



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Hovedveileder Professor Harald Carlsen

Effekt av NOX1 og Reaktive oksygenforbindelser i tarm hos mus som fôres med høfetttdiett

Effect of NOX1 and Reactive oxygen species in
intestine of mice fed high fat diet

Eirin Haraldsdotter Wesenberg

Bioteknologi – retning mikrobiologi

FORORD

Arbeid med denne masteroppgaven ble utført ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) fra august 2019 til august 2020, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Jeg vil gjerne få gi en stor takk til min hovedveileder Harald Carlsen for god veiledning og et spennende og lærerikt prosjekt. Videre vil jeg takke alle de gode samarbeidene og samtalene, samt veiledningen jeg har fått av stipendiat Anne Mari Herfinndal, stipendiat Dimitris Papoutsis og stipendiat Sergio Rocha, i tillegg til medstudentene Sissel Hulsund og Marita Torrissen Mårli. Dere har beriket dette året for meg, og jeg tror ikke dette hadde gått uten dere! Jeg vil også få takket alle dere andre i forskningsgruppa som har tatt meg imot og hjulpet meg med så mangt.

Avslutningsvis ønsker jeg også å takke min fantastiske samboer og mine foreldre som både har møtt meg med forståelse og støtte, og holdt ut med meg gjennom denne tiden.

August 2020, Sofiemyr

Eirin Haraldsdotter Wesenberg

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Et velfungerende fordøyelsessystem er viktig for både mental og fysisk helse. Særlig er et kontrollert miljø og symbiotisk mikrobiom i nederste del av tynntarm svært viktig, da hovednæringsopptak skjer i dette området. Reaktive oksygenforbindelser (ROS) dannes i alle celler i kroppen, men særlig NADPH oksidaser (NOX) er assosiert med produksjonen av disse. NOX1 som produserer superoksid er særlig oppregulert i ileum, men den nøyaktige rolle av NOX1, eller effekt av ROS i ulike situasjoner er fortsatt uklart.

Hensikt: Av den grunn ønsket vi å undersøke effekten av NOX1 i C57BL/6-hannmus føret på høyfettdiett med og uten fababønnefraksjon på mikrobiotasammensetningen og –antallet. Særlig ble det ønsket å indusere overvekt i musene, som har blitt assosiert med mikrobiell dysbiose, og å undersøke om ROS eller fababønnefraksjon bidro til forbedret tarmhelse.

Metoder: Villtypemus og NOX1-knockout mus ble føret med høyfettdiett med eller uten fababønnefraksjon for å indusere overvekt. Videre ble ROS-produksjon i mageregion målt *in vivo* ved bruk av en kjemiluminescerende probe. Den relative mikrobiotasammensetning i ileum og cøcum ble funnet gjennom 16S rRNA-sekvensering. Kvantifisering av antall bakterier ble gjort flowcytometrisk ved bruk av tellekuler. Før kvantifiseringen kunne gjøres måtte nedgang i celletall kvantifiseres som et resultat av lagringstid etter prøveuttak.

Resultater: Gjennom prosjektet ble det sett at dietten førte til overvektig fenotype sammenlignet med mus føret på standarddiett, samt at fravær av NOX1 kraftig reduserte det L-012-medierte lyssignaet. Videre ble det sett økt antall unike arter i cøcum sammenlignet med ileum, samt generell reduksjon av artsantallet i forsøksmusene føret med høyfettdiett. Det ble også observert dysbioseassosiert mikrobiotasammensetning både på fylumnivå og slektsnivå både i ileum og cøcum, og en antydning til økning i mikrobiotakvantitet i NOX1ko-musene sammenlignet med VT-musene. Fababønnefraksjonen i dietten viste tegn til å øke mengden av visse symbiotiske slekter, samt å holde bakteriemengden nede i ileum.

Konklusjon: Til sammen ga resultatene en viss indikasjon på at NOX1-indusert ROS har en regulativ effekt på mikrobiotasammensetning og –kvantitet, samt at fababønnefraksjon kunne motvirke noen av de dysbioseassosierte effektene skapt av høyfettdietten

ABSTRACT

Background: A well functioning digestive system is important both for mental and physical health. Specifically, a controlled environment and symbiotic microbiome in the lower part of the small intestine is very important, as the main nutrient uptake takes place in this area. Reactive oxygen species (ROS) are created in all cells of the body, but especially NADPH oxidases (NOX) are associated with the production of these. NOX1 is upregulated in ileum, but the exact role of this enzyme, or the effect of ROS in different settings is still unclear.

Purpose: For this reason, we wanted to investigate the effect of NOX1 in C57BL/6 male mice, fed on a high fat diet with or without a faba bean fraction in the microbiota composition and count. There were specifically an intent to introduce obesity in the mice as has been associated with microbial dysbiosis, and to investigate if ROS or faba bean fraction contributed to better intestinal health.

Methods: Wild type and NOX1 knockout (NOX1ko) mice were fed with a high fat diet with or without a faba bean fraction in order to induce obesity. Further, the ROS production in the abdominal region was measured in vivo through use of a chemically luminescent probe. The relative composition of microbiota in ileum and cecum were sequenced using the 16S rRNA-genes. Quantification of the number of bacteria were done through flow cytometry by the use of counting beads. Before the flow cytometric quantification could take place, the possible reduction in cell count had to be quantified as a result of storage time after sampling.

Results: The project showed that the diet led to an obese phenotype compared to mice fed with a standard diet, and that the absence of NOX1 strongly reduced the L-012 mediated light signal. An increased number of unique species were observed in the cecum, as compared to ileum, though reduction in operational taxonomic units were associated with the high fat diet in all the test groups. A dysbiotic associated microbiome composition was observed both at the phylum and genus level in the cecum, and a tendency to increased micro biotic quantity in the NOX1ko mice as compared to the WT mice. The faba bean fraction of the diet showed signs of increasing the amount of certain symbionts, as well controlling the bacteria load in ileum low.

Conclusion: Taken together, the results gave a certain indication that the NOX1 produced ROS had a regulatory effect on the microbiotic composition and quantity, and that the faba bean fraction could counteract some of the dysbiotic effects associated with the high fat diet.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	i
SAMMENDRAG.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INNHALDSFORTEGNELSE	v
LISTE OVER FIGURER.....	ix
FORKORTELSER.....	x
1 INTRODUKSJON	1
1.1 TARMENS OPPBYGNING OG FUNKSJON.....	2
1.1.1 Fordøyelsen.....	2
1.1.2 Tarmens forsvarssystemer	4
1.1.3 Tarmmikrobiota	5
1.1.4 Hvordan påvirkes mikrobiota av kosthold?	6
1.2 REAKTIVE OKSYGENFORBINDELSER OG NADPH-OKSIDASE	7
1.2.1 Reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser	7
1.2.2 NADPH-oksidaser og ROS-produksjon i kroppen	8
1.2.3 Funksjon av NOX1 og ROS i tarmen	10
1.2.4 Måling av ROS/RNS med L-012.....	11
1.3 BELGFRUKTER OG FABABØNNER	11
1.3.1 Effekten av belgfrukter på inflammasjon	12
1.4 VÆSKESTRØMICYTOMETRI.....	12
1.4.1 Flowcytometri av bakterier	13
1.5 16S rRNA-SEKVENSERING	13
1.6 HENSIKTEN MED PROSJEKTET	15
2 MATERIAL OG METODE.....	0
2.1 DYREFORSØK	0
2.1.1 Dyr og dyrehold	0

2.1.2	Etiske aspekter	1
2.1.3	NOX1ko-forsøk	1
2.1.4	Innledende forsøk.....	1
2.2	TILLAGING AV FÔR.....	2
2.2.1	Tillaging av bønnefraksjon	2
2.2.2	Tillaging av spesialfôr.....	2
2.3	IN VIVO-AVBILDNING AV ROS/RNS I TARM.....	3
2.3.1	Tillaging av L-012-probe	4
2.3.2	Avbildningsprosedyre	4
2.4	INNLEDENDE FORSØK.....	4
2.4.1	<i>E. coli</i> -renkultur	4
2.4.2	Fiksering i formaldehyd (2%) til tidseffekten og langtidslagring.....	5
2.4.3	OD-måling, fortynning og farging før flowcytometri.....	5
2.4.4	Ekstraksjon av ileumkymusprøver i NOX1ko-hunnmus.....	6
2.4.5	Stabilisering og fiksering av bakterier til flowcytometri	7
2.4.6	OD-måling, fortynning og farging før flowcytometri.....	7
2.5	INNHEENTING AV BIOLOGISKE PRØVER VED TERMINERING.....	7
2.5.1	Uttak av kymus fra ileum til flowcytometri og 16S-sekvensering	8
2.5.2	Ekstraksjon av cøkuminnhold.....	8
2.5.3	Uttak av fekalpellet fra kolon	8
2.6	BEHANDLING AV KYMUSPRØVER FRA ILEUM	9
2.7	FLOWCYTOMETRI AV BAKTERIER I KYMUS FRA ILEUM.....	9
2.7.1	Farging av bakterier og tillaging av prøver til flowcytometri.....	9
2.7.2	Visualisering og kvantifisering av bakterier med CellStream™	10
2.8	16S RRNA-SEKVENSERING AV BAKTERIER FRA ILEUM OG CØKUM.....	10
2.8.1	Isolering av DNA	11
2.8.2	PCR.....	12

2.8.3	Kvantitative og kvalitative metoder.....	14
2.8.4	Tillaging av bibliotek.....	15
2.9	DATAANALYSE.....	15
2.9.1	QIIME.....	15
2.9.2	Flowcytometridata	16
2.9.3	Statistisk dataanalyse	16
2.9.4	LEfSe-analyse.....	17
3	RESULTATER.....	0
3.1	EFFEKTEN AV DIETT OG GENOTYPE PÅ VEKT OG ROS-PRODUKSJON I TARM.....	0
3.1.1	Høyfettdiett med eller uten fababønner førte til vektøkning	0
3.1.2	L-012 signal fra mageregion forsvinner i NOX1-knockoutmus.....	2
3.1.3	Fababønner i høyfettdiett hos villtypemus har liten effekt på ROS/RNS-signalet	4
3.2	EFFEKT AV GENOTYPE OG DIETT PÅ SAMMENSETNINGEN AV MIKROBIOTA I ILEUM OG CØKUM	5
3.2.1	16S sekvensering av mikrobiota i ileum og cøkum viser ulikt artsmangfold.....	5
3.2.2	Sammenligninger i mikrobiotasammensetning i ileum og cøkum som effekt av NOX1 og diett ved bruk av LEfSe.....	6
3.3	EFFEKTEN AV DIETT OG GENOTYPE PÅ BAKTERIETALL I ILEUM.....	12
3.3.1	Forberedende forsøk	12
3.3.2	Diett har en effekt på bakteriekvantitet i ileum hos villtypemus.....	15
4	DISKUSJON.....	0
4.1	HVORDAN DIETT OG GENOTYPE PÅVIRKER VEKT I C57BL/6-HANNMUS	1
4.2	GENOTYPE, OG I MINDRE GRAD DIETT, PÅVIRKET <i>IN VIVO</i> ROS-SIGNALET FRA TARM I C57BL/6-HANNMUS.....	2

4.3	MULIGE TOLKNINGER OM HVORDAN MIKROBIOTASAMMENSETNINGEN PÅVIRKES AV NOX1 OG DIETT I ILEUM OG CØKUM.....	3
4.3.1	Det ble sett ulikt artsmangfold mellom ileum og cøkum som effekt av diett.....	3
4.3.2	NOX1ko-mus på HF-diett viste færre forskjeller i diversitet og relativ sammensetning av bakteriefylum mellom ileum og cøkum	3
4.3.3	I cøkum ble oppregulert mengde Bacteroidetes assosiert med FB- og chowdiett, mens Firmicutes-oppregulering ble assosiert med HF-diett	4
4.3.4	Økt relativ sammensetning av Proteobacteria ble sett i ileummikrobiota i NOX1ko-mus.....	5
4.3.5	Mikrobielle endringer i ileum på slekts- og familienivå.....	6
4.4	MULIGE TOLKNINGER AV OM DIETT ELLER GENOTYPE PÅVIRKET BAKTERIEANTALL I ILEUM.....	7
4.5	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	10
5	KONKLUSJON	0
	Kilder	0
	VEDLEGG.....	6

LISTE OVER FIGURER

Figur 2.1: Skjematisk oversikt over metode for det forberedende forsøket på E.coli-renkultur.....	5
Figur 2.2: Skjematisk oversikt over metode og tidspunkt for flowcytometrisk kvantifisering av mikrobiota fra ileum i mus.....	7
Figur 2.3: Skjematisk oversikt over utførte steg fra lysing av prøver frem til MiSeq Illumina-sekvensering av 16S rRNA.....	11
Figur 2.4: Observerte antall unike OTU'er sortert ut fra prøvetype ileum eller cøcum, samt genotype og diett.	16
Figur 3.1: Gjennomsnittlig vektøkning i forsøksgruppene fra forsøksstart (baseline) til terminering av musene i uke 14.	1
Figur 3.2: Representative in vivo-avbildninger fra de fire forsøksgruppene ved baseline, og ved 6, 24 og 96 timer etter forsøksstart, samt ved 10 uker etter forsøksstart.	3
Figur 3.3: Emitterte lyssignalet fra L-012-probe i villtypemus på HF- og FB-diett ved ulike måletidspunkt.....	4
Figur 3.4: Observerte antall unike OTU'er fra 16S-sekvensering av kymus fra ileum og cøcum i villtype- og NOX1ko-mus.	5
Figur 3.5: Forskjeller i fylumsammensetning i VT- og NOX1ko-mus mellom ileum og cøcum.....	7
Figur 3.6: Forskjeller i fylumsammensetning i cøcum.	8
Figur 3.7: Fylumnivå ulikheter i bakteriesammensetning mellom dietter i ileum.	9
Figur 3.8: Relativ sammensetning av oppregulerte slekter og familier i ileum som resultat av diett og genotype.	11
Figur 3.9: Celletall av E. coli-renkultur bestemt med flowcytometri etter henholdsvis 10, 20, 30 og 40 minutters fiksering i 2% formaldehyd.	13
Figur 3.10: Kvantifisering av bakterietall (celler/mL) i renkultur av E. coli.....	13
Figur 3.11: Celletall (celler/mL) i miljøprøver fra mus som en effekt av lagring.	14
Figur 3.12: Kvantifisering av bakterier i ileum i NOX1ko- og VT-mus på ulike dietter.	15

FORKORTELSER

(Fortsetter på neste side)

CFU	kolonidannende enheter (colony forming units)
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Patterns</i>
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoxy Nukleosidtrifosfater
ddNTP	Dideoksynukleotider
ddPCR	Digital dråpe PCR
DUOX	Dual oksidase
e/i/n NOS	endotelial/induserbar/nevronal nitrogenoksid syntase
FB	Høyfett med fababønnefraksjon
Flowcytometri	Væskestrømscytometri
FGS	Første Generasjons Sekvensering
FISH	Fluorescerende <i>In Situ</i> Hybridisering
FSC	Forward scatter
HF	Høyfettdiett
IBS	Irritabel Tarm Syndrom
IP	Intraperitonealt
LDA	Lineær Diskriminant Analyse (<i>Linear Discriminant Analysis</i>)
LEfSe	LDA effektstørrelse (<i>Linear discriminant analysis effect size</i>)
LPS	Lipopolysakkarid
MAMP	Mikrobeassosiert molekylært mønster (<i>Microbe Associated Molecular Pattern</i>)
MnSOD	Mangan Superoksid Dismutase
mRNA	Messenger RNA
NADH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid fosfat

NGS	Neste Generasjons Sekvensering
NO	Nitrogenoksid
NOX	NADPH Oksidase
OD	Optisk tetthet (<i>Optical Density</i>)
ONOO ⁻	Peroksinitritt
OTU	<i>Operational Taxonomic Units</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PRR	Mønsterkjenningsreseptorer (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
qPCR	Kvantitativ PCR
rDNA	ribosomalt DNA
RNA	Ribonukleinsyre
RNS	Reaktive nitrogenforbindelser
ROS	Reaktive oksygenforbindelser (<i>reactive oxygen species</i>)
rRNA	Ribosomalt RNA
RT	Revers Transkriptase
SCFA	Kortkjededede fettsyrer (<i>short chain fatty acids</i>)
SEM	Standardfeil (Standard Error of the Mean)
SOD	Superoksid Dismutaser
SSC	<i>Side Scatter</i>
S.T.A.R. buffer	<i>Stool Transport And Recovery buffer</i>
TGS	Tredje Generasjons Sekvensering
VT	Villtype

1 INTRODUKSJON

Fordøyelsessystemet er livsviktig for flercellede organismer, særlig i tarmen da dette er hovedområdet for opptak av væske og næringsstoffer, et område for kommunikasjon mellom vert og de fleste av mikrobenes som lever inni oss, og et område hvor kroppen kvitter seg med avfallsstoffer via fordøyelsessystemet. Vi er helt avhengige av de symbiotiske mikroorganismene, både for fysisk og mental helse. Kroppen har særlig mange fysiske og kjemiske forsvarmekanismer i tarm. Blant annet er det en sterk fysisk barriere mellom tarminnholdet og verten, det utskilles antimikrobielle stoffer og hovedtyngden av immunsystemet er assosiert med tarmen. Tynntarmen er et område assosiert med relativt få bakterier sammenlignet med tykktarmen, men siden tynntarmen er avhengig av at næringsstoffer får lett tilgang til epitelcellene for å bli tatt opp, er tynntarmens vegg utsatt for bakterielle «angrep». Derfor har tynntarmen trolig et mer sofistikert forsvar mot bakterier enn tykktarm. Dette omfatter blant annet høyere utskillelse av antimikrobielle peptider, lavere pH, høyere oksygeninnhold, og mer omfattende immunsystem. Videre kan produksjon av reaktive oksygenforbindelser ha en viktig rolle i forsvarssystemet. For eksempel er det vist at produksjon av reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser (ROS/RNS) påvirker både bakterietall og -sammensetning, særlig i nedre del av tynntarm. NADPH oksidaser, forkortet til NOX, er særlig viktige for produksjonen av ROS i kroppen, og en av disse, NOX1, er høyt uttrykt i epitelceller både tynn- og tykktarm. Videre kan ROS produsert av NOX1 reagere med andre reaktive forbindelser som nitrogenoksid og danne antibakterielle forbindelser som peroksynitritt. Det som gjør tynntarmen særlig interessant er det relativt høye uttrykket av induserbar nitrogenoksid-syntase, (iNOS), særlig i nedre del av tynntarm. iNOS lager nitrogenoksid og kan dermed konstitutivt lage relevante mengder med peroksynitritt i samarbeid med NOX1. Diett har også blitt vist at er viktig for tarmmikrobiomet. Et fettriakt kosthold vil kunne føre til overvekt og tilhørende livsstilssykdommer, som også ofte er assosiert med en endring i mikrobiotasammensetning og lavgradsinflammasjon i tarm. Inntak av bønner og andre belgfrukter er derimot assosiert med redusert forekomst av flere livsstilssykdommer som diabetes og hjerte og karsykdom.

Effekten ROS/RNS-produksjon i tynntarm har på bakteriesammensetningen og -antall under ulike forhold er fortsatt uklar. Eksempelvis er det gjort få studier for å se på effekten av NOX1-regulering av mikrobiotaen i ileum ved inntak av høyfettdiett, og om

INTRODUKSJON

fababønnefraksjon i den fettrike dietten vil kunne påvirke positivt. Derfor ble det bestemt å undersøke hva effekten av NOX1 ved fettrikt kosthold har på mikrobefolkning og -antall i ileum, og om en fababønnefraksjon i denne dietten påvirker denne i en mer positiv retning.

1.1 TARMENS OPPBYGNING OG FUNKSJON

Som allerede forklart er hovedfokuset i denne oppgaven å studere effekten av det ROS-produserende enzymet NOX1, og høyfettdiett med og uten fababønner på mikrobiotasammensetning og mikrobiotakvantitet i tarmen. Fordi dette er et relativt spesifikt felt, vil den videre innledningen introdusere fordøyelsessystemets oppbygning, immunsystemet assosiert med dette og introdusere viktigheten av tarmmikrobiotaen for å sette oppgavens hovedfokus i perspektiv.

1.1.1 Fordøyelsen

Fordøyelsessystemet er helt essensielt for overlevelse i multicellulære organismer og består av en rekke organer og systemer fra munnhulen til anus. I løpet av maten og drikkens reise gjennom fordøyelsessystemet blir nødvendig væske og mikro- og makronæringsstoffer absorbert av tarmens epitelceller, først og fremst i tynntarm. For makronæringsstoffene krever det først at disse brytes ned til mindre bestanddeler for muliggjøring av opptak. Denne nedbrytningsprosessen foregår både som mekaniske og kjemiske prosesser og resulterer i at næringsstoffene har en slik størrelse og ladning at cellene kan absorbere dem. Alt som ikke blir tatt opp fra tynntarmen sendes videre til tykktarm og enten skilt ut som avføring eller bearbeidet av bakterier der.

Nedbrytningsprosessen starter allerede i munnhulen med mekanisk kverning av maten, samt kjemisk nedbrytning ved at spyttinnholdende små mengder enzymer som amylase og lipase tilføres maten. Den spyttblandede maten fraktes videre gjennom spiserøret til magesekken hvor den blandes med magesyre og nye fordøyelsesenzymer. Fra dette dannes det en tykflytende blanding, kalt kymus, som videre sendes i porsjoner til tynntarmen. I øvre del av tynntarmen blandes den sure kymusen med gallesaft og fordøyelsessafter som både inneholder fordøyelsesenzymer og alkalisk bikarbonat skilt ut fra bukspyttkjertel. Dermed øker også kymusens pH her. Tynntarmen kan deles inn i tre deler: duodenum, jejunum og ileum, og det er i disse delene nær sagt all fordøyelse og opptak av næringsstoffer foregår. Distalt for ileum ligger blindtarmen, heretter kalt cøcum, med blindtarmsvedhenget. Cøcum

INTRODUKSJON

er første del av tykktarmen, videre kalt kolon. Mellom ileum og cøcum er det en lukkemuskel som hindrer tilbakeslag mellom de ulike delene. Lukkemuskler finnes det flere av i fordøyelsessystemet, blant annet mellom spiserør og magesekk, og mellom magesekk og tynntarm (Barrett, 2014). I mennesker er cøcum og blindtarmsvedhenget stort sett ansett som potensielle problemer, mens i de fleste planteetere er cøcum som en slags pose der vanskelig nedbrytbare fiber blir brutt ned (Stumpff, Manneck, & Martens, 2019). Videre fra cøcum fraktes kymusen gjennom kolon som samler opp og kvitter seg med materiale som ikke ble absorbert i tynntarm. I kolon skjer det absorbering av væske i tillegg til absorbering av kortkjedede fettsyrer (SCFA), produsert av kolonassosierte bakterier (Barrett, 2014). Kolon kan også deles inn i ulike områder; den stigende, transverse og nedgående kolon, i tillegg til den sigmoidale kolon. Deretter skilles det som er til overs ut av fordøyelsessystemet som avføring gjennom rektum og anus.

Fordøyelsessystemet kan sees på som et langt rør, hvor laget nærmest tarminnholdet/ lumen er bygget opp av epitelceller. Epitelcellene danner ytterste lag av mukosaen, også kalt slimhinnen. Mukosaen består videre av en tynn membran, et bindevevslag kalt Lamina propria og et tynt muskellag kalt Muscularis mucosa. Rundt mukosaen ligger et lag med nerveceller som kalles submukosa. Rundt submukosaen ligger blant annet et sirkulært muskelvev og et langsgående muskelvev som begge bidrar til tynntarmens struktur og har som hovedoppgave å frakte kymusblandingen videre i tynntarmen med regulerte muskelkontraksjoner (Barrett, 2014).

Tynntarmen og tykktarmens struktur sett fra inni tarmen er noe ulik. Tynntarmen har både globulære strukturer kalt krypter i tillegg til fingerlignende utstikkere kalt tarmtotter. Tykktarmen har kun krypter og har ellers en flat overflate. I både tynn- og tykktarm skilles tarminnhold fra resten av kroppen med et enkelt cellelag kalt epitelceller. Disse er koblet sammen med tette celle-sammenføyninger (*tight junctions*) for å hindre uønsket transport mellom cellene (Barrett, 2014). Nede i kryptene er det stamceller. Disse vil gjennom celledeling og differensiering bli til fire hovedtyper spesialiserte celler; absorpsjonsceller, begerceller, enteroendokrine celler og Paneth-celler. Absorpsjonscellene, begercelle og de enteroendokrine cellene vil alle migrere ut av kryptene og oppover tarmtottene, mens både stamcellene og Paneth-cellene blir igjen nede i kryptene. Modningen/ differensiering av cellene foregår under celledeling og migrering ut av kryptene. Videre migrere cellene oppover tarmtottene. Absorpsjon av næringsstoffer foregår i hovedsak på tuppen av tarmtottene, men

INTRODUKSJON

det er også dette området som er mest utsatt for slitasje og celledød. Når det skjer havner de døde epitelcellene i lumen, mens nye epitelceller overtar plassen (Mowat & Agace, 2014).

1.1.2 Tarmens forsvarssystemer

Det totale overflatearealet på tarmen i et voksent menneske er på omtrent 30- 35 m² (Helander & Fändriks, 2014) og er både hovedområde for næringsopptak, men også et område særlig utsatt for symbiotiske og patogene mikrober, metabolitter og toksiner (Lea, 2017). Mesteparten av kroppens immunforsvar holder til rundt tarmen, noe vi har to hovedtyper av.

Førstelinjeforsvaret består blant annet av fysiske og kjemiske barrierer. De fysiske barrierene inkluderer epitelcellene og tette celle-sammenføyninger mellom epitelcellene som danner en barriere. Denne barrieren hindrer uønskede molekyler og partikler å slippe inn i kroppen, mens ønskede molekyler kan aktivt eller passivt transporteres gjennom epitelcellene som transepitelial transport, eller mellom cellene som paracellulær transport. Da tarminnholdet, kymusen, også består av skadelige stoffer er det et slimlag som skiller epitelcellene og kymusen. I tynntarmen er det kun ett slikt lag, mens det i tykktarmen er både et indre og et ytre slimlag da bakteriemengden i tykktarmen utgjør området på jorda med høyest bakterietetthet. Slimlaget produseres av begercellene og har antimikrobielle egenskaper. Dette er fordi mukuslaget består av mucin glykoproteiner som er giftige for mange bakterier, i tillegg til at det også er store mengder antistoffer og antimikrobielle peptider (Mowat & Agace, 2014).

Antimikrobielle stoffer produseres i hovedsak av Paneth-celler. Disse stoffene er svært viktige og er en del av det medfødte forsvaret, som er et generelt forsvar som alltid er aktivt. Det medfødte forsvaret omfatter i tillegg til antibakterielle stoffer også flere immunceller som finnes i Lamina propria. Disse er blant annet dendrittiske celler og makrofager, i tillegg til T- og B-celler (Mowat & Agace, 2014). I likhet med immunsystemet i de fleste slimhinner, er tarmens immunsystem tolerant ovenfor de kommensale bakteriene som innebærer at både det medfødte og ervervede immunsystemet holdes i sjakk av antiinflammatoriske mekanismer som sørger for en effektiv men ikke-ødeleggende immunrespons hvis små mengder bakterier slipper gjennom barrieren og inn i Lamina propria.

Reduksjon eller ødeleggelse av tarmbarrierens integritet eksempelvis ved en omfattende invasjon eller vevsskade, aktiverer inflammasjonsrespons i immunceller i Lamina propria. Da vil immunceller tilhørende både det medfødte og adaptive forsvaret aktiveres, og mikrober vil

INTRODUKSJON

gjenkjennes basert på mønstergjenkjenningreseptorer (*pattern recognition receptors*, PRR) og bli fagocytert. I fagocytoseprosessen spiller reaktive oksygenforbindelser en viktig rolle.

1.1.3 Tarmmikrobiota

Mikrobiota har blitt definert som alle levende vesener innen et mer eller mindre veldefinert område, og inkluderer bakterier, arker, sopp, alger og små protister (Berg et al., 2020).

Tarmmikrobiota har de siste årene blitt vist å være viktig. Trolig lever så godt som alle flercellede organismer i symbiose med mikrober. Fysisk og mental helse i pattedyr er avhengig av et sunt mikrobiom. Blant annet har mikrobiomet vist å ha en effekt på næringsopptaket (Bäckhed et al., 2004), produsere kortkjedede fettsyrer (*short chain fatty acids*, SCFA) som tarmepitelcellene trenger (den Besten et al., 2013), en effekt ved sårheling og epitelcellevekst i tarm (Alam et al., 2016; Neish, 2009) og er også viktig for opplæring av immunsystemet (Lea, 2017). Mental helse har i de siste årene også blitt vist at påvirkes av mikrobiotaen vår (Cryan & O'Mahony, 2011), og også i motsatt tilfelle, nemlig at mikrobiotaen kan påvirkes av mental helse (J. Zhang et al., 2019). Over tid har den humane mikrobiotaen likevel vist seg å være relativt stabil, og ble av Lozupone et al. (2012) sammenlignet med et hvilket som helst annet økosystem med tanke på både funksjonell diversitet og stresstoleranse. Det er flere faktorer som kan skape normal variasjon eller som i mer alvorlige tilfeller kan påvirke stabiliteten slik at en ny likevekt dannes. Disse kan være alder, genetikk, miljø, sykdom og medisinbruk som antibiotika (Lozupone et al., 2012; Milani et al., 2017).

Trolig har artsrikheten noe å si for hvor stabilt et økosystem er, hvor ulike arter forbruker forskjellige ressurser og dermed er mindre sårbare for infeksjon (Lozupone et al., 2012). I tarmen finnes det stort sett kommensale og symbiotiske mikrober, eller er opportunistiske patogener. Strikte patogener blir oftest utkonkurrert av de andre artene tilstede. Dette legger grunnlaget for en sunn og velfungerende tarmmikrobiota, også kalt normobiose eller eubiose. Motsetningen til normobiose er det som kalles dysbiose og defineres som midlertidig eller vedvarende ubalanse i mikrobiotaen. Dysbiose har blant annet blitt assosiert med flere sykdommer som Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, irritabel tarm syndrom (IBS), overvekt og diabetes (Casén et al., 2015). Grensen mellom eubiose og dysbiose er dessverre ikke klart markert og ble omtalt som et slags «Anna Karenina prinsipp» av Berg et al (2020) hvor dysbiose blir sammenlignet med den kjente delen av sitatet om at hver ulykkelige familie er ulykkelig på hver sin måte. Med unntak av dysbiose, er mikrobiotaen i symbiose med verten.

INTRODUKSJON

Like fullt er en dysbiotisk bakterieprofil i mange studier kjennetegnet ved en lavere artsrikdom og økte forekomster av visse typer bakteriefyla som *Proteobacteria* (Shin, Whon, & Bae, 2015).

Kvantifisering av bakterier i og på menneskekroppen har blitt gjort på mange måter og i mange studier. I en metastudie gjort av Mowat et al (2014) ble bakteriekvantiteten gjennom fordøyelsessystemet kartlagt: øvre del av tynntarmen (duodenum og jejunum) hadde i underkant av 10^5 bakterier per mL, ileum hadde fra 10^3 - 10^7 , mens cøkum og kolon hadde fra 10^9 - 10^{12} . Noen av grunnen til de store forskjellene i bakterietall har blitt forklart med ulike forhold i tynntarm og tykktarm både med tanke på pH-verdi, næringsstoffer, tilgang til oksygen, antistoffproduksjon, oppbygningen i tillegg til gjennomfartstiden (Donaldson, Lee, & Mazmanian, 2016). I forskningsmiljøet med alle forbedringene og endrede måleteknikker forandrer ting seg fort. Blant annet fra 2012 til 2013 ble det foreslåtte antall ulike bakterielle arter i mikrobiomet redusert fra rundt 1000 arter i hvert person til ca. 150 arter (Faith et al., 2013; Lozupone et al., 2012).

Overordnet kan man si at tarmmikrobiota har bestemte hovedfunksjoner, nemlig å bidra til utvikling av tarmens immunsystem, opprettholde tarmbarrierens integritet, bidra med næringsstoffer gjennom å bryte ned for oss vanskelig nedbrytbare komplekser, i tillegg til beskyttelse av verten mot patogene mikroorganismer.

1.1.4 Hvordan påvirkes mikrobiota av kosthold?

Mikrobiota påvirkes av kosthold. Dette kan tydelig sees i studier av Avershina et al. (2014) på tarmmikrobiota i spedbarn der inntak av morsmelk fører til at *Bifidobacterium* dominerer i tarmen kort tid etter fødsel. Denne slekten er ofte assosiert med konsum av morsmelk og nedbrytning av humane melke-oligosakkarider. Dette er en fellesbetegnelse på komplekse glykaner, og har demonstrert å fostre et bakteriesamfunn som sammen kan bryte nevnte glykaner ned (Avershina et al., 2016) Etter introduksjon av fast føde i spedbarn ble det videre sett en markant endring i sammensetning til en som var mer lik en «voksen» mikrobiotasammensetning (Avershina et al., 2014). Tilsvarende har det blitt observert forskjellige mikrobiotasammensetninger i mennesker i ulike geografiske områder trolig som et resultat diett og spisemønsteret, selv om det også kan være andre påvirkningsfaktorer som geografisk eller genetisk effekt (Milani et al., 2017). Under mer kontrollerte forhold har det blitt observert forandring i mikrobiotasammensetning etter endring i diett. I en studie utført av Wu et al. (2011) ble det observert endring i mikrobiotasammensetningen allerede etter 24

INTRODUKSJON

timer på ny diett, og denne endringen vedvarte de 10 dagene kostholdet ble opprettholdt. Dette tyder på at komponentene i dietten kan brukes til å påvirke bakteriesammensetningen.

Naturlig nok vil maten vi gir bakteriene kunne bestemme hva slags bakterier som får lov å vokse. Bakteriene i tarmen kan som nevnt produsere SCFA. Dette gjør de som et resultat av energiproduksjon, hvor de hovedsakelig gjennom fermentering bryter ned kostfiber, resistent stivelse og andre komplekse molekyler som ikke blir absorbert av verten. Hovedtyper SCFA som produseres i tarmen er eddiksyre, propionsyre og smørsyre. Med andre ord vil maten som konsumeres bidra til å bestemme hva slags fermentering som forekommer og dermed også bakteriesammensetningen basert på hvilken type metabolsk aktivitet som gjøres samt hvilke endeprodukter som dannes (Holscher, 2017).

Visse trender mellom bakteriell sammensetning og diett har blitt sett. I et studie gjort av Ley, Turnbaugh, Klein, and Gordon (2006) ble den relative sammensetningen i fekalprøver fra overvektige mennesker på enten fett- eller karbohydratbegrensede dietter analysert. Til tross for at hver person hadde unike relative sammensetninger av bakterier, ble det funnet fylogenetiske trender som antydte at raten mellom Firmicutes og Bacteroidetes er viktig for fenotypen, og at økt mengde Bacteroidetes assosieres med nedgang i vekt. Dette støtter teorien om at tarmmikrobiota i mennesker skal kunne klassifiseres ut fra noen få enterotyper, altså noen få ulike hovedsammensetninger av bakterielle arter (Hills et al., 2019; Lozupone et al., 2012). Videre har et fettriakt kosthold blitt assosiert med nedgang i fylumet Verrucomicrobia, samt oppgang i Proteobacteria (Cândido et al., 2018). I studier på mus hvor dyrene har blitt føret med høyfettdiett/ vestlig diett, har det også blitt sett en sammenheng til nedgang i Bacteroidetes, samt en generell nedgang i generell mikrobielldiversitet (Cândido et al., 2018).

1.2 REAKTIVE OKSYGENFORBINDELSER OG NADPH-OKSIDASE

1.2.1 Reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser

Reaktive oksygenforbindelser, heretter kalt ROS, er små forbindelser med opphav i dioksygen, O_2 . ROS er en paraplybetegnelse og inkluderer radikale forbindelser (superoksid: O_2^* , hydroksyl radikal: HO^*), singlet oksygen: 1O_2 , og noen ikke-radikale forbindelser (hydrogenperoksid: H_2O_2 og hypoklorsyre: $HClO$). Disse har både svært ulik reaktivitet og halveringstid (Pryor, 1986). Radikal er en fellesbetegnelse på relativt ustabile ioner, atomer eller molekyler. Felles for ROS-artene er at de har et uparet elektron i ytterste orbital og dette

INTRODUKSJON

uparede elektronet omtales som reaktivt da det kan påvirke andre molekylers stabilitet, som enzymer, nukleinsyrer og membranlipider (Nelson & Cox, 2013 (David L. Nelson, 2013)).

I likhet med ROS er reaktive nitrogenforbindelser, heretter kalt RNS, relativt små forbindelser derivert fra nitrogenoksid (NO). NO har forholdsvis spesifikk effekt, er fysiologisk viktig blant annet for blodtrykksregulering (Moncada & Higgs, 2006) og ikke spesielt reaktiv alene. Omdannelsen RNS skjer når NO interagerer med frie radikaler eller enzymer, særlig i møte med O_2^{*-} som danner det svært reaktive peroksinitritt, $ONOO^-$ (Patel et al., 1999). På denne måten er ROS blant annet viktig for regulering av blodtrykket sammen med NO (Moncada & Higgs, 2006), og produseres i de fleste celler i kroppen.

1.2.2 NADPH-oksidaser og ROS-produksjon i kroppen

ROS produseres i alle aerobe celler som et biprodukt i energiproduksjonen (Nelson & Cox, 2013). Dannelsen av O_2^{*-} forekommer ved ufullstendig reduksjon av O_2 til H_2O , hovedsakelig når elektroner flyttes fra Kompleks I/II til Ubiquinon, og fra Ubiquinone til Kompleks III i den respiratoriske kjeden (Nelson & Cox, 2013). Dannelsen av O_2^{*-} forekommer særlig når det er ulik rate på elektronmengden inn i, og på elektronflyten gjennom den respiratoriske kjeden (Nelson & Cox, 2013). Elektrontransportkjeden overfører elektroner fra nicotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) eller nicotinamid adenin dinukleotid (NADH) gjennom fire membrankomplekser på veien til O_2 for å redusere dette til H_2O (David L. Nelson, 2013). Ved fullstendig reduksjon vil det ved bruk av 4 elektroner dannes to vannmolekyler fra O_2 . Ved ufullstendig reduksjon vil det kunne dannes 3 ulike typer frie radikaler: O_2^{*-} dannes ved tilførsel av ett elektron, med to elektroner omdannes O_2^{*-} til H_2O_2 , mens det ved tre elektroner dannes OH^* .

Det foregår en aktiv omgjøring av superoksid til hydrogenperoksid av mitokondrielle superoksid dismutaser (SOD). Det finnes 3 isotyper av SOD i pattedyr (Miao & St Clair, 2009), men kun type 2, mangan superoksid dismutase (MnSOD), er essensiell for overlevelse. Dette har blant annet blitt demonstrert i mus som dør kort tid etter fødsel (Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995). Omgjøringen til H_2O_2 er i tillegg til å beskytte cellene fra oksidativ skade, også brukt som signalmolekyl i diverse redoksprosesser fordi H_2O_2 har egenskaper som gjør det godt egnet (Hernández-García, Wood, Castro-Obregón, & Covarrubias, 2010; Knaus, 2020). H_2O_2 er i motsetning til O_2^{*-} mye mer stabilt. Dessuten gjør ladningen til O_2^{*-} at dette molekylet ikke kan diffundere gjennom membraner, men i stedet kontrolleres lettere. H_2O_2 har ingen ladning slik at diffusjon forekommer i tillegg til aktiv

INTRODUKSJON

transport gjennom akvaporiner (Knaus, 2020). H_2O_2 -initiering av redokssignalisering kan blant annet skje ved reversibel oksidering av reaktive cystein-forbindelser i enzymer slik at de aktiveres. Reversibiliteten gjør det mulig for cellene å skille mellom, og reagere på varierende konsentrasjon av H_2O_2 (Jones & Neish, 2017).

I tillegg til produksjon av ROS som et biprodukt av elektrontransportkjeden, forekommer også aktiv produksjon av ROS i kroppen, hvor hovedmengden dannes av enzymfamilien NADPH oksidaser. Det finnes 7 isoformer av NADPH oksidaser i mennesker; NOX 1-5 og DUOX 1-2. Disse finnes i ulike vev hvor de har ulik funksjon. NOX2 var den første isoformen som ble oppdaget, og kjent for å være aktiv ved sykdomstilstand. Da vil det produseres ROS i immunceller som fagocytter og granulocytter (Lea, 2017; Snelgrove, Williams, Thorpe, & Hussell, 2004). Slike immunceller aktiveres gjennom binding av «pattern recognition receptors», kort kalt PRR'er, som er på utsiden av immunceller, til «microbe associated molecular patterns», MAMPs på mikrober (Jones & Neish, 2011) eller «danger associated molecular patterns», DAMPs som kan finnes på ikke-infeksiøst skadet vev (Q. Zhang, Itagaki, & Hauser, 2010). Ved slik binding aktiveres immuncellens kjemotakse (bevegelse mot eller fra en gradient av et kjemisk stoff), i tillegg til endring i aktinskjelettet og produksjon av ROS inne i immuncellene, alt for å kunne ta inn bakterier eller andre celler ved fagocytose, og videre drepe dem med høye konsentrasjoner av ROS/RNS, såkalt respiratorisk utbrudd (Lea, 2017). NOX1 er nært beslektet NOX2, men i stedet for å dominere i immunceller er NOX1 funnet i epitelceller i tynntarm (Mandal, 2010) og kolon, i tillegg til i glatt muskelvev, livmor, prostata og endotelceller (Bedard & Krause, 2007). NOX3, NOX4 og NOX5 har blitt funnet i flere indre organer som lever, lunger, nyrer og milt i tillegg til eggstokker og testikler (Panday, Sahoo, Osorio, & Batra, 2015). DUOX 1 og 2 har begge blitt funnet langs fordøyelsessystemet, fra epitelceller i spiserøret gjennom magesekken og helt ned til kolon (Panday et al., 2015).

I likhet med NOX-enzymene, har også nitrogenoksid syntasene (Brando et al.) viktige roller i kroppen. NOS produserer NO i ulike vev og har tre ulike isoformer: nevralt NOS (nNOS), endotelisk NOS (eNOS), og induserbar NOS (iNOS) (Förstermann & Sessa, 2012). Både nNOS og eNOS har som navnene tilsier blitt funnet i nevroner og i endotelceller, i tillegg til også ha blitt funnet mange andre celletyper og vev hvor de produserer små mengder NO. iNOS, først funnet i makrofager (Arzumanian, Stankevicius, Laukeviciene, & Kevelaitis, 2003), er derimot ikke vanligvis uttrykt i celler før bestemte bakterielle agens eller proinflammatoriske cytokiner induserer uttrykk. Slik induksjon kan forekomme i de fleste

INTRODUKSJON

celletyper eller vev, kun avhengig av aktivering med riktig agens, og vil deretter være aktiv (Förstermann & Sessa, 2012).

1.2.3 Funksjon av NOX1 og ROS i tarmen

Funksjonen til NADPH-oksidaser og ROS i tarmen har lenge vært av interesse i forskningsmiljøet, og det finnes mange teorier om den faktiske funksjonen. Det har blitt antydnet at NOX sin rolle, og funksjonen av ROS, både er for å kommunisere mellom mikrobiom og vert, vertens kontroll av mikrobiomet for å opprettholde homeostase.

NOX1 og iNOS finnes begge i tarmen. I normaltilstand uttrykkes NOX1 svakt i ileum og har blitt funnet å uttrykkes i en økende gradient fra proksimal til distal del av kolon (Szanto et al., 2005). Uttrykk av iNOS er høyest i ileum sammenlignet med resten av tarmen (Matziouridou et al., 2018) og reguleres i epitelcellene i respons til bakteriemengden (Shaked et al., 2012). Som tidligere nevnt kan iNOS og NOX1 sammen produsere forløperne til den svært reaktive og kortlevde forbindelsen peroksinitritt (ONOO⁻). Matziouridou et al (2018) viste at det var et kraftig ROS-aktivert signal fra ileum i villtypemus og at i NOX1- eller iNOS-knockoutmus ble signalet redusert, mens bakteriemengden økte. Dette likner studier om ROS i insektsartene *Drosophila melanogaster* og *Aedes aegypti*, der DUOX-oppregulering ser ut til å kontrollere bakteriemengden i tarmen (Ha, Oh, Bae, & Lee, 2005; Xiao et al., 2017). I NOX1ko-mus og iNOSko-mus har det også blitt sett likere bakteriesammensetning i tynntarm og cøcum sammenlignet med villtypemus (Matziouridou et al., 2018). Alt dette støtter hypotesen om at aktiviteten til NOX1 og iNOS, og produksjon av ROS i tarmen er med på å opprettholde homeostase.

Homeostase i tarmen innebærer også fravær av patogene arter. I en studie gjort i 2016 viste Pircalabioru et al at NOX1 beskyttet mot kolonisering av murine patogener, og at ved infeksjon regulerte NOX1 uttrykket av DUOX2. Ved fravær av NOX1 i tarmen ble det derimot sett en oppregulering av H₂O₂-produserende bakterier som viste å hindre patogen kolonisering og virulensfaktorer (Pircalabioru et al., 2016). I tillegg til at mikrobiotaen kan hindre patogen vekst gjennom å etterligne vertens naturlige forsvar, har det også blitt sett i flere flercellede organismer at symbiotiske bakteriearter kan indusere ROS-produksjon i vertens celler, kanskje som en form for kommunikasjon (Jones & Neish, 2017). Det er blitt vist at visse bakteriestammer kan aktivere ROS-produksjon i intestinale epitelceller i mus til ikke-dødelige konsentrasjoner. Alam et al så i denne studien fra 2016 at ROS-aktiveringen hadde en positiv effekt på sårheling og cellemotilitet i kolon. I samme studien ble det også

INTRODUKSJON

sett at bakteriefrie mus hadde dårligere sårheling og tregere cellemotilitet trolig på grunn av fravær av bakterieindusert ROS (Alam et al., 2016).

1.2.4 Måling av ROS/RNS med L-012

Det har blitt laget flere ulike prober og teknikker for å måle ROS/RNS som har vært relativt gode i *in vitro*-studier. I *in vivo*-studier har derimot den kjemiluminescerende proben L-012 gitt gode resultater for måling av peroksintritt (Daiber, Oelze, Steven, Kröller-Schön, & Münzel, 2017; Kielland et al., 2009; Van Dyke, Ghareeb, Van Dyke, & Van Thiel, 2007). Trolig kan også L-012 brukes til deteksjon av hypoklorsyre ifølge Goiffon et al. (Goiffon, Martinez, & Piwnica-Worms).

L-012 er en probe som er en analog til den mer kjente ROS-proben luminol, men mer følsom og dermed mer egnet for *in vivo*-avbildning i mus. Siden den er særlig følsom for peroksintritt er den godt egnet som NOX og NOS-aktivitetsindikator.

1.3 BELGFRUKTER OG FABABØNNER

I mange land er bønner hovedkilden til et adekvat proteininntak. Å bytte ut kjøtt med bønner har de siste årene derfor blitt populært og relevant, blant annet på grunn av miljøhensyn som vannforbruk og redusert kjøttkonsum, og av økonomiske årsaker. Flere bønnearter er relativt robuste slik at de er greie å kultivere, men brukes ofte til dyrefôr til tross for at det også kan egne seg som mat for mennesker på grunn av deres næringsinnhold og helsebringende effekter. Bønner er belgvekster i familien *Fabaceae*, og felles egenskaper for disse er det relativt store innholdet av proteiner. I tillegg inneholder de komplekse karbohydrater som kostfiber og resistent stivelse, samt lave nivåer av lipider. Videre kan de være viktige kilder til mineraler og vitaminer, og inneholder også fenolforbindelser som kan fungere som antioksidanter (Martín-Babrejas, 2019). I tillegg til alle forbindelsene med positiv effekt inneholder bønner også ikke-næringsstoffer (tidligere kalt anti-næringsstoffer), som tanniner, oligosakkarider og alkaloider. Dette er stoffer som kan gi uheldige effekter da metaboliseringmuligheten av disse er lav, men også i stor grad kan fjernes gjennom tilberedelsesprosessen (Martín-Babrejas, 2019).

Fababønner med det latinske navnet *Fabaceae vicia*, har et proteininnhold på ca. 30% av tørrvekt (Gdala J., 1997).

INTRODUKSJON

1.3.1 Effekten av belgfrukter på inflammasjon

Helseeffekter av belgfrukter som kikerter, hvite og svarte bønner, og hvite og mørke kidneybønner har blitt undersøkt i ulike dyrestudier (Monk J. M. & A., 2017; Monk et al., 2017; Monk, Wu, Hutchinson, et al., 2018; Monk, Wu, McGillis, et al., 2018; Monk et al., 2015). Samtlige av disse studiene viste en positiv sammenheng mellom bønnekonsum og forbedret tarmhelse i C57BL/6-mus blant annet med ulcerøs kolitt. Den forbedrede tarmhelsen var blant annet assosiert med en gunstig påvirkning på mikrobiota i tarm, som økt mengde av slekten *Prevotella*, som er i Bacteroides-fylumet, i cøcum og kolon.

1.4 VÆSKESTRØMICYTOMETRI

Væskestrømcytometri, heretter kalt flowcytometri, er en teknikk som kan kvantifisere og skille celler basert på størrelse, kompleksitet og fenotype. Dette gjøres ved sende en lysstråle rett på en væskestråle med celler eller partikler og registrere lysspredningen i forhold til størrelse og kompleksitet. I eukaryote blir dette oftest kombinert med fluorescens ved å farge celler med spesifikke antistoffer koblet til fluorescerende molekyler og derved gi mye informasjon om både kvalitet og kvantitet av bestemte celletyper og deres fenotypiske egenskaper. De senere årene har det også blitt utviklet bedre optikk som har gjort det lettere å undersøke mindre celler som bakterier med flowcytometri, men lite tilfang av gode bakterielle markører og antistoffer gjør analyser av bakterier mer begrenset.

Vanligvis benyttes en eksitasjonskilde, som er en laser. Denne belyser et snitt av en væskestrøm av celleduspensjon og føringsvæske (*sheath fluid*). Når cellene passerer eksitasjonslysstrålen vil denne spre lyset fremover som såkalt lavvinkel lysspredning (*forward scatter*, heretter FSC) og til siden i form av høyvinkel lysspredning (*side scatter*, heretter SSC) som videre registreres av detektorer. I hvilken grad slik lysspredning forekommer er avhengig av intra- og ekstracellulær kompleksitet i tillegg til størrelse. Ofte regnes FSC som et mål for størrelse på partikkelen, mens SSC regnes som et resultat på cellens kompleksitet (Lea., 2002).

Detektorene for SSC registrerer også fluorescens. Dette utnyttes vanligvis ved å farge bestemte celletyper, for eksempel med antistoffer, eller farge universelle egenskaper som dobbelttrådig DNA. Kvantifisering av bakterier er i hovedsak basert på å farge bakterielt DNA med DNA-bindende fluorescerende molekyler som også derfor vil skille mellom uspesifikke partikler fra miljøet og bakteriene.

INTRODUKSJON

Ved cytometriske undersøkelser av prøver vil det bli dannet punktplot basert på en kombinasjon av FSC, SSC eller fluorescens. Disse vil ved bruk av ulike dataprogrammer omgjøres til konturplott. Ved undersøkelse av ulike prøver bør celletettheten i prøvene ikke være for stor da dette kan gjøre nøyaktig avlesning vanskelig. Videre bør cellene være som enkeltceller i suspensjonen da dette vil gi riktigere cytometrisk avlesning. Filtrering og god blanding eller vortexing av celsesuspensjonen vil kunne bidra til å øke andelen enkeltceller, og å fjerne cellekomplekser (Lambrecht, Schattenberg, Harms, & Mueller, 2018).

1.4.1 Flowcytometri av bakterier

De senere årene har nytten av flowcytometriske undersøkelser av mikrober blitt oppdaget. Dette er blant annet fordi flowcytometri har vist å være en tidseffektiv og økonomisk rimelig metode å studere utviklingen av bakterielle kulturer og samfunn på (Lambrecht et al., 2018). Kvantifisering av både renkulturer og blandede kulturer har blitt gjort med relativt stor suksess, og talletall basert på flowcytometri samsvarer godt med manuelle celletellinger (Fontana et al., 2017). Noen flowcytometere har mulighet til å måle celler per volum av prøve og kvantifisere bakterier ut fra det. Alternativt er det vanlig å bruke tellekuler med en bestemt størrelse og konsentrasjon (Khomtchouk et al., 2019). Vandeputte et al. (2017) viste at flowcytometrisk kvantifisering sammen med sekvenseringsinformasjon skapte et bedre bilde av mikrobiotaulikheter mellom pasienter med Crohns sykdom og friske individer.

1.5 16S rRNA-SEKVENSERING

Sekvensering er en teknikk som brukes for å kartlegge rekkefølgen på nukleotidene i DNA- og RNA-sekvenser. De senere årene har denne teknikken blitt forenklet og forbedret så mye at svært mange i dag har tatt den i bruk innen ulike områder.

De sekvenseringsteknikkene som i dag benyttes er basert på metoden Fredrick Sanger var med å utvikle på 1970-tallet (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977), som var starten på førstegenerasjons sekvensering (FGS). Sangersekvensering er en metode som går ut på selektiv innsetting av dideoksynukleotider (ddNTP'er) i den komplementære DNA-tråden under *in vitro* DNA-replikasjon. Dette var en dyr og tidkrevende metode, men i kombinasjon med den senere utviklingen av andre metoder som blant annet polymerasekjedereaksjon (PCR) og fluorescerende *in situ* hybridisering (FISH) ble det starten på en revolusjon av hvordan man studerte mikroorganismer (Escobar-Zepeda, Vera-Ponce de Leon, & Sanchez-Flores, 2015). Denne revolusjonen førte til utviklingen av andregenerasjons sekvenseringsmetoder, også kalt

INTRODUKSJON

neste generasjons sekvensering (NGS), som i motsetning til FGS gir både høyere og sikrere utbytte. Med NGS, for eksempel med Illuminasekvensering, kan millioner av DNA-molekyler parallellsekvenseres, selv om lengden på disse er begrenset til mellom 100-500 bp lange (Escobar-Zepeda et al., 2015). De siste årene har også tredje generasjons sekvenseringmetoder (TGS) blitt utviklet, som er enda raskere og kan kartlegge enda lenger fragmenter enn NGS-metodene. Et eksempel på en type TGS-metode er nanoporesekvensering som kan avlese rundt 500 sekvenser samtidig, men disse kan til gjengjeld ha en lengde på mellom 2-10 kb (Magi, Semeraro, Mingrino, Giusti, & D'Aurizio, 2018). Med utviklingen av NGS og TGS kan man i dag gjennomføre sekvensering relativt raskt og rimelig av store mengder data.

Illuminasekvensering er en sekvenseringsteknikk som går ut på solid-faseamplifisering kombinert med bro-amplifisering for å til slutt danne klynger av entrådete DNA-molekyler (van Dijk, Auger, Jaszczyszyn, & Thermes, 2014). Mange NGS-teknikker benytter «sekvensering-gjennom-syntese»-teknikk som kan observeres mens det pågår. Illuminas bro-amplifisering kalles dette nettopp fordi hver DNA-tråd må bøyes som en bro for å binde en nær primer (bundet til samme flate som den sekvensen som skal repliseres) som er viktig for å starte neste runde med polymerisering. Selve sekvenseringen gjøres med fluoriserende «reversibel-terminator» deoxy nukleosidtrifosfater (dNTP) som krever at fluoroforen som er bundet til den ene hydroxylposisjonen må kløyves av før neste dNTP kan festes på. Ved å benytte ulike fluoroforer på de ulike dNTP'ene vil lyssignalene som dannes underveis i polymeriseringen kunne avleses og skilles fra hverandre. Dessuten vil selve avlesningen vil være synkron (Heather & Chain).

Med dagens sekvenseringsteknologi kan blant annet kartlegging av organismesammensetning enkelt utføres i komplekse prøver eller miljøer. Dette kalles metagenomsekvensering. For å bestemme artssammensetning best mulig må det først velges en relativt universal markør som også har såpass store ulikheter at den kan benyttes til fylogenetisk klassifisering. Allerede på 1970-tallet foreslo Carl Woese å bruke de ribosomale enhetene som en slik universell markør (Fox, Magrum, Balch, Wolfe, & Woese, 1977), og i dag brukes ofte den lille ribosomale subenheten, 16S-rRNA, til klassifisering av bakterier. Ved bruk av 16S rRNA som molekylær markør kan slektskap bestemmes basert på prosentandel likhet i sekvensen. 16S rRNA-genet er et gen på omtrent 1500bp som består av 9 variable regioner, V1-V9, med høyt konserverte regioner mellom seg. Ved å undersøke sekvenslikheten pleier vanligvis operational taxonomic units (OTU'er) å kunne bestemmes. Når sekvenslikheten er på >97% i 16S rRNA-genet, regnes ofte OTU'en som samme art (Gentry, 2015; Stahl, 2015).

INTRODUKSJON

For å kunne bestemme fylogenetisk slektskap i komplekse prøver ved bruk av 16S rRNA-genet og Illuminasekvensering, må både steg med amplifisering av målområdet gjennomføres, i tillegg til kvalitative og kvantitative undersøkelser av prøvene underveis. Amplifiseringen av målområdet skjer i to omganger, første stegs PCR og indeks-PCR. Disse stegene utføres for å få store nok mengder av målgene til at de kan måles med sekvensering, og krever bestemte primere. Primerne som benyttes bestemmes basert på hva man er ute etter å se på, da noen er spesifikke for gitte arter, mens andre er mer generelle. Ved å benytte primerne som binder seg til de kjente konserverte sekvensene med variable områder mellom, så vil disse variable områdene transkriberes og kan videre sammenlignes med hverandre og med sekvensbiblioteker/databaser (Gentry, 2015).

1.6 HENSIKTEN MED PROSJEKTET

De fleste studiene som er gjort for å kartlegge effekter av diett på mikrobiotasammensetning har gjort dette i prøver fra kolon, cøcum og/eller avføring, og har hovedsakelig neglisjert tynntarm. De distale delene av tynntarm, som imidlertid er veldig interessante da de blant annet er hovedområdet for næringsopptak samtidig som bakterier og toksiner skal unngås, er det lite informasjon om. Særlig manglende er studier på mikrobiota fra ileum. Videre har tidligere forsøk vist en lavere bakteriekvantitet i tynntarm sammenlignet med cøcum og tykktarm, og en noe ulik mikrobiotasammensetning. I tidligere studier på normale mus har også ileum blitt observert som det området i tarmen som både har NOX1 og har høyest uttrykk av iNOS. Disse enzymene kan sammen produsere forløperne til den svært reaktive oksygen- og nitrogenforbindelsen peroksintritt, som trolig produseres i epitelcellene i ileum for å opprettholde homeostase. Til tross for kroppens arbeid for å opprettholde et stabilt miljø i tarmen, har diett vist å kunne påvirke dette. Blant annet er et kosthold rikt på fett og enkle karbohydrater ofte assosiert med livsstilssykdommer som diabetes og dysbiose i tarmen. Videre har bønner i dietten blitt antydnet å kunne redusere sannsynlighet for blant annet de overnevnte livsstilssykdommene, samt gi en gunstig mikrobiotasammensetning i tarm trolig som et resultat av blant annet fenol-forbindelser og kostfiber.

Siden hovedopptaket av næringsstoffer foregår i ileum, og peroksintritt har blitt vist i normalvektige mus at har høyest konsentrasjon der, var formålet med dette forsøket å undersøke effekten av NOX1 i C57BL/6-hannmus fôret på høyfettdiett og høyfettdiett med fababønnefraksjon. Videre var det også ønskelig å undersøke om tilstedeværelsen av

INTRODUKSJON

fababønner i dietten hadde en regulatorisk effekt på mikrobiotasammensetning og –kvantitet, samt om det hadde en antioksidanteffekt i tarmen i høyfettdiett-fôrede C57BL/6-hannmus med eller uten NOX1.

Mer spesifikt var målet å undersøke hva fravær av NOX1, gjennom bruk av villtypemus og NOX1-knockout mus, gjorde for ROS-mengde i tarm (ved bruk av optisk avbildning med L-012), den mikrobiotiske sammensetningen (målt med 16S rRNA- sekvensering) og bakteriekvantiteten (målt flowcytometrisk) ved konsum av høyfettdiett eller høyfettdiett med fababønnefraksjon.

Oppsummert var det fire hovedmål i dette prosjektet:

- Bestemme om høyfettdietten med eller uten fababønnefraksjon førte til vektøkning sammenlignet med villtypemus på standarddiett, samt om genotypen ga noen fenotypiske forskjeller
- Undersøke om ROS-signal fra mageregion ved bruk av L-012-probe ble påvirket av genotype og eller diett
- Undersøke om mikrobiotasammensetningen i ileum og cøcum påvirkes av genotypen og diett, da særlig om tegn til dysbiose-assosiert mikrobiota kunne sees
- Etablere om formalinfiksering og lagringstid hadde en effekt på kvantitet av celler i renkultur samt i ileale kymusprøver fra mus, for deretter å undersøke om bakteriekvantiteten i ileum ble påvirket av genotype og diett

2 MATERIAL OG METODE

Følgende metoder ble høsten 2019 og våren 2020 utført ved NMBU. Oversikt over programvarer, instrumenter og materialer er gitt i vedlegg A og B.

2.1 DYREFORSØK

Det ble gjennomført ett forsøk som inneholdt fire eksperimentelle grupper mus fôret med to ulike eksperimentelle dietter i enten villtypemus eller i mus som manglet NOX1-ekspresjon (NOX1 knockout mus). Forsøket pågikk i 15 uker. Underveis i forsøket, ble det parallelt gjennomført et innledende forsøk (delkapittel 2.4). Dyr hvor hensikten var å undersøke hvordan fikseringstid i formalin, og langtidslagring påvirket celletallet. Uttak av prøver (delkapittel 2.5 og 2.6) fra forsøksdyrene til flowcytometri (delkapittel 2.7) og sekvensering (delkapittel 2.8) ble gjennomført og analysert.

2.1.1 Dyr og dyrehold

I forsøket var det to eksperimentelle grupper med 22 hannmus i hver. Den ene gruppen besto av villtypemus (VT) og den andre gruppen besto av knockoutmus for NOX1-enzymet (NOX1ko). I tillegg ble 4 VT-mus tatt med som en kontrollgruppe. Alle musene var hannmus med C57BL/6J-bakgrunn. Villtypemusene ble innkjøpt fra The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), mens NOX1ko-mus i C57BL/6J-bakgrunn ble avlet frem ved NMBU gjennom avl etter innkjøp av homozygote avlspar fra Jackson Labs (innkjøpt i 2015). NOX1ko-musene var av typen global knockout, som innebærer at NOX1-genet var slått ut i alle organismens celler. På grunn av avlshensyn ble NOX1ko-musene delt inn i 3 ulike aldersgrupper. Ved innkjøp av VT-mus ble tilsvarende aldersgrupper bestilt opp slik at like mange dyr fra hver aldersgruppe var representert i begge forsøksgrupper.

Oppstalling av dyrene var under kontrollerte forhold, med temperatur på 25-27° C, luftfuktighet på 40-60% og lysforholdene var 12:12 timer dag/natt-syklus. Alle musene var oppstallet i samme burstativ av typen Innorack (Innovive, San Diego, CA), med to eller tre mus i hvert bur. Burene var individuelt ventilerte med bunnstrø, fôrskår og vannflasker. Musene hadde tilgang til vann og fôr *ad libitum*; standard fôr (Chow SDS [Special Diet Services], Witham, UK) før forsøksstart og deretter spesiallaget fôr underveis i forsøket. Burene var i tillegg utstyrt med hus med løpehjul, bitepinne og reirmateriale. Ved forsøksstart

METODE

ble løpehjulet fjernet for å redusere aktiviteten og fremme fedme. Musene ble inspisert hver dag.

2.1.2 Ethiske aspekter

På forhånd ble forsøket godkjent av mattilsynet (FOTS ID 21627). Forsøksoppsettet fulgte kravene og retningslinjene vedtatt av EU-kommisjonen for omsorg og behandling av laboratoriedyr.

2.1.3 NOX1ko-forsøk

De overordnede målene med forsøket var å undersøke om uttrykket av enzymet NOX1 ville ha en effekt på mikrobiotasammensetningen i musene, om fababønnefraksjon i dietten hadde noen positiv/negativ effekt på mikrobiotasammensetningen, og om Flowcytometri var en god teknikk for å se på ulikheter i mikrobiotasammensetning og kvantitet.

I forsøket ble musene delt inn i fire grupper basert på genotype: VT og NOX1ko, og på forsøksdiett: høyfett diett (HF) og høyfettdiett med fababønnefraksjon (FB). Informasjon om diettene kan finnes i delkapittel 2.2. Hver gruppe besto av 11 hannmus. Det ble også inkludert en kontrollgruppe mot slutten, 4 VT-hannmus føret med Chow SDS (SDS, UK). Musene levde på forsøksdietten i 15 uker, før terminering for ekstraksjon av prøver. De første tre ukene av forsøket ble bunnstrø med avføring fra alle burene blandet og tilbakeført til alle burene i et forsøk på å etablere en likere tarmmikrobiota mellom VT- og NOX1ko-musene. Førkonsum og vekt på musene ble ukentlig mål.

Underveis i forsøket ble musene barbert på magen og injisert intraperitonealt med L-012-probe for å se på ROS i tarmen. Informasjon om dette kan finnes i delkapittel 2.3. Videre ble det tatt ut blodprøver av musene to ganger i løpet av forsøket for å måle blodsukker/insulin ved faste. Dette ble gjort av Sissel Hulsund i sammenheng med hennes masterprosjekt. Alle andre prøveuttak ble gjort på termineringsdagen.

2.1.4 Innledende forsøk

Hensikten med det innledende forsøket var å undersøke om det var en tidssensitivitet rundt prøveuttaket av mikrobiota, fikseringstidslengde i formaldehyd (2%), og stor nedgang det ble i antall bakterier ved langtidslagring. Forsøket ble gjennomført på renkultur av *Echerichia coli*, og på ekstraherte ileumkumprøver fra to NOX1ko-hannmus. Mer informasjon om dette kommer i delkapittel 2.4.

2.2 TILLAGING AV FÔR

Fôret som skulle benyttes i løpet av forsøket var en høyfettdiett hvor 60% av energien (kcal) kommer fra fett, 24% av energien fra karbohydrater og de resterende 16% fra proteiner.

Halvparten av musene skulle få ren høyfettdiett (HF-diett) og den andre halvparten skulle få høyfettdiett iblandet fababønnefraksjon (FB-diett). Bønnefraksjonen ble laget fra bunn, mens de resterende ingrediensene ble bestilt fra Altromin i henhold til deres oppskrift på HF-diett.

2.2.1 Tillaging av bønnefraksjon

Et frysetørket pulver fra tørkede hele fababønner av typen Columbo, produsert på Vollebekk i Ås, ble tilberedt og blandet inn i musefôret i henhold til forsøk gjort av andre (Monk J. M. & A., 2017). Først ble bønnene lagt i destillert vann over natt ved romtemperatur (ratio ca. 1:3 av bønner og vann). De ble så kokt i bløtleggingsvannet til de var myke (40 min.) og videre homogenisert sammen med deler av bønnevannet til konsistensen var jevn og flytende.

Homogenatet ble overført til egne frysetørkekobler (1,5L) og oppbevart over natten i -80°C .

Frosset bønnehomogenat ble frysetørket med Heto DW6–85 DryWinner i opptil 4 døgn til pulverkonsistens var oppnådd. Pulveret ble videre homogenisert og siktet med vanlig kjøkkensikt for å sikre pulverkonsistens og fjerne større biter. Undersøkelse av næringsinnhold i bønnepulveret ble gjennomført av IHA (Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap v/ NMBU, Vedlegg ett eller annet). Bønnepulveret ble oppbevart i lufttette beholdere i romtemperatur frem til det ble benyttet i tillaging av FB-fôret.

2.2.2 Tillaging av spesialfôr

De to diettene, HF- og FB-diettene, ble laget ved å veie ut og blande alle ingrediensene i henhold til utregnede mengder (Tabell 1), for deretter å tilsette vann slik at deigen ble fast nok til å kunne forme til pellets. Disse ble formet til biter (2- 6 gr.) som var passende i størrelse til å bli liggende i fôrbeholderen i burene, samtidig som tilgangen for musene var god. Videre ble disse frosset ned (-80°C , minimum 8 timer) og frysetørket (minst 24t) og deretter oppbevart i -20°C .

METODE

Tabell 1: Ingredienser benyttet i tillagingen av høyfettdiett med og uten fababønnefraksjon og mengden benyttet av disse (vekt (g)). Utrekede verdier for energi (kcal) og prosentandelen (% kcal) av disse i 100g av dietten. Totalvekt (total (g)) og energi per kg også vist.

Ingredienser		Høyfettdiett med fababønnefraksjon			Høyfettdiett		
		Vekt (g)	kcal	% kcal	Vekt (g)	kcal	% kcal
Protein	Kasein	23	92	1,76	35	140	2,63
	Kollagen	77	308	5,88	120	480	9,03
Karbohydrat	Stivelse	60,8			125	500	9,4
	Sukrose	90	360	6,87	90	360	6,77
	Cellulose, BW200	0	0	0	34	0	0
Fløtepulver (FP)		300			300		
	FP fett	126	1134	21,64	126	1134	21,32
	FP protein	60	180	3,44	60	240	4,51
	FP monosakkarid	101,1	404,4	7,72	101,1	404,4	7,6
Fett	Lard	215	1935	36,93	220	1980	37,23
Mineraler	Mineral Mix	35		0	35		0
Vitaminer	Vitamin mix	20	80	1,53	20	80	1,5
Fababønnepulver (FB)		200			-	-	-
	FB stivelse	64,2	256,8	4,9	-	-	-
	FB protein	68	272	5,19	-	-	-
	FB fiber	32	64	1,22	-	-	-
	FB andre karbohydrater; mono-, di-, poly-)	33,8	135,2	2,58	-	-	-
	FB fett	2	18	0,34	-	-	-
Total (g)		1008	5239,4	100	966,1	5318,4	100
Per kg			5198			5505	

2.3 *IN VIVO*-AVBILDNING AV ROS/RNS I TARM

In vivo-avbildning av ROS ved hjelp av kjemiluminescens emittert fra musene ble utført med avbildningsinstrumentet IVIS Lumina II. Dette instrumentet kan detektere lav luminescens blant annet fra bioluminescerende og fotoluminiserende markører.

Den kjemiluminescerende proben/markøren L-012 (8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-*d*]-pyridazine-1,4-(2*H*,3*H*)dione natriumsalt) produsert av Wako er en såkalt ROS-probe som blir oksidert av visse typer reaktive oksygenforbindelser. Oksidasjonen fører til at L-012 blir eksitert for deretter å gå over til en ny grunntilstand med lavere energi. Energien som avgis er i form av fotoner som ved bruk av et følsomt kamera både kan kvantifiseres og visualiseres.

METODE

Lyssignalet fra L-012 er tidligere benyttet for å kartlegge mengde ROS produsert i tarmen. Fra tidligere forsøk (Kielland et al., 2009) er det kjent at denne proben blant annet reagerer med peroksinitritt (ONOO⁻), spesielt i distale ende av ileum, og gir målbar *in vivo* og *ex vivo* kjemiluminescens. Dette ble målt ved ulike tidspunkt gjennom *in vivo*-avbildning 1 dag før dietten ble implementert i tillegg til 6, 24 og 96 timer etter implementeringen for å undersøke om diettene førte til en rask effekt på ROS-nivåene. Deretter ble det gjennomført en ny avbildningsrunde etter 10 uker på dietten.

Prosessering av bildene ble gjort ved bruk av programmet Living Image.

2.3.1 Tillaging av L-012-probe

L-012-markør, heretter kalt L-012-probe, ble tilbered ved å løse 100mg konsentrert krystallform av L-012 (2,5mg/mL, 8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazine-1,4-(2H,3H) dione Sodium Salt) i 40 mL vann blandet med 350 mg NaCl i samsvar med oppskrift fra produsent. Den løste proben ble videre sterilfiltrert, før den ble oppbevart lystett i alikvoter på 1 mL og lagret ved -20° C.

2.3.2 Avbildningsprosedyre

Musene ble på forhånd barbert på ventral side og veid for å bestemme hvor mye probe som skulle injiseres. Videre ble musene injisert intraperitonealt med L-012 probe (ca. 10 mg/kg mus). Avbildning av musene skjedde 2-3 minutter etter injeksjon, med en eksponeringstid på 5 minutter. Musene var immobilisert med isofluran (2,5-3%) under injeksjon og avbildning. 3-4 mus ble avbildet sammen. Living Image software ble benyttet til dataanalyse.

2.4 INNLEDENDE FORSØK

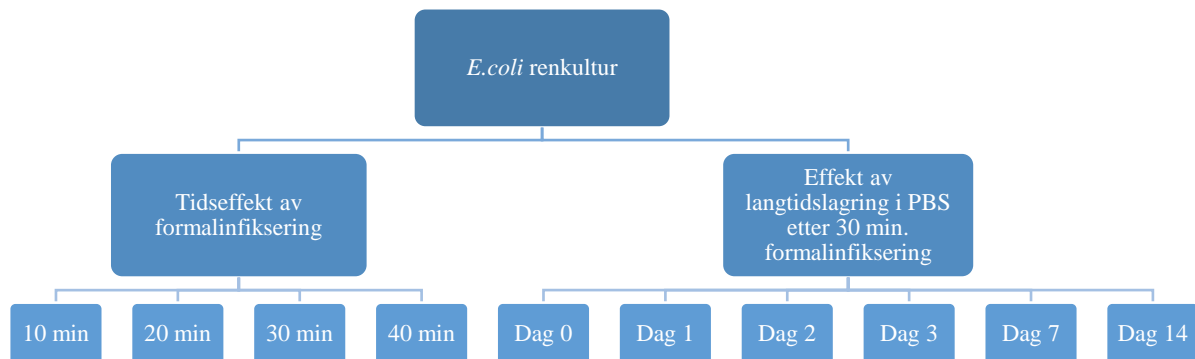
Det ble bestemt at et innledende forsøk skulle gjennomføres for å undersøke potensielt tidssensitive aspekter ved ekstraksjon og behandling av miljøprøver i hovedforsøket. Disse var tidseffekten av formalinfiksering på celletallet i prøven, og effekten av langtidslagring på kvantiteten av formalinfikserte celler. Prøvene som skulle undersøkes var *E. coli*-renkulturprøver i tillegg til ileumkymprøver fra to NOX1ko-hunnmus.

2.4.1 *E. coli*-renkultur

En over natt-kultur av *E. coli* ble benyttet for å undersøke effekten av fikseringstid i formalin og langtidslagring på celletallet (figur 1). Etter lett vorteksing av prøven ble det målt ut

METODE

aliquoter (1mL) til begge deler av forsøket. Alle aliquotene ble sentrifugert (20 min, 15° C, 3 200 x g) før supernatanten ble fjernet.



Figur 2.1: Skjematisk oversikt over metode for det forberedende forsøket på E.coli-renkultur.

Undersøkelse av henholdsvis tidseffekten av ulike formalinfiksering (2% formaldehyd i 10, 20, 30 og 40 minutter), og effekten av langtidslagring ved 4° C etter 30 minutter formalinfiksering (2% formaldehyd) målt samme dag (dag 0), dag 1, dag 2, dag 3, dag 7 og dag 14 etter fiksering.

2.4.2 Fiksering i formaldehyd (2%) til tidseffekten og langtidslagring

Fire aliquoter ble benyttet for å undersøke tidseffekten av formalinfiksering på celletall, og tre aliquoter ble benyttet for å undersøke langtidseffekten av lagring i PBS på celletall i renkulturprøvene. Etter sentrifugering og fjerning av supernatanten, ble nypreparert formalinløsning (2% formaldehyd i sterilfiltrert PBS, 1mL) tilført hver aliquot slik at cellepelletene ble resuspendert. De fire aliquotene til undersøkelse av formalinfikseringseffekten ble videre inkubert i henholdsvis 10, 20, 30 og 40 minutter før de ble sentrifugert (10 min, 15° C, 3 200 x g). Deretter ble supernatant fjernet og prøven resuspendert i sterilfiltrert PBS. Aliquotene til undersøkelse av effekten av langtidslagring ble inkubert med formalin i 30 minutter før sentrifugering (10 min, 15° C, 3 200 x g), fjerning av supernatanten og resuspensjon i PBS. Alle prøvene ble videre sentrifugert på nytt slik at supernatanten kunne fjernes før resuspensjon i ny, sterilfiltrert PBS (1 mL).

Hver prøve ble filtrert (40 µm) over i nye rør for å fjerne uløste cellekomplekser og filtrene ble skylt med PBS slik at prøvene ble fortynnet 1:1. De tre aliquotene til langtidslagring ble filtrert over i samme rør.

2.4.3 OD-måling, fortynning og farging før flowcytometri

De nå fem ulike prøvene (10 min., 20 min., 30 min., 40 min., og 30 min. til langtidslagring) ble målt OD₆₀₀ på ved bruk av SpectraMax M2. Ut fra dette ble det kalkulert og tillaget en 1

METODE

mL fortynning av hver prøve med PBS til OD₆₀₀ var ca. 0,035. Prøven til langtidslagring ble lagret kjølig (4° C) de neste ukene med uttak regelmessig (dag 1, 2, 3, 7, og 14). Videre ble 500 µL målt ut og overført til nytt rør. Denne mengden ble deretter tilsatt SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (3 µL, fortynnet til 100x konsentrat i DMSO), blandet godt og inkubert mørkt (15 min, romtemp.) i henhold til manual.

Det ble laget i stand tripletter av hver prøve for telling med flowcytometri, ved å måle ut 100 µL godt blandet tellekuleløsning og tilføre 20 µL SYBR Green-farget prøve til hver av dem. Disse ble blandet godt for undersøkelse med flowcytometri.

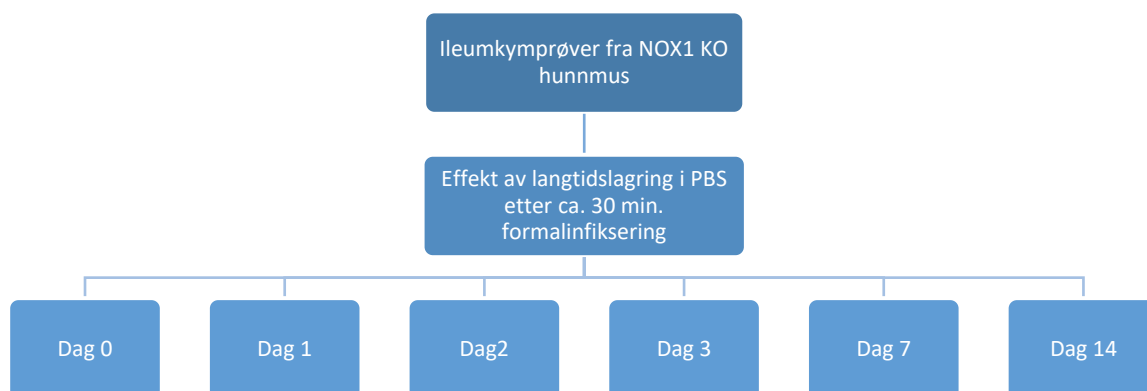
Den langtidslagrede prøven gjennomgikk samme behandling som nevnt overfor. Ved hvert uttak ble OD₆₀₀ målt, en fortynning basert på OD-målingen ble laget, og ut fra dette ble det farget en del med SYBR® Green I, og tripletter med tellekuler ble laget i stand.

For hver runde med flowcytometri som ble kjørt ble minst en ufarget prøve undersøkt, en farget prøve med kun bakterier, og tripplettene med fargede prøver. Dessuten ble det også kjørt ren tellekule-prøve og en runde med kun sterilfiltrert PBS.

2.4.4 Ekstraksjon av ileumkymusprøver i NOX1ko-hunnmus

Hunnmusene ble avlivet med nakkestrekk før de ble festet med nåler til en isoporplate dekket med desinfisert aluminiumfolie. Buken og bukhalen ble åpnet i to omganger ved bruk av sterilteknikk. Videre ble tarmene dissekert ut ved å kutte duodenum like under magesekken, og kolon like over rektum. Tarmene lagt på en aseptisk avkjølt plate, og det ble kuttet i overgangen ileum/cøcum. Videre ble ileum holdt fast med pinsett (ca. 6 cm fra kuttet), mens en steril, bøyd saks ble benyttet til å presse ut prøve fra distal del av ileum mot platen. Denne miljøprøven ble raskt overført til forveide rør med formalin (2% formaldehyd, 1 mL) i henhold til manual fra Lambrecht et al. (2018) og homogenisert så godt det lot seg gjøre før inkubasjon (minst 30 min, RT). Vekt av miljøprøven ble notert.

METODE



Figur 2.2: Skjematisk oversikt over metode og tidspunkt for flowcytometrisk kvantifisering av mikrobiota fra ileum i mus. Miljøprøvene fra to hunnmus ble undersøkt med flowcytometri etter formalinfiksering (2% formaldehyd, 30 min.) ved langtidslagring i 4 ° C. Dette ble gjort for å bestemme hurtigheten av nedgangen i antall bakterier.

2.4.5 Stabilisering og fiksering av bakterier til flowcytometri

Etter fiksering av prøvene i formalin (2% formaldehyd i PBS, 30 min., RT) ble de deretter behandlet på samme vis som renkulturprøvene (Delkapittel 2.4.1.1) med sentrifugering, kast av supernatant, vask med PBS, lagring i ny PBS før filtrering (40 µm). Skylling av filteret ble deretter gjort med steril PBS (3mL) slik at begge prøver ble fortynnet 3:1 i PBS. Denne førstegangsfortynningen ble underveis i forsøket oppbevart kjølig (4° C).

2.4.6 OD-måling, fortynning og farging før flowcytometri

For hver dag de fikserte prøvene skulle kjøres på flowcytometri ble OD₆₀₀ bestemt ved hjelp av SpectraMax M2 og basert på det kalkulert hvilket blandingsforhold av PBS og prøve som trengtes for å lage 1 mL med OD₆₀₀ = 0,04 for hver prøve. Videre ble det fra denne fortynningen laget et rør til å farge bakteriene med SYBR® Green I (6 µL/ mL prøve), før inkubasjon og tillaging av tripletter av prøven med tellekuler.

For hver runde med flowcytometri som ble kjørt ble minst en ufarget prøve undersøkt, i tillegg til den fargede prøven med kun bakterier, og triplettene med fargede prøver for hver mus.

2.5 INNHENTING AV BIOLOGISKE PRØVER VED TERMINERING

På termineringsdagen ble musene først veid før de ble injisert intraperitonealt med ZRF-cocktail (3,2mg Zolazepam, 3,2mg Tiletamin, 0,45mg Xylazine og 2,6µg Fentanyl per mL, injiserte 10µL/g mus) for å gi en dyp anestesi og analgesi. Videre ble det utført hjertepunktur

METODE

og 0,4 - 1 mL blod ble ekstrahert. For å forsikre om at musene var avlivet ble det deretter utført nakkestrekk før videre prøveuttak.

To eller tre mus fra hver av de fire forsøksgruppene ble terminert hver dag. Terminering og prøveuttak ble kun gjort i 1,5-2,5 timer av gangen før ekstraherte prøver ble behandlet eller lagret. Dette for å sikre at celletallet i prøvene ikke ble redusert før fiksering, og flowcytometri kunne gjennomføres relativt kort tid etter ekstraksjon. Kontrollgruppen med villtypemus på chowdiett ble alle terminert samme dag, en dag før forsøksgruppene.

Musene ble fiksert på en ren plate og buken ble åpnet ved bruk av sterilteknikk før tarmsystemet (fra duodenum rett etter magesekken, til nederst i kolon før rektum) kunne aseptisk dissekeres ut og overføres til en ren, desinfisert plate. Der ble prøver av tarminnhold (kym) fra både ileum og cøkum samlet.

2.5.1 Uttak av kymus fra ileum til flowcytometri og 16S-sekvensering

Kymus fra ileum ble samlet ved å klippe rett ved den ileocøkale ventilen, overgangen mellom ileum og cøkum, og presse ut innhold fra de nederste 5-6 cm av ileum. Dette ble overført til forveide rør med iskald, sterilfiltrert PBS (1 mL). Rørene ble oppbevart på is i maksimalt 2,5 timer for ikke å miste mikrobiell masse før videre behandling av bakteriene. Vekt av hver prøve ble bestemt før videre behandling.

Det ble også tatt ut skrapeprøver av epitellaget i ileum til mRNA-målinger og klippet ca. 1 cm. vevsbit fra ileum til sekvensering. Analysen av disse prøvene ble gjort av andre og blir ikke omtalt videre i denne oppgaven.

2.5.2 Ekstraksjon av cøkuminhold

Kym fra cøkum ble tatt ut ved først separere cøkum fra både ileum og kolon, for deretter å kutte i underkant av 1 cm fra overgangen til ileum og kolon. Sistnevnte ble gjort for å i hovedsak samle opp bakteriene på motsatt side fra den ileocøkale ventilen da dette er et område som er lett å identifisere for prøveuttak. Fra denne biten av cøkum ble det klemt ut prøve som ble overført til forveide rør med Stool Transport and Recovery buffer, S.T.A.R.-buffer (400 µL) for å stabilisere DNA ved lagring. Cøkumprøvene ble oppbevart ved -20° C frem til de skulle behandles til 16S rRNA-sekvensering.

2.5.3 Uttak av fekalpellet fra kolon

En eller to palleter fra omtrent midt i kolon ble også ekstrahert og fryst ned (-80° C). Disse ble ikke undersøkt videre på grunn av tidsmangel.

2.6 BEHANDLING AV KYMUSPRØVER FRA ILEUM

Etter overføring av ileuminholdet til rør med iskald PBS (Delkapittel 2.5.1) ble rørene veid og total vekt ble notert slik at kymusvekt kunne beregnes ved å subtrahere vekt av rør med bare PBS. Videre ble kymus løst opp til en nær homogen løsning i PBS, før halvparten (500 µL) ble overført til nytt rør. Alle prøvene ble videre sentrifugert (10 min, 10° C, 3 200 x g) slik at supernatanten kunne fjernes. Den ene parallellen av prøvene ble tilført S.T.A.R-buffer (250-350 µL avhengig av mengde prøve) og deretter lagret ved -20° C før videre behandling til sekvensering (Delkapittel 2.8). Den andre parallellen av prøvene ble resuspendert i nypreparert formalin (2% formaldehyd i sterilfiltrerte PBS) og inkubert i 30 minutter i romtemperatur før sentrifugering og fjerning av supernatant, vasking i PBS og videre resuspensjon i ny PBS (som beskrevet i Delkapittel 2.4.1.1). Formalinfikseringen skjedde innen 3 timer etter at prøvene var blitt ekstrahert fra ileum.

2.7 FLOWCYTOMETRI AV BAKTERIER I KYMUS FRA ILEUM

Flowcytometri av ileumkymprøvene ble gjennomført med CellStream™ Flow Cytometer. Dette ble benyttet for å kvantifisere antall bakterier i de ulike prøvene ved bruk av tellekuler.

2.7.1 Farging av bakterier og tillaging av prøver til flowcytometri

Bakterieprøvene som skulle undersøkes med flowcytometri ble filtrert (40µm) for å fjerne eventuelle mat- og cellekomplekser, før det ble fortynnet i PBS til OD₆₀₀ ca. var 0,035.

Deretter ble de farget med SYBR® Green I konsentrat (x100 000) som hadde blitt fortynnet (x100 konsentrat i DMSO). Det ble tilført 3µL/0,5mL prøve av SYBR® Green I. Prøvene ble videre blandet godt og inkubert mørkt (15 min., RT).

Etter farging av bakteriene ble det laget en parallell til kvantifisering bestående av tellekuler (100 µL) og SYBR® Green-farget prøve (20 µL) til hver av dem.

For hver prøve som skulle undersøkes ble det tillaget en ufarget bakterieprøve, en farget bakterieprøve og en parallell bestående av tellekuler samt 2 replikater av fargede bakterier fortynnet 5:1 med tellekuleløsning. Det ble også laget i stand blindprøver med kun sterilfiltrert PBS og kun tellekuleløsning.

METODE

2.7.2 Visualisering og kvantifisering av bakterier med CellStream™

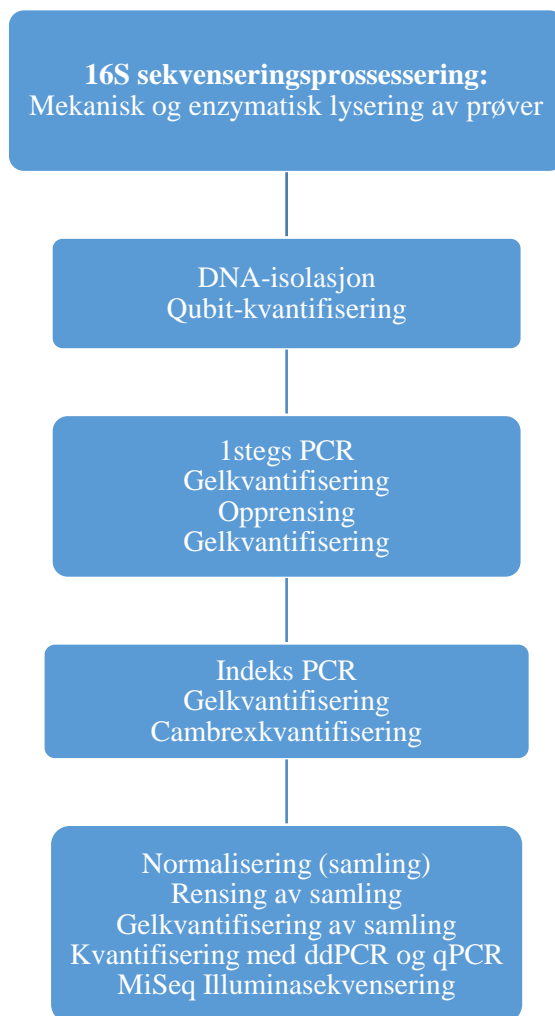
Visualisering og kvantifisering av bakterieprøvene ble gjennomført med væskestrømscytometeret CellStream™ Flow Cytometer samme dag som prøvene ble tatt ut. Instrumentet ble kalibrert før hver kjøring med CellStream™ Calibration Reagent i henhold til manual fra produsent. Videre ble sterilfiltrert avgasset vann benyttet som føringsvæske (*sheath fluid*). Prøvene ble undersøkt som enkeltprøver, og flytraten ble satt til treg. Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC) og laseren 488 ble benyttet.

Ved oppstart av prosjektet ble PBS undersøkt som negativ kontroll for å bestemme hvordan denne oppførte seg. Videre ble ren tellekuleløsning analysert flowcytometri for å markere området («gate») tellekulene havnet i. Tellekulene hadde en snittstørrelse på ca. 7,4 µm i diameter for lettere å skilles fra bakteriesamingene. Terskelverdien ble satt til 300 på både FSC og SSC da alle hendelser under denne verdien ble ansett som irrelevante hendelser. Hver runde med flowcytometri ble startet med analysering av ufargede bakterier og hvordan disse ble registrert i hver prøve. Videre ble de fargede bakteriene kjørt for å kunne skille mellom ufargede og fargede bakterier. Til slutt ble prøvene med tellekuler analysert og det ble registrert 50 000 - 100 000 hendelser, 50 000 hendelser innenfor området merket som bakterier, eller 1000 tellekuler for hver prøve i prøver hvor det lot seg gjøre. Utvelgelse av flowcytometrisk område er vist i Vedlegg D.

2.8 16S RRNA-SEKVENSERING AV BAKTERIER FRA ILEUM OG CØKUM

For å riktigere kunne bestemme hvilke arter som var til stede i ileumkymprøvene og i cøkumprøvene fra musene ble det gjennomført en 16S sekvensering på MiSeq fra Illumina, Inc. Sekvensen som var ønsket amplifisert opp var de variable regionene V3-V4 i 16S rRNA-genet (rDNA). Prosesseringen som ble utført på prøvene både fra ileum og cøkum er skjematisk fremstilt i figur 2.3.

METODE



Figur 2.3: Skjematisk oversikt over utførte steg fra lysing av prøver frem til MiSeq Illumina-sekvensering av 16S rRNA.

2.8.1 Isolering av DNA

Isolering av DNA ble gjort gjennom en kombinasjon av mekanisk og enzymatisk behandling for å oppnå lysing av flest mulig typer celler uavhengig av cellulær oppbygging.

2.8.1.1 Mekanisk lysing

Det ble overført 400 μL fra hver av ileumkym- og cøkumprøvene oppløst i STAR-buffer (Roche) til rør med tre typer syrevaskede glassperler (0.2g av $< 106 \mu\text{m}$, 0.2g av $425\text{-}600 \mu\text{m}$ og 2-4 perler på 2mm, alle fra Sigma Life Sciences). Videre ble rørene prosessert i en MagNA Lyser (6500 rpm, 20 sek x2) fra Roche før sentrifugering. Supernatant (50 μL) ble overført til en (KingFisher) 96-brønns plate og videre brukt i den enzymatiske lysingen.

2.8.1.2 Enzymatisk lysing

For å sikre lysing av celler som ikke ble lysert mekanisk ble lysesbuffer (50 μL) tilsvarende prøvevolumet, og proteinase (5 μL) blandet i hver prøve på platen før inkubering (55 ° C, 10 min.) i KingFisher Flex robot fra Thermo Fisher Scientific.

METODE

2.8.1.3 DNA-ekstraksjon

Da både mekanisk og enzymatisk lysering var gjort kunne DNA ekstraheres fra prøvene. Ekstraksjonen ble gjort med kittet Mag Midi (kitnr. 40420) i henhold til manualen ved bruk av KingFisher Flex roboten.

2.8.2 PCR

Det ble gjennomført en totrinns polymerasekjedereaksjon (PCR) for amplifisering og ID-merking av de ønskede DNA-sekvensene fra ileumkym- og cøcumprøvene som vist i figur 1. Disse er henholdsvis omtalt som førstestegs PCR og indeks PCR. Før sekvenseringen kunne gjennomføres ble det også utført to kvantitative former for PCR nemlig kvantitativ PCR (qPCR) og digital dråpe PCR (ddPCR) for mer nøyaktig å fastslå den sanne konsentrasjon av DNA ([DNA]) på det opparbeidede biblioteket. Dette er svært viktig for nøyaktigheten på sekvenseringsresultatene.

2.8.2.1 Førstestegs PCR

Førstestegs PCR ble gjennomført for å amplifisere opp det ønskede 16S rDNA-fragmentet, variabel region V3-V4 med en lengde på 466bp (Yu, Lee, Kim, & Hwang, 2005). Hver reaksjon besto av 2 µL av templat DNA (ukjent konsentrasjon), 1x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load, 0,2 µM forward/revers primere (PRK314F, PRK806R, sekvenser i vedlegg C) og nukleasefritt vann til et endelig volum på 25 µL. PCR-stegene var bygd opp av 15 minutter initialisering ved 95° C, deretter 25 sykluser med 95° C i 30 sekunder (denaturering), 55° C i 30 sekunder (annealing) og 72° C i 45 sekunder (elongering), før 7 minutter ved 72° C og endelig avkjøling ved 10° C. PCR-produktet ble videre undersøkt med gelelektroforese (1,5% agarose), og deretter rensset med Sera-Mag beads. Utvalgte prøver ble på nytt undersøkt med gelelektroforese for tilstedeværelse av templat- rDNA.

2.8.2.2 Indeks PCR

Indekseringen av de ulike prøvene ble gjennomført ved bruk av en kombinasjon av forward og revers primere slik at hver prøve fikk en unik kombinasjon av disse for å skille dem fra hverandre under selve sekvenseringen. Automatisert pipettering av indeksprimerne ble gjort med epMotion 5070. Hver reaksjon besto av 2 µL rensset DNA-templat, 1x FIREPol® Master Mix Ready to Load, 0,2 µM forward/revers indeksprimere (sekvenser i vedlegg C, designet av Mikrobiell Diversitet-gruppa ved NMBU) og nukleasefritt vann til et endelig volum på 25 µL. PCR-stegene som ble gjennomført var 5 minutter initialisering ved 95° C, deretter 10 sykluser med 95° C i 30 sekunder, 55° C i 1 minutt og 72° C i 45 sekunder, før 7 minutter

METODE

ved 72° C og endelig avkjøling ved 10° C. Fortsatt tilstedeværelse av PCR-produktet ble undersøkt med gel elektroforese (1,5% agarose i TAE-buffer) før en Cambrex-måling ble utført før tillaging av sekvenseringsbibliotek.

2.8.2.3 *Kvantitativ og digital dråpe PCR*

To ulike teknikker PCR ble utført av andre på det samlede biblioteket for å komme nærmest den sanne [DNA] for å øke nøyaktigheten av sekvenseringen. DNA konsentrasjonen funnet med qPCR ble gjort ved bruk av KAPA Library quantification kit for Illumina plattformer (KAPABiosystems) i henhold til manual fra produsent. ddPCR ble utført ved å lage to fortyningsserier fra 10^{-5} til 10^{-8} fortyning av det samlede biblioteket. Videre ble en mastermix bestående av 1x Super mix for EvaGreen, 0,2 μ M Illumina koloni forward/revers primere (primere som amplifiserer alle DNA fragmentene i biblioteket) og PCR-vann til et totalt volum på 20,7 μ L per reaksjon tillaget. Duplikater fra hver fortyningsrekke ble satt opp slik at det var 4 + 4 sanne duplikater av fortyningene 10^{-5} til 10^{-7} , mens det av fortyning 10^{-8} og negativ kontroll kun ble satt opp 2 + 2 sanne duplikater. Videre behandling av prøvene ble gjort i henhold til manual for QX200™ droplet generator og i henhold til manual for QX200 Droplet Reader and QuantaSoft Software instruksjonsmanual.

2.8.2.4 *Rensing av prøver og bibliotek*

Rensing av både enkeltprøver og bibliotek ble gjort ved bruk av Sera-Mag Speed beads, en teknologi basert på selektiv binding av DNA til paramagnetiske perler. Rensingen av prøvene ble gjort ved bruk av Sera-Mag Speed bead løsning (0,1%, 10 μ L) på 10 μ L av PCR-produktet. Blanding av Sera-Magperler og prøver ble inkubert (5 min., romtemp.), før disse ble plassert på magnet til supernatanten var klar. Videre ble supernatanten fjernet, og perlene ble vasket med etanol (80%, 100 μ L) i to omganger. Overflødig etanol ble fjernet og perlene ble lufttørket (15 min.) før 20 μ L PCR-vann ble tilsatt til hver prøve og inkubert (2 min., romtemp.). Ved bruk av magnet kunne 16 μ L supernatant inneholdende det rensede DNA'et bli overført til ny plate. Ved rensing av biblioteket 300 μ L renseset, og tilsvarende mye Sera-Mag løsning (0,1%, 300 μ L). I to omganger ble dette vasket med 200 μ L ethanol (80%), og 80 μ L PCR-vann ble tilført etter fjerning av etanol. Dette resulterte i ca. 70 μ L renseset bibliotek.

2.8.2.5 *Rensing av prøver og bibliotek*

Rensing av både enkeltprøver og bibliotek ble gjort ved bruk av Sera-Mag Speed beads en teknologi basert på selektiv binding av DNA til paramagnetiske perler. Rensingen av prøvene ble gjort ved bruk av Sera-Mag Speed bead løsning (0,1%, 10 μ L) på 10 μ L av PCR-

METODE

produktet. Blanding av Sera-Magperler og prøver ble inkubert (5 min., romtemp.), før disse ble plassert på magnet til supernatanten var klar. Videre ble supernatanten fjernet, og perlene ble vasket med etanol (80%, 100 µL) i to omganger. Overflødig etanol ble fjernet og perlene ble lufttørket (15 min.) før 20 µL PCR-vann ble tilsatt til hver prøve og inkubert (2 min., romtemp.). Ved bruk av magnet kunne 16 µL supernatant inneholdende det rensede DNA'et bli overført til ny plate. Ved rensing av biblioteket 300 µL renses, og tilsvarende mye Sera-Mag løsning (0,1%, 300 µL). I to omganger ble dette vasket med 200 µL ethanol (80%), og 80 µL PCR-vann ble tilført etter fjerning av etanol. Dette resulterte i ca. 70 µL renses bibliotek.

2.8.3 Kvantitative og kvalitative metoder

For å sikre at kvaliteten på prøvene ble opprettholdt gjennom prosesseringen ble tilstedeværelsen av DNA undersøkt og kvantifisert både med agarosegelelektroforese og Qubit® Fluorometer - målinger. Etter at biblioteket ble samlet og renses ble DNA-konsentrasjon bestemt basert på gjennomføring av agarosegel, Qubit-måling, real-time PCR (qPCR) og digital droplet PCR (ddPCR) da ingen kvantifiseringsteknikk er perfekt. Disse kvantifiseringsstegene av det samlede biblioteket ble gjennomført av andre.

2.8.3.1 Kvalitative undersøkelser med agarosegelelektroforese

For å bekrefte at det var DNA-sekvenser tilstede i prøvene med riktig lengde underveis i prøveprosesseringen ble prøvene undersøkt ved agarosegelelektroforese etter hver runde med PCR og rensing. Agarosegelen ble tillaget ved å løse opp agarose (1,5%, i TAE-buffer 1x), og PeqGREEN farge ble tilført (40 µL/L gel). Videre ble 5 µL PCR produkt, eller renses prøve (farget med 1 µL Loading Dye per 5 µL prøve), applisert i hver brønn, eller 4 µL DNA ladder (100 bp DNA Ladder Ready to Load). Kjøring av gelen ble gjort ved 80V, 25 min. Ved undersøkelse av renses produkt ble DNA farget med Loading dye (1 µL/ 5 µL prøve). Videre ble DNA-båndene visualisert og sammenlignet med de kjente lengdene til 100 bp DNA Ladder Ready to Load.

2.8.3.2 Konsentrasjonsbestemmelser av DNA

Konsentrasjonsbestemmelse underveis i bibliotekstillagingen ble gjennomført ved bruk av Quant-iT™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit. Arbeidsløsningen (Quant-iT™ Working Solution) ble tillaget fra Quant-iT™ reagent (1 µL) og Quant-iT™ buffer (199 µL). Før måling av enkeltprøver, ble tillagde standarder (190 µL arbeidsløsning til 10 µL standard) målt for å kalibrere Qubit® Fluorometer. Arbeidsløsningen ble brukt i henhold til produsentens manual til målingen av prøver (198 µL arbeidsløsning til 2 µL) som

METODE

enkeltprøver eller i alle prøvene samtidig ved bruk av Cambrex – FLX 800 CSE.

Fluorescenssignalet målt med Cambrex ble omgjort til konsentrasjon ved å velge ut femten prøver med et bredt spekter av fluorescenssignal. Etter å ha kalibrert Qubit® Fluorometer med kjente standarder, ble konsentrasjonen av de utvalgte prøvene målt og DNA-konsentrasjonen ble bestemt. Dermed kunne det til settes opp en standardkurve for å bestemme konsentrasjonen i alle prøvene basert på fluorescenssignalet registrert med Cambrex. Basert på disse utregningene kunne biblioteket tillages.

2.8.4 Tillaging av bibliotek

Ved samling av biblioteket måtte mengde av hver prøve bestemmes basert på konsentrasjonen av DNA i den respektive prøven. Dette ble gjort basert på den målte fluorescensen og utregnede konsentrasjonen for at biblioteket som ble tillaget skulle være normalisert. Etter at mengde av hver prøve ble bestemt, ble det normaliserte biblioteket tillaget ved bruk av Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation i henhold til produsentens manual.

2.9 DATAANALYSE

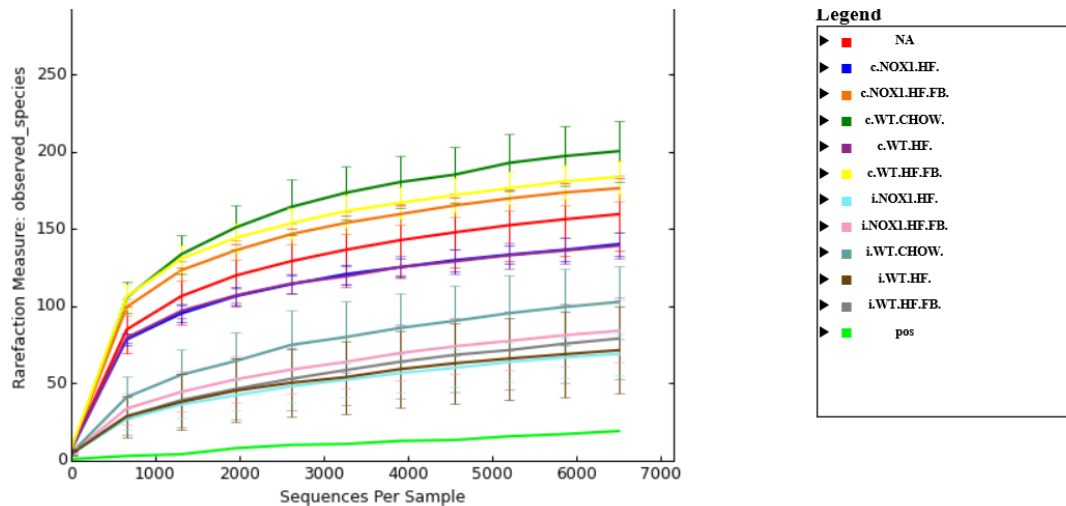
2.9.1 QIIME

Ved analyse av 16S-sekvenseringsdata med MiSeq ble samlingen, *clustering*, bestemt å være 681K/mm². Det ble satt en grense i QIIME™ på 6500 som var det antallet sekvenser, *rarefraction*, som ble tilfeldig valgt ut fra hver prøve for å analysere den relative sammensetningen av bakterier i hver prøve. Videre ble det satt en grense på 97% sekvenslikhet for unike OTU'er i prøvene. All behandling i QIIME™ ble gjort av andre grunnet korona-pandemien.

For å undersøke om majoriteten av unike OTU'er var blitt identifisert fra 6500 sekvenser, ble PD Whole Tree-dataene fra QIIME undersøkt. Disse dataene er vist i figur 2.4, og antyder en utflating av antall unike OTU'er som tyder på at majoriteten av disse har blitt identifisert og at det derfor er greit å kun analysere 6500 sekvenser.

Videre statistiske analyser ble gjort på L2 – fylumnivå data, L6 – genusnivådata samt antall unike OTU'er funnet med 97% sekvenslikhet.

METODE



Figur 2.4: Observerte antall unike OTU'er sortert ut fra prøvetype ileum eller cøcum, samt genotype og diett. PD Whole Tree- data fra QIIME antyder at antallet unike OTU'er identifisert ved en rarefaction på 6500 sekvenser nærmer seg en utflating. Modifisert figur fra QIIME-analyser. Forklaring: NA = ikke relevante prøver; c = cøcumprøver; i = ileumkymprøver; WT = villtype; NOX1 = NOX1ko-mus; HF = høyfettdiett; HF.FB = høyfettdiett med fababønner; pos = positiv kontroll.

2.9.2 Flowcytometridata

Bestemmelse av bakteriekvantiitet fra ileumkymprøvene ble gjort ved bruk av Cell StreamTM Analysis 1.2.1 (EDM Millipore Corporation, Darmstadt, Tyskland). Dette programmet ble brukt til å justere og definere området for tellekuler og området for bakterier i alle prøvene (forklart i Vedlegg C). Ved bruk av oppsamlet data om vekt av prøvemengde, fortynningsgrad av prøven i PBS, antall celler registrert samt antall tellekuler registrert og informasjon om konsentrasjonen av tellekuler i tellekuleløsningen kunne antall celler per gram ileumkym for hver mus kalkuleres. Dette ble gjort i Excel (Microsoft Office Professional).

2.9.3 Statistisk dataanalyse

Statistisk analyser ble hovedsakelig utført i GraphPad Prism 8, samt SPSS Statistics.

Statistisk modeller benyttet er spesifisert i der det er relevant i resultatdelen. I hvert tilfelle ble den statistiske modellen valgt ut basert på hva som passet dataene og hvor godt dataene møtte kriteriene for testene. Signifikansnivå ble satt til $p < 0,05$, og er et mål på sannsynligheten for å gjøre observasjonen man har gjort dersom alle antagelsene er oppfylt for den benyttede statistiske modellen. Dataene er vist som gjennomsnitt \pm SEM der det passer. De fleste dataene var ikke normalfordelte og ble derfor sammenlignet med uparametriske tester. Normalfordeling ble målt med D'Agostino Pearson.

METODE

2.9.4 LEfSe-analyse

LEfSe, som står for Linear Diskriminant Analyse, forkortet LDA, Effekt Størrelse, er en algoritme som identifiserer biologisk relevant informasjon som skiller to eller flere grupper fra hverandre basert på genetiske data (Segata et al., 2011). Den biologiske relevante informasjonen kan blant annet være gener eller taksa (arter, slekter familier etc.). Store biologiske datasett blir sammenlignet gjennom den uparametriske testen Kruskal-Wallis for å finne taxa som har en signifikant ulik artsrikhet sammenlignet med den eller de andre gruppene. Videre blir dataene analysert for om denne ulikheten stemmer for hele gruppen, som måles ved bruk av den parvise Wilcoxon rank- sum test. Til slutt benyttes LDA for å estimere effektstørrelsen den biologisk relevante informasjonen har, samt å utføre en dimensjonsreduksjon viss ønskelig.

I dette prosjektet ble kun første del av LEfSe benyttet, altså utvelgelse av biologisk relevant data ved bruk av Kruskal-Wallis og parvis Wilcoxon rank- sum test. Dette ble gjort på fylumnivå data fra ileum og cøcum, samt på slektsnivå data fra ileum. Datasettene som ble analysert hadde kun ett nivå, altså ble skilt basert på genotype, diett eller vev prøvene ble tatt ut fra.

3 RESULTATER

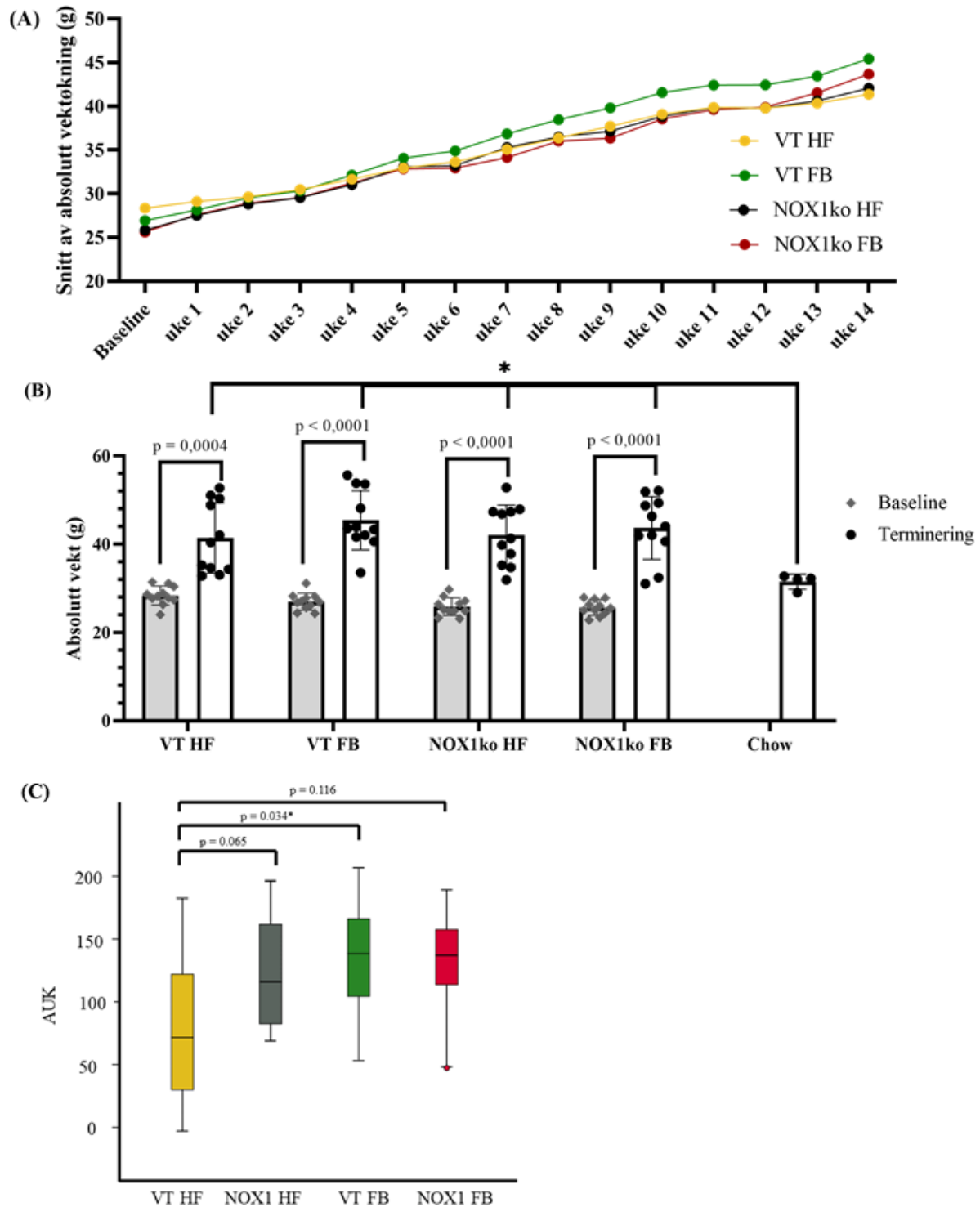
3.1 EFFEKTEN AV DIETT OG GENOTYPE PÅ VEKT OG ROS-PRODUKSJON I TARM

I en tidligere studie gjort av Matziouridou et al. (2018) på normalvektige mus føret med standarddiett, heretter kalt Chowdiett ble det funnet at NOX1, sammen med iNOS, bidrar til å produsere ROS som opprettholder homeostase i tarmmikrobiota i ileum. I dette forsøket ble en høyfettdiett med og uten fababønner føret til C57BL/6 hannmus i 14 uker for å undersøke rollen til NOX1.

3.1.1 Høyfettdiett med eller uten fababønner førte til vektøkning

For å bekrefte om dietten førte til overvekt ble musene veid ukentlig fra forsøksstart til og med uke 14. Ved forsøksstart veide musene i de ulike forsøksgruppene i gjennomsnitt mellom 25-30 gram, mens de etter 14 uker hadde økt snittvekten til 40-45 gram (figur 3.1a). Ved å sammenligne vekten ved forsøksstat og -slutt innad i gruppene ble det funnet signifikant vektøkning i alle fire forsøksgruppene (figur 3.1b). Villtypemusene på standarddiett og med samme alder ble ikke veid underveis, men hadde etter 14 uker en signifikant lavere vekt enn forsøksgruppene, analysert med den ikke-parametriske Mann-Whitney-testen (figur 3.1b). For å undersøke den kumulative endringen i vekt innad i hver forsøksgruppe, ble arealet under kurven (Arzumanian et al.) for hver mus kalkulert (figur 3.4c), og likheten mellom de fire forsøksgruppene ble analysert med Kruskal-Wallis-testen ($p = 0,134$). Da det kunne se ut til at den ene forsøksgruppen, VT med HF-diett, hadde en noe lavere vektutvikling enn de andre gruppene, og p -verdien til tross for å ikke være signifikant, var relativt lav, ble det gjort en *ad hoc* Mann-Whitney-test mellom denne gruppen og de andre tre. Dette resulterte i tre relativt lave p -verdier: $p = 0,065$, $p = 0,034$ og $p = 0,116$ for sammenligninger mellom henholdsvis VT HF og NOX1ko HF, VT FB, og NOX1ko FB som vist i figur 3.1c. Oppsummert fører HF dietten til en signifikant vektøkning i løpet av de 14 ukene, og alle forsøksgruppene med HF-diett har en signifikant høyere vekt enn mus føret med lavfett Chow. Videre er det en trend til at fravær av NOX1 fører til en større relativ vektøkning enn villtypemus på en ren HF-diett. Til slutt kan det synes som om Fababønner i HF-dietten bidrar til noe økt vektutvikling.

RESULTAT



Figur 3.1: Gjennomsnittlig vektøkning i forsøksgruppene fra forsøksstart (baseline) til terminering av musene i uke 14. To genotyper (VT og NOX1ko) og to dietter (HF og FB) ble brukt. Både NOX1ko-musene og villtypemusene hadde en jevn vektøkning gjennom forsøket. (a) Snittvekten i gruppene fra uke til uke, med en startvekt på 25-30 gram og et termineringsvektsnitt på mellom 40-45 gram. (b) Den absolutte vektøkningen i de fire forsøksgruppene fra baseline til termineringsdagen, og den avsluttende vekten for VT-musene på chowdiett. (c) Gjennomsnittlige kumulativ vektøkningen for hver forsøksgruppe. (b) Signifikans mellom baseline og termineringsvekten i hver forsøksgruppe ble kalkulert med parett-test og tilhørende p-verdier var alle signifikante. Termineringsvekt mellom forsøksgruppene og Chowdiett-gruppen ble sammenlignet med Mann-Whitney-test og alle sammenligningene hadde signifikant p-verdi: VT HF p = 0,0015; VT FB p < 0,0015; NOX1ko p < 0,0095; NOX1ko FB p < 0,0176. (c) Forskjell mellom total vektøkning mellom gruppene målt med Kruskal-Wallis-testen (p = 0,134), samt ad hoc Mann-Whitney test mellom VT HF og de andre tre gruppene. N = 11 dyr i hver forsøksgruppe, og n = 4 dyr i chowdiett-gruppen.

RESULTAT

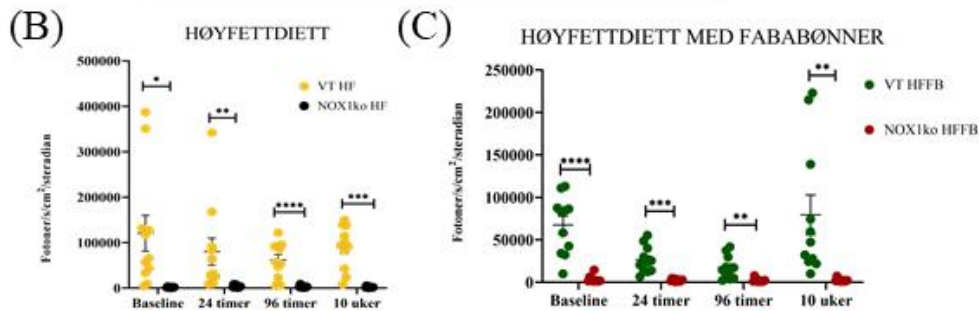
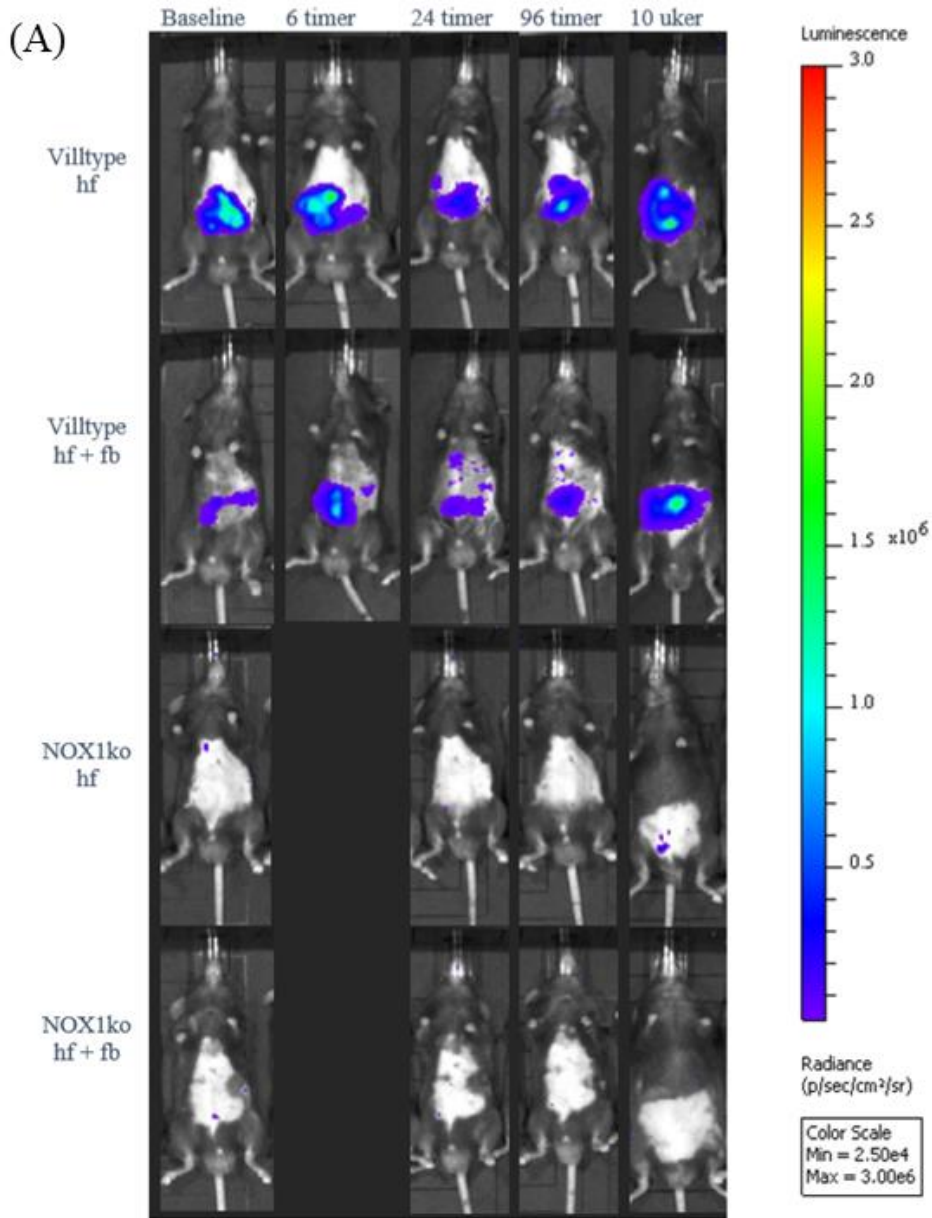
3.1.2 L-012 signal fra mageregion forsvinner i NOX1-knockoutmus

Tidligere studier har vist at den kjemiluminescerende proben L-012 kan benyttes til *in vivo*-avbildning av ROS/RNS og at den er særlig følsom for tilstedeværelse av peroksintritt (Kielland et al., 2009; Matziouridou et al., 2018). NOX1 er høyt uttrykt i epitelceller både i tykktarm og ileum. Siden NOX1 lager superoksid anion, vil det potensielt dannes peroksintritt når superoksid reagerer med nitrogenoksid (NO) fra iNOS som er høyt uttrykt i epitelceller i ileum. Hypotesen var da at fravær av NOX1 (NOX1ko) vil føre til drastisk reduksjon i lyssignalet sammenliknet med villtypemusene.

Som vist i figur 3.2a var det et gjennomgående kraftig redusert L-012-mediert signal i NOX1ko-musenes mageregion i forhold til i villtypemusene. Dette viser at ROS/RNS-mediert L-012-signal er tilnærmet helt avhengig av NOX1, og fravær av lys gjaldt i begge NOX1ko-gruppene vist både før og etter start av forsøket. Videre ble det undersøkt om lyssignalet i NOX1ko-musene ble påvirket av diett. Det ble ikke funnet noen forskjeller mellom de to diettgruppene ved måling ved baseline og uke 10 i forsøket ($p=0.9$, uke 14). Med andre ord var effekten av NOX1-fraværet på L-012-signal uavhengig av hvilken diett musene fikk.

Fra figur 3.2b og 3.2c kan det observeres signifikant forskjell mellom signal fra VT-mus og NOX1ko-mus basert på Mann-Whitney-analyser.

RESULTAT



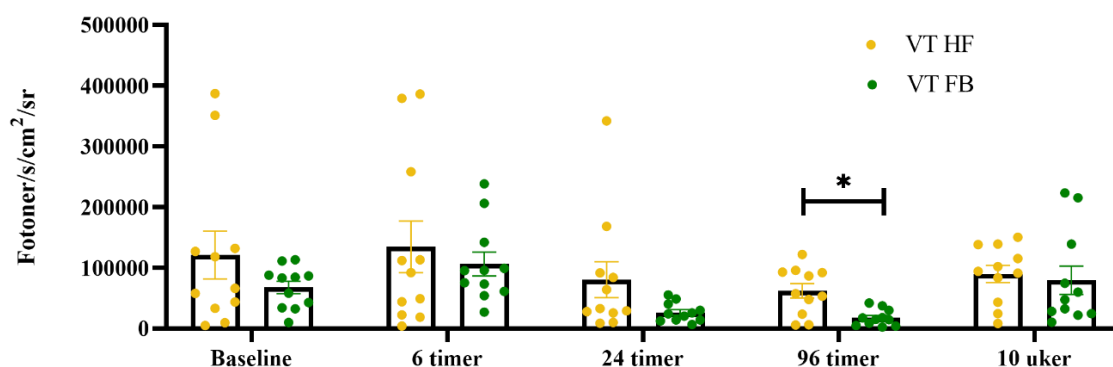
Figur 3.2: Representative in vivo-abildninger fra de fire forsøksgruppene ved baseline, og ved 6, 24 og 96 timer etter forsøksstart, samt ved 10 uker etter forsøksstart.

(a) Villtypemusene ble avbildet ved alle de valgte tidspunktene, mens NOX1ko-musene kun ble avbildet ved fire av tidspunktene. Mengden emittert lys ble målt i fotoner/ sekund/ cm²/ steradianer. (b) Punktdiagram av alle in vivo-målingene gjort av forsøksdyrene på høyfettdiett før forsøksstart, 24 og 96 timer inn i forsøket samt etter 10 uker på forsøksdietten. (c) Punktdiagram av alle in vivo-målingene av dyrene på høyfettdiett med fababønner før forsøksstart, 24 og 96 timer inn i forsøket samt etter 10 uker på forsøksdietten. (b,c) Analyser gjort med Mann-Whitney-test. P-verdien mellom målingene er vist med en eller flere *.

RESULTAT

3.1.3 Fababønner i høyfettdiett hos villtypemus har liten effekt på ROS/RNS-signalet. Tidligere studier antyder en antiinflammatorisk effekt i tarmen ved konsum av kikerter, hvite bønner og svarte bønner (Monk J. M. & A., 2017; Monk et al., 2017; Monk, Wu, Hutchinson, et al., 2018; Monk, Wu, McGillis, et al., 2018; Monk et al., 2015). Siden disse belgfruktene inneholder polyfenoler som kan virke som antioksidanter, ble det testet om fababønnefraksjonen ville påvirke mengden av ROS/RNS via en antioksidanteffekt.

Lyssignalet generert av L-012 ble derfor sammenliknet mellom villtypemusene som enten ble føret med høyfettdiett alene eller høyfettdiett med fababønnefraksjon. Dyrene ble fulgt tett de første fire dagene for å måle den dynamiske utviklingen i lyssignal etter introduksjon av høyfettdiett med eller uten fababønner til musene. Som figur 3.6 viser, går lyssignalet i begge gruppene ned i løpet av de fire første dagene (96 timer; VT HF $p=0.13$, VT FB $p=0.0002$). Nedgangen er størst i VT FB gruppen, og er signifikant forskjellig i forhold til nedgang sett i HF-gruppen når endringen fra baselinenivået er vurdert ($p=0.04$). Med den ikke-parametriske Mann-Whitney analysen av hvert måletidspunkt ble det kun funnet forskjell mellom målingene ved 96 timers tidspunktet (figur 3.3). Lyssignalet generert etter 10 uker på forsøksdietten var på samme nivå som etter 24 timer på dietten for VT mus på HF-diett, og tilnærmet tilbake på baseline-nivået for VT på FB-diett.



Figur 3.3: Emitterte lyssignalet fra L-012-probe i villtypemus på HF- og FB-diett ved ulike måletidspunkt. Signifikant forskjell ble sett i lyssignal i VT-mus FB sammenlignet med VT HF. Signifikansen ble funnet fra ratioen mellom baselinemålingen og 96 timers-målingen i de to gruppene. Mann-Whitney-test brukt for bestemme signifikans. P-verdi = 0,04 vist ved *.

Oppsummert ble det kun sett signifikant forskjell mellom lyssignalene fra L-012-proben mellom baseline og 96-timersmålingen.

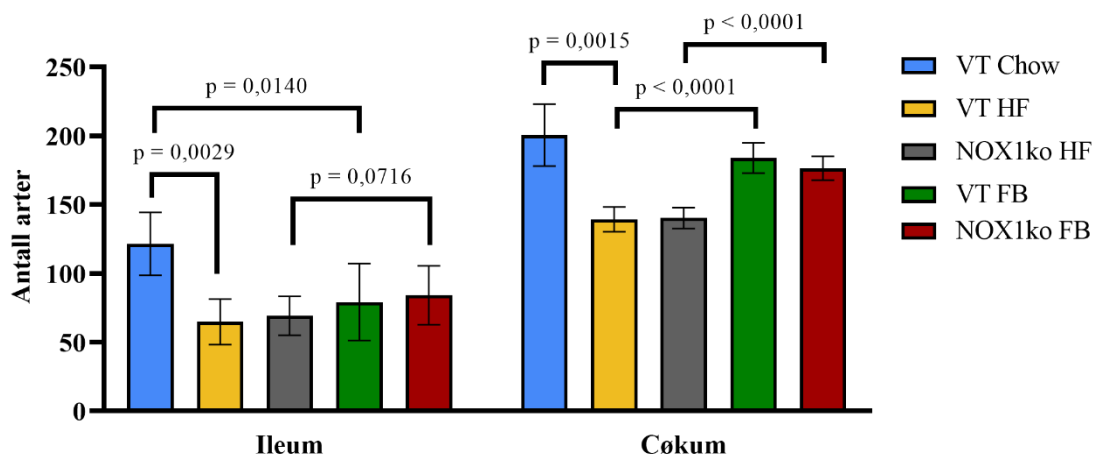
RESULTAT

3.2 EFFEKT AV GENOTYPE OG DIETT PÅ SAMMENSETNINGEN AV MIKROBIOTA I ILEUM OG CØKUM

3.2.1 16S sekvensering av mikrobiota i ileum og cøkum viser ulikt artsmangfold

Studier på tarmmikrobiota viser, ikke overraskende, at det er forskjell mellom ileum og cøkum i både antall arter og sammensetning (Matziouridou et al., 2018). Det ble høstet bakterieprøver fra både ileum og cøkum og utført en 16SrRNA-sekvensering. De opparbeidede dataene støtter at antall OTU'er var betydelig høyere i cøkum enn i ileum (figur 3.4-3.5).

Basert på 16S-sekvenseringsdata i QIIME ble det beregnet gjennomsnitt av antall unike OTU'er (med 97% sekvenslikhet) til stede i hver prøve, slik at forsøksgruppegjennomsnitt kunne finnes. Videre ble gruppesnittene sammenlignet innad i vevet de kom fra, og gjennom Mann-Whitney-analyser ble det sett tendenser til at genotype og diett spiller en rolle for artsdiversiteten i ileum. I cøkum var det derimot en tydelig effekt av diett på artsdiversitet (figur 3.4).



Figur 3.4: Observerte antall unike OTU'er fra 16S-sekvensering av kymus fra ileum og cökum i viltype- og NOX1ko-mus.

Det ble funnet markant høyere artsdiversitet i cökum sammenlignet med ileum. Færrest antall ulike arter kan observeres fra den rene høyfettdietten uavhengig av genotype. I både ileum og cökum ble det funnet signifikante p-verdier ved sammenligning av HF- og FB-diett i NOX1ko-mus. For VT-mus ble det kun funnet signifikant p-verdi ved sammenligning av diettene i cökum. VT-mus på chowdiett hadde høyest alfadiversitet i hver sin gruppe (ileum og cökum).

Som figur 3.4 viser, er det i gjennomsnitt en dobling i antall arter fra ileum til cökum i alle fire forsøksgruppene. Chowdiettgruppen har også en økning, men er noe lavere enn i mus på HF-diett. I både ileum- og cökum-prøvene var antall arter i mus føret på chowdiett høyere enn i de andre diettene. Antall arter i cökum fra mus føret med Fababønner var også signifikant høyere enn i mus føret med ren HF-diett. I ileum er derimot effekten av

RESULTAT

fababønner kun marginalt forskjellig fra den rene HF-dietten. Hverken i ileum eller i cøcum har fravær av NOX1 noen effekt på artsrikdom.

Oppsummert var antallet unike OTU'er signifikant høyere i cøcum sammenlignet med ileum. Som ventet, er det større artsmangfold i chow-fôrede mus sammenlignet med HF-fôrede mus. Fababønner fører til økt artsantall i cøcum sammenlignet med den rene HF-dietten, mens i ileum er denne effekten mye svakere. Genotype hadde ingen effekt på artsrikdom hverken i ileum eller i cøcum.

3.2.2 Sammenligninger i mikrobiotasammensetning i ileum og cøcum som effekt av NOX1 og diett ved bruk av LEfSe

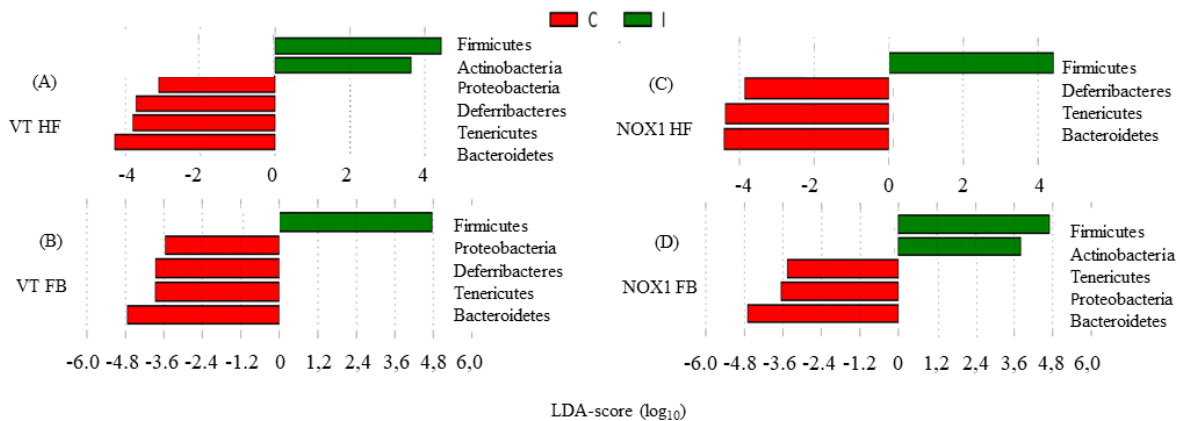
For å undersøke om diett eller genotype kunne føre til endring i mikrobiotasammensetningen ble sekvenseringsdataene analysert med LEfSe. LEfSe er et verktøy som kan brukes til å forklare hva som skiller mikrobielle samfunn Dette gjøres gjennom å finne for eksempel organismer eller gener som gjennomgående skiller et samfunn fra et annet.

Fordi tidligere studier (Matziouridou et al., 2018) har antydnet at NOX1 bidrar til å opprettholde homeostase i ileum ved å hindre kolonisering av bakterier fra cøcum og tykktarm, var hypotesen at mikrobiotasammensetningen i NOX1ko-musene ville være likere mellom ileum og cøcum enn i villtypemusene.

3.2.2.1 *Cøcum har gjennomgåendende større mangfold og økt relativ sammensetning av fyla sammenlignet med ileum, og både genotype og diett har en signifikant effekt på fylumsammensetning*

LEfSe- analyser av sekvenseringsdataene på fylumnivå viste at det var fire fyla (Tenericutes, Deferribacteres, Proteobacteria og Bacteriodetes) som var høyere i cøcum i villtypemus sammenlignet med ileum (figur 3.5). Overlappende for begge dietter var oppregulering av Tenericutes og Bacteriodetes i cøcum, mens særegent for HF-dietten var Deferribacteres (figur 3.5a), og i FB-dietten var det Proteobacteria (figur 3.5b).

RESULTAT



Figur 3.5: Forskjeller i fylumsammensetning i VT- og NOX1ko-mus mellom ileum og cøkum.

VT- og NOX1ko-mus ble føret med (a,c) høyfettdiett eller (b,d) høyfettdiett med fababønnefraksjon. Modifisert figur fra LEfSe.

I villtypemusene føret med HF-diett ble det observert to fyla, Firmicutes og Actinobacteria som var oppregulert i ileum sammenlignet med cøkum (figur 3.5a), mens det i FB-dietten kun ble sett oppregulering av Firmicutes (figur 3.5b). Det kunne også observeres høyere LDA-score av særlig Firmicutes og Bacteroidetes i FB-diettførede mus, sammenlignet med HF-diettførede VT-mus i henholdsvis ileum og cøkum.

I NOX1ko-musene ble det observert færre fyla med LDA-score over 2 enn i villtypemusene. Dette kan tyde på større likhet i mikrobiotasammensetningen mellom ileum og cøkum i VT-mus sammenlignet med NOX1ko-mus. Det ble også funnet at Tenericutes var oppregulert i høyfettdietten (figur 3.5c), mens Proteobacteria var oppregulert i fababønnedietten (figur 3.5d).

Både villtypemusene og NOX1ko-musene hadde generelt høyere LDA-score i musene føret med fababønner som kan tyde på at forskjellene i mikrobiotasammensetningen var større enn de føret med ren høyfettdiett.

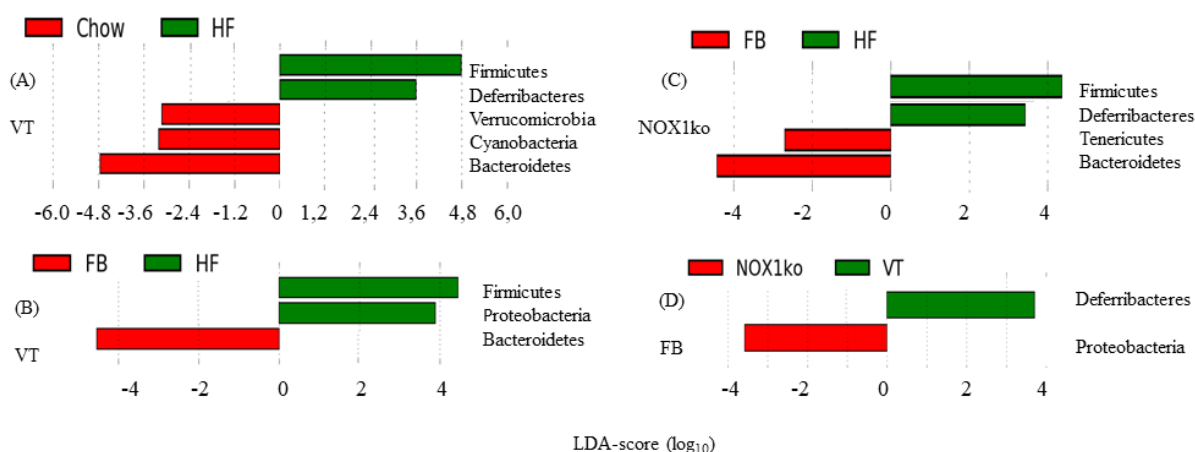
Fra dette kan det konkluderes med at forskjellene mellom ileum og cøkum var mindre i NOX1ko- enn i VT-mus. Videre ble det observert at LDA-scoren var høyere i FB-dietten sammenlignet med HF-dietten.

3.2.2.2 Bakterielle ulikheter i cøkum mellom de eksperimentelle gruppene

Siden fylogenetiske ulikheter var blitt kartlagt mellom kymus fra ileum og cøkum, kunne eventuelle forskjeller forårsaket av de ulike diettene og NOX1 bestemmes. Siden cøkum har en høyere bakterietetthet og trolig også stabilitet, ble det ikke forventet å se store mikrobiologiske forskjeller her.

RESULTAT

Ved å benytte LEfSe til analysene av cøkum i villtypemus mellom diettene ble det funnet 5 fyla som var representert ulikt mellom individene på standard Chow-diett og de på ren høyfettdiett (figur 3.6a). Til sammenligning hadde villtypemus fôret med henholdsvis ren høyfettdiett og høyfettdiett med fababønner færre forskjeller, med kun de 3 fylaene Firmicutes, Proteobacteria og Bacteroidetes som skilte de to diettene (figur 3.6b). Dessuten var LDA-scoren lavere mellom høyfett- og fababønnedietten, enn mellom chow- og høyfettdietten.



Figur 3.6: Forskjeller i fylumsammensetning i cøkum.

Forskjeller i fylumsammensetning i VT-mus mellom (a) HF- og chowdiett og (b) HF- og FB-diett. (c) Forskjeller i fylumsammensetning i NOX1ko-mus som et resultat av diett og (d) ulikheter innad i FB-diett som et resultat av genotype. Modifisert figur fra LEfSe.

Ved å gjøre tilsvarende analyser for NOX1ko-genotypen kunne det fastslås at det var 4 ulike fyla med en LDA-score over 2. I HF-dietten var disse Firmicutes og Deferribacteres, mens i FB-dietten var det Tenericutes og Bacteroidetes (figur 3.6c).

Videre etter at forskjell mellom genotyper som resultat av diett var kartlagt, kunne diett som resultat av genotyper analyseres. Ved å sammenligne villtype- og NOX1ko-genotypene som fikk ren høyfettdiett ble det ikke funnet noen forskjeller i fylogenetisk sammensetning.

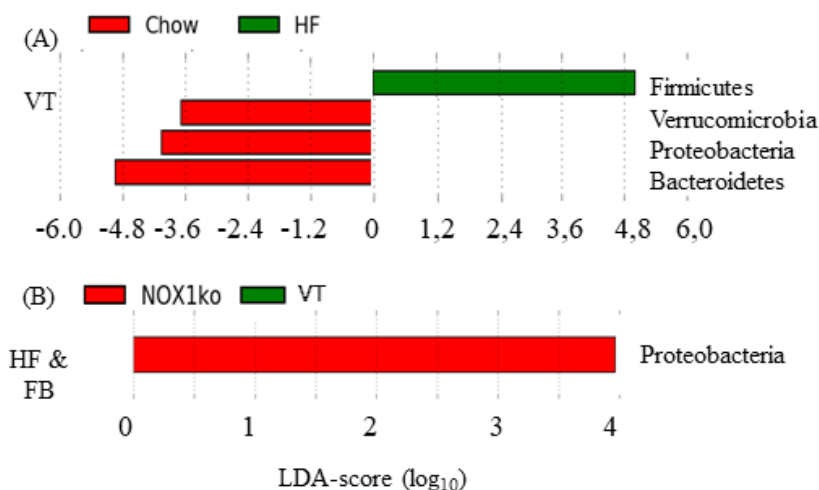
Fababønnedietten viste derimot å ha resultert i oppregulering av Deferribacteres i VT-musene og Proteobacteria i NOX1ko-musene (figur 3.6d).

Høyere mengde av Bacteroidetes i chow- og i FB-dietten sammenlignet med Firmicutes i HF-dietten tyder på en mer overvektig fenotype i HF-dietten. Oppregulert mengde av Proteobacteria i NOX1ko-mus på fababønnedietten sammenlignet med VT-mus på FB-diett kan tyde på større grad av dysbiose i cøkum.

RESULTAT

3.2.2.3 Bakterielle ulikheter i ileum mellom de eksperimentelle gruppene

Da konsentrasjonen av ROS/RNS er høyest i ileum var det forventet å se større forandringer i mikrobiotasammensetning i dette området. I VT-musene var det på fylumnivå kun forskjell mellom standard Chow-diett og høyfettdiett (figur 3.7a) men ikke mellom høyfett og fababønner. Det ble heller ikke sett noen forskjeller i fylumnivå-sammensetning mellom HF-diett og FB-diett i NOX1ko-musene.



Figur 3.7: Fylumnivå ulikheter i bakteriesammensetning mellom dietter i ileum.

(a) Forskjeller i fylumsammensetning i VT-mus mellom HF- og chow-diett. (b) Sammenligning innad i diettene (HF: VT mot NOX1ko; FB: VT mot NOX1ko) viste begge oppregulert nivå av Proteobacteria. Modifisert figur fra LEfSe.

Derimot ble det sett en tydelig effekt av genotype på fylumnivå i ileum. Da VT-mus ble sammenlignet med NOX1ko-mus føret med henholdsvis høyfettdiett og fababønnediett ble det funnet 1 signifikant forskjell i fylum, nemlig Proteobacteria, som var høyere i NOX1ko-mus (figur 3.7b). Dette tyder på økt dysbiose i NOX1ko-musene sammenlignet med VT-musene uavhengig av diett.

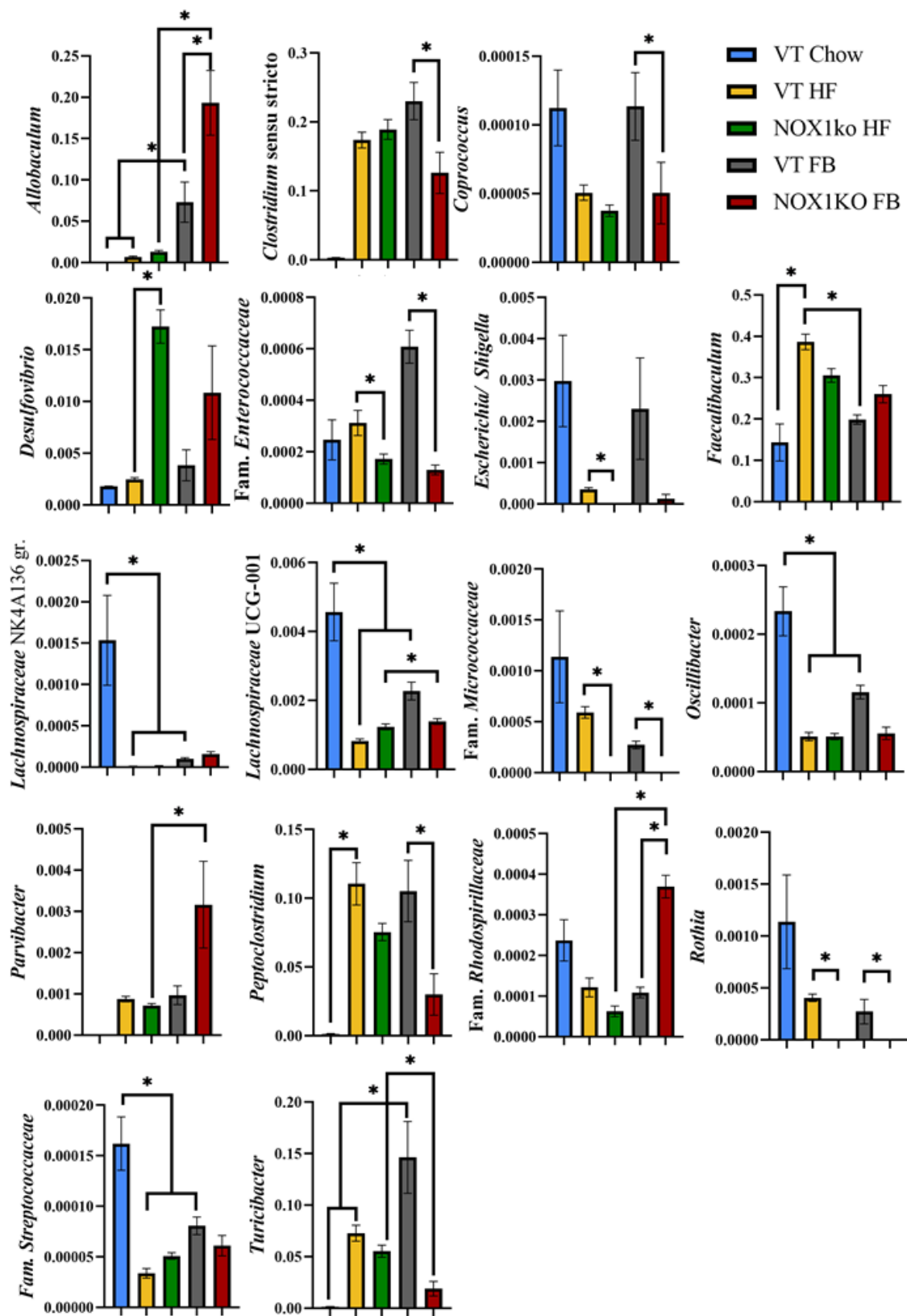
Videre ble mikrobiotafordeelingen i ileum på slektsnivå mellom NOX1ko-musene og VT-musene vurdert med LEfSe analyse. Analysene ble gjort ved å sammenligne diettene mot hverandre, og ved å sammenligne genotypene mot hverandre. Totalt hadde 14 slekter en LDA-verdi på 2 eller mer. Det ble også sett signifikant ulik relativ sammensetning på høyere taxonomiske nivåer. I noen av sammenligningene ble det sett at tilstedeværelsen av både fylumet, klassen, ordenen, familien og slekten var signifikant ulik mellom gruppene, som reflekterer de store omveltningene i mikrobiota som følge av diett og genotype. De oppregulerte familiene og slektene er presentert i figur 3.8.

RESULTAT

I VT- og NOX1ko-mus fôret med ren HF-diett ble det kun funnet 3 slekter som gjennomgående hadde ulik fordeling i de to gruppene; *Desulfovibrio*, *Escherichia/Shigella* og *Rothia*. Mens *Desulfovibrio* var oppregulert i NOX1ko-musene, var *Rothia* og *Escherichia/Shigella* kraftig nedregulert sammenlignet med VT-musene. Tilsvarende tendenser ble også observert ved å sammenligne NOX1ko og VT på FB-dietten. Innad i FB-dietten, ble det i tillegg til *Rothia* også observert signifikant endring i den relative mengden av både *Allobaculum*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Enterococcus*, *Peptoclostridium*, *Turicibacter* og *Corpococcus*.

Ved å se på effekt av diett innad i genotypene ble det også funnet ulikheter slekts-sammensetningen. NOX1ko-musene førte FB-dietten til oppregulering i slektene *Allobaculum*, *Lachnospiraceae* UCG 001 og *Parvibacter* i forhold til HF-dietten. VT-genotypen ble alle tre diettene; HF-, FB- og chow-dietten, sammenlignet. I FB-dietten var særlig *Allobaculum* og *Turicibacter* oppregulert sammenlignet med de andre to diettene, og *Faecalibaculum* var oppregulert i HF-dietten sammenlignet med de andre to. Chow-dietten viste derimot å ha en signifikant høyere andel av slektene *Oscillibacter*, *Lachnospiraceae* NK4A136 gr., *Lachnospiraceae* UCG 001, og en ukultureert slekt av *Lachnospiraceae* (alle slektene bortsett fra den ukultureerte *Lachnospiraceae* vist i figur 3.8).

RESULTAT



Figur 3.8: Relativ sammensetning av oppregulerte slekter og familier i ileum som resultat av diett og genotype. Alle utvalgte bakterieslekter og -familier hadde en LDA-verdi på 2 eller mer, og ble funnet gjennom bruk av LEfSe. Slekter og familier med signifikant ulik tilstedeværelse mellom genotypene eller diettene er merket med *.

RESULTAT

Fra LEfSe-analysene av 16S-sekvenseringen kan det konkluderes med at det er flere unike OTU'er i cøcum sammenlignet med ileum, i tillegg til at mikrobiotaen i cøcum virket mer stabil enn den i ileum. I NOX1ko-mus var det færre signifikante forskjeller mellom ileum og cøcum på fylumnivå sammenlignet med de i VT-musene. I cøcum ble det funnet økt mengde av Bacteroidetes i chow- og i FB-dietten, og økt mengde Firmicutes i HF-dietten. Videre i cøcum ble det også sett oppregulert mengde av Proteobacteria i NOX1ko-mus på FB-diett sammenlignet med VT-mus på samme diett. I ileum på fylumnivå ble det hovedsakelig sett ulikheter mellom chow- og HF-diett i VT-mus, og oppregulering av Proteobacteria i NOX1ko-mus på begge dietter sammenlignet med VT-mus på tilsvarende dietter. Ved nærmere LEfSe-analyser i ileum ble det funnet 15 slekter, samt diverse høyere taksonomiske grupper som hadde signifikant ulik relativ sammensetning ved sammenligning av genotypene og diettene.

3.3 EFFEKTEN AV DIETT OG GENOTYPE PÅ BAKTERIETALL I ILEUM

Mikrobiotasammensetningen i forsøksgruppene viste en effekt både av genotype og diett. Tidligere studier har funnet en økning i bakteriekvantitet i ileum trolig på grunn av fravær av NOX1 (Matziouridou et al., 2018). I den studien ble kvantifiseringen gjort med plattetelling. Jeg ønsket å finne ut om bakteriekvantifisering også kunne gjøres med flowcytometri, og om det var noen effekt av NOX1 og diett på antall bakterier i ileum.

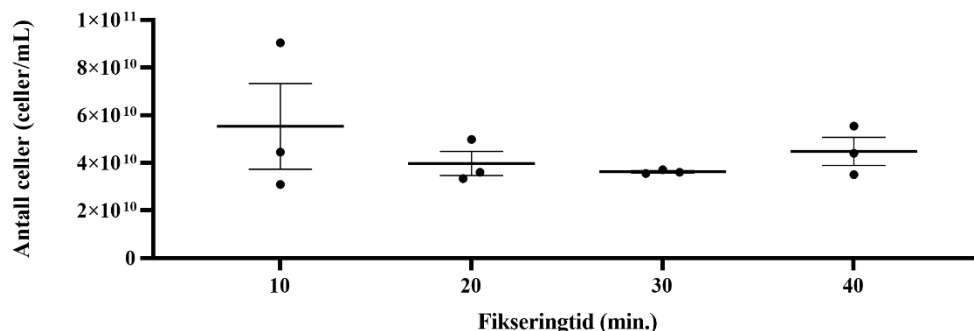
Det ble først initiert innledende forsøk for å 1) etablere hvor lenge kymusprøvene fra forsøksdyrene burde fikseres for å opprettholde så representativt antall celler som mulig til kvantifisering, og 2) bestemme om lagringstid i PBS etter formalinfiksering påvirker celletallet. De to forberedende forsøkene ble gjennomført på renkultur av *E. coli* og på kymusprøver fra ileum i to hunnmus på chowdiett.

3.3.1 Forberedende forsøk

3.3.1.1 Renkultur – ingen effekt av ulik fikseringstid på celletall

Fikseringstid og den eventuelle effekten av denne ble undersøkt på renkultur *E. coli*. Det ble forventet å se en nedgang i celletall ved 40 minutter, da 30 minutter brukes som fikseringstid i flere forsøk (Lambrecht et al., 2018). Det ble målt tre paralleller for hver fikseringsbehandling. Fra disse målingene ble det funnet et gjennomsnitt for hver av de ulike fikseringstidene med tilhørende standardfeil (SEM)(figur 3.9).

RESULTAT



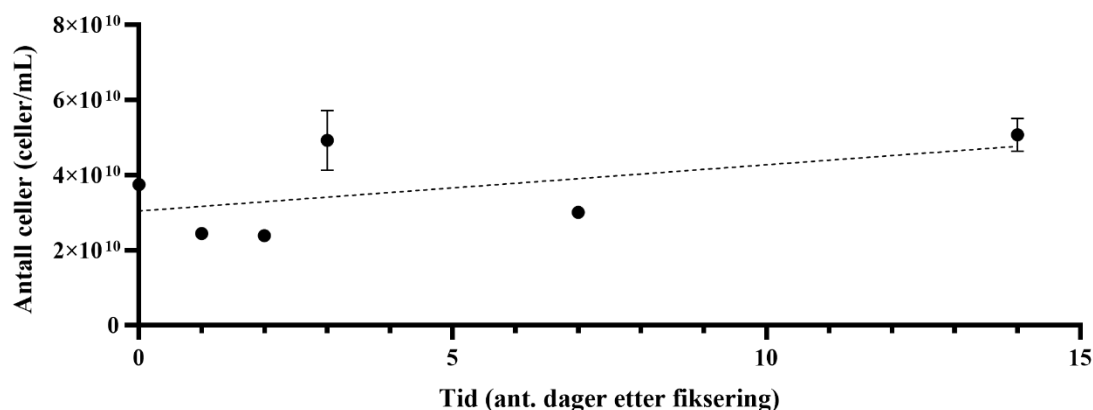
Figur 3.9: Celletall av *E. coli*-renkultur bestemt med flowcytometri etter henholdsvis 10, 20, 30 og 40 minutters fiksering i 2% formaldehyd.

Ingen signifikant forskjell funnet, testet med Wilcoxon matched pairs signed rank test. Gjennomsnitt og SEM er presentert for triplottene av hver fikseringsbehandling.

Ved å analysere telldataene opp mot hverandre, ble det fastslått at det ikke kunne observeres noen signifikant effekt av de valgte fikseringstidene på celletallet. Ut fra figur 3.9 kan det se ut som at antallet celler er lavest ved 30 minutters fiksering, men på grunn av de overlappende standardfeilene kan ikke de ulike tidsbehandlingene antas å ha ulik effekt på celletallet. Det ble bestemt å fikserer fremtidige celleprøver i 30 minutter.

3.3.1.2 Bakterietall ved langtidslagring etter formalinfixering

For å undersøke stabiliteten i celletall ved lagring etter fiksering i 2% formaldehyd (30 min.) ble både renkultur *E. coli* og kymusprøver fra to hunnmus benyttet. Tripletter fra hver lagringstid (dag 0, 1, 2, 3, 7 og 14) ble undersøkt med flowcytometri. For renkulturen ble det observert en svak stigning i bakterietall, men med relativt store variasjoner fra dag til dag (figur 3.10).



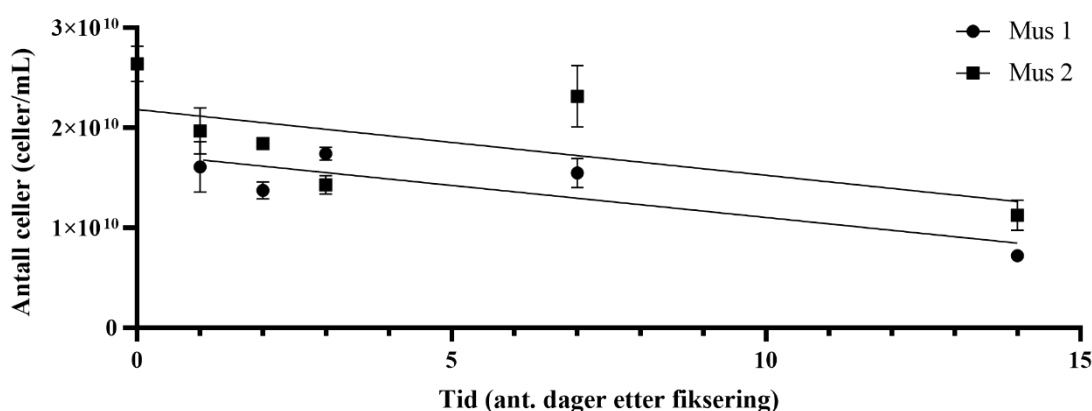
Figur 3.10: Kvantifisering av bakterietall (celler/mL) i renkultur av *E. coli*.

Flowcytometrisk kvantifisering ble gjort ved dag 0, 1, 2, 3, 7 og 14 etter formaldehydfiksering (2%). Hvert gjennomsnitt er presentert med tilhørende SEM. Dag 1, 2 og 7 har så lav SEM at denne ikke syns. En lineær kurve er tilpasset datapunktene med en R^2 -verdi på 0,234.

RESULTAT

Det ble tilpasset en lineær trendlinje til dataene som mot forventningen viser en stigende trend i renkulturen (figur 3.10). Dette antyder en vekst og kan skyldes at fiksering av renkulturen ikke var tilstrekkelig. Den tilpassede trendlinjen hadde svært lav R^2 -verdi som tyder på dårlig tilpasning til dataene.

Ved å undersøke kymusprøvene fra to mus kunne tidseffekten av lagring også bestemmes på prøver likere de som skulle analyseres i hovedforsøket. Målinger av miljøprøven fra mus 1, dag 0, ble fjernet grunnet høye verdier av celler som et resultat av i snitt svært få tellekuler i akkurat denne prøvetripletten. Snitt ble regnet ut fra hver triplett, en lineær trendlinje ble tilpasset hver av museprøvene (figur 3.11).



Figur 3.11: Celletall (celler/mL) i miljøprøver fra mus som en effekt av lagring. Flowcytometrisk kvantifisering ble gjort ved 0, 1, 2, 3, 7 og 14 dager etter formaldehydfiksering (30 min.). Det ble tilpasset en lineær trendkurve. Trendkurven for mus 1 har en R^2 -verdi på 0,722, mens den for mus 2 har en R^2 -verdi på 0,384.

I motsetning til renkulturprøven (figur 3.10) kan det observeres synkende trend i miljøprøvene fra begge mus (figur 3.11). Den synkende trenden var forventet, men den er kun svak. For mus 1, hvor dag 0-målingene ble fjernet var den tilhørende R^2 -verdien relativt høy, mens den for mus 2 var særlig lav som antyder en mindre enn optimal tilpasning av den lineære kurven. Trenden de tilpassede linjene viser antyder en viss nedgang i celletall over tid.

Da miljøprøvene var mest representative for prøvene i hovedforsøket ble det bestemt å analysere prøvene allerede samme dag som prøveuttakene.

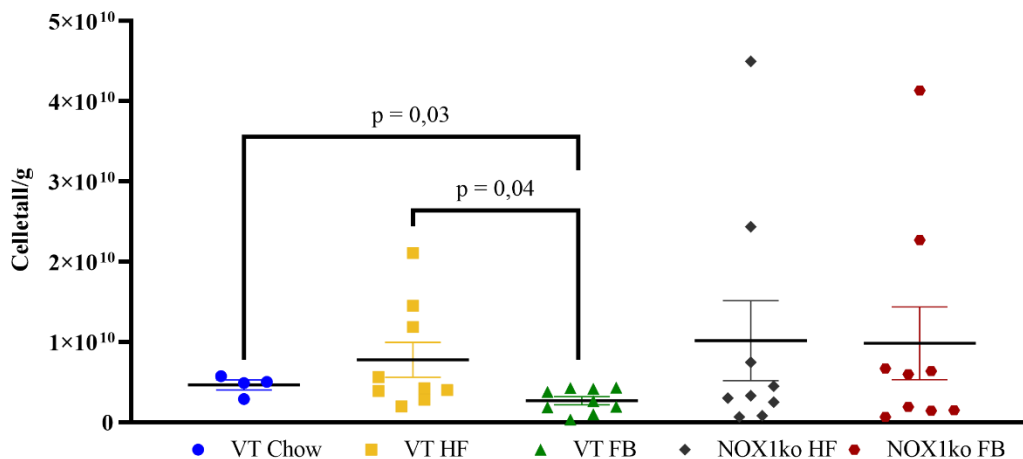
RESULTAT

3.3.2 Diett har en effekt på bakteriekvantitet i ileum hos villtypemus

Basert på de forberedende forsøkene ble det bestemt at formalinfikseringstiden ikke ga noen signifikant forskjell i celletall, og at celletallet i miljøprøvene var høyest samme dag som prøveuttaket. Derfor ble det bestemt at bakteriekvantifisering av kymusprøver skulle fikseses i 30 minutter og analyseres med flowcytometri samme dag som prøveuttaket ble gjort.

Bakterietellingen ble gjort sammen med tellekuler for en riktigere kvantifisering.

Kvantifiseringen ble gjort på 40 prøver, fra henholdsvis ni mus ($n = 9$) i hver av forsøksgruppene, og de fire musene føret med standarddiett ($n = 4$). Telletallene av bakterier ble korrigert med telletallene av kvantifiseringkuler og den kjente konsentrasjonen av disse. Telletallene i alle gruppenen ble kalkulert å være i størrelsesorden 10^8 - 10^{10} , som er et noe høyt estimat sammenlignet med tidligere forskning på tynntarm (Mowat et al., 2014; Donaldson et al, 2016). Gjennomsnittet i hver forsøksgruppe ble kalkulert, samt tilhørende SEM og signifikansnivå mellom gruppene ved bruk av Mann-Whitney testen (figur 3.12).



Figur 3.12: Kvantifisering av bakterier i ileum i NOX1ko- og VT-mus på ulike dietter.

Det ble sett signifikant forskjell i telletall fra VT-mus på HF- diett sammenlignet med FB-diett ($p=0,04$), samt mellom VT-mus på FB- og chowdiett ($p=0,03$). Telletallene kalkulert fra flowcytometriske data funnet med tellekuler. Forsøksgruppene hadde $n=9$ individer hver, VT-mus på chowdiett hadde $n=4$ dyr. Statistisk sammenligning ble gjort parvis med Mann-Whitney test.

Figur 3.12 viser at det kun var signifikant forskjell på bakterieantallet mellom HF- og FB-diett ($p = 0,04$), samt mellom FB- og chowdiett ($p = 0,03$), begge i VT-mus. Det ble også sett relativt stor variasjon mellom bakterietallet i VT-mus på HF-diett, samt generelt i NOX1ko-musene. Særlig er det stor spredning mellom målepunktene i NOX1ko-musene, som også er gjenspeilet i SEM-linjene (figur 3.12). Dette kan antyde at både FB- og chowdietten hadde en mer stabiliserende effekt på mikrobiotakvantiteten i VT-musene enn ren HF-diett. Den

RESULTAT

relativt store variasjonen i telletall i NOX1-genotypen kan tyde på et mer ustabilt miljø i ileum.

4 DISKUSJON

Oppregulering av ROS i tarm har de senere årene blitt antydnet å ha en regulatorisk rolle i tarmen, da særlig i tynntarm, for å opprettholde homeostase. Det ROS-produserende enzymet NOX1 har blitt vist at er særlig oppregulert i nedre del av ileum i normalvektige mus. Til tross for økt fokus på tarmhelse, er forskningen på mikrobiota i ileum relativt lite studert. Derimot er det store studier på effekt av diett på mikrobiotasammensetning i kolon og avføring. Fett- og karbohydratrike dietter har blitt assosiert med dysbiose i tarm, overvekt, diabetes og diverse andre livsstilssykdommer, mens fababønner har vist å redusere sannsynligheten for noe av dette.

Hensikten med dette prosjektet var derfor å undersøke rollen til NOX1-produsert ROS på mikrobiotasammensetning og bakterieantall i ileum i overvektige mus føret med høyfettdiett med eller uten fababønnefraksjon. Videre var det ønsket å bestemme om tilstedeværelse av fababønnefraksjon i høyfettdietten hadde positiv eller negativ effekt på mikrobiotaen.

Gjennom prosjektet ble det sett at dietten førte til overvektig fenotype sammenlignet med mus føret på standarddiett, samt at fravær av NOX1 kraftig reduserte det L-012-medierte lyssignaet. Videre ble det sett økt antall unike arter i cøcum sammenlignet med ileum, samt generell reduksjon artsantallet i forsøksmusene føret med høyfettdiett. Det ble også observert dysbioseassosiert mikrobiotasammensetning både på fylumnivå og slektsnivå både i ileum og cøcum, og en antydning til økning i mikrobiotakvantitet i NOX1ko-musene sammenlignet med VT-musene. Fababønnefraksjonen i dietten viste tegn til å øke mengden av visse eubioseassosierte slekter, samt å holde bakteriemengden nede i ileum.

Det som diskuteres nærmere i denne delen kan settes opp punktvis:

- Hvordan vekten gjennom forsøket ble påvirket av diett og genotype
- Hvordan ROS-signal fra tykktarm ble påvirket av NOX1 og høyfettdiett med eller uten fababønner
- Mulige tolkninger om hvordan mikrobiotasammensetningen påvirkes av genotypen og diett
- Mulige tolkninger av om bakteriekvantiteten i ileum ble påvirket av genotype og diett
- Veien videre

4.1 HVORDAN DIETT OG GENOTYPE PÅVIRKER VEKT I C57BL/6-HANNMUS

Det ble sett en tydelig vektøkning i alle de fire forsøksgruppene fra forsøksstart til terminering. Ved sammenligning av den endelige vekten i forsøksgruppene og VT-musene på chowdiett ble det sett en signifikant forskjell. Dette tyder på at høyfettfôret hadde den ønskede effekten som var å føre til overvekt i begge genotyper. Dette var i samsvar med det som har blitt sett i mange andre studier på hannmus ved *ad libitum* matkonsum og fravær av løpehjul i C57BL/6-mus (Delahaye et al., 2018; Hicks et al., 2016; Jeong, Jang, & Kim, 2019; Ronis et al., 2013).

Videre ble det sett en tendens til forskjell i vektøkning mellom VT-mus på HF-diett sammenlignet med de andre tre forsøksgruppene, hvor både VT-mus på FB-diett samt begge NOX1ko-gruppene antydte å ha en kraftigere vektøkning. Dette ligner på en tidligere studie gjort av Monk et al., (2017) hvor det ble observert en forskjell i vektøkning mellom mus fôret med 20% kcal kikertfraksjon i grunndiett sammenlignet med mus fôret på standard grunndietten. Samme forskjell ble derimot ikke sett i mus fôret med fraksjon av hvite eller sorte bønner (Monk et al., 2017), som kan tyde på at visse bønner i dietten gir kraftigere vektøkning enn andre sammenlignet med grunndiett.

Kanskje hadde det blitt sett tydeligere forskjeller i vektøkning ved større forsøksgrupper, da det kun var n=11 individer i hvert forsøksgruppe, samt n= 4 i VT-gruppen på chowdiett. Dessuten ble det sett relativt store ulikheter i termineringsvekt innad i gruppene som kan skyldes burfordeling da to eller tre mus ble plassert sammen. En slik fordeling kan føre til dominerende/submissiv oppførsel som videre kan påvirke fôrkonsumet samt vektøkningen i begge parter, men kan også gi utslag i mus som bor alene (Bartolomucci et al., 2009).

Generelt ble det sett en vektøkning i forsøksgruppene som tyder på at den fettrike kosten fungerte for å gi overvekt i musemodellen. Det ble også antydte ulik vektøkning mellom visse av forsøksgruppene, men dette er ikke sikkert.

4.2 GENOTYPE, OG I MINDRE GRAD DIETT, PÅVIRKET *IN VIVO* ROS-SIGNALET FRA TARM I C57BL/6-HANNMUS

Det ble sett at L-012-signalet fra mageregionen forsvant i NOX1ko-musene sammenlignet med VT-musene, som tyder på hypotesen stemmer ved at NOX1-produsert superoksid i tarm er viktig for det L-012-medierte lyssignalet. Flere tidligere studier støtter dette, og viser videre at hovedsignalet kommer fra tynntarmen i mus med uhindret ROS/RNS-produksjon (Kielland et al., 2009; Matziouridou et al., 2018). Dette antyder også at ingen andre enzymer, eksempelvis DUOX 1 eller 2, oppreguleres og overtar NOX1 sin rolle i tarmen i løpet av de første 10 ukene av forsøket.

Videre ble det kun observert ulikheter mellom diettene i VT-musene etter 96 timers tilgang til den eksperimentelle dietten da lyssignaleratioen mellom startnivå og 96 timer var signifikant lavere i FB-dietten sammenlignet med HF-dietten. Dette kan tyde på at fababønnefraksjonen kan ha en viss antioksidanteffekt på grunn av fenolforbindelsene, eller at det er andre forbindelser i bønnene som har en effekt direkte på enten ROS-mengden eller indirekte via en endring i mikrobiotasammensetningen. Antioksidanteffekten vil kunne stemme over ens med den antiinflammatoriske effekten sett av Monk et al. ved konsum av kikerter samt hvite og svarte bønner i mus (Monk J. M. & A., 2017; Monk et al., 2017; Monk, Wu, Hutchinson, et al., 2018; Monk, Wu, McGillis, et al., 2018).

Dersom endringen i L-012-emittert lys skyldes endring i mikrobiotasammensetning så kan dette stemme over ens med den raske diettavhengige mikrobiotaendringen som blant annet har blitt rapportert av Wu et al. (2011). Potensielt kan det hende endringen i L-012-medierte lyssignal reflekterer den dynamiske mikrobiota utviklingen skapt av diettskifte de 96 første timene, men at dette har stabilisert seg på et noe høyere nivå i begge dietter innen 10 uker. Da 10-ukersmålingen er svært lik i begge forsøksgruppene, tyder dette på at høyfett delen i diettene har større innvirkning over tid, direkte eller indirekte, på lyssignalet enn fababønnefraksjonen i FB-dietten.

Det ble også sett noe variasjon i lyssignal mellom hvert individ innad i gruppene. Denne variasjonen kan ha en sammenheng med spisemønsteret til dyrene, i likhet med det som ble sett i mygg, der DUOX ble oppregulert rett etter blodkonsum (Xiao et al., 2017). Alternativt kan forskjellene i lyssignal skyldes inkonsekvent administrering av L-012-proben ved IP-injeksjon.

DISKUSJON

Oppsummert ble det kun sett en midlertidig signifikant endring i ROS-signal fra mageregion hos VT-mus på FB-diett relativt kort tid etter introduksjonen av denne.

4.3 MULIGE TOLKNINGER OM HVORDAN

MIKROBIOTASAMMENSETNINGEN PÅVIRKES AV NOX1 OG DIETT I ILEUM OG CØKUM

4.3.1 Det ble sett ulikt artsmangfold mellom ileum og cøkum som effekt av diett. Fra 16S-sekvenseringen ble det observert nesten en dobling i antall unike bakterielle OTU'er i cøkum sammenlignet med ileum i hver forsøksgruppe. Dette reflekterer godt det litteraturen sier om at ileum har et mer krevende miljø på grunn av lavere pH, gjennomfartstid, oksygentilgang og immunforsvaret som er særlig fokusert i tynntarmen og særlig i ileum (Donaldson et al., 2016; Mowat & Agace, 2014).

Det ble også sett en signifikant reduksjon i antall arter både i ileum og cøkum i begge HF-diettene sammenlignet med chowdietten. Reduksjon i artsmangfold er ofte assosiert med både overvekt og dysbiose (Cândido et al., 2018; Lozupone et al., 2012). FB-dietten viste liten effekt sammenlignet med HF-dietten i ileum, men i cøkum ble det derimot sett signifikant høyere antall arter i FB-dietten sammenlignet med ren HF-diett. Dette tyder på at fababønnefraksjonen i dietten hadde en positiv effekt på artsmangfold primært distalt for tynntarm i tråd med teorier om at kostfiber i dietten øker metabolske interaksjoner mellom mikrober og at fiber ikke i samme grad påvirker mikrobiota i tynntarm (Holscher, 2017).

Oppsummert ble det sett høyere artsmangfold i cøkum sammenlignet med ileum. Høyfett-diett hadde en negativ effekt på antall arter i både ileum og cøkum, og fababønnefraksjonen førte til et større artsmangfold i cøkum. Overraskende ble tilstedeværelse av NOX1 ikke sett å ha noen effekt på artsmangfold i verken ileum eller cøkum.

4.3.2 NOX1ko-mus på HF-diett viste færre forskjeller i diversitet og relativ sammensetning av bakteriefylum mellom ileum og cøkum

Basert på tidligere studier, ble det jobbet utfra en hypotese at det i NOX1ko-musene var større likhet i sammensetning mellom ileum og cøkum som et resultat av dårligere bakterieregulering på grunn av fravær av ROS/RNS i ileum. Gjennom LefSe-analyser hvor sammensetning i ileum og cøkum i de ulike forsøksgruppene ble sammenlignet, ble det sett

DISKUSJON

større forskjeller i VT-mus sammenlignet med NOX1ko-mus føret med HF-diett. Det ble sett signifikant ulikheter i 6 fyla i VT-musene, mens det i NOX1-musene kun var 4 slike ulikheter. Færre signifikante forskjeller i relativ sammensetning tyder på større likhet mellom ileum og cøcum. Dette støtter teorien om at fravær av NOX1 og ROS/RNS fører til likere forhold i ileum og cøcum, som også ble vist av Matziouridou et al. (2018).

Hypotesen stemte for øvrig ikke i FB-dietten, der både VT-musene og NOX1ko-musene hadde ulik sammensetning i 5 fyla hver mellom ileum og cøcum. Dette kan skyldes at Actinobacteria er oppregulert i ileum hos NOX1ko-musene på FB-diett sammenlignet med i cøcum. Videre er det også ikke oppregulerte mengder av Deferribacteres i cøcum i motsetning til de tre andre forsøksgruppene. I følge Murine Mibrobiome Database (Yang, Park, Park, Baek, & Chun, 2019) er Deferribacteres et forholdsvis vanlig fylum å finne i cøcum i C57BL/6-mus hvor det har blitt funnet i nesten 30% av labmus. Deferribacteres, særlig arten *Mucispirillum schaedleri*, er kjent for å drive anaerob fermentering, og har blitt sett i relativt store mengder i kryptene i cøcum hos mus der de har blitt antydnet å være en nøkkelart som opprettholder stabilitet (Zaborin et al., 2020). Fraværet av oppregulert Deferribacteres i cøcum, eller tilstedeværelsen av dette fylumet i både ileum og cøcum, samt oppreguleringen av Actinobacteria i ileum kan være et resultat av manglende ROS/RNS-produksjon.

I alle de fire forsøksgruppene ble det sett en oppregulering av Firmicutes i ileum som er et fylum assosiert med høyere syretoleranse. Dette stemmer godt over ens med forholdene i tynntarmen (Mowat & Agace, 2014). Tilstedeværelsen av Bacteroidetes i cøcum og kolon er også som forventet da dette fylumet særlig er assosiert med nedbrytning av mange typer kostfiber og komplekse polysakkarider, som hovedsakelig foregår i cøcum og kolon (Salyers, Vercellotti, West, & Wilkins, 1977).

4.3.3 I cøcum ble oppregulert mengde Bacteroidetes assosiert med FB- og chowdiett, mens Firmicutes-oppregulering ble assosiert med HF-diett

I cøcum ble det funnet økt relativ mengde av Bacteroidetes i FB- og chowdietten, og økt relativ mengde Firmicutes i HF-dietten. Endringen i Firmicutes/Bacteroidetes-forholdet mellom VT-musene på HF- og chowdiett er typisk for den som blir sett i sammenheng med overvektstypen som også har blitt sett i her (Ley et al., 2006). Oppreguleringen av henholdsvis Bacteroidetes i begge genotyper på FB-diett og Firmicutes i begge genotyper på HF-diett tyder også på at bønnefraksjonen har en effekt på dette forholdet. Dette kan trolig

DISKUSJON

knyttet til blant annet kostfibermengden som fins i disse bønnene. At HF-dietten har en oppregulerende effekt på Firmicutes-mengden i cøcum virker naturlig da Firmicutes er syretolerante, og økt fettinntak fører til oppregulering av gallesyre i tynntarmen, som kan gi et surere miljø også i cøcum (Yokota et al., 2012).

I cøcum ble det observert signifikant nedregulert mengde Proteobacteria i VT-mus på FB-diett. Denne forskjellen ble ikke sett ved sammenligning av HF- og chowdiett i VT-mus, som kan tyde på at bønnefraksjonen alene har en nedregulerende effekt på Proteobacteria. Den samme nedregulering ble også sett ved sammenligning i FB-diett mellom VT- og NOX1ko-mus, som kan tyde på at fravær av NOX1 også spiller inn. Tilstedeværelsen av Proteobacteria er en velbrukt markør på dysbiose (Shin et al., 2015), og kan her tyde på lavere grad av dysbiose som en effekt av fababønner.

4.3.4 Økt relativ sammensetning av Proteobacteria ble sett i ileummikrobiota i NOX1ko-mus

I ileum på fylumnivå ble det sett oppregulering av Proteobacteria i NOX1ko-mus sammenlignet med VT-mus på tilsvarende dietter. Dette stemmer godt med den oppregulerte mengden Proteobacteria som ble sett i cøcum, og støtter også hypotesen om at NOX1 og ROS-produksjon er brukt i bakteriell kontroll i ileum (Matziouridou et al., 2018)

I VT-musene, ved sammenligning av de tre diettene (HF, FB, chow), ble det som ventet sett kraftig oppreguleringen av Firmicutes i HF-dietten. Dette ble ikke gjenspeilet i FB-dietten, som kan tyde på at fababønnefraksjonen hadde en liten effekt mikrobiotasammensetningen også i ileum. Chow-dietten viste oppregulering av Verrucomicrobia, som kun inneholder den kommensale slekten *Akkermansia*, som er assosiert med god tarmhelse (Alam et al., 2016), samt Bacteroidetes og Proteobacteria. Sistnevnte var ikke forventet, da oppregulering av Proteobacteria som oftest er sett i sammenheng med dysbiose (Jeong et al., 2019; Litvak, Byndloss, Tsolis, & Bäumler, 2017; Shin et al., 2015). Dette kan skyldes at fylumet Proteobacteria er litt mer allsidig enn bare dysbiose-assosiert, og blant annet inkluderer mange opportunistiske bakterier som også blir sett i normalt tilstand (Sivaraj et al., 2020). Nedregulering av Proteobacteria i HF- og FB-diettene sett i VT-mus kan muligens forklares med oppreguleringen i Firmicutes som et resultat av diett.

DISKUSJON

4.3.5 Mikrobielle endringer i ileum på slekts- og familienivå

Ved nærmere LEfSe-analyser i ileum ble det funnet 14 slekter, samt flere ulike høyere taksonomiske grupper, som hadde signifikant ulik relativ sammensetning ved sammenligning av genotypene og diettene.

I alle forsøksgruppene ble det sett nedregulering av de butyratproduserende *Lachnospiraceae*-slektene sammenlignet med chowdietten. Disse slektene har nylig blitt vist å være viktige for å hindre inflammasjon i tarmen da butyratproduksjonen begrenser regulatorisk T-cellerespons (Takahashi et al., 2020). Nedreguleringen av disse slektene i alle forsøksmusene på høyfettdiett med eller uten fababønner kan være med å forklare hvorfor fettrikt kosthold ofte er assosiert med høyere grad av inflammasjon i tarmen (Cândido et al., 2018; Delahaye et al., 2018).

Det ble også sett en signifikant nedregulering av den fakultative anaerobe familien *Streptococcaceae* og slekten *Escherichia/Shigella* i VT-musene på HF-diett og generelt i NOX1ko-musene sammenlignet med chow-dietten. Dette stemmer godt overens med endring i mikrobiotasammensetning i cøcum og kolon i mus etter konsum av fett- og karbohydratrik diett sett i en studie av Pircalabioru et al. (2016). Disse bakteriene har vist å ha en beskyttende effekt i NOX1ko-mus da de kan konkurrere om næringsstoffene med patogene mikrober som *Citrobacter rodentium* (Pircalabioru et al., 2016). I VT-mus på FB-diett ble det derimot sett tilsvarende mengder av *Escherichia/Shigella* som i de chow-fôrede musene, som antyder den positive effekten bønner kan ha i kostholdet.

Enterococcaceae, som i likhet *Streptococcaceae* er en melkesyreproduserende familie, ble sett i signifikant lavere relative mengder i NOX1ko-genotypen sammenlignet med VT-musene. Dette er motsatt trend av hva som ble sett i studien til Matziouridou et al. (2018), men kan forklares med at disse musene ble fôret med chowdiett. Pircalabioru et al (2016) viste nettopp dette da en endring i diett fra chowdiett til høyfettdiett førte til at melkesyrebakteriene og andre symbiotiske bakterier som før hadde vært oppregulert i NOX1ko-musene, i stor grad forsvant.

Studien av Pircalabioru et al (2016) viste at diettskifte førte til oppregulering av familien *Desulfovibrionaceae*. Dette ble det også sett tendenser til her, men i mye større grad i sammenheng med FB-dietten, som kan være et resultat av at denne bakteriefamilien er svovelreduserende. I fekalprøver fra mennesker har det ikke blitt sett noen sammenheng mellom *Desulfovibrionaceae*-mengde og konsum av svovelholdige proteiner (Lennon et al.,

DISKUSJON

2014), men det kan være problematisk å sammenligne fekalsammensetningen med bakteriesammensetningen i ileum da det ikke nødvendigvis er representativt (Yan et al., 2019). Dette støttes også av de tydelige forskjellene i mikrobiotasammensetning mellom ileum og cøcum i forsøksmusene i dette prosjektet.

Forskjeller i mikrobiota kan som nevnt forekomme som et resultat av miljø. Optimalt burde avl av globale knockout-dyr gjøres gjennom heterozygot avl (krysning av to heterozygote individer) både for å sikre likest mulig genetisk og mikrobiotisk grunnlag. Dette for å sikre at endringer som forekommer gjennom forsøk er et resultat av behandlingene som har blitt gjort, og ikke som en effekt av hvor dyrene ble avlet frem. Av praktiske årsaker ble NOX1ko-musene avlet frem gjennom homozygot avl ved NMBU, mens VT-musene innkjøpt. I et forsøk på å harmonisere mikrobiota mellom de to genetiske forsøksgruppene, ble bunnstrø fra de respektive burene blandet og tilbakeført flere ganger i ukene før forsøksstart. Da det ikke ble sett noen forskjell på fylumnivå mellom VT- og NOX1ko-musene i cøcum, kan det tyde på at harmoniseringen ble oppnådd. Videre kan det derfor sies at de observerte forskjellene som blir sett er et resultat av genotype og diett.

Kort oppsummert ble det sett ulikt artsmangfold i ileum og cøcum. Videre ble det hovedsakelig sett forskjeller i fylumnivå sammensetning i cøcum på grunn av dietten, mens sammensetningen i ileum så ut til å være mest påvirket av fravær eller tilstedeværelse av NOX1. På slektsnivå ble det funnet mikrobielle ulikheter som samsvarer med resultater funnet av andre.

4.4 MULIGE TOLKNINGER AV OM DIETT ELLER GENOTYPE PÅVIRKET BAKTERIEANTALL I ILEUM

Det ble kun sett en signifikant forskjell mellom bakteriekvantiteten i ileum mellom VT-mus på henholdsvis HF- og FB-diett, og mellom HF- og chowdiett, men relativt stor spredning i talletallene til NOX1ko-musene og VT-musene på HF-diett. Dette kan tyde på at bakterietallet gjennomgående var bedre regulert i VT-musene, mens HF-diett og NOX1ko-genotypen hadde et mer ustabil miljø i tarmen, derav de store forskjellene. Fra Matziouridou et al (Matziouridou et al., 2018) kunne det observeres en liknende spredning i bakteriekvantiteten fra ileum i NOX1ko-musene som observert her, men med prøver fra flere individer var disse jevnere fordelt. Potensielt kan disse ulikhetene tilskrives ulike dietter, da musene til Matziouridou et al (2018) ble fôret med chowdiett. I en studie gjort av Ahmed et al

DISKUSJON

(2007) ble mukusprøver hentet ut fra ileum i 6 individer i sammenheng med akuttkirurgi på grunn av tarmreseksjon, også kalt kolektomi. Estimertene av bakterieantall fra denne delen viste også stor spredning ($10^{7,9}$ - $10^{9,5}$ 16S rRNA kopier/mg mukosalt vev). Da akuttkirurgien kanskje også var assosiert med dysbiose, kan det antyde at spredningen i talletall nettopp skyldes dette.

Dersom dysbiose er grunnen til det tydelige spredningen i estimerte bakterietall i VT-mus på HF-diett, kan dette tyde på at høyfettdiett variable forhold i tynntarmen. Videre kan samlingen i VT-mus føret med henholdsvis FB- og chowdiett tyde på velfungerende normalt immunsystem som kontrollert holder celletallet nede. Særlig i VT-musene på FB-diett ble det sett signifikant lavere bakteriekvantitet sammenlignet med VT-mus på chowdiett. Dette kan støtte hypotesen om den antiinflammatoriske effekten bønner kan ha på tarm, eventuelt kan det tyde på at det er andre næringsstoffer som bidrar positivt. Uansett ser det ut til å støtte studier om forbedret tarmhelse ved konsum av bønner (Monk J. M. & A., 2017; Monk et al., 2017; Monk, Wu, Hutchinson, et al., 2018; Monk, Wu, McGillis, et al., 2018; Monk et al., 2015).

Ved kvantifisering av bakterietall med flowcytometri ble det kalkulert tall i størrelsesorden 10^8 - 10^{10} . Dette er noe høyere enn konsensus-estimat fra tidligere år som sier at det i tynntarmen er mellom 10^3 - 10^7 antall bakterier, som kan tyde på noe overestimerte bakterietall (Donaldson et al., 2016; Mowat & Agace, 2014). Til tross for dette, har det også blitt rapportert om høyere bakterietall nederst i ileum, som er likere de som har blitt funnet i cøkum og kolon. Blant annet fant Ahmed et al (2007) at det i siste del av ileum ble funnet 10^9 bakterier gram⁻¹ gjennom kvantitativ PCR, mens Matziouridou et al (2018) rapportert om mellom 10^9 - 10^{10} bakterier gram⁻¹ i ilealt kym estimert fra kolonidannende enheter (*colony forming units*, CFU). Begge disse teknikkene er kjent for å henholdsvis over- og underestimere bakterietall, i likhet med mange andre metoder. Med andre ord er det vanskelig å estimere absolutte celletall på en god måte, særlig fordi det har blitt sett at hvert steg med generelle prøveforberedelser vil kunne påvirke bakteriekvantiteten både positivt og negativt (Ou, McGoverin, Swift, & Vanholsbeeck, 2017).

Flowcytometri er en metode som krever små kvanta av prøve og relativt lite prøveforberedelser. For å kvantifisere absolutte bakterietall flowcytometrisk har det blitt sett gode estimater ved bruk av tellekuler (Khomtchouk et al., 2019). Motstridende til dette er den potensielle overestimeringen som har blitt sett gjennom for kraftig blanding av tellekulene, da

DISKUSJON

dette kan produsere bobler som har blitt sett å redusere antall tellekuler, og dermed overestimere cellekvantiteten (Ou et al., 2017). Videre er estimatene av bakterieantall som er kalkulert fra NOX1ko- og VT-musene ikke normalfordelte. Dette kan potensielt bedres gjennom flere replikater av hver prøve.

Oppsummert ble det sett signifikant forskjell, eller tendenser til en forskjell, i bakteriekvantitet mellom de forsøksgruppene, trolig som et resultat av diett og genotype, men selve bakteriekvantiteten er det noe usikkerhet rundt da estimatene var svært høye.

4.5 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID

Da døgnet bare har 24 timer, og masterprosjektet også hadde en naturlig tidsbegrensning, var det analysearbeid som det ikke ble funnet tid til. En naturlig videreføring av prosjektet ville være å kvantifisere bakterieantallet flowcytometrisk også i cøkum, og deretter bruke det kalkulerte antallet sammen med den relative mikrobiotasammensetningen til å finne kvantitativ sammensetning. Dette vil kunne gi et bedre inntrykk av faktiske forskjeller.

Videre ville det være interessant å undersøke det flowcytometriske avtrykket til mikrobiotaen med hensyn på forskjeller mellom, og likheter innad i forsøksgruppene og om noen av disse kan tilskrives spesifikke bakteriegrupper. Ved flowcytometrisk sortering av celler i bestemte områder vil disse deretter kunne sekvenseres slik at bakteriesammensetninge kan bestemmes.

5 KONKLUSJON

Gjennom fôring av villtypemus og NOX1 knockout-mus med høyfettdiett med eller uten fababønnefraksjon i 14 uker ble overvekt induisert i alle fire forsøksgruppene. Det ble sett en marginal forskjell i vektøkning mellom diettene, men ingen mellom genotypene. Gjennom *in vivo*-avbildning med L-012, ble det sett en kraftig nedregulering i ROS/RNS-signal fra mageregionen i NOX1ko-musene. I villtypemusene ble det sett en midlertidig svak nedregulering i ROS/RNS-signal etter noen få dager på høyfettdiett med fababønnefraksjon.

Ved bruk av 16S rRNA-sekvensering ble det funnet dobbelt så mange unike arter i cøcum som i ileum. Høyfettdiett førte til signifikant reduksjon i antall av unike arter og dysbioseassosiert oppregulering av fylum både i ileum og cøcum. Fababønnefraksjonen viste derimot probiotiske effekt i cøcum gjennom å både øke mengde Bacteroidetes i tillegg til antallet unike arter. Fravær av NOX1 ble antydnet å ha større effekt på fylumsammensetning i ileum sammenlignet med cøcum. Ved undersøkelser av bakteriesammensetning i ileum på slekts- og familienivå ble det sett nedregulering av flere symbiotiske arter i alle forsøksgrupper, om enn i noe mindre grad i villtypemus på høyfettdiett med fababønnefraksjon. Videre så det ut til at både genotypen og dietten hadde en effekt på mikrobiotasammensetningen i ileum.

De forberedende flowcytometriske kvantifiseringsanalysene tydet på en negativ korrelasjon mellom bakteriekvantitet i ileumkymprøver og lagringstid. Derfor ble flowcytometri gjennomført samme dag som prøveuttak. Videre ble det sett at fababønnefraksjonen hadde en regulerende effekt på bakterieantallet i ileum, mens fravær av NOX1, samt ren høyfett diett førte til store variasjonen i bakteriekvantitet. Antallet bakterier i ileum ble flowcytometrisk bestemt å være i størrelsesorden 10^9 - 10^{10} .

Til sammen ga resultatene en viss indikasjon på at NOX1-indusert ROS har en positivt regulativ effekt på tarmmikrobiotasammensetning og -kvantitet, samt at fababønnefraksjon kunne motvirke noen av de dysbioseassosierte effektene skapt av høyfettdietten.

KILDER

- Ahmed, S., Macfarlane, G. T., Fite, A., McBain, A. J., Gilbert, P., & Macfarlane, S. (2007). Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Appl Environ Microbiol*, 73(22), 7435-7442. doi:10.1128/aem.01143-07
- Alam, A., Leoni, G., Quiros, M., Wu, H., Desai, C., Nishio, H., . . . Neish, A. S. (2016). The microenvironment of injured murine gut elicits a local pro-restitutive microbiota. *Nat Microbiol*, 1, 15021. doi:10.1038/nmicrobiol.2015.21
- Arzumanian, V., Stankevicius, E., Laukeviciene, A., & Kevelaitis, E. (2003). [Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells]. *Medicina (Kaunas)*, 39(6), 535-541.
- Avershina, E., Lundgard, K., Sekelja, M., Dotterud, C., Storro, O., Oien, T., . . . Rudi, K. (2016). Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environ Microbiol*, 18(7), 2226-2236. doi:10.1111/1462-2920.13248
- Avershina, E., Storro, O., Oien, T., Johnsen, R., Pope, P., & Rudi, K. (2014). Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children. *FEMS Microbiol Ecol*, 87(1), 280-290. doi:10.1111/1574-6941.12223
- Barrett, K. E. (2014). *Gastrointestinal Physiology* (2 ed.). USA: McGraw-Hill Education.
- Bartolomucci, A., Cabassi, A., Govoni, P., Ceresini, G., Cero, C., Berra, D., . . . Palanza, P. (2009). Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoS One*, 4(1), e4331. doi:10.1371/journal.pone.0004331
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C., Charles, T., . . . Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0
- Brando, B., Barnett, D., Janossy, G., Mandy, F., Autran, B., Rothe, G., . . . Gratama, J. W. (2000). Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*, 42(6), 327-346. doi:10.1002/1097-0320(20001215)42:6<327::aid-cyto1000>3.0.co;2-f
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., . . . Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15718-15723. doi:10.1073/pnas.0407076101
- Cândido, F. G., Valente, F. X., Grześkowiak Ł, M., Moreira, A. P. B., Rocha, D., & Alfenas, R. C. G. (2018). Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J Food Sci Nutr*, 69(2), 125-143. doi:10.1080/09637486.2017.1343286
- Casén, C., Vebø, H. C., Sekelja, M., Hegge, F. T., Karlsson, M. K., Ciemniejewska, E., . . . Rudi, K. (2015). Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Aliment Pharmacol Ther*, 42(1), 71-83. doi:10.1111/apt.13236
- Cryan, J. F., & O'Mahony, S. M. (2011). The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*, 23(3), 187-192. doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x
- Daiber, A., Oelze, M., Steven, S., Kröller-Schön, S., & Münzel, T. (2017). Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and

- their use in the cardiovascular system. *Redox Biol*, 12, 35-49.
doi:10.1016/j.redox.2017.02.001
- David L. Nelson, M. M. C. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (6 ed.). NY, USA: Macmillan Higher Education
- Delahaye, L. B., Bloomer, R. J., Butawan, M. B., Wyman, J. M., Hill, J. L., Lee, H. W., . . . van der Merwe, M. (2018). Time-restricted feeding of a high-fat diet in male C57BL/6 mice reduces adiposity but does not protect against increased systemic inflammation. *Appl Physiol Nutr Metab*, 43(10), 1033-1042. doi:10.1139/apnm-2017-0706
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*, 54(9), 2325-2340. doi:10.1194/jlr.R036012
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 14(1), 20-32. doi:10.1038/nrmicro3552
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de Leon, A., & Sanchez-Flores, A. (2015). The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet*, 6, 348. doi:10.3389/fgene.2015.00348
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., . . . Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341(6141), 1237439. doi:10.1126/science.1237439
- Fontana, C., Crussard, S., Simon-Dufay, N., Pialot, D., Bomchil, N., & Reyes, J. (2017). Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic *Leptospira* strains. *J Microbiol Methods*, 132, 34-40. doi:10.1016/j.mimet.2016.10.013
- Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., & Woese, C. R. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(10), 4537-4541. doi:10.1073/pnas.74.10.4537
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33(7), 829-837, 837a-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
- Gdala J., B. L. (1997). Chemical composition and carbohydrate content of several of faba bean and pea seeds. *Journal of Animal Feed Science*(6), 123-135.
- Gentry, I. P. C. G. T. (2015). *Environmental Microbiology* (3 ed.): Elsevier.
- Goiffon, R. J., Martinez, S. C., & Piwnica-Worms, D. (2015). A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma. *Nat Commun*, 6, 6271. doi:10.1038/ncomms7271
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., & Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science*, 310(5749), 847-850. doi:10.1126/science.1117311
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8. doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003
- Helander, H. F., & Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol*, 49(6), 681-689. doi:10.3109/00365521.2014.898326
- Hernández-García, D., Wood, C. D., Castro-Obregón, S., & Covarrubias, L. (2010). Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radic Biol Med*, 49(2), 130-143. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.020
- Hicks, J. A., Hatzidis, A., Arruda, N. L., Gelineau, R. R., De Pina, I. M., Adams, K. W., & Seggio, J. A. (2016). Voluntary wheel-running attenuates insulin and weight gain and affects anxiety-like behaviors in C57BL6/J mice exposed to a high-fat diet. *Behav Brain Res*, 310, 1-10. doi:10.1016/j.bbr.2016.04.051

- Hills, R. D., Jr., Pontefract, B. A., Mishcon, H. R., Black, C. A., Sutton, S. C., & Theberge, C. R. (2019). Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. *Nutrients*, *11*(7). doi:10.3390/nu11071613
- Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, *8*(2), 172-184. doi:10.1080/19490976.2017.1290756
- Jeong, M. Y., Jang, H. M., & Kim, D. H. (2019). High-fat diet causes psychiatric disorders in mice by increasing Proteobacteria population. *Neurosci Lett*, *698*, 51-57. doi:10.1016/j.neulet.2019.01.006
- Jones, R. M., & Neish, A. S. (2011). Recognition of bacterial pathogens and mucosal immunity. *Cell Microbiol*, *13*(5), 670-676. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01579.x
- Jones, R. M., & Neish, A. S. (2017). Redox signaling mediated by the gut microbiota. *Free Radic Biol Med*, *105*, 41-47. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.495
- Khomtchouk, K. M., Weglarz, M., Bekale, L. A., Koliesnik, I., Bollyky, P. L., & Santa Maria, P. L. (2019). Quantitative assessment of bacterial growth phase utilizing flow cytometry. *J Microbiol Methods*, *167*, 105760. doi:10.1016/j.mimet.2019.105760
- Kielland, A., Blom, T., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., Blomhoff, R., & Carlsen, H. (2009). In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radic Biol Med*, *47*(6), 760-766. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.013
- Knaus, U. G. (2020). Oxidants in Physiological Processes. *Handb Exp Pharmacol*. doi:10.1007/164_2020_380
- Lambrecht, J., Schattenberg, F., Harms, H., & Mueller, S. (2018). Characterizing Microbiome Dynamics - Flow Cytometry Based Workflows from Pure Cultures to Natural Communities. *J Vis Exp*(137). doi:10.3791/58033
- Lea, T. (2017). *Immunologi og immunologiske teknikker* (3 ed.). Bergen: Fagbokforlaget.
- Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Jr., Dionne, L., Lu, N., . . . Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(18), 9782-9787. doi:10.1073/pnas.93.18.9782
- Lennon, G., Balfe, Á., Bambury, N., Lavelle, A., Maguire, A., Docherty, N. G., . . . O'Connell, P. R. (2014). Correlations between colonic crypt mucin chemotype, inflammatory grade and *Desulfovibrio* species in ulcerative colitis. *Colorectal Dis*, *16*(5), O161-169. doi:10.1111/codi.12503
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, *444*(7122), 1022-1023. doi:10.1038/4441022a
- Li, Y., Huang, T. T., Carlson, E. J., Melov, S., Ursell, P. C., Olson, J. L., . . . Epstein, C. J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, *11*(4), 376-381. doi:10.1038/ng1295-376
- Litvak, Y., Byndloss, M. X., Tsohis, R. M., & Bäumlner, A. J. (2017). Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. *Curr Opin Microbiol*, *39*, 1-6. doi:10.1016/j.mib.2017.07.003
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, *489*(7415), 220-230. doi:10.1038/nature11550
- Magi, A., Semeraro, R., Mingrino, A., Giusti, B., & D'Aurizio, R. (2018). Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Brief Bioinform*, *19*(6), 1256-1272. doi:10.1093/bib/bbx062

- Mandal, D. F., P.; Levine, A. D. . (2010). REDOX regulation of IL-13 signaling in intestinal epithelial cells: usage of alternate pathways mediates distinct gene expression patterns. *Cellular signalling*, *22*(10), 1485–1494. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.017>
- Martín-Babrejas, M. Á. (Ed.) (2019). *Legumes - Nutritional Quality, Processing and Potential Health Benefits* (Vol. 8). UK: The Royal Society of Chemistry.
- Matziouridou, C., Rocha, S. D. C., Haabeth, O. A., Rudi, K., Carlsen, H., & Kielland, A. (2018). iNOS- and NOX1-dependent ROS production maintains bacterial homeostasis in the ileum of mice. *Mucosal Immunol*, *11*(3), 774-784. doi:10.1038/mi.2017.106
- Miao, L., & St Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*, *47*(4), 344-356. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., . . . Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*, *81*(4). doi:10.1128/mbr.00036-17
- Moncada, S., & Higgs, E. A. (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1), 213-254. doi:10.1007/3-540-32967-6_7
- Monk J. M., L. D., Wua W., Graf D., McGillis L. H., Hussain A., Carey C., Robinson L. E., Liu R., Tsao R., Brummer Y., Tosh S. M., & A., P. K. (2017). Chickpea-supplemented diet alters the gut microbiome and enhances gut barrier integrity in C57Bl/6 male mice. *Journal of Functional foods*, *38*, 663-674.
- Monk, J. M., Lepp, D., Wu, W., Pauls, K. P., Robinson, L. E., & Power, K. A. (2017). Navy and black bean supplementation primes the colonic mucosal microenvironment to improve gut health. *J Nutr Biochem*, *49*, 89-100. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.08.002
- Monk, J. M., Wu, W., Hutchinson, A. L., Pauls, P., Robinson, L. E., & Power, K. A. (2018). Navy and black bean supplementation attenuates colitis-associated inflammation and colonic epithelial damage. *J Nutr Biochem*, *56*, 215-223. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.02.013
- Monk, J. M., Wu, W., McGillis, L. H., Wellings, H. R., Hutchinson, A. L., Liddle, D. M., . . . Power, K. A. (2018). Chickpea supplementation prior to colitis onset reduces inflammation in dextran sodium sulfate-treated C57Bl/6 male mice. *Appl Physiol Nutr Metab*, *43*(9), 893-901. doi:10.1139/apnm-2017-0689
- Monk, J. M., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., Liu, R., . . . Power, K. A. (2015). White and dark kidney beans reduce colonic mucosal damage and inflammation in response to dextran sodium sulfate. *J Nutr Biochem*, *26*(7), 752-760. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.02.003
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, *14*(10), 667-685. doi:10.1038/nri3738
- Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, *136*(1), 65-80. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.080
- Ou, F., McGovern, C., Swift, S., & Vanholsbeeck, F. (2017). Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry. *J Appl Microbiol*, *123*(2), 464-477. doi:10.1111/jam.13508
- Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., & Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*, *12*(1), 5-23. doi:10.1038/cmi.2014.89

- Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., & Darley-Usmar, V. M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*, *1411*(2-3), 385-400. doi:10.1016/s0005-2728(99)00028-6
- Pircalabioru, G., Aviello, G., Kubica, M., Zhdanov, A., Pacllet, M. H., Brennan, L., . . . Knaus, U. G. (2016). Defensive Mutualism Rescues NADPH Oxidase Inactivation in Gut Infection. *Cell Host Microbe*, *19*(5), 651-663. doi:10.1016/j.chom.2016.04.007
- Pryor, W. A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol*, *48*, 657-667. doi:10.1146/annurev.ph.48.030186.003301
- Ronis, M. J., Sharma, N., Vantrease, J., Borengasser, S. J., Ferguson, M., Mercer, K. E., . . . Badger, T. M. (2013). Female mice lacking p47phox have altered adipose tissue gene expression and are protected against high fat-induced obesity. *Physiol Genomics*, *45*(9), 351-366. doi:10.1152/physiolgenomics.00148.2012
- Salyers, A. A., Vercellotti, J. R., West, S. E., & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of Bacteroides from the human colon. *Appl Environ Microbiol*, *33*(2), 319-322. doi:10.1128/aem.33.2.319-322.1977
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, *12*(6), R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Shaked, H., Hofseth, L. J., Chumanovich, A., Chumanovich, A. A., Wang, J., Wang, Y., . . . Karin, M. (2012). Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(35), 14007-14012. doi:10.1073/pnas.1211509109
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*, *33*(9), 496-503. doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.011
- Sivaraj, S., Chan, A., Pasini, E., Chen, E., Lawendy, B., Verna, E., . . . Bhat, M. (2020). Enteric dysbiosis in liver and kidney transplant recipients: a systematic review. *Transpl Int*. doi:10.1111/tri.13696
- Snelgrove, R., Williams, A., Thorpe, C., & Hussell, T. (2004). Manipulation of immunity to and pathology of respiratory infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, *2*(3), 413-426. doi:10.1586/14787210.2.3.413
- Stahl, M. M. J. M. K. B. D. B. D. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14 ed.). Essex, England: Pearson Education limited.
- Stumpff, F., Manneck, D., & Martens, H. (2019). Unravelling the secrets of the caecum. *Pflugers Arch*, *471*(7), 925-926. doi:10.1007/s00424-019-02292-1
- Szanto, I., Rubbia-Brandt, L., Kiss, P., Steger, K., Banfi, B., Kovari, E., . . . Krause, K. H. (2005). Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol*, *207*(2), 164-176. doi:10.1002/path.1824
- Takahashi, D., Hoshina, N., Kabumoto, Y., Maeda, Y., Suzuki, A., Tanabe, H., . . . Hase, K. (2020). Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells. *EBioMedicine*, *58*, 102913. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102913
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, *30*(9), 418-426. doi:10.1016/j.tig.2014.07.001

- Van Dyke, K., Ghareeb, E., Van Dyke, M., & Van Thiel, D. H. (2007). Ultrasensitive peroxy-nitrite-based luminescence with L-012 as a screening system for antioxidative/antinitrating substances, e.g. Tylenol (acetaminophen), 4-OH tempol, quercetin and carboxy-PTIO. *Luminescence*, 22(4), 267-274. doi:10.1002/bio.959
- Vandeputte, D., Kathagen, G., D'Hoe, K., Vieira-Silva, S., Valles-Colomer, M., Sabino, J., . . . Raes, J. (2017). Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*, 551(7681), 507-511. doi:10.1038/nature24460
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., . . . Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108. doi:10.1126/science.1208344
- Xiao, X., Yang, L., Pang, X., Zhang, R., Zhu, Y., Wang, P., . . . Cheng, G. (2017). A Mesh-Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut. *Nat Microbiol*, 2, 17020. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.20
- Yan, W., Sun, C., Zheng, J., Wen, C., Ji, C., Zhang, D., . . . Yang, N. (2019). Efficacy of Fecal Sampling as a Gut Proxy in the Study of Chicken Gut Microbiota. *Front Microbiol*, 10, 2126. doi:10.3389/fmicb.2019.02126
- Yang, J., Park, J., Park, S., Baek, I., & Chun, J. (2019). Introducing Murine Microbiome Database (MMDB): A Curated Database with Taxonomic Profiling of the Healthy Mouse Gastrointestinal Microbiome. *Microorganisms*, 7(11). doi:10.3390/microorganisms7110480
- Yokota, A., Fukiya, S., Islam, K. B., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., . . . Ishizuka, S. (2012). Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet? *Gut Microbes*, 3(5), 455-459. doi:10.4161/gmic.21216
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89(6), 670-679. doi:10.1002/bit.20347
- Zaborin, A., Penalver Bernabe, B., Keskey, R., Sangwan, N., Hyoju, S., Gottel, N., . . . Alverdy, J. C. (2020). Spatial Compartmentalization of the Microbiome between the Lumen and Crypts Is Lost in the Murine Cecum following the Process of Surgery, Including Overnight Fasting and Exposure to Antibiotics. *mSystems*, 5(3). doi:10.1128/mSystems.00377-20
- Zhang, J., Song, L., Wang, Y., Liu, C., Zhang, L., Zhu, S., . . . Duan, L. (2019). Beneficial effect of butyrate-producing Lachnospiraceae on stress-induced visceral hypersensitivity in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 34(8), 1368-1376. doi:10.1111/jgh.14536
- Zhang, Q., Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010). Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock*, 34(1), 55-59. doi:10.1097/SHK.0b013e3181cd8c08

VEDLEGG

VEDLEGG A – Programvarer og instrumenter

Programvarer	Referanser
Cell Stream™ Analysis 1.2.1	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
GraphPad Prism 8	GraphPad Software LLC
LEfSe	
Living Image Software	PerkinElmer, Waltham, MA
QIIME	
QuantaSoft Software	Bio-Rad Laboratories, Inc.,
SPSS	IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Instrumenter - produktnavn	Leverandør
Biomek 3000 Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Cambrex FLX 800 CSE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
epMotion 5070	Eppendorf International, Hamburg, Germany
Heto DW6–85 DryWinner	Heto-Holten, Denmark
IVIS Lumina	II Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
KingFisher Flex	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LightCycler 480 Instrument II	Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA
MagNA Lyser	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland
MiSeq	Illumina, San Diego, CA, USA

NanoDrop 2000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
QX200 Droplet Generator	BioRad Laboratories, Inc.,
QX200 Droplet Reader	BioRad Laboratories, Inc.,
Qubit flourometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

VEDLEGG B – Materialer

Kitt benyttet	Leverandør
Flow Cytometry Absolute Count Standard™	Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA
KAPA Library Quantification Kit Illumina® Platforms KR0405 – v8.17	KAPA Biosystems
Mag Midi kit, NAP40420	LGC Limited, Middlessex, UK
MiSeq Reagens Kit v3 600-cycle (MS-102-3003)	Illumina Advantage (TG), San Diego, CA, USA
Sera-mag speed beads	GE Lifesciences Europe GmbH, Buckinghamshire, UK
Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Kjemikalier	Leverandør
Dimetyl sulfoxid	Sigma-Aldrich
DNA Ladder Ready to Load	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Ethanol 96 % vol (20824.365)	VWR Chemicals
L-012 (120-04891)	Wako Pure Chemical Industries, Neuss, Tyskland
PBS	
SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain, 10 000x concentrate in DMSO	Invitrogen, Ltd., Paisley, UK Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

QX200TM ddPCRTM EvaGreen® supermix	Bothium, Inc.,
S.T.A.R Buffer	Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ
Neutral buffered formalin 10%	Sigma-Aldrich

VEDLEGG C – Virkestoff i ZRF

Virkestoffer i ZRF	Endelig konsentrasjon	Mengde
Fentanyl		2,6 µg
Tiletamine		3,3 mg
Xylazine		0,45 mg
Zolazepam		3,3 mg
Isotonisk NaCl		1 mL (0,9 %)

VEDLEGG D – Primere

Primere benyttet i førstestegs PCR **Sekvens**

Forward (PRK341F)	5 ‘ CCTACGGGRBGCASCAG 3‘
Revers (PRK806)	5 ‘ GGACTACYVGGGTATCTAAT 3‘

Primernavn **Forward primersekvens 5’ → 3’,
Målregion: 16S rRNA (V3-V4)**

F9	aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctgtttcgCCTAC GGGRBGCASCAG
F10	aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctcgtacgCCTA CGGGRBGCASCAG
F11	aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctgagtggCCTA CGGGRBGCASCAG
F12	aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctggtageCCTA CGGGRBGCASCAG
F13	aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctactgatCCTAC GGGRBGCASCAG

F14 aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctatgagcCCTA
CGGGRBGCASCAG

F15 aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctattcctCCTAC
GGGRBGCASCAG

F16 aatgatacggcgaccaccgagatctacacttttccctacacgacgcttccgatctcaaaagCCTA
CGGGRBGCASCAG

Revers primersekvens 5' → 3'

Primernavn

Målregion: 16S rRNA (V3-V4)

R13 caagcagaagacggcatacagagatTTGACTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R14 caagcagaagacggcatacagagatGGAACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R15 caagcagaagacggcatacagagatTGACATgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R16 caagcagaagacggcatacagagatGGACGGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R17 caagcagaagacggcatacagagatCTCTACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R18 caagcagaagacggcatacagagatGCGGACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R19 caagcagaagacggcatacagagatTTTCACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R20 caagcagaagacggcatacagagatGGCCACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R21 caagcagaagacggcatacagagatCGAAACgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R22 caagcagaagacggcatacagagatCGTACGgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

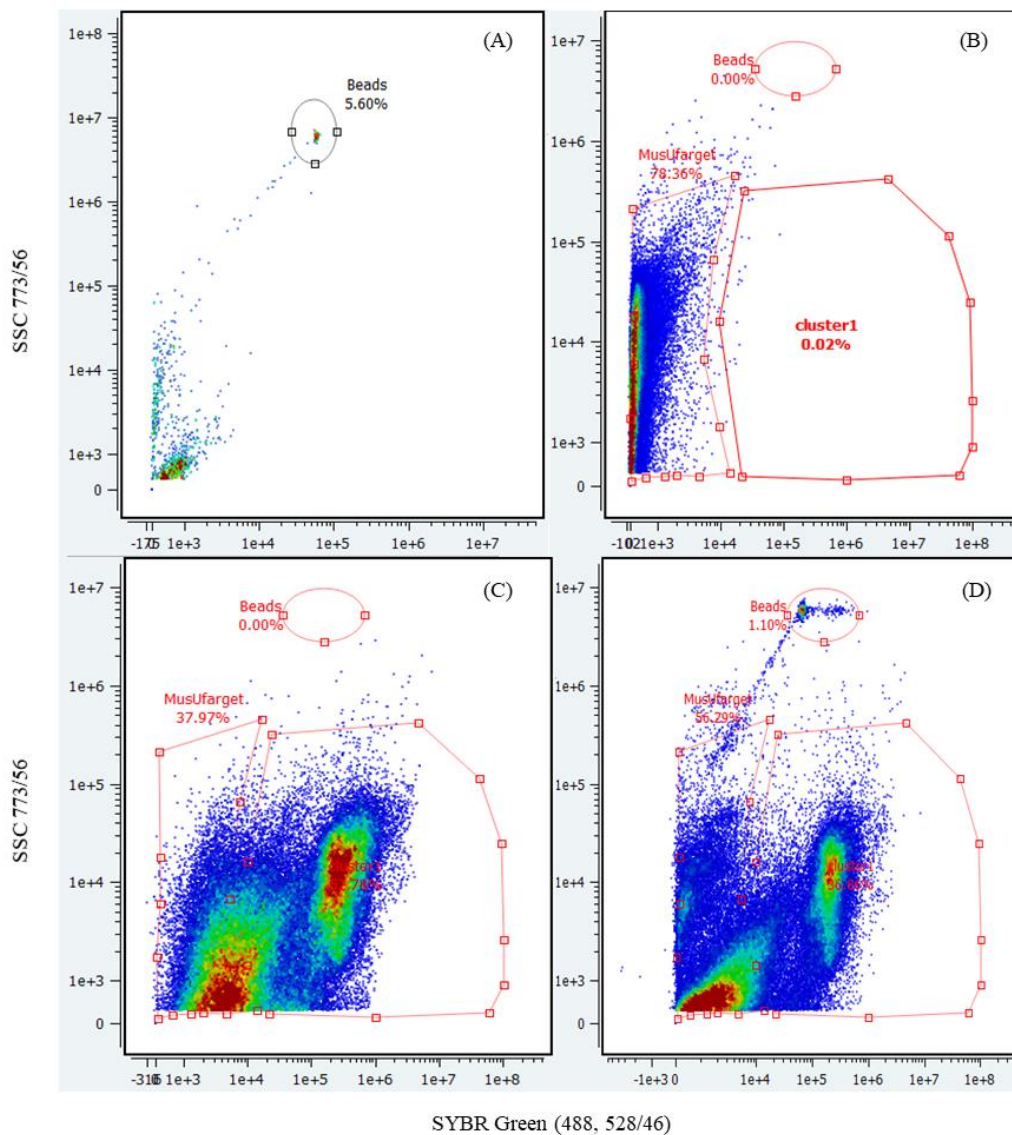
R23 caagcagaagacggcatacagagatCCACTCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R24 caagcagaagacggcatacagagatGCTACCgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

R25 caagcagaagacggcatacagagatATCAGTgtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctG
GACTACYVGGGTATCTAAT

VEDLEGG E – Utvelgelse av flowcytometrisk område

Definisjon og justering av kvantifiseringsområde ble gjort i CellStream™ Analysis ved å først bestemme og markere området hvor tellekulene havnet (A), deretter markere hvor de ufargede bakteriene havnet (B). Ut fra dette kunne nedre grense, *threshold*, bestemmes. Her bestemt til $Th = 300$. Videre ble området de fargede bakteriene havnet innenfor markert (C), før fortynninger med fargede bakterier med tellekuler ble analysert (D). Antall hendelser ble funnet og benyttet til videre analysering av bakteriekvantitet.





Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway