til cytoskjelettfilamenter i cellene. Rørkontakter (gap junctions) forbinder cytoplasma mellom to celler, og tillater molekyler og ioner å passere fritt. Hemidesmosomer binder epitelceller til basalmembranen.

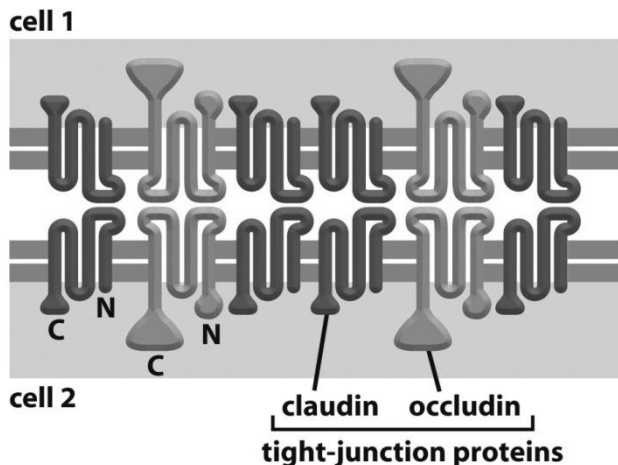


Figure 19-26b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

**Figur 4:** Tette kontakter består av et grenet nettverk av adhesjonsproteiner som binder sammen nærliggende epitelceller. De hindrer molekyler i å passere fritt mellom apikal og basolateral side av epitelcellene. Claudiner og occludiner er hovedtransmembranproteinene. (Alberts, 2008).

## 1.2 Peyerske flekker og M-celler

Peyerske flekker er makroskopiske aggregater av immunceller som befinner seg like under epitelcellelaget i tynntarm (se figur 2). Epitellaget over de peyerske flekkene er karakteristisk i forhold til at det ikke er dekket av slim, antall mikrovilli er redusert og at det inneholder M-celler. M-celler er fagocytterende celler som kan ta opp og transportere materiale fra apikal til basolateral side ved hjelp av en prosess som kalles transcytose. I lamina propria, under de peyerske flekkene og M-cellene, finner man dendrittiske celler, lymfocytter og makrofager (se figur 2). Antigen fra M-celler kan dermed tas opp av dendrittiske celler som videre presenterer disse til immunceller som T-celler. De peyerske flekkene, som det er omtrent 30 av i nederste del av tynntarmen (ileum), er en viktig del av immunsystemet i tarm. De overvåker innholdet i tarmlumen.

## 1.3 Basolateral side og tarmassosiert lymfoid vev

På den basale siden av epitelcellelaget finner man tarmassosiert lymfoid vev (GALT: gut-associated lymphoid tissue). Det inneholder som nevnt peyerske flekker (i ileum), men i tillegg enkle follikler (i endetarm og rektum) og store lymfeknuter i mesenteriet, bindevevet som fester deler av tarmene og andre bukorganer til bakre bukvegg. Det tarmassosierte lymfoide vevet kan deles inn i effektor- og induksjonssteder. Utenfor det organiserte lymfoide vevet finner man effektorstedene. De omfatter spredte lymfocytter i epitelcellelaget, og lymfocytter, antigenpresenterende celler og IgA-produserende plasmaceller i det tynne

bindevevslaget under mukosa, i lamina propria. Mellom epitelcellene og bindevevet er det et tynt, fleksibelt lag av bindevevsmolekyler som kalles basalmembranen (se figur 5). Induksjonsstedene utgjøres av det organiserte lymfoide vevet som peyerske flekker og mesenteriske lymfeknuter. Immunresponsen settes i gang her.

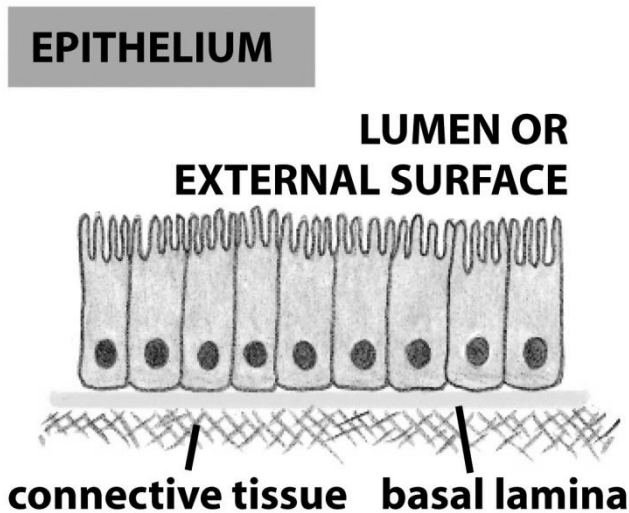


Figure 19-39 part 2 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figur 5: Basalmembranen (basal lamina) er tynn og fleksibel, og danner en mekanisk forbindelse mellom epitelcellene og bindevevet. (Alberts, 2008).

## 1.4 Dendrittiske celler

### 1.4.1 Dendrittiske celler

Dendrittiske celler er de mest avanserte og spesialiserte av de antigenpresenterende cellene, og har svært viktige funksjoner ved igangsettelse av immunrespons i tarm. Umodne dendrittiske celler blir produsert av hematopoetiske stamceller i beinmargen (Liu, 2001). De dendrittiske cellene kan kommunisere med epitelceller, som kan regulere barrierefunksjon og homeostase. De kan også kommunisere med det adaptive immunsystemet, og da indusere en immunrespons eller toleranse (Lea, 2006). Dendrittiske celler har lange utløpere kalt dendritter, derav navnet. Dendrittene kan forlenges og trenge mellom epitelcellene slik at de kommer i direkte kontakt med innholdet i tarmlumen. For at dette skal kunne skje, åpner de dendrittiske cellene tette kontakter mellom epitelcellene. Siden dendrittiske celler også uttrykker tette kontakter, vil integriteten av epitelbarrieren være opprettholdt (Rescigno et al., 2001). MyD88-avhengig (myeloid differentiation primary-response gene 88) signalering gjennom mønstergjenkjennende reseptorer og uttrykking av kjemokinreseptoren CX<sub>3</sub>CR1, er

nødvendig for at utløperne fra de dendrittiske cellene skal kunne komme i kontakt med innholdet i tarmlumen. Eksempler på mønstergjenkjennende reseptorer er toll-lignende reseptorer (TLR) og nukleotid oligomerisering domene-lignende reseptorer (NLR) (Coombes and Powrie, 2008).

De dendrittiske cellene finnes i forskjellige varianter, både i blod, i lymfoide organer og i andre kroppsvev. De finnes i organiserte lymfoide strukturer i tarm som peyerske flekker og mesenteriske lymfeknuter (MLN), samt i lamina propria i både tynn- og tykktarm (Coombes and Powrie, 2008).

Det finnes to hovedtyper dendrittiske celler i blod. Disse klassifiseres med henhold til uttrykk av  $\beta$ -integrinet CD11c. Myeloide dendrittiske celler uttrykker CD11c, og er forløperen til Langerhans celler og dendrittiske celler i hud. Denne typen dendrittiske celler binder invaderende patogene mikroorganismer fra periferien, og migrerer deretter til sekundært lymfoid vev der de presenterer antigener for naive T-celler. Plasmacytoide dendrittiske celler uttrykker derimot ikke CD11c, og migrerer direkte til sekundært lymfoid vev fra blod. Plasmacytoide dendrittiske celler skiller ut interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ), og spiller dermed en viktig rolle i kontroll av virusinfeksjoner (Donaghy et al., 2001, Ueda et al., 2003).

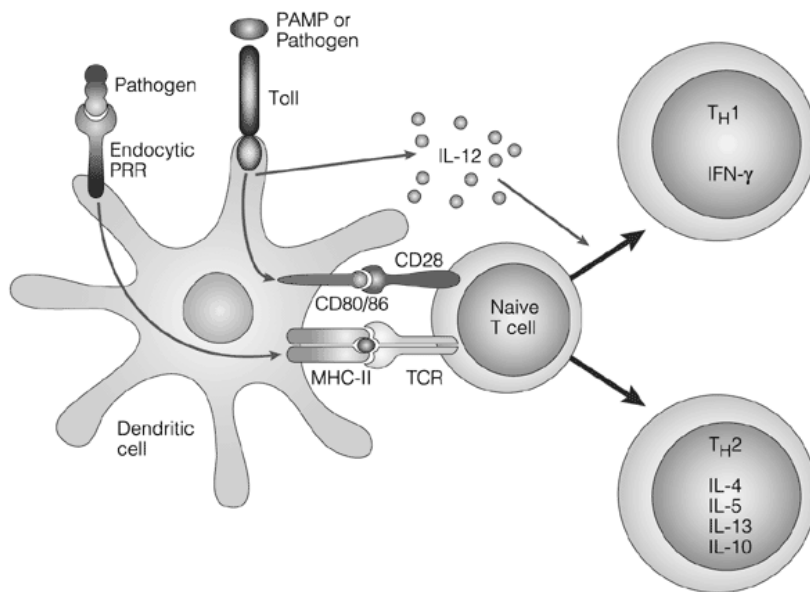
#### **1.4.2 Dendrittiske cellers modning og regulering av immunitet**

På overflaten til de dendrittiske cellene blir det uttrykt ulike proteinmolekyler, blant annet MHC (Major Histocompatibility Complex/hovedvevsforlikelighetsantigenkompleks) proteiner, kostimulatoriske proteiner og celleadhesjonsproteiner. Toll-lignende reseptorer på umodne dendrittiske celler vil gjenkjenne de invaderende mikroorganismene som vil bli fagocyttert av dendrittiske celler. Bakterienes proteiner kløyes til peptidfragmenter i de dendrittiske cellene som deretter vil bli presentert på overflaten. Umodne dendrittiske celler uttrykker lave nivåer av MHC klasse II og kostimulatoriske molekyler, og er dermed svake stimulatorer av T-celleproliferasjon. MHC proteinene på dendrittiske celler vil binde peptidfragmenter (se figur 6). De dendrittiske cellene med bundet antigen vil modnes, og bli transportert til lymfeknuter. Under modningsprosessen vil de dendrittiske cellene oppregulere uttrykket av MHC klasse II og kostimulatoriske molekyler, og vil da kunne stimulere naive T-celler. De vil også rekruttere effektorceller til betennelsesstedet. I lymfeknutene vil T-cellene binde antigen og MHC, ved hjelp av T-cellereseptorer (TCR) på overflaten til T-cellene. T-cellene har også reseptorer som binder de kostimulatoriske proteinene på dendrittiske celler.

Denne bindingen vil hjelpe til med å aktivere T-cellene (Stagg et al., 2003, Hua et al., 2010, Alberts, 2008, Santegoets et al., 2008).

Eksempler på kostimulatoriske proteiner er CD80, CD86, CD40 og CD83 (Petroff and Perchellet, 2010, Tobiášová-Czetoová et al., 2005, Peach et al., 1995).

Celleadhesjonsproteinene på dendrittiske celler og på T-cellene bidrar til interaksjon mellom cellene (se figur 6). Den inflammatoriske responsen er altså et samspill mellom det medfødte og det adaptive immunsystemet.



Nature Reviews | Immunology

**Figur 6:** Aktiverte dendrittiske celler uttrykker CD80/86 kostimulatoriske molekyler og MHC klasse II molekyler som binder seg til reseptorer (CD28 og TCR) på naive T-celler. Ulike signaler fører til at den naive T-cellen utvikler seg til for eksempel en TH1 eller en TH2 celler. (Medzhitov, 2001).

CD83 er en overflatemarkør for fullt modne dendrittiske celler. På proteinnivå er det to forskjellige isoformer av CD83; en løselig form og en membranbunden form. Den membranbundne formen har immunstimulatorisk evne og aktiverer T-celler. Den løselige formen har motsatt virkning, den har en immunhemmende effekt (Prechtel and Steinkasserer, 2007).



### **1.4.3 Dendritiske celler produserer cytokiner og kjemokiner**

Dendritiske celler produserer signalmolekyler som cytokiner og kjemokiner. Cytokiner kan deles inn etter struktur og funksjoner. Noen cytokiner kalles for interleukiner (ILs), og kan ha navn som IL-4 og IL-12. En annen type cytokiner er interferoner, som for eksempel INF- $\alpha$ , de er antivirale cytokiner. Andre eksempler på cytokiner er TNF- $\alpha$  (tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), CD40 ligand og Fas ligand. Granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF) og makrofag kolonistimulerende faktor (M-CSF) regulerer hematopoiese, dannelsen av de ulike celletypene i blodet (Lea, 2006).

Kjemokiner er en type kjemotaktiske cytokiner som har en viktig rolle i reguleringen av cellebevegelse i spesifikke områder i kroppen, samt celleaktivering (Oliveira and Lukacs, 2003). Kjemokinene er små og positivt ladet, og i likhet med andre cytokiner, binder de seg til korresponderende reseptorer på celleoverflaten av ulike celler. Cytokiner og kjemokiner virker stort sett lokalt, enten autokrint eller parakrint (Seeger et al., 2000, Alberts, 2008, Middleton et al., 2002).

### **1.4.4 Toveis kommunikasjon mellom epitel og dendritiske celler**

Epitelcellene spiller en viktig rolle i opprettholdelsen av den normale tarmfunksjonen, ikke bare som en barriere mellom tarminnholdet og de underliggende immuncellene, men også som en aktiv deltager i opprettholdelsen av toleranse mot mikrofloraen og matantigener og i bekjempelsen av patogene bakterier. Dendritiske celler blir sett på som immunsystemets ”dørvakter”, og kontakt mellom dendritiske celler og tarmfloraen er essensiell for utvikling og regulering av immunresponsen (Zeuthen et al., 2008).

Enteroendokrine celler, enterocytter og begerceller i tarmepitelet uttrykker mønstergjenkjennende reseptorer, slik at de kan kjenne igjen ulike molekylære strukturer på mikrobene. Signalisering fra mønstergjenkjennende reseptorer i tarmepitelet er med på å opprettholde barrierefunksjonene i tarmen, inkludert produksjonen av sekretorisk IgA, som bidrar til en barriere mot patogene bakterier og virus (Wells et al., 2011).

Tarmepitelceller påvirker responsen til dendritiske celler mot mikrofloraen. Det antas at det er en toveis kommunikasjon mellom tarmepitelcellene og de dendritiske cellene (Zeuthen et al., 2008). Tarmepitelcellene og de dendritiske cellene kommuniserer ved hjelp av celle-celle interaksjoner og ved utskillelse av løselige komponenter (Niess and Reinecker, 2006). TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) og TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) blir skilt ut fra tarmepitelcellene, og spiller en sentral rolle i kommunikasjon mellom epitel og dendritiske

celler ved allergiske reaksjoner (Zeuthen et al., 2008). TSLP aktiverer umodne CD11c<sup>+</sup> (myeloide) dendritiske celler (Watanabe et al., 2005).

## **1.5 Mikroflora i tarm**

### **1.5.1 Mikroflora i tarm. Kommensale, probiotiske og patogene bakterier**

Tarmepitelet blir hele tiden utsatt for ulike mikroorganismer, både gjennom tarmens egne bakterier og gjennom kosten som inntas. Magesekken, som har en svært lav pH, representerer et fiendtlig miljø for mikroorganismer, og begrenser mikroflora i den øverste delen av fordøyelseskanalen. Deretter er det en gradvis økning av bakterieinnhold jo lenger ned i fordøyelseskanalen man kommer; gjennom tynntarm, tykktarm og mot endetarmen. Tarmen inneholder omtrent  $10^{14}$  bakterier, noe som er omtrent ti ganger fler celler enn i menneskekroppen. Immunsystemet må skille mellom eget og fremmed, og mellom fredelige og sykdomsfremkallende mikrober for å unngå sykdommer som matallergi, kronisk inflammatorisk tarmsykdom (inflammatory bowel disease) og tarmkreft.

Tarmfloraen består av ulike typer bakterier. Kommensale bakterier er en naturlig del av tarmfloraen, husholdningsfloraen. Med kommensalisme menes en form for biologisk samliv der den ene parten (her bakteriene) drar nytte av samlivet, mens den andre organismen (verten) verken blir positivt eller negativt påvirket. Kommensale bakterier kan lette fordøyelse, absorpsjon og lagring av næringsstoffer i tarm. I tillegg tror man at signaler fra kommensale bakterier har en essensiell rolle for utviklingen av immunsystemet. Endringer i sammensetningen av det kommensale bakteriesamfunnet i tarmen, kan også påvirke mottageligheten for, eller utviklingen av immunmedierte sykdommer (Artis, 2008).

Patogene bakterier som kommer inn i kroppen, for eksempel via mat, kan formere seg og ødelegge vertsceller. Noen patogene bakterier produserer toksiner, og vil kunne forårsake sykdom (Vorland, 2001). Kroppen vil reagere med ulike forsvarsmekanismer for å prøve å hindre skade, men mange patogene bakterier har evnen til å kunne unnsnippe disse forsvarssystemene.

En forklaring på gjenkjennelsen av patogene versus kommensale bakterier, er at bare patogene bakterier har utviklet mekanismer som gjør at de kan invadere epitelcellebarrieren og overleve i vertens vev, og vil dermed bli gjenkjent av celler fra det medfødte immunsystemet. Kommensale bakterier som mangler virulens vil ikke overleve i vertsceller eller spre seg gjennom vev, og vil derfor ikke klare å lokke fram medfødte eller adaptive

immunresponser. Tarmepitelceller uttrykker, som beskrevet over, et bredt spekter av mønstergjenkjennende reseptorer som kjenner igjen bakterielle faktorer som blant annet lipopolysakkarid (LPS), lipoproteiner, flagellin og umetylerte CpG-sekvenser i DNA molekyler. Derfor vil tarmepitelceller ha mulighet til å kjenne igjen og reagere på kommensale bakterier, også i fravær av patogener (Artis, 2008).

Probiotiske bakterier er bakterier som per definisjon skal gi en helsegevinst utover kommensale bakterier. Probiotiske bakterier blir ofte tilsatt til matprodukter som yoghurt, melk og farmasøytiske produkter. De kan være effektive mot for eksempel diaré og kronisk inflammatorisk tarmsykdom. Probiotiske mekanismer kan være svært ulike. De kan modulere gjennomtrengeligheten av epitelceller, konkurrere med patogene bakterier om kolonisering i tarm, eller direkte modifisere aktiviteten til immunceller. Probiotiske bakterier kan interagere enten direkte med dendritiske celler eller indirekte via effekten av epitelceller (Ouwehand et al., 2002, Foulquié Moreno et al., 2006, Hua et al., 2010).

Det er visse krav for at en probiotisk bakterie skal kunne brukes i kommersielle produkter. Det er derfor anbefalt at probiotiske stammer karakteriseres med et minimum av tester. Testene går ut på å bestemme antibiotikaresistensmønstre, vurdere visse metabolske aktiviteter, vurdere sideeffekter under *in vivo* studier, og epidemiologisk overvåkning av unaturlige hendelser i forbrukere. Dersom stammen som undersøkes hører til en art som er kjent som en toksinprodusent i mennesker, må det testes for giftproduksjon, og dersom stammen hører til en art med kjent hemolytisk potensial, så kreves bestemmelse av hemolytisk aktivitet.

For å vurdere sikkerheten av probiotiske bakterier som skal brukes på mennesker, er det nødvendig å utføre både *in vitro* og *in vivo* tester. *In vitro* tester anbefalt for probiotiske stammer er analyse av gallesyreresistens, binding til mucus og/eller menneskeepitelceller og cellelinjer, antimikrobiell aktivitet mot potensielle patogene bakterier, evnen til å redusere patogen tilslutning til overflater og gallesalt hydrolase aktivitet. Probiotiske produkter må vise fordeler i menneskeforsøk, som statistiske og biologiske signifikante forbedringer i forhold til tilstand, symptomer, velvære eller livskvalitet. Probiotika kan være ansvarlig for fire typer sideeffekter. Dette kan være systemisk infeksjon, skadelige metabolske aktiviteter, overdreven immunstimulering i mottakelige individer og genoverføring (FAO/WHO, 2002).

### 1.5.2 Enterokokker

Enterokokker er melkesyrebakterier og en vanlig kommensal tarmbakterie hos mennesker. Enterokokker kan også isoleres fra ulike miljø- og dyrekilder. De er fakultativt anaerobe, grampositive bakterier som opptrer i par, kjeder eller som enkle kokker. Enterokokker kan ikke danne sporer. Noen enterokokker kan overleve i stressende og fiendtlige miljøer, som ved høye saltkonsentrasjoner og ved ekstreme temperaturer (5-65 °C) (Domann et al., 2007, Fisher and Phillips, 2009). De har også en generelt høy endogen motstand mot gallesyre, salter og løsemidler (Paulsen et al., 2003).

Enterokokkslekten består av 28 ulike arter (Foulquié Moreno et al., 2006). De mest vanlige artene er *Enterococcus faecalis* og *Enterococcus faecium*. Innenfor disse to artene finnes det ulike stammer.

### 1.5.3 *Enterococcus faecalis*

Kommensale-, probiotiske- og patogene bakteriestammer er alle representert i *E. faecalis*, noe som gjør denne arten spesielt interessant.

Enterokokker produserer bakteriosiner, og noen stammer blir dermed brukt som probiotiske bakterier i matindustrien. Symbioflor-1 er en kommersiell probiotisk stamme som hevdes å ha probiotiske egenskaper (Domann et al., 2007).

En velbeskrevet patogen stamme i arten *E. faecalis* er V583. Ved sekvensering av genomet fant man ut at det inneholder mye bevegelig og fremmed DNA (Paulsen et al., 2003). Ved sammenligning med den probiotiske stammen Symbioflor-1, fant man ut at den probiotiske stammen mangler store genomiske områder (Domann et al., 2007). Endringer i genomet til *E. faecalis* har ført til forskjellige stammer med patogene- eller fordelaktige trekk (Foulquié Moreno et al., 2006, Paulsen et al., 2003, Hua et al., 2010). Tidligere trodde man at enterokokker var uskadelige for mennesker, men det har vist seg at visse typer er av de mest vanlige årsakene til sykehusinfeksjoner. Bakteriene kan forårsake blant annet urinveisinfeksjoner, sår infeksjoner, og sepsis. (Fisher and Phillips, 2009).

*E. faecalis* 3336 er en kommensal stamme isolert fra babyavføring. Denne kommensale stammen heretter referert til som 3336, samt Symbioflor-1 og V583 blir brukt i denne oppgaven.

## **1.6 Fibrinogen**

Fibrinogen er et protein som er mest kjent for sin rolle i blodkoagulering. Proteinet består av par med tre uidentiske polypeptidkjeder;  $A\alpha$ ,  $B\beta$  og  $\gamma$ . Selv om leveren er det primære stedet for fibrinogensyntese, har det blitt vist at epitelceller fra forskjellige vev også uttrykker en eller flere av fibrinogengenene (Simpson Haidaris, 1997). Oppregulering i tarm krever et inflammatorisk stimulus (Molmenti et al., 1993). Ved oppregulering skilles fibrinogen ut, og blir ført inn i epitelcellemembranen. Derfor kan fibrinogen være viktig for barrierefunksjonen i tarm.

## 1.7 Prosjekt beskrivelse

Denne masteroppgaven er todelt. Den ene delen av studien tok sikte på å studere modning av dendritiske celler. Umodne dendritiske celler som blir eksponert for inflammatoriske og bakterielle stimulus vil modnes. Dette medfører store forandringer i dendritiske cellers biologi. Disse forandringene kan være blant annet morfologiske endringer, endret migreringsevne og / eller endring av uttrykk av overflatemolekyler. I denne studien ville man undersøke om eksponering av dendritiske celler for patogene, probiotiske og kommensale bakteriestammer inducerer til ulik oppregulering av ekspresjon, av slike overflatemolekyler på dendritiske celler. Overflatemolekylene det ble valgt å studere, CD80 og CD83, er typiske markører for modning av dendritiske celler. Bakteriestammene som ble brukt i studien var alle av arten *E. faecalis*. *E. faecalis* er i dette tilfellet en passende modellorganisme, fordi den har både kommensale, probiotiske og patogene stammer. Stammene, med ulike egenskaper, kommer fra samme art og slekt, og de har dermed mange likheter. Positive og negative kontroller ble inkludert som referanser for maksimal og minimal stimulering.

Det er vist at stimulerte epitelceller kommuniserer med dendritiske celler. I den andre delen av studien ville man se om tilfellet også var motsatt, om stimulerte dendritiske celler kommuniserer med epitelceller. Man ville da kokultivere Caco-2 celler med kondisjonert medium fra dendritiske celler stimulert med ulike *E. faecalis* stammer basolateralt, og se på genekspresjonen av et protein. Proteinene det ble valgt å studere var fibrinogen. Dette fordi det i en tidligere masteroppgave ble vist i en transkriptomanalyse (mikromatrise), at uttrykket av fibrinogen ble kraftig nedregulert for Caco-2 celler kokultivert med dendritiske celler eksponert for en kommensal og en probiotisk bakterie (Bjerkan, 2009). Man ville derfor se om man kunne verifisere disse resultatene ved hjelp av real-time PCR (qRT-PCR). I denne oppgaven ble det også inkludert en patogen bakteriestamme, *E. faecalis* V583, samt negative kontroller.

# 2 Materialer

## 2.1 Laboratorieutstyr og instrumenter

<b>Teknikk</b>	<b>Utstyr/instrument</b>	<b>Produsent</b>
Cellearbeid	6, 24 og 96 brønnsplater	Becton Dickinson Labware
	50 mL rør	Becton Dickinson Labware
	Coulter Z1 (partikkelteller)	Coulter Electronics Ltd
	Filterbrønner 0,4 µm FALCON	Becton Dickinson Labware
	Filter 0,22 µm MILLEX®GP	Millipore
	Kyvetter 1,5 mL	Plastibrand
	15 og 50 mL PP-testtuber	Greiner bio-one
	Sprøyte 1 mL, BD Plastipak	Becton Dickinson Labware
	Sprøytespiss, BD Microlance	Becton Dickinson Labware
	Steril-cycle CO <sub>2</sub> inkubator	Thermo Scientific
	Celleskap	Termacks
	Sterilbenk	Biowizard
	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Cellelinje	Caco-2	American Type Culture Collection
Mikroskop	Leica DFC 420	Leica
	SEM Zeiss EVO - 50 - EP	Carl Zeiss SMT Ltd
Sentrifuger	Megafuge 1.0	Heraeus
	BIOfuge pico	Heraeus
	IEC Micromax	IEC
Spekrofotometri	UV-160A	Shimadzu
	BioAssay	Bioscreen C
Nukleinsyre analyse v.h.a spektrofotometri	Nanodrop 200C	Thermo Scientific

Magnetisk separasjon	MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec
	MACS Pre-separation Filters	Miltenyi Biotec
	MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec
Væskestrømscytometer	MACSQuant Analyzer	Miltenyi Biotec
UV-lys	Gel Doc 1000	BioRad
Kritisk punkt tørker	BAL-TEC CPD 030	BAL-TEC AG
Sputter Coater	Polaron SC 7640	Quorum Technologies Ltd
RNA analyse	Agilent 2100 BioAnalyzer	Agilent Technolgies
qRT-PCR	PTC 200 Peltier Thermal cyclers	MJ reaserch
	Rotor-Gene TM 600	Corbett Research, UK

## 2.2 Kjemikalier

Kjemikalie	Produsent
2-merkaptoetanol	SIGMA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck
Etanol	Kemetyl Norge AS
Paraformaldehyd	SIGMA
Pipes	SIGMA
Prostaglandin E2	SIGMA
Thioglycerol	SIGMA
TNF- $\alpha$	Immuno Tools



## 2.3 Kit

Navn	Produsent
RNeasy®Mini kit (50)	QIAGEN
Superscript®VILO cDNA Syntesis Kit	Invitrogen
Agilent RNA Nano kit	Agilent Technologies

## 2.4 Medier og løsninger

Navn	Produsent
BSA (Rinderalbumin 30 %)	Biotest
Dulbecco's PBS (1X)	PAA Laboratories
Føtalt kalveserum (FCS)	Fischer Scientific
Gentamicin Sulfat 50 mg/mL	Bio Whittaker
Granulocyte monocyte colony-stimulating factor	ImmunoTools
Ikke-essensielle aminosyrer (100X)	PAA Laboratories
IL-4	ImmunoTools
LPS	SIGMA
Lymfoprep	Fresenius Kabi Norge AS
RPMI 1640 + L-Glutamin	PAA Laboratories
Collagen Solution Type 1 from rat tail	SIGMA
EDTA	SIGMA
Trypsin EDTA (1X)	PAA Laboratories
Natriumpyruvat	PAA Laboratories

## 2.5 Antistoff

Navn	Produsent
CD14 microbeads (human)	MACS Miltenyi Biotech
CD 80-PE	BD Biosciences
CD 80-FITC	BD Biosciences
CD 83-APC (human)	MACS Miltenyi Biotech

## 2.6 Primere

Navn	Produsent
Fibrinogen $\alpha$ (Hs00241027_m1*)	Applied Biosystems
Fibrinogen $\beta$ (Hs00905942_m1*)	Applied Biosystems
Fibrinogen $\gamma$ (Hs00241037_m1*)	Applied Biosystems
Ribosomal protein, large, P0 (Hs99999902_m1)	Applied Biosystems

## 2.7 Bakteriestammer

Navn	Kilde
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	LMG, IKBM, UMB
<i>Enterococcus faecalis</i> Symbioflor-1	LMG, IKBM, UMB
<i>Enterococcus faecalis</i> 3336	LMG, IKBM, UMB

# 3 Metoder

## 3.1 Cellekulturarbeid

Cellearbeid ble utført ved hjelp av sterilteknikk, altså i sterilbenk med sterilt utstyr. Celler ble dyrket i plastikkflasker eller i plater ved 37 °C i en atmosfære med 5 % CO<sub>2</sub>. Caco-2 celler (ATCC), monocytter og dendrittiske celler ble kultivert i RPMI 1640 medium med L-glutamin tilsatt 10 % varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS), 25 µL/mL gentamicin sulfat, 1 mM natrium pyruvat, ikke-essensielle aminosyrer og 50 µM thioglycerol (refereres til som supplementert medium). Cellene ble vasket med Dulbecco's PBS (1x) før behandling med trypsin EDTA, som ble brukt for å løsne adherente celler fra platen. Cellene ble trypsinert i 4-12 minutter ved 37 °C, og trypsineringen ble stoppet ved å tilsette supplementert medium som inneholdt tilsvarende mengde serum. Estimering av antall celler ble utført med en Coulter Z1 partikkel teller.

Celler som skulle oppbevares i flytende nitrogen ble kjølt ned på is og tilsatt 1 volum innfrysingsmedium (20 % FCS og 20 % DMSO). Dette ble tilsatt dråpevis for å unngå proteindenaturering som et resultat av varmeutvikling fra DMSO. Mellom 5 - 25 x 10<sup>6</sup> celler ble fryst ned i egnede rør. Celler ble først oppbevart ved - 80 °C i 2 døgn, og deretter flyttet over i flytende nitrogen som holder - 96 °C. Når celler skulle tas i bruk, ble de tint i vannbad (37 °C) til ca. 1 °C, vasket med supplementert medium og platet ut i flasker eller brønner.

## 3.2 Isolering av mononukleære celler fra perifert blod

Mononukleære celler (MNC) fra perifert blod ble isolert fra ferske buffy coats (levert av Sykehuset Østfold, Fredrikstad) ved tetthetsgradientsentrifugering. Gradientmediet som ble benyttet kalles Lymfoprep. Femten mL PBS og 15 mL buffy coat ble blandet godt i 50 mL rør, før 10 mL Lymfoprep ble forsiktig avsatt i bunnen ved hjelp av en sprøyte. Rørene ble sentrifugert ved 800 x g i 25 minutter. Sentrifugeringen ble utført uten brems for å unngå forstyrrelser i gradientlagene. De mononukleære cellene ble isolert fra interfasen mellom plasma/PBS og gradientmediet. Cellene ble sugd opp med en pasteurpipette, tilsatt 40 mL medium, og deretter vasket ved å sentrifugere ved 350 x g i 20 minutter med brems. Cellene ble deretter vasket to ganger ved å sentrifugere i 10 minutter ved 350 x g, resuspendert i supplementert medium og telt, før nedfrysning som beskrevet over.

### **3.3 Magnetisk separasjon av monocytter fra isolerte mononukleære celler**

Monocytter ble isolert fra mononukleære celler ved hjelp av anti-CD14-koblede magnetiske partikler fra Miltenyi Biotech, etter leverandørens protokoll. Mononukleære celler ble tint hurtig i vannbad ved 37 °C, cellene overført til et 50 mL rør, og tilsatt 45 mL supplementert medium. Etter sentrifugering i 10 minutter ved 350 x g ble cellene resuspendert i 5 mL supplementert medium og antall celler estimert. Cellene ble igjen sentrifugert i 10 minutter ved 350 x g, og  $10^7$  celler ble resuspendert i 80 µL vaskebuffer (0,5 % BSA, 2 mM EDTA i PBS). Tyve µL anti-CD14-koblede magnetiske partikler ble tilsatt per  $10^7$  celler, suspensjonen ble blandet godt og inkubert på is i 15 minutter. Cellene ble vasket med 1 - 2 mL vaskebuffer, sentrifugert i 10 minutter ved 350 x g, og pelleten resuspendert i 500 µL buffer. Monocyttene var nå merket med magnetiske partikler, og en magnetisk kolonne ble benyttet for å separere ut monocyttene. Kolonnen ble først tilsatt 500 µL vaskebuffer, og deretter ble celsuspensjonene tilsatt. Videre ble det vasket tre ganger med 500 µL vaskebuffer. Kolonnen ble holdt over et 15 mL rør, og det ble tilsatt 1 mL vaskebuffer før et stempel ble kjørt ned. Monocyttene ble tilsatt 5 mL supplementert medium og sentrifugert i 10 minutter ved 350 x g. Pelleten ble resuspendert i supplementert medium og cellene ble telt. Cellene ble platet ut med en tetthet på  $2 \cdot 10^6$  celler/per brønn i 24 brønns plater.

### **3.4 Differensiering og stimulering av dendrittske celler**

Monocytter ble differensiert til umodne dendrittske celler ved kultivering i nærvær av 25 ng / mL IL-4 og 50 ng / mL granulocyt makrofag koloni stimulerende faktor (GM-CSF).

Vekstfaktorer ble tilsatt på dag 0 og 4. På dag 6 ble de umodne dendrittske cellene stimulert til modning ved tilsetning av ulike stimulus. Som positiv kontroll ble det brukt 5 µg / mL PGE<sub>2</sub>, 5 ng / mL TNF-α og 100 ng / mL LPS.

### **3.5 UV-inaktivering av bakterier**

Kulturer inkubert over natt, ble sentrifugert i 10 minutter ved 3345 x g og bakteriene vasket med 3 mL PBS. Bakteriepelleten ble resuspendert i vekstmedium uten gentamicin, slik at suspensjonen hadde en optisk tetthet (OD) ved 600 nm på ca 0,5. Dette gir ca.  $2 \cdot 10^8$  bakterier / mL. Tre mL bakteriesuspensjon ble overført til en 6 brønns plate. For å bestemme bestrålingstiden for komplett inaktivering, ble det tatt prøver ved ulike tidspunkt. Prøvene ble platet ut på agarskåler, og etter et døgnns innkubering ble eventuelle bakteriekolonier telt. Ved kokulturforsøkene ble bakteriesuspensjonene UV-bestrålt i 120 minutter.

### **3.6 Kokultivering av bakterier og umodne dendritter**

På dag 6 (se over) ble umodne dendrittiske celler kultivert sammen med tre ulike stammer av bakterien *Enterococcus faecalis*; Symbioflor-1, 3336 og V583. Bakteriesuspensjonene hadde en optisk tetthet på 0,5 (se over). Ved noen forsøk ble bakteriene UV-inaktivert. Én mL av disse bakteriesuspensjonene ble tilsatt i brønner med umodne dendrittiske celler. Cellene ble kokultivert i 2 timer, adherente celler vasket 5 ganger i supplementert medium med gentamicin og til slutt inkubert ved 37 °C i 24 timer i supplementert medium med gentamicin.

### **3.7 Bioassay**

Bakterievekst ble monitorert ved hjelp av et såkalt bioassay. Et bioassay er en spektrofotometrisk metode som måler OD. Overnattkulturer av V583, 3336 og Symbioflor-1 ble brukt som inokulum i sterilt supplementert medium med og uten gentamicin og overført til bioassay-plater i triplikater. Sterilt medium ble brukt som negativ kontroll, samt bakgrunnskorreksjon. Målingene ble utført ved 600 nm, ved 37 °C og med resting i forkant av hver måling (hvert 15 min) i 15 timer.

### **3.8 Fluorescens merking og væskestrømscytometri**

Dendrittiske celler ble sentrifugert ved 350 x g i 10 minutter og resuspendert i 100 µL supplementert medium, før suspensjonen ble overført til spisse 96-brønnersplater egnet for væskestrømscytometrianalyser. Platen med cellene ble sentrifugert i 5 minutter ved 350 x g, før det ble tilsatt 100 µL PBS og farget med 10 µL fluorokromkoblede antistoff (CD80-PE / CD80-FITC, og / eller CD83-APC). Platen ble satt i kjøleskap i 30 minutter. Platen med cellene ble så sentrifugert i 5 minutter ved 350 x g og cellene vasket 3 ganger med 100 µL PBS. Væskestrømscytometeret blandet cellesuspensjonene, før 90 µL prøve ble analysert. Merkede celler passerer da i en væskestrøm gjennom en laserstråle og fluorokromene eksiteres. Emisjonslyset blir dermed detektert og fungerer som et avlesningssystem for antall merkede celler. Det ble her analysert for grad av uttrykking av overflatemolekylene CD80 og CD83.

### **3.9 Caco-2 polarisering**

Filterbrønner egnet for polarisering av celler ble plassert i 24-brønnersplater og coated med 300 µL 5 % collagen i 5 timer. Collagenløsningen ble fjernet etter 5 timer og filtrene tørket i romtemperatur overnatt. Det ble sådd ut 300 000 Caco-2 celler / filter i 300 µL supplementert medium, og 900 µL supplementert medium ble tilsatt i brønnene under filterkoppene.

Supplementert medium ble byttet på dag 4, 8, 12, 16 og 18, og utviklingen av et konfluent cellelag ble fulgt ved hjelp av lysmikroskopering. Celler var normalt polarisert etter 21 dager.

### **3.10 Fremføring av prøver til sveipeelektronmikroskopering**

Polariserte Caco-2 celler ble fiksert, dehydrert, kritiskpunkttørket og coatet før mikroskopering, som følger. Cellene ble vasket med 500 µL PBS og fiksert med 500 µL 4 % paraformaldehyd (PFA) i 45 min ved romtemperatur. Fikseringsløsningen ble forsiktig sugd av før det ble vasket 3 ganger med 500 µL 0,05 M pipesbuffer (34,63 g Pipes / 1 l dH<sub>2</sub>O, pH justert til 7,2 med konsentrert HCl). Cellene ble deretter dehydrert i økende konsentrasjon av (50 %, 70 %, 80 %, 96 % og 100 %) etanol i 0,05 M pipesbuffer i 15 minutter ved romtemperatur. Dehydrering med 100 % etanol ble gjentatt tre ganger. Ved kritiskpunkttørking ble kammeret fylt ¾ med 100 % etanol, og prøven ble lagt ned. Prøven ble avkjølt til 10 °C, og den flytende etanolen ble gradvis skiftet ut med transisjonsvæske. Utsiftingen ble utført på 90 bar, helt til prøvekommeret nådde en temperatur på 40 °C. Gass ble da sluppet forsiktig ut, helt til trykket var på 0 bar. Prøvene ble til slutt coated med et tynt lag palladium, før de ble analysert med sveipeelektronmikroskopet.

### **3.11 Basolateral stimulering av epitelceller**

Kondisjonert medium fra dendritiske celler (d.v.s. kokultivert med bakterier) ble sterilfiltrert (0,22 µm porer) og tilsatt polariserte Caco-2 celler basolateralt (under filterkoppen).

Supplementert medium i filterkoppene ble skiftet. Cellene ble stimulert i 2 timer ved 37 °C, vasket med PBS og trypsinert. Cellene ble deretter overført til eppendorfrør sammen med 1 mL supplementert medium.

### **3.12 mRNA isolering, cDNA syntese og real-time PCR**

mRNA ble ekstrahert fra Caco-2 celler ved bruk av RNeasy Mini Kit (50) (QIAGEN) etter leverandørens protokoll, og konsentrasjonen ble målt på nanodrop (spektrofotometer).

RNAse fritt vann ble brukt som negativ prøve. RNA ble lagret ved – 80 °C.

cDNA syntese ble utført på en konvensjonell PCR-maskin (MJ RESEARCH PTC-200 Peltier Thermal Cycler) ved å bruke SuperScript VILO cDNA syntesis kit (INVITROGEN), som beskrevet av leverandøren. Her ble 4 µL 5 X VILO Reaction Mix, 2 µL 10 X SuperScript Enzyme Mix og RNA opp til et totalvolum på 20 µL blandet. cDNA konsentrasjonen ble målt spektrofotometrisk på nanodrop (med RNase fritt vann som blank). cDNA ble lagret ved -20 °C.

Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) ble utført ved å amplifisere spesifikt cDNA på qRT-PCR Rotor-Gene TM 600 (Corbett Research, UK). qRT-PCR estimerer mengde mRNA i en prøve. TaqMan Gene Expression Assays protokoll (INVITROGEN) ble fulgt. 10,0 µL 2x TaqMan MM, 1,0 µL 20 X TaqMan GEA (Fibrinogen:  $\alpha$ , $\beta$   $\gamma$  og et referansegen (RPLP0), 7,0 µL DEPC H<sub>2</sub>O og 2,0 µL cDNA (100 ng) per prøve ble blandet. Utstyret ble sterilisert ved UV-belysning. To µL av hver prøve ble tilsatt, før qRT-PCR ble kjørt.

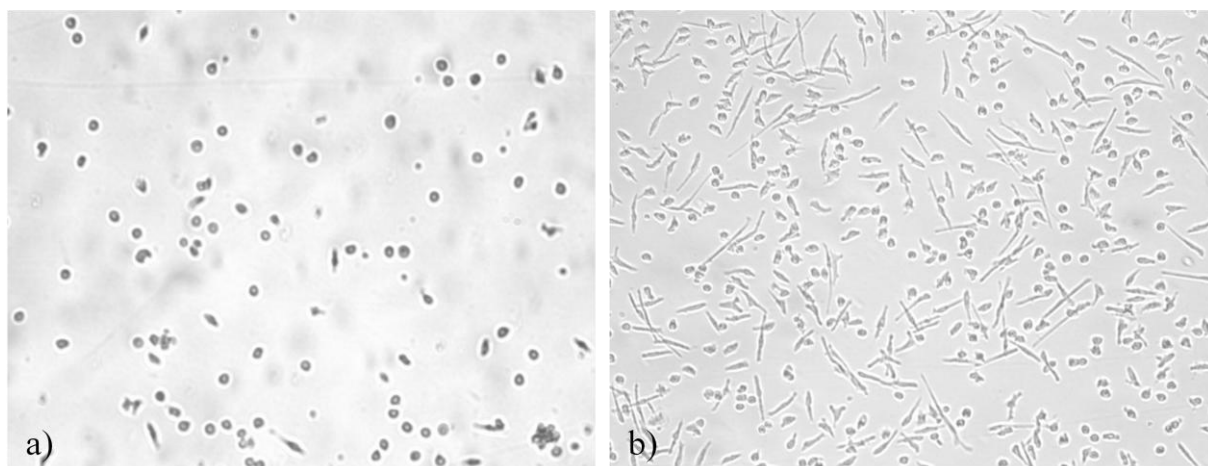
### **3.13 Bioanalyser**

Agilent RNA 6000 Nano Assay protokoll ble fulgt for å se på kvaliteten til det isolerte RNA'et. Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies) ble brukt, som beskrevet av leverandøren. Denaturerte prøver og ladder ble tilsatt på en chip, før prøvene ble analysert.

# 4 Resultater

## 4.1 Differensiering og stimulering av dendrittske celler

Monocyttar kan differensieres *in vitro* til dendrittske celler ved tilsetjing av GM-CSF og IL-4 til dyrkningsmediet (Butler et al., 2006). For å kunne fungere som effektive antigenpresenterende celler, må dendrittske celler gjennom en modningsprosess fra umodne dendrittske celler og vidare til modne. Umodne dendrittske celler kan modnes ved å stimulere med LPS, PGE<sub>2</sub> og TNF- $\alpha$  (Boullart et al., 2008, Kvale et al., 2006).



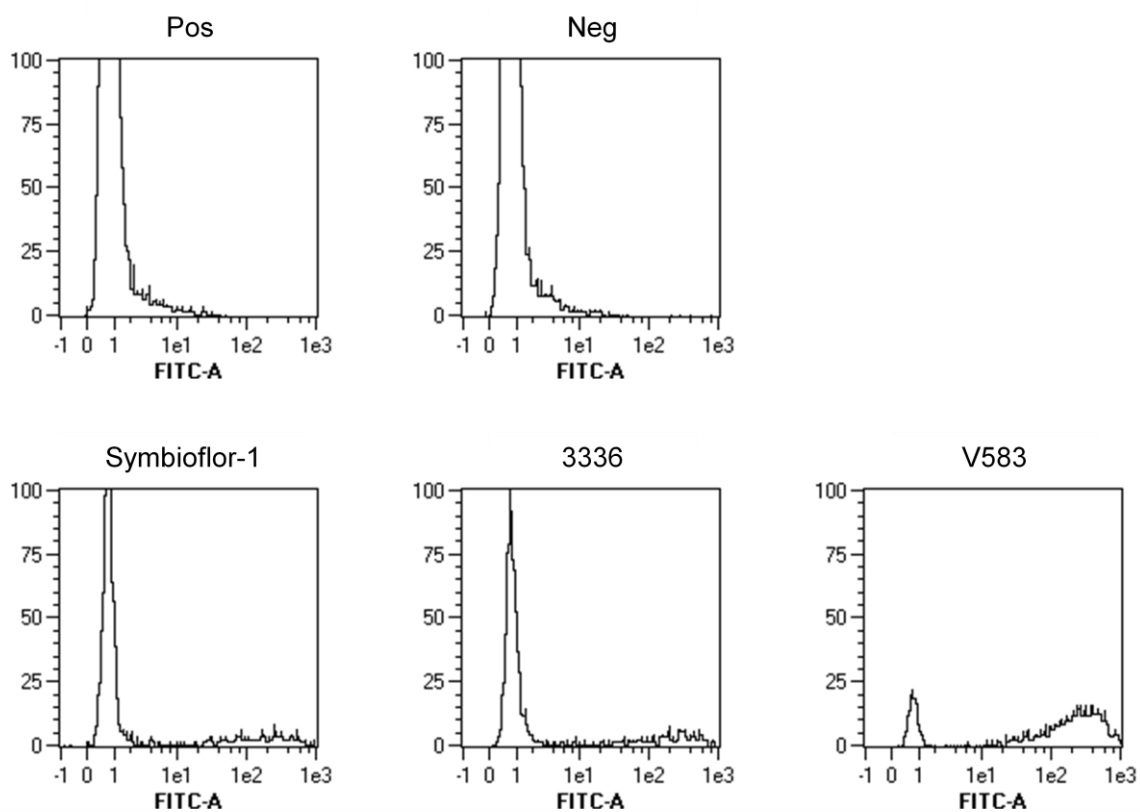
**Figur 7:** a) Monocyttar på vei til å bli dendrittske celler. Bildet er tatt ved hjelp av et lysmikroskop (10x), på dag 4 etter separasjon og utplating av monocyttar. På dag 4 ble cellene differensiert ved tilsetjing av IL-4 og GM-CSF sammen med friskt medium. b) Bildet viser dendrittske celler på dag 6 etter separasjon og utplating av monocyttar, før stimulering med LPS, TNF- $\alpha$  og PGE<sub>2</sub>. Bildet er tatt ved hjelp av et lysmikroskop (10x).

Figur 7a viser monocyttar på vei til å bli dendrittske celler. Man kan her se monocyttar med deres runde form. Figur 7b viser dendrittske celler på dag 6 etter separasjon og utplating av monocyttar, før stimulering med TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> og LPS. Man kan av bildene se at de dendrittske cellene har utviklet seg, og at de viser morfologiske forandringar. Dette indikerer at stimuleringen har induisert til differensiering mot dendrittske celler.



## 4.2 Suboptimal overflatemarkør for påvisning av modne dendrittske celler

For å undersøke om ulike bakteriestammer inducerer ulik oppregulering av overflatemolekyler på dendrittske celler, ble umodne dendrittske celler eksponert for ulike stammer av bakterien *E. faecalis*. De ble eksponert for den patogene stammen *E. faecalis* V583, den probiotiske stammen *E. faecalis* Symbioflor-1, og den kommensale stammen *E. faecalis* 3336, heretter referert til som V583, Symbioflor-1 og 3336. Eksponeringen ble utført på dag 6 i modningsprosessen. Væskestrømscytometri ble brukt for å se på oppregulering av overflatemolekylet CD80, som blir oppregulert på modne dendrittske celler. Se metoder for fremgangsmåte.

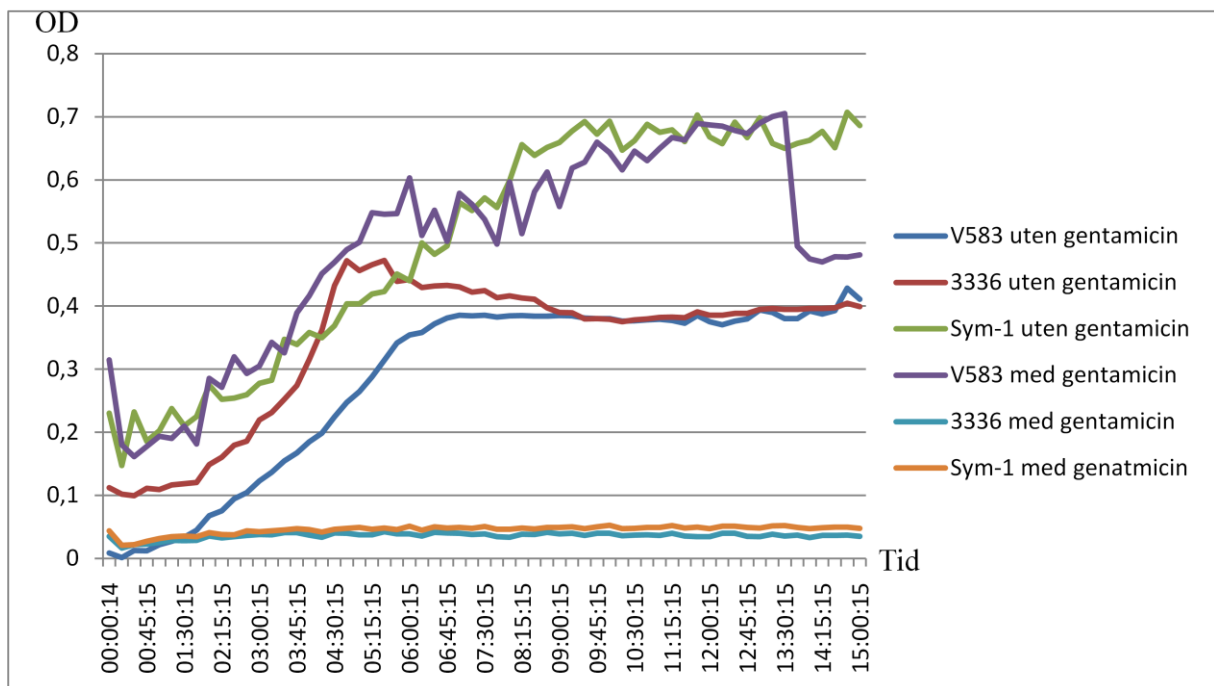


**Figur 8:** Væskestrømscytometrianalyse for uttrykk av overflatemarkøren CD80 på dendrittske celler eksponert for ulike bakteriestammer. Resultatene er representative for ett forsøk. Positiv kontroll (pos) er dendrittske celler stimulert med LPS, TNF- $\alpha$  og PGE<sub>2</sub>. Negativ kontroll (neg) er ustimulerte dendrittske celler.

Resultatet er representative for ett forsøk. Positiv kontroll ser ikke ut til å fungere. Resultatene viste, som vist i figur 8, at uttrykket av CD80 var kraftig oppregulert for V583, i forhold til for 3336 og Symbioflor-1.

### 4.3 V583 er resistent mot gentamicin

Ved kokultivering av dendrittiske celler og bakterier, ble vekstmediet tilsatt gentamicin for å hemme bakterievekst og surgjøring av mediet som et resultat av bakterienes syreproduksjon. Etter overnatt kokultivering med gentamicin, ble det observert at kulturen med den patogene stammen V583 hadde vekst og dermed fått en gul farge grunnet lav pH. Dette tyder på at *E. faecalis* V583 er resistent mot gentamicin. For å bekrefte dette ble veksten til de ulike bakteriene studert i medium med og uten gentamicin.



**Figur 9:** Spektrofotometrisk monitorering av bakterievekst. Ved hjelp av en spektrofotometrisk metode, et bioassay, ble OD for de tre *E. faecalis* stammene 3336, Symbioflor-1 og V583, med og uten gentamicin tilsetning målt hvert 45. minutt.

Som man kan se av figur 9, var det vekst for alle tre stammer når de ikke var behandlet med gentamicin. Stammene 3336 og Symbioflor-1 behandlet med gentamicin, viste ikke vekst. V583 behandlet med gentamicin viste derimot vekst. V583 så ut til å vokse bedre i nærvær av gentamicin enn uten.

Bioassayet viser at V583 er resistent mot gentamicin. Man vil derfor bruke UV-bestråling for å inaktivere alle bakteriestammene.

## 4.4 UV-inaktivering av bakterier

Væskestrømscytometriresultatene for dendrittiske celler eksponert for bakterier behandlet med gentamicin, viste antydning til at V583 uttrykte mer av overflatemolekylet CD80, enn Symbioflor-1 og 3336. Ved hjelp av en spektrofotometrisk metode der OD ble målt, ble det bekreftet at V583 var resistent mot gentamicin. Bakteriene ble derfor inaktivert med UV-lys i stedet, slik at bakterieveksten skulle være hemmet. Det ble først gjort et forsøk for å se hvor lenge man må bestråle bakteriene med UV-lys for at de skal være inaktiverte. Det ble tatt ut prøver fra bakteriekulturene under UV-bestrålingen ved ulike tidspunkt (30, 60, 90, 120 og 150 minutter), og prøvene ble plattet ut på agarskåler (BHI).

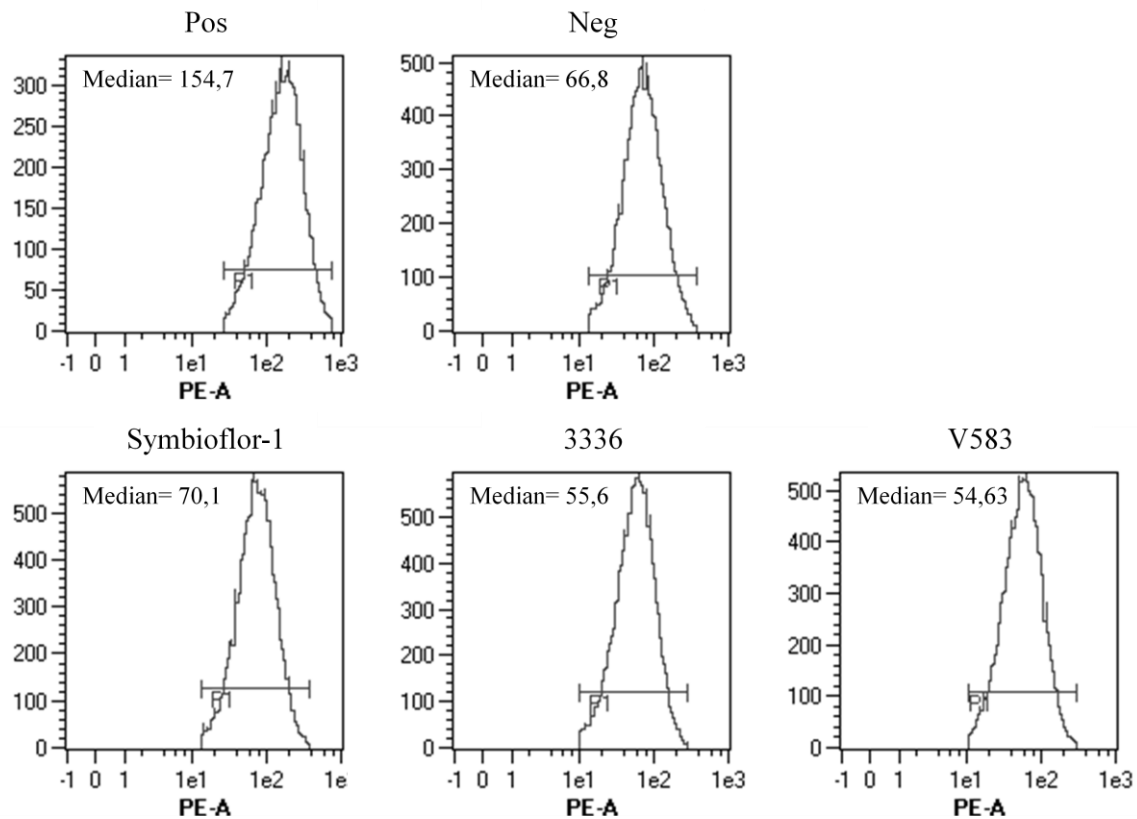
Tabell 1: Kolonivekst (antall kolonier) på agarskåler (BHI) med UV-inaktiverede bakterier ved ulike tidspunkt (minutter).

Minutter	V583	Symbioflor-1	3336
30	>	>	>
60	>	51	3
90	4	4	2
120	Ingen kolonier	Ingen kolonier	Ingen kolonier
150	Ingen kolonier	Ingen kolonier	Ingen kolonier

Ved å undersøke veksten på agarskålene etter ett døgn inkubering, fant man ut at de tre bakteriestammene ble inaktivert etter ulike tidspunkt (se tabell 1). Etter 60 minutter var *E. faecalis* 3336 så godt som inaktivert, mens Symbioflor-1 da hadde 51 kolonier og V583 hadde over 300 (TMTC) kolonier på skålene. Etter 90 minutter var alle stammene så godt som inaktivert, med 4 kolonier på skålene for V583 og Symbioflor-1, og 2 for 3336. Etter 120 minutter hadde ingen av de tre *E. faecalis* stammene noen kolonier på agarskålene. Det ble derfor utført UV-bestråling i 120 minutter før kokultivering med dendrittiske celler, for å være sikker på at alle de tre stammene var inaktivert.

## 4.5 Oppregulering av CD80 som følge av UV-inaktiverede bakterier

Etter UV-inaktivering, ble oppregulering av CD80 på dendrittiske celler eksponert for ulike bakteriestammer studert. Fremgangsmåten var ellers lik som tidligere.



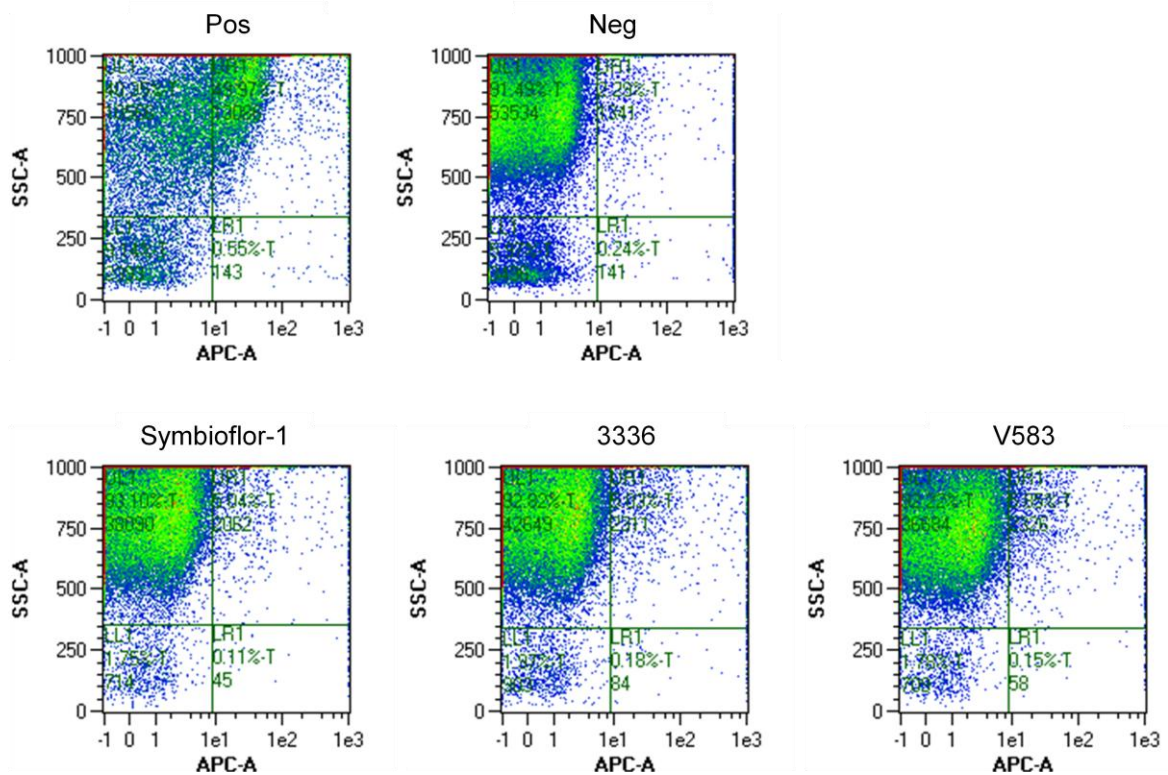
**Figur 10:** Væskestrømscytometrianalyse av dendrittiske celler eksponert for UV-inaktiverte bakteriestammer. Resultatene vist er representativt for ett forsøk. Positiv kontroll (pos) er dendrittiske celler stimulert med LPS, TNF- $\alpha$  og PGE<sub>2</sub>. Negativ kontroll (neg) er ustimulerte dendrittiske celler. Medianen for fluorescens intensiteten er også vist.

Væskestrømscytometriresultatene, presentert i figur 10, viste ingen markante forskjeller i oppreguleringen av CD80 for de tre bakteriestammene. Medianen for fluorescens intensiteten for Symbioflor-1 er noe høyere enn for de andre bakteriestammene. Den negative kontrollen virket ikke som den skulle.

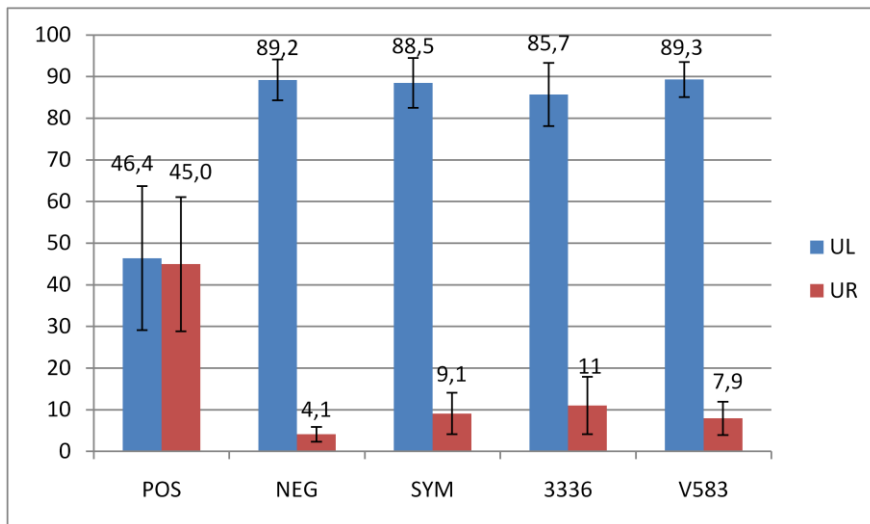
#### 4.6 Oppregulering av CD83 etter stimulering med UV-inaktiverte bakterier

Siden CD80 ikke fungerte som markør for å se på modningen av dendrittiske celler, ville man bruke en annen markør. Zhou og Tedder studerte ekspresjon av overflatemolekylet CD83 på dendrittiske celler (Zhou and Tedder, 1996). De fant at CD83 ble uttrykt når dendrittiske celler var fullt modne. Man vil derfor analysere uttrykk av CD83 for å se på modningen av dendrittiske celler som et alternativ for CD80. Det ble brukt samme framgangsmåte som tidligere.

a)



b)

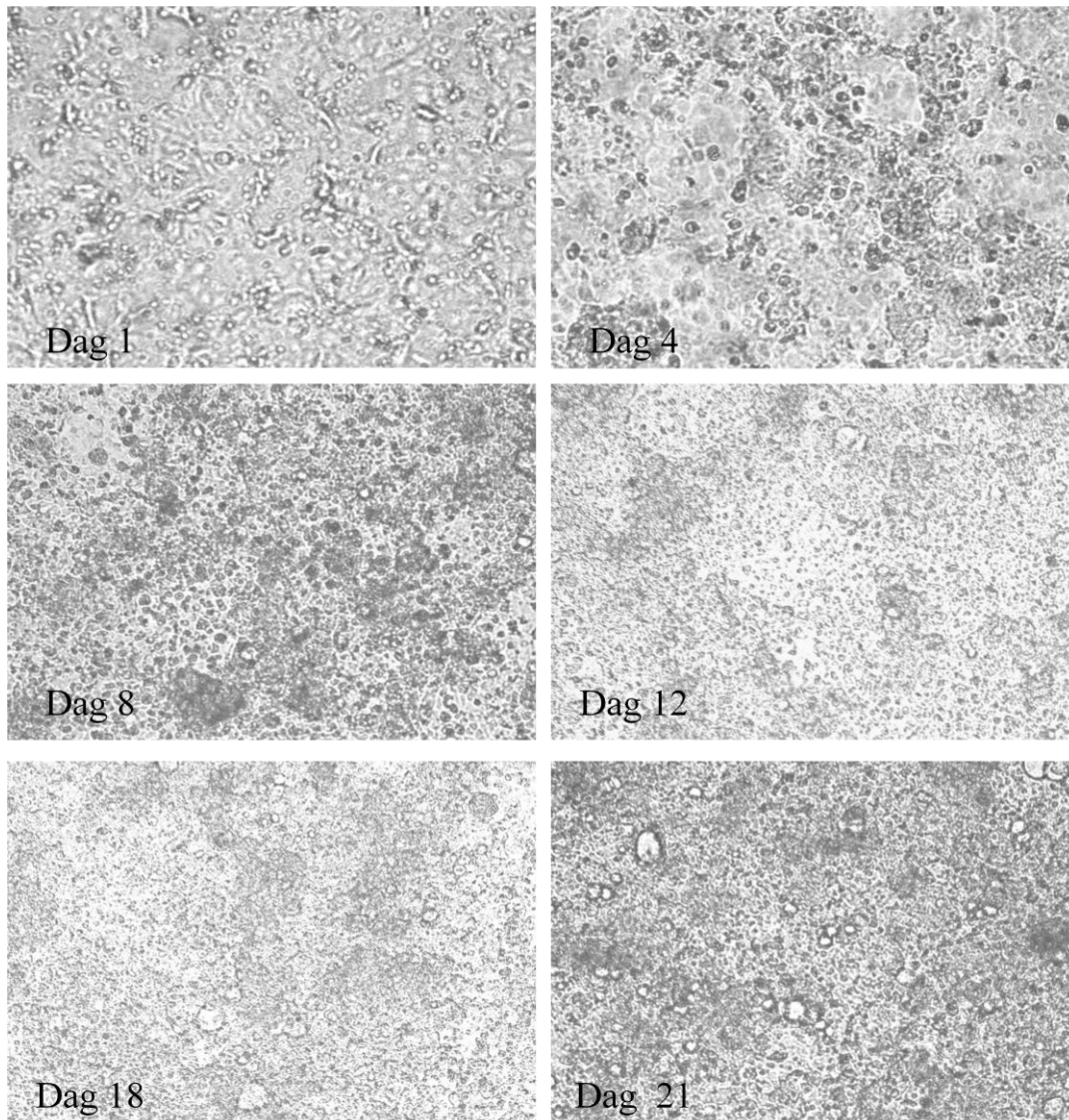


**Figur 11:** a) Figuren viser resultater fra ett representativt væskestrømcytometriforsøk der uttrykk av CD83 på dendrittiske celler ble studert etter stimulering med ulike bakteriestammer. Forsøket ble utført totalt fire ganger. Resultatene er fremstilt som tetthetsplot. Plottene er delt inn i fire kvadranter; øvre høyre (UR), øvre venstre (UL), nedre høyre (LR) og nedre venstre (LL). Celler i UL, uttrykker ikke CD83, mens celler i UR uttrykker CD83. Positiv kontroll (pos) er dendrittiske celler stimulert med LPS, TNF- $\alpha$  og PGE<sub>2</sub>. Negativ kontroll (neg) er dendrittiske celler som ikke er stimulert. b) Figuren viser gjennomsnittet av % UL og % UR av totalt antall celler for alle forsøkene, der uttrykk av CD83 på dendrittiske celler ble studert etter stimulering med ulike bakteriestammer. Positiv kontroll (pos) er dendrittiske celler stimulert med LPS, TNF- $\alpha$  og PGE<sub>2</sub>. Negativ kontroll (neg) er dendrittiske celler som ikke er stimulert. Standardavvik for alle prøvene er også vist.

Sammenliknet med negativ kontroll, virker det som om alle de tre bakteriestammene har en tendens til å oppregulere CD83, og dermed gi en liten stimulering av dendrittske celler. Ut fra resultatene presentert i figur 11b, ser det ikke ut til at de forskjellige stammene har ulik påvirkning på modningen av dendrittske celler.

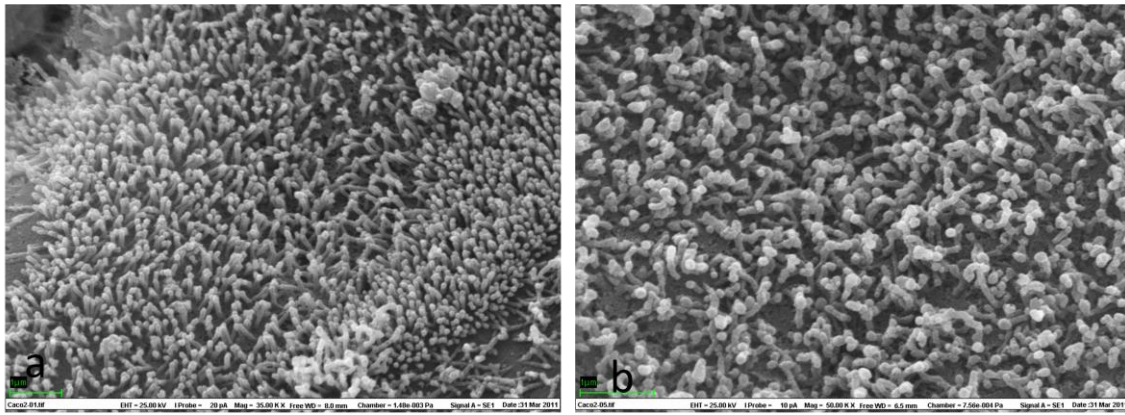
#### **4.7 Påvisning av polariserte epitelceller ved hjelp av SEM**

I den andre delen av dette masterprosjektet, skulle man studere om stimulering av dendrittske celler med ulike typer bakterier regulerte gentranskripsjonen av fibrinogen i tarmepitel. Det benyttes da polariserte Caco-2 celler. Caco-2 er en kreftcellelinje etablert fra en tykktarmkreftsvulst, som gradvis vil utvikle en børstesøm (mikrovilli) når de dyrkes på filter. Det ble sådd ut Caco-2 celler i filterkopper der medium var tilgjengelig for cellene både apikalt og basolateralt. Dette vil fremme polariseringsprosessen.



**Figur 12: Vekst av Caco-2 celler på filtre. Bildene er tatt ved hjelp av lysmikroskop på 10x forstørrelse på dag 1, 4, 8, 12, 18 og 21. Dette ble gjort for å følge polariseringsprosessen og sammenligne den med tidligere polariseringsforsøk.**

Figur 12 viser Caco-2 celler på dag 1, 4, 8, 12, 18 og 21 etter utplating i filterkopper. Da lysmikroskopering ikke viser om cellene har utviklet børstesøm, ble de analysert ved hjelp av et sveipeelektronmikroskop på dag 21.



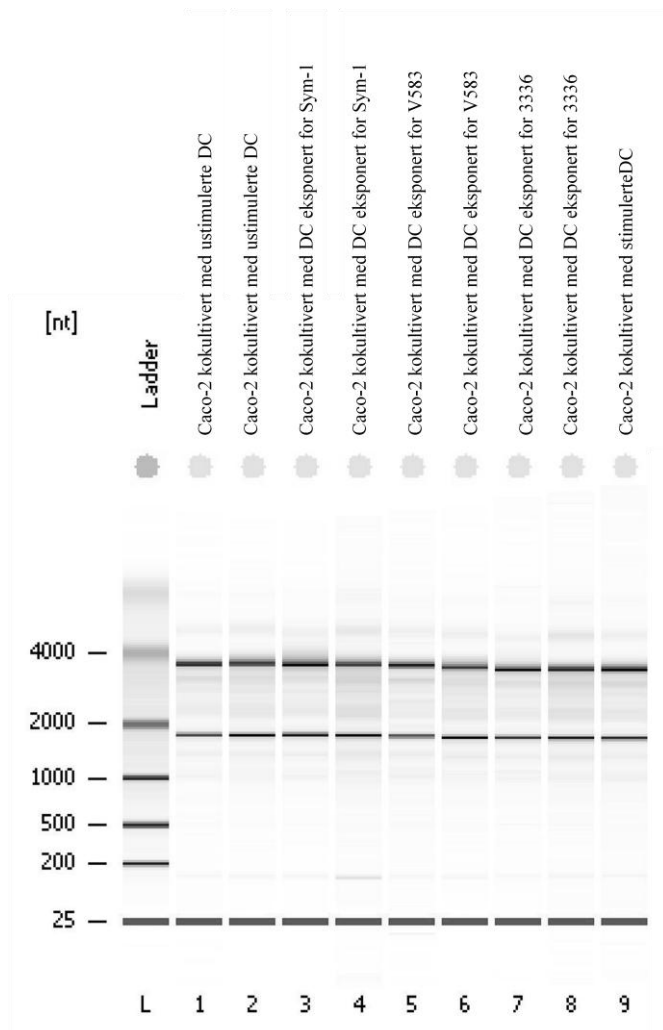
**Figur 13: a og b) Polariserte Caco-2 celler. Bildene er tatt ved hjelp av et sveipeelektronmikroskop ved 35 000 og 50 000 x forstørrelse.**

Figur 13 viser en rett og tettstående børstesøm (mikrovilli) på apikal side av epitelcellene. Dette verifiserer at Caco-2 cellene hadde polarisert og kunne da brukes til å studere genregulering i Caco-2 celler kokultivert med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for ulike stammer av bakterien *E. faecalis*.

#### **4.8 Genekspresjon av fibrinogen**

En potensiell nedregulering av fibrinogen i Caco-2 celler stimulert med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for ulike stammer fra bakterien *E. faecalis* skulle studeres. Etter basolateral stimulering av Caco-2 cellene, ble mRNA isolert som beskrevet i metod delen. Etter å ha utført mRNA isolering ble konsentrasjonene målt spektrofotometrisk på nanodrop (Nanodrop 200C, Thermo Scientific). Konsentrasjonene var generelt noe lave, så man ville videre sjekke kvaliteten av mRNA'et ved hjelp av en bioanalyser (Agilent 2100 BioAnalyzer, Agilent Technolgies).





Figur 14: Bioanalyser resultater av mRNA fra Caco-2 celler kokultivert med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for de tre *E. faecalis* stammene 3336, symbioflor-1 og V583. Resultatet viser også kontroller, der Caco-2 celler er kokultivert med ustimulerte og stimulerede dendrittiske celler.

Figur 14 viser bioanalyser resultater av mRNA fra Caco-2 celler kokultivert med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for de tre *E. faecalis* stammene 3336, symbioflor-1 og V583. Positive og negative kontroller er også tatt med. Gelbildet viser at det er lite degradering.

RIN (RNA integritetnummer) er et mål på RNA kvaliteten. Bioanalyser tildeler hver prøve RIN-verdier mellom 1 og 10, hvor 10 korresponderer til en ren, udegradert prøve.

**Tabell 2: Tabellen viser bioanalyser resultater med RIN-verdier for Caco-2 celler kokultivert med dendrittske celler eksponert for ulike bakteriestammer.**

Navn	RIN-verdi
Caco-2 celler kokultivert med ustimulerte DC, 1	8,90
Caco-2 celler kokultivert med ustimulerte DC, 2	8,80
Caco-2 celler kokultivert med DC eksponert for Sym-1, 1	9,0
Caco-2 celler kokultivert med DC eksponert for Sym-1, 2	8,30
Caco-2 celler kokultivert med DC eksponert for V583, 1	8,70
Caco-2 celler kokultivert med DC eksponert for v583, 2	8,50
Caco-2 celler kokultivert med DC eksponert for 3336, 1	8,70
Caco-2 celler kokultivert med DC eksponert for 3336, 2	8,60
Caco-2 celler kokultivert med stimulerede DC	8,80

Som tabell 2 viser, var RIN-verdiene høye, med verdier mellom 8,3 og 9,0.

Det var bra kvalitet på mRNA'et, og man kunne da gå videre med å utføre en cDNA syntese.

Etter cDNA syntese, ble det kjørt qRT-PCR for å se på ekspresjon av proteinet fibrinogen. qRT PCR resultatene vil da gi et uttrykk for hvor mye mRNA som var tilstede i hver prøve, altså mengde fibrinogentranskript og eventuelle forskjeller etter ulike stimuli.

**Tabell 3:** Tabellen viser resultater fra qRT-PCR, der genregulering av de tre fibrinogenkjedene FG $\alpha$ , FG $\beta$  og FG $\gamma$  i Caco-2 celler stimulert med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for de tre bakteriestammene Symbioflor-1 (Sym-1), 3336 og V583, ble målt. Tallene viser til mengde fibrinogentranskript, og er korrigert for referansegen , samt at negativkontroll (ustimulerte dendrittiske celler) er trukket fra. Resultatene viser to paralleller fra to forsøk.

Fibrinogenkjede	Bakterie	Genregulering			
		Forsøk 1,1	Forsøk 1,2	Forsøk 2,1	Forsøk 2,2
FG $\alpha$	Sym-1	1,19	-0,69	1,23	0,62
	3336	-0,33	-0,49	3,33	-0,06
	V583			0,9	0,07
FG $\beta$	Sym-1	1,19	0,66	0,58	0,09
	3336	0,34	-1	-0,5	0,31
	V583			0,14	-0,18
FG $\gamma$	Sym-1	0,75	-0,31	0,45	0,29
	3336	-0,45	-1,41	0,07	0,06
	V583			0,39	-0,05

Tabell 3 viser reguleringen av fibrinogen mRNA i Caco-2 celler etter stimulering med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for de tre bakteriestammene Symbioflor-1, 3336 og V583. Det kreves minimum en to-folds opp- eller nedregulering, for å kunne hevde at genekspresjonen er påvirket. Resultatene viste at det ikke var noen signifikant opp- eller nedregulering av fibrinogen.

# 5 Diskusjon

## Ulike bakteriestammers evne til å stimulere dendrittske

For å undersøke om bakteriestammer med forskjellige egenskaper (kommensale, probiotiske og patogene) påvirker dendrittske celler på ulik måte, ville man studere oppreguleringen av overflatemarkørene CD80 og CD83. Oppregulering av disse overflatemarkørene gir en indikasjon på modning av dendrittske celler. *E. faecalis* er i dette tilfellet en egnet art å studere, nettopp fordi det finnes både kommensale, probiotiske og patogene stammer. Stammene, med ulike egenskaper, kommer fra samme art og slekt, og de har dermed mange likheter.

I et innledende forsøk, viste resultatene antydning til at den patogene *E. faecalis* stammen V583 gav høyest uttrykk av overflatemolekylet CD80 på dendrittske celler, sammenliknet med Symbioflor-1 og 3336 (figur 8, side 24). CD80 gir et kostimulatorisk signal som er nødvendig for å sette i gang en immunrespons. Antistoffet ga respons, men den positive kontrollen for CD80 oppregulering på dendrittske celler fungerte ikke optimalt. I tillegg var antallet celler i dette forsøket ganske lavt, noe som kan ha gitt feilaktige resultater. Ut fra dette forsøket kan man dermed ikke konkludere med at den patogene stammen V583 fører til noen oppregulering av CD80 på dendrittske celler.

I motsetning til de andre *E. faecalis* stammene (Symbioflor-1 og 3336), ble det observert at den patogene stammen V583 hadde vokst i nærvær av gentamicin i det innledende forsøket beskrevet over. Antibiotikaresistens ble deretter påvist ved hjelp av bioassaystudiene beskrevet i resultatdelen (Figur 9, side 25). Denne antibiotikaresistensen førte til at den patogene stammen V583 fortsatt var aktiv under kokultivering med dendrittske celler. Symbioflor-1 og 3336 var ikke resistente mot gentamicin, dermed var veksten deres hemmet. Den levende patogene bakteriekulturen stimulerte dermed dendrittske celler i 24 timer, mens de inaktiverte probiotiske og kommensale bakteriene kun stimulerte dendrittske celler i en 2 timers kokultur (se metoder). Dette kan være årsaken til at det så ut som om V583 gav en større stimulering av dendrittske celler enn de andre stammene.

Av bioassayresultatene ser det ut som om V583 vokser bedre med gentamicin enn uten. Man ville forventet at V583 behandlet med gentamicin hadde vist mindre vekst enn for V583 som ikke var behandlet med gentamicin. Forsøket ble bare utført en gang så det er mulig dette kan

skyldes feil utførelse. Hensikten med forsøket var å påvise gentamicinresistens, og siden dette ble vist, så ble ikke forsøket gjentatt.

Lefort med flere, fant ut at gentamicin ikke er optimal for å hemme veksten til to *E. faecalis* stammer (Lefort et al., 2000). Enterokokker transporterer ikke gentamicin effektivt gjennom membranen, og derfor er ikke denne typen antibiotikum effektiv nok til å hemme enterokokker alene (Lefort et al., 2000). For å løse problemet med at en av de tre stammene i prosjektet var resistent mot gentamicin, burde man vurdert alternative antibiotika som også ville hemmet den patogene stammen V583. Dette kan være utfordrende da V583 er resistent mot flere typer antibiotika. Hensikten med antibiotikabehandling etter kokultur av dendrittske celler og bakterier, var å hemme bakteriell vekst og dermed syreproduksjon. Syren kan inducere en stressrespons i celler.

Et alternativ som ble utprøvd, var inaktivering ved hjelp av UV-bestråling. Metode for UV-bestråling ble optimalisert, slik at det etter endt bestråling ikke ga noe vekst i form av bakteriekolonier på agarskåler, som beskrevet over.

Inaktiverte bakterier kan føre til at man mister en del av det helhetlige bildet. Aktive bakterier skiller ut faktorer som inaktive ikke gjør, noe som kan påvirke de dendrittske cellene. Hadde man brukt aktive bakterier isteden, ville man muligens fått andre resultater. Men dette var da ikke mulig på grunn av syreproduksjon.

Etter UV- inaktivering, ble det utført et nytt forsøk for å analysere uttrykket av CD80 på dendrittske celler etter kokultur med de forskjellige *E. faecalis* stammene. Resultatene viste nå ingen betydelig forskjell mellom de ulike bakteriestammene. Medianen for fluorescensintensiteten for Symbioflor-1 stimulerte dendrittske celler, var noe høyere enn for de andre bakteriestammene. Antistoffet ga respons, men den negative kontrollen for CD80 oppregulering på dendrittske celler fungerte ikke. Man kan ikke si i hvilken grad bakteriestammene stimulerte til uttrykk av CD80 på dendrittske celler. Siden CD80 som markør ikke ga optimale resultater for analyse av modningen til dendrittske celler, ble en alternativ overflatemarkør, CD83, brukt isteden.

CD83 viste seg å være en god markør for å se på modningen til dendrittske celler. Både positiv og negativ kontroll viste forventede resultater. Etter fire modningsforsøk med CD83 som markør, kan det se ut til at alle tre bakteriestammene viser en tendens til å stimulere

modning av dendrittiske celler. Resultatene viste derimot ingen signifikant forskjell på uttrykt CD83 mellom de ulike bakteriestammene.

Rimoldi med flere, så på om dendrittiske celler kunne diskriminere mellom bakterier med ulike egenskaper (Rimoldi et al., 2005). De fant ut at dendrittiske celler reagerte veldig likt på alle de testede bakteriestammene, inkludert patogene og kommensale bakterier. De dendrittiske cellene eksponert for ulike bakterier, oppregulerte uttrykket av CD83, CD80 og HLA-DR. Oppreguleringen av overflatemarkørene var uavhengig av om de dendrittiske cellene var stimulert med patogene eller kommensale bakterier, noe som stemmer med hva man så i denne studien.

I andre studier, utført av Zeuthen med flere og Christensen med flere, har det derimot blitt vist at forskjellige bakterier har stimulert til ulik oppregulering av overflatemarkører på dendrittiske celler (Zeuthen et al., 2006, Christensen et al., 2002). Studiene viste at bakterier med størst evne til å inducere IL-12, et proinflammatorisk cytokin, viste størst oppregulering av overflatemolekyler på dendrittiske celler. Hart med flere, studerte også dendrittiske celler eksponert for ulike bakterier (Hart et al., 2004). De så at noen av stammene nedregulerte uttrykt CD80 (og noe CD40), at ingen av stammene regulerte CD86, og at alle stammene oppregulerte CD83 på dendrittiske celler. Det var forskjeller mellom de ulike bakteriene på hvor mye de oppregulerte CD83.

Disse tidligere studiene viste altså at ulike bakterier påvirket dendrittiske celler på forskjellig måte. Men disse studiene var stort sett på ulike bakteriearter, eller ulike bakteriestammer med antatt like egenskaper (probiotiske). At resultatene i disse studiene ikke viste det samme som i denne, tyder på at ulike bakteriearter og andre bakteriestammer innenfor andre arter, kan ha ulike effekter på modningen av dendrittiske celler. Noen bakterier kan vise forskjeller på uttrykket av overflatemarkører, mens andre ser ut til å ha lik effekt. Slik som i dette tilfellet, med antatte ulike egenskaper mellom bakteriestammene, hadde man forventet at de ville stimulert dendrittiske celler på ulik måte, noe som viste seg å ikke være tilfellet. *E. faecalis* Symbiofor-1 viser ikke probiotiske egenskaper i denne studien. For å bli klassifisert som en probiotisk bakterie, må stammen i så fall vise andre probiotiske egenskaper. Men siden andre studier har vist at Symbiofor-1 binder dårligere til tarmepitel og at viabiliteten blir dårligere ved lav pH, sammenlignet med de to andre stammene, så kan man sette spørsmålsteget ved om *E. faecalis* Symbiofor-1 er en probiotisk bakterie, slik som det er antatt (Christoffersen, 2011).

## **Transkriptomanalyse av fibrinogen i tarmepitel etter stimulering med kondisjonert medium fra dendrittiske celler**

Rimoldi med flere, har vist at dendrittiske celler inkubert med kondisjonert medium fra bakteriebehandlede epitelceller produserer antiinflammatoriske cytokiner (Rimoldi et al., 2005). Men da de studerte epitelceller, bakterier og dendrittiske celler i et direkte kokultiveringsforsøk (Caco-2 celler på filter, med bakterier på apikal side og dendrittiske celler på basolateral side), viste det seg at det ble produsert både proinflammatoriske og antiinflammatoriske cytokiner. Dette tyder på at stimulerte tarmepitelceller kommuniserer med dendrittiske celler. Flere studier har også vist dette (Butler et al., 2006, Zeuthen et al., 2008, Rimoldi et al., 2005). Man ville i dette forsøket se om tilfellet også er motsatt; om stimulerte dendrittiske celler kommuniserer med tarmepitelcellene. En slik toveis kommunikasjon har ikke blitt studert tidligere. Man kokultiverte Caco-2 celler med kondisjonert medium fra dendrittiske celler stimulert med ulike *E. faecalis* stammer basolateralt, og så på genekspresjonen av et protein (fibrinogen).

Fibrinogen er et komplekst protein, som består av par med tre ikke-identiske polypeptidkjeder;  $A\alpha$ ,  $B\beta$  og  $\gamma$ . Proteinet uttrykkes primært i leveren (intracellulær ekspresjon), men er også blitt påvist i andre vev, som lunge og tarm (Lawrence and Simpson-Haidaris, 2004). Det er få studier på fibrinogen i tarmepitel.

Fibrinogen gamma blir uttrykt i flere forskjellige ekstrahepatiske vev. Simpson- Haidaris undersøkte om epitelceller fra lunge og lever uttrykte  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$  fibrinogen i respons på proinflammatoriske faktorer (Simpson Haidaris, 1997). Resultatene viste en lokal syntese av fibrinogen i skadet vev. Fibrinogen i ekstrahepatiske epitelceller ble produsert i respons på betennelsesfaktorer, og har dermed en betydning for reparasjon av skadet vev.

I en tidligere masteroppgave (Bjerkan, 2009), ble det ved en helgenomisk transkriptomanalyse vist en kraftig nedregulering av uttrykt fibrinogen i Caco-2 celler stimulert basolateralt med kondisjonert medium fra dendrittiske celler eksponert for ulike bakteriestammer. Man ville derfor se om man kunne verifisere disse resultatene ved bruk av qRT-PCR. Oppregulering av fibrinogen i tarm krever et inflammatorisk stimulus (Molmenti et al., 1993). Så man kunne ha forventet at V583 ville oppregulert fibrinogen. qRT-PCR resultatene i dette prosjektet viste derimot ingen markant opp- eller nedregulering av fibrinogen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

Mikromatriseforsøk er en god metode for å profilere genomet. Det er vanlig å bekrefte mikromatriseresultater ved hjelp av qRT-PCR. Mikromatrise og qRT-PCR forsøk gir ofte ulike resultater (Morey et al., 2006). Begge metodene gir muligheter for feil, som kan påvirke dataene. mRNA isolering, cDNA syntese og qRT-PCR analysene inneholder mange trinn hvor feil kan oppstå. Det tidligere mikromatriseforsøket ble utført kun en gang. Kvaliteten på mRNA'et er avgjørende for et nøyaktig resultat, noe som ble verifisert før qRT-PCR forsøket i denne studien. Selv om tallene, som viser mengde fibrinogentranskript, fra qRT-PCR forsøket i denne studien (se tabell 3, side 34) ikke viste helt samme tendens i forhold til opp- eller nedregulering av fibrinogen for alle parallellene, så tyder det ikke på noen markant nedregulering av uttrykt fibrinogen. Det må eventuelt gjøres flere studier for å kunne konkludere med at fibrinogen blir nedregulert i Caco-2 celler etter kokultivering med stimulerende dendritiske celler.

I denne studien ble bakteriene inaktivert dobbelt så lenge som i det tidligere utførte mikromatriseforsøket. Dette kan ha ført til at bakteriene i mikromatriseforsøket, som var bestrålt med UV-lys i en time, skilte ut flere faktorer enn det bakteriene i denne studien gjorde, noe som kan ha påvirket reguleringen av fibrinogen. Det er mulig det var derfor mikromatriseforsøket viste en så kraftig nedregulering, og at man da ikke fikk noen signifikant regulering i qRT-PCR forsøket, men dette er trolig ikke hele svaret. For å få alle bakteriestammene inaktivert, måtte man her inaktivere i to timer, slik som UV-inaktiveringsforsøket viste.

Kokultiveringseksperimentet ble utført ved at Caco-2 celler ble eksponert for kondisjonert medium fra stimulerende dendritiske celler i to timer. Forsøket var en indirekte kokultivering. En annen metode kunne vært å bruke en direkte kokultiveringsmetode, ved å stimulere dendritiske celler i nærvær av Caco-2 celler. Indirekte kokultivering ble valgt for å oppnå en effekt på genaktiviteten, som et resultat av ulike faktorer skilt ut fra dendritiske celler, i respons på tilsatte stimulus. Man kunne ha inkubert Caco-2 cellene med kondisjonert medium fra dendritiske celler eksponert for ulike bakterier i mer enn to timer, for å være sikker på at inkubasjonstiden var lang nok til å aktivere gentranskripsjonen og fullføre translasjonen. Men en kokultiveringsperiode på to timer burde være optimalt, i følge O'Hara med flere (O'Hara et al., 2006).

Man har her bare Caco-2 (epitel) og utskilte faktorer fra dendritiske celler eksponert for bakterier, *in vitro*. I menneskets tarm vil det være flere komponenter tilstede, som kan ha



påvirkning på blant annet genuttrykket. Man kan derfor ikke si at oppsettet er representativt for slik det er i mennesketarmen. Man må utføre *in vivo* studier for å få et representativt forsøk.

Resultatene fra denne studien indikerer at bakterier ikke påvirker fibrinogen i tarmepitelceller. Det ville videre være relevant å undersøke cytokinproduksjonen. Man har her bare sett på ett gen, noe som ikke er nok for å kunne si noe om dendritiske celler påvirker tarmepitelet eller ikke.

# Referanser

- ABREU, M. T. 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*, 10, 131-144.
- ALBERTS, E. A. B. 2008. *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science.
- ARTIS, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*, 8, 411-420.
- BJERKAN, L. 2009. *The significance of prostaglandin E2 on dendritic cell biology and effect of differentially stimulated dendritic cells on polarized Caco2 cell gene activity*. Master of Science, Universitetet for miljø og biovitenskap.
- BOULLART, A., AARNTZEN, E., VERDIJK, P., JACOBS, J., SCHUURHUIS, D., BENITEZ-RIBAS, D., SCHREIBELT, G., VAN DE RAKT, M., SCHARENBERG, N., DE BOER, A., KRAMER, M., FIGDOR, C., PUNT, C., ADEMA, G. & DE VRIES, I. 2008. Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E<sub>2</sub>; results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57, 1589-1597.
- BUTLER, M., NG, C.-Y., VAN HEEL, D. A., LOMBARDI, G., LECHLER, R., PLAYFORD, R. J. & GHOSH, S. 2006. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *European Journal of Immunology*, 36, 864-874.
- CHRISTENSEN, H. R., FRØKIÆR, H. & PESTKA, J. J. 2002. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 168, 171-178.
- CHRISTOFFERSEN, T. E. 2011. *RE: Enterococcus faecalis*.
- COOMBES, J. L. & POWRIE, F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, 8, 435-446.
- DOMANN, E., HAIN, T., GHAI, R., BILLION, A., KUENNE, C., ZIMMERMANN, K. & CHAKRABORTY, T. 2007. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic Enterococcus faecalis strain Symbioflor 1. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 533-539.
- DONAGHY, H., POZNIAK, A., GAZZARD, B., QAZI, N., GILMOUR, J., GOTCH, F. & PATTERSON, S. 2001. Loss of blood CD11c<sup>+</sup> myeloid and CD11c<sup>-</sup> plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood*, 98, 2574-2576.
- FAO/WHO 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- FISHER, K. & PHILLIPS, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155, 1749-1757.
- FOULQUIÉ MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E. & DE VUYST, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- HART, A. L., LAMMERS, K., BRIGIDI, P., VITALI, B., RIZZELLO, F., GIONCHETTI, P., CAMPIERI, M., KAMM, M. A., KNIGHT, S. C. & STAGG, A. J. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53, 1602-1609.

- HUA, M. C., LIN, T. Y., LAI, M. W., KONG, M. S., CHANG, H. J. & CHEN, C. C. 2010. Probiotic Bio-Three induces Th1 and anti-inflammatory effects in PBMC and dendritic cells. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 3529-3540.
- KVALE, E. Û., DALGAARD, J., LUND-JOHANSEN, F., ROLLAG, H., FARKAS, L., MIDTVEDT, K., JAHNSEN, F. L., BRINCHMANN, J. E. & OLWEUS, J. 2006. CD11c+ dendritic cells and plasmacytoid DCs are activated by human cytomegalovirus and retain efficient T cell-stimulatory capability upon infection. *Blood*, 107, 2022-2029.
- LAWRENCE, S. O. & SIMPSON- HAIDARIS, P. J. 2004. Regulated de novo biosynthesis of fibrinogen in extrahepatic epithelial cells in response to inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, 92, 234-243.
- LEA, T. 2006. *Immunologi og immunologiske teknikker*, Fagbokforlaget Vigmostad og Bjørke AS.
- LEA, T. 2011. Celle kontakter.
- LEFORT, A., ARTHUR, M., GARRY, L., CARBON, C., COURVALIN, P. & FANTIN, B. 2000. Bactericidal Activity of Gentamicin against *Enterococcus faecalis* In Vitro and In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 2077-2080.
- LIU, Y.-J. 2001. Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptive Immunity. *Cell*, 106, 259-262.
- MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1, 135-45.
- MIDDLETON, J., PATTERSON, A. M., GARDNER, L., SCHMUTZ, C. & ASHTON, B. A. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, 100, 3853-3860.
- MOLMENTI, E. P., ZIAMBARAS, T. & PERLMUTTER, D. H. 1993. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14116-14124.
- MOREY, J., RYAN, J. & VAN DOLAH, F. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8, 175-193.
- NISS, J. H. & REINECKER, H.-C. 2006. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cellular Microbiology*, 8, 558-564.
- O'HARA, A. M., O'REGAN, P., FANNING, Á., O'MAHONY, C., MACSHARRY, J., LYONS, A., BIENENSTOCK, J., O'MAHONY, L. & SHANAHAN, F. 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology*, 118, 202-215.
- OLIVEIRA, S. H. P. & LUKACS, N. W. 2003. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 1455-1463.
- OUWEHAND, A., SALMINEN, S. & ISOLAURI, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- PAULSEN, I. T., BANERJEE, L., MYERS, G. S. A., NELSON, K. E., SESHADRI, R., READ, T. D., FOUTS, D. E., EISEN, J. A., GILL, S. R., HEIDELBERG, J. F., TETTELIN, H., DODSON, R. J., UYAMAY, L., BRINKAC, L., BEANAN, M., DAUGHERTY, S., DEBOY, R. T., DURKIN, S., KOLONAY, J., MADUPU, R., NELSON, W., VAMATHEVAN, J., TRAN, B., UPTON, J., HANSEN, T., SHETTY, J., KHOURI, H., UTTERBACK, T., RADUNE, D., KETCHUM, K. A., DOUGHERTY, B. A. & FRASER, C. M. 2003. Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299, 2071-2074.

- PEACH, R. J., BAJORATH, J., NAEMURA, J., LEYTZE, G., GREENE, J., ARUFFO, A. & LINSLEY, P. S. 1995. Both Extracellular Immunoglobulin-like Domains of CD80 Contain Residues Critical for Binding T Cell Surface Receptors CTLA-4 and CD28. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 21181-21187.
- PETROFF, M. G. & PERCHELLET, A. 2010. REVIEW ARTICLE: B7 Family Molecules as Regulators of the Maternal Immune System in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63, 506-519.
- PRECHTEL, A. & STEINKASSERER, A. 2007. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research*, 299, 59-69.
- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J.-P. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2, 361-367.
- RIMOLDI, M., CHIEPPA, M., LARGHI, P., VULCANO, M., ALLAVENA, P. & RESCIGNO, M. 2005. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood*, 106, 2818-2826.
- SANTEGOETS, S., J. A. M., VAN DEN EERTWEGH, A. J. M., VAN DE LOOSDRECHT, A. A., SCHEPER, R. J. & DE GRUIJL, T. D. 2008. Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies *Journal of Leukocyte Biology*, 84, 1364-1373.
- SEGERER, S., NELSON, P. J. & SCHLONDORFF, D. 2000. Chemokines, Chemokine Receptors, and Renal Disease: From Basic Science To Pathophysiologic and Therapeutic Studies. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 152-176.
- SIMPSON HAIDARIS, P. J. 1997. Induction of Fibrinogen Biosynthesis and Secretion From Cultured Pulmonary Epithelial Cells. *Blood*, 89, 873-882.
- STAGG, A. J., HART, A. L., KNIGHT, S. C. & KAMM, M. A. 2003. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut*, 52, 1522-1529.
- TOBIÁSOVÁ-CZETOOVÁ, Z., PALMBORG, A., LUNDQVIST, A., KARLSSON, G., ADAMSON, L., BARTUNKOVÁ, J., MASUCCI, G. & PISA, P. 2005. Effects of human plasma proteins on maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology Letters*, 100, 113-119.
- UEDA, Y., HAGIHARA, M., OKAMOTO, A., HIGUCHI, A., TANABE, A., HIRABAYASHI, K., IZUMI, S., MAKINO, T., KATO, S. & HOTTA, T. 2003. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Human Immunology*, 64, 1144-1151.
- VORLAND, L. H. 2001. Hva gjør bakterier patogene? *Tidsskrift for den norske lægeforening*, 121, 3083-9.
- WATANABE, N., HANABUCHI, S., MARLOIE-PROVOST, M.-A., ANTONENKO, S., LIU, Y.-J. & SOUMELIS, V. 2005. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood*, 105, 4749-4751.
- WELLS, J. M., ROSSI, O., MEIJERINK, M. & VAN BAARLEN, P. 2011. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4607-4614.
- ZEUTHEN, L. H., CHRISTENSEN, H. R. & FROKIAER, H. 2006. Lactic Acid Bacteria Inducing a Weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Response in Human Dendritic Cells Inhibit Strongly Stimulating Lactic Acid Bacteria but Act Synergistically with Gram-Negative Bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13, 365-375.

- ZEUTHEN, L. H., FINK, L. N. & FROKIAER, H. 2008. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Journal of Immunology*, 123, 197-208.
- ZHOU, L. J. & TEDDER, T. F. 1996. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 2588-2592.