



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Tove Gulbrandsen Devold

Egenskaper til *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erteprotein i to ulike modeller av Caco-2 adenokarsinomceller

Properties of *in silico*-identified bioactive peptides from
pea protein in two different models of Caco-2
adenocarcinoma cells

Carina Wiker Holmemo
Matvitenskap

Forord

Denne oppgaven ble skrevet i forbindelse med fullføring av en toårig mastergrad i Matvitenskap i retning matvaretrygghet, -kvalitet og -hygiene ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU, Ås). Masteroppgaven utgjør 30 studiepoeng. Den er utført som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture arbeidspakke 4 som blant annet undersøker kvalitet og helseeffekter av proteinrike matplanter. Bærekraft, miljø og helse er av personlig interesse, og utnyttelse av proteinrike matplanter er en viktig del av overgangen mot et mer bærekraftig og helsefremmende kosthold. Eksperimentene knyttet til oppgaven ble utført i Meieribygget ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) på NMBU i Ås våren 2020.

Det rettes en takk til hovedveileder Tove Guldbrandsen Devold, samt medveiledere Tora Asledottir og Tor Erling Lea, for konstruktive tilbakemeldinger. En spesiell takk rettes til Tora Asledottir for hjelp til det praktiske arbeidet på laboratoriet og for hjelp til å fullføre det siste av påbegynt laboratoriearbeid i midten av mars 2020 da universitetet stengte som følge av Covid-19. I tillegg ønsker jeg å takke egen familie, min kjæreste med sin familie, medstudenter og venner for en enorm støtte i perioden der masteroppgaven har blitt formet.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, 2020

Carina Wiker Holmemo

Abstract

Background: As part of the FoodProFuture research project, it is desirable to investigate the possible health effects of protein-rich food plants. Following, *in vitro* digestion of pea flour, several peptides were identified - some of which were highly likely to have bioactive effects. Bioactive peptides are protein fragments that may affect the immune response. The same peptides were examined in more detail for their ability to affect the barrier function of the intestine. Components of food can affect the integrity of the intestinal epithelium which further can result in a smaller selection of constituents consumed by the body from the intestinal lumen.

Purpose: The purpose of this thesis was to investigate various properties that peptides from peas could have on the immune response and the intestinal epithelium.

Method: Selected peptide sequences were tested *in vitro* in Caco-2 cell model with IL-1 β -induced IL-8 production to investigate whether the peptides could have immunomodulatory activity. Also, TEER value was measured before and after peptide exposure to monolayers of polarized Caco-2 cells.

Results: In systems with both IL-1 β and the selected peptides, the results showed a trend in which the production of IL-8 was lower than IL-1 β alone. The TEER value was lower after the exposure of the selected peptides in all samples.

Conclusion: Based on the results of this paper, the selected peptides demonstrated inhibitory effects on IL-8-production in the model system with possible immunomodulatory consequences. The results also concluded that the selected peptides could affect the barrier function of the intestine with reduced integrity.

Sammendrag

Bakgrunn: Som en del av forskningsprosjektet FoodProFuture er det ønsket å undersøke mulige helseeffekter som ulike komponenter i proteinrike matplanter kan ha. Etter *in vitro*-fordøyelse av ertemel ble en rekke peptider identifisert, hvorpå noen hadde høy sannsynlighet for å ha bioaktiv effekt. Bioaktive peptider er proteinfragmenter som blant annet kan påvirke immunresponsen. De samme peptidene ble undersøkt nærmere for deres evne til å påvirke tarmens barrierefunksjon. Komponenter fra mat kan påvirke integriteten til tarmepitelet som videre kan medføre en mindre seleksjon av bestanddeler inn i kroppen fra tarmlumen.

Hensikt: Formålet med denne oppgaven var å undersøke ulike egenskaper peptider fra erteprotein kunne ha på immunresponsen og på permeabiliteten til tarmepitelet.

Metode: Utvalgte peptidsekvenser ble testet *in vitro* i en Caco-2-cellemodell med IL-1 β -indusert IL-8-produksjon for å undersøke om peptidene kunne ha immunmodulerende virkning. I tillegg ble TEER-verdi målt før og etter peptideksponering på monolag av Caco-2-celler.

Resultater: I systemer med både IL-1 β og utvalgte peptider viste resultatene en gjennomgående trend med redusert produksjon av IL-8 sammenlignet med IL-1 β -stimulering alene. TEER-verdien var lavere etter eksponering av de utvalgte peptidene i alle prøvene.

Konklusjon: Basert på resultatene i denne oppgaven kan utvalgte peptider fra erteprotein regulere immunresponsen i Caco-2-celler ved å inhibere IL-1 β -indusert IL-8-produksjon. Resultatene viste også at de utvalgte peptidene kunne redusere tarmepitelets permeabilitet etter eksponering i Caco-2-cellemonolag.

Forkortelser

BBI	Bowman-Birk proteasehemmere
BGMP	Bovine glykomakropeptid
Caco-2	Cancer coli-2
CD	Crohns sykdom
CO ₂	Karbondioksid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
HcC	Chenopodin med høy ladning
IBD	Inflammatorisk tarmsykdom
IBS	Irritabel tarmsyndrom
IL-1	Interleukin-1
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-1R	Interleukin-1 Reseptor
IL-1Ra	Interleukin-1 Reseptor antagonist
IL-1RI	Interleukin-1 Reseptor type I
IL-8	Interleukin-8
INF- γ	Interferon gamma
JAM	Junctional Adhesion Molecule, celleadhesjonsproteiner
LcC	Chenopodin med lite ladning
NEAA	Ikke-essensielle aminosyrer
NF- κ B	Kjernefaktor κ B
PBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
PepDK	Peptid med aminosyresekvens DKPWWPK
PepNE	Peptid med aminosyresekvens NEPWWPK
SFVM	Serumfritt vekstmedium
TEER	Transepitelial elektrisk motstand
TLR	Toll-liknende reseptor
TNF- α	Tumor nekrosefaktor alfa
UK	Ulcerøs kolitt
ZO-1	Zonula okkludens-1
ZO-2	Zonula okkludens-2

Innholdsfortegnelse

1.0	INNLEDNING	1
1.1	BÆREKRAFTIG OG HELSEFREMMEDE KOSTHOLD INKLUDERER MATPLANTER	1
1.1.1	<i>Et ubalansert globalt matsystem under økende press</i>	1
1.1.2	<i>Plantebasert kosthold gir helsefordeler</i>	2
1.1.3	<i>FoodProFuture og erteprotein</i>	4
1.2	KOMPONENTER FRA MAT PÅVIRKER TARMEN.....	5
1.2.1	<i>Tarmkanalens oppbygging og fordøyelse av proteiner</i>	5
1.2.2	<i>Viktige celler i tarmen</i>	6
1.2.3	<i>Fysisk barriere beskytter kroppens indre</i>	8
1.2.4	<i>Kjemisk cellekommunikasjon og inflammasjon</i>	11
1.2.5	<i>Tarmsykdommer</i>	14
1.2.6	<i>Bioaktive peptider fra mat</i>	15
1.3	METODETEORI	17
1.3.1	<i>Caco-2-celler</i>	17
1.3.2	<i>In vitro-immunoassay i Caco-2-celler</i>	18
1.3.3	<i>TEER av Caco-2-cellemonolag</i>	20
1.4	HENSIKT MED OPPGAVEN.....	21
2.0	MATERIALER OG METODE	22
2.1	DYRKING OG VEDLIKEHOLD AV CACO-2-CELLER.....	23
2.1.1	<i>Opptining og dyrking av Caco-2-celler</i>	23
2.1.2	<i>Splitting og vedlikehold av Caco-2-celler</i>	24
2.2	IN VITRO IMMUNOASSAY	24
2.2.1	<i>IL-1β-indusert IL-8-produksjon i Caco-2-celler</i>	24
2.2.2	<i>Måling av IL-8 med sandwich ELISA</i>	27
2.3	TEER-MÅLING AV CACO-2-CELLEMONOLAG.....	28
2.4	STATISTISK ANALYSE OG DATABEHANDLING	29
3.0	RESULTATER	30
3.1	EFFEKT AV PEPDK OG PEPNE PÅ IL-8-PRODUKSJON I CACO-2-CELLER	30
3.2	EFFEKT AV PEPDK OG PEPNE PÅ PERMEABILITETEN TIL CACO-2-CELLEMONOLAG	34
4.0	DISKUSJON	38
4.1	PEPTIDENES EFFEKT PÅ IL-8-PRODUKSJON	38
4.2	PEPTIDENES EFFEKT PÅ TARMEPITELET'S PERMEABILITET.....	44
5.0	KONKLUSJON	48
	REFERANSER	49
	VEDLEGG	54
	VEDLEGG 1	54
	VEDLEGG 2	54
	VEDLEGG 3	55
	VEDLEGG 4.....	56
	VEDLEGG 5.....	56
	VEDLEGG 6.....	58
	VEDLEGG 7.....	59

1.0 Innledning

1.1 Bærekraftig og helsefremmende kosthold inkluderer matplanter

1.1.1 Et ubalansert globalt matsystem under økende press

Det globale matsystemet er under økende press grunnet blant annet vekst i verdensbefolkningen og endringer i klima ¹. Befolkningsvekst vil bety at flere individer vil ha et næringsbehov å dekke. Klimaendringer på sin side vil kunne gi redusert produksjonskapasitet ². Samtidig er matsystemet ubalansert med store forskjeller i ulike deler av verden ^{2, 3}. 800 millioner mennesker er underernærte samtidig som to millioner voksne mennesker lider av overvekt og fedme. Matsystemet inkluderer produksjon og forbruk av mat, samt foredling og distribusjon ². Utviklingen av dagens matsystem har gjennom globalisering, industriell produksjon og lange forsyningskjeder kunnet gi verdensbefolkningen et variert kosthold ⁴. I tillegg har store matvolum blitt produsert av det globale matsystemet til verdens matmarked ¹.

Et bærekraftig kosthold innebærer at matkonsumet og -produksjonen skal sikre tilstrekkelig mengder mat til verdensbefolkningen og som samtidig bidra til god helse, men uten at det går på bekostning av fremtidige generasjoner sin mulighet til det samme ¹. Et bærekraftig matsystem fremmer god folkehelse, har liten innvirkning på miljøet og det øker matsikkerheten ⁴. Matsikkerhet er et begrep som omhandler tilgjengeligheten ethvert menneske har til mat ¹. Graden av selvforsyning sier noe om hvor mye av matforbruket Norge selv produserer. Med hensyn på beredskap ved krig og i krisetider er det spesielt viktig med en høy selvforsyningsgrad i landet ⁵.

For fisk og kjøtt er Norge i høy grad selvforsynte, mens graden av selvforsyning er betydelig lavere for planteprodukter ⁵. For sistnevnte er det både utfordringer knyttet til produksjonens avlingsstørrelse og hvilke vekster det er mulig å dyrke frem ¹. Store deler av jordbruksarealet er lokalisert i bratt terreng og vekstsesongen er kort grunnet lite varme totalt gjennom året. Samtidig er det store variasjoner i værforholdene og utfordringer med å få god nok dyrkejord, noe som påvirker produksjonsutfallet i vekstsesongen. Norge er et av de landene i verden med lavest andel jordbruksareal. Av det totale landarealet i Norge utgjør jordbruket rundt 3,7 %, hvorav 2/3 av jordbruksarealet benyttes til å produsere grovfôr til husdyr ^{1, 3}. De klimatiske

forholdene gjør også at det kun er mulig med produksjonen av gress i store deler av Norge, som videre benyttes til kjøttproduksjonen¹. Gressproduksjon utgjør 60 % av jordbruksarealet. Det globale matsystemet er ansvarlig for mellom 22 og 37 % av verdens klimagassutslipp, hvorunder jordbruk, prosessering og distribusjon er blant årsaker til utslippene^{2, 3}. Produksjonen av forskjellige matvarer bidrar med ulikt utslipp av klimagasser⁶, og produksjonen av husdyr anses å være en viktig kilde til klimagassutslipp³. Spesielt er oppmerksomheten rettet mot utslippet av metangass ved produksjonen av rødt kjøtt og melk^{1, 2}. Under fordøyelsen til drøvtyggere frigis det tarmgass, slik som metan, som følge av mikrobiell gressnedbrytning i vommen^{1, 3}. CO₂-ekvivalenter er enheten som benyttes når oppvarmingseffekten av klimagasser estimeres¹. De forskjellige gassene gir ulikt potensial for oppvarming. Enkelt vurderes de ulike gassene ut ifra enheten CO₂-ekvivalent, som tilsvarer den effekten 1 tonn karbondioksid vil ha på global oppvarming gjennom 10 tiår. 25 tonn karbondioksid tilsvarer 1 tonn med metangass. Ved produksjon av en kilo storfe vil utslippet være på cirka 12 til 30 kg CO₂-ekvivalenter^{1, 3}. Til sammenligning vil andelen CO₂-ekvivalenter fra produksjonen av en kilo gris eller kylling være på to til fem kg. Produksjonen av de fleste matplanter vil bidra til langt mindre utslipp sammenlignet med animalske produkter.

Estimater av effekten til ulike reduksjonstiltak for utslipp av klimagasser har blitt utarbeidet³. En overgang til et mer plantebasert kosthold fra et kosthold med mye rødt kjøtt kan redusere utslippene i jordbruket med omlag 2,9 million CO₂-ekvivalenter per dag. En endring i matkonsum og -produksjon vil derfor være essensielt for å imøtekomme behovet for et mer bærekraftig matsystem². I et skifte mot et mer bærekraftig matsystem vil det derfor være viktig å konsumere og produsere mindre matvarer fra animalsk opprinnelse til fordel for vegetabiliske matvarer^{7, 6}. Matvarene bør i tillegg kreve minimalt med transport og bruk av lokalprodusert mat bør fremmes⁶.

1.1.2 Plantebasert kosthold gir helsefordeler

Forbruket av kjøtt har økt i Norge de siste 10 årene med omlag 7 %¹. Globalt er det forventet at kjøttforbruket fortsatt vil øke, men at det vil være noe lavere³. I industriland, slik som Norge, er det derimot forventet en nedgang i årene fremover. Årsaken til dette er at bevisstheten rundt klimaeffekter har blitt større samtidig med økt kunnskap knyttet til helsekonsekvensene. Høyt inntak av rødt kjøtt som lam, svin eller storfe, er assosiert med økt risiko for negative

helseeffekter og tap av leveår ². Herunder er ikke-smittsomme sykdommer som hjerneslag, diabetes type 2 eller hjerte- og karsykdom årsaker. Fordi rødt kjøtt er en energirik matvare kan et høyt inntak føre til overvekt ⁸. I tillegg er kreft i tykk- og endetarm tilknyttet høyt inntak av rødt kjøtt ^{2,9}. For henholdsvis kvinner og menn er kolorektal kreft den andre og tredje hyppigste årsaken til kreft ⁸. Andre former for kreft har også blitt sett i sammenheng med rødt kjøtt, hvorunder bukspyttkjertel-, spiserørs-, mage- og brystkreft er eksempler ^{2,6,8}. Likeledes har lungekreft blitt koblet til konsumet av rødt kjøtt ⁶.

Av helsemessige årsaker anbefaler Helsedirektoratet et primært plantebasert kosthold ⁶. Det vil derfor være behov for å øke inntaket av vegetabilier i befolkningen. Matplanter er ofte næringsrike, generelt kalorifattige, rike på fiber og har en bedre fettprofil. Imidlertid er det svært viktig å sikre vegetabilier som er gode proteinkilder. Proteiner er et energigivende makronæringsstoff som har flere nødvendige funksjoner i kroppen ⁹. Funksjonen til proteiner hos mennesker omfatter blant annet oppbygging og vedlikehold av hud, slimhinner, skjelett, bindevev og muskulatur. Proteiner er viktig for transport av næringsstoffer og oksygen i blodet, samt transport av andre stoffer rundt i kroppen. De bidrar også til lagring av ulike stoffer og deltar i immunresponsen. Proteinrike vegetabilier er til eksempel belgvekster ⁶. Det er samlebetegnelsen for blant annet linser, bønner og erter. Et økt inntak av belgvekster er antatt å redusere risikoen for hjerneslag, hypertensjon og hjertesykdom ¹. Det er også indikert at et økt konsum vil kunne gi lavere risiko for kreft i prostata, magesekk og i tykk- og endetarm.

Ettersom protein er livsnødvendig for kroppen har proteininnholdet betydning for den ernæringsmessige verdien til enkeltmatvarer ⁹. Ved mangel på protein vil immunforsvaret, hukommelsen og hormonproduksjonen bli nedsatt. Barn i utviklingsland som dør av under- eller feilernæring dør ofte av sykdom som medfølger et svekket immunforsvar ¹⁰. Videre kan proteinmangel føre til lave nivåer av hemoglobiner og redusert sårheling. Muskelsvinn vil forekomme, samtidig som svimmelhet og slapphet vil være konsekvenser ⁹. Ved tap av muskelmasse kan kroppens forbreningen bli redusert ¹⁰. For barn i vekst, kronisk syke for eldre som mister mye av muskelmassen, er det ekstremt viktig med tilfredsstillende inntak av protein ^{2, 11}. Basert på kunnskapen knyttet til proteinmangel og sykdom er det derfor viktig å sikre gode proteinkilder til befolkningen, selv ved et skiftet til et mer bærekraftig matkonsum.

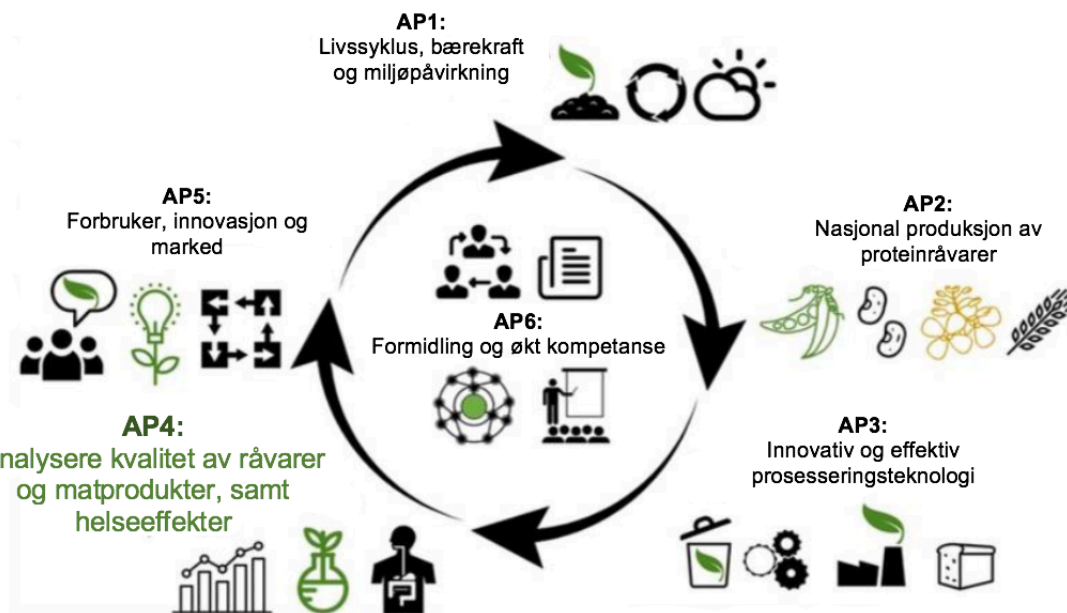
1.1.3 FoodProFuture og erteprotein

På verdensbasis er erter (*Pisum sativum*) en av de mest produserte proteinrike matplantene ¹². De tilhører erteblomstfamilien Fabaceae ¹³. Erter har et lavt innhold av fett, og høyt innhold av karbohydrater og protein ¹². For sistnevnte utgjør innholdet 25 % i snitt, men det varierer ut ifra art og planter. I tillegg til å være rik på protein, har erter en relativt god proteinkvalitet sammenlignet med andre proteinrike vegetabiler. Årsaken til at erter betraktes for å ha en god proteinkvalitet er at matplanten inneholder en rekke essensielle aminosyrer. Imidlertid er innholdet av cystein og metionin lavt. Erter har derimot et høyt innhold av lysin, som til eksempel er en begrenset aminosyre i korn. Proteiner fra erter har i tillegg en fordøyelighet på mellom 90 og 95 %.

Ved siden av å ha en gunstig proteinprofil er fordelen med erter at de i stor grad kan dyrkes overalt i verden, og i Norge har det blitt dyrket frem erter i velegnede områder helt siden vikingtiden ^{1, 14}. Imidlertid er det begrenset hvor i landet erter kan dyrkes og produksjonsarealet konkurrerer mot andre vekster slik som korn ^{1, 15}. Av det norske kornarealet er det under 1 % som brukes til produksjon av erter, hvorpå resten av forbruket importeres ¹⁵. Allikevel ligger det et potensiale i å øke dyrkningsomfanget av erter i Norge ^{1, 15}. Imidlertid er det nødvendig med tilpassede sorter som enkelt kan fremdyrkes i norske forhold. Lengde på vekstsesongen, temperatur, nedbørsforhold og jordsmonn er faktorer som påvirker produksjonen av vekster ³. De ertesortene som finnes tilgjengelig for forbrukerne på markedet, er ikke gunstig å dyrke i norske forhold ¹⁵. Det meste av norskproduserte erter går per dags dato til dyrefôr, samtidig som etterspørselen kjøtterstatningsprodukter laget av planteproteiner øker.

Forskningsprosjektet FoodProFuture ønsker å etablere en kunnskapsplattform for plantevekster som har potensiale til å dyrkes i de norske klimatiske forhold ⁷. Ved siden av studier om dyrking av råvarene, nye prosesseringsmetoder, forbrukerpreferanser og sensoriske analyser, ønsker prosjektet å opparbeide kunnskap rundt planteproduktenes kvalitetsegenskaper. Prosjektet er delt inn i seks arbeidspakker med ulike fokusområder (se figur 1.1.3.A). Denne masteroppgaven er en del av arbeidspakke 4 (AP4) som blant annet har som mål å analysere kvaliteten til råvarer og matprodukter, men også se nærmere på helseeffekter av planteproteiner ⁷. Under fokusområdet til AP4 der helseeffekter studeres, er det beskrevet i prosjektskissen at menneskelige fordøyelsesenzymer har blitt benyttet til *in vitro*-fordøyelse av planteproteiner ¹⁶. Videre er det beskrevet at *in vitro*-cellemodeller benyttes til å undersøke mulige effekter av

ferdigfordøyde planteproteiner på epitel- og immunceller, samt inflammasjonsprosesser. En spesiell vekt ønsker AP4 å legge på studier av blant annet tarmbarrierefunksjon og systemisk inflammasjon ettersom disse er spesielt viktig ved kroniske livsstilssykdommer.



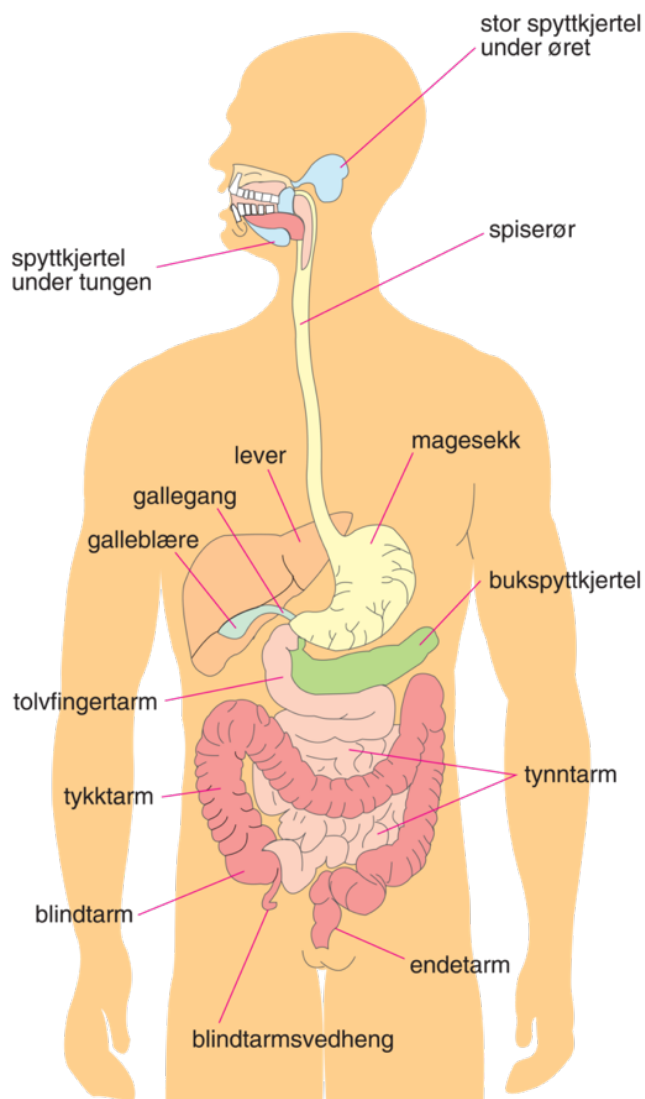
Figur 1.1.3.A: En modifisert illustrasjon av de seks arbeidspakkene (AP) til forskningsprosjektet FoodProFuture, hvorpå AP4 omhandler kvaliteten og helseeffekter av ulike matvarer⁷. Denne masteroppgaven er en del av A4 der helseeffekter av peptider fra fordøyd ertemel bli undersøkt nærmere.

1.2 Komponenter fra mat påvirker tarmen

1.2.1 Tarmkanalens oppbygging og fordøyelse av proteiner

Under fordøyelsesprosessen tas nødvendige næringsstoffer fra maten opp i kroppen og avfallsstoffer skilles ut^{9, 11}. Kanalen der maten fordøyes er flere meter lang og strekker seg fra munnhulen til endetarmsåpningen (se figur 1.2.1.A). Fordøyelsessystemet har nærliggende organer som bidrar med forskjellige funksjoner i nedbrytningen av føden, slik som bukspyttkjertelen, leveren og galleblæren. Tarmkanalen defineres som området fra etter magesekken og frem til endetarmsåpningen, og deles ytterligere inn i tynn- og tykktarm. Tynntarmen består av tre deler, tolvfingertarmen (*duodenum*), tomtarmen (*jejunum*) og krumtarmen (*ileum*). I tynntarmen foregår absorpsjonen av næringsstoffer. Tarmepitelen er strukturert på en slik måte at opptaksoverflaten er størst mulig¹⁷. Cellelagstrukturen er foldet i tarmtotter med mikrovilli. Tykktarmen på sin side består av blindtarmen (*coecum*), tykktarmen (*colon*) og endetarmen (*rectum*)^{9, 11}. Her vil væske trekkes ut fra ikke-absorbert næringsmateriale og massen vil derfor bli fastere. Tilkoblet tarmsystemet er både blodforsyning og nerver.

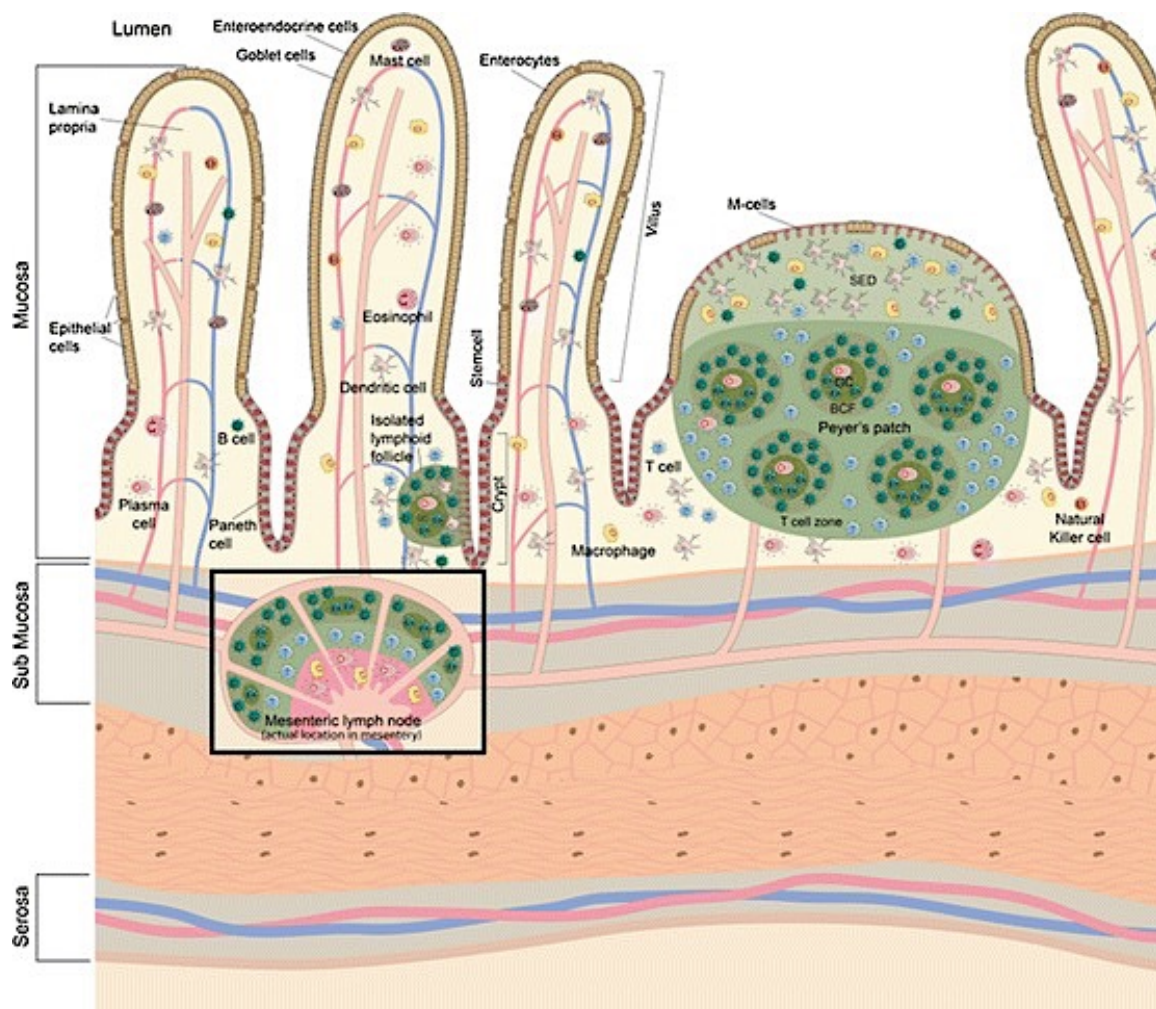
Selve fordøyelsen starter i munnhulen med tygging før næringsmidlet går videre ned til magesekken, også kjent som ventrikkelen ⁹. Her starter noe enzymatisk nedbrytning av proteiner som følge av at pepsinogen fra ventrikkelens hovedceller omdannes til pepsin. Saltsyren HCl bidrar til et surt miljø i ventrikkelen, som således gir en høyere pepsinaktivitet. Imidlertid foregår størst andel av proteinnedbrytningen i duodenum hvor bukspyttkjertelen bidrar med et enzymrikt og basisk sekret. De proteolytiske enzymene sørger for at proteinet blir brutt ned til korte peptider og aminosyrer som transporteres over tarmepitelet og til leveren via portåren. Videre frigjøres aminosyrer fra leveren hvor de da kan sirkulere fritt i plasma og fraktes til perifert vev hvor de kan tas opp av celler. Det er større konsentrasjon av aminosyrer intracellulært enn det er ekstracellulært. I tillegg blir aminosyrer brukt som energikilde av tarmceller og immunceller.



Figur 1.2.1.A: En illustrasjon av den humane mage-tarmkanalen lånt med tillatelse fra Store norske leksikon ¹⁸.

1.2.2 Viktige celler i tarmen

Tarmen er et utsatt område, noe som gir behov for et forsterket immunforsvar slik at trusler raskt kan identifiseres og ufarliggjøres ¹⁷. Det finnes en rekke forskjellige celler med ulike oppgaver i immunsystemet. Det medfødte immunforsvaret er spesielt viktig som førstelinjeforsvar og er spesialiserte til å handle raskt mot forskjellige grupper agens, slik som virus og bakterier. Et eksempel på slike immunceller er nøytrofile granulocytter. Immuncellene i det medfødte immunforsvaret vil imidlertid ikke utvikle seg når kroppen blir utsatt for nye fremmedstoffer. Det ervervede immunforsvaret, kalt lymfocytter, oppnår en bedre presisjon enn immuncellene i det medfødte immunforsvaret, og omtales også som det spesifikke forsvaret ¹⁷. Dette er fordi enkeltceller kan reagere på helt bestemte antigener via reseptorer på overflaten og ved gjenkjenning av et antigen vil den spesifikke immuncellen ekspandere klonalt.



Figur 1.2.2.A: Strukturen og ulike celler i tynntarmen ¹⁹. Den apikale siden er ut mot tarmlumen, imens den basolaterale siden er mot kroppens indre. Et enkelt epitelcellelag skiller tarminnholdet i lumen fra immuncellene som er i lamina propria og resten av kroppens indre miljø.

Celler i immunsystemet er ofte organisert i lymfoide vevstrukturer ¹⁷. Det skilles mellom primært og sekundært lymfatisk vev. I førstnevnte vev er utvikles og modnes de spesifikke immuncellene. Thymus og benmarg er inkludert i det primære lymfatisk vevet. Blant sekundært lymfatisk vev finnes både lymfeknuter, tonsiller og milten. Lymfocytter er oppsamlet rundt mage-tarmkanalen i slimhinneassosiert lymfoid vev, i tarmveggen i peyerske flekker og mellom cellene i tarmepitellaget. Blodbanen frakter også nødvendig immunforsvar til fordøyelseskanalen.

Tarmepitellaget består av ulike celletyper, i tillegg til lymfocytter ¹⁹. Det er begerceller som skiller ut slim, hormonutskillende enteroendokrine celler, enterocytter som absorberer næringsstoffer og paneth-celler som står for sekresjon av antimikrobielle peptider. Sistnevnte har virkning på blant annet patogene mikroorganismer ¹⁷. Slim produsert fra begerceller kalles for mukus og ved skader på epitellaget kan produksjonen av mukus øke da det har en beskyttende effekt under reparasjon av tarmepitelet. Det finnes i tillegg et mindretall av andre celler i epitelet med andre oppgaver. Deriblant er M-celler spesialiserte epitelceller som kontrollerer alt tarminnholdet i lumen ved å frakte komponenter fra innholdet inn til såkalte peyerske flekker der det er rikelig med immunceller. Immuncellene registrerer forskjellige inntrengere i tarminnholdet som må ufarliggjøres. Figur 1.2.2.A viser en illustrasjon av et utsnitt fra tynntarmen med påfølgende immunsystem og celler.

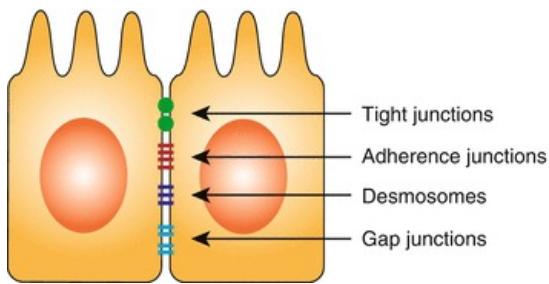
1.2.3 Fysisk barriere beskytter kroppens indre

Tarmepitellaget fungerer som en fysisk barriere som skiller tarminnholdet i lumen fra kroppens indre ¹⁹. Den siden av tarmepitelet som vender ut mot tarmlumen betegnes som den apikale siden, mens siden som er vendt mot kroppens indre kalles for basolateral side ¹⁷. Det er kun et monolag med epitelceller som skiller tarminnholdet i lumen fra kroppens indre ²⁰. Hensikten med barrieren er å sikre at ikke tarminnholdet passerer inn i kroppen uselektert ¹⁹. Eksempler på tarmmateriale som er uønsket i kroppen er fordøyelsesenzymer, mikroorganismer og annet fremmed materiale. Fremmedstoffer fra tarminnholdet kan fremkalle allergier eller virke toksiske ²¹. Samtidig er oppgaven til tarmepitelet å absorbere næringsstoffer, ioner og vann fra lumen og inn i kroppen ²².

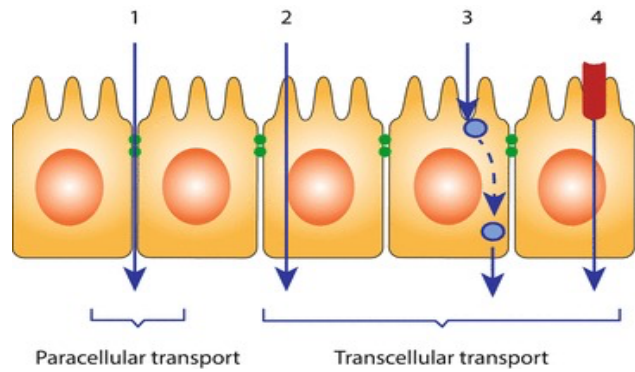
For å opprettholde barrierer er epitelcellene koblet tett sammen gjennom intercellulære proteinforbindelser, kalt okkluderende celleforbindelser (engelsk; tight junction), som kan ses

i figur 1.2.3.A^{23, 17}. De tette celleforbindelsene sørger for tarmbarrieren sin integritet og er viktig for å opprettholde normale fysiologiske aktiviteter^{23, 24, 25}. Med okkluderende celleforbindelser reguleres paracellulær transport av molekyler fra apikal til basolateral side (se paracellulær transport i figur 1.2.3.B). Dette ettersom de har evnen til å åpne og lukke seg som følge av kjemiske signalmolekyler¹⁷. Regulering foregår også som følge av tilstedeværelse av forskjellige komponenter i tarmlumen, slik som mikroorganismer, antimikrobielle molekyler, enzymer, frie radikaler og forskjellige peptider^{20, 26, 27, 28}.

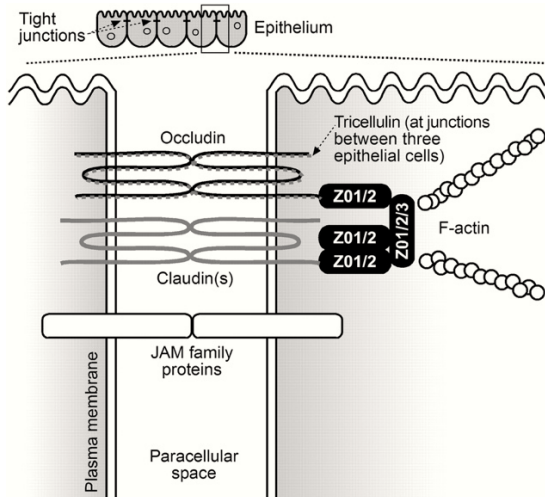
De okkluderende celleforbindelsene består av flere proteinkomponenter som er lokalisert både inter- og intracellulært. Viktige komponenter er okkludin, claudin, zonula okkludens-1 (ZO-1), zonula okkludens-2 (ZO-2) og F-aktinfilamenter (se figur 1.2.3.C). Adhesjonsproteiner (JAM) er også en del av det tette intercellulære kryssnettverket. De forskjellige proteinene samarbeider om å åpne og lukke for paracellulær transport²⁹. Eksempelvis kan en eksponering for ulike signalmolekyler, slik som peptider fra maten, medføre at samspillet mellom ZO-1 og okkludin endres slik at det oppstår en omorganisering i cytoskjelettet til epitelcellene³⁰. I tillegg kan det oppstå omorganisering eller oppløsning av aktin^{30, 29}. Det kan også skje endringer i genekspressjonen av de nevnte proteinkomponentene som inkluderes i okkluderende celleforbindelser³⁰. Interaksjoner mellom komponenter i tarminnholdet og cellemembranreseptorene har vist å kunne demontere de okkluderende celleforbindelsene²⁹. Alle disse endringene vil ha betydning for integriteten til tarmbarrieren. Tarmpermeabiliteten kan både øke og reduseres som følge av ulik eksponering³⁰. Komponenter fra mat er med på å regulere og modifisere permeabiliteten til de okkluderende celleforbindelsene gjennom en rekke ulike mekanismer³⁰. Dersom permeabiliteten til tarmepitelet øker vil det kunne oppstå en ukontrollert og ikke-selektert gjennomstrøm av ulike molekyler, fremmedstoffer og mikroorganismer fra tarmlumen og over i blodbanen (se figur 1.2.3.D)^{26, 31}.



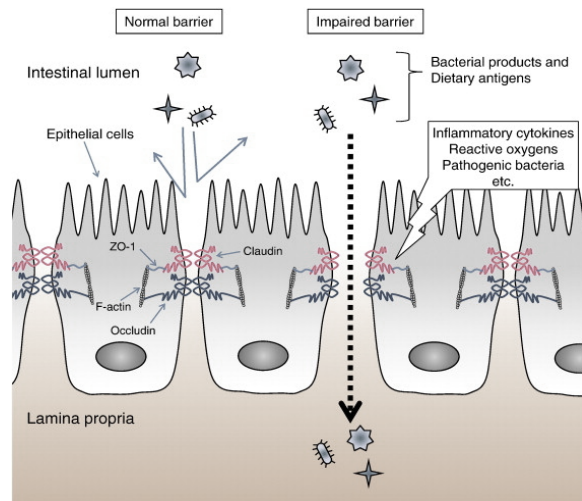
Figur 1.2.3.A: Polariserte epitelceller. Den skjematisk tegningen viser ulike intracellulære kontakter, slik som okkluderende celleforbindelser. Intracellulære kontakter er nødvendige for at barrieresfunksjon opprettholdes, i tillegg til at naboceller kan kommunisere med hverandre ¹⁹.



Figur 1.2.3.B: Transport og absorpsjon gjennom tarmepitelets cellelag kan foregå på ulike måter. 1) viser paracellulært transport, 2) viser transport av molekyler fra apikal side til basolateral side gjennom passiv transport, 3) viser transcytose mediert via vesikkel og 4) viser hvordan barrieremediert opptak og diffusjon gjennom epitelcellelaget foregår ¹⁹.



Figur 1.2.3.C: Okkluderende celleforbindelser som forbinder to epitelceller sammen ³⁰.



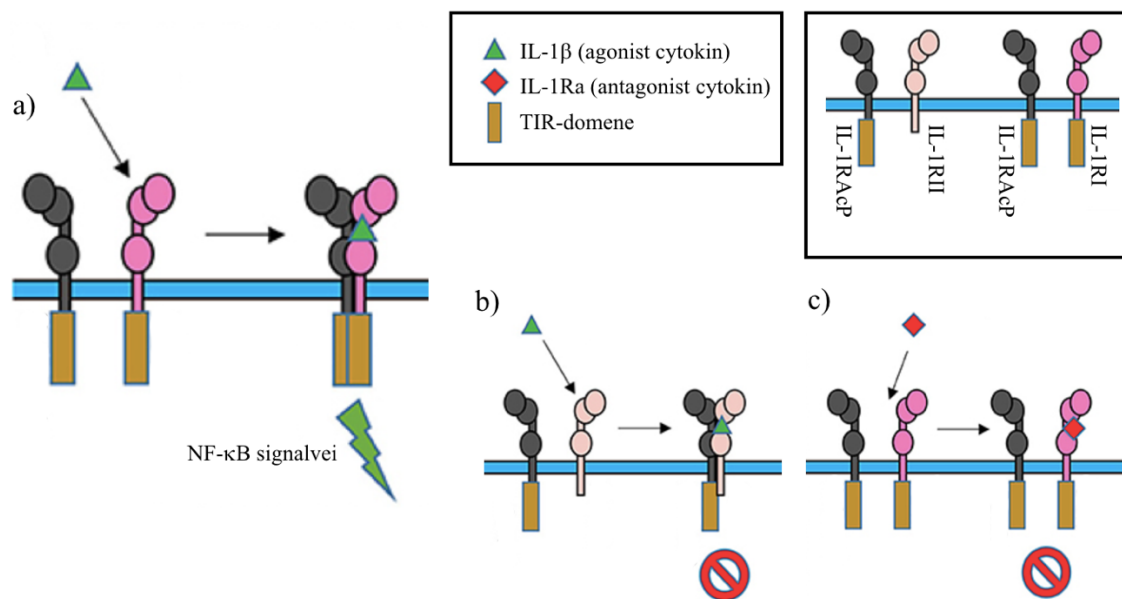
Figur 1.2.3.D: Ødeleggelse i de okkluderende celleforbindelse ³².

1.2.4 Kjemisk cellekommunikasjon og inflammasjon

Kroppens celler kommuniserer kjemisk via ulike signalmolekyler ¹⁷. Gjennom cellekommunikasjon kan ulike celletyper gi hverandre beskjeder slik at de sammen kan samarbeide om viktige oppgaver. Det kan foregå ved at cellene har direkte kontakt med hverandre eller ved at cellene utskiller signaler som mottakercellen kan oppfatte og handle etter. Mottakercellen kan eksempelvis være egen celle eller nabocelle. Dette samspillet er komplekst og velorganisert. Cytokiner er en gruppe signalmolekyler som blant annet er involvert i reguleringen av immunresponsen og virker ved å binde seg til spesifikke reseptorer. Disse reseptorene finnes på membranoverflaten til mottakerceller og som oftest har de lokal virkning. Flere ulike typer celler produserer cytokiner, deriblant immunceller fra det medfødte og det ervervede immunforsvaret, samt endotel- og epitelceller. I nettverket av cytokiner påvirkes de av hverandres aktivitet, de kan regulere produksjonen av hverandres membranreseptorer og ulike cytokiner påvirker ekspresjonen av andre cytokiner. Samtidig kan det samme cytokinet føre til flere ulike reaksjoner. Basert på struktur og funksjon deles cytokinene inn i grupper. Interleukiner er en gruppe cytokiner. Innunder denne gruppen er det flere proinflammatoriske cytokiner, noe som betyr at de kan fremme inflammasjonsreaksjoner.

Interleukin-1 (IL-1) har flere virkninger ¹⁷. De påvirker hypotalamus slik at det utvikles feber ettersom en økning i kroppstemperaturen gjør at mikroorganismer trives dårligere og at immunforsvaret har bedre virkning ved høyere temperaturer. De aktiverer også lymfocytter, samt at de har innvirkning på karendotelet. IL-1 deles inn i interleukin-1 alfa (IL-1 α) og interleukin-1 beta (IL-1 β) basert på hvilken sekundærstruktur som dominerer ^{17, 33}. De er sentrale ved traume, stress, infeksjon og inflammasjon ³³. Begge er med på å regulere immunforsvaret, både det ervervede og det medfødte. Flere celletyper, deriblant nøytrofile granulocytter, makrofager og monocytter, uttrykker IL-1 α og IL-1 β . Ved stimulering av inflammatoriske signaler uttrykkes en inaktiv provariant av IL-1 β på 31 kDa. En biologisk aktivering foregår enzymatisk hvorpå størrelsen på modent IL-1 β er på 17 kDa. Aktivering fører til at IL-1 β kan bindes til interleukin-1 reseptor type I (IL-1RI) med dets tilleggsprotein. Dette kan videre medføre en intracellulær kaskadereaksjon som vil kunne aktivere målcellen og føre til ekspresjon av andre cytokiner. Signaloverføringen kan hemmes på ulike måter. Hvilke tilleggsproteiner IL-1RI rekrutterer avgjør hvorvidt det oppstår en reaksjon eller ikke. Tilleggsproteinet må ha et spesielt domene for at IL-1 β -bindingen skal medføre en signaloverføring i mottakercellen. Om ikke tilleggsproteinet har et slikt domene vil virkningen

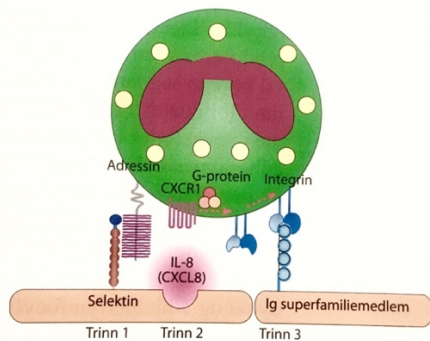
være antagonistisk. Interleukin-1 reseptor antagonist (IL-1Ra) er en antagonist til IL-1 β fordi de har strukturelle likheter (se figur 1.2.4.A). IL-1Ra vil derfor konkurrere med IL-1 β om reseptorplassen. Når IL-1Ra bindes til IL-1RI vil ikke tilleggsproteinet bli rekruttert, noe som hindrer at det utløses en signalreaksjon. I et system hvor både IL-1Ra og IL-1 β er tilstede, vil den antagonistiske effekten til IL-1Ra kunne forhindre IL-1 β -signalering på mottakercellen. Når IL-1Ra bindes til IL-1RI vil derfor ekspresjonen av andre cytokiner hemmes og det vil heller ikke forekomme aktivering av målceller^{33,34}.



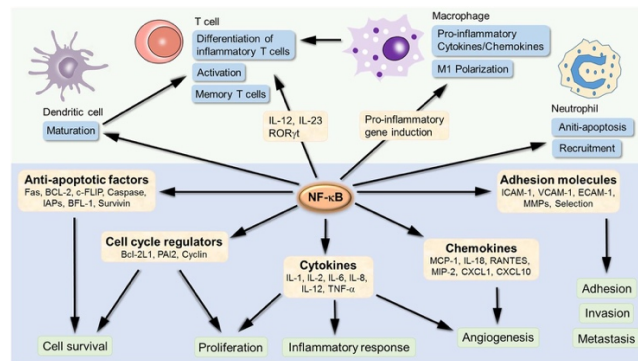
Figur 1.2.4.A: En illustrasjon av hvordan a) IL-1 β binder seg til IL-1RI med tilleggsproteinet IL-1RAcP hvor resultatet medfører NF- κ B signalering ettersom de begge har Toll/interleukin-1 reseptor (TIR) domene, b) IL-1 β binder seg til IL-1RII med tilleggsproteinet IL-1RAc som mangler et TIR-domene hvor resultatet ikke medfører signalering, og c) IL-1Ra binder seg til IL-1RI hvor det dannes et kompleks hvor resultatet ikke medfører signalering³⁵.

Inflammasjon er en biologisk reaksjon som oppstår ved infeksjoner og ikke-letal skade i kroppens vev³⁶. Hensikten er å beskytte kroppen mot fatale følger som skaden kan medføre. En skade kan være forårsaket av traume i vevet eller av fremmed agens slik som patogene mikroorganismer. I begynnelsen av en inflammasjon formidler makrofager, fibroblaster og epitelceller proinflammatoriske signaler til endotelet, og dertil rekrutteres leukocytter fra blodbanen gjennom en rekke steg³⁷. IL-1 β er et eksempel på et proinflammatorisk signalmolekyl³⁹. I cytoplasma finnes kjernefaktor κ B (NF- κ B) som er involvert i signaloverføringen som skjer når IL-1 β binder seg til IL-1RI^{34, 38}. Det er en transkripsjonsfaktor som øker produksjonen av cytokiner og kjemokiner ved en immunrespons^{17, 39}. NF- κ B kan for eksempel binde seg til promotoren til interleukin-8 (IL-8) og deretter

fremme IL-8-ekspressjonen ⁴⁰. IL-8 er et såkalt kjemokin og virker som en kraftig kjemoattraktant (se figur 1.2.4.B). Ved ulike inflammasjonstilstander blir IL-8 produsert av mange forskjellige typer celler (se tabell 1.2.4.A) ²². Den komplekse effekten av NF- κ B er vist i en illustrasjon i figur 1.2.4.C.



Figur 1.2.4.B: IL-8 signaliserer til nøytrofile granulocytter at det er inflammasjon ved å binde seg til reseptoren CXCR1 ¹⁷.



Figur 1.2.4.C: Illustrasjon av induserbar transkripsjonsfaktor NF- κ B ³⁹. Den inflammatoriske responsen er kompleks og sammensatt, og det finnes en rekke markører for inflammasjon. Økt cytokin- og kjemokinnivå og aktiveringen av proinflammatoriske signalmolekyler er eksempler på inflammasjonsmarkører ^{36, 41}.

Tabell 1.2.4.A: Oversikt over IL-1 β , IL-1Ra og IL-8, derunder celler de sekreseres fra, målceller, reseptorer de binder seg til og aktiviteten de utfører ^{17, 42, 43}

Cytokiner	Reseptor	Sekret fra	Målcelle	Aktivitet
IL-1 β	IL-1RI IL-1RII IL-1RAP	Monocyter Makrofager Nøytrofile Epitelceller Dendrittceller	Makrofager Epitelceller T-celler	Feber T-celleaktivering Makrofagaktivering Karendotelpåvirkning
IL-1Ra	IL-1RI	Monocyter Nøytrofile Hepatocytter	Flere celletyper	Naturlig antagonist til IL-1RI
IL-8	CXCR1 CXCR2	Epitelceller Endotelceller Monocyter Makrofager Fibroblaster Dendrittceller	Nøytrofile Makrofager Epitelceller Naive T-celler Mastceller	Nøytrofil kjemoattraktant og aktivator Induksjon av fagocytose

1.2.5 Tarmsykdommer

Ved sårheling eller infeksjonssykdom i tarmen utgjør inflammasjon en viktig rolle ³⁶. I enkelte tilfeller kan inflammasjon opptre ukontrollert og overdrevet, noe som kan føre til kroniske sykdommer. Inflammatorisk tarmsykdom (IBD) er en kronisk tilstand i mage-tarmkanalen der det dannes sår og vedvarende inflammasjon, og skyldes en overdreven immunrespons ⁴⁴. IBD inkluderer sykdommene Crohns sykdom (CD) og ulcerøs kolitt (UK). Ved CD kan hele fordøyelseskanalen rammes og opptrer ofte med flekkvis inflammasjon ⁹. Inflammasjonen kan gi store smerter, forsnevring i tarmen eller åpninger mellom tarmkanalen og andre organer. UK på sin side rammer slimhinnene i tykk- og endetarm.

Patogenesen til IBD involverer komplekse prosesser og mange proinflammatoriske cytokiner, hvorpå IL-1 β utgjør en nøkkelrolle ⁴⁴. I tillegg er det en oppregulert kjemokinekspresjon av blant annet IL-8 i tarmens slimhinne som følge av at NF- κ B aktiveres intracellulært ³⁸. IBD, og spesielt UK, er relatert til kolorektalkreft ^{38, 45}. Mekanismen har tilknytning til transkripsjonsfaktoren NF- κ B ⁴⁵. Aktivering av NF- κ B kan medføre at premaligne celler overlever fordi NF- κ B-aktivering blant annet kan blokkere celleapoptose. Samtidig vil NF- κ B-bindingen til DNA som induserer IL-8-produksjon gi inflammasjonsrelatert vevsskade som igjen kan føre til oppregulering av forskjellige kreftfremmende komponenter. På verdensbasis er kreft i magesekken, tykktarm og endetarm hyppige dødsårsaker ⁹.

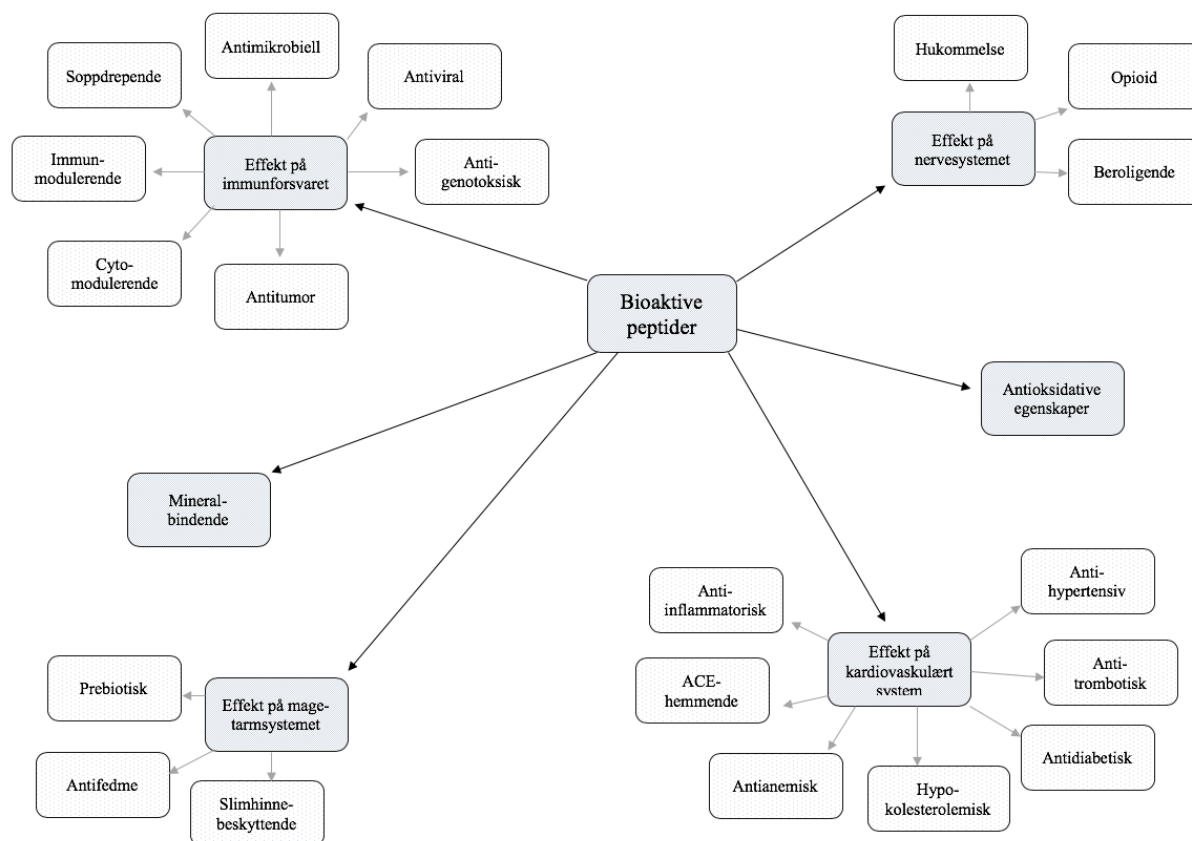
Integriteten til tarmbarrieren må opprettholdes for at ikke uønskede stoffer skal passere inn i kroppen ²⁹. Dersom permeabiliteten til epitelcellelaget øker og uønskede stoffer strømmer inn i kroppen fra tarmlumen, kan det medføre utvikling av og symptomforverring hos en rekke sykdommer. Sykdommene kan både manifestere seg i tarmens slimhinne og de kan virke systemisk ³⁰. Det kan også medføre matallergier, astma og atopisk eksem ²⁹. Også autoimmune sykdommer som multippel sklerose, lupus og autoimmun hepatitt er forbundet med økt tarmpermeabilitet ^{26, 29}. Lekk tarm er eksempel på en tilstand der tarmbarrierens permeabilitet øker, noe som er relatert til endringer i de okkluderende celleforbindelsene i det paracellulære rommet ²¹. Pasienter med IBD, personer med cøliaki, diabetes type 1, kreft og Alzheimers er funnet å ha redusert barrierefunksjon ^{26, 21, 46}. Økt tarmpermeabilitet har også blitt sett på som faktor ved irritabel tarmsyndrom (IBS) ⁴⁷. Matintoleranser er ikke uvanlig hos personer med IBS, som vil si en overfølsomhet for diverse matvarer. Ved utvikling av sykdom i tarmen kan mat være både utløsende eller innvirkende faktor ⁹. Samtidig kan valg av riktig mat og ernæring

være avgjørende under behandling av en rekke tarmsykdommer. Derfor er det nødvendig å forske på komponenter som kan motvirke utviklingen av diverse sykdommer i tarmkanalen.

1.2.6 Bioaktive peptider fra mat

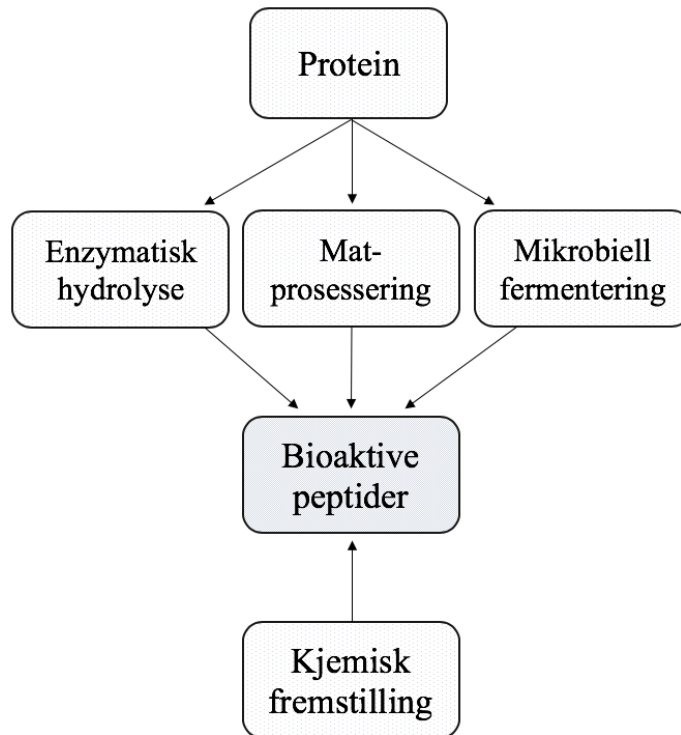
Til enhver tid blir menneskekroppen eksponert for giftige stoffer og fysiologiske ubalanser som gjennom homeostase holdes kontrollert slik at det ikke utvikles sykdom ⁴⁸. Bestanddeler fra mat, både næringsstoffer og ikke-næringsstoffer, påvirker hvordan og om sykdom utvikles. Funksjonelle komponenter fra mat har av den grunn vist seg å være gunstig ved forebygging og behandling av ulike sykdommer. Proteinfragmenter kan eksempelvis ha positiv innvirkning på helsen ved siden av å blant annet være energigivende næringsstoff ⁴⁹. Herunder menes bioaktive peptider som har vist å ha en positiv helseeffekt. Peptider som er bioaktive har blant annet innvirkning på immunforsvaret, kroppens fordøyelse og sirkulasjonssystemet, samt på det endokrine- og nervesystemet. Virkningen av disse peptidsekvensene har vist seg å ligne på medikamentelle og hormonelle aktiviteter. Av den grunn jobbes det aktivt med å utvikle bioaktive peptider som kan ha lindrende eller forebyggende effekt på forskjellige sykdommer. Det antas at bioaktive peptider kan virke forebyggende mot livsstilssykdommer ⁵⁰.

Basert på virkningsmåte kan bioaktive peptider klassifiseres i grupper, slik som mineralbindende, antioksidative, antimikrobielle, antihypertensive eller immunmodulerende ⁴⁹. Mange bioaktive peptider deler noen fellestrekk, slik som sekvenslengden på aminosyrerekken og hydrofobe aminosyrer, samt tilstedeværelse av spesifikke aminosyrer slik som prolin. Sekvenslengden på bioaktive peptider er ofte mellom to til 20 aminosyrer ⁵¹. Figur 1.2.6.A illustrerer ulike effekter bioaktive peptider kan ha.



Figur 1.2.6.A: Ulike mulige effekter bioaktive peptider kan ha i kroppen ⁵². En modifisert figur.

For at de bioaktive peptidene skal kunne ha en funksjonell effekt må de spaltes fra proteinkomplekset som de er en del av ⁵¹. Når protein brytes ned gjennom proteolyse under fordøyelsen, kan fordøyelsespeptidaser frigjøre bioaktive peptider ^{49, 51}. Det antas i tillegg at bioaktive peptider ikke brytes ned like enkelt av de proteolytiske enzymene under fordøyelse ⁴⁹. Bioaktive peptider kan også dannes under prosessering av mat. Under prosessering av mat vil matvarekomponentene endres kjemisk og strukturelt slik at bioaktive peptider kan frigis fra proteinkomplekser gjennom eksempelvis enzymatisk hydrolyse. Kilder til bioaktive peptider kan være både animalske og vegetabiliske matvarer ³⁶. Mikroorganismer kan gjennom fermentering bryte ned proteiner og produsere bioaktive peptider ⁵³. En skjematisk fremstilling av hvordan bioaktive peptider fremstilles er illustrert figur 1.2.6.B.



Figur 1.2.6.B: Produksjonen av bioaktive peptider i en skjematisk fremstilling ⁴⁹. En modifisert figur.

1.3 Metodeteori

1.3.1 Caco-2-celler

Celler kan isoleres fra vev eller allerede etablerte cellelinjer og videre dyrkes frem i kunstige miljøer, hvorpå næringsrikt kulturmedium benyttes til å fremme celleveksten ⁵⁴. Cellemodellsystemer er ofte brukt til å undersøke egenskapene til bioaktive peptider ettersom de er relativt raske å gjennomføre, økonomiske og reproducerbare ³⁶. Samtidig vil det være mulig å analysere den effekten de har på ulike inflammasjonsmolekyler. Ved valg av riktig cellelinje til et forsøk er det flere kriterier en må ta stilling til, deriblant deres funksjonelle egenskaper ⁵⁴. Det er flere cellelinjer med morfologi lik epitelceller som ofte blir benyttet i matvitenskapsstudier ¹⁹. Herunder er T84, HuTu-80, SW620, HT29-MTX og Caco-2 blant brukte cellelinjer med human opprinnelse. De er isolert fra karsinomer tilknyttet tykktarmen, med unntak av HuTu-80 som er isolert fra tynntarm.

Cellelinjene har ulike egenskaper, noe som avgjør bruken av dem ⁵⁴. Caco-2 er en cellelinje etablert fra et humant kolonadenokarsinom, som vil si en primær tykktarmssvulst, isolert fra en mann på 72 år med kaukasisk bakgrunn ⁵⁵. Ved oppdyrking *in vitro* vil Caco-2-celler kunne

differensiere til et cellelag med morfologi lik tynntarmsepitelceller ^{19, 55}. De vil danne apikale mikrovilli og intracellulære okkluderende forbindelseskomplekser ¹⁹. Cellelinjen HT29-MTX kan også utvikle et sammenvokst monolag med okkluderende forbindelseskomplekser i tillegg til å sekretere slim. Imidlertid er Caco-2-cellelinjen sin evne til å danne okkluderende celleforbindelsene bedre enn HT29-MTX, noe som gjør at de oftere velges når transepitelial transport og epitelbarrierefunksjon studeres. Samtidig vil de uttrykke flere av de samme transportsystemene og enzymene som de primære epitelcellene gjør. Caco-2-celler uttrykker de fleste reseptorer som normale epitelceller gjør, inkludert IL-1R ^{19, 56}. Cellelinjen produserer også enkelte cytokiner, slik som IL-8 ¹⁹.

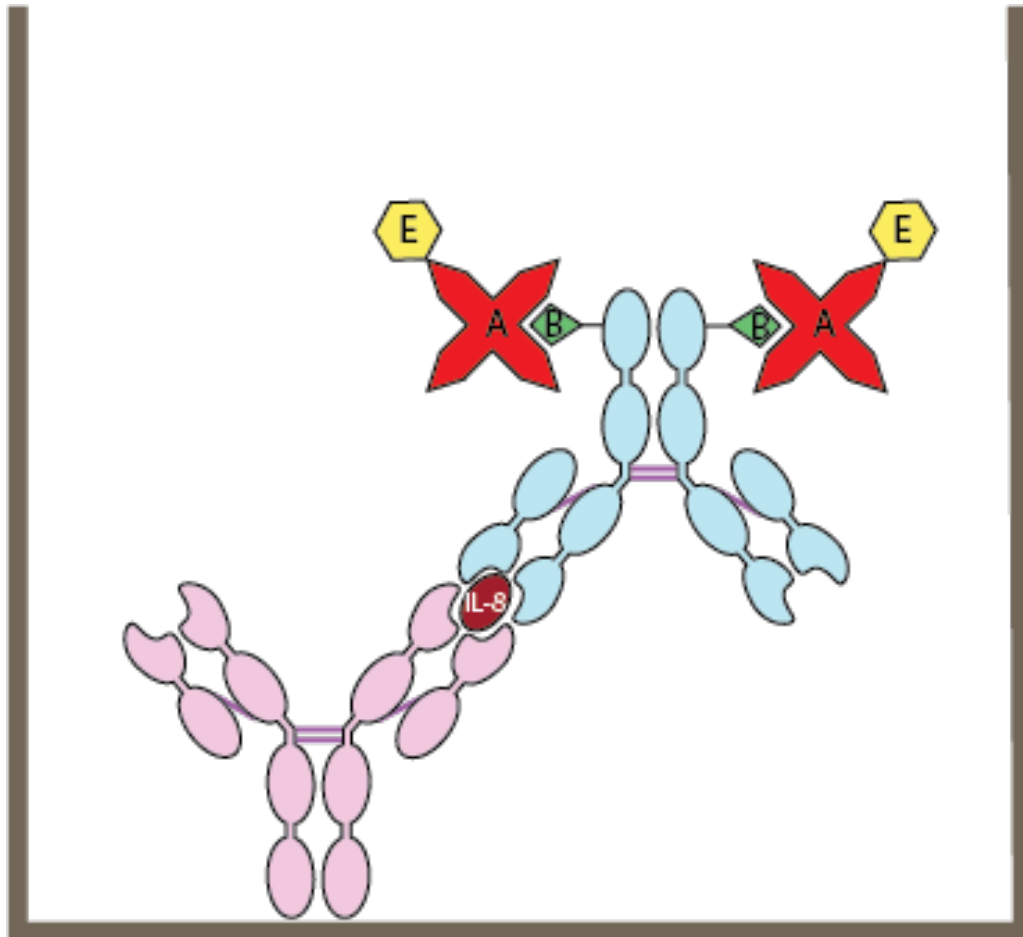
Valg av cellelinjer i *in vitro*-studier vil påvirke resultatene, og hvilke celler en bør velge avhenger av formålet med forsøket ¹⁹. Imidlertid kan heller ikke resultatene nødvendigvis overføres direkte til eller demonstreres *in vivo*. Allikevel blir *in vitro*-modeller ansett som nyttige i studier av peptiders bioaktivitet og effekt på tarmepitelet. Caco-2-celler anses for å være den mest optimale cellelinjen blant *in vitro*-modeller som etterligner tynntarmen ²⁴. Caco-2 er en anerkjent og veletablert tarmcellelinjer som benyttes til *in vitro*-studier ³⁸.

1.3.2 *In vitro*-immunoassay i Caco-2-celler

En IL-1 β industert IL-8-ekspressjonen i Caco-2-celler kan brukes til å undersøke mulige effekter av bioaktive peptider ³⁸. Dersom peptidene har antiinflammatoriske egenskaper vil de eksempelvis kunne hemme ekspressjonen av IL-8 i Caco-2-cellene. For å kontrollere at cellemodellen fungerer er det gunstig å benytte IL-1 β -antagonist som kontroll sammen med IL-1 β ³⁴. IL-1Ra vil hemme den IL-1 β -induserte IL-8-produksjon i Caco-2-celler.

For å måle konsentrasjon av IL-8, kan sandwich ELISA benyttes. Sandwich ELISA er et kvantitativt enzymimmunoassay som kan brukes til målinger av biologiske substanser som forekommer i lave konsentrasjoner ⁵⁷. Metoden er velegnet til målinger av cytokiner, slik som IL-8 ⁵⁸. Det benyttes plater der antistoffet kalt *Capture Antibody* festes til platen i mikroplatebrønnene. *Capture Antibody* binder antigenet som skal måles, i dette tilfellet IL-8. *Detection Antibody* er et nytt antistoff som bindes til antigenet, hvoretter et sekundært antistoff kalt *Avidin-HRP Conjugate* med konjugert enzym bindes til *Detection antibody* igjen ⁵⁹. Videre

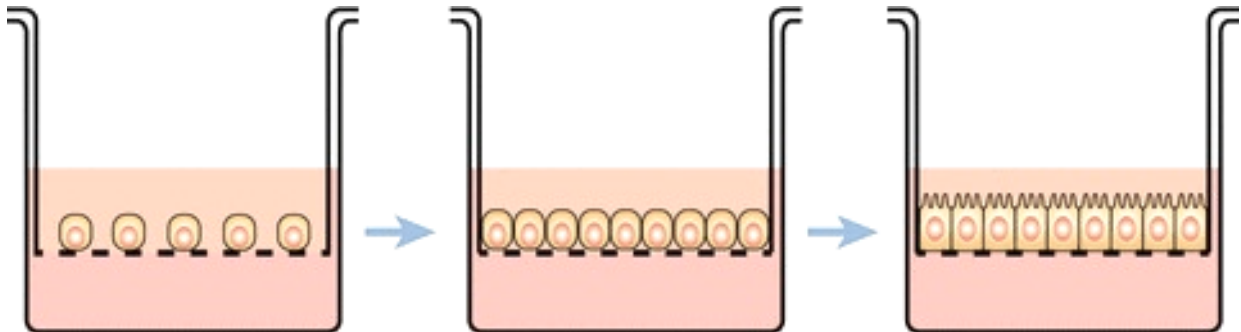
oppstår det fargeforandring ved tilsetning av *ABTS Liquid Substrate*. Figur 1.3.2.A illustrerer hvordan fremgangsmåten er ved deteksjon av IL-8 med sandwich ELISA.



Figur 1.3.2.A: En illustrasjon av fremgangsmåten for deteksjon av IL-8 ved sandwich ELISA utformet av medveileder Tor Lea ⁶⁰.

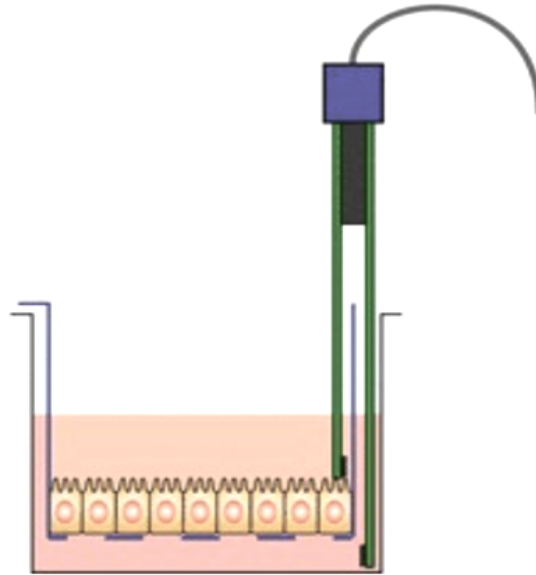
1.3.3 TEER av Caco-2-cellemonolag

For å studere hvilke effekter peptider har på integriteten til tarmepitelet er Caco-2-cellelinjen en etablert *in vitro*-modell²⁵. Caco-2-celler kan dyrkes på polykarbonatfilterinnsatser i kulturplater for å danne en etterligning av tarmepitelet med apikal- og basolateral side^{19, 61}. Cellene vil differensiere på filterinnsatsene helt frem til det oppnås et konfluent, sammenhengende cellelag. Etter 21 dager vil det være dannet et monolag med tette mikrovilli på den apikale siden (se figur 1.3.3.A). Når det er oppnådd et fullt polarisert Caco-2-cellemonolag vil det være utviklet intercellulære kontakter, slik som okkluderende celleforbindelser¹⁹.



Figur 1.3.3.A: Dyrking av Caco-2-cellemonolag¹⁹. Monolaget ligner epitelcellemonolag med okkluderende celleforbindelser (eng; tight junction), samt at den apikale siden har børstesøm.

For å studere barriereintegriteten til et Caco-2-cellemonolag kan transepitelial elektrisk motstand (TEER) måles⁶¹. Den paracellulære transporten over tarmepitelbarrieren har en lavere elektrisk motstand enn de transcellulære transportveiene, og TEER-verdien reflekterer først og fremst integriteten til de okkluderende celleforbindelsene²². Med andre ord sier TEER-verdien noe om porestørrelsen i den permeable epitelmembranen gjennom å måle fluksen av væskestrøm²⁴. Målinger av TEER-verdien til Caco-2-cellemonolaget foregår ved at en elektrode plasseres i kammeret til mediet som illustrert i figur 1.3.3.B, og verdien måles i ohm (Ω).



Figur 1.3.3.B: Monolag med Caco-2-celler dyrket på filter med elektroder plassert på den apikale og den basolaterale siden ¹⁹. Caco-2-cellemonolaget oppnår en høy elektrisk motstand som er høy.

1.4 Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne masteroppgaven var å undersøke mulige egenskaper til *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erteprotein etter *in vitro*-fordøyelse kan ha på cytokinproduksjonen i tarmepitelet. I forsøket ble mulige immunmodulerende egenskaper til utvalgte peptider analysert gjennom IL-1 β -indusert IL-8-produksjon i en *in vitro*-modell av Caco-2 adenokarsinomceller. Konsentrasjonen av IL-8 ble målt med sandwich ELISA.

I tillegg hadde oppgaven som formål å undersøke mulige egenskaper av de samme ertepeptidene på tarmepitelets permeabilitet. For å studere dette ble Caco-2 adenokarsinomceller dyrket på filterinnsatser i 21 dager til et polarisert cellemonolag. TEER av celledaget ble målt før og etter eksponering av testpeptidene for å undersøke differansen i målingene.

Hvilke mulige egenskaper har *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erteprotein i to ulike modeller av Caco-2 adenokarsinomceller?

2.0 Materialer og metode

Peptidene som ble analysert i denne oppgaven ble valgt på bakgrunn av et tidligere forsøk. Ertemel ble fordøyd i en statisk *in vitro* fordøyelsesmodell ⁶² ved bruk av mage- og tarmsafter aspirert fra friske personer (n=20) ⁶³. *In vitro* fordøyelsesmodeller er gode verktøy til å studere hvordan maten prosesseres i mage-tarmkanalen på en effektiv og rimelig måte ⁶⁴. Etter *in vitro* fordøyelse ble det materialet rensert og således separert via HPLC-kolonne tilkoblet et massespektrometer. Totalt ble 2054 peptider identifisert fra 19 proteiner etter søk opp i UniProt-databasen begrenset til erter (*Pisum sativum*).

Videre ble programvaren PeptideRanker benyttet til å vurdere bioaktiviteten til de identifiserte peptidene ⁶⁵. I PeptideRanker vurderes sannsynligheten for at sekvensen har bioaktivitet gjennom blant annet sammensetning av aminosyrer, sekvenslengde og de strukturelle trekkene, og det estimeres en total poengsum for sannsynlighet. En poengsum på mer enn 0,5 gir indikasjon på en mulig bioaktiv virkning, og det er en større sannsynlighet desto høyere poengsum er. For 9 av de identifiserte peptidene var poengsummen i PeptideRanker på mer enn 0,5. Peptidsekvensene DKPWWPK (videre kalt PepDK) og NEPWWPK (videre kalt PepNE) hadde høyest poengsum, og var på henholdsvis 0,94 og 0,89. På bakgrunn av dette ble det bestemt å undersøke deres immunmodulerende virkning og deres effekt på tarmepitelets barrierefunksjon. Tabell 2.0.A viser ytterligere informasjon om de utvalgte peptidene, derav hvilket erteprotein peptidene stammer fra, deres molekylvekt og produsent.

Tabell 2.0.A: Peptidene som ble undersøkt for immunmodulerende egenskaper og barrierefunksjoner hadde opphav fra erter. Sekvensen for begge peptider var på syv aminosyrer.

	PepDK	PepNE
Aminosyresekvens	DKPWWPK	NEPWWPK
Molekylvekt (MW)	956,11	956,07
Opphav (art)	Erter	Erter
Fra protein	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-2	Seed linoleate 9S-lipoxygenase-3
Start (protein)	688	685
Slutt (protein)	694	691
Leverandør	Genosphere Biotechnologies	Genosphere Biotechnologies
Produktnummer	N°113487 NH2/COOH	N°113488 NH2/COOH

Generelt laboratorieutstyr som ble benyttet til forsøkene er belyst i påfølgende avsnitt. Jevnt i forsøket ble det benyttet Falconrør, Eppendorfrør og pipetter tilpasset forskjellig volum. Kjøleskap med temperatur på 4°C, fryser på -20 og -80°C, vannbad på 37°C og inkubatorskap på 37°C ble brukt. Sistnevnte hadde fuktige atmosfæriske forhold der 5 % var CO₂ og 95 % var luft. Det ble i tillegg benyttet tre ulike sentrifuger, herunder en bordsentrifuge i romtemperatur beregnet for Eppendorfrør (1,5 ml) og en sentrifuge til Falconrør (50 ml) med en styrke på 1300 rpm, samt en sentrifuge til Eppendorfrør (1,5 ml) med en styrke på 1500 rpm og en temperatur på 4°C. For å rense vann som ble benyttet i forsøkene ble maskinen fra Milli-Q® Direct Water Purification System fra Merck Life Science AS brukt. Sikkerhetskabinettet som ble benyttet under celledyrking og -forsøk var Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet fra ThermoFisher Scientific.

2.1 Dyrking og vedlikehold av Caco-2-celler

Caco-2-cellelinjen som ble benyttet i denne oppgaven var fra European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) med katalognummer 86010202⁵⁵. Leverandøren var Merck Life Science AS. Falcon® Cellekulturflasker (T75) fra Corning Life Science ble benyttet til celledyrking. ATCC sin protokoll *Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol* ble benyttet, der ytterligere informasjon om dyrking og vedlikehold av Caco-2-celler kan innhentes.

2.1.1 Opptining og dyrking av Caco-2-celler

For oppdyrking av Caco-2-celler ble nedfryste celler i passasje 51 hurtig tint ved 37°C. Umiddelbart etter tining ble cellene tilsatt 5 ml vekstmedium bestående av Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose med 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % ikke-essensielle aminosyrer (NEAA) og 1 % av antibiotikumet Penicillin-Streptomycin. Løsningene i vekstmediet var bestilt fra Merck Life Science AS. Videre ble cellene sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter, hvorpå supernatanten ble fjernet. Nytt vekstmedium ble tilsatt cellepelletten, og etter resuspending ble cellene overført til en T75 cellekulturflaske. T75-flasken med Caco-2-celler ble inkubert ved 37°C i en fuktig atmosfære med 5 % CO₂ frem til en konfluens på 70-80 % var oppnådd.

2.1.2 Splitting og vedlikehold av Caco-2-celler

Da cellene hadde oppnådd ønsket konfluens ble de splittet. Gammelt medium ble fjernet og cellene ble vasket med 10 ml Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) bestilt fra Merck Life Science AS. Cellene ble således løst opp ved tilsetning av 2 ml trypsin-EDTA bestilt fra Biowest og inkubering i 5 minutter ved 37°C i en fuktig atmosfære med 5 % CO₂. Trypsineringen ble stoppet ved tilsetning av 10 ml vekstmedium, hvorpå cellene ble spunnet ned ved sentrifugering i 5 minutter ved 1300 rpm. Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml med vekstmedium og overført til en ny T75-flaske med en tetthet på 1x10⁶ celler/ml. Telling av celler ble utført i en Countess II Automated Cell Counter-maskin med katalognummer AMQAX1000 fra ThermoFisher Scientific. Cellene ble inkubert som beskrevet ovenfor. For vedlikehold av cellene før 70-80 % konfluens var oppnådd, ble vekstmediumet erstattet med nytt der også cellene ble vasket med PBS imellom.

2.2 *In vitro* immunoassay

2.2.1 IL-1 β -indusert IL-8-produksjon i Caco-2-celler

I *in vitro* immunoassayforsøket ble det benyttet ulike konsentrasjoner av PepDK og PepNE, både hver for seg og sammen i et 1:1-forhold. Peptidene ble løst i PBS til en konsentrasjon på 15 mg/ml. Fra denne løsningen ble det laget en stockløsning med peptidkonsentrasjon på 1000 μ M som videre ble benyttet. De utvalgte testkonsentrasjonene er presentert i tabell 2.2.1.A.

Tabell 2.2.1.A: Forskjellige konsentrasjoner av peptidene PepDK og PepNE, samt PepDK+PepNE i 1:1-forhold, ble testet for immunmodulerende egenskaper i in vitro Caco-2-cellemodell.

Konsentrasjon (µM)	PepDK	PepNE	PepDK + PepNE
1	x	x	x
5	x	x	x
10	x	x	x
20	-	-	x
30	x	x	x
40	-	-	x
50	x	x	x
60	x	x	x
70	x	x	x
80	x	x	x
100	x	x	x
150	x	x	x
200	x	x	-

Til forsøket ble IL-1β benyttet til å indusere IL-8-ekspressjon i Caco-2-celler, hvorpå en potensiell virkning av peptidene PepDK og PepNE ble undersøkt. IL-1Ra ble i tillegg benyttet sammen med IL-1β som en inhibitor kontroll på bakgrunn dens IL-1β-antagonistiske egenskaper. I tillegg ble en positiv kontroll med kun IL-1β og negativ kontroll uten tilsetning av stimulator brukt for å sammenligne effekten til peptidene. Leverandør av IL-1β (produktnummer 11457756001) og IL-1Ra (produktnummer SRP3327) var Merck Life Science AS.

Caco-2-celler fra celleduspensjonen i 2.1.2 ble overført med en tetthet på $1,8 \times 10^5$ celler/brønn til Falcon® transparente 12-brønnsplater fra Corning Life Science, i tillegg til 1,5 ml vekstmedium i hver av brønnene. Cellelinjen hadde passasjenummer mellom 54 og 61. Platen ble inkubert ved 37°C i en fuktig atmosfære med 5 % CO₂. På dag 3 ble gammelt medium i brønnene fjernet og erstattet med 1,5 ml nytt vekstmedium. Platen ble på nytt inkubert i ytterligere 24 timer. Deretter ble gammelt medium i brønnene erstattet med 1 ml serumfritt vekstmedium (SFVM) bestående av DMEM High Glucose, 1 % NEAA og 1 % PenStrep for fasting av cellene, og platen ble inkubert i nye 24 timer.

Testpeptider og kontroller ble overført til brønnene med et forhåndsbestemt oppsett (se tabell 2.2.1.B og 2.2.1.C). Gammelt medium i brønnene for testpeptider og inhibitorkontroll ble fjernet først. I brønnene for inhibitorkontroller, ble cellelaget eksponert for et preparat med 1 ml SFVM og IL-1Ra (100 ng/ml) i 30-40 minutter før IL-1 β (15 ng/ml) ble tilsatt brønnen for at IL-1Ra skulle kunne binde seg til reseptorene før de konkurrerte med IL-1 β om plassen. Det samme gjaldt for brønnene med testpeptider der også IL-1 β først ble tilsatt i brønnene etter 30-40 minutter peptideksponering. Etter disse hadde fått virket, ble gammelt medium fjernet i brønner for positive og negative kontroller erstattet med nytt medium. IL-1 β ble således tilført i alle aktuelle brønner og platene ble ristet forsiktig for å fordele stimulanten jevnt i mediumet i brønnene. 12-brønnsplatene ble deretter inkubert med 5 % CO₂ i fuktig atmosfære i 37°C. Etter 24 timer ble supernatanten på 1 ml fra hver brønn ble overført til Eppendorfrør. Disse ble oppbevart ved -20°C frem til utførelsen av sandwich ELISA som beskrevet i 2.2.2.

Tabell 2.2.1.B: De ulike eksponeringspreparatene som ble tilført Caco-2-cellemonolag i 12-brønnsplater. SFVM står for serumfritt vekstmedium.

	SFVM (1 ml)	IL-1β (15 ng/ml)	IL-1Ra (100 ng/ml)	Peptid (x μM)
Negativ kontroll	+	-	-	-
Positiv kontroll	+	+	-	-
Inhibitorkontroll	+	+	+	-
Testpeptid	+	+	-	+

Tabell 2.2.1.C: Oversikt over oppsett på 12-brønnsplate som ble fulgt gjennom hele forsøket.

	1	2	3	4
A	Negativ kontroll	Negativ kontroll	Peptid Konsentrasjon 1	Peptid Konsentrasjon 2
B	Positiv kontroll	Positiv kontroll	Peptid Konsentrasjon 1	Peptid Konsentrasjon 2
C	Inhibitorkontroll	Inhibitorkontroll	Peptid Konsentrasjon 1	Peptid Konsentrasjon 2

2.2.2 Måling av IL-8 med sandwich ELISA

Nedfryste prøver ble tint på is og deretter sentrifugert i 10 min ved 1500 rpm og 4°C. Supernatanten ble igjen overført til nye Eppendorfrør for at ikke celler skulle være tilstede når prøvepreparatene videre ble analysert ved bruk av sandwich ELISA.

Sandwich ELISA-settet som ble benyttet til forsøket ble bestilt fra PeproTech med katalognummer 900-K18. Settet inneholdt alle nødvendige komponenter for kunne detektere IL-8 i prøvene⁶⁶. Protokollen *Human IL-8 (CXCL8) Standard ABTS ELISA Development Kit* ble brukt i forsøket. Fra PeproTech ble også buffersettet med katalognummer 900-K00 bestilt og fortyninger av bufferblandingene ble utført som beskrevet i PeproTech sin medfølgende protokoll.

Preparering av platen ble gjort med *Capture Antibody* fortynnet med PBS til en konsentrasjon på 0,50 µg/ml der 100 µl ble tilført hver brønn på 96-brønnsplaten. Platen ble forseglet og inkubert over natten ved romtemperatur. Væsken ble fjernet før plater ble vasket fire ganger med 300 µl per brønn av vaskebuffer (1 % TWEEN-20 i PBS). Deretter ble 300 µl *Block buffer* tilført hver brønn, hvorpå platen ble inkubert i romtemperatur i minimum 1 time. Væsken ble fjernet fra brønnene og ytterligere vasket med vaskebuffer 4 ganger.

Standard med humant IL-8 ble fortynnet til en konsentrasjon på 4000 pg/ml. Standarden ble videre fortynnet fra 4000 pg/ml til 3,906 pg/ml, samt med en nullprøve. Disse ble tilsatt brønner på platen i duplikater med et volum på 100 µl. I tillegg ble supernatanten fra 2.2.1 tilført i duplikater. Inkubering av platen ble gjort i romtemperatur i minimum 2 timer på risting ved 300 rpm (Orbital Shaker OS-10 fra Boeco), før brønnene ble tømt og vasket ytterligere fire ganger med vaskebuffer.

Detection antibody ble fortynnet med 1xDiluent til en konsentrasjon på 0,50 µg/ml og 100 µl ble tilført hver brønn, hvoretter platen ble inkubert i romtemperatur i 2 timer. Væsken ble så fjernet og brønnene ble vasket med vaskebuffer 4 ganger. 5,5 µl med *Avidin-HRP Conjugate* ble fortynnet med 1xDiluent til en konsentrasjon på 1:2000. Det ble deretter tilført 100 µl per brønn, hvorpå platen ble inkubert ytterligere i 30 minutter ved romtemperatur. Før avlesning av platene ble væsken fjernet og vasket 4 ganger med vaskebuffer. *ABTS Liquid Substrate*-løsning ble tilført med et volum på 100 µl per brønn og inkubert i romtemperatur frem til grønnfargen

var utviklet. ELISA-platen ble avlest ved 405 nm med en bølgelengdekorreksjon på 650 nm med risting (SpectraMax M2). Programvaren SoftMax Pro 6.5 (Molecular Devices) registrerte absorbansverdier som ble videre importert til programvaren på nettsiden www.elisaanalysis.com for analysering. Microsoft Excel: Office 365 ble benyttet til videre databearbeiding.

2.3 TEER-måling av Caco-2-cellemonolag

I Falcon® transparente 24-brønnsplater fra Corning Life Science ble hver brønn fylt med 600 µl vekstmedium før polykarbonatfilter av 6,4 mm diameter og med 0,4 µm porediameter ble plassert i brønnene. Falcon® Cellekulturinnsatser som ble benyttet var gjennomsiktige PET-membran med porestørrelse på 0,4 µm og $1,6 \times 10^6$ porer/cm². Leverandør var Corning Life Science med artikkelnummeret er 734-0036. 200 µl cellesuspensjon fra splittede celler i passasje 57 eller 64 ble overført til polykarbonatfiltrene med en celletetthet på 1×10^4 celler/cm². Platene ble inkubert i 5 % CO₂ i fuktig atmosfære ved 37°C. Vekstmediet ble byttet tre ganger i uken frem til dag 21 da monolaget var konfluent og cellene fullstendig differensiert. På dag 21 ble transepitelial elektrisk resistens (TEER) til Caco-2-cellemonolaget målt med EVOM² Epithelial Voltohmmeter fra WPI tilkoblet testelektroder, STX2. Elektrodene ble sterilisert i etanol før de ble plassert i vekstmedium i noen minutter. Resistensen til transepitelet ble målt i ohm (Ω). TEER-verdiene ble målt med medium i den apikale siden som deretter ble fjernet og erstattet med nytt medium med peptid i konsentrasjonene oppgitt i tabell 2.3.A. Etter 2,5 timer peptideksponering ble TEER-verdien ble målt på nytt. To brønner per plante inneholdt kun filterinnsatsene (R_{blank}) og denne verdien ble trukket fra TEER-verdien ($R_{\text{prøve}}$) for å fastslå resistensen til cellelaget ($R_{\text{totalt cellelag}}$) etter eksponering.

Resistens (R):

$$R_{\text{totalt cellelag}} = R_{\text{prøve}} - R_{\text{blank}}$$

Tabell 2.3.A: De forskjellige konsentrasjonene av PepDK og PepNE som ble testet på Caco-2-cellemonolag for å undersøke effekten peptidene har på transepitelet.

Konsentrasjon (µM)	PepDK	PepNE
5	x	x
10	x	x
20	x	x
30	x	x
50	x	x
100	x	x
150	x	x
200	x	x
250	x	-

2.4 Statistisk analyse og databehandling

Dataene fra *in vitro*-immunoassay ble normalisert for å lettere kunne sammenligne resultatene fra ulike plater ettersom det var variasjoner i målingene fra plate til plate. Resultatene ble uttrykt som prosent av positiv kontroll, hvorpå positiv kontroll var 100 %. Videre ble resultatene av testpeptidene presentert som median \pm variasjonsbredden. Årsaken til at dette ble valgt fremfor gjennomsnitt \pm standardavvik var fordi det kun ble gjort tre målinger for hver konsentrasjon av peptidene. Statistisk signifikans (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$) ble bestemt med en Student's t-test med tosidig fordeling for uparede datasett utført i Microsoft Excel hvor resultatene for testpeptidene ble sammenlignet med positiv kontroll. Denne programvaren ble også benyttet til å utarbeide grafer for å enkelt illustrere resultatene som er oppnådd i forsøkene.

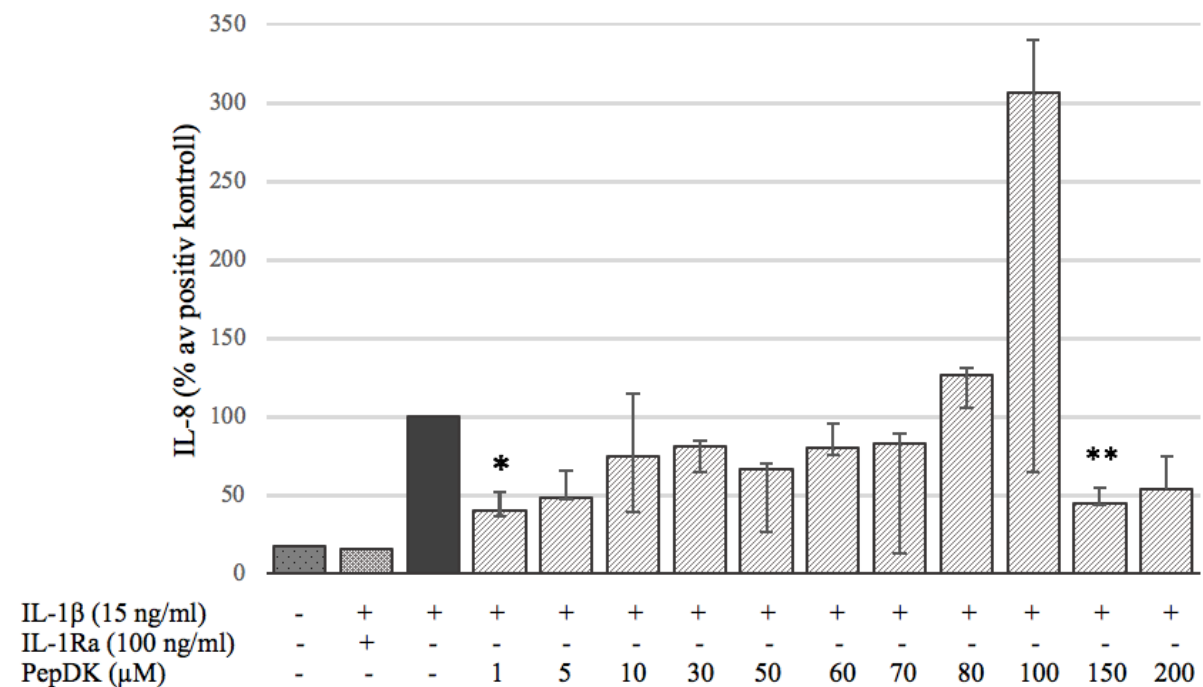
For *in vitro*-tarmpermeabilitetsanalysen (TEER) ble det utført en Student's t-test med tosidig fordeling for parede datasett i Microsoft Excel for å undersøke statistisk signifikans (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$) mellom TEER-verdien før og etter peptideksponering. Denne programvaren ble også benyttet til utarbeidelse av grafer som illustrerer resultatene fra forsøket. Alle resultatene ble belyst i et stolpe- og linjediagram, samt i et spredningsplott. Stolpediagram presenterer gjennomsnitt \pm standardavvik av TEER-verdien før og etter peptideksponering. Linjediagram av resultatene presenterer gjennomsnitt av differansen i TEER-verdien før og etter peptideksponering til de ulike målingene for det bestemte testpeptidet. Resultater med høy verdi representerer en større differanse og lav verdi representerer en mindre differanse. Spredningsplott av resultatene presenterer differansen i TEER-verdien før og etter peptideksponering til hver av de ulike prøve. Et stolpediagram for forsøket der ulike celletettheter ble testet ut ble utformet i Microsoft Excel.

3.0 Resultater

3.1 Effekt av PepDK og PepNE på IL-8-produksjon i Caco-2-celler

Caco-2-celler ble indusert med cytokinet IL-1 β og testpeptider for å undersøke eventuelle immunmodulerende effekter av peptidene. IL-1 β fremmer IL-8-produksjon, og IL-8-konsentrasjonen ble målt med sandwich ELISA. For å kontrollere effekten til peptidene i testsystemet, ble det benyttet positiv kontroll hvor IL-1 β ble tilsatt Caco-2-cellene uten testpeptider (100 % IL-8-produksjon), negativ kontroll uten IL-1 β eller testpeptider og inhibitor kontroll med IL-1 β sammen med IL-1 β -antagonisten IL-1Ra.

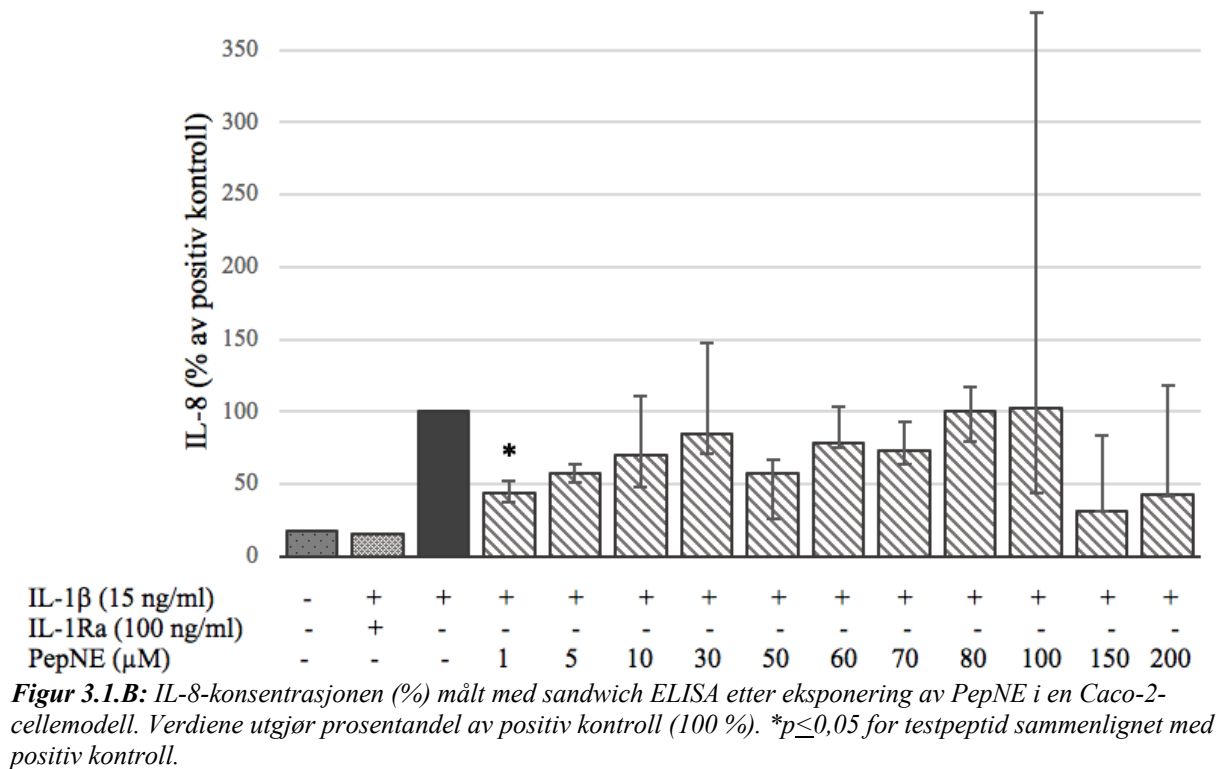
Figur 3.1.A viser mengden IL-8 produsert i Caco-2-celler etter IL-1 β -indusering alene (positiv kontroll) og sammen med PepDK ved ulike konsentrasjoner. Målt IL-8-konsentrasjon produsert med testpeptidene tilstede er oppgitt i prosent basert på positiv kontroll (100 %). Figuren viser i tillegg negativ kontroll hvor det ikke ble tilsatt IL-1 β , samt inhibitor kontroll der også IL-1Ra ble tilført Caco-2-celler sammen med IL-1 β .



Figur 3.1.A: IL-8-konsentrasjonen (%) målt med sandwich ELISA etter eksponering av PepDK i en Caco-2-cellemodell. Verdiene utgjør prosentandel av positiv kontroll (100 %). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ for testpeptid sammenlignet med positiv kontroll.

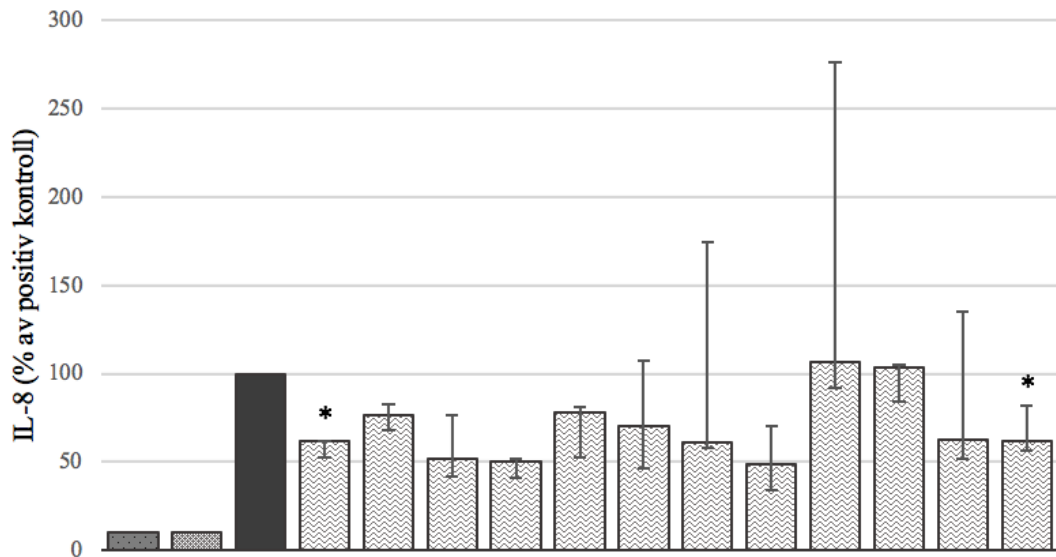
Sammenlignet med positiv kontroll medførte tilstedeværelse av PepDK til reduksjon i IL-8-produksjonen, med unntak av ved konsentrasjonene 80 og 100 μ M. Det var en signifikant reduksjon i IL-8-produksjonen ved konsentrasjonene 1 μ M ($p < 0,05$) og 150 μ M ($p < 0,01$).

Figur 3.1.B viser mengden IL-8 produsert i Caco-2-celler etter IL-1 β -indusering alene (positiv kontroll) og sammen med PepNE ved ulike konsentrasjoner. Målt IL-8-konsentrasjon produsert med testpeptidene tilstede er oppgitt i prosent basert på positiv kontroll (100 %). Figuren viser også negativ kontroll hvor det ikke ble tilsatt IL-1 β , i tillegg til inhibitor kontroll der også IL-1 β -antagonisten IL-1Ra ble tilført Caco-2-celler sammen med IL-1 β .



I likhet med PepDK medførte tilstedeværelse av PepNE til reduksjon i IL-8-produksjonen sammenlignet med positiv kontroll, med unntak av ved noen enkeltmålinger. Det var en signifikant reduksjon i IL-8-produksjonen ved konsentrasjonene 1 μ M ($p < 0,05$).

Figur 3.1.C viser konsentrasjonen av IL-8 produsert ved eksponering for PepDK og PepNE i 1:1-forhold i Caco-2-celler sammen med IL-1 β . PepDK+PepNE ble testet ved forskjellige konsentrasjoner. Figuren viser også de tre kontrollene; positiv-, negativ- og inhibitor kontroll.



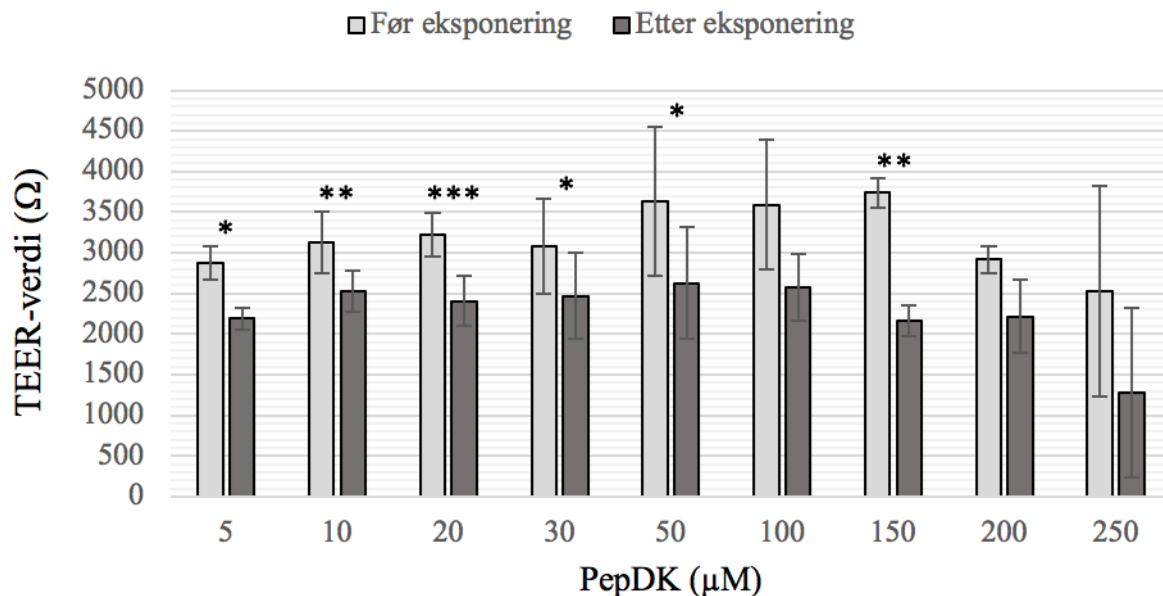
Figur 3.1.C: IL-8-konsentrasjonen (%) målt med sandwich ELISA etter eksponering av PepDK+PepNE i en Caco-2-cellemodell. Verdiene utgjør prosentandel av positiv kontroll (100 %). * $p \leq 0,05$ for testpeptid sammenlignet med positiv kontroll.

PepDK+PepNE i 1:1-forhold førte til en reduksjon i IL-8-produksjonen sammenlignet med positiv kontroll, med unntak av ved konsentrasjonene 70 og 80 μ M. Reduksjonen i IL-8-produksjonen var signifikant ved konsentrasjonene 1 og 150 μ M ($p < 0,05$).

3.2 Effekt av PepDK og PepNE på permeabiliteten til Caco-2-cellemonolag

Caco-2-cellemonolag ble benyttet for å undersøke testpeptidene sin effekt på tarmepitelpermeabilitet. På dag 21 ble først TEER (Ω) målt uten testpeptider. Videre ble nytt medium med testpeptider i bestemte konsentrasjoner tilsatt brønnene på den apikale siden. Etter 2,5 timer ble TEER (Ω) av Caco-2-cellemonolaget målt på nytt. I resultatene vurderes differansen i den målte TEER-verdien (Ω) før og etter peptideksponering.

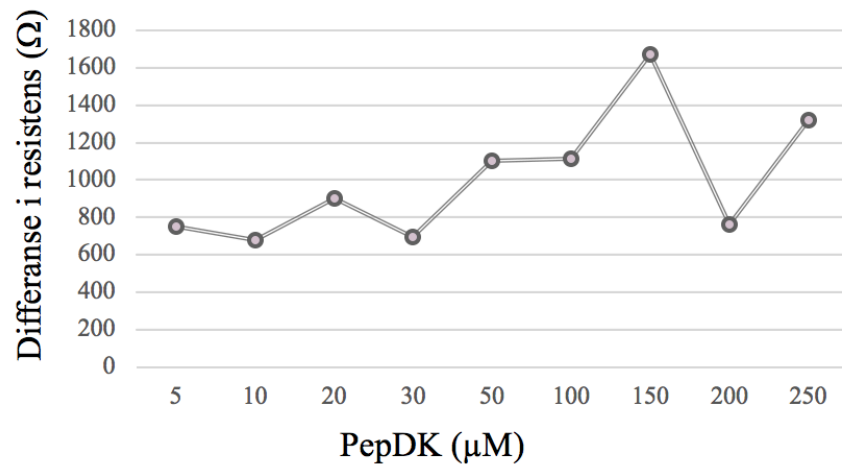
Figur 3.2.A viser resultatene av TEER-verdien (Ω) til Caco-2-cellemonolaget fra måling før og etter eksponering av PepDK ved ulike konsentrasjoner.



Figur 3.2.A: TEER-verdien (Ω) til Caco-2-cellemonolag på dag 21 målt før og etter eksponering av PepDK. «Før eksponering» tilsvarer den elektriske motstanden til monolaget av celler før peptidet ble tilført. «Etter eksponering» viser den elektriske motstanden til monolaget av celler etter 2,5 timer peptideksponering. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ sammenlignet før og etter peptideksponering.

TEER var lavere etter eksponering for PepDK for samtlige prøver. Det var signifikant forskjell for 1, 30 og 50 μM ($p < 0,05$), for 10 og 150 μM ($p < 0,01$) og 20 μM ($p < 0,001$).

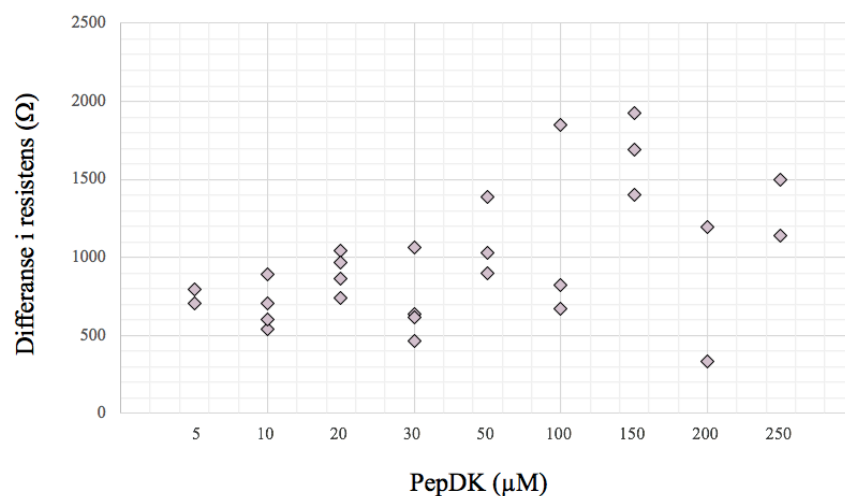
Figur 3.2.B viser den gjennomsnittlige differansen i TEER (Ω) før og etter peptideksponering ved de ulike PepDK-konsentrasjonene, hvorpå en høyere verdi tilsvare større differanse og lavere verdi tilsvare en mindre differanse i resistensen.



Figur 3.2.B: Grafen illustrerer differansen i TEER-verdien (Ω) til Caco-2-cellemonlaget på dag 21 før og etter eksponering av PepDK. Punktene ved de forskjellige konsentrasjonene er gjennomsnitt av de ulike målingene for den aktuelle konsentrasjonen.

Differansen var størst ved konsentrasjonene 50, 100, 150 og 250 μM og minst ved 5, 10, 30 og 200 μM .

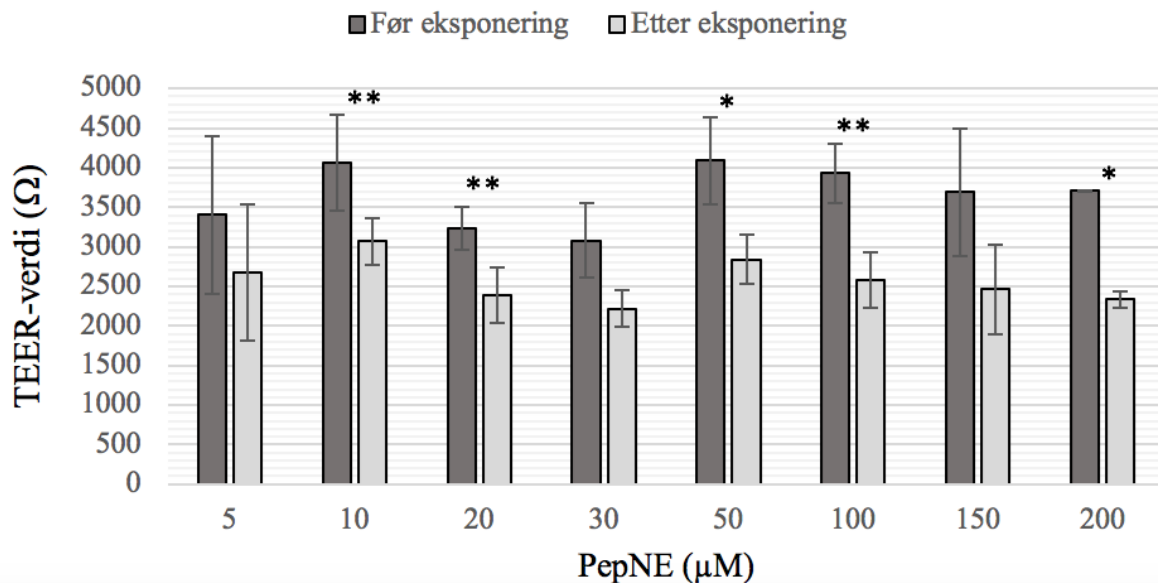
Figur 3.2.C viser spredningsområdet til de ulike målingene for aktuelle konsentrasjoner av PepDK. Resultatene er oppgitt som differansen i resistensen (Ω) før og etter PepDK-eksponering.



Figur 3.2.C: Grafen viser differansen i TEER-verdien (Ω) til de ulike målingene av Caco-2-cellemonlag på dag 21 før og etter eksponering av PepDK i ulike konsentrasjoner. Høy verdi tilsvare en større differanse og motsatt ved lav differanseverdi.

Som illustrert i figuren var det spredning i differansen ved de ulike målingene også ved samme konsentrasjoner.

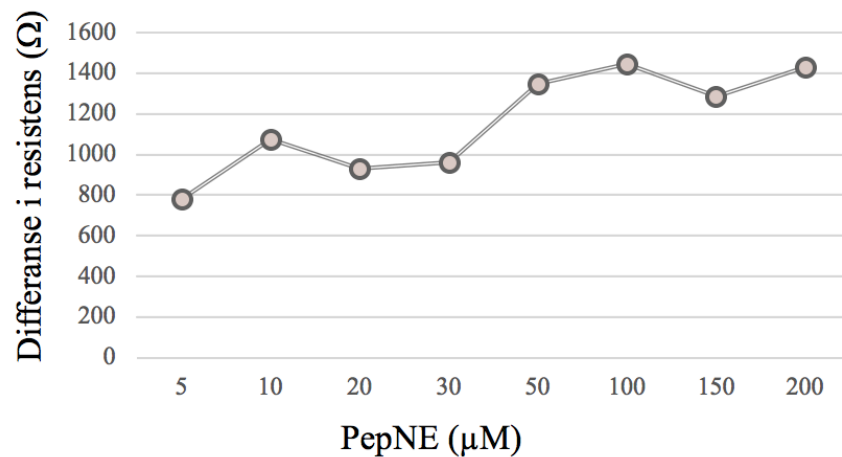
Figur 3.2.D viser resultatene av TEER-verdien (Ω) til Caco-2-cellemonolaget fra måling før og etter eksponering av PepNE ved ulike konsentrasjoner.



Figur 3.2.D: TEER-verdien (Ω) til Caco-2-cellemonolag på dag 21 målt før og etter eksponering av PepNE. «Før eksponering» tilsvarer den elektriske motstanden til monolaget av celler før peptidet ble tilført. «Etter eksponering» viser den elektriske motstanden til monolaget av celler etter 2,5 timer peptideksponering. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ sammenlignet før og etter peptideksponering.

TEER var lavere etter eksponering for PepNE for samtlige prøver. Det var signifikant forskjell for 50 og 200 μM ($p < 0,05$), samt for 10, 20 og 100 μM ($p < 0,01$).

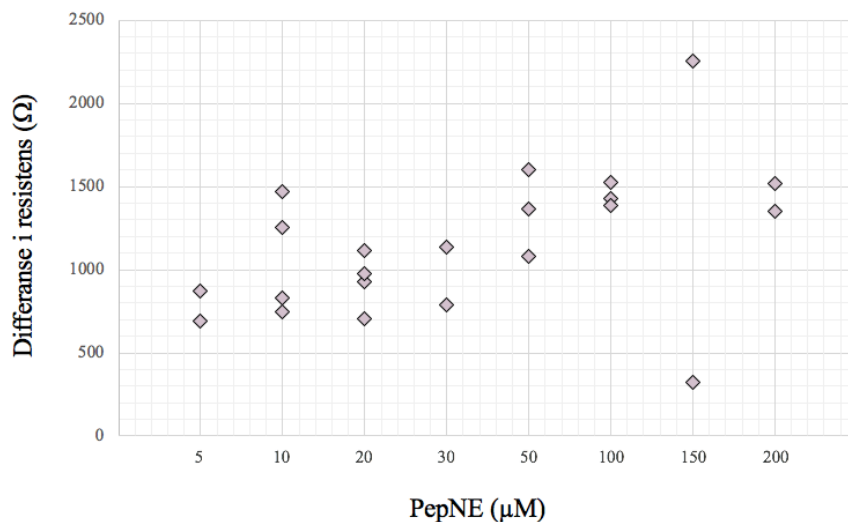
Figur 3.2.E viser den gjennomsnittlige differansen i TEER (Ω) før og etter peptideksponering ved de ulike PepNE-konsentrasjonene, hvorpå en høyere verdi tilsvarer større differanse og lavere verdi tilsvare en mindre differanse i resistensen.



Figur 3.2.E: Grafen illustrerer differansen i TEER-verdien (Ω) til Caco-2-cellemonolaget på dag 21 før og etter eksponering av PepNE. Punktene ved de forskjellige konsentrasjonene er gjennomsnitt av de ulike målingene for den aktuelle konsentrasjonen.

Differansen var størst ved konsentrasjonene 50, 100, 150 og 200 μM og minst ved 5, 10, 20 og 30 μM .

Figur 3.2.F viser spredningsområdet til de ulike målingene for aktuelle konsentrasjoner av PepNE. Resultatene er oppgitt som differansen i resistensen (Ω) før og etter PepNE-eksponering.



Figur 3.2.F: Grafen viser differansen i TEER-verdien (Ω) til de ulike målingene av Caco-2-cellemonolag på dag 21 før og etter eksponering av PepNE i ulike konsentrasjoner. Høy verdi tilsvarer en større differanse og motsatt ved lav differanseverdi.

Det var spredning i differansen ved de ulike målingene også ved samme konsentrasjoner.

4.0 Diskusjon

I skiftet mot et mer bærekraftig og helsefremmende kosthold er det nødvendig å redusere produksjon og konsum av kjøtt, da spesielt rødt kjøtt, til fordel for proteinrike matplanter ^{7, 6}. Formålet med forskningsprosjektet FoodProFuture er å etablere en kunnskapsplattform for norskdyrkede proteinrike matplanter. Som en del av dette arbeidet er det nødvendig å kartlegge ulike helseeffekter av planteproteiner, samt fragmenter fra disse. Et kosthold rikt på erter har vist å kunne redusere tilfeller av diabetes type 2, hjertesykdom, LDL-kolesterol og tarmkreft ⁶⁷. Ved siden av essensielle makro- og mikronæringsstoffer kan erter inneholde bioaktive komponenter, eksempelvis peptider, som påvirker helsen uten å tilføre kroppen næring ^{67, 68, 69}. Når bioaktive peptidsekvenser er en del av opprinnelsesproteinet vil de være inaktive, og det må spaltes fra proteinet for å være aktivt ⁶⁹. Bioaktive peptider kan regulere og forbedre biologiske funksjoner i menneskekroppen. Denne masteroppgaven har undersøkt mulige egenskaper til *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erteprotein i to ulike modeller av Caco-2 adenokarsinomceller. I en modell ble testpeptidene, kalt PepDK og PepNE i oppgaven, undersøkt for mulige immunmodulerende egenskaper på produksjonen av IL-8. IL-8-produksjon i Caco-2-cellene ble induisert av cytokinet IL-1 β . I en annen modell ble de samme peptidene undersøkt for mulige egenskaper på tarmepitelets permeabilitet gjennom måling av TEER av polariserte Caco-2-cellemonolag før og etter peptideksponering. Peptidene som ble studert nærmere i denne oppgaven ble identifisert i en tidligere studie i samme forskningsprosjekt etter *in vitro*-fordøyelse.

4.1 Peptidenes effekt på IL-8-produksjon

Basert på resultatene fra denne studien har ertepeptidene PepDK og PepNE hemmende effekt på IL-1 β -indusert IL-8-produksjon i Caco-2-celler. For både PepDK og PepNE alene, samt peptidene sammen i 1:1-forhold var effekten signifikant forskjellig fra den positive kontrollen (100 % IL-8-produksjon) ved flere konsentrasjoner. Også ved konsentrasjoner der det ikke var en signifikant forskjell mellom testpeptidene og den positive kontrollen, ble det sett en betydelig inhiberende trend i IL-8-produksjonen ved tilstedeværelse av testpeptidene. Derimot var det unntak ved noen konsentrasjoner hvor det isteden ble sett en økning i IL-8-produksjonen sammenlignet med den positive kontrollen. Disse vil bli diskutert ytterligere i senere avsnitt.

Studien fra denne masteroppgaven gir indikasjon på at de utvalgte peptidene kan ha immunmodulerende egenskaper, men resultatene forteller ikke hvilke potensielle mekanismer som ligger bak. Som nevnt innledningsvis er mekanismen bak IL-1 β -indusert IL-8-produksjon en rekke intracellulære kaskadereaksjoner som oppstår når IL-1 β binder seg til reseptorer på cellens overflate. Kaskadereaksjonen medfører at NF- κ B aktiveres og som videre binder seg til IL-8-promotor på DNA, noe som medfører oppregulering av IL-8-ekspresjonen. NF- κ B finnes i cytoplasma i inaktiv tilstand ⁷⁰. Aktiveringen av NF- κ B kan også oppstå som følge av stimuli fra andre cytokiner slik som tumor nekrosefaktor alfa (TNF- α). Både TNF- α og IL-1 β binder seg til spesifikke reseptorer på cellemembranens ytre og stimulerer intracellulære reaksjoner, noe som igangsetter en inflammasjonsreaksjon ⁷⁰. Cytokinstimulerte Caco-2-celler med eksempelvis IL-1 β og TNF- α blir ofte benyttet til som *in vitro* IBD-modell for å undersøke effekten av ulike matkomponenter med hensyn på forebygging og behandling av den kroniske betennelsestilstanden IBD som rammer mage-tarmkanalen ⁷¹.

Sett i sammenheng med sykdom, som eksempelvis IBD, kan bioaktive peptider være viktige. Kroniske betennelser kan være ytterst problematiske med svært alvorlige konsekvenser ⁷². Når det først har oppstått en slik inflammatorisk ubalanse, vil det være vanskelig for kroppen å rette det opp. Dette er fordi det under en inflammasjonsrespons fra proinflammatoriske cytokiner produseres flere inflammasjonsmediatorer, noe som videre blant annet kan medføre reduksjon i tarmepitelintegriteten og føre til skader i vev. Dette vil igjen bidra til å holde inflammasjonen vedlike. På grunn av dette har personer med IBD økt sannsynlighet for utvikling av kolorektalkreft. Dagens farmasøytiske terapi mot IBD fokuserer på modulering av immun- og inflammasjonsresponsen, men det rapporteres om uheldige bivirkninger. Ulike bioaktive peptider derivert fra matkilder har vist å ha antiinflammatoriske og immunmodulerende egenskaper hos personer med IBD ⁷³. Forskere ønsker derfor å kartlegge ulike peptider med slike egenskaper, samt mekanismene som ligger bak disse egenskapene ⁷². Basert på resultatene fra disse eksperimentene ville det vært interessant å studert PepDK og PepNE i sammenheng med forebygging og behandling av IBD.

Bioaktive peptider kan virke immunmodulerende gjennom ulike mekanismer. Eksempelvis viste et peptid derivert fra soya å kunne virke antiinflammatorisk ved å undertrykke sekresjonen av cytokiner via en protonavhengig peptidtransportør i tarmen ⁷². Et peptid fra myseprotein har vist å kunne hemme IL-8-produksjonen ved å blokkere agensen sitt bindingssete på reseptoren.

Biologiske effekter av proteinet chenopodin som finnes i store mengder i quinoa, har blitt undersøkt for immunmodulerende egenskaper i Caco-2-celler⁷⁴. I en studie ble aktiveringen av NF- κ B og produksjonen av IL-8 målt etter induisert inflammasjon med IL-1 β . Chenopodin viste å ha en antiinflammatorisk effekt. Nedregulering av NF- κ B-aktiveringen ses på som en viktig årsak til den antiinflammatoriske effekten til chenopodin. Det finnes to former for chenopodin – lite ladet chenopodin (LcC) og høyt ladet chenopodin (HcC). Mekanismen bak deres virkning på IL-8-produksjonen ser ut til å være forskjellig. Forskerne så at LcC hadde evnen til å binde seg til IL-1 β , noe som forhindret cytokinet i å binde seg til målreseptoren. HcC på sin side virket direkte på cellene og forhindret IL-1 β i å kunne binde seg. Flere andre studier har vist at bioaktive proteiner og peptider, blant annet fra erter, kan stimulere eller direkte interagere med toll-liknende reseptor (TLR). De fleste immunceller og epitelceller uttrykker TLR og de utgjør en viktig rolle i reguleringen av immunresponsen⁷⁵. Bovine glykomakropeptid (BGMP) ser ut til å blant annet øke produksjonen av IL-1Ra-lignende cytokiner⁷³. Studie har vist at aminosyren histidin kan redusere TNF- α -indusert IL-8-produksjon i Caco-2-celler⁷¹. Peptidet lunasin derivert fra soya har vist å kunne hemme kreftutvikling i celler gjennom både å hindre celleforandringer ved kjemisk karsinogenindusering og fremme en selektiv apoptose hos celler som transformeres ved å forhindre histonacetylering på DNA-nivå⁶⁷. I belgfrukter, herunder soyabønner, linser, kikerter og erter, finnes det peptider som virker proteasehemmende og kalles for Bowman-Birk (BBI)⁷⁶. Studier indikerer at disse forbindelsene forebygger tarmkreft. I tillegg indikerer studier at disse peptidene har antiinflammatorisk effekt ved at de forhindrer frie radikaler i å frigjøres fra celler. En BBI-isoform isolert fra erter, kalt TI1B, har også vist å virke hemmende på protaser⁶⁷. γ -glutamyl-peptider har vist å kunne indusere aktivering av kalsiumsensende reseptor og derfor øke de intracellulære kalsiumnivåene, samt virke antiinflammatoriske i både *in vivo* og *in vitro* IBD-cellemodeller⁷²

Overnevnte eksempler er med for å illustrere hvor kompleks immunmoduleringen kan være og at det finnes flere ulike mekanismer bak. Via forskjellige molekylære mekanismer kan bioaktive peptider være involvert i regulering av intracellulære signalveier og ekspresjon av ulike gener ved å bli absorbert fra tarmen, transporter inn i cellen eller interagere med reseptorer på cellemembranen^{72, 67}. Mange bioaktive peptider vil ikke bli absorbert fra tarmen, og vil derfor utgjøre sin virkning direkte i tarmkanalen⁶⁷. Den intracellulære kaskadereaksjonen som oppstår ved stimuli fra eksogen IL-1 β der NF- κ B aktiveres, kan som nevnt hemmes. PepDK og PepNE kan virke ekstracellulært ved å binde seg til samme reseptorer som IL-1 β . Som nevnt

innledningsvis kunne reseptorantagonisten IL-1Ra ta opp plassen i det samme bindingssetet som IL-1 β . Hvorvidt det er den samme mekanismen som medfører at PepDK og PepNE hemmer IL-8-produksjon i Caco-2-cellene kan ikke bestemmes basert på denne studien. Samtidig er det mindre sannsynlig at kompetitiv binding er mekanismen som medførte immunmoduleringen som ble observert. Sekvensen til IL-1 β som er publisert på UniProt.org, viser kun forsvinnende små likheter med sekvensen til PepDK og PepNE. Det finnes imidlertid andre ekstracellulære måter peptidene kan virke på, blant annet hvor de binder seg til andre reseptorer på cellemembran som videre virker intracellulært på kaskadereaksjonen som medfører IL-8-produksjon eller hvor de interagerer med andre molekyler som videre påvirker IL-8-produksjon ⁷². Det kan også tenkes at PepDK og PepNE tas opp i cellen, som for eksempel ved hjelp av transportproteiner, og virker intracellulært ⁷².

Til tross for at resultatene fra studien gir inntrykk av at peptidene har immunmodulerende egenskaper, er det nødvendig å påpeke at studien har visse svakheter. Eksempelvis ble konsentrasjonene av de utvalgte peptidene bestemt i et tidlig stadium av prosessen i denne masteroppgaven. Da de ulike konsentrasjonene ble valgt var det primært ønsket å finne ut om peptidene kunne ha effekt på IL-8-ekspressjonen i Caco-2-celler. Sett i retrospektiv ville det vært aktuelt å teste ut også andre konsentrasjoner enn hva som ble undersøkt i denne studien. Det ville vært gunstig å velge konsentrasjoner med til eksempel en halveringsrekke eller en faktor på 5. I tillegg burde konsentrasjonsrekken inkludert en konsentrasjon på 0 μ M der kun middelet som peptidene var fortynnet med, ble testet. For prøven med konsentrasjon på 0 μ M ville det vært forventet samme resultat som for positiv kontroll ettersom det kun ville blitt tilsatt IL-1 β og fortynningsvæske uten peptid. En slik prøve ville kunne avdekke om det var artefakter som var årsak til resultatene, slik som at cellene blir utsatt for hypoosmolare betingelser. I en halveringsrekke med høyeste konsentrasjon på 100 μ M ville eksempelvis de neste konsentrasjonene vært 50, 25, 12,5, 6,25 og 3,125 μ M og frem til 0 μ M. Med en faktor på 5 ville påfølgende konsentrasjoner være 20, 4, 0,8, 0,16 og 0,032 μ M, og videre helt til 0 μ M. På den måten ville det vært mulig å undersøke peptidenes immunmodulerende egenskaper i et større område. I biologi er det vanlig at kurven for dose-respons er U-formet ⁶. Ved å velge en annen strategi for konsentrasjonstesting av peptidene, slik som forøvrig nevnt, er det nærliggende å tro at dette ville gitt bedre svar på hvordan dose-respons-kurven til peptidene er.

Ved siden av valg av peptidkonsentrasjoner ville det vært hensiktsmessig for validiteten til resultatene dersom det ble gjort flere analyser av de samme konsentrasjonene. I tillegg hadde det vært ønskelig om disse var gjort på ulike plater for å se på reproduserbarheten til målingene. I dette forsøket ble det kun testet triplikater av hvert peptid ved de aktuelle konsentrasjonene, og det ble gjort på samme plater. Dette medfører stor usikkerhet i dataene. I tillegg ble det kun benyttet duplikater av de tre kontrollene på hver plate. Kontrollene som ble benyttet var negativ kontroll der kun nytt medium ble tilsatt og positiv kontroll der IL-1 β ble tilsatt, samt inhibitor kontroll der både IL-1 β og IL-1Ra ble tilsatt. Det kunne vært fordelaktig å inkludere en kontroll der peptidet i de bestemte konsentrasjonene ble testet uten IL-1 β . Dette ville gitt et større bilde på de biologiske reaksjonene som foreligger i resultatene.

I negativ kontroll ble det ikke tilsatt IL-1 β , hvorpå det derfor ikke var forventet særlig IL-8-produksjon. Allikevel ble det målt IL-8 fra flere av de negative kontrollene. IL-8 produseres når NF- κ B aktiveres som følge av intracellulær stimulering. Det kan tenkes at det var forhold i brønnene der Caco-2-cellene ble dyrket som medførte at NF- κ B ble aktivert. Ved sammenligning med inhibitor kontrollene ble det til og med målt lavere IL-8-konsentrasjon når IL-1Ra var tilstede. Et annet interessant funn var at det ble ved en feiltakelse foretatt en prøve med testpeptid uten IL-1 β -induksjon. Dette var ved 200 μ M av PepDK og resultatet finnes i vedlegg. Fra denne prøven ble det målt en konsentrasjon av IL-8 på mindre enn 1 % sammenlignet med positiv kontroll. Til sammenligning målte negativ kontroll i gjennomsnitt en konsentrasjon av IL-8 på mer enn 17 % IL-8. For de to andre målingene av 200 μ M PepDK der IL-1 β ble tilsatt etter planen, var resultatet 53,5 og 74,3 %. På bakgrunn av at IL-8 ble produsert i et system uten IL-1 β -induksjon, samt at PepDK uten IL-1 β medførte den laveste målingen av IL-8, er dette med på å styrke indikasjonen på at PepDK kan ha en immunmodulerende effekt.

I forsøket ble både IL-1Ra og testpeptidene tilsatt brønnene 30 til 40 minutter før IL-1 β ble tilsatt. Bakgrunnen for at IL-1Ra ble tilsatt før IL-1 β var først og fremst for å gi antagonisten et forsprang til å binde seg til reseptorene på cellemembranen før IL-1 β ble tilsatt systemet. Ettersom hensikten med studien var å identifisere mulige immunmodulerende effekter av testpeptidene, ble også testpeptidene tilsatt i sine brønner samtidig som IL-1Ra i inhibitor kontrollene. Som nevnt er det ikke mulig å si noe om mekanismene som ligger bak funnene, men det er interessant å bemerke at peptidene hadde evne til å inhibere IL-8-

produksjonen når det ble tilsatt i forkant av IL-1 β -induksjon. Det ville derfor vært interessant å studert forskjeller ved tilsetning av IL-1 β samtidig som peptidene og etter 30-40 minutter, som i denne studien. Det er også viktig å bemerke at virkningen av peptidene trolig vil være en helt annen *in vivo* ettersom det da vil være en rekke andre komponenter tilstede som påvirker immunreaksjoner. Ulike peptider kan ha synergisk eller antagonistisk effekt ¹⁷.

Det ble målt langt høyere konsentrasjoner av IL-8 ved særlig noen konsentrasjoner. Spesielt ved konsentrasjonene 80 og 100 μ M av PepDK ble det observert avvikende høye IL-8-konsentrasjoner sammenlignet med positiv kontroll. Den samme tendensen ble sett for PepNE. Det som er verdt å bemerke er at triplikatene for 80 μ M PepDK og PepNE ble målt på samme plate. Dette gjelder også for 100 μ M, samt også konsentrasjonene 70 og 80 μ M av PepDK+PepNE i 1:1-forhold. Det kan ha oppstått forhold i positiv kontroll eller peptidprøvene kan medføre bias og som påvirket resultatene. Det er viktig å vektlegge at det kun ble utført triplikater av et peptid ved en bestemt konsentrasjon, og at mengden IL-8 ble vurdert med prosent av den positive kontrollen. Dette kunne imidlertid blitt kontrollert dersom det hadde blitt benyttet flere plater til testing av peptider ved de samme konsentrasjonene. Samtidig kan det ha oppstått målefeil under bestemmelse av IL-8-konsentrasjon med sandwich ELISA. Det kan for eksempel hende at supernatanten ikke ble resuspendert godt nok før uttak av prøvene eller at det har oppstått feil under preparering av sandwich ELISA-platene som medfører at IL-8 ikke festes til brønnene.

Selv om resultatene viser en trend som tilsier at peptidene har immunmodulerende egenskaper er det flere usikkerhetsmomenter i resultatene. Det har vært utfordrende å sammenligne resultatene fra hver av platene som ble testet og mange faktorer kan ha hatt innvirkning på resultatene. Forsøk der cellemodeller benyttes er tid- og ressurskrevende, noe som setter begrensninger for hva som er mulig å oppnå i en masteroppgave av denne størrelsen. Fokuset lå først og fremst på å innhente nok data til å vurdere effekten til peptidene. Dersom forsøket skulle gjentas ville forfatter av denne masteroppgaven rådet til å vektlegge kvalitet fremfor kvantitet, samt å effektivisere forsøket der det er mulig. Som nevnt innledningsvis ble det i forsøket benyttet 12-brønnsplater til å dyrke Caco-2-cellene. Disse kunne til fordel blitt erstattet med 24- eller 96-brønnsplater. Dette ville gjort det mulig å inkludere flere kontroller og flere peptidprøver på en plate. En svakhet med denne studien var blant annet at peptider med samme konsentrasjon ikke ble testet på ulike plater. Ved å benytte plater med flere brønner ville testkapasiteten økt og samtidig gitt resultatene mer styrke. På en sandwich ELISA-plate er det

96 brønner. 24 av disse brønnene ble brukt til IL-8-standard. 72 brønner ble brukt til egne prøver, og i dette forsøket ble det valgt å teste hver prøve i duplikater. Slik som forsøket var lagt opp i denne oppgaven gav en sandwich ELISA-plate 18 resultater av ulike peptidprøver fra totalt tre 12-brønnsplater. Til kontrollene gikk det 36 av 96 brønner. For å øke validiteten av sandwich ELISA-resultatene kunne det blitt utført triplikater av hver prøve, men på en annen side ville dette krevd flere sandwich ELISA-plater, noe som igjen ville blitt mer tid- og ressurskrevende.

Hvorvidt konsentrasjonene som er testet av de utvalgte peptidene er av biologisk relevant verdi er imidlertid usikkert. Det er flere måter å vurdere dette på. Etersom peptidene ble isolert fra ertermel vil en kunne utføre estimater på hvilke mengder en porsjon erter ville gitt av de utvalgte peptidsekvensene. Samtidig kan det argumenteres for at dersom disse peptidene har en immunmodulerende effekt, kan det etter flere studier tenkes at potensialet til peptidene ligger i tilskuddsbruk for å eksempelvis redusere kroniske inflammasjoner. Peptidene vil i slikt fall være i konsentrerte mengder. For å bestemme om peptider har fysiologisk relevans, vil det uansett være behov for at det utføres flere kjemiske analyser. Videre vil det være nødvendig med *in vivo*-studier for å undersøke effekten nærmere. I denne masteroppgaven vil ikke biologisk relevans av utvalgte peptidkonsentrasjoner diskuteres ytterligere da det kun var ønsket å studere mulige egenskaper av PepDK og PepNE.

Resultatene fra disse forsøkene kan indikere at peptidene PepDK og PepNE kan ha immunmodulerende effekt ved å nedregulere IL-8-ekspresjonen. Studien bidrar til å danne kunnskap om mulige egenskaper til *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erterproteiner og det oppfordres til videre forskning på deres immunmodulerende egenskaper.

4.2 Peptidenes effekt på tarmepitelets permeabilitet

For samtlige prøver ved ulike konsentrasjoner ble TEER av polariserte Caco-2-cellemonolag målt til å være lavere etter 2,5 time med eksponering av PepDK eller PepNE sammenlignet med TEER før peptideksponering. Dette betyr at den elektriske motstanden til epitelcellelaget var lavere etter eksponering for peptider. Med andre ord indikerer dette at PepDK og PepNE har egenskaper som medfører at den paracellulære permeabiliteten til tarmepitelet øker, så vel som at integriteten reduseres. Mekanismen bak denne endringen kan ikke bestemmes basert på disse resultatene da det finnes flere mekanismer som regulerer permeabiliteten.

Som nevnt innledningsvis er de okkluderende celleforbindelsene komplekse strukturer bestående av flere ulike proteiner. Blant de viktigste proteinene er okkludin, claudiner, junction adhesjonsmolekyl (JAM), cingulin og ZO-1, -2 og -3^{23, 71, 77}. De tre førstnevnte proteinene er integrert i membranen i tillegg til å danne intra- og ekstracellulære strukturer. Den ekstracellulære strukturen som disse tre proteinene sammen danner, binder epitelceller sammen og regulerer barrierefunksjonen til tarmepitelet. Intracellulært er disse proteinene videre linket til perifere membranproteiner, slik som cingulin og ZO-1, -2 og -3, som videre er linket til aktin og myosin. En velfungerende barriere er avhengig av alle komponentene i den komplekse strukturen til de okkluderende celleforbindelsene. Regulering foregår ved at proteinene fosforyleres⁷¹. Endringer i den intercellulære strukturen er en kontinuerlig og dynamisk prosess som påvirkes av intracellulær stimulering, noe som igjen er påvirket av ekstracellulære forhold. Etersom det er de okkluderende celleforbindelsene som kontrollerer den paracellulære transporten av molekyler fra apikal til basolateral side, er det nødvendig å forstå hvilke signalforbindelser som påvirker strukturen. Små endringer i strukturen kan ha konsekvenser for barriereintegriteten, noe som igjen kan medføre mindre selektiv fluks av molekyler inn i kroppen. Konstant vil tarmlumen bli eksponert for ulike matkomponenter, men også organismer fra mikroflora, patogener og antigener. Økt tarmepitelpermeabilitet kan føre til at uønskede stoffer får passere tarmbarrieren.

En svekket tarmbarriere er forbundet med negative konsekvenser ettersom det medfører en mindre seleksjon av mikroorganismer, toksiner, allergener og andre fremmedstoffer fra tarmlumen inn i kroppen og over i blodbanen^{26, 31}. En dysfunksjon i de okkluderende celleforbindelsene kan blant annet medføre sykdom som IBD ettersom uønskede molekyler kan gi inflammasjonsreaksjoner⁷¹. Uønskede molekyler, slik som allergener, kan gi en overstimulering i immunforsvaret⁷². På en annen siden har en studie vist at IL-1 β fører til en økning i permeabiliteten til tarmbarriere av Caco-2-celler⁷⁸. Studien viste samtidig at effekten av IL-1 β på tarmepitelet var tidsavhengig og ikke skyltes en akutt intracellulær signalprosess, men istedenfor skyltes proteinsyntese. Ved cytokinindusert reduksjon i barriereintegriteten er det en rekke intracellulære mekanismer involvert. Apoptose eller nekrose har blitt foreslått som mekanismer bak økt permeabilitet. I nevnt studie førte ikke IL-1 β til celledød. Derimot har TNF- α vist å nedregulere ekspresjonen av okkludin, ZO-1 og claudin-1 i Caco-2-celler. Cytokinet interferon gamma (INF- γ) hadde samme effekt på ekspresjonen av

okkludin og ZO-1, men motsatt effekt på claudin-1. IL-1 β på sin side førte til oppregulering av claudin-1, men hadde ingen effekt på reguleringen ZO-1. Derimot kan IL-1 β føre til en nedregulering av okkludinekspresjon. Dette viser hvor kompleks reguleringen av de okkluderende celleforbindelsene trolig er. IL-1 β sin evne til å regulere okkludinekspresjonen kan se ut til at påvirkes av NF- κ B-aktivering⁷⁸. I en studie der NF- κ B-inhibitor ble benyttet sammen med IL-1 β -indusert permeabilitetsregulering av Caco-2-cellemonolag, viste resultatene at nedreguleringen av okkludinekspresjonen ble hemmet.

Interaksjonen mellom ZO-1 og C-terminalregionen til okkludin er en viktig del av den tette strukturen til de okkluderende celleforbindelsene⁷¹. En nedregulering av okkludin vil kunne redusere integriteten til barrieren, mens en oppregulering vil styrke integriteten. Også endringer i ekspresjonen og distribusjonen av de andre proteinene som utgjør en del av de okkluderende celleforbindelsene, samt aktin, kan ha innvirkning på integriteten til tarmbarrieren. En studie av peptidsekvensen NPWDQ derivert fra kasein viste at peptidet kunne oppregulere okkludinekspresjon og styrke barrieren i Caco-2-cellemodell, noe som videre hindret store molekyler, herunder allergener, i å krysse barrieren⁷¹. Studien undersøkte TEER, samt endringer i genekspressjonen til de ulike proteinene i de okkluderende celleforbindelsene etter eksponering av peptidet. I motsetning til resultatene fra denne studien hvor TEER ble målt til å være lavere etter peptideksponering, var TEER høyere etter eksponering for NPWDQ. En annen studie som undersøkte effekten til chitosan, et kosttilskudd, på permeabiliteten til Caco-2-monolag viste en reduksjon i TEER etter eksponering³¹. Studien fant også at chitosan hadde cytotoxisk effekt og kunne medføre permanente skader på de okkluderende celleforbindelsene.

Ettersom reguleringen av de okkluderende celleforbindelsene er en dynamisk prosess, ville det i denne oppgaven vært interessant å måle TEER etter litt tid for å studere om permeabiliteten gikk tilbake til utgangspunktet. Eksempelvis kunne mediumet blitt byttet med nytt friskt medium uten peptider før nye målinger. For å undersøke for permanente celledskader kunne aktiviteten av laktat dehydrogenase i mediet under cellerepareringen blitt målt, hvorpå økt aktivitet indikerer permanente skader på plasmamembranen. Den vedvarende økning i tarmpermeabiliteten som chitosan kan medføre gjør at forfatterne av studien belyser utfordringer knyttet til daglig konsum av chitosan. Forfatterne diskuterer hvordan uønskede molekyler, slik som allergener og toksiner, kan komme over i blodbanen ukontrollert dersom chitosan konsumeres i for høye doser slik at tarmens integritet påvirkes³¹. Til sammenligning

kan det tenkes at de undersøkte konsentrasjonene av PepDK og PepNE var så høye at de virket cytotoxiske på Caco-2-cellene og at lavere dose ville medført en annen virkning, som til eksempel økt TEER. Det ville derfor vært gunstig og undersøkt peptidenes effekt på tarmbarrieren i lavere konsentrasjoner ³¹.

Et viktig spørsmål som ikke kan besvares i denne studien er hvorvidt PepDK og PepNE blir transportert paracellulært eller ikke, og om de virker utenpå Caco-2-cellene eller om de blir absorbert inn i cellene før de utgjør sin funksjon ⁷¹. Om de virker ekstracellulært kan være at de binder seg til reseptorer på cellemembranen eller at det forekommer interaksjoner med andre molekyler ³¹. Det kan også tenkes at de deltar i kaskadereaksjoner eller interagerer med molekyler intracellulært. En mulig forklaring på hvorfor permeabiliteten økte etter eksponering av peptidene kan være at Caco-2-monolaget registrerte tilstedeværelsen av peptider i de utvalgte konsentrasjonene som et signal på næringsstoffer ⁷¹. Den økte permeabiliteten kan derfor være en respons på signaler om at peptidene skulle absorberes.

Vurdert i etterkant er det flere områder av forsøket som kunne vært gjort annerledes. Blant annet burde det vært inkludert en prøve der kun fortynningsmedium uten peptid ble blandet med mediet, det vil si en 0 μ M. Dette ville bidratt til kunnskap om det er andre forhold enn kun peptidet som påvirker den økte permeabiliteten. Dersom cellene blir utsatt for hypoosmolare betingelser kan en sitte igjen med artefakte resultatene. Av samme årsak burde det blitt inkludert en kontroll der kun medium uten peptid ble erstattet for å se om mediet alene ville gitt samme resultat. For eksempel kan det tenkes at selve aktiviteten der gammelt medium fjernes og nytt medium påføres kan føre til små rifter i celledaget, noe som trolig kan medføre en økt permeabilitet i celledaget. Det kunne også vært nyttig å inkludere et irrelevant peptid som er kjent at ikke har effekt på celledaget, samt kontroller som medfører økning og reduksjon i permeabiliteten. I dette forsøket var det begrenset med testutstyr tilgjengelig slik at det kun var mulig å utføre forsøket på tre 24-brønnsplater. Dersom forsøket skulle blitt gjentatt, ville det vært en fordel å benytte flere plater. Det ville gitt flere gjentak, mulighet for flere paralleller av peptidene ved samme konsentrasjon og for å inkludere de nevnte kontrollene. I tillegg kunne peptidene blitt testet ved lavere konsentrasjoner for å undersøke om det er finnes en trend for når permeabiliteten begynner å øke.

Etter peptideksponering kunne det med fordel blitt gjort flere målinger av celledaget ved ulike tidsintervaller. I dette forsøket ble celledaget målt etter 2,5 time. Derimot ville det vært

interessant å studere effekten peptidene hadde på cellemonolaget også ved tidligere tidspunkt, samt senere tidspunkt. Dette ville gitt et bedre bilde av eksponeringstiden som skulle til før permeabiliteten ble påvirket av peptidene ved de ulike konsentrasjonene, samt hvorvidt integriteten vendte tilbake til utgangspunktet etter en viss tid.

Resultatene fra disse forsøkene indikerer at peptidene PepDK og PepNE kan øke tarmepitelets permeabilitet. Studien er med på å bidra til kunnskapsetablering rundt mulige egenskaper til *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erte proteiner. For en dypere forståelse oppfordres det til videre forskning på området.

5.0 Konklusjon

Basert på resultatene i denne oppgaven viste *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erte protein å kunne påvirke cytokinproduksjonen i tarmepitelet ved å inhibere IL-1 β -indusert IL-8-ekspressjonen i Caco-2 adenokarsinomceller. Resultatene viste også at de samme ertepeptider kunne påvirke integriteten til tarmbarrieren ved å øke permeabiliteten til Caco-2-cellemonolag. Imidlertid er det flere svakheter i forsøkene, noe som gjør det nødvendig med flere liknende studier med lavere peptidkonsentrasjoner og flere prøvegentak som viser reproducerbarhet. Allikevel gir masteroppgaven et grunnlag for videre forskning av mulige egenskaper til *in silico*-identifiserte bioaktive peptider fra erte protein.

Referanser

1. Nasjonalt råd for ernæring (2017). *Bærekraftig kosthold – vurdering av de norske kostrådene i et bærekraftperspektiv* (Hentet: 17.04.2020)
2. Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S. et al. (2019). Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, 393 (10170): 447-492. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)31788-4
3. Miljødirektoratet. (2020). *Klimakur 2030* (Hentet: 24.04.2020)
4. Swinburn, B. A., Kraak, V. I., Allender, S., Atkins, V. J., Baker, P. I., Bogard, J. R. et al. (2019). The global syndemic of obesity, undernutrition, and climate change: the Lancet Commission report. *The Lancet*, 393 (10173): 791-846. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32822-8
5. Regjeringen. *Matsikkerhet*. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/mat/innsikt/matsikkerhet/id2357158/> (Hentet: 21.04.2020)
6. Helsedirektoratet (2011). *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer – metodologi og vitenskapelig kunnskapsgrunnlag* (Hentet: 23.04.2020)
7. NOFIMA. *FoodProFuture: Innovative and Sustainable Exploitation of Plant Proteins in Future Foods*. Tilgjengelig fra: <https://nofima.no/prosjekt/foodprofuture/> (Hentet: 24.04.2020)
8. Ekmekcioglu, C., Wallner, P., Kundi, M., Weisz, U., Haas, W., Hutter, H. P. (2018). Red meat, diseases, and healthy alternatives: A critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58 (2): 247-261. DOI: 10.1080/10408398.2016.1158148
9. Drevon, C. A., Blomberg, R. (2012). *Mat og medisin: Lærebok i generell og klinisk ernæring*. 6 utg. Cappelen Damm høyskoleforlag.
10. Kvam, M. (2019) Protein, *NHI*. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/kosthold/ernaring/protein/> (Hentet: 01.05.2020)
11. Mahan, K. L., Raymond, L., Escott-Stump, S. (2012) *Krause Food & The Nutrition Care Process*. 13 utg. Elsevier.
12. Shen, S., Hou, H., Ding, C., Bing, D. J., Lu, Z.-X. (2016). Protein content correlates with starch morphology, composition and physicochemical properties in field peas. *Canadian journal of plant science*, 96 (3): 404-412. DOI: 10.1139/cjps-2015-0231
13. Iqbal, A., Khalil, I. A., Ateeq, N., Khan, M. S. (2006). Nutritional quality of important food legumes. *Food chemistry*, 97 (2): 331-335. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.05.011
14. Day, L. (2013). Proteins from land plants–potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32 (1): 25-42. DOI: 10.1016/j.tifs.2013.05.005
15. NIBIO (2017). *Erter og åkerbønner er god agronomi*. Tilgjengelig fra: <https://www.nibio.no/nyheter/erter-og-kerbønner-er-god-agronomi> (Hentet: 18.04.2020)
16. FoodProFuture. *WP4: Quality of materials and products*. Tilgjengelig fra: <https://foodprofuture.no/work-packages/wp4-quality-of-materials-and-products/> (Hentet: 28.04.2020)
17. Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3 utg. Fagbokforlaget.
18. Holck, P. (2020). Tarmen, *SML*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/tarmen> (Hentet: 04.05.2020)

19. Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A. et al. (2015). The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models: *Springer*. Tilgjengelig fra: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29787039/>. DOI: 10.1007/978-3-319-16104-4
20. Lerner, A., Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*, 14 (6): 479-489. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.01.009
21. Fasano, A. (2012). Leaky gut and autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 42 (1): 71-78. DOI: 10.1007/s12016-011-8291-x
22. Hashimoto, K., Matsunaga, N., Shimizu, M. (1994). Effect of vegetable extracts on the transepithelial permeability of the human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58 (7): 1345-1346. DOI: 10.1271/bbb.58.1345
23. Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, 20 (2): 107-126. DOI: 10.1177/2211068214561025
24. Zucco, F., Batto, A. F., Bises, G., Chambaz, J., Chiusolo, A., Consalvo, R. et al. (2005). An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Alternatives to laboratory animals*, 33 (6): 603-618. DOI: 10.1177/026119290503300618
25. Mine, Y., Zhang, J. W. (2003). Surfactants enhance the tight-junction permeability of food allergens in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *International archives of allergy and immunology*, 130 (2): 135-142. DOI: 10.1159/000069009
26. Mu, Q., Kirby, J., Reilly, C. M., Luo, X. M. (2017). Leaky gut as a danger signal for autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 8: 598. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00598
27. Michielan, A., D'Incà, R. (2015). Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut. *Mediators of inflammation*. DOI: 10.1155/2015/628157
28. Takano, K., Kojima, T., Sawada, N., Himi, T. (2014). Role of tight junctions in signal transduction: an update. *EXCLI journal*, 13: 1145. DOI: 10.17877/DE290R-7042
29. Liu, Z., Li, N., Neu, J. (2005). Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta paediatrica*, 94 (4): 386-393. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2005.tb01904.x
30. Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of nutrition*, 141 (5): 769-776. DOI: 10.3945/jn.110.135657
31. Ranaldi, G., Marigliano, I., Vespignani, I., Perozzi, G., Sambuy, Y. (2002). The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13 (3): 157-167. DOI: 10.1016/s0955-2863(01)00208-x
32. Suzuki, T., Hara, H. (2011). Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22 (5): 401-408. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.08.001
33. Krumm, B., Xiang, Y., Deng, J. (2014). Structural biology of the IL-1 superfamily: Key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. *Protein Science*, 23 (5): 526-538. DOI: 10.1002/pro.2441
34. Garat, C., Arend, W. P. (2003). Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-κB pathways. *Cytokine*, 23 (1-2): 31-40. DOI: 10.1016/S1043-4666(03)00182-0

35. Fields, J. K. (2019). Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. *Frontiers in immunology*, 10: 1412. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01412
36. Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed research international*, 2014. DOI: 10.1155/2014/608979
37. Frank, P. G., Lisanti, M. P. (2008). ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295 (3): H926-H927. DOI: 10.1152/ajpheart.00779.2008
38. Romier, B., Van De Walle, J., During, A., Larondelle, Y., Schneider, Y. J. (2008). Modulation of signalling nuclear factor- κ B activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 100 (3): 542-551. DOI: 10.1017/S0007114508966666
39. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.-C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2 (1): 1-9. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23
40. Nourbakhsh, M., Kälble, S., Dörrie, A., Hauser, H., Resch, K., Kracht, M. (2001). The NF- κ B repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF- κ B-flanking sequence element. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (6): 4501-4508. DOI: 10.1074/jbc.M007532200
41. Maestri, E., Marmiroli, M., Marmiroli, N. (2016). Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. *Journal of Proteomics*, 147: 140-155. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.03.048
42. Kmiec, Z., Cyman, M., Ślebioda, T. J. (2017). Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in medical sciences*, 62 (1): 1-16. DOI: 10.1016/j.advms.2016.09.001
43. Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., Livrea, M. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- κ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 111 (3): 415-423. DOI: 10.1017/S0007114513002663
44. Lee, S. H., eun Kwon, J., Cho, M. L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal research*, 16 (1): 26. DOI: 10.5217/ir.2018.16.1.26
45. Wang, S., Liu, Z., Wang, L., Zhang, X. (2009). NF- κ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular & molecular immunology*, 6 (5): 327. DOI: 10.1038/cmi.2009.43
46. Hollander, D. (1999). Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Current gastroenterology reports*, 1 (5): 410-416. DOI: 10.1007/s11894-999-0023-5
47. Chey, W. D., Kurlander, J., Eswaran, S. (2015). Irritable bowel syndrome: a clinical review. *Jama*, 313 (9): 949-958. DOI: 10.1001/jama.2015.0954
48. Udenigwe, C. C. & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of food science*, 77 (1): R11-R24. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x
49. Sánchez, A., Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1 (1): 29-46. DOI: 10.1093/fqsafe/fyx006
50. Yoshikawa, M., Fujita, H., Matoba, N., Takenaka, Y., Yamamoto, T., Yamauchi, R. et al. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors*, 12 (1-4): 143-146. DOI: 10.1002/biof.5520120122

51. Capriotti, A. L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Ventura, S., Chiozzi, R. Z. et al. (2015). Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44: 205-213. DOI: 10.1016/j.jfca.2015.08.007
52. Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A. D., Jacobsen, C. (2018). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58 (18): 3097-3129. DOI: 10.1080/10408398.2017.1352564
53. Singh, B. P., Vij, S., Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54: 171-179. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.01.022
54. ThermoFisher Scientific. *Introduction to Cell Culture*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html> (Hentet: 12.04.2020)
55. Merck. *CACO-2 Cell Line human*. Tilgjengelig fra: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_86010202?lang=en®ion=NO (Hentet: 10.04.2020)
56. Varilek, G. W., Neil, G. A., Bishop, W. P. (1994). Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 267 (6): G1101-G1107. DOI: 10.1152/ajpgi.1994.267.6.G1101
57. Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51 (12): 2415-2418. DOI: 10.1373/clinchem.2005.051532
58. Leng, S. X., McElhaney, J. E., Walston, J. D., Xie, D., Fedarko, N. S., Kuchel, G. A. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63 (8): 879-884. DOI: 10.1093/gerona/63.8.879
59. Molecular Devices. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Tilgjengelig fra: <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa#gref> (Hentet: 04.04.2020)
60. BioSite (2019). *ELISA Principles 101*. Tilgjengelig fra: <https://www.nordicbiosite.com/blog/elisa-principles-101> (Hentet: 16.04.2020)
61. Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W., Newman, S. M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 214 (3): 248-257. DOI: 10.3181/00379727-214-44093
62. Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S. et al. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14 (4): 991-1014. DOI: 10.1038/s41596-018-0119-1
63. Ulleberg, E. K., Comi, I., Holm, H., Herud, E. B., Jacobsen, M., Vegarud, G. E. (2011). Human gastrointestinal juices intended for use in in vitro digestion models. *Food digestion*, 2 (1-3): 52-61. DOI: 10.1007/s13228-011-0015-4
64. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C. et al. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5 (6): 1113-24. DOI: 10.1039/c3fo60702j
65. Mooney, C., Haslam, N. J., Pollastri, G., Shields, D. C. (2012). Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PloS one*, 7 (10). DOI: 10.1371/journal.pone.0045012

66. PeproTech. *Human IL-8 (CXCL8) Standard ABTS ELISA Development Kit*. Tilgjengelig fra: <https://www.peprotech.com/en/human-il-8-standard-abts-elisa-development-kit> (Hentet: 19.04.2020)
67. González-Montoya, M., Cano-Sampedro, E., Mora-Escobedo, R. (2017). Bioactive Peptides from Legumes as Anticancer Therapeutic Agents. *Int J Cancer Clin Res*, 4 (2): 081. DOI: 10.23937/2378-3419/1410081
68. Kapoor, S. (2015). Bioactives and therapeutic potential of legumes: A review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5 (2): 65-74.
69. Karami, Z., Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of food science and technology*, 56 (2): 535-547. DOI: 10.1007/s13197-018-3549-4
70. Liang, Q., Chalamaiah, M., Liao, W., Ren, X., Ma, H., Wu, J. (2020). Zein hydrolysate and its peptides exert anti-inflammatory activity on endothelial cells by preventing TNF- α -induced NF- κ B activation. *Journal of Functional Foods*, 64: 103598. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103598
71. Yasumatsu, H., Tanabe, S. (2010). The casein peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells. *British journal of nutrition*, 104 (7): 951-956. DOI: 10.1017/S0007114510001698
72. Zhang, H., Hu, C. A. A., Kovacs-Nolan, J., Mine, Y. (2015). Bioactive dietary peptides and amino acids in inflammatory bowel disease. *Amino Acids*, 47 (10): 2127- 2141. DOI: 10.1007/s00726-014-1886-9
73. de Medina, F. S., Daddaoua, A., Requena, P., Capitán-Cañadas, F., Zarzuelo, A., Suárez, M. D. et al. (2010). New insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69 (3): 454-462. DOI: 10.1017/S0029665110001783
74. Capraro, J., De Benedetti, S., Di Dio, M., Bona, E., Abate, A., Corsetto, P. A. et al. (2020). Characterization of Chenopodin Isoforms from Quinoa Seeds and Assessment of Their Potential Anti-Inflammatory Activity in Caco-2 Cells. *Biomolecules*, 10 (5): 795. DOI: 10.3390/biom10050795
75. Kiewiet, M. G., Dekkers, R., Gros, M., van Neerven, R. J., Groeneveld, A., de Vos, P. et al. (2017). Toll-like receptor mediated activation is possibly involved in immunoregulating properties of cow's milk hydrolysates. *PLoS One*, 12 (6): e0178191. DOI: 10.1371/journal.pone.0178191
76. Clemente, A., del Carmen Arques, M. (2014). Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20 (30): 10305. DOI: 10.3748/wjg.v20.i30.10305
77. Madara, J. L. (1998). Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annual review of physiology*, 60 (1): 143-159. DOI: 10.1146/annurev.physiol.60.1.143
78. Al-Sadi, R. M., Ma, T. Y. (2007). IL-1 β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *The Journal of Immunology*, 178 (7): 4641-4649. DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4641

Vedlegg

Vedlegg 1

Immunoassay av PepDK

Tabell V.1: Rådata til figur 3.1.A. Måling 1 ved 200 μM er utelatt fra grafen og statistisk beregning ettersom denne brønnen ikke fikk tilført IL-1 β .

Konsentrasjon (μM)	Måling 1	Måling 2	Måling 3	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Inhibitor	Inhibitor
1	356.308	391.435	506.798	1126.011	828.034	79.656	83.313	236.754	113.932
5	1289.835	1324.438	1783.759	2007.923	3452.85	212.778	135.298	147.966	114.095
10	17.846	34.247	52.709	47.798	44.004	16.17	27.19	20.082	32.62
30	1100.986	1379.308	1440.873	1518.523	1905.831	60.332	103.754	90.154	63.942
50	17.331	43.46	45.629	89.568	40.751	34.787	34.791	14.562	24.426
60	1028.273	1096.103	1306.827	1290.17	1448.086	43.5	51.812	55.375	70.628
70	130.763	855.526	922.12	1086.156	995.047	115.074	100.849	151.66	169.203
80	1588.408	1900.875	1965.576	1543.17	1466.559	54.006	59.005	121.518	57.547
100	40.209	189.85	211.026	45.629	78.449	17.336	36.417	23.282	12.333
150	211.979	214.822	263.034	464.431	499.806	27.014	29.843	11.422	10.677
200	2.956	218.552	303.517	411.286	406.199	18.995	20.031	12.152	8.397

† Det ble notert at brønnen for måling 1, 200 μM , ikke fikk stimulering fra IL-1 β . Hensikten med denne stimulanten var å indusere IL-8-produksjonen.

Vedlegg 2

Immunoassay av PepNE

Tabell V.2: Rådata til figur 3.1.B.

Konsentrasjon (μM)	Måling 1	Måling 2	Måling 3	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Inhibitor	Inhibitor
1	371.771	424.692	508.346	1126.011	828.034	79.656	83.313	236.754	113.932
5	1403.622	1575.814	1754.831	2007.923	3452.85	212.778	135.298	147.966	114.095
10	22.197	32.025	51.055	47.798	44.004	16.17	27.19	20.082	32.62
30	1220.591	1449.206	2526.101	1518.523	1905.831	60.332	103.754	90.154	63.942
50	29.365	37.5	44.002	89.568	40.751	34.787	34.791	14.562	24.426
60	1033.062	1070.833	1414.186	1290.17	1448.086	43.5	51.812	55.375	70.628
70	669.337	757.419	971.703	1086.156	995.047	115.074	100.849	151.66	169.203
80	1194.148	1508.969	1757.255	1543.17	1466.559	54.006	59.005	121.518	57.547
100	63.611	176.711	232.824	45.629	78.449	17.336	36.417	23.282	12.333
150	150.688	151.424	405.253	464.431	499.806	27.014	29.843	11.422	10.677
200	171.335	173.513	483.644	411.286	406.199	18.995	20.031	12.152	8.397

Vedlegg 3

Immunoassay av PepDK + PepNE

Tabell V.3: Rådata til figur 3.1.C.

Konsentrasjon (μM)	Måling 1	Måling 2	Måling 3	Positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Inhibitor	Inhibitor
1	496.07	588.002	589.553	1031.771	862.508	90.19	84.019	112.798	117.388
5	642.856	724.898	781.854	1031.771	862.508	90.19	84.019	112.798	117.388
10	464.088	580.372	850.176	847.487	1380.281	171.457	276.049	153.616	124.582
20	456.309	560.727	574.453	847.487	1380.281	171.457	276.049	153.616	124.582
30	1005.27	1478.428	1536.497	2064.966	1733.738	80.866	136.061	88.331	92.791
40	887.28	1338.323	2044.249	2064.966	1733.738	80.866	136.061	88.331	92.791
50	1377.156	1450.763	4164.284	1953.339	2809.779	108.386	133.92	190.503	104.167
60	805.519	1158.774	1669.795	1953.339	2809.779	108.386	133.92	190.503	104.167
70	1064.069	1239.52	3205.802	947.899	1368.161	55.083	105.472	124.353	277.477
80	975.428	1201.926	1218.641	947.899	1368.161	55.083	105.472	124.353	277.477
100	720.07	864.194	1868.589	1331.039	1434.332	139.794	189.941	158.806	115.177
150	778.306	851.211	1128.396	1331.039	1434.332	139.794	189.941	158.806	115.177

Vedlegg 4

TEER-måling av PepDK

Tabell V.4: Rådata til figur 3.2.A, 3.2.B og 3.2.C.

Peptid	Konsentrasjon	Før	Etter
3	5	2735.375	2092.5
3	5	3022.375	2286.5
3	10	2621.5	2182
3	10	3535.5	2748
3	10	3244.375	2704.5
3	10	3119.375	2476.5
3	20	3410.5	2472
3	20	2896.5	2136
3	20	3483.375	2808.5
3	20	3108.375	2203.5
3	30	2271.5	1908
3	30	3158.5	2196
3	30	3662.375	3085.5
3	30	3251.275	2695.5
3	50	3726.75	2803
3	50	2673.5	1878
3	50	4493.5	3206
3	100	4325.75	2570
3	100	2744.5	2173
3	100	3709.5	2990
3	150	3942.75	2112
3	150	3594.5	2003
3	150	3684.5	2382
3	200	2800.375	2531.5
3	200	3032.375	1896.5
3	250	3445.375	2009.5
3	250	1611.375	536.5

Vedlegg 5

TEER-måling av PepNE

Tabell V.5: Rådata til figur 3.2.D, 3.2.E og 3.2.F.

Peptid	Konsentrasjon	Før	Etter
4	5	2700.375	2072.5
4	5	4101.375	3290.5
4	10	4179.5	3028
4	10	4872.5	3503
4	10	3626.375	2855.5
4	10	3582.375	2896.5
4	20	2941.5	1928
4	20	3131.5	2304
4	20	3300.375	2654.5
4	20	3579.375	2665.5
4	30	3411.5	2378
4	30	2742.5	2053
4	50	3966.75	2694
4	50	4696.5	3194
4	50	3616.5	2637
4	100	3965.75	2536
4	100	4284.5	2958
4	100	3534.5	2251
4	150	3121.375	2862.5
4	150	4254.375	2063.5
4	200	3709.375	2255.5
4	200	3699.375	2411.5

Vedlegg 6

P-verdi til resultater fra immunoassay

Tabell V.6: Homoskedastisk Student's t-test med tosidig fordeling.

Konsentrasjon (μM)	PepDK	PepNE	PepDK+PepNE
1	0.021122501	0.021356857	0.013707451
5	0.115856091	0.129087745	0.06679253
10	0.463225263	0.399252342	0.146358477
20	-	-	0.064826513
30	0.132766368	0.97303514	0.111087972
40	-	-	0.36941869
50	0.263907986	0.234291285	0.969540823
60	0.164825278	0.324857183	0.082247434
70	0.306457533	0.139827913	0.505751295
80	0.132987622	0.937510954	0.89783773
100	0.31425063	0.239653176	0.6544334
150	0.002104966	0.111406357	0.047799369
200	0.136174141	0.39523805	-

Vedlegg 7

P-verdi til resultater fra TEER

Tabell V.7: Parvis Student's t-test med tosidig fordeling.

Konsentrasjon (μM)	PepDK	PepNE
5	0.042876585	0.08054157
10	0.003929761	0.008524202
20	0.000926622	0.001651989
30	0.016284155	0.125452739
50	0.020938689	0.014309711
100	0.112336269	0.001036972
150	0.009272384	0.42512384
200	0.352028212	0.038497323
250	0.090911239	-



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway