



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2018 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Hovedveileder Professor Harald Carlsen

# **Rollen til det ROS-genererende enzymet NADPH oksidase 1 ved lavgrads inflammasjon i tykktarm**

Elucidating the role of the ROS-generating enzyme  
NADPH oxidase 1 during low-grade inflammation in  
colon

**Anne Mari Herfindal**

Bioteknologi – retning molekylærbiologi

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap



## FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) fra august 2017 til august 2018, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Jeg vil gjerne få takke alle de flotte menneskene som har gitt meg et uforglemmelig og lærerikt år. Først og fremst en stor takk til min hovedveileder, Professor Harald Carlsen. Jeg er veldig takknemlig for at du gav meg muligheten til å være en del av forskningsgruppen. I tillegg til å organisere et solid opplegg, har du hjulpet meg å holde en stø kurs gjennom året, vært oppmuntrende og pushet meg til å gi mitt beste. Uten din tålmodige og omfattende veiledning hadde jeg ikke klart dette.

Videre hadde ikke året blitt det samme uten stipendiat Sergio Rocha, som har tatt laboratierferdigheten mine til et helt nytt nivå, og i tillegg vært til uvurderlig støtte gjennom hele prosessen. I tillegg en stor takk til senioringeniør Lars Fredrik Moen, postdoktor Anders Kielland, stipendiat Dimitrios Papoutsis og alle dere andre ved laboratoriet, som tok meg imot med åpne armer, og som har bidratt med deres kunnskap når jeg selv har stått fast.

Avslutningsvis vil jeg også takke mine fantastiske foreldre og samboer, som i litt vanskelige og frustrerende tider har minnet meg på at når man gjør så godt man kan, så er det alltid bra nok.

August 2018, Ås

Anne Mari Herfindal



## SAMMENDRAG

**Bakgrunn:** I kroppen dannes reaktive oksygenforbindelser (ROS) i så godt som alle typer celler og vev, hvor de utfører mange ulike og viktige funksjoner. I denne sammenheng ansees enzymer kalt NADPH oksidaser (NOX-enzymmer) som de viktigste bidragsyterne. ROS som blir produsert av disse enzymene i tykktarm, kan ha viktige funksjoner både som forsvarsmekanisme og for å opprettholde en sunn tarm. Likevel er det uklart nøyaktig hvilke effekter eller roller disse forbindelsene har i ulike situasjoner, spesielt NOX1-generert ROS.

**Hensikt:** Av den grunn ønsket vi å undersøke hvordan fravær av NOX1 påvirker ROS-produksjon, tykktarmsinflammasjon, intestinal barrierefunksjon og sykdomsgrad, i en situasjon hvor epitellaget i tykktarm har blitt utsatt for en mild irritasjon/inflammasjon. For å kunne gjøre dette, måtte det først etableres en modell som gjenskapte den ønskede situasjonen, hvor mus ble brukt som modellorganisme.

**Metoder:** For å etablere en lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm, ble villtypemus eksponert for ulike doser av kjemikalie dextran sulfat sodium (DSS) i drikkevann. Etter to innledende forsøk, ble den etablerte modellen anvendt på *NOX1* knockout- og villtypemus (1 % DSS, seks dager). For å evaluere eventuelle forskjeller mellom dyrene, ble det gjort ulike observasjoner og analyser. Disse inkluderte evaluering av synlig sykdomsgrad under forsøkene, måling av ROS-produksjon ved optisk avbildning, ekspresjonsanalyser av inflammasjons- og ROS-relaterte gener, og estimering av Lcn-2- og LBP-nivåer i henholdsvis avføring og blod.

**Resultater:** Resultatene viste at fravær av NOX1 i liten grad påvirket synlig sykdomsgrad, ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener eller tarmbarrierens gjennomtrengelighet i den etablerte modellen. Det ble imidlertid observert forhøyede nivåer av den sensitive inflammasjonsmarkøren Lcn-2 i avføring i *NOX1* knockoutmus sammenlignet med villtype. I tillegg viste optisk *ex vivo*-avbildning med den sensitive ROS-proben L-012, at ROS-produksjonen var kraftig redusert i knockoutmus, både med og uten DSS-eksponering.

**Konklusjon:** Til sammen gav resultatene en viss indikasjon på at NOX1-generert ROS har en positiv effekt ved lavgrads, DSS-indusert tykktarmsinflammasjon. Nøyaktig hvilke mekanismer som fører til den positive effekten er derimot uklart, og krever videre undersøkelser. En naturlig videreføring av prosjektet vil være å undersøke om fravær av NOX1-generert ROS fører til endringer i tykktarmens mikrobiotasammensetning, som tidligere observert for nedre del av tynntarm.

## ABSTRACT

**Background:** Virtually all cells throughout the body produce reactive oxygen species (ROS), where they perform many important and different functions. In this regard, enzymes called NADPH oxidases (NOX enzymes) are the most important contributors. ROS produced by these enzymes in the colon, may have important functions both as a defense system and for maintaining a healthy gut. Nevertheless, it is unclear exactly which effects or roles these compounds have in different settings, especially NOX1-generated ROS.

**Aim:** We therefore aimed to explore how knockout of NOX1 affects ROS-production, colon inflammation, intestinal barrier function and disease severity in a situation where the colon epithelium is subject to a mild irritation/inflammation. To do this, we first had to establish a model that mimicked this situation, where mice were chosen as model organism.

**Methods:** To establish the low-grade inflammation model in colon, we exposed wildtype mice to different doses of dextran sulfate sodium (DSS). After the initial experiments, the established model was applied on *NOX1* knockout and wildtype mice (1 % DSS, six days). To evaluate differences between the mice, different observations and analyses were done. These included visible disease evaluation during the experiments, measurement of ROS production by optical imaging, gene expression analyses of inflammatory and ROS-related genes, and estimation of Lcn-2 and LBP levels in feces and blood, respectively.

**Results:** Our results showed that the absence of NOX1 to minimal degree affects disease severity, expression of inflammatory genes and the intestinal permeability in the established model. We did however observe increased levels of the sensitive inflammation marker Lcn-2 in feces, when comparing DSS-exposed knockout and wildtype animals. In addition, we observed that the ROS production, measured by optical imaging with the ROS-sensitive probe L-012, was substantially reduced in knockout mice, both with and without DSS-exposure.

**Conclusion:** Our findings suggest that NOX1-generated ROS have a positive effect during low-grade, DSS-induced colon inflammation. However, exactly which mechanisms that lead to the positive effect are still unclear and require further investigation. A natural continuation of the project could be to investigate whether the absence of NOX1-generated ROS leads to changes in colon microbiota composition, as previously seen in the lower part of the small intestine.

# INNHALDSFORTEGNELSE

Forord.....	I
Sammendrag .....	III
Abstract.....	IV
Liste over tabeller .....	VIII
Liste over figurer.....	VIII
Forkortelser .....	X
<b>1 INTRODUKSJON .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tarmens oppbygning og funksjon.....	1
1.1.1 Fordøyelse og vevsstruktur .....	2
1.1.2 Tarmmikrobiota .....	4
1.1.3 Forsvarssystemer i tarm .....	5
1.2 Sykdom i tarm .....	8
1.3 Eksperimentelle modeller for inflammasjon i tarm.....	8
1.3.1 DSS-indusert tykktarmsinflammasjon .....	9
1.4 ROS og ROS-genererende enzymer.....	11
1.5 ROS og deres rolle i tykktarm.....	14
1.5.1 Måling av ROS .....	17
1.6 Hensikten med prosjektet .....	18
<b>2 METODER.....</b>	<b>20</b>
2.1 Dyreforsøk.....	20
2.1.1 Dyr og dyrehold .....	20
2.1.2 Etiske aspekter .....	21
2.1.3 Pilotforsøk.....	21
2.1.4 Etableringsforsøk .....	22
2.1.5 <i>NOX1</i> knockout (KO)-forsøk .....	23
2.1.6 Administrering av DSS .....	24
2.2 Evaluering av sykdomsgrad .....	25
2.3 Avbildning av reaktive oksygenforbindelser .....	26
2.3.1 <i>Ex vivo</i> -avbildning og RNA-integritet .....	26
2.4 Innhenting av prøver .....	27
2.4.1 Avføring.....	27

2.4.2	Blod.....	27
2.4.3	Vev.....	28
2.5	Lcn-2 ELISA.....	28
2.6	LBP ELISA.....	31
2.7	Analyse av genekspressjon.....	32
2.7.1	RNA-ekstraksjon.....	33
2.7.2	Analyse av RNA-konsentrasjon og renhetsgrad.....	34
2.7.3	Analyse av RNA-integritet.....	34
2.7.4	Opprensing av RNA med LiCl.....	34
2.7.5	Kvantifisering av mRNA ved RT-qPCR.....	35
2.7.6	Inhiberingstesting.....	40
2.8	Bestemmelse av genotype.....	41
2.9	Statistisk analyse.....	43
<b>3</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>44</b>
3.1	Etablering av lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm.....	44
3.1.1	Pilotforsøk (2 og 4 % DSS).....	44
3.1.2	Etableringsforsøk (0,5, 1 og 2 % DSS).....	50
3.2	Rollen til NOX1 ved lavgrads inflammasjon i tykktarm.....	54
3.2.1	NOX1 knockout gir ingen endring av sykdomsgrad.....	54
3.2.2	NOX1 bidrar i stor grad til L-012-signal.....	55
3.2.3	NOX1 knockout gir ikke økt oppregulering av inflammasjonsrelaterte gener ..	57
3.2.4	NOX1 knockout gir ikke økt oppregulering av ROS-relaterte gener.....	60
3.2.5	Genekspressjon – proksimal versus distal tykktarm.....	63
3.2.6	NOX1 knockout påvirker Lcn-2-nivåer ved mild inflammasjon.....	66
3.2.7	NOX1 knockout påvirker ikke LBP-nivåer i plasma.....	67
<b>4</b>	<b>DISKUSJON.....</b>	<b>68</b>
4.1	Etablering av lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm.....	69
4.2	Effekt av NOX1 knockout på <i>ex vivo</i> -avbildning.....	72
4.3	Effekt av NOX1 knockout på tarmbarrierens gjennomtrengelighet.....	73
4.4	Effekt av NOX1 knockout på sykdomsgrad og inflammasjonsmarkører.....	73
4.5	Sammenligning av proksimal og distal tykktarm.....	79
4.6	Metodologiske betraktninger.....	79
4.7	Forslag til videre arbeid.....	81



<b>5 KONKLUSJON.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERANSER .....</b>	<b>83</b>
<b>BILAG.....</b>	<b>92</b>
Bilag A – Programvarer og instrumenter.....	92
Bilag B – Materialer.....	93
Bilag C – Primere.....	95
Bilag D – Standardkurver for Lcn-2 ELISA.....	96
Bilag E – Bestemmelse av genotype.....	97
Bilag F – P-verdier fra en- og toveis ANOVA .....	97

## LISTE OVER TABELLER

Tabell 1.1 Typiske effekter av akutt DSS-indusert inflammasjon.....	10
Tabell 2.1 Scoringsskjema for evaluering av synlig sykdomsgrad i pilotforsøk .....	25
Tabell 2.2 Reaksjonsblanding for cDNA-syntese.....	36
Tabell 2.3 Temperatursykluser ved cDNA-syntese .....	36
Tabell 2.4 Reaksjonsblanding for PCR ved primeroptimalisering .....	37
Tabell 2.5 Temperatursykluser ved PCR for primeroptimalisering.....	37
Tabell 2.6 Reaksjonsblanding for qPCR.....	39
Tabell 2.7 Temperatursykluser ved qPCR.....	39
Tabell 2.8 Reaksjonsblanding for PCR ved bestemmelse av genotype .....	42
Tabell 2.9 Temperatursykluser for PCR-reaksjon ved bestemmelse av genotype.....	42
Tabell 3.1 Sykdomsscore i pilotforsøk .....	45

## LISTE OVER FIGURER *(fortsetter på neste side)*

Figur 1.1 Oversikt over fordøyelseskanalen .....	2
Figur 1.2 Organisering av de ulike lagene i tarmveggen .....	3
Figur 1.3 Epitellagets strukturelle overflate i tynn- og tykktarm.....	4
Figur 1.4 Den kjemiske strukturen til DSS .....	9
Figur 1.5 Utvalgte reaksjonsveier for dannelse av RONS. ....	13
Figur 1.6 Mulige kilder til L-012-signal i tykktarm.....	17
Figur 2.1 Homozygot avl.....	21
Figur 2.2 Guppdesign for pilotforsøk.....	22
Figur 2.3 Tidslinje for pilotforsøk.....	22
Figur 2.4 Gruppedesign for etableringsforsøk .....	23
Figur 2.5 Tidslinje for etableringsforsøk .....	23
Figur 2.6 Gruppedesign for KO-forsøk.....	24
Figur 2.7 Tidslinje for KO-forsøk.....	24
Figur 2.8 Prinsippskisse for sandwich ELISA .....	29
Figur 2.9 Utvikling av fluorescenssignal ved qPCR.....	38
Figur 2.10 Inhiberingstest .....	41

Figur 3.1 Vektutvikling i pilotforsøk .....	45
Figur 3.2 <i>In vivo</i> -avbildning i pilotforsøk.....	46
Figur 3.3 <i>In vivo</i> -avbildninger av enkelt dyr i pilotforsøk .....	47
Figur 3.4 <i>Ex vivo</i> -avbildning i pilotforsøk.....	47
Figur 3.5 Representative <i>ex vivo</i> -avbildninger fra pilotforsøk.....	48
Figur 3.6 Oppregulering av mRNA-ekspresjon i pilotforsøk .....	49
Figur 3.7 Evaluering av synlig sykdomsgrad i etableringsforsøk.....	51
Figur 3.8 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener i etableringsforsøk .	52
Figur 3.9 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av ROS-relaterte gener i etableringsforsøk .....	53
Figur 3.10 <i>Ex vivo</i> -avbildning i KO-forsøk .....	55
Figur 3.11 Representative <i>ex vivo</i> -avbildninger fra KO-forsøk.....	56
Figur 3.12 <i>Ex vivo</i> -avbildning i KO-forsøk (proksimal versus distal tykktarm) .....	56
Figur 3.13 mRNA-nivåer for inflammasjonsrelaterte gener i KO-forsøk.....	58
Figur 3.14 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener i KO-forsøk .....	59
Figur 3.15 mRNA-nivåer for ROS-relaterte gener i KO-forsøk .....	61
Figur 3.16 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av ROS-relaterte gener i KO-forsøk.....	62
Figur 3.17 Sammenligning av mRNA-nivåer i proksimal og distal tykktarm .....	64
Figur 3.18 Lipocalin-2 i avføring fra KO-forsøk.....	66
Figur 3.19 LBP i plasma fra KO-forsøk .....	67
Figur 4.1 Redusert ROS-produksjon resulterer i forhøyede Lcn-2-nivåer i avføring.....	76
Figur 4.2 Illustrasjon av mulig hypotese.....	78

## **FORKORTELSER** (fortsetter på neste side)

AMPs	Antimikrobielle peptider
ANOVA	Variansanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovin serum albumin
CD	Crohns sykdom ( <i>Crohn's disease</i> )
cDNA	Komplementær DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CGD	Kronisk granulomatøs sykdom ( <i>chronic granulomatous disease</i> )
COX2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
Cq	<i>Cycle quantification</i>
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksyribose nukleosid trifosfat
DSS	Dextran sulfate sodium
DUOX	Dual oksidase ( <i>dual oxidase</i> )
e/i/nNOS	Endotelial/induserbar /nevronal nitrogenoksid syntase
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
gDNA	Genomisk DNA
GF	<i>Germ free</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
i.p.	Intraperitonealt
IBD	Inflammatorisk tarmsykdom ( <i>inflammatory bowle disease</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
K8	Keratin 8
KO	Knockout
LBP	Lipopolysakkarid bindende protein
Lcn-2	Lipocalin-2
LP	Lamina propria
LPO	Laktoperoksidase
LPS	Lipopolysakkarid
MAMPs	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MCFA	<i>Medium-chain fatty acids</i>
MDB	<i>Membrane desalting buffer</i>
MPO	Myeloperoksidase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MV	Molekylvekt
NAC	<i>No amplification control</i>
NADPH	Nikotinamid adenin di-nukleotid fosfat
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NHI	Norsk helseinformatikk

NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
NOX	NADPH oksidase
NTC	<i>No template control</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase kjedereaksjon ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PPR	<i>Pattern recognition receptor</i>
Ptgs	prostaglandin-endoperoksid syntase 2
qPCR	Kvantitativ PCR ( <i>quantitative PCR</i> )
rDNase	Rekombinant DNase
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsyre
RNS	Reaktive nitrogenforbindelser ( <i>reactive nitrogen species</i> )
ROI	<i>Region of interest</i>
RONS	Reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser ( <i>reactive oxygen and nitrogen species</i> )
ROS	Reaktive oksygenforbindelser ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Rotasjoner per minutt
RT	Revers transkriptase
SD	Standardavvik ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfeil ( <i>standard error of the mean</i> )
SIgA	Sekretorisk immunglobulin A
SOD	Superoksid dismutase
SPF	Spesifikk patogenfri
TGF	Transformerende vekstfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
TJ	<i>Tight junctions</i> (tette cellesammenføyninger)
TMB	Tetrametylbenzidin
TNBS	<i>Trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorisk T-celle
UC	Ulcerøs kolitt ( <i>ulcerative colitis</i> )
VEOIBD	<i>Very-early-onset IBD</i>
VT	Villtype
4-PL	4-parameter logistisk

# 1 INTRODUKSJON

---

Tykkertarmen er en viktig del av det gastrointestinale systemet, og har som hovedfunksjon å absorbere vann og elektrolytter, samt lagre avfallsstoffer og ufordøyelig materiale frem til defekasjon. I tillegg er tykkertarmen hjem til store mengder mikroorganismer, i hovedsak bakterier. Disse lever i stor grad i symbiose med verten, og utøver mange viktige funksjoner. For å opprettholde en sunn balanse mellom mikroorganismer og vert, og for å hindre at skadelige organismer får innpass i kroppen, har tarmen utviklet en rekke forsvarsmekanismer. Disse inkluderer en sterk fysisk barriere mellom tarmlumen og verten, utskillelse av antimikrobielle peptider og immunglobuliner, samt et velutviklet immunsystem til stede i tarmvevet. Imidlertid er det også holdepunkter for at reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser (RONS) kan bidra i dette forsvaret. Viktige enzymer i denne sammenheng er induserbar nitrogenoksid syntase (iNOS) og NADPH oksidaser (NOX-enzymmer) som NOX1, NOX2 og DUOX2. I tykkertarm er *NOX1*-uttrykket høyt under normale forhold, mens *iNOS* og *NOX2* først oppreguleres ved inflammasjon. Det er likevel uklart hvilke effekter eller roller RONS har i ulike settinger, spesielt NOX1-generert ROS. Eksempelvis har det blitt gjort få studier av RONS-produksjon ved lavgrads inflammasjon, noe vi mener kan være like relevant som ved alvorlige tarmskader og -sykdom. Gjennom dette prosjektet ønsket vi derfor å etablere en lavgrads inflammasjonsmodell i tykkertarm hos mus, for deretter å benytte modellen til å studere hvordan fravær av NOX1-generert ROS påvirker inflammasjonsgrad og barrierefunksjon i en situasjon der tykkertarmen har blitt utsatt for en mild irritasjon.

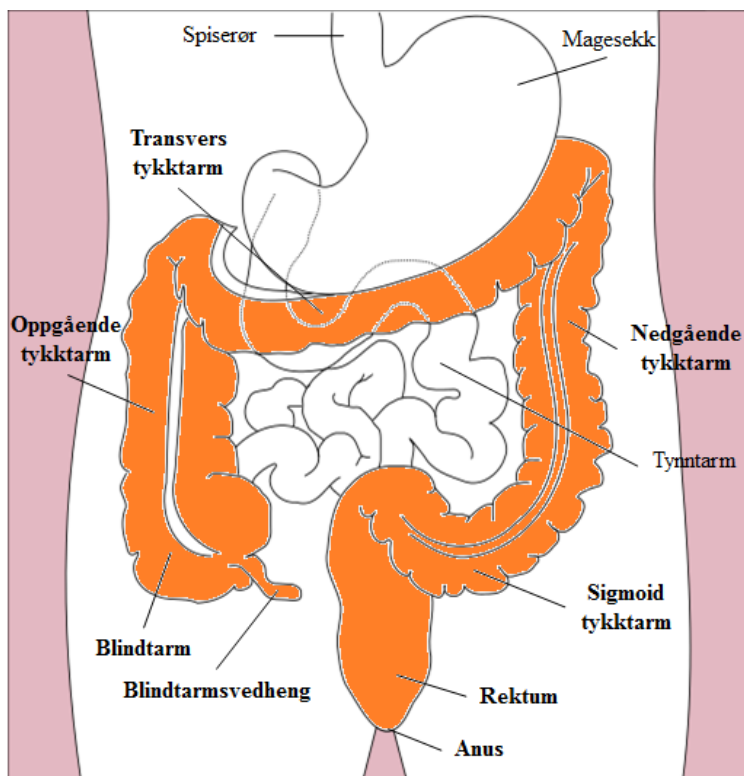
## 1.1 TARMENS OPPBYGNING OG FUNKSJON

Som forklart innledningsvis hadde dette prosjektet fokus på NOX1-generert ROS i tykkertarm. Som ved all forskning, er det likevel viktig å se forskningsobjektet sitt som den del av en større helhet. Av den grunn starter denne introduksjonen med en innføring i tarmens primære funksjon, struktur og mikrobiota, etterfulgt av en oversikt over ulike mekanismer som benyttes for å opprettholde en sunn balanse mellom vert og mikroorganismer.

# INTRODUKSJON

## 1.1.1 Fordøyelse og vevsstruktur

Tarmen er en helt essensiell del av det gastrointestinale systemet, som har som hovedfunksjon å transportere næringsstoffer, elektrolytter og vann inn i kroppen gjennom fordøyelse og absorpsjon, og å transportere ufordøyelig materiale og avfallsstoffer ut (Barrett, 2014). Fordøyelsesprosessen starter allerede i munnen, hvor enzymer i spyttet (som amylase) begynner nedbrytning av maten vi spiser (Barrett, 2014). Derfra transporteres maten gjennom spiserøret, og ned i magen hvor den kvernes til mindre biter og blandes med magesyre og fordøyelsesenzymmer. Denne tyktflytende blandingen, kalt kymus, føres deretter videre inn i tarmsystemet, som overordnet kan deles i to deler: tynntarmen og tykktarmen. Fra proksimal til distal ende, består tynntarmen av duodenum, jejunum og ileum, hvor utskilte enzymer bryter ned den delvis prosesserte maten til mindre molekyler, som videre kan absorberes av celler i tarmveggen (Greenwood-Van Meerveld et al., 2017). Ufordøyelig materiale og andre avfallsstoffer føres videre til tykktarmen, hvor det blir tatt opp vann og elektrolytter slik at kymus omdannes til hardere avføring. Tykktarmen kan deles inn i blindtarmen (med blindtarmsvedheng), oppgående, transvers, nedgående og sigmoid tykktarm, rektum og anus (Barrett, 2014) (figur 1.1). Det er også vanlig å omtale nedre og øvre del av tykktarmen som henholdsvis proksimal og distal tykktarm, spesielt når man snakker om tykktarm i mus.



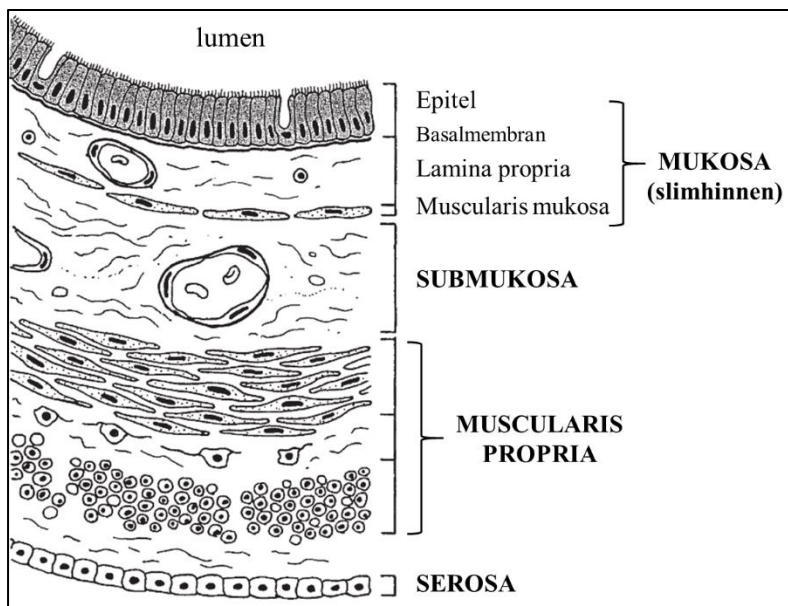
**Figur 1.1** Oversikt over fordøyelseskanaalen, der tykktarmen er markert i oransje. Øvre del av spiserøret og munnhulen er ikke illustrert.

## INTRODUKSJON

Fordøyelseskanaalen kan betraktes som et langt rør, hvor rørveggen består av ulike lag (figur 1.2). Innerst, i kontakt med lumen (dvs. hulrommet inne i tarmen) finner vi epitelet, som i tarmen dannes av ett enkelt celledag. Både i tynn- og tykktarm danner epitelet glandulære strukturer, kalt krypter (Barrett, 2014). Nær, eller i bunnen av kryptene ligger stamceller, som gjennom celledeling og differensiering danner spesialiserte celler (McDonald et al., 2006). De spesialiserte cellene kan deles inn i fire hovedtyper: absorpsjonsceller, Paneth-celler, begerceller og enteroendokrine celler (Kim & Ho, 2010), og i takt med differensieringen migrerer cellene ut av kryptene. Unntaket er Paneth-celler, som forblir i kryptene selv etter differensiering (McDonald et al., 2006).

Sett fra innsiden, har tynn- og tykktarmen ulik overflate (figur 1.3). Epitelet i tynntarmen danner fingerlignende strukturer som strekker seg ut i lumen, kalt villi. Tykktarmen har ikke villi-strukturer, noe som gir en glatt overflate med åpninger ned i kryptene (Barrett, 2014). Cellene i epitellaget er søyleformede, med en klart definert retning. Den apikale overflaten vender ut mot lumen, mens den basale er i kontakt med underliggende vev. Cellenes polaritet er helt essensiell for deres funksjon, da for eksempel absorpsjon og sekresjon av diverse forbindelser må skje i definerte retninger (fra/til lumen, eller fra/til kroppens indre) (Giepmans & van Ijzendoorn, 2009).

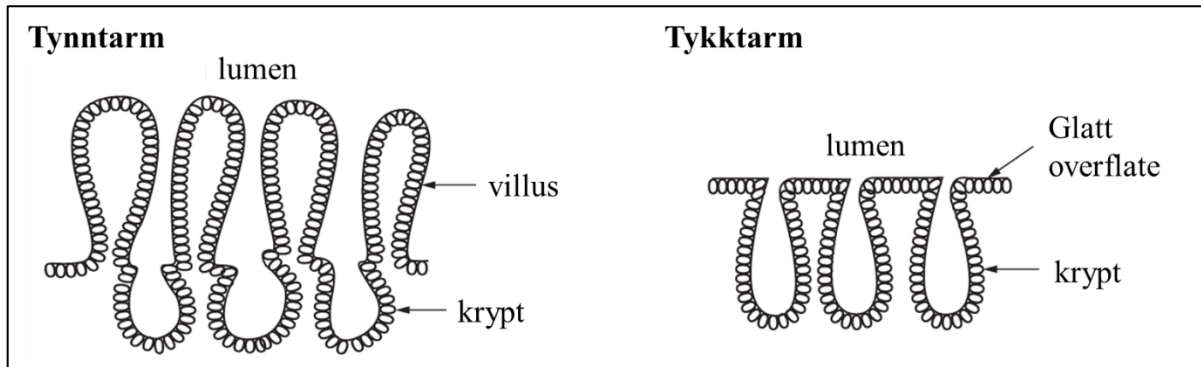
Under epitellaget finner vi lamina propria (LP; løst bindevev) og muscularis mukosa (muskelvev), som sammen med epitelet omtales som mukosa eller slimhinnen. Videre består tarmveggen av submukosa (løst bindevev med stort nervenettnettverk), muscularis propria (flere typer muskelvev) og serosa (bindevev) (Barrett, 2014).



**Figur 1.2** Organisering av de ulike lagene i tarmveggen. Modifisert illustrasjon fra Barrett (2014). Epitelets glandulære strukturer (krypter) er ikke illustrert.



## INTRODUKSJON



**Figur 1.3** Epitellagets strukturelle overflate i tynn- og tykktarm. Modifisert illustrasjon fra Barrett (2014).

### 1.1.2 Tarmmikrobiota

Begrepet «mikrobiota» betegner en samling mikroorganismer som oppholder seg i et bestemt habitat (Donaldson et al., 2016). Kroppen til dyr og mennesker innehar eksempelvis ulike habitater som huden, innsiden av munnen og nesen, reproduksjonskanaler og tarmene (Grice & Segre, 2012). Av disse utgjør tarmen den viktigste arenaen for kommunikasjon mellom mikroorganismer og vert (Neish, 2009), hvor blind- og tykktarmen har høyest tetthet og størst mangfold av bakterier (Donaldson et al., 2016). Generelt øker bakteriemengden når man beveger seg fra proksimal tynntarm til distal tykktarm (Donaldson et al., 2016).

Tarmen som helhet bør ikke defineres som ett enkelt habitat, ettersom de ulike delene tilbyr svært ulike omgivelser for de koloniserende organismene. Tynntarmen har for eksempel et mye surere miljø, høyere produksjon av antimikrobielle forbindelser og er mer oksygenrik, sammenlignet med tykktarmen. Det at tarminnholdet i tynntarmen passerer raskere sammenlignet med tykktarm, gjør også at evnen til å binde seg til slimlag og vev ansees som en viktig egenskap. Blind- og tykktarmen tilbyr et annet miljø for bakterier, med blant annet lenger «gjennomfartstid», lavere konsentrasjoner av antimikrobielle forbindelser, og hvor kun næringsstoffer som er ufordøyelige for verten (komplekse polysakkarider) er tilgjengelige. Dette gir god grobunn for fermenterende polysakkarid-degraderende anaerobe bakterier (Donaldson et al., 2016). I tillegg til den longitudinale gradienten, oppstår det også mer lokale forskjeller, spesielt i tykktarm. Bakgrunnen for dette er at veggen i tykktarmen folder seg, slik at det oppstår inter-fold regioner hvor bakteriesammensetningen skiller seg signifikant fra sammensetningen i sentral-lumen. I inter-fold regionene vil det for eksempel være større ansamling av slim, som enkelte bakterier (som *A. muciniphila*) drar stor nytte av (Donaldson et al., 2016).

## INTRODUKSJON

Den enorme koloniseringen av tarmen starter trolig allerede i mors mage, for deretter gå gjennom flere forandringer som resultat av fødselsmetode, inntak av morsmelk eller morsmelkerstatning, og videre introduksjon av fast føde (Tanaka & Nakayama, 2017). Ved treårsalderen har man i stor grad lagt grunnlaget for den voksne tarmmikrobiotaen, og etter dette er bakteriesammesetningen relativt stabil (Faith et al., 2013; Martinez et al., 2013). Noen endringer kan likevel skje som funksjon av for eksempel diett (David et al., 2014; Singh et al., 2017) og antibiotikabehandling (Becattini et al., 2016; Iizumi et al., 2017).

Bakteriell ubalanse (dysbiose) har blitt koblet til en rekke sykdommer og plager, både immunologiske, metabolske og neurologiske. Spesifikke eksempler er inflammatoriske tarmsykdom (IBD), kolorektal kreft, astma hos barn, fedme og kronisk leversykdom (Donaldson et al., 2016). Hvis man derimot ser bort fra tilstander hvor man har bakteriell ubalanse, lever bakteriene i tarmen i stor grad i symbiose med verten, der de to partene drar nytte av hverandre (Neish, 2014). Overordnet kan man derfor si at tarmmikrobiotaen har fire hovedfunksjoner: (1) bidra med næringsstoffer ved nedbrytning av komplekse karbohydrater kroppen selv ikke kan fordøye, (2) oppretthold av integriteten til tarmbarrieren, (3) bidra til beskyttelse av verten mot patogene mikroorganismer og (4) bidra til utvikling av tarmens immunsystem (Thursby & Juge, 2017).

### 1.1.3 Forsvarssystemer i tarm

Med sitt store overflateareal (300-400 m<sup>2</sup> i mennesker) utgjør epitellaget i tarmsystemet den viktigste kontaktflaten mellom kroppen og det ytre miljøet (Neish, 2009). Og som allerede beskrevet, er tarmen hjem for store mengder mikroorganismer. Det er derfor viktig med et funksjonelt forsvarssystem som tillater tilstedeværelse av gunstige bakterier, samtidig som patogene organismer og andre skadelige forbindelser ikke får innpass i kroppen. Man deler gjerne tarmens forsvarssystem inn i et førstelinjeforsvar, som omfatter en fysisk og en kjemisk barriere og et andrelinjeforsvar som omfatter aktivering av immunsystemet i de tilfeller uønskede og skadelige forbindelser krysser tarmbarrieren.

Førstelinjeforsvaret dannes av epitelet. Fysisk ved at epitelcellene er sterkt bundet til hverandre ved såkalte tette cellesammenføyninger (*tight junctions*, TJ) og gjennom produksjon av slim (mucus), og kjemisk ved utskillelse av en rekke forbindelser som bidrar til å holde tarmmikrobiotaen i sjakk. TJ er proteinkomplekser som binder epitelcellene sammen nær den apikale siden av cellene, og på den måten hindrer fri flyt av bakterier og

## INTRODUKSJON

molekyler gjennom epitellaget (paracellulær transport) (Giepmans & van Ijzendoorn, 2009). Viktigheten av TJ i opprettholdelse av epitelets integritet, gjør dem til et naturlig mål for invaderende virus og patogene bakterier, som ved å forstyrre eller ødelegge disse kompleksene kan kolonisere underliggende vev og spre seg til andre steder i kroppen (Konig et al., 2016).

For å hindre at tarminnholdet i det hele tatt kommer i kontakt med epitelet, er det derfor dekket av et viskøst slimlag, som produseres av spesialiserte celler, kalt begerceller (*Goblet cells*). Generelt øker antall begerceller når man beveger seg fra proksimal tynntarm, hvor de utgjør ca. 10 % av epitelcellene, til distal tykktarm, hvor de utgjør ca. 25 % (Mowat & Agace, 2014). Organiseringen av slimet er forskjellig i de ulike delene av fordøyelseskanalen. Epitelet i mage og tykktarm er dekket av to slimlag, mens det i tynntarmen bare er ett. Tykktarmens innerste slimlag har høy tetthet, er bundet til epitelet, og er i stor grad ugjennomtrengelig for bakterier. Det ytre slimlaget er derimot løsere, har lavere tetthet, og er kolonisert av en rekke bakterier (Pelaseyed et al., 2014). Det har i tillegg blitt gjort studier som indikerer at viskositeten til slimlaget i tykktarm øker fra proksimal til distal ende i mus (Swidsinski et al., 2007).

Den kjemiske barrieren er mer fremtredende i tynntarmen enn tykktarmen, ved at tynntarmsepitelet har flere Paneth-celler. Disse cellene er spesialisert for utskillelse av antimikrobielle peptider (AMPs). Absorpsjonsceller i både tynn- og tykktarm kan også produsere noen typer AMPs, men ikke i like store mengder (Peterson & Artis, 2014). I tillegg til AMPs, er utskilt immunoglobulin A (SIgA) en viktig del av tarmbarrieren, spesielt i tykktarm (Mowat & Agace, 2014). Hovedfunksjonen til SIgA er såkalt immunekskludering, som innebærer en rekke ulike mekanismer som til sammen sørger for å holde mikroorganismer og giftstoffer avskilt fra tarmvevet (Corthesy, 2013).

I tillegg til AMPs og SIgA finnes det mer indirekte mekanismer for å holde bakteriekoloniene i sjakk. Ett eksempel er utskillelse av Lipocalin-2 (Lcn-2). Lcn-2 er et såkalt akutfaseprotein, som har flere funksjoner i kroppen, deriblant å hindre overdreven vekst av tarmbakterier ved å hemme deres opptak av jern (Singh et al., 2016). I tarmen produseres Lcn-2 i både epitelceller og immunceller som nøytrofile granulocytter og makrofager. I avføring ser man forhøyede nivåer av Lcn-2 ved skader og infeksjon i tarm (Moschen et al., 2017). Av den grunn har Lcn-2 blitt foreslått som en svært nyttig biologisk markør for inflammasjon i tarm (Chassaing et al., 2012).

## INTRODUKSJON

Dersom patogene organismer klarer å penetrere barrieren og invadere underliggende vev, settes det i gang en inflammatorisk respons, utført av immunceller (leukocytter) i LP. Det samme vil skje dersom tarmveggen skades slik at underliggende vev blir eksponert for innholdet i lumen. Immuncellene i LP inkluderer ikke-adaptive immunceller som makrofager, dendritiske celler og nøytrofile granulocytter, og adaptive immunceller som T- og B-lymfocytter (Indrelid, 2017). De tre førstnevnte er fagocytterende celler, som via PPRs (*pattern recognition receptors*) kan gjenkjenne MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) på invaderende mikrober eller mikrobielle produkter, sluke dem via fagocytose og ødelegge dem i intracellulære vesikler. Eksempelvis er reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser en viktig del av denne prosessen. Epitelcellene bruker også PPRs for å «sansse» miljøet i lumen. Videre er B-lymfocytter antigenproduserende celler, mens T-lymfocytter kan beskrives som et bindeledd mellom det ikke-adaptive og det adaptive immunsystemet. Gjennom tett kommunikasjon, samarbeider de to delene av immunsystemet for å bekjempe infeksjoner (Indrelid, 2017).

Signalpeptider, kalt cytokiner, brukes i stor grad som intracellulært kommunikasjonsmiddel mellom immuncellene. Cytokinene deles typisk i proinflammatoriske og antiinflammatoriske, utfra om de bidrar til å øke eller bremse inflammasjonsgraden i vevet. Cytokiner som typisk kategoriseres som proinflammatoriske er interleukin (IL)-1, IL-6, tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  og interferon (IFN) $\gamma$ , mens IL-4, IL-10, IL-27, IL-13 og transformerende vekstfaktor (TGF)- $\beta$  ansees som antiinflammatoriske. Dette er likevel ikke endelige definisjoner, siden ett gitt cytokin kan ha forskjellige virkninger i ulike situasjoner (Indrelid, 2017).

Siden tarmveggen hele tiden eksponeres for bakterier, er det i mange tilfeller viktig å ikke sette i gang en overdreven immunrespons. Dette gjelder spesielt i tykktarm, hvor bakterietettheten i lumen er svært høy. I den sammenheng har makrofager i tarmen en viktig egenskap, ved at de effektivt fjerner bakterier i vevet samtidig som de i liten grad trigger en omfattende videre respons fra resten av immunsystemet (Indrelid, 2017).

Et annet bidrag til dempet immunrespons (toleranse) i tarmen er regulatoriske T-celler (Tregs) (Indrelid, 2017), som aktiveres etter å bli presentert for antigener fra lumen av dendritiske celler (Bio-Rad, 2016). I tarmen har tykktarm den høyeste forekomsten av Tregs (Mowat & Agace, 2014).

### 1.2 SYKDOM I TARM

Tarmen kan rammes av en rekke ulike plager og sykdommer, deriblant inflammatoriske tarmsykdommer som Crohns sykdom (CD) og ulcerøs kolitt (UC), med typiske karakteristika som vektreduksjon, magesmerter og blodig diaré (Cha et al., 2017). Felles for disse er at de bakenforliggende årsakene til tilstandene ikke er fullstendig kjent, noe som igjen kan vanskeliggjøre effektiv behandling (Kawada et al., 2007). Den generelle forståelsen er at IBD skyldes både svekket barrierefunksjon og upassende respons fra immunsystemet i tarmen, slik at man får en konstant eller kronisk immunrespons rettet mot tarmmikrobiotaen (Kawada et al., 2007; König et al., 2016; Podolsky, 2002). Siden langvarig tarmsykdom gir økt risiko for utvikling av kolorektal kreft (Lakatos & Lakatos, 2008; NHI, 2017), er det viktig å kartlegge de grunnleggende mekanismene som på et senere stadium kan føre til sykdom. De siste årene har det blitt mer og mer fokus på ROS som en slik bakenforliggende årsak for IBD og kreftutvikling, hvor en rekke studier har vist økt forekomst av oksidativt stress (Rezaie et al., 2007). På den andre siden har man avdekket mutasjoner i genet som koder for NOX1 og DUOX2 i mennesker som tidlig utvikler UC (VEOIBD; *very-early-onset IBD*), noe som tyder på at også redusert ROS-produksjon kan være skadelig (Hayes et al., 2015; Schwerd et al., 2018). I dette prosjektet var vi ikke primært interessert i mekanismer ved alvorlig tarmsykdom, selv om tarmsykdom hos mennesker er den grunnleggende motivasjonen bak studier av inflammasjon i tarm.

### 1.3 EKSPERIMENTELLE MODELLER FOR INFLAMMASJON I TARM

Det har blitt utviklet en rekke musemodeller for å studere skader og sykdom i tarm (Jiminez et al., 2015; Kiesler et al., 2015; Low et al., 2013; Mizoguchi et al., 2016), både kjemisk induisert og ved bruk av genmanipulerte mus, slik som *IL-10* knockout (KO)-mus.

Motivasjonen bak slike modeller er typisk å bedre forståelsen av humane sykdommers etiologi (årsak) og sykdomsutvikling, samt å teste ut terapeutiske strategier. I motsetning til enklere laboratoriemodeller (som cellekulturer), gir dyremodeller mulighet til å studere hvordan genetikk, miljøfaktorer og ulike sider av immunsystemet virker sammen. Mus deler mange humane egenskaper, noe som gjør dem til et naturlig valg som modellorganisme. Eksempelvis har mennesker og mus lignende genetikk (90 % felles gener), tarmmikrobiota, og fordøyelseskanal (Jiminez et al., 2015).

## INTRODUKSJON

### 1.3.1 DSS-indusert tykktarmsinflammasjon

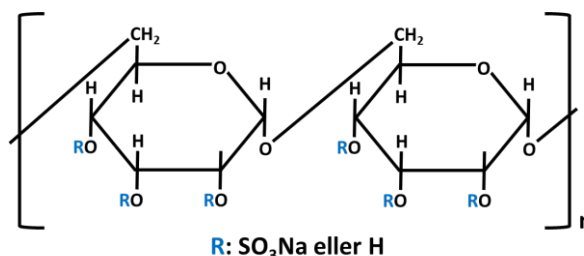
En vanlig metode for å indusere tarminflammasjon er å eksponere dyrene for kjemiske forbindelser som irriterer tarmen og ideelt skaper en sykdomstilstand som mimikerer det man finner hos mennesker. Dextran sulfat sodium (DSS) er ett av flere redskaper som brukes for å indusere inflammasjon i tykktarm, og er i dag den mest brukte modellen for å studere tykktarmsinflammasjon i mus (Viennois et al., 2013).

DSS er et sulfatert polysakkarid (Chassaing et al., 2014), hvor hver glukoseenhet kan ha opptil tre sulfatgrupper (Araki et al., 2010)

(figur 1.4). I tillegg til varierende svovelinnhold per glukoseenhet, kan også lengden til molekylene variere i stor grad, noe som resulterer i svært ulik molekylvekt (fra 5 kDa til 1400 kDa) (Perse & Cerar, 2012). Molekylvekten (MV) er helt avgjørende for induksjon av inflammasjon, og optimal MV for induksjon av UC-lignende kolitt er mellom 40 og 50 kDa (Chassaing et al., 2014). Histologiske undersøkelser av tykktarm etter DSS-eksponering viser at hele tarmen er affisert, men distal del er mer affisert enn proksimal (Azuma et al., 2008; Yan et al., 2009).

Dyr eksponeres for DSS via drikkevannet, og ved å variere dosen og hyppigheten av eksponering, kan man indusere akutt eller kronisk inflammasjon. Akutt inflammasjon induseres med typisk 1-5 % DSS i drikkevann i ca. en uke (Jiminez et al., 2015). Hvilken DSS-dose som benyttes avhenger av ønsket inflammasjonsgrad, men også av hva slags musestamme som benyttes. C57BL/6-mus er for eksempel mer følsomme for DSS enn BALB/c-mus (Melgar et al., 2005). Generelt anbefales det derfor å teste ulike konsentrasjoner for å oppnå ønsket effekt (Chassaing et al., 2014). For C57BL/6-mus brukes typisk 4 og 1 % DSS for induksjon av henholdsvis robust og moderat inflammasjon, mens lavgrads-inflammasjon induseres ved bruk av < 1 % DSS (Chassaing et al., 2012). Tabell 1.1 gir en oversikt over ulike effekter av akutte DSS-modeller som går igjen i litteraturen.

Mekanismene for DSS-indusert inflammasjon er uklare (Araki et al., 2010). Den nåværende, overfladiske forståelsen, er at DSS forårsaker en skade i epitellaget som gir bakterier og deres produkter tilgang til underliggende vev, som igjen setter i gang en inflammatorisk respons mediert av immunceller i LP (Kiesler et al., 2015; Low et al., 2013). Mer detaljert har det blitt



**Figur 1.4** Den kjemiske strukturen til DSS.

## INTRODUKSJON

foreslått at DSS entrer epitelcellene ved å først danne vesikkelkomplekser med *medium-chain fatty acids* (MCFA) i tykktarmslumen, og derfra fusjonere med epitelcellenes membraner (Laroui et al., 2012). Hvordan DSS videre fører til svekket barriere er uklart. Det er imidlertid gjort koblinger mellom DSS-eksponering og (1) bakterier i tykktarmens innerste slimlag (Johansson et al., 2010), (2) økt apoptose og redusert celledeling av epitelceller (Araki et al., 2010), og (3) økt intestinal gjennomtrengelighet (Gianolio et al., 2016; Kitajima et al., 1999; Yan et al., 2009).

Videre har en rekke studier sett på sammenhengen mellom bakterier og inflammasjonsgrad i DSS-modellen, men resultatene er tvetydige. Det har blant annet blitt vist at *germ-free* (GF) og antibiotika-behandlede mus utvikler svakere inflammasjon, men samtidig pådrar seg større fysiske skader på epitelet enn konvensjonelle mus (Hernandez-Chirlaque et al., 2016). I tillegg til sammenligning av konvensjonelle og GF mus, har det blitt observert at ulik sammensetning av tarmbakterier påvirker inflammasjonsgraden ved DSS-eksponering (Li et al., 2017; Roy et al., 2017).

Det har også blitt foreslått at reaktive oksygenforbindelser er involvert i den DSS-induserte inflammasjonsprosessen, ved å bidra til forverring av inflammasjonen. Denne teorien baserer seg blant annet på studier i rotter (Araki et al., 2003) og mus (Araki et al., 2006), hvor det har blitt vist at antioksidantbehandling har positiv effekt på DSS-indusert kolitt. Eksempler på positive effekter var redusert histologisk skade, mindre grad av forkortning av tykktarmen, lavere nivåer av IL-6 i serum, og lavere nivåer av MPO (myeloperoksidase) i tykktarm.

**Tabell 1.1** Typiske effekter av akutt DSS-indusert inflammasjon. \*

Kliniske tegn	Patologiske effekter (i tykktarm)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vekttap</li> <li>• Endret avføringskvalitet <i>Løs konsistens/diaré, blod</i></li> <li>• Rektal blødning</li> <li>• Blod i tykktarm</li> <li>• Forkortning av tykktarm</li> <li>• Økt tykktarmsvekt</li> <li>• Økt vekt/lengde-ratio tykktarm</li> <li>• Økt miltvekt</li> <li>• Reduksjon i vann- og matinntak</li> <li>• Redusert aktivitetsnivå</li> <li>• Sammenkrøket kroppspositur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Økt ekspresjon av cytokiner/kjemokiner** <i>TNF<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, IL-17, IL-6, IL-12, IFN<math>\gamma</math></i> <i>(proinflammatoriske), IL-10 (anti-inflammatorisk), KC, MIP-2</i></li> <li>• Histologiske endringer <i>f.eks. ødeleggelse av krypter</i></li> <li>• Infiltrasjon av immunceller i slimhinnen</li> <li>• Økt myeloperoksidase (MPO)-aktivitet (infiltrasjon av nøytrofile granulocytter)</li> <li>• Forhøyede nivåer av Lcn-2 i avføring</li> <li>• Svekket tarmbarriere (høyere gjennomtrengelighet)</li> <li>• Økt produksjon av ROS</li> </ul>

\* kilder: (Alex et al., 2009; Araki et al., 2010; Bamba et al., 2012; Chassaing et al., 2012; Egger et al., 2000; Kato et al., 2016; Kitajima et al., 1999; Kriegelstein et al., 2001; Melgar et al., 2005; Ramonaite et al., 2014; Suzuki et al., 2006; Taghipour et al., 2016; Wang et al., 2018; Yan et al., 2009) \*\*kjemokiner er kjemotaktiske cytokiner, som blant annet dirigerer lymfocytter til betent eller skadet vev (Borish & Steinke, 2003).

## 1.4 ROS OG ROS-GENERERENDE ENZYMER

«Reaktive oksygenforbindelser» (ROS), brukes som en paraplybetegnelse på en rekke små, oksygen-utledede forbindelser. Blant dem har man radikaler som superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ) og hydroksyl ( $\cdot OH$ ), men også ikke-radikaler som hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) og hypoklorsyre ( $HOCl$ ) (Aviello & Knaus, 2016). Et radikal er et ion, molekyl eller atom som har et uparet elektron i ytterste orbital, noe som er en ustabil konfigurasjon. Ulike ROS skiller seg fra hverandre både når det gjelder reaktivitet og levetid (Aviello & Knaus, 2018).

Grunnet sin reaktive natur, kan mange ROS reagere med de fleste typer molekyler, og på den måten endre eller ødelegge dem. Dette kan skje med alt fra små uorganiske molekyler til makromolekyler som proteiner, fettsyrer, karbohydrater og nukleinsyrer (Bedard & Krause, 2007). Likefullt er det nå akseptert at ROS også har viktige funksjoner i organismen. Det har blitt klart at ROS bidrar til regulering av mange ulike prosesser, i så godt som alle typer celler og vev, slik som forsvar mot bakterier, celledødsregulering og genekspressjon, celledød og -vekst, samt flere (Bedard & Krause, 2007).

I kroppen er superoksid utgangspunktet for de fleste ROS (Bedard & Krause, 2007). I cellene dannes superoksid i hovedsak ved ufullstendig reduksjon av di-oksygen ( $O_2$ , gass) i elektrotransportkjeden, og via enzymer kalt NADPH oksidaser (Aviello & Knaus, 2016). I elektrontransportkjeden reduseres  $O_2$  til  $H_2O$  ved hjelp av to elektroner, samtidig med at det dannes en protongradient over indre mitokondriemembran som gir opphav til ATP-produksjon. Likevel vil en liten andel av oksygenet ikke bli fullstendig redusert til vann, og det dannes superoksid (Aviello & Knaus, 2016). Det er estimert at 1 % av oksygenet blir omdannet til superoksid, men dette tallet er høyst usikkert, og vil variere avhengig av aldring eller skade på mitokondriene (Lambeth & Neish, 2014).

Cellen kan videre omdanne superoksid til hydrogenperoksid, som er en mer stabil forbindelse. Dette kan skje spontant eller ved hjelp av superoksid dismutaser (SOD) (Aviello & Knaus, 2018). Viktigheten av SOD har blitt demonstrert ved bruk av *SOD* KO-mus, som dør få dager etter fødsel (Lambeth & Neish, 2014). Imidlertid er ikke omdannelsen av superoksid til hydrogenperoksid kun for å hindre oksidative skader, da hydrogenperoksid er et viktig signalmolekyl (Brown & Griendling, 2009). Høye konsentrasjoner av  $H_2O_2$  er likevel ikke gunstig for cellen, og kan derfor omdannes til oksygen og vann ved hjelp av katalase eller glutatjon peroksidase. Uten katalysering skjer denne omdannelsen langsomt (Aviello & Knaus, 2018).



## INTRODUKSJON

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan videre danne det svært reaktive hydroksylradikalet (<sup>•</sup>OH) i nærvær av Fe<sup>2+</sup> (kalt Fenton-reaksjon) (Aviello & Knaus, 2018). Hydroksyl står for mesteparten av oksidative skader i celler i både dyr, planter og mikroorganismer (Chen & Schopfer, 1999). Alternativt kan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> omdannes til HOCl i nærvær av klor, i en reaksjon katalysert av peroksidaser (for eksempel MPO i fagocytterende celler). Sammenlignet med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, er HOCl 100 ganger mer toksisk for cellene (Aviello & Knaus, 2016).

I tillegg kan superoksid reagere med nitrogenoksid (<sup>•</sup>NO) og danne peroksintritt (**ONOO<sup>•</sup>**). I likhet med superoksid er nitrogenoksid et radikal, og er den eneste forbindelsen i cellen som dannes i høye nok konsentrasjoner, og som er reaktiv nok, til å utkonkurrere omdannelsen av superoksid til hydrogenperoksid via SOD (Beckman, 1996). Dette gjelder under den forutsetning at <sup>•</sup>NO og O<sub>2</sub><sup>•-</sup> er tilstrekkelig nær hverandre. Peroksintritt er ikke et radikal, men dets reaktivitet kan sammenlignes med reaktiviteten til <sup>•</sup>OH (Brown & Griendling, 2009; Egea et al., 2017), men i motsetning til hydroksyl, er peroksintritt svært stabil (Beckman, 1996). Peroksintritt kan videre ha skadelige effekter i seg selv, eller gjennom dannelse av andre nitrogenholdige forbindelser. Nitrogenoksid, peroksintritt, og eventuelt etterfølgende reaktive forbindelser, kalles samlet for reaktive nitrogenforbindelser (RNS) (Singer et al., 1996). Oversikt over de nevnte mekanismene for dannelse av RONS er gitt i figur 1.5.

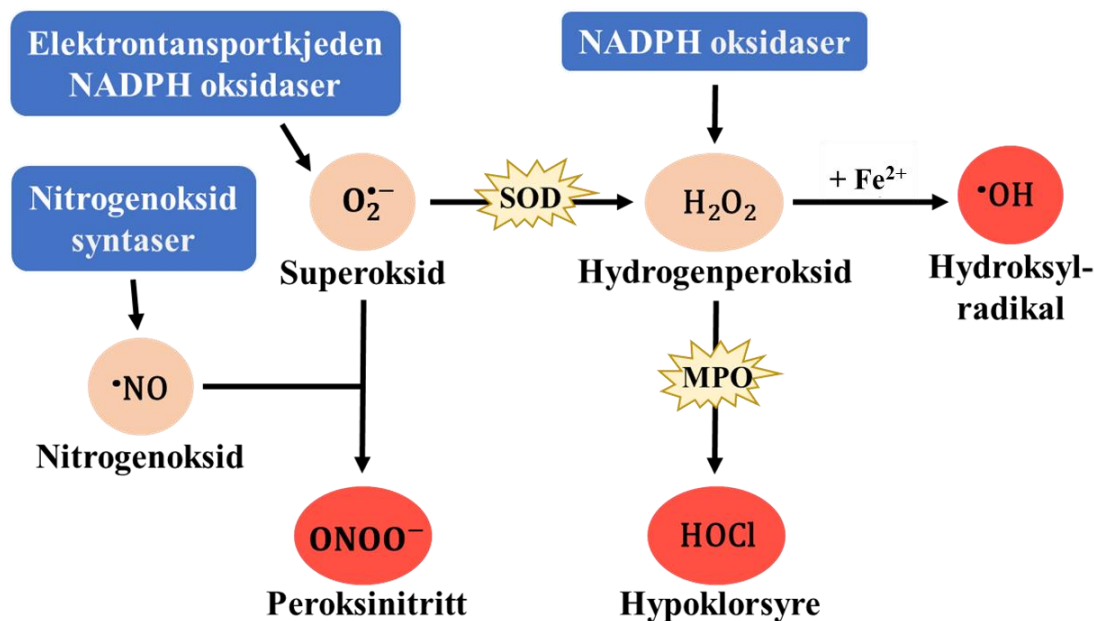
Dannelse av superoksid i elektrontransportkjeden er kun et biprodukt. Derimot finnes det en rekke enzymer, kalt nikotinamid adenin di-nukleotid fosfat (NADPH) oksidaser (NOX-enzymen), som har som funksjon å generere ROS. I denne enzymfamilien finner man NOX1-5 og DUOX1-2. NOX5 uttrykkes ikke i mus, mens de øvrige isoformene uttrykkes både i mus og mennesker (Aviello & Knaus, 2016). Felles for disse enzymene er at de er transmembrane proteiner som transporterer elektroner over biologiske membraner. I denne prosessen reduseres oksygen til superoksid (NOX1-5) eller hydrogenperoksid (DUOX1-2), samtidig som NADPH oksideres til NADP<sup>+</sup>. For å bli katalytisk aktive, er NOX1-4 avhengige av en eller flere aktiverende underenheter (Bedard & Krause, 2007).

NOX2 var det første av NOX-enzymene til å bli oppdaget. Enzymet produseres i hele kroppen, men hovedsakelig i fagocytterende celler som makrofager og nøytrofiler (Bedard & Krause, 2007). Når cellen blir aktivert av mikrober eller cytokiner, vil NOX2 generere store mengder superoksid i fagosomer. Superoksid omdannes deretter til hydrogenperoksid, og videre til hypoklorsyre via MPO (Brown & Griendling, 2009). Denne produksjonen av ROS omtales som et «respiratorisk utbrudd» (*respiratory burst*), og dersom det ikke kontrolleres

## INTRODUKSJON

strengt kan vev bli skadet (Lambeth & Neish, 2014). Om ROS i de fagocytterende cellene direkte bidrar til å drepe bakterier er fortsatt uklart (Rada et al., 2008), men at NOX2-aktivitet er nødvendig for bakteriedreping i nøytrofiler har blitt demonstrert av personer med dysfunksjonelt NOX2-kompleks (kalt kronisk granulomatøs sykdom, CGD). Disse individene er spesielt utsatt for infeksjoner (Brown & Griendling, 2009). Det neste NOX-enzymet som ble oppdaget var NOX1, som kodes av genet *NOX1* på X-kromosomet i mus og mennesker (Bedard & Krause, 2007). Sammenlignet med andre steder i kroppen, uttrykkes *NOX1* i høyest grad i tykktarm (Kikuchi et al., 2000; Suh et al., 1999). I tillegg uttrykkes *NOX1* i lavere grad i blant annet endotelceller og glatte muskelceller (Aviello & Knaus, 2018).

I tillegg til NOX-enzymene finnes det nitrogenoksid syntaser (NOS-enzymmer). I likhet med NOX-generert ROS, har nitrogenoksid viktige funksjoner i cellen (Forstermann & Sessa, 2012). Det finnes tre isoformer av NOS: nNOS, iNOS og eNOS, der «n», «i» og «e» står for henholdsvis nevronal, induserbar og endotelial. Som navnene tilsier, er nNOS og eNOS aktive i henholdsvis nerve- og endotelceller, hvor de blir konstitutivt uttrykt og produserer små mengder nitrogenoksid (Aviello & Knaus, 2016). iNOS kan uttrykkes i ulike celler, deriblant immunceller som makrofager og nøytrofiler. Til forskjell fra de andre isoformene, blir iNOS syntetisert først når cellen aktiveres av spesifikke cytokiner eller mikrobielle produkter. For eksempel induseres iNOS av cytokinene  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  og  $\text{IFN-}\gamma$ . Enklere sagt produseres nitrogenoksid i store mengder via iNOS ved inflammasjon eller infeksjon.



Figur 1.5 Utvalgte reaksjonsveier for dannelse av RONS.

## 1.5 ROS OG DERES ROLLE I TYKKTARM

Tidligere trodde man at ROS i tykktarm i hovedsak stammet fra NOX2-aktivitet i fagocytterende celler i LP. Etter hvert som andre NOX-enzymmer ble karakterisert, ble det klart at også epitelcellene i tykktarm genererer ROS, i hovedsak via NOX1 og DUOX2 (Bedard & Krause, 2007). Som i andre vev, bidrar NOX2-generert ROS i fagocytterende celler i LP til bekjempelse av invaderende mikroorganismer. DUOX2, som uttrykkes av epitelceller i hele fordøyelseskanalen (El Hassani et al., 2005), har sannsynligvis også en viktig funksjon i forhold til forsvarssystem. Det har blant annet blitt foreslått et mulig samarbeid med laktoperoksidase (LPO) (Bedard & Krause, 2007). Rollen til NOX1 er ikke like klar, men to hypoteser testes hyppig: (1) at NOX1 har en viktig rolle i tarmens forsvarssystem, og (2) at NOX1 har en viktig rolle i regulering av celleprolifisering i epitelet (Bedard & Krause, 2007).

I fordøyelseskanalen er ekspresjon av *NOX1* høyest i tykktarm, men har relativt høyt uttrykk også i ileum (Matziouridou et al., 2017; Schwerd et al., 2018). Innad i tykktarm uttrykkes *NOX1* med en økende gradient fra proksimal til distal ende (Grasberger et al., 2015; Kamizato et al., 2009; Schwerd et al., 2018; Szanto et al., 2005). Nøyaktig hvor i epitelet *NOX1* uttrykkes, er noe uklart. Noen rapporterer at uttrykket er høyest i nedre del av kryptene (Geiszt et al., 2003), mens andre viser *NOX1*-mRNA ekspresjon både i krypter og på den luminale overflaten av vevet (Szanto et al., 2005). Det synes derimot klart at proteinet NOX1 er aktivt hovedsakelig på den luminale overflaten, som er vist både i marsvin (Kawahara et al., 2004) og mennesker (Fukuyama et al., 2005). Uavhengig av nøyaktig posisjon, antyder den konstitutive ekspresjonen en spesifikk funksjon akkurat i tykktarm, og kanskje også i ileum.

Ulike studier har forsøkt å kartlegge både regulering av og rollen til NOX1 i inflammasjonsmodeller. I *IL-10* KO-mus, som spontant utvikler tykktarmsbetennelse, øker *NOX1*-ekspresjon med dyrenes alder (Kamizato et al., 2009). Det ble i samme studie også vist at *IL-10* virker nedregulerende på TNF $\alpha$ - og IFN $\gamma$ -aktivert *NOX1*-ekspresjon og produksjon av superoksid i T84-celler.

Andre har kombinert *IL-10* og *NOX1* KO i mus, og funnet at sammenlignet med *IL-10* KO alene, fører den kombinerte knockoutmodellen til forverret sykdomsgrad og svekkelse av barrierefunksjon (Treton et al., 2014). Treton og kollegaer viste i tillegg at *NOX1* KO-mus ikke skiller seg fra villtypemus med tanke på sykdomsscore, histologiske undersøkelser av

## INTRODUKSJON

tarmvevet, tarmbarrierens gjennomtrengelighet eller ekspresjon av proinflammatoriske cytokiner. Evaluering av synlig sykdomsgrad og histologiske undersøkelser viste heller ingen forskjeller mellom *NOX1* KO-mus og villtypemus etter DSS-eksponering (2-5 % DSS, 5 dager) (Treton et al., 2014).

På den andre siden viste Kato og kollegaer at behandling med 2 % DSS fører til forverrede epitel-skader og oppregulering av inflammasjonsmarkører i tykktarmen til *NOX1* KO-mus sammenlignet med villtype (Kato et al., 2016). I dette tilfelle ble dyrene eksponert for DSS i fire dager, etterfulgt av fem dager med vann. Dette var for å undersøke hvordan *NOX1* eventuelt bidrar til reparasjon av tarmepitelet. Studien fant at *NOX1* påvirker celleproliferasjon og -migrasjon ut av tarmkryptene, og at fravær av *NOX1* resulterer i at begerceller ikke modnes. Oppsummert viste studien at *NOX1* bidrar til reparasjon av vevsskade i tykktarm, noe som også har blitt foreslått av andre (Leoni et al., 2013). Videre koblet Kato og kollegaer DSS-indusert ROS-produksjon i epitelet til tilstedeværelse av proteinet *NOX1* på epitelcellenes apikale membran. Det ble foreslått at når epitelet skades, vil cytokiner og vekstfaktorer frigjøres fra infiltrerende immunceller, og på den måten aktivere *NOX1* (Kato et al., 2016).

Som nevnt innledningsvis er det blitt foreslått at både *NOX1*- og *DUOX2*-generert ROS er en viktig del av forsvarssystemet i tarmen (Leto & Geiszt, 2006). Både i *Drosophila melanogaster* (bananflue) (Ha et al., 2005) og *Caenorhabditis elegans* (rundorm) (Chavez et al., 2009) er det blitt demonstrert at ROS produsert av *DUOX*-enzym har viktige antimikrobielle funksjoner. I pattedyr har det videre blitt foreslått at *DUOX2*-generert hydrogenperoksid virker som substrat for LPO på slimhinnene i spiserør og mage (Matziouridou et al., 2017). LPO katalyserer  $H_2O_2$ -oksidasjon av blant annet tiocyanat til hypotiocyanitt. Hypotiocyanitt har antimikrobielle egenskaper, og er effektiv mot en rekke bakterier, virus, gjær og sopp. Lignende  $H_2O_2$ /tiocyanat/LPO-system har også nylig blitt foreslått som mekanisme i tykktarm hos mus, men LPO har ikke blitt funnet i tarmen hos mennesker (Rigoni et al., 2017).

Ved bruk av GF og spesifikt patogenfrie (SPF) mus, har det blitt vist at ekspresjon av *DUOX2* mRNA og protein er avhengig av tilstedeværelsen av tarmmikrobiota (Grasberger et al., 2015; Larsson et al., 2012; Sommer & Backhed, 2015). I tillegg viste Sommer og Backhed at eksponering for 3 % DSS i drikkevann gir økt mRNA-ekspresjon allerede etter én dag, noe som trolig skyldes tettere kontakt mellom bakterier og epitelceller grunnet svekket

## INTRODUKSJON

barriere (Sommer & Backhed, 2015). Oppregulering av *DUOX2* ved DSS-eksponering har også blitt observert av andre (Rigoni et al., 2017). Det ser det ut til at *NOX1* i tykktarm påvirkes i mindre grad av bakterier, da det er liten forskjell i *NOX1*-uttrykk i GF versus konvensjonelle mus (Larsson et al., 2012). I ileum ser det derimot ut til at tarmmikrobiotaen er avgjørende (Larsson et al., 2012; Matziouridou et al., 2017). Dette kan tyde på at *NOX1* reguleres forskjellig i ulike deler av fordøyelseskanalen, noe som også har blitt observert for *DUOX2* (Sommer & Backhed, 2015).

Som forklart tidligere er tarmmikrobiotaen og verten separert av en sterk fysisk og kjemisk barriere. Likevel foregår det kontinuerlig kommunikasjon over denne barrieren, som deriblant involverer ROS (Aviello & Knaus, 2018). Ved bruk av *iNOS* og *NOX1* KO-mus har det for eksempel blitt demonstrert at produksjon av peroksinitritt kan være viktig for både mengde og sammensetning av tarmbakterier i ileum, og at *iNOS*- og *NOX1*-ekspresjon i ileum er bakterielt induert (Matziouridou et al., 2017). Den samme studien viste i tillegg tydelig at *in vivo* ROS-signal fra tarm blir kraftig redusert dersom bakteriene fjernes ved antibiotikabehandling (Matziouridou et al., 2017).

I forhold til kobling mellom *NOX1* og mikrobiota, har det også blitt gjort studier av hvordan *Lactobacilli rhamnosus* påvirker *NOX1*-generert ROS, både i tynn- og tykktarm (Jones et al., 2013). Ved bruk av epitelspesifikke *NOX1* KO- og villtypemus, ble det vist at økt produksjon av ROS som respons på *L. rhamnosus*, trolig skyldes *NOX1*-generert ROS. Til forsøket ble den ROS-spesifikke proben Hydro-Cy3 brukt, som man tror er spesielt sensitiv for superoksid og hydroksylradikaler (Kundu et al., 2009). Videre ble det konkludert med at denne *L. rhamnosus*-induserte ROS-produksjonen påvirker celleprolifisering i tarmvevet positivt (Jones et al., 2013). Et viktig poeng er likevel at ikke alle bakterier ser ut til å indusere *NOX1*-aktivitet i like stor grad. Andre studier har vist at knockout av *p22<sup>phox</sup>* (*NOX1-4*) resulterer i mindre andel fakultative anaerobe bakterier som er kjent for sine beskyttende, antiinflammatoriske roller ved tarmsykdom (Aviello & Knaus, 2018).

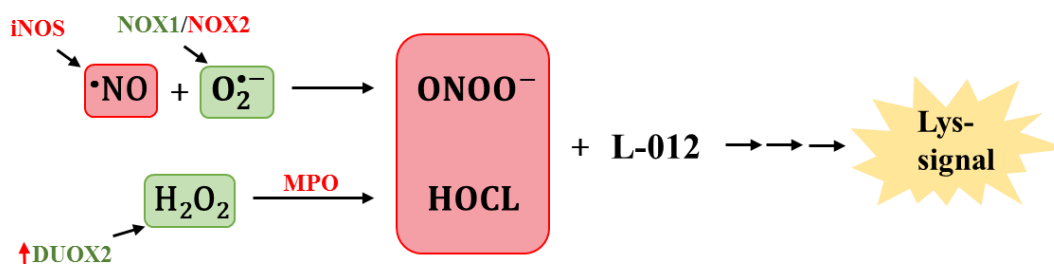
Roller til *NOX1* i tarmens forsvarssystem mot mikrober, er blant annet basert på den økende gradienten av både *NOX1*-ekspresjon og bakteriemengde fra proksimal til distal tykktarm. I tillegg har det blitt observert at *NOX1* påvirkes av IFN- $\gamma$ , lipopolysakkarid (LPS) og flagellin (Bedard & Krause, 2007). Det mangler likevel bevis for direkte sammenheng mellom *NOX1*-generert ROS og bekjempelse eller kontroll av bakterier i tykktarm.

## INTRODUKSJON

Selv om det ofte induseres relativt kraftig inflammasjon ved studier av inflammatorisk tarmsykdom, har enkelte grupper benyttet seg av mildere sykdomsmodeller. Eksempelvis viste en studie at 1 % DSS gav økt forekomst av nitrotyrosin (markør for peroksintritt) i tykktarm, uten nevneverdige utslag på inflammasjonsscore (Suzuki et al., 2006). Dette betyr at selv uten alvorlig skade på tarmvevet eller eksponering for patogene mikroorganismer, så blir ROS-produksjonen økt. Spørsmålet er da hvilket eller hvilke av de ROS-genererende enzymene i tykktarmen som var ansvarlig. Siden peroksintritt dannes fra superoksid og nitrogenoksid, er det plausibelt å anta at i det minste iNOS blir oppregulert ved mild irritasjon forårsaket av 1 % DSS. Bidrag av superoksid kan komme fra både NOX1 og NOX2, men siden NOX2 i størst grad aktiveres ved infeksjon eller av proinflammatoriske cytokiner, er det mer sannsynlig at NOX1 var den primære kilden til superoksid ved denne svake irritasjonen av tarmbarrieren. Det avsluttende spørsmålet blir da hvilken rolle denne oppreguleringen av ROS spiller, spesielt om den er med på å styrke eller svekke tarmbarrieren.

### 1.5.1 Måling av ROS

Det har blitt utviklet mange metoder for måling av ROS (Daiber et al., 2017). Blant dem er optisk avbildning etter injeksjon av ROS-spesifikke prober, som kan brukes for å måle ROS-produksjon både *in vivo* og *ex vivo*. Ett eksempel er den kjemiluminescerende proben L-012, som ser ut til å ha høy sensitivitet for peroksintritt (Daiber et al., 2017; Van Dyke et al., 2007), og kanskje også hypoklorsyre (Goiffon et al., 2015). Dette gjør at L-012-indusert kjemiluminescens kan fungere som en god indikator for både NOS- og NOX-aktivitet. Problemet er derimot at man ikke med sikkerhet kan si hvilket enzym som i hovedsak gir opphav til signalet, og heller ikke nøyaktig hvilke ROS som reagerer med L-012, og skaper lyssignalet. Dersom det likevel stemmer at L-012 i hovedsak reagerer med peroksintritt og hypoklorsyre, viser figur 1.6 mulige kilder for L-012-signal i tykktarm.



**Figur 1.6** Mulige kilder til L-012-signal i tykktarm. Fargene rød og grønn viser til aktivitet eller tilstedeværelse ved henholdsvis skade/inflammasjon og normalt tilstand.

### 1.6 HENSIKTEN MED PROSJEKTET

Ved studier av både ROS i tarm og av inflammatorisk tarmsykdom generelt, brukes ofte inflammasjonsmodeller som induserer alvorlige skader med kraftige inflammatoriske responser. I dette prosjektet siktet vi derimot på en mer «fysiologisk» eller mild tilstand, som i større grad ligner en naturlig situasjon som kan oppstå i tykktarm i friske individer. I første omgang var det derfor nødvendig å etablere en modell som gjenspeiler denne situasjonen. Til dette ble det valgt å benytte oral eksponering for DSS i mus, hvor ulike doser ble testet for å oppnå en lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm. Optimalt skulle modellen karakteriseres av svak oppregulering av inflammasjonsrelaterte gener og markører, samtidig som dyrene i liten grad viste tegn på sykdom.

Videre ville vi undersøke hvilke eventuelle roller det ROS-genererende enzymet NOX1 hadde i denne modellen. Viktige argumenter for denne interessen er at *NOX1*-uttrykket i tykktarm som sådan er høyt. Videre vil mild inflammasjon trolig føre til oppregulering av iNOS, som igjen genererer nitrogenoksid i nærvær av superoksid. Ved bruk av L-012 probe, har vår gruppe tidligere vist at L-012 er en meget sensitiv markør for peroksintritt, som trolig har konsekvenser for både miljøet i tarmlumen og barrierefunksjon. Vi ønsket derfor å indusere en tilstand hvor vi får oppregulering av peroksintritt, og undersøke betydningen av å fjerne NOX1.

Mer spesifikt ville vi undersøke hva fravær av NOX1, ved bruk av villtype- og *NOX1* knockoutmus, har å si for både synlig sykdomsgrad, inflammasjonsgrad (i form av ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener og markører), ROS-signal fra tykktarm (ved bruk av optisk avbildning med L-012) og barrierefunksjon (i form av LBP-nivåer i plasma) i en situasjon hvor tarmbarrieren har blitt utsatt for en mild irritasjon.

Oppsummert hadde prosjektet følgende hovedmål (I-IV):

- I. Etablere en musemodell som gjenskaper en mild irritasjon i epitellaget i tykktarm ved bruk av DSS, siden dette i større grad enn alvorlige inflammasjonsmodeller kan gjenspeile en mer naturlig situasjon som kan oppstå i tarmen i relativt friske individer.
- II. Beskrive ekspresjonsnivåene av ulike inflammasjongsener og ROS-regulerende gener i tykktarm etter en mild inflammasjonsinduksjon.

## INTRODUKSJON

- III.** Undersøke i hvilken grad ROS-produksjon ved bruk av L-012 er påvirket av mild inflammasjon, og om NOX1 er viktig for denne ROS-produksjonen.
  
- IV.** Undersøke hvordan fravær av NOX1 påvirker sykdomsgrad, inflammasjon og barrierefunksjon i den etablerte modellen, med utgangspunkt i hypotesen om at NOX1-generert ROS har en positiv effekt.



## 2 METODER

---

Følgene metoder ble utført høsten 2017 og våren 2018 ved NMBU. Lister over programvarer, instrumenter og materialer er gitt i bilag A, B og C.

### 2.1 DYREFORSØK

Det ble gjennomført tre dyreforsøk med administrering av DSS i drikkevann:

1. Pilotforsøk (beskrevet i delkapittel 2.1.3)
2. Etableringsforsøk (beskrevet i delkapittel 2.1.4)
3. *NOXI* knockout-forsøk (beskrevet i delkapittel 2.1.5)

I forkant av disse, ble det utført et mindre forsøk i forbindelse med metodevalidering, men hvor DSS ikke ble benyttet (beskrevet i delkapittel 2.3.1)

#### 2.1.1 Dyr og dyrehold

I forsøkene ble både villtype- (VT) og *NOXI* knockoutmus (*NOXIKO*) benyttet, avlet lokalt ved Dyrelaboratoriet ved KBM med utgangspunkt i innkjøpte stammer fra The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Både VT- og *NOXI* KO-mus hadde C57BL/6J-bakgrunn. Til sammen ble 60 VT (39 hanner, 21 hunner) og 20 *NOXIKO* (4 hanner, 16 hunner) benyttet.

Ved laboratoriet ble dyrene avlet frem ved homozygot avl (figur 2.1). Knockoutdyrene var såkalte konvensjonelle knockout, som betyr at uttrykket av *NOXI*-proteinet er slått ut i alle kroppens celler, i motsetning til vevsspesifikk knockout.

Dyrene ble oppstallet i individuelt ventilerte bur (Innovive, San Diego, CA), som alle stod i samme stativ (*rack*). Både temperatur (23-25 °C) og luftfuktigheten (45-55 %) i dyrestallen ble sjekket daglig. Dyrene ble gitt standard tørrfôr (RM1, SDS diet) og vann *ad libitum*, både før og under intervensjon. Oppstallingsrommet hadde lysstyring, innstilt med 12:12 lys/mørke-syklus. Alle bur var utstyrt med burstrø, løpehjul med hus, tyggepinne og reirmateriale. Under DSS-forsøk (varighet 6-8 dager) ble ikke burstrø skiftet ut.

## METODER



**Figur 2.1 Homozygot avl**

Ved dyrelaboratoriet ble villtype- og *NOXI* knockoutmus avlet frem ved homozygot avl av hunn- og hanndyr. *NOXI*-genet ligger på X-kromosomet, slik at hanndyr kun har en utgave av genet. +/- indikerer henholdsvis intakt og knockout-versjon av *NOXI*-genet.

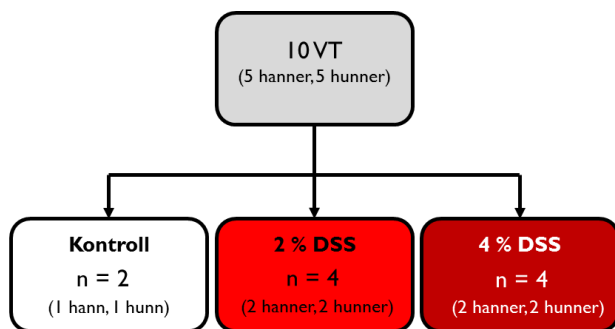
### 2.1.2 Etsiske aspekter

Dyreforsøkene ble godkjent av Mattilsynet, og følgende prosedyrer ble utført i overensstemmelse med retningslinjer for omsorg og bruk av laboratoriedyr fremsatt av EU-kommisjonen.

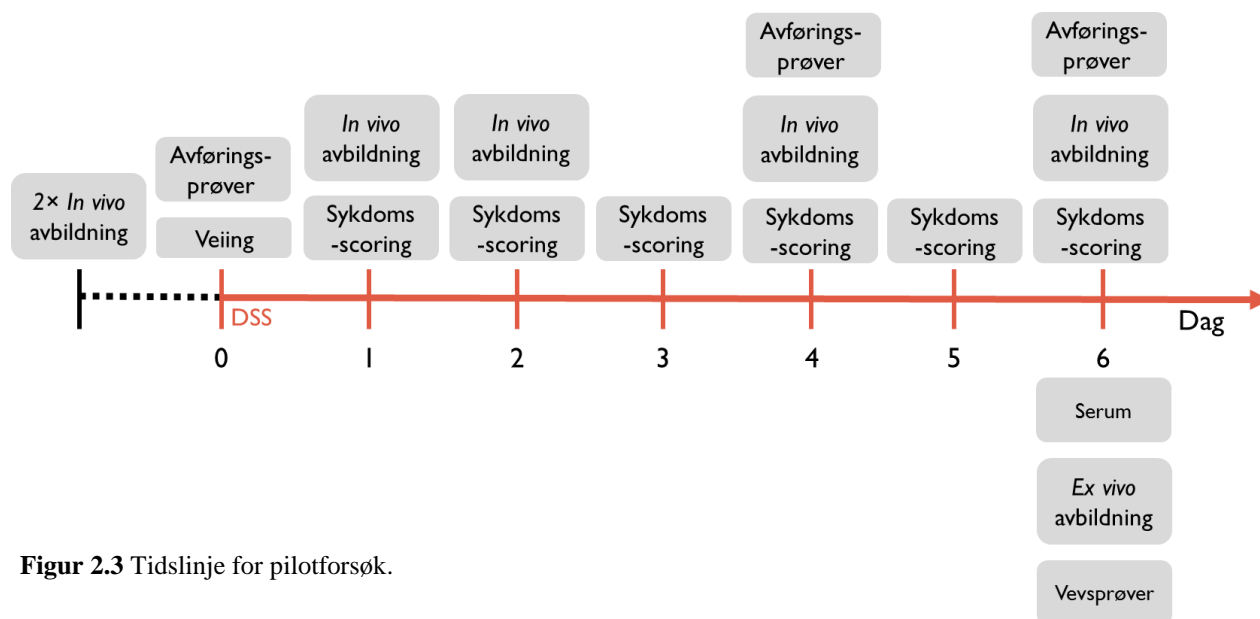
### 2.1.3 Pilotforsøk

De overordnede målene med pilotforsøket, var å teste om standard doser av DSS førte til forventede sykdomseffekter beskrevet i litteraturen og om ROS-signal fra tarmen kunne måles ved hjelp av L-012. 10 VT (5 hanner, 5 hunner), i alder 10 uker ved forsøkets start, ble brukt til dette formålet. To var kontrolldyr (ikke DSS), og resterende åtte ble delt i to grupper og gitt enten 2 eller 4 % DSS i drikkevannet i 6 dager (figur 2.2.). I forkant av forsøket ble to og to dyr plassert i rene bur og øremerket.

Underveis ble dyrene daglig evaluert for sykdomsgrad, og på dag 0, 4 og 6 ble det innhentet avføringsprøver. På termineringsdagen (dag 6) ble blodprøver til serum tatt fra leggvenen, men disse prøvene ble ikke analysert videre. *In vivo*-avbildning av ROS-mediert L-012-signal ble foretatt både i forkant av forsøket og underveis for å kunne sammenligne de samme dyrene før og etter intervensjon. På termineringsdagen ble L-012-signalet også målt direkte fra tarm (*ex vivo*-avbildning). Blodprøvetaking, *ex vivo*-avbildning og innhenting av vevsprøver på termineringsdagen, ble utført for dyr i DSS-gruppene, samt for to kontrolldyr. Tidslinje for pilotforsøket er gitt i figur 2.3.



Figur 2.2 Guppdesign for pilotforsøk.



Figur 2.3 Tidslinje for pilotforsøk.

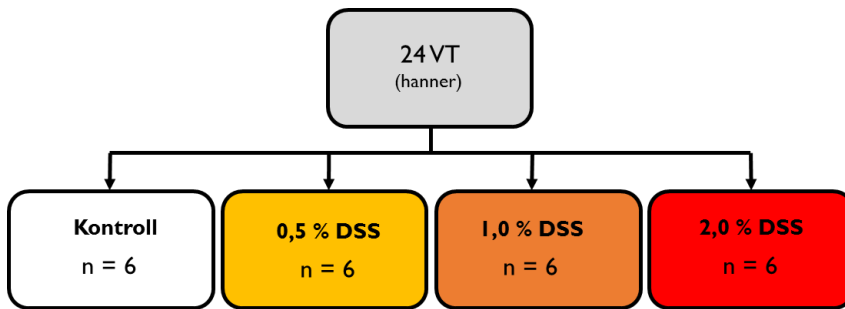
### 2.1.4 Etableringsforsøk

Formålet med etableringsforsøket var å finne optimal oral DSS-dose for induksjon av mild inflammasjon i tykktarm. Til dette ble det benyttet 24 VT (hanner). Dyrene ble delt i fire grupper (n=6) og gitt drikkevann med 0, 0,5, 1 eller 2 % DSS i 8 dager (figur 2.4).

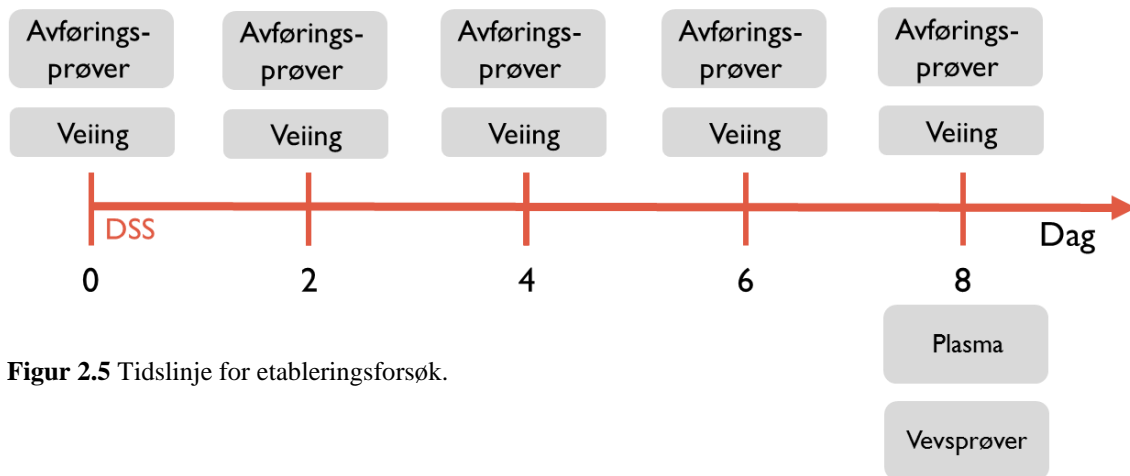
Gjennomsnittlig alder i hver gruppe var på henholdsvis 12, 10, 14 og 12 uker. I forkant av intervensjon ble 2-3 dyr plassert i rene bur og øremerket.

Annenhver dag ble dyrene veid og det ble samlet inn avføringsprøver. På termineringsdagen (dag 8) ble blodprøver til plasma tatt fra hjertet, etterfulgt av cervical dislokasjon. Etter terminering ble det innhentet vevsprøver, lengden til tykktarm ble målt og milt ble veid. Tidslinje for etableringsforsøk er gitt i figur 2.5.

## METODER



Figur 2.4 Grupperdesign for etableringsforsøk.



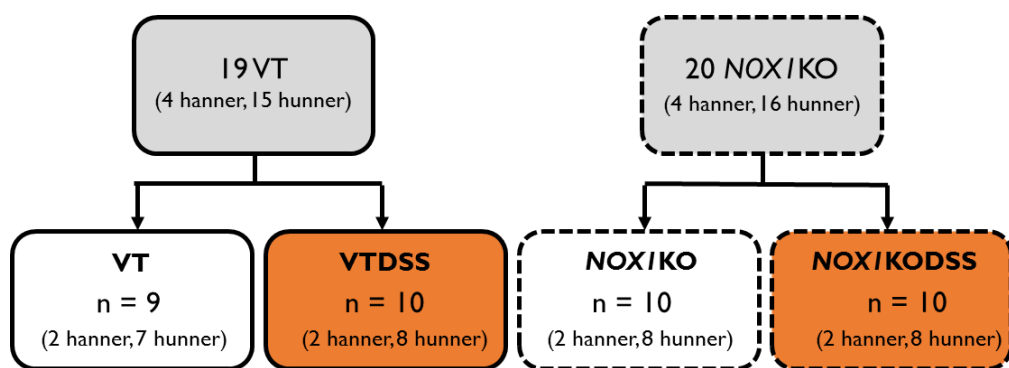
Figur 2.5 Tidslinje for etableringsforsøk.

### 2.1.5 NOX1 knockout (KO)-forsøk

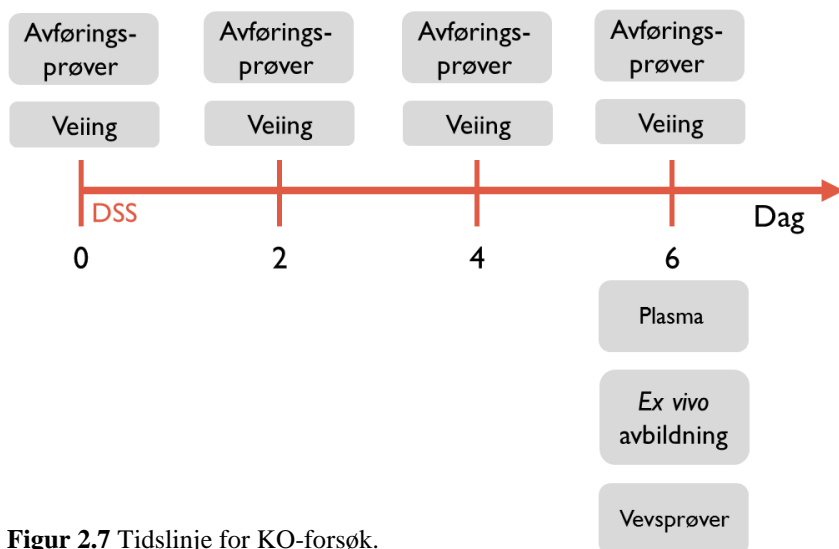
De overordnede målene med KO-forsøket, var å undersøke hvilken effekt fraværet av det ROS-genererende enzymet NOX1 har under mild inflammasjon i tykktarm, og om ROS signalet ble påvirket. Til dette ble det benyttet 19 VT (4 hanner, 15 hunner) og 20 NOX1KO (4 hanner, 16 hunner). Dyr av hver genotype ble delt i to grupper (n=9-10), som hver ble gitt drikkevann med 0 eller 1 % DSS i 6 dager (figur 2.6). Gjennomsnittlig alder for dyrene i gruppene var på henholdsvis 16, 15, 17 og 14 uker for VTDSS, NOX1KODSS, VT og NOX1KO. I forkant av intervensjon ble 2-3 dyr plassert i rene bur og øremerket.

Annenhver dag ble dyrene veid og det ble innsamlet avføringsprøver. På termineringsdagen (dag 6) ble blodprøver til plasma tatt fra hjertet, etterfulgt av cervikal dislokasjon. Etter terminering ble det utført *ex vivo*-avbildning av ROS og innhentet vevsprøver. Lengden til tykktarm ble målt og milt ble veid. Tidslinje for KO-forsøk er gitt i figur 2.7.

## METODER



Figur 2.6 Gruppedesign for KO-forsøk.



Figur 2.7 Tidslinje for KO-forsøk.

### 2.1.6 Administrering av DSS

Drikkevannsløsninger med DSS ble tillaget som gram DSS per gram vann (vektprosent). Ferske DSS-løsninger ble laget annenhver dag for å unngå vekst i flaskene, og av hensyn til stabiliteten til oppløst DSS ved romtemperatur (Chassaing et al., 2014). Dette ble gitt til dyrene i rene flasker. Flasker og vann til kontrolldyr ble skiftet tilsvarende. Vanninntak ble målt ved å veie flasker med innhold før og etter todagersperiodene.

## 2.2 EVALUERING AV SYKDOMSGRAD

Under pilotforsøket ble det administrert 2 og 4 % DSS i drikkevann. Ved disse dosene var det forventet at dyrene ville oppleve middels til sterke symptomer, lignende dem som opptrer ved kolitt. For å overvåke sykdomsgraden, ble kroppsvekt, avføringskvalitet, kroppsholdning og aktivitetsnivå evaluert daglig. Musene ble gitt en individuell score på de ovennevnte parameterne i henhold til kriterier gitt i tabell 2.1. Total sykdomsscore på 10 eller mer på en gitt dag, var avlivningsgrunn.

**Tabell 2.1** Scoringsskjema for evaluering av synlig sykdomsgrad i pilotforsøk.

Parameter	Score				
	0	1	3	5	10
Kroppsvekt, beregnet som initialvekt (dag 0) - dagens vekt	≤ 5 % vektneidgang	5-15 % vektneidgang		15-20 % vektneidgang	> 20 % vektneidgang
Avføringskvalitet	Normal	Løs konsistens og/eller spor av blod	Flytende konsistens og/eller tydelig mengde blod		
Aktivitetsnivå	Normal	Full bevegelse, men mer inaktiv enn normalt	Beveger seg iblant og reagerer lite ved berøring		
Kroppsholdning	Normal	Liten endring i normal positur	Tydelig sammenkrøket positur		

## 2.3 AVBILDNING AV REAKTIVE OKSYGENFORBINDELSER

*In vivo*-avbildning ble utført under pilotforsøket, ved bruk av avbildningsinstrumentet IVIS Lumina II, som kan detektere meget svak bioluminescens som genereres i musene. Som tidligere beskrevet er L-012 en ROS-spesifikk probe som reagerer med ulike typer ROS og emitterer lys (maks emisjon ved 460 nm) (Zielonka et al., 2013). L-012 (2,5 mg/mL) ble løst i 0,9 % NaCl. To og to dyr ble plassert i bedøvelseskammer tilført isofluran (2,5-3 %) og injisert med L-012 intraperitonealt (i.p.; ca. 10 mg/kg mus) etter at bedøvelse var inntruffet. Dyrene ble så overført til avbildningskammeret og avbildet 2,5-3 minutter etter injeksjon, med eksponeringstid på 5 minutter. I avbildningskammeret var dyrene immobilisert med isofluran tilkoblet kammeret. Lysintensiteten fra ventral side av musene ble analysert med programvaren Living Image, og uttrykt som fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian.

*Ex vivo*-avbildning av tarm ble utført på termineringsdagen av pilot- og KO-forsøk. Samme utstyr og programvare ble brukt som ved *in vivo*-avbildning, og lignede prosedyre ble fulgt. Ett og ett dyr ble bedøvet ved bruk av isofluran-kammer, for deretter å bli injisert i.p. med L-012 (ca. 20 mg/kg mus). 3 (pilotforsøk) eller 4 (KO-forsøk) minutter etter injeksjon, ble dyret avlivet ved cervikal dislokasjon. Tarm ble dissekert ut og avbildet (eksponering 5 minutter). For å beskytte tarmene fra temperaturen (37 °C) til gulvet i avbildningskammeret, ble de lagt på en isoporplate under avbildning.

### 2.3.1 *Ex vivo*-avbildning og RNA-integritet

På termineringsdagen av pilot- og KO-forsøk var det ønske om å gjennomføre *ex vivo*-avbildning av dyrenes tykktarm, samt innhenting av slimhinneprøver fra tykktarm for mRNA-målinger. Det ble derfor undersøkt om *ex vivo*-avbildningen ville føre til redusert RNA-integritet i innhentede vevsprøver. Hypotesen var at 5-6 minutters opphold i romtemperatur uten noen form for RNA-stabiliserende middel, kunne føre til degradering av RNA.

*Ex vivo*-avbildning, innhenting av slimhinneprøver, RNA-ekstraksjon og integritetstesting ble gjort som beskrevet annet sted. Det ble ikke observert noen signifikant forskjell i integritet før og etter avbildning ( $p=0,19$ , tosidig, parvis Students t-test,  $n=6$ ). Dette viste at det var uproblematisk å innhente vevsprøver for mRNA-målinger etter *ex vivo*-avbildning.

## 2.4 INNHENTING AV PRØVER

### 2.4.1 Avføring

I pilot-, etablerings- og KO-forsøk ble det innhentet avføringsprøver. Under pilotforsøket ble dette gjort hver dag, mens annenhver dag for de to andre. Etter veiing, ble ett og ett dyr plassert i tomme beholdere, og avføring ble samlet inn ved bruk av en ren pinsett og overført til Eppendorf-rør. Prøver ble oppbevart ved -80 °C frem til videre analyse (Lipocalin-2 ELISA).

### 2.4.2 Blod

På termineringsdagen av KO-forsøket, ble det utført blodprøvetaking ved hjertepunktur. For å samtidig muliggjøre *ex vivo*-avbildning, ble følgende prosedyre fulgt: Dyrene ble fastet i fire timer da det er kjent at LPS-nivåer i blodet påvirkes av matinntak. Ett og ett dyr ble injisert i.p. med ZRF-cocktail (ca. 10 µL/g mus). ZRF-cocktail (Zoletil Forte, Rompun, Fentadon) består av virkestoffer som til sammen virker både bedøvende og smertestillende (tabell B.4, bilag B). Bedøvede dyr ble barbert på det abdominale området og injisert i.p. med L-012. Ett minutt etter L-012-injeksjon ble ca. 500 µL blod tappet fra hjertet ved hjertepunktur og overført til Eppendorf-rør som umiddelbart ble lagt på is. Vi ventet ett minutt fra L-012-injeksjon til hjertepunktur for å gi L-012 tid til å spre seg i kroppen før blodsirkulasjonen ble stoppet. Dinatrium EDTA (0,05 M, 0,2 µm filtrert) ble brukt som antikoagulant. Blodprøvene ble sentrifugert i 10 minutter (6000 g, 4 °C), og plasma ble pipettert ut. Plasma ble deretter overført til nye Eppendorf-rør og oppbevart ved -20 °C til videre analyse (LBP ELISA). Etter hjertepunktur (4 minutter etter L-012 injeksjon), ble det utført cervikal dislokasjon, og *ex vivo*-avbildning av tarm ble gjort som tidligere beskrevet.

På termineringsdagen av etableringsforsøket, ble det også utført hjertepunktur, men ikke *ex vivo*-avbildning. Prosedyren over ble fulgt, med unntak av barbering og L-012 injeksjon.



## METODER

### 2.4.3 Vev

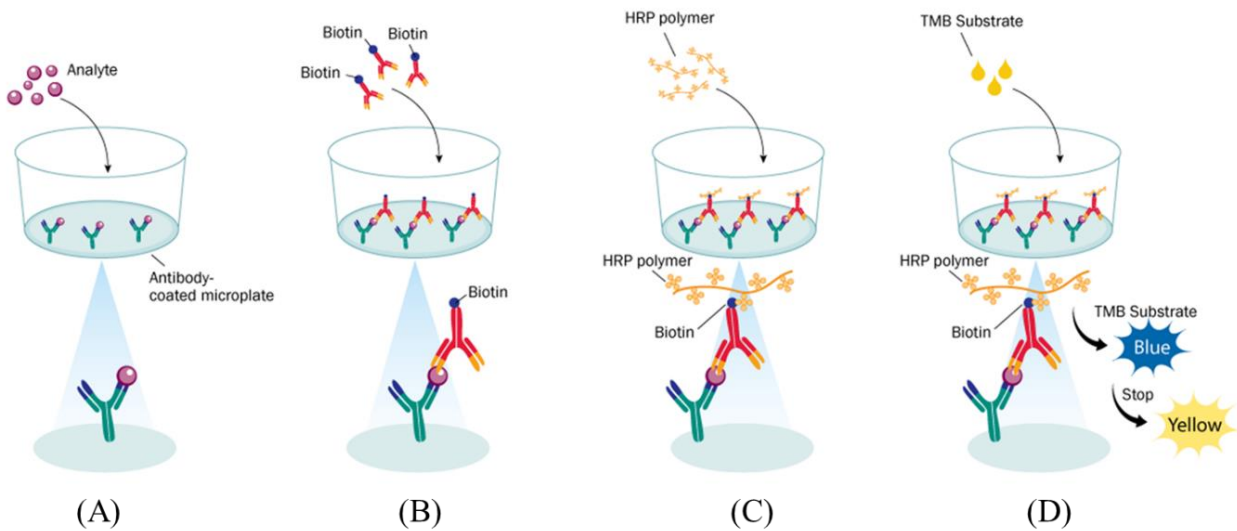
Etter terminering av forsøkene ble det innhentet flere typer vevsprøver, men kun slimhinneprøver fra tykktarm ble videre opparbeidet og analysert som del av denne oppgaven.

Etter cervikal dislokasjon, ble dyrenes abdominale område vasket med etanol. Dette var for å unngå forurensning av hudbakterier i prøvene. Dyrene ble åpnet, og tarm ble dissekert ut og skylt i PBS. Ved etablerings- og KO-forsøket, ble lengden til tykktarm målt og milten veid. I pilot- og KO-forsøket ble det deretter utført *ex vivo*-avbildning, før videre prosedyre ble fulgt. Tykktarm (blindtarm ekskludert) ble åpnet ved å lage longitudinalt snitt fra proksimal og/eller distal ende. I pilot- og etableringsforsøk ble det kun tatt slimhinneprøver fra proksimal tykktarm, mens det i KO-forsøket ble tatt fra både proksimal og distal del. Prøvene ble tatt ved å skrape med et avflatet objektglass, og ble umiddelbart preservert i Eppendorf-rør med RNAlater (ca. 100 µL/10 mg vev) og oppbevart ved 4 °C i ca. 24 timer. Dette var for å sikre at RNAlater trakk tilstrekkelig inn i vevet, hvis funksjon er å opprettholde RNA-integriteten under oppbevaring og homogenisering ved RNA-ekstraksjon. Etter 24 timer ble prøvene oppbevart ved -20 °C frem til RNA-ekstraksjon.

### 2.5 LCN-2 ELISA

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) er en sensitiv metode for kvantifisering av et spesifikt protein (analytt) i en prøve. Det finnes flere typer ELISA (direkte, indirekte, sandwich og kompetitiv), men det grunnleggende prinsippet er det samme (Aydin, 2015). Man utnytter de spesifikke bindingsegenskapene til antistoffer og detekterer mengden bundet protein ved bruk av enzymer som katalyserer en signalgenererende reaksjon (for eksempel en fargereaksjon). Prinsippskisse og beskrivelse av sandwich ELISA, som ble brukt til å måle nivåer av proteinet Lcn-2 i avføringsprøver, er gitt i figur 2.8. Lcn-2-nivåer ble målt fordi proteinet ansees som en svært sensitiv og dynamisk markør for DSS-indusert inflammasjon i tykktarm (Chassaing et al., 2012). Til analysen ble Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA og DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 brukt. Grunnet tidsbegrensninger, ble det besluttet kun å utføre fullstendig analyse av avføringsprøver innhentet på dag 6 av KO-forsøk.

## METODER



**Figur 2.8** Prinsippskisse for sandwich ELISA (R&D Systems, u. å.).

I forkant av (A) blir brønnen tilsatt Capture Antibody og blokkeringsløsning, hvor sistnevnte ikke er illustrert.

**(A)** Prøve/standard tilsettes, og analytten binder seg til Capture Antibody (CA) som er festet i brønnen. Brønnen vaskes deretter for å fjerne analytt som ikke har bundet seg til CA.

**(B)** Detection Antibody (DA) tilsettes og binder seg til analytten. Proteinene biotin er bundet til DA. Overskudd av DA-biotin vaskes bort før neste steg.

**(C)** Streptavidin-HRP polymer tilsettes. Streptavidin bindes sterkt til biotin, mens HRP (*horseradish peroxidase*) er et enzym som står for fargeendringen i neste steg.

**(D)** Tetrametylbenzidin (TMB) Substrate Solution tilsettes, og oksideres av HRP. Oksidasjonen av TMB fører til utvikling av blå farge, hvor intensiteten gjenspeiler mengden analytt som var til stede i den tilsatte prøven. Etter en gitt tid tilsettes Stop Solution, som stopper reaksjonen. Til slutt avleses absorbansen (den optiske tettheten) ved 450 nm.

### Opparbeiding av prøver

Avføringsprøver ble opparbeidet i henhold til metode beskrevet av andre (Chassaing et al., 2012). Avføring ble veid og overført til Eppendorf-rør med 1× PBS med 0,1 % Tween 20 (volumprosent) (100 mg avføring/mL). Prøvene ble homogenisert ved risting i 20 minutter og deretter sentrifugert i 10 minutter (13 523 g, 4 °C). Supernatant ble overført til nye Eppendorf-rør.

### Fortynning av prøver

Lcn-2-standard som fulgte med kittet, ble opparbeidet i konsentrasjoner fra 7,81 til 500 pg/mL (7 fortynninger), fortynnet i Reagent Diluent. Det var derfor nødvendig å fortynne

## METODER

supernatantene slik at konsentrasjoner av Lcn-2 falt innenfor dette området. For å bestemme passende fortytning ble det tatt utgangspunkt i lignende forsøk beskrevet tidligere (Chassaing et al., 2012), som viste at ulike DSS-doser (kontroll, 1 % og 4 % DSS) krever ulike fortytninger. Det ble det testet flere ulike fortytninger av prøver innhentet på dag 6 av pilot- (4 % DSS) og etableringsforsøket (kontroll og 1 % DSS). Prøve fra 4 % DSS-gruppen ble inkludert for å ha en positiv kontroll ved alle etterfølgende analyser. For kontrollprøver var 20-gangers fortytning tilstrekkelig, mens for gruppen som hadde fått 4 % DSS, var 20 000-gangers fortytning nødvendig. Prøver fra 1 % DSS-gruppen viste større variasjon, slik at ikke alle prøver kunne ha lik fortytning for å oppnå Lcn-2-konsentrasjoner som falt innenfor standardkurven. Disse prøvene måtte fortynnes mellom 200 og 2000 ganger. Prøver ble fortynnet med 1× PBS med 0,1 % Tween 20.

### **ELISA-prosedyre**

Preparering av reagenser og ELISA ble utført som anbefalt av leverandøren av Lcn-2-kittet. 96-brønns mikrolater ble dekket med fortynt Capture Antibody, 100 µL i hver brønn. Plater ble forseglet og inkubert over natten (minimum 16 timer) ved romtemperatur. Brønner ble tømt, og vasket med Wash Buffer tre ganger. Dette ble gjort ved å fylle hver brønn med vaskebuffer (300 µL), tømme ut innholdet, og blotte platen mot rent papir. Brønner ble så blokkert ved å tilsette 300 µL Reagent Diluent og inkubere 1 time ved romtemperatur. Reagent Diluent inneholder bovin serum albumin (BSA), som binder seg i brønnen der Capture Antibody ikke har bundet seg. Dette er for å hindre uspesifikk binding av proteiner til brønnens innside (dvs. til andre steder enn Capture Antibody), og på den måten redusere bakgrunnsstøy ved målingen av optisk tetthet ved slutten av prosedyren. Vaskeprosedyre ble utført. 100 µL av prøver, standarder og kontroller ble tilsatt brønner i duplikater. Plater ble forseglet, inkubert 2 timer ved romtemperatur, og vaskeprosedyre ble utført. 100 µL Detection Antibody ble tilsatt hver brønn. Plater ble forseglet, inkubert 2 timer ved romtemperatur, og vaskeprosedyre ble utført. 100 µL Streptavidin-HRP ble tilsatt hver brønn. Plater ble dekket med aluminiumsfolie, inkubert 20 minutter ved romtemperatur, og vaskeprosedyre ble utført. 100 µL Substrate Solution ble tilsatt hver brønn. Plater ble dekket med aluminiumsfolie og inkubert 20 minutter ved romtemperatur. 50 µL Stop Solution ble tilsatt hver brønn, og plater ble dunket forsiktig for å sørge for tilstrekkelig miksing. Den optiske tettheten i hver brønn ble umiddelbart bestemt ved bruk av Sunrise absorbanleser, satt til 450 nm. Bølgelengdekorreksjon ble satt til 620 nm (kit-instruksjoner anbefalte 540

## METODER

eller 570 nm, men dette var ikke tilgjengelig for vår programvare). Avlesninger ved 620 nm ble subtrahert fra avlesninger ved 450 nm for å korrigere for optiske feil i platen.

For hver plate, ble følgende kontroller inkludert:

- Negativ kontroll (brønner uten Capture Antibody, hvor reelle prøver ble tilsatt).
- Positiv kontroll (prøve fra 4 % DSS-gruppe).
- 1× PBS med 1 % Tween 20 (bakgrunn for prøver).
- Reagent Diluent (bakgrunn for standarder).

### Dataanalyse

Bakgrunnssignal ble subtrahert fra prøvesignaler. For å evaluere prøvefortynninger, ble signal fra standardprøver brukt til å konstruere standardkurve ved lineær regresjon (figur D.1, bilag D). Linearisering av data ble gjort ved logaritmisk transformasjon av optisk tetthet og teoretiske Lcn-2-konsentrasjoner, etter anbefaling i kit-instruksjon. Det ble laget en standardkurve for hver kjøring. For beregning av endelige konsentrasjoner av Lcn-2 i supernatanter, ble standardkurve konstruert ved bruk av 4-parameter logistisk (4-PL) kurvetilpassing (figur D.2, bilag D), med programvaren Magellan. R-kvadrat ( $R^2$ ) var større enn 0,99 for alle 4-PL-kurver. Konsentrasjoner av Lcn-2 i avføring (ng/g) ble deretter estimert ved å multiplisere med fortynningsfaktor og dividere med innveid mengde avføring som prøven var opparbeidet fra.

## 2.6 LBP ELISA

Målinger av lipopolysakkarid bindende protein (LBP) i blod brukes som et indirekte mål på LPS-nivåer (Umoh et al., 2016). LPS er en viktig bestanddel i cellemembranen til Gram-negative bakterier, som det finnes mange av i tarmen. Når bakterien dør og brytes ned, vil LPS frigjøres og fungere som et endotoksin (giftstoff) på verten. LPS er et endotoksin, og ikke et eksotoksin, siden bakterien ikke aktivt skiller ut LPS. Dersom tarmbarrieren er svekket, kan LPS lettere passere gjennom epitelet, og gå inn i sirkulasjon. Tilstedeværelsen av LPS vil gi økte nivåer av LBP i blodet, som binder seg til LPS. På den måten kan LBP-nivå i blodet fungere som mål på svekket tarmbarriere. LBP ELISA ble utført på plasmaprøver ved bruk av Mouse LBP Quantification ELISA kit. Dette kittet er også et sandwich ELISA, men her er peroksidase som oksiderer TMB bundet til

## METODER

deteksjonsantistoffet. Grunnet tidsbegrensninger ble det kun utført analyse av plasma innhentet på dag 6 av KO-forsøket.

Preparering av reagenser og ELISA ble utført som anbefalt av leverandøren av LBP-kittet. Plasmaprøver ble fortynnet 800 ganger med Dilution Buffer. 100 µL av prøver, kontroller og standarder (LBP-konsentrasjoner fra 50-1,56 ng/mL, 6 fortynninger), ble overført til 96-brønns plate i duplikater. Platen ble forseglet og inkubert 1 time ved romtemperatur med risting (horisontal bevegelse, 300 rpm). Brønner ble tømt og vasket med Wash Buffer tre ganger, som beskrevet for Lcn-2 ELISA. 100 µL Detection Antibody ble tilsatt hver brønn. Platen ble forseglet, inkubert 1 time med risting ved romtemperatur, og vaskeprosedyre ble utført. 100 µL Substrate ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med aluminiumsfolie og inkubert 12-14 minutter ved romtemperatur. 100 µL Stopping Solution ble tilsatt hver brønn, og platen ble dunket forsiktig for å sørge for tilstrekkelig miksing. Den optiske tettheten ble umiddelbart bestemt ved bruk av Sunrise absorbansleser, som beskrevet for Lcn-2 ELISA.

Absorbansdata ble analysert som beskrevet i for Lcn-2 ELISA. R-kvadrat ( $R^2$ ) var større enn 0,99 for 4-PL-kurven. LBP-konsentrasjoner i plasma (ng/mL) ble estimert ved å multiplisere med fortynningsfaktor.

Følgende kontroller ble inkludert:

- Positiv kontroll (Referanseserum)
- Dilution Buffer (bakgrunn for prøver og standarder)

## 2.7 ANALYSE AV GENEKSPRESJON

Ved analyse av genespresjon måler man mengden mRNA produsert fra spesifikke gener. I dette prosjektet var vi interessert i inflammasjons- og ROS-relaterte gener. Analyseprosessen innebærer følgende trinn:

- Ekstraksjon av RNA fra vevsprøver.
- Analyse av RNA-konsentrasjoner, renhetsgrad og -integritet.
- Renseprosedyre dersom det er inhibitorer av RT-qPCR reaksjoner til stede i prøvene.
- Kvantifisering av mRNA ved RT-qPCR:
  - Dannelse av cDNA fra mRNA ved revers transkriptase (RT).
  - Optimalisering av primere.
  - Kvantitativ bestemmelse av cDNA (qPCR).

### 2.7.1 RNA-ekstraksjon

Ekstraksjon av RNA og protein fra slimhinneprøver fra tykktarm ble utført ved bruk av NucleoSpin RNA/Protein Purification kit i henhold til anbefalt metode (Machery-Nagel, 2014). Det ble gjort enkelte modifikasjoner av sentrifugebetingelser. Da kun ekstrahert RNA ble analysert videre, er ikke protein-ekstraksjon omtalt.

Vevsbiter ble veid, og maksimum 30 mg vev ble overført til 350 µL RP1-buffer blandet med 3,5 µL β-merkaptoetanol. RP1-buffer inneholder guanidintiocyanat, som gir nedbrytning av cellemembran og inaktivering av enzymer som degraderer RNA og proteiner. β-merkaptoetanol er et reduksjonsmiddel som bryter di-sulfidbindinger i proteiner.

Homogenisering ble gjort ved bruk av 25-gauge nål med 1 mL sprøyte. For å redusere viskositeten til homogeniserte prøver, ble de overført til NucleoSpin-filter, og sentrifugert (2 min, 11 000 g). Etter sentrifugering ble filtre fjernet, og 350 µL etanol (70 %) ble tilsatt. Cellelysat og etanol ble kraftig blandet for å justere bindingsegenskapene til RNA.

Prøver ble overført til NucleoSpin RNA/Protein Column og sentrifugert (3 min, 13 000 g). Formålet med kolonnen er å binde RNA og DNA til silica-membranen, mens proteiner passerer gjennom. Videre ble DNA i kolonnen degradert med rekombinant DNase (rDNase). For å øke effektiviteten til rDNase, ble det i forkant tilsatt 350 µL MDB (*membrane desalting buffer*) til kolonnene, som deretter ble sentrifugert (3 min, 13 000 g). Etter direkte overføring av 90 µL rDNase-reaksjonsblanding til membraner, ble kolonner inkubert 20 minutter ved romtemperatur.

For å inaktivere rDNase, ble kolonnene tilsatt 200 µL RA2, og sentrifugert (2 min, 11 000 g). Rester av RA2 i membraner ble fjernet ved å vaske to ganger med RA3. Først med 600 µL og samme sentrifugebetingelser som RA2. Deretter med 250 µL og sentrifugering i 3 minutter med 11 000 g.

Avslutningsvis ble RNA eluert fra silica-membraner ved å tilsette 50 µL RNase-fritt vann og sentrifugere i 2 minutter (11 000 g, 4 °C). Ekstrahert RNA ble oppbevart på is for analyse på Nano-Drop spektrofotometer, og ble deretter lagret ved -80 °C frem til videre opparbeiding (DSS-rensning).

### 2.7.2 Analyse av RNA-konsentrasjon og renhetsgrad

For å bestemme RNA-konsentrasjoner og renhetsgrad av ekstrahert RNA, ble det brukt Nano-Drop spektrofotometer. RNase-fritt vann ble brukt som blankprøve. RNA-konsentrasjoner ble bestemt ved å måle absorbans ved 260 nm, der nukleinsyrer har maksimal absorpsjon (Matlock, 2015). Renhet av RNA ble bestemt ved også å måle absorbans ved 280 og 230 nm, og se på ratioen i absorbans mellom 260/280 og 260/230. Proteiner har maksimal absorbans ved 280 nm. Lav A 260/280 ratio indikerer derfor forekomst av proteiner i prøvene. A 260/280 på ca. 2 aksepteres generelt som rent RNA (Matlock, 2015). For våre analyser ble forholdstall på  $2 \pm 0,2$  akseptert som rent i henhold til anbefaling gitt i kit-instruksjon for RNA-ekstraksjon. A 260/230 gir indikasjon på andre typer forurensninger. Ved kolonnebasert RNA-ekstraksjon er overskudd av guanidin en typisk forurensning. I vårt tilfelle kunne i tillegg karbohydratbidrag fra DSS utgjøre et problem i etterfølgende cDNA-syntese og qPCR-reaksjon (Viennois et al., 2013). Dette ble håndtert ved DSS-rensing av RNA-prøver, omtalt i delkapittel 2.7.4.

### 2.7.3 Analyse av RNA-integritet

Ved genekspressjonsanalyser er det standard prosedyre å analysere integriteten til ekstrahert RNA. Dette er for å sjekke at lagring av prøver og/eller ekstraksjonsprosedyren ikke har ført til degradering. Dersom RNA har blitt brutt ned, vil ikke den kvantitative analysen gjenspeile de faktiske mRNA-nivåene for det gitte genet. RNA-integritet ble evaluert ved bruk av kapillærelektroforese på Agilent 2100 Bioanalyser, med Agilent RNA 6000 Nano Kit. Basert på resultater fra kapillærelektroforesen, kalkulerer programvaren 2100 Expert et *RNA integrity number* (RIN) for hver prøve. RIN er et tall mellom 1 og 10, hvor 1 er den mest degraderte profilen og 10 er den mest intakte.  $RIN \geq 8$  ble akseptert som intakt RNA.

### 2.7.4 Opprensing av RNA med LiCl

Det har tidligere blitt vist at DSS kan inhibere rever transkripsjon og PCR (Kerr et al., 2012; Viennois et al., 2013). Vi testet derfor om dette var tilfelle for våre RNA-prøver (se delkapittel 2.7.6), og fant betydelig inhibering ved qPCR. Vi bestemte derfor at ekstrahert RNA fra alle forsøk med DSS-administrering skulle renses for polysakkarider (inkludert DSS) i forkant av RT-qPCR. Dette ble gjort ved bruk av litiumklorid (LiCl)-metode, som beskrevet av andre (Viennois et al., 2013).

## METODER

Prøver ble inkubert med 0,1 volum av 8 M LiCl fortynnet i RNase-fritt vann på is i 2 timer. Etter inkubasjon, ble prøvene sentrifugert (30 min, 14 000 g, 4 °C). Supernatant ble forkastet, og RNA-pelleter (ikke synlige) ble løst i 200 µL RNase-fritt vann. Dette ble gjentatt en gang. Prøver ble så tilsatt 0,1 volum 3 M natriumacetat (pH=5,2) og 2 volum etanol (100 %), og inkubert i (30 min, -20 °C). Etter inkubasjon ble prøver sentrifugert (30 min, 14 000 g, 4 °C). Supernatant ble forkastet, og RNA-pelleter (synlige i enkelte prøver) ble vasket med 100 µL etanol (70 %). Prøver ble sentrifugert (10 min, 14 000 g, 4 °C), supernatant ble forkastet, og RNA-pelleter ble løst i 15-20 µL RNase-fritt vann. Avslutningsvis ble RNA-konsentrasjon og renhetsgrad av DSS-rensede prøver målt ved bruk av Nano-Drop spektrofotometer, som tidligere beskrevet.

### 2.7.5 Kvantifisering av mRNA ved RT-qPCR

For å undersøke den inflammatoriske effekten av DSS i tykktarm, ble mRNA-ekspresjon av de kjente, inflammasjonsrelaterte genene prostaglandin-endoperoksid syntase 2 (*Ptgs2*; også kjent som *COX2*), tumornekrosefaktor  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ), interleukin 6 (*IL-6*), interleukin 1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ) og Lipocalin-2 (*Lcn-2*) analysert. I tillegg ble ekspresjon av de ROS-relaterte genene NADPH oksidase 1 (*NOX1*), NADPH oksidase 2 (*NOX2*), dual oksidase 2 (*DUOX2*) og induserbar nitrogenoksid syntase (*iNOS*) analysert.

#### **cDNA-syntese ved revers transkripsjon**

cDNA-syntese fra mRNA, ble utført ved bruk av iScript cDNA Synthesis Kit i henhold til kit-instruksjoner. Prinsippene bak cDNA-syntese er som følger: enzymet revers transkriptase (RT) blandes med RNA-templat, primere og dNTP'er. RT binder seg til RNA ved hjelp av primerne, og danner en DNA-tråd som er komplementær med RNA (cDNA). På denne måten får man dannet en RNA-cDNA hybrid. Deretter blir RNA nedgradert av RNase H, slik at kun enkelttrådet cDNA blir igjen. cDNA kan videre amplifiseres og kvantifiseres ved qPCR.

Oversikt over ulike komponenter og volum i reaksjonsblandingene er gitt i tabell 2.2. RNA og reagenser ble tint og oppbevart på is eller kjøleblokk (-20 °C) under prosedyren. Temperatursykluser for cDNA-syntesen er gitt i tabell 2.3, og ble kjørt på PTC-200 Thermal Cycler. For hver kjøring ble det inkludert én NAC-prøve (*no amplification control*). NAC ble opparbeidet som andre prøver, men uten enzym, og med RNA fra tilfeldige prøver. Syntetisert cDNA fortynnet (8 ng/µL) og oppbevart ved -20 °C frem til analyse ved qPCR.



## METODER

**Tabell 2.2** Reaksjonsblanding for cDNA-syntese (per reaksjon).

Komponent	Volum ( $\mu\text{L}$ )
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nukleasefritt vann	Varierende (0-11) *
RNA-templat	Varierende (4-15) *
<i>TOTAL</i>	20 $\mu\text{L}$

\* RNA-templat og nukleasefritt vann ble tilsatt i varierende volum for å oppnå RNA-konsentrasjon på ca. 40 ng/ $\mu\text{L}$  i reaksjonsblandingene.

**Tabell 2.3** Temperatursykluser ved cDNA-syntese.

Steg	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )	Varighet (min)
Annealing	25	5
Revers transkripsjon	46	20
Terminering	95	1
Hold	4	$+\infty$

### Optimalisering av primere

Optimal hybridiseringstemperatur (*annealing*) for ulike primerpar ble funnet ved bruk av PCR og gel-elektroforese. PCR ble utført ved bruk av 5X Hot FirePol Blend Master MIX Ready to Load. Oversikt over ulike komponenter og volum i reaksjonsblandingene er gitt i tabell 2.4. Temperatursykluser for PCR-reaksjon kjørt på C1000 Thermal Cycler, er gitt i tabell 2.5. For hvert primerpar ble åtte ulike temperaturer i intervallet 55-65  $^{\circ}\text{C}$  testet. Temperaturer for øvrige trinn i PCR-reaksjonen ble holdt konstant.

Amplifiseringsgrad for ulike temperaturer ble deretter analysert ved gel-elektroforese. Det ble brukt 2 % agarose-gel tilsatt GelRed (5  $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ ). Hver brønn ble tilsatt 5  $\mu\text{L}$  amplifisert prøve eller DNA Ladder Ready to Load. Gel ble kjørt i 30 minutter med spenning på 80 volt. Gel-bilder ble tatt ved bruk av Gel Doc EZ Imager. Temperaturer som gav bånd med høy intensitet, ble videre analysert ved qPCR for å verifisere høy primereffektivitet ved ulike templatkonsentrasjoner. qPCR ble utført som beskrevet annet sted. Oversikt over primerpar og optimale hybridiseringstemperaturer er gitt i tabell C.1 i bilag C.

## METODER

**Tabell 2.4** Reaksjonsblanding for PCR ved primeroptimalisering (per reaksjon).

Komponent	Volum ( $\mu\text{L}$ )
5x HOT FIREPol Blend Master Mix RTL	2
*Primer forward (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3
*Primer revers (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,3
cDNA-templat (8 ng/ $\mu\text{L}$ )	3
H <sub>2</sub> O, PCR grade	4,4
<i>TOTAL</i>	<i>10 <math>\mu\text{L}</math></i>

\* Se tabell C.1 i bilag C for primersekvenser.

**Tabell 2.5** Temperatursykluser ved PCR for primeroptimalisering.

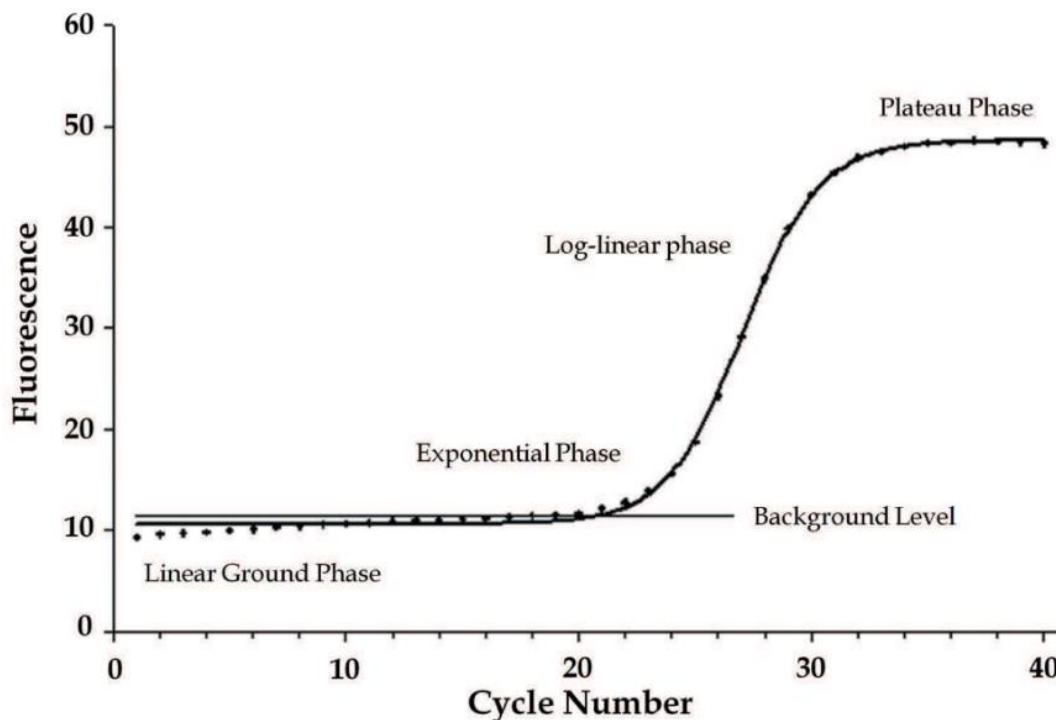
Steg	Varighet	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )
Aktivering av DNA-polymerase	13 min	95
Denaturering	15 sek	95
Annealing	Repetert 35x	[55-65] *
Elongering		72
Avsluttende elongering	5 min	72

\* Hvert primerpar ble kjørt med åtte ulike hybridiseringstemperaturer innenfor det gitte temperaturintervallet.

### Kvantitativ PCR (qPCR)

qPCR er en metode for å kvantifisere mengden cDNA som finnes i en gitt prøve. Metoden gir også kvalitativ informasjon, i likhet med tradisjonell PCR. Det grunnleggende prinsippet bak qPCR er som følger: man lager en reaksjonsblanding bestående av cDNA, primerpar som bindes spesifikt til flankene av cDNA-sekvensen man vil kvantifisere (målgenet), DNA polymerase, dNTP'er og fluorescens-genererende fargestoff (her EvaGreen). EvaGreen sender ut fluorescerende stråling i seg selv, men signalet forsterkes betraktelig ved binding til dobbeltrådet DNA. Ved å la reaksjonsblandingen gjennomgå flere sykluser av et gitt temperaturprogram, vil DNA-polymerase amplifisere cDNA i prøven ved hjelp av primerne (som ved tradisjonell PCR). For hver syklus vil mengden DNA i prøven øke, og da også det fluorescerende signalet. Utviklingen av fluorescenssignalet kan deles i fire faser: (1) lineær fase, (2) eksponentiell fase, (3) log-lineær fase og (4) platåfase (figur 2.9). Først når signalet når den eksponentielle fasen, kan signalet detekteres som noe annet enn et bakgrunnssignal. Antall sykluser som skal til for å nå denne «kvantifiseringsterskelen» kalles C<sub>q</sub>-verdien (*cycle quantification*). Prøver med lav C<sub>q</sub>-verdi inneholdt på den måten mer cDNA i utgangspunktet, enn prøver med høy C<sub>q</sub>-verdi. Det er denne kvantifiseringen av cDNA-mengden underveis i reaksjonen (*real time*) som skiller qPCR fra tradisjonell PCR.

## METODER



**Figur 2.9** Utvikling av fluorescenssignal ved qPCR går gjennom fire faser: lineær, eksponentiell, log-lineær og platåfase (Yilmaz et al., 2012).

Kvantitativ analyse av amplicon (PCR-produkt) ble utført ved bruk av 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix. Oversikt over ulike komponenter og volum i reaksjonsblandinger er gitt i tabell 2.6, og temperatursykluser er gitt i tabell 2.7. For å hindre forurensing av prøver, ble alle reaksjonsblandinger opparbeidet i rene omgivelser (dedikert PCR-rom). cDNA og reagenser ble tint og oppbevart på is eller kjøleblokk (-20°C) under prosedyren.

For hvert primerpar ble det inkludert én NAC- (fra cDNA-syntese) og én NTC-prøve (*no template control*). Alle prøver, utenom NAC og NTC, ble analysert i duplikater. qPCR ble utført på LightCycler 480 Instrument II.

Etter temperaturprogram for amplifisering (for kvantitativ analyse), ble det inkludert et smeltekurve-program. Dette var for å evaluere om korrekt DNA-sekvens var blitt amplifisert (kvalitativ analyse). For eksempel vil to smeltetopper i en prøve indikere at enten cDNA har blitt degradert eller at det var genomisk DNA (gDNA) til stede i prøven. Siden alle de brukte primerne spenner over ekson-ekson-sammenføyninger, ble sistnevnte ikke sett på som noe potensielt problem.

## METODER

**Tabell 2.6** Reaksjonsblanding for qPCR (per reaksjon).

Komponent	Volum ( $\mu\text{L}$ )
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR supermix	2
*Primer forward (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,2
*Primer revers (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0,2
DNA-templat (8 ng/ $\mu\text{L}$ )	3
H <sub>2</sub> O, PCR grade	4,6
<i>TOTAL</i>	<i>10 <math>\mu\text{L}</math></i>

\* Se tabell C.1 i bilag C for primersekvenser.

**Tabell 2.7** Temperatursykluser ved qPCR.

Steg	Varighet	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )
Aktivering av DNA-polymerase	15 min	95
Denaturering	15 sek	95
Annealing	20 sek	<i>Variabel*</i>
Elongering	20 sek	72
Smeltekurve	1 min	95
	1 min	45
	25 min	60-90 (+ 0,02/sek)

\* Se tabell C.1 i bilag C for optimal hybridiseringstemperatur for hvert primerpar.

### Dataanalyse

Cq-verdi for hver prøvebrønn ble beregnet fra fluorescensdata, ved bruk av programvaren LinRegPCR. LinRegPCR ble også brukt til å estimere effektiviteten til hvert primerpar, i henhold til metode beskrevet i litteraturen (Ramakers et al., 2003). Med primereffektivitet menes graden av amplifisering per syklus i den eksponentielle amplifiseringsfasen.

Effektivitet på 2 vil si at hver syklus gir en dobling av mengden DNA. I teorien er dette være den høyeste effektiviteten man kan oppnå, og omtales derfor ofte som 100 % primereffektivitet.

Data fra qPCR ble kvantifisert ved relativ kvantifisering, der man bestemmer endringer i «*steady-state*» mRNA-nivåer. Det vil si at man ikke bestemmer mRNA-konsentrasjonen i en gitt prøve (som ved absolutt kvantifisering), men ekspresjonsnivået til målgenet relativt til et referansegene som uttrykkes i like stor grad uavhengig av behandlingen dyrene i utgangspunktet ble utsatt for. Ved denne typen kvantifisering er primereffektivitet en viktig faktor, som bør korrigeres for ved normaliseringen (Yilmaz et al., 2012).

## METODER

For våre analyser ble husholdningsgenet glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (*GAPDH*) brukt som referansegen. Normaliseringen ble gjort ved bruk av ligning 1, hvor det ble korrigert for ulik primereffektivitet for mål- og referansegen, etter anbefalt metode (Yilmaz et al., 2012). Normaliseringen ble gjort for hvert individ, og ikke på gruppegjennomsnitt. De to Cq-verdiene i ligningen er fra samme opprinnelige prøve (individ), men fra reaksjon med ulike primerpar for mål- og referansegen.

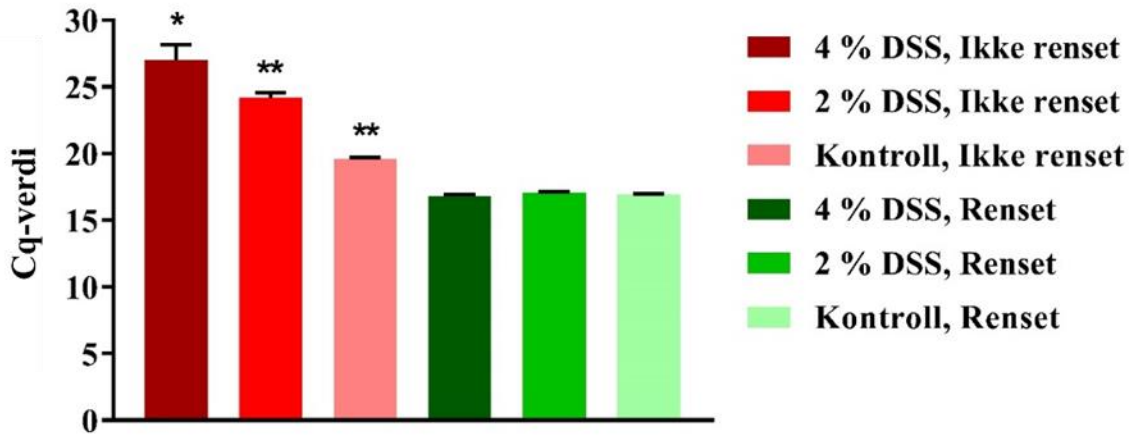
$$N = \frac{(E_{\text{målgen}})^{(-Cq_{\text{prøve (målgen)}})}}{(E_{\text{referansegen}})^{(-Cq_{\text{prøve (referansegen)}})}} \quad (1)$$

Der N: normalisert mRNA-ekspresjon av målgen for en gitt prøve (individ); E: primereffektiviteten til målgen/referansegen; Cq: antall PCR-sykluser som kreves for å nå kvantifiseringsterskelen, med primere for målgen/referansegen.

### 2.7.6 Inhiberingstesting

I dag anslås det at en tredjedel av all forskning på kolitt i mus benytter seg av ulike DSS-modeller (Viennois et al., 2013). Likevel har man først i senere tid blitt klar over den inhiberende effekten av DSS ved RT-qPCR (Kerr et al., 2012; Viennois et al., 2013), og flere metoder for fjerning av DSS fra RNA har blitt foreslått. I denne oppgaven ble det besluttet å bruke litiumklorid-metoden presentert av Viennois et al. (2013), da den er relativt raskt, har lave kostnader, og ser ut til å gi tilfredsstillende resultater. Dette er en metode som i korte trekk belager seg på utfelling av RNA, samtidig som at polysakkarider (inkludert DSS) holdes tilbake i løsning.

Effekten av LiCl-metoden ble testet på cDNA opparbeidet fra DSS-rensede og ikke-rensede RNA-prøver, fra tykktarmsprøver fra pilotforsøk (se delkapittel 2.7.4 for metodebeskrivelse). Rensede og ikke-rensede prøver kom fra de samme opprinnelige RNA-prøvene. Opparbeidet cDNA ble analysert ved qPCR, med primere for *GAPDH*. Dersom det ikke er inhibitorer til stede i prøvene, er det forventet liten variasjon i Cq-verdier siden *GAPDH* er stabilt uttrykt. Cq-verdier for hver gruppe (kontroll, 2 % og 4 % DSS, Renset/ikke rensed) er gitt i figur 2.10. Det var tydelig forskjell mellom rensede og ikke-rensede prøver. For urensede prøver, var det større variasjon både innad og mellom gruppene. Dette forteller at DSS-dose har mye å si for graden av inhibering, og at inhiberingsgraden ikke nødvendigvis er lik for alle prøver fra den samme eksperimentelle gruppen. Urensede kontrollprøver viste at det også var andre inhibitorer enn DSS til stede i prøvene.



**Figur 2.10 Inhiberingstest**

Gjennomsnittlige Cq-verdier fra qPCR ved inhiberingstesting, med primere for *GAPDH*, før og etter DSS-rensing med litiumklorid-metoden. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM. Statistisk sammenligning ble gjort mellom rensede og ikke-rensede prøver for hver eksperimentell behandling (DSS %). Stjerner indikerer signifikant forskjell (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) ved parvis, tosidig Students t-test. DSS:  $n=3$ , Kontroll:  $n=2$ .

## 2.8 BESTEMMELSE AV GENOTYPE

For å verifisere at dyrene i KO-forsøket hadde korrekt genotype, ble det utført genotyping på vevsprøver fra dyrenes øre. gDNA ble ekstrahert ved bruk av protokoll beskrevet i litteraturen (Truett et al., 2000). 75  $\mu\text{L}$  lyseringsbuffer (25mM NaOH, 0,2 mM dinatrium EDTA, pH=12) ble tilsatt hver vevsprøve, og prøver ble varmet ved 95  $^{\circ}\text{C}$  i 30 minutter. Prøver ble deretter kjølt ned til 4  $^{\circ}\text{C}$  og tilsatt 75  $\mu\text{L}$  nøytraliseringsmiddel (40 nM Tris-HCl, pH=5). PCR ble utført ved bruk av 5X Hot FirePol Blend Master MIX Ready to Load, og tre ulike primere (se tabell C.2, bilag C).

Oversikt over ulike komponenter og volum i reaksjonsblandinger er gitt i tabell 2.8.

Temperatursykluser for PCR-reaksjon er gitt i tabell 2.9, etter anbefaling fra dyrelleverandør (The Jackson Laboratory, 2017). Enkelte temperaturtrinn ble forlenget av hensyn til den lavere polymeriseringshastigheten til HOT FIREPol DNA polymerase.

Temperaturprogrammet inneholdt et såkalt «*touch down*»-program, som brukes når den optimale hybridiseringstemperaturen (*annealing*) til primerne er ukjent.

## METODER

Etter amplifisering ved PCR, ble amplikon-lengder analysert ved bruk av gel-elektroforese, med 2 % agarose-gel tilsatt GelRed (5  $\mu\text{L}$ /100 mL). Hver brønn ble tilsatt 5  $\mu\text{L}$  prøve eller DNA Ladder Ready to Load. Gel ble kjørt i 30 minutter med spenning på 80 volt. Gel-bilder ble tatt ved bruk av Gel Doc EZ Imager, og er gitt i figur E.1 i bilag E. Alle prøver gav forventet genotype, med unntak av én (prøve «30»). Forventet genotype var VT, mens resultatene tilsa at dyret var *NOX1KO*. At dyret likevel var VT, ble bekreftet av L-012-signal fra *ex vivo*-avbildning.

**Tabell 2.8** Reaksjonsblanding for PCR ved bestemmelse av genotype (per reaksjon).

Reagens	Volum ( $\mu\text{L}$ )
5x HOT FIREPol Blend Master Mix RTL	2
Primer Wild type Reverse (~ 16,6 mM)	0,3
Primer Common (~ 16,6 mM)	0,3
Primer Mutant Reverse (~ 16,6 mM)	0,3
gDNA-templat	1
H <sub>2</sub> O, PCR grade	6,1
<i>TOTAL</i>	<i>10 <math>\mu\text{L}</math></i>

**Tabell 2.9** Temperatursykluser for PCR-reaksjon ved bestemmelse av genotype.

Steg	Varighet	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )
Initial aktivering	12 min	95
Denaturering	15 sek	95
Annealing	30 sek	65 (-0,5 per syklus)
Elongering	30 sek	72
Denaturering	15 sek	95
Annealing	30 sek	60
Elongering	30 sek	72
Avsluttende elongering	5 min	72

## 2.9 STATISTISK ANALYSE

All statistisk analyse ble gjort ved bruk av programvaren GraphPad Prism 7. For hver analyse ble det vurdert hvilken statistisk modell som var egnet. Den brukte modellen i hvert tilfelle er spesifisert i figurtekst i resultatkapittelet. I alle tilfeller ble  $p < 0,05$  brukt som signifikanskriterium. En p-verdi er et mål på sannsynligheten for å gjøre observasjonen man har gjort, gitt at alle antagelsene som ligger til grunn for den brukte statistiske modellen er oppfylt. Data er uttrykt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM.

Det ble testet for signifikante ekstremverdier (*outliers*) ved bruk av Routs test ( $Q = 1\%$ ). Etter beste evne, ble det også testet om de statistiske modellenes antagelser var møtt. Det vil blant annet si at data for hver eksperimentelle gruppe var normalfordelt (for parametriske modeller), og at grupper som ble sammenlignet hadde lignende variasjon (standardavvik, SD).

Normalfordeling ble testet ved bruk av D'Agostino og Pearson normalitetstest i tilfeller der  $n > 7$ . «n» betegner antall individer per gruppe. Ved lavere n ble Shapiro-Wilk normalitetstest brukt. D'Agostino og Pearson ble valgt i de tilfeller det var mulig basert på anbefalinger i litteraturen (Motulsky, u. å.). I tilfeller der data ikke var normalfordelt, selv etter ekskludering av eventuelle ekstremverdier, ble data log-transformert før videre analyse. Log-transformasjon er et nyttig verktøy for å både minske variasjon innad i gruppene og å gjøre data mer normalfordelt. Etter normalitetstest og eventuell transformasjon, ble det testet om variasjonen (SD) innad i gruppene (*homogeneity of variance*) var signifikant forskjellig fra hverandre, ved bruk av Brown-Forsythe test. Basert på om normalfordeling ble oppnådd eller ikke, ble henholdsvis parametriske og ikke-parametriske modeller brukt.

I enkelte tilfeller ble Welch korreksjon brukt for å korrigere for ulikt SD i gruppene. Korreksjon for multiple sammenligninger (repeterte målinger) ble gjort ved Bonferroni-Dunn metoden. Ved parvise sammenligninger ble antagelsene sjekket og ekstremverdianalyse gjort på differanser mellom parvise målinger, og ikke på målingene i seg selv.



## 3 RESULTATER

---

### 3.1 ETABLERING AV LAVGRADS INFLAMMASJONSMODELL I TYKKTARM

For å etablere en lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm, ble det gjort to dyreforsøk: pilot- og etableringsforsøk. Det ble først brukt relativt høye, etablerte doser av DSS for å verifisere effekten på dyrene i vårt laboratorium. Deretter ble lavere doser testet, hvor målet var å finne optimal oral dose for induksjon av lavgrads inflammasjon. I pilot- og etableringsforsøket ble det kun benyttet villtypemus (C57BL/6J).

#### 3.1.1 Pilotforsøk (2 og 4 % DSS)

Det overordnede formålet med pilotforsøket var å kartlegge hvilke effekter 2 og 4 % DSS i drikkevann har på sykdomsgrad hos mus, over en periode på 6 dager. Dette var for å undersøke om standard konsentrasjoner av DSS gav de forventede effekter som er beskrevet i litteraturen, med tydelige, ytre tegn på inflammasjon (Bamba et al., 2012; Chassaing et al., 2012).

#### Evaluering av synlig sykdomsgrad

Sykdomsscore for dyr i pilotforsøket er gitt i tabell 3.1, hvor det fra dag 4 ble observert signifikant forskjell mellom 2 og 4 % DSS. Vektnedgang (figur 3.1) gav det største bidraget til denne forskjellen. I tillegg ble det observert en markant reduksjon i vanninntak mellom dag 4 og 6, sammenlignet med kontrollperiode fra uken før DSS-eksponering. Reduksjonen var på henholdsvis 26 og 64 % for 2 og 4 % DSS.

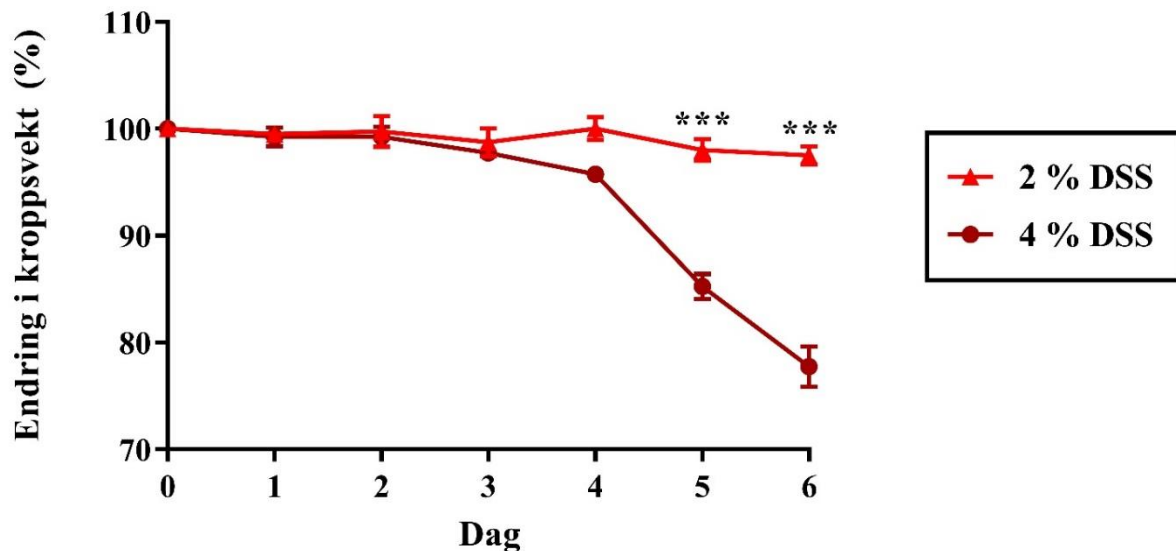
Oppsummert viste sykdomsevalueringen en tydelig effekt av 4 % DSS, som gav symptomer lignende dem som opptrer ved alvorlig ulcerøs kolitt hos mennesker (Parray et al., 2012). 2 % DSS gav derimot svakere symptomer enn forventet. De eksperimentelle gruppene i pilotforsøket bestod av både hann- og hunndyr, men det ble ikke observert noen signifikant forskjell i sykdomsgrad mellom kjønn.

## RESULTATER

**Tabell 3.1 Sykdomsscore i pilotforsøk**

Gjennomsnittlig sykdomsscore på dag 1 til 6 av pilotforsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n=4). Der SEM ikke er oppgitt, hadde alle dyr i gruppen samme score. Stjerner indikerer signifikant forskjell (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) mellom 2 og 4 % DSS ved tosidig Students t-test med korreksjon for multiple sammenligninger ved Bonferroni-Dunn metoden. Sammenligninger ble gjort innad på hver dag.

DSS %	Parameter	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4**	Dag 5*	Dag 6***
2	Aktivitetsnivå	0	0	0	0	0	0,3 ± 0,3
	Kroppspositur	0	0	0	0	0	0
	Avføringskvalitet	0	1	1	0,5 ± 0,3	1,5 ± 0,5	2 ± 0,6
	Kroppsvekt	0	0	0	0	0	0,3 ± 0,3
	<b>Total score</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,5 ± 0,3</b>	<b>1,5 ± 0,5</b>	<b>2,5 ± 0,5</b>
4	Aktivitetsnivå	0	0	0	0	0	0
	Kroppspositur	0	0	0	0	0	2 ± 0,6
	Avføringskvalitet	0	1	1	3	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5
	Kroppsvekt	0	0	0	0,3 ± 0,3	3 ± 1,2	8,8 ± 1,3
	<b>Total score</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3,3 ± 0,3</b>	<b>5,5 ± 1</b>	<b>13,3 ± 1,1</b>



**Figur 3.1 Vektutvikling i pilotforsøk**

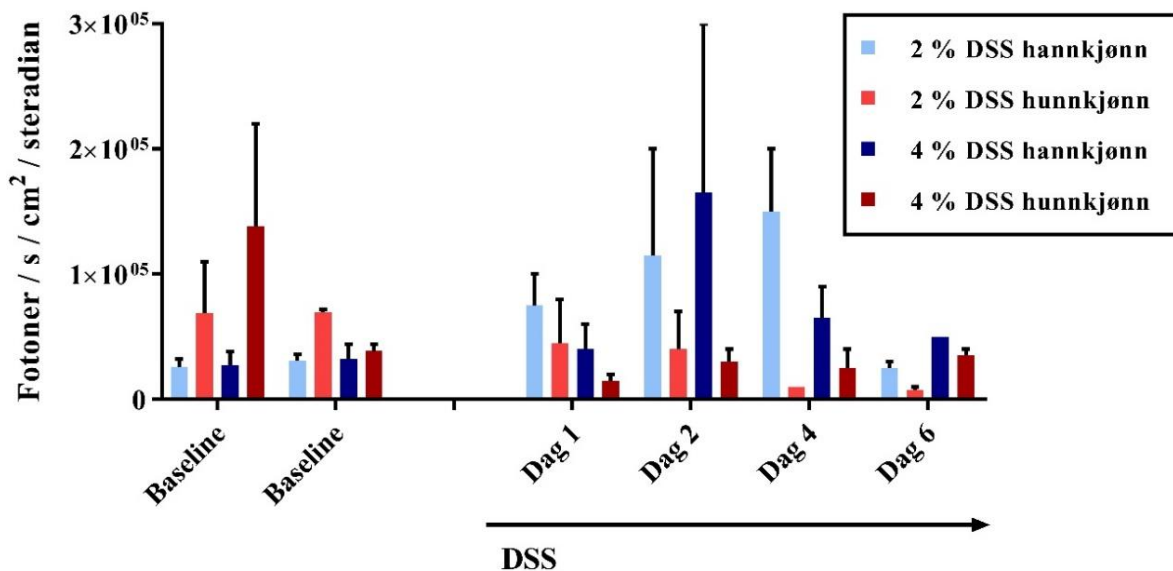
Vektutvikling for dyr i pilotforsøk, uttrykt som gjennomsnittlig prosentendring fra initialvekt (dag 0). Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n=4). \*\*\* indikerer signifikant forskjell (p<0,001) mellom 2 og 4 % DSS ved tosidig Students t-test med korreksjon for multiple sammenligninger ved Bonferroni-Dunn metoden. Sammenligninger ble gjort innad på hver dag.

## RESULTATER

### ***In vivo*-avbildning med L-012: uegnet for å undersøke tidsavhengig produksjon av ROS knyttet til inflammasjonsutvikling i DSS-eksponerte dyr**

Økt produksjon av ROS er knyttet til inflammasjon. For å undersøke den tidsavhengige produksjonen av ROS som følge av DSS-eksponering, ble det gjennomført optisk *in vivo*-avbildning av dyrenes abdominale område etter injeksjon av den ROS-spesifikke proben L-012 på dag 1, 2, 4 og 6 av pilotforsøket. Hypotesen var at 4 % DSS ville gi sterkere signal enn 2 % på alle dager, og at L-012-signalet ville øke i takt med sykdomsgrad for begge DSS-gruppene.

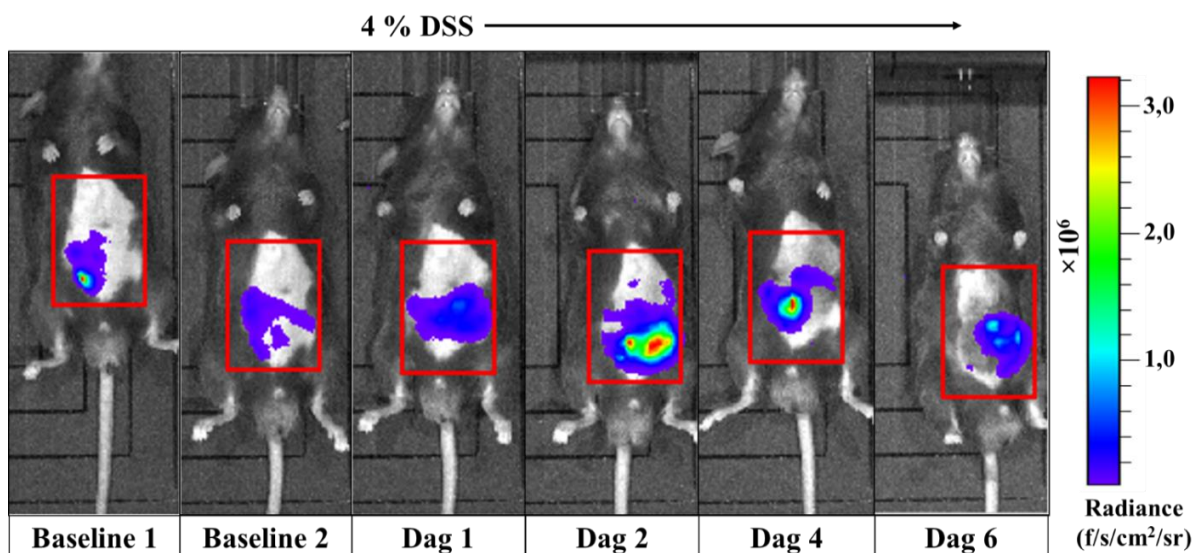
Som vist i figur 3.2, ble det observert stor variasjon innad i DSS-gruppene, både mellom og innad i kjønn. Også før DSS-eksponering (baseline) var det store variasjoner mellom dyrene. Det ble ikke observert signifikant forskjell mellom 2 og 4 % DSS på noen av dagene. En mulig trend, var at signalet jevnt over var lavere for hunndyr enn for hannedyr. Det ble imidlertid ikke funnet noen signifikant forskjell mellom kjønn innad i DSS-gruppene på noen av dagene. For hannedyr så det i tillegg ut til at signalet steg til et maksimum, før det falt igjen mot dag 6. Denne «signaltoppen» opptrådte på dag 4 og 2 med henholdsvis 2 og 4 % DSS. *In vivo*-avbildninger for hannedyr i 4 % DSS-gruppen som i størst grad bidro til denne trenden er gitt i figur 3.3.



**Figur 3.2 *In vivo*-avbildning i pilotforsøk**

L-012-indusert kjemiluminescens uttrykt som gjennomsnittlig radianse (fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian) fra dyrenes abdominale område på dag 1, 2, 4 og 6 av pilotforsøk. «Baseline» er målinger fra uken før DSS-eksponering. Dyrene er gruppert etter DSS-dose og kjønn (n=2). Statistisk sammenligning ble gjort mellom 2 og 4 % DSS for hver dag, ved tosidig Students t-test med korreksjon for multiple sammenligninger ved Bonferroni-Dunn metoden. Det ble ikke tatt hensyn til kjønn ved sammenligning av DSS-doser. Sammenligning av kjønn ble gjort innad i hver DSS-dose.

## RESULTATER

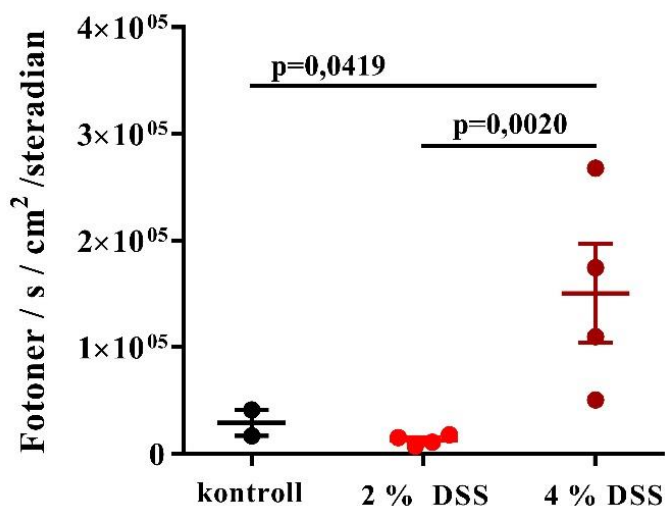


**Figur 3.3** *In vivo*-avbildninger av enkeltdyr i pilotforsøk

*In vivo*-avbildninger av det samme hanndyret under administrering av 4 % DSS på dag 1, 2, 4 og 6 av pilotforsøk, etter injeksjon av L-012. Pseudo-fargene representerer fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian, med minimums- og maksimumssignal på henholdsvis  $3,06 \times 10^4$  og  $3,26 \times 10^6$ . Røde firkanter viser ROI (*region of interest*).

### *Ex vivo*-avbildning med L-012: 4 % DSS gir økt ROS-produksjon

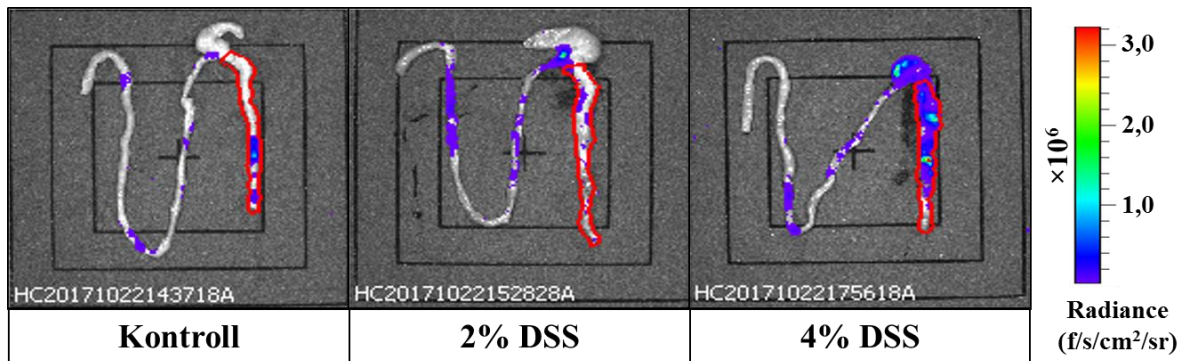
I tillegg til *in vivo*, ble det utført *ex vivo*-avbildninger av dyrenes tarm på dag 6 (figur 3.4). I samsvar med hypotesen, gav 4 % DSS signifikant høyere L-012-signal sammenlignet med 2 % DSS og kontroll. Noe overraskende, ble det ikke observert noen forskjell mellom 2 % DSS og kontroll. Representative avbildninger for kontroll, 2 og 4 % DSS er gitt i figur 3.5.



**Figur 3.4** *Ex vivo*-avbildning i pilotforsøk

L-012-indusert kjemiluminescens uttrykt som gjennomsnittlig radiance (fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian) fra tykktarm på dag 6 av pilotforsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM. P-verdier fra enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium). Kontroll:  $n=2$ , DSS:  $n=4$ .

## RESULTATER



**Figur 3.5 Representative *ex vivo*-avbildninger fra pilotforsøk**

Representative *ex vivo*-avbildninger av tarmen til tre forskjellige hanndyr (kontroll, 2 og 4% DSS) på dag 6 av pilotforsøk, etter injeksjon av L-012. Injeksjon ble foretatt før disseksjon. Pseudo-fargene representerer fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian, med minimums- og maksimumssignal på henholdsvis 2,15×e<sup>4</sup> og 3,23×e<sup>6</sup>. Røde markering viser ROI (*region of interest*).

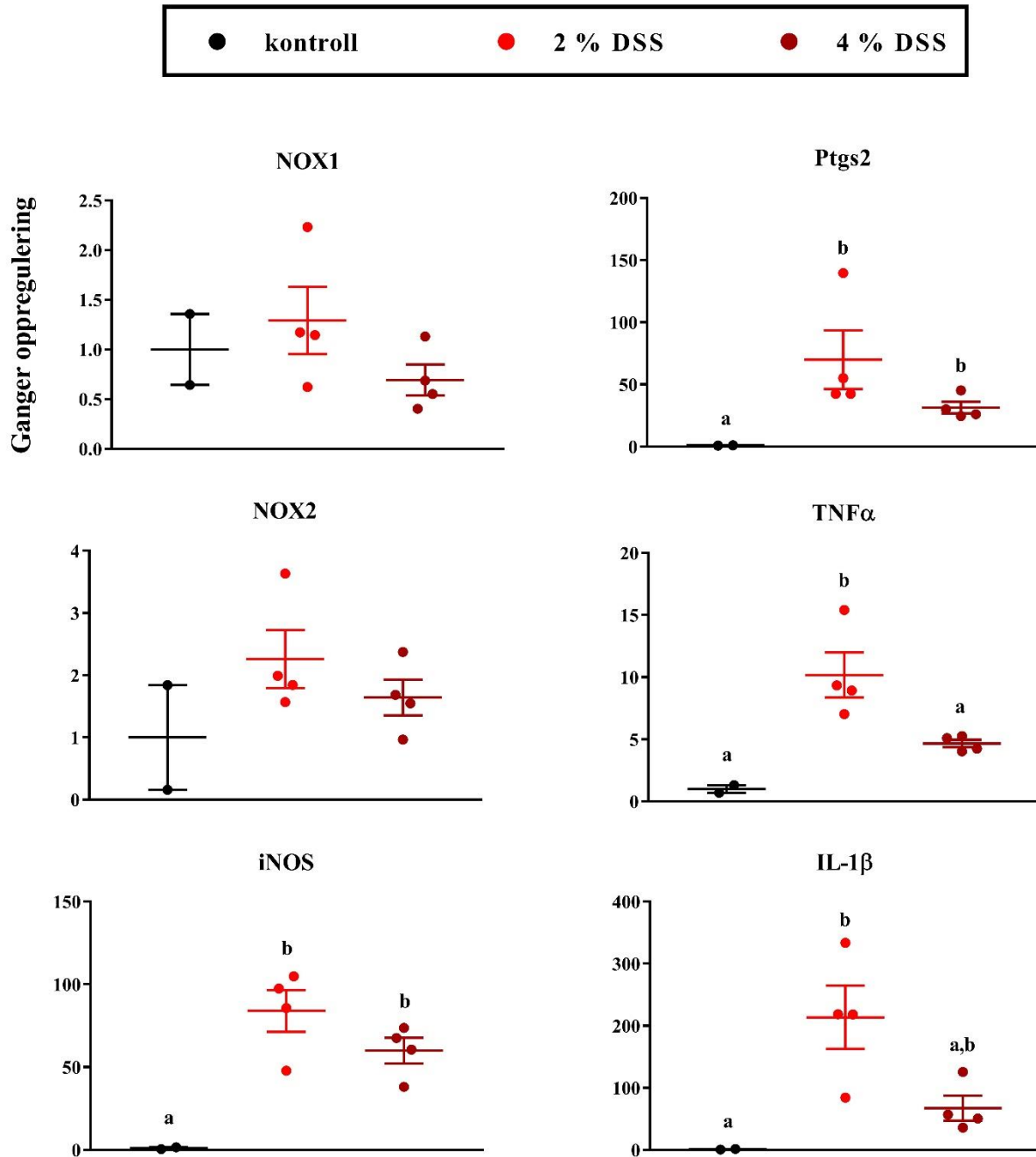
### Ekspresjon av proinflammatoriske gener

For å videre vurdere graden av tykktarmsinflammasjon, ble mRNA-ekspresjon av de proinflammatoriske genene *Ptgs2*, *TNF $\alpha$*  og *IL-1 $\beta$*  analysert i slimhinne fra proksimal tykktarm (figur 3.6, p-verdier i tabell F.1 i bilag F). Alle tre genene ble markant oppregulert, selv om forskjellen mellom 4 % DSS og kontroll kun var signifikant for *Ptgs2*. Størst økning ble observert for *IL-1 $\beta$* , som ble oppregulert ca. 200 og 70 ganger for henholdsvis 2 og 4 % DSS. Et interessant funn var at 4 % DSS ikke gav større oppregulering enn 2 % DSS. For *TNF $\alpha$*  gav 2 % DSS til og med signifikant større oppregulering enn 4 %. Uavhengig av dette bekreftet ekspresjonsanalysen tykktarmsinflammasjon, i overensstemmelse med sykdomsevalueringen.

### Ekspresjon av ROS-relaterte gener

Siden målet med oppgaven var å utforske produksjon av ROS i tykktarm, ble mRNA-ekspresjonen av de ROS-relaterte genene *NOX1*, *NOX2* og *iNOS* analysert (figur 3.6, p-verdier i tabell F.1 i bilag F). I likhet med de proinflammatoriske genene, førte DSS til en kraftig oppregulering av *iNOS*, mens *NOX1*- og *NOX2*-uttrykkene enten var uendret eller kun marginalt oppregulert. Med 2 og 4 % DSS ble *iNOS* oppregulert henholdsvis 85 og 69 ganger sammenlignet med kontrollgruppen.

## RESULTATER



**Figur 3.6 Oppregulering av mRNA-ekspresjon i pilotforsøk**

Ganger oppregulering av ROS-relaterte (*NOX1*, *NOX2*, *iNOS*) og proinflammatoriske (*Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* ) gener i slimhinne fra proksimal tykktarm i pilotforsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom eksperimentelle grupper, analysert ved enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium). Kontroll:  $n=2$ , DSS:  $n=4$ .

## RESULTATER

### 3.1.2 Etableringsforsøk (0,5, 1 og 2 % DSS)

Formålet med etableringsforsøket var å finne optimal DSS-dose for induksjon av mild inflammasjon i tykktarm, hvor det vil være få eller ingen synlige tegn på sykdom. Med utgangspunkt i blant annet Suzuki et al. (2006) og Chassaing et al. (2012), var det forventet at 1 % DSS ville gi slik mild inflammasjon. I tillegg ble 0,5 og 2 % DSS inkludert, hvor sistnevnte skulle fungere som positiv kontroll. Dyrene ble eksponert for DSS i drikkevann i 8 dager.

#### **Få eller ingen synlig sykdomstegn med 1 og 0,5 % DSS**

Frem til dag 6 etter DSS-behandling, var kroppsvekten stabil i alle gruppene. Men fra dag 6 gikk vekten til dyr i 2 % DSS-gruppen signifikant ned sammenlignet med de øvrige gruppene (figur 3.7A). Basert på vektutvikling observert i pilotforsøket, var det ikke forventet at 2 % DSS skulle føre til slik kraftig vektreduksjon. På dag 8 viste dyrene i 1 % DSS-gruppen kun et beskjedent vekttap, hvor de ikke skilte seg signifikant fra kontrolldyr.

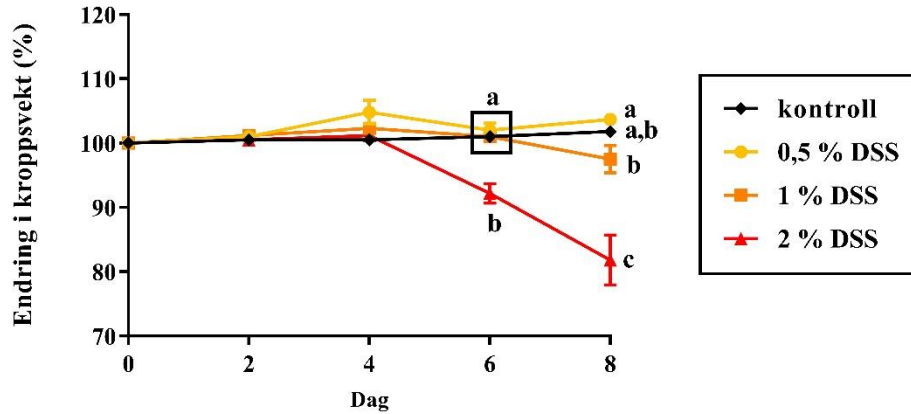
Fra dag 4 ble det observert økende endring i avføringskvalitet for dyr i 2 % DSS-gruppen, hvor kvaliteten på dag 8 var svært flytende og blodig. Noe mildere symptomer ble observert for 4 av 6 dyr i 1 % DSS-gruppen fra dag 6. I 0,5 % DSS-gruppen viste bare 2 av 6 dyr noe endret avføringskvalitet på dag 8.

Siden pilotforsøket viste at vanninntaket gikk ned som følge av DSS-eksponering, ble det undersøkt om lavere doser av DSS ville gi den samme effekten. Både 2 og 1 % DSS førte til en reduksjon i vanninntak (henholdsvis 46 og 32 %) mellom dag 6-8 sammenlignet med inntak mellom dag 0-2 (figur 3.7B). Etter terminering av forsøket, ble tykktarmslengde målt og milt veid for hvert dyr. 2 % DSS førte til signifikant kortere tykktarm sammenlignet med de øvrige gruppene (figur 3.7C), mens ingen forskjell i miltvekt ble observert (data ikke vist).

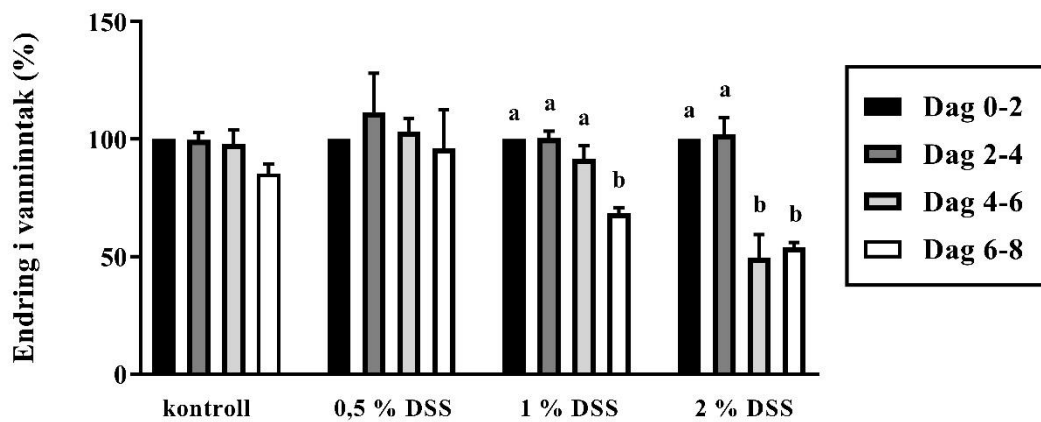
Oppsummert viste evalueringen av synlig sykdomsgrad at 0,5 og 1 % DSS i ingen eller liten grad påvirket dyrenes helse utad, mens 2 % DSS førte til sterkere symptomer enn det som var forventet ut fra pilotforsøket.

## RESULTATER

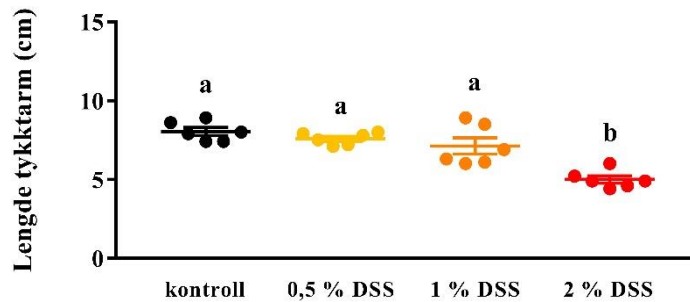
(A)



(B)



(C)



**Figur 3.7 Evaluering av synlig sykdomsgrad i etableringsforsøk**

(A) Vektutvikling uttrykt som gjennomsnittlig prosentendring fra initialvekt (dag 0). Sammenligninger ble gjort mellom DSS-dose, innad på hver dag (n=6). (B) Gjennomsnittlig vanninntak per bur / antall dyr i buret, målt annen hver dag. Sammenligninger ble gjort mellom dager, innad i DSS-dose (n=2-3). (C) Gjennomsnittlig tykktarmslengde på dag 8 (n=6). (A, B, C) Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell analysert ved ANOVA ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium). Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM.

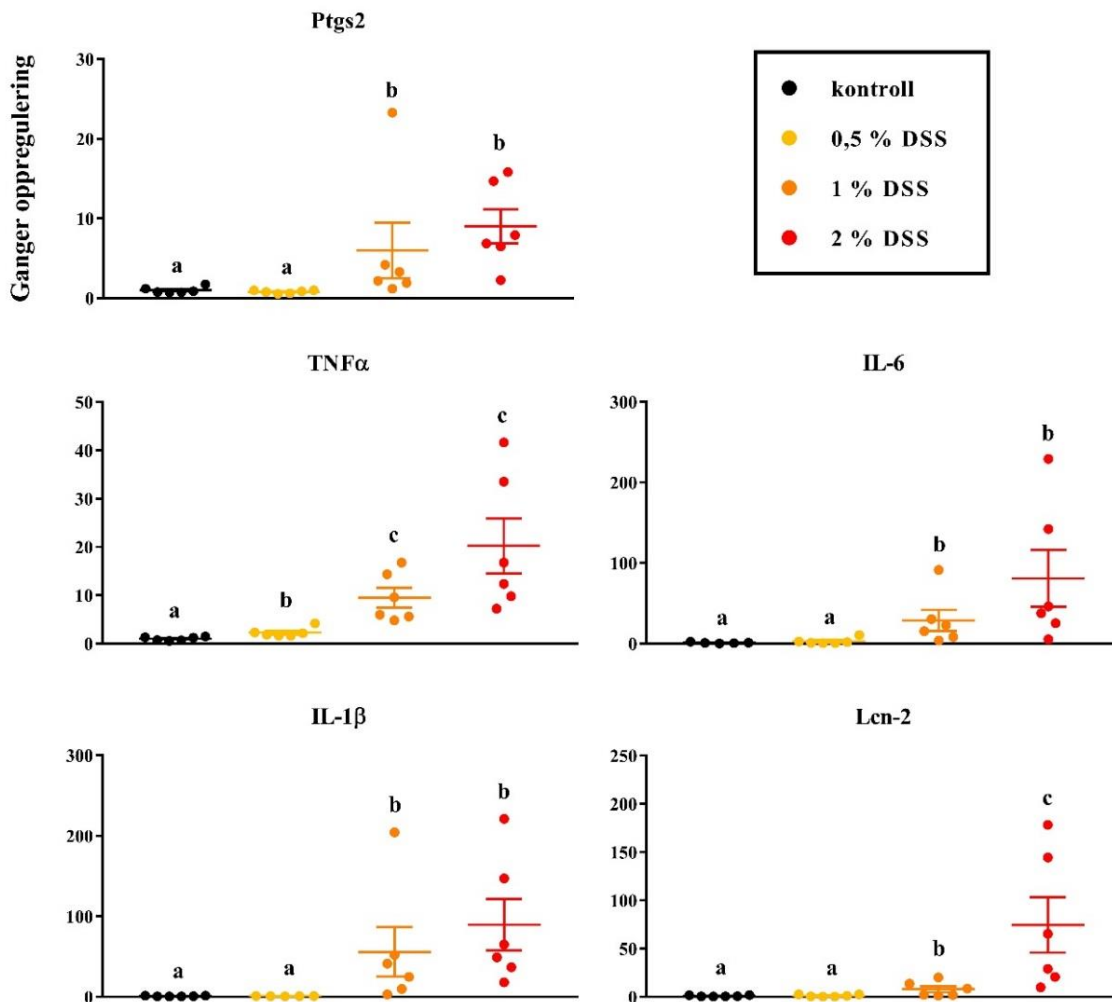


## RESULTATER

### Ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener: doseavhengig oppregulering

For å videre evaluere graden av inflammasjon, ble mRNA-ekspresjonen av de proinflammatoriske genene *Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-6* og *IL-1 $\beta$*  analysert i slimhinne fra proksimal tykktarm. I tillegg ble ekspresjon av inflammasjonsmarkøren *Lcn-2* analysert. Resultater fra analysen er gitt i figur 3.8 (p-verdier i tabell F.2 i bilag F). 1 og 2 % DSS gav signifikant oppregulering av samtlige gener sammenlignet med kontroll. 0,5 % DSS gav kun oppregulering av *TNF $\alpha$* .

Selv om man ikke kunne påvise signifikant dose-respons av DSS, hvor alle gruppene skilte seg signifikant fra hverandre, viste analysen en trend der økt DSS-dose gav økt mRNA-ekspresjon for samtlige inflammasjonsrelaterte gener.

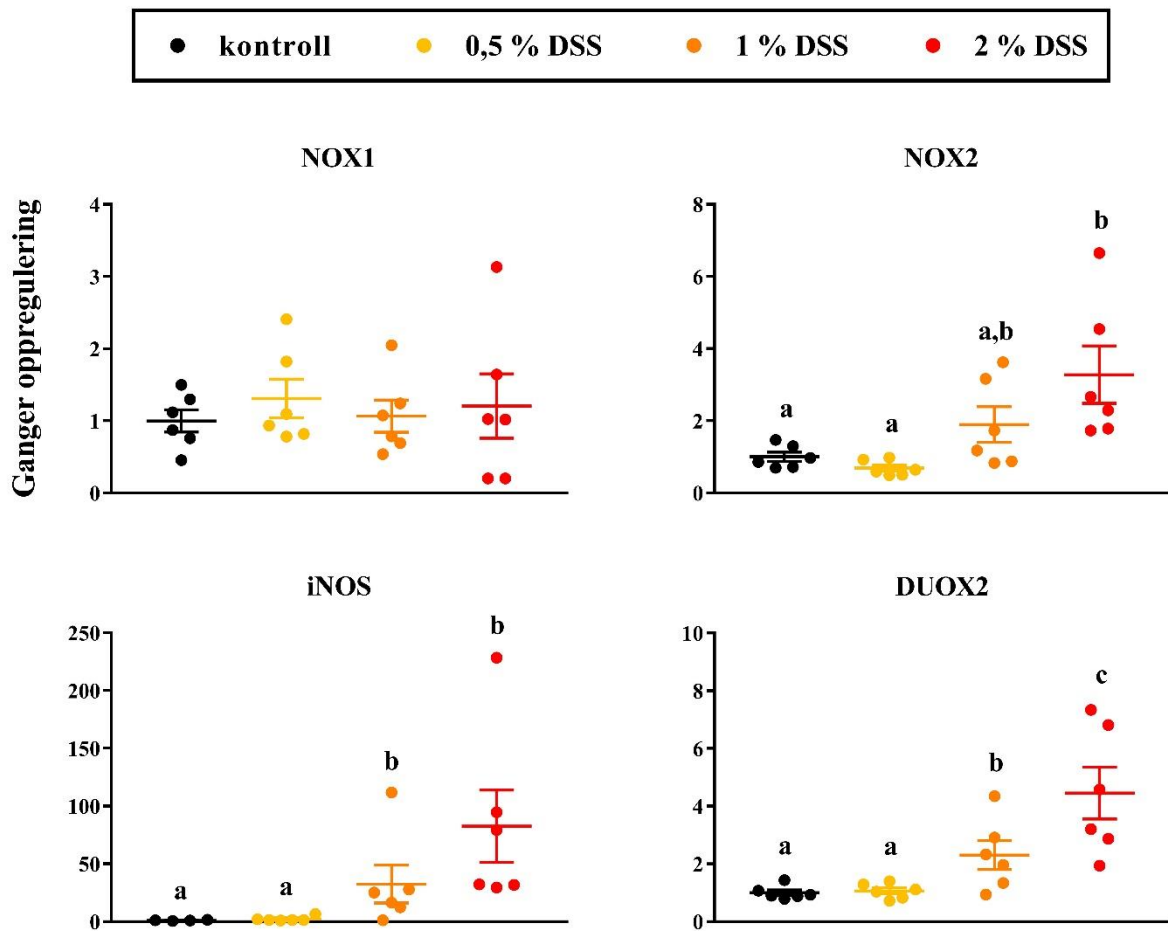


**Figur 3.8 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener i etableringsforsøk**  
Ganger oppregulering av mRNA fra inflammasjonsrelaterte gener (*Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *Lcn-2*) i slimhinnen fra proksimal tykktarm i etableringsforsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n=5-6). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom eksperimentelle grupper, analysert ved enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest (p<0,05 som signifikanskriterium).

## RESULTATER

### Ekspresjon av ROS-relaterte gener: doseavhengig oppregulering

I tillegg til inflammasjonsrelaterte gener, ble mRNA-ekspressjonen av de ROS-relaterte genene *NOX1*, *NOX2*, *iNOS* og *DUOX2* analysert (figur 3.9, p-verdier i tabell F.3 i bilag F). I likhet med pilotforsøket, ble det ikke observert oppregulering av *NOX1*. De resterende genene viste derimot en trend, hvor økt konsentrasjon av DSS gav økt oppregulering. Oppregulering av *iNOS* og *DUOX2* var forventet, da det er kjent at disse uttrykkes i større grad under inflammasjon. Mer interessant var den signifikante oppreguleringen av *NOX2* med 4 % DSS, som ikke ble observert i pilotforsøket.



**Figur 3.9 Oppregulering av mRNA-ekspressjon av ROS-relaterte gener i etableringsforsøk**

Ganger oppregulering av mRNA fra ROS-relaterte gener (*NOX1*, *NOX2*, *iNOS*, *DUOX2*) i slimhinnen fra proksimal tykktarm i etableringsforsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n=4-6). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom eksperimentelle grupper, analysert ved enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium).

## 3.2 ROLLEN TIL NOX1 VED LAVGRADS INFLAMMASJON I TYKKTARM

Basert på etableringsforsøket kunne vi konkludere med at 1 % DSS fører til kun marginale effekter på sykdomsgrad. Likevel observerte vi en markant økt mRNA-ekspresjon av proinflammatoriske gener, og gener som koder for ROS-genererende enzymer. Særlig ble *iNOS* oppregulert, noe som indikerer en økt produksjon av nitrogenoksid. Videre så vi ingen økning av *NOX1*-ekspresjon som følge av DSS-behandling, men at *NOX1* har en stabil høy ekspresjon i tykktarm uavhengig av DSS. Med andre ord førte 1 % DSS til en tilstand hvor det trolig produseres mye av både nitrogenoksid og superoksid, som sammen danner peroksinitritt. Vår hypotese var at fraværet av NOX1 ville føre til redusert dannelse av peroksinitritt, som igjen kan påvirke inflammasjonsstatus og barrierefunksjon. Nærmere bestemt ville vi teste om ROS-bidrag fra NOX1 fører til svakere inflammasjon og bedre opprettholdelse av barrierefunksjon under mild inflammasjon induisert av 1 % DSS. Både villtypemus (VT) og *NOX1* knockoutmus (*NOX1KO*) ble eksponert for DSS i 6 dager.

### 3.2.1 *NOX1* knockout gir ingen endring av sykdomsgrad

1 % DSS gav ingen signifikant endring i kroppsvekt eller vanninntak, sammenlignet med kontrolldyr, verken for VT eller *NOX1KO* (data ikke vist). Det ble heller ikke observert noen forskjeller i miltvekt (data ikke vist). Videre fant vi at både VT og *NOX1KO* behandlet med 1 % DSS hadde signifikant kortere tykktarm enn kontrolldyr (VT), men det var ingen forskjell mellom DSS-gruppene (data ikke vist). Etter 4 dager med DSS ble det observert endring i avføringskvalitet, i form av løs konsistens og/eller blod, men dette gjaldt både VT og *NOX1KO*.

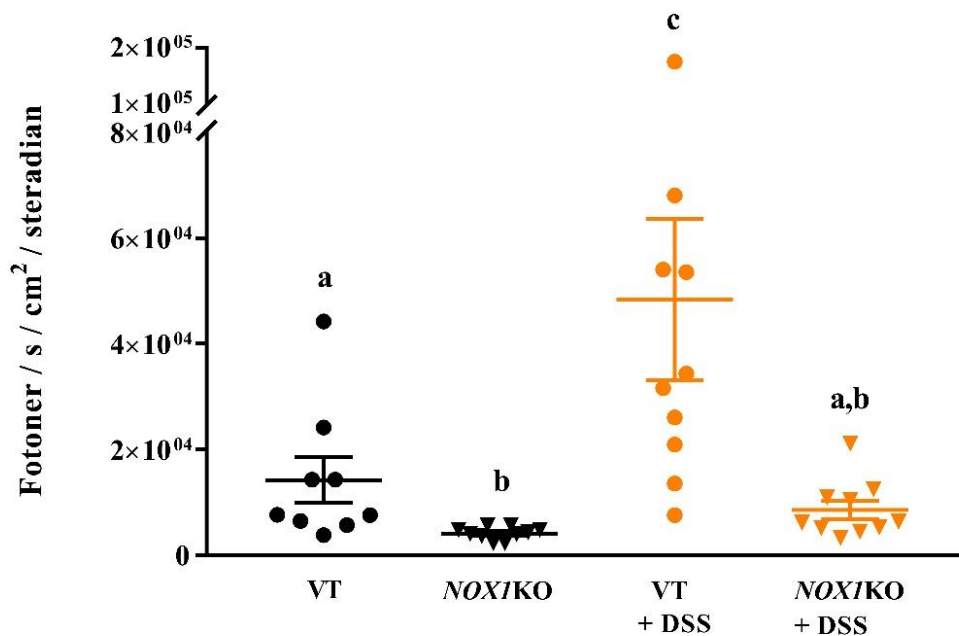
## RESULTATER

### 3.2.2 NOX1 bidrar i stor grad til L-012-signal

For å undersøke om ROS-produksjon påvirkes av å fjerne NOX1, ble det utført *ex vivo*-avbildning med L-012. Tidligere studier har antydnet at L-012 er sensitiv for peroksintritt. Vår hypotese var da at *NOX1KO* ville gi lavere signal enn VT, siden NOX1 bidrar med produksjon av superoksid, som igjen er nødvendig for dannelsen av peroksintritt.

Som vist i figur 3.10, observerte vi et signifikant høyere signal fra tykktarm i VT sammenlignet med *NOX1KO*, både med og uten DSS-behandling. Det ble også observert signifikant forskjell mellom VT og VTDSS. Mellom *NOX1KO* og *NOX1KODSS* ble det derimot ikke observert noen forskjell. Dette var i overensstemmelse med hypotesen om at NOX1 i stor grad bidrar til L-012-signalet, både ved normaltilstand og ved DSS-eksponering. Representativ avbildning fra hver eksperimentelle gruppe er gitt i figur 3.11.

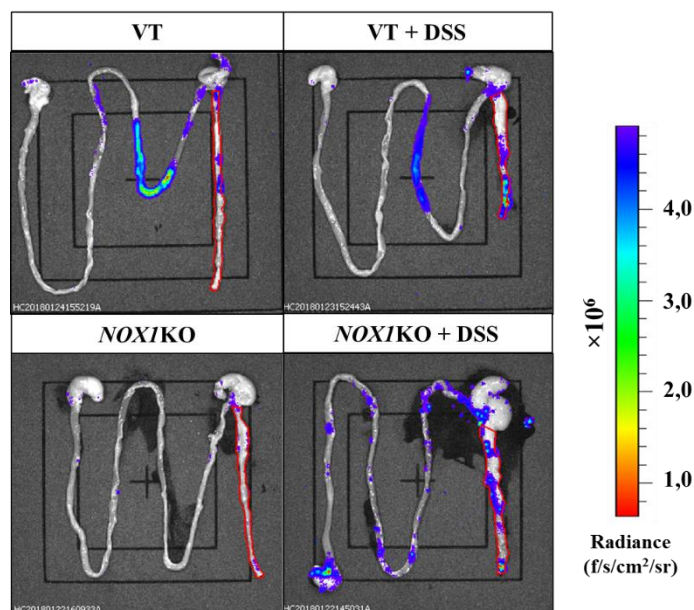
Ved sammenligning av L-012-signal fra proksimal og distal tykktarm for hver eksperimentelle gruppe, ble det kun observert signifikant forskjell for VT, der signalet var høyest i proksimal tykktarm (figur 3.12).



**Figur 3.10** *Ex vivo*-avbildning i KO-forsøk

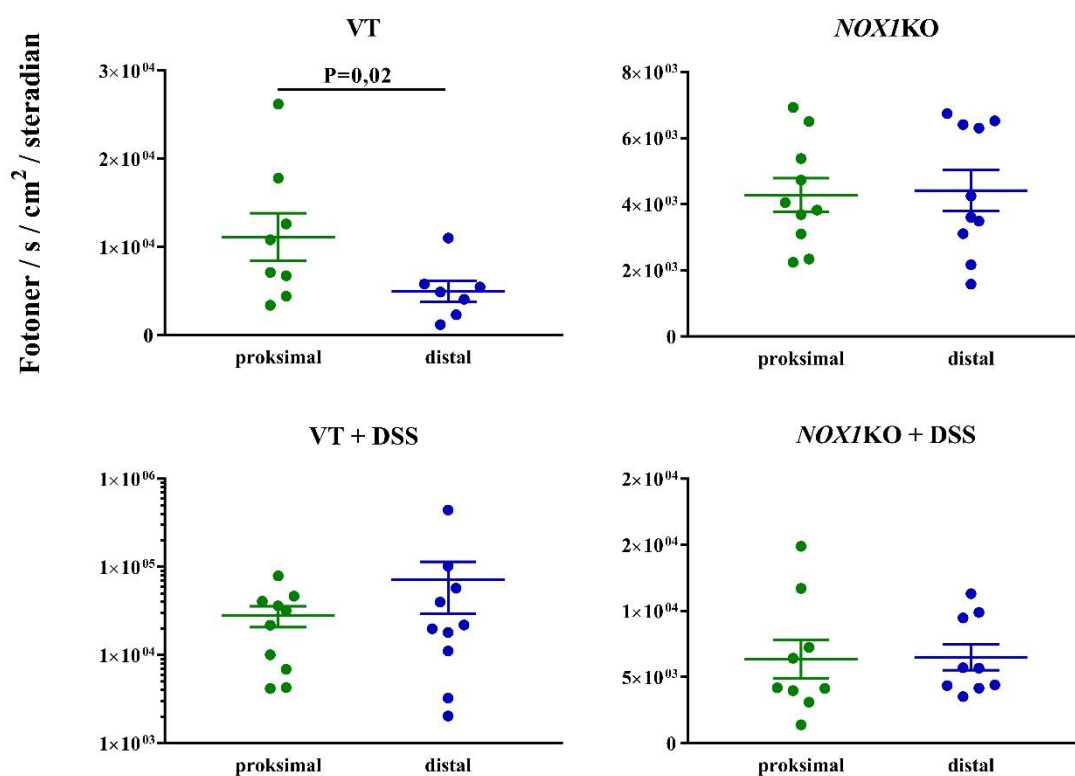
L-012-indusert kjemiluminescens uttrykt som gjennomsnittlig radiance (fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian) fra hele tykktarm på dag 6 av KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n =9,10,10,10). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom eksperimentelle grupper, analysert ved toveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest (p<0,05 som signifikanskriterium).

## RESULTATER



**Figur 3.11 Representative *ex vivo*-avbildninger fra KO-forsøk**

Representative *ex vivo*-avbildninger av tarmen til ett dyr fra hver eksperimentelle gruppe på dag 6 av KO-forsøk, etter injeksjon av L-012. Injeksjon ble foretatt før disseksjon. Pseudo-fargene representerer fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian, med minimums- og maksimumssignal på henholdsvis  $8,71 \times 10^3$  og  $4,37 \times 10^5$ . Røde markering viser ROI (*region of interest*).



**Figur 3.12 *Ex vivo*-avbildning i KO-forsøk (proksimal versus distal tykktarm)**

Sammenligning av L-012-indusert kjemiluminescens uttrykt som gjennomsnittlig radiance (fotoner/s/cm<sup>2</sup>/steradian) fra proksimal og distal tykktarm på dag 6 av KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n=7-10). P-verdier fra parvis, tosidig Students t-test ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium).

## RESULTATER

### 3.2.3 *NOX1* knockout gir ikke økt oppregulering av inflammasjonsrelaterte gener

For å videre undersøke om *NOX1* bidrar positivt under mild inflammasjon, ble mRNA-ekspresjonen av de inflammasjonsrelaterte genene *Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$*  og *Lcn-2* målt i slimhinne fra proksimal og distal tykktarm. Årsaken til at både proksimal og distal del ble undersøkt, var at tidligere forsøk har vist at distal tykktarm viser større tegn på skade under DSS-administrering enn proksimal (Azuma et al., 2008; Yan et al., 2009)

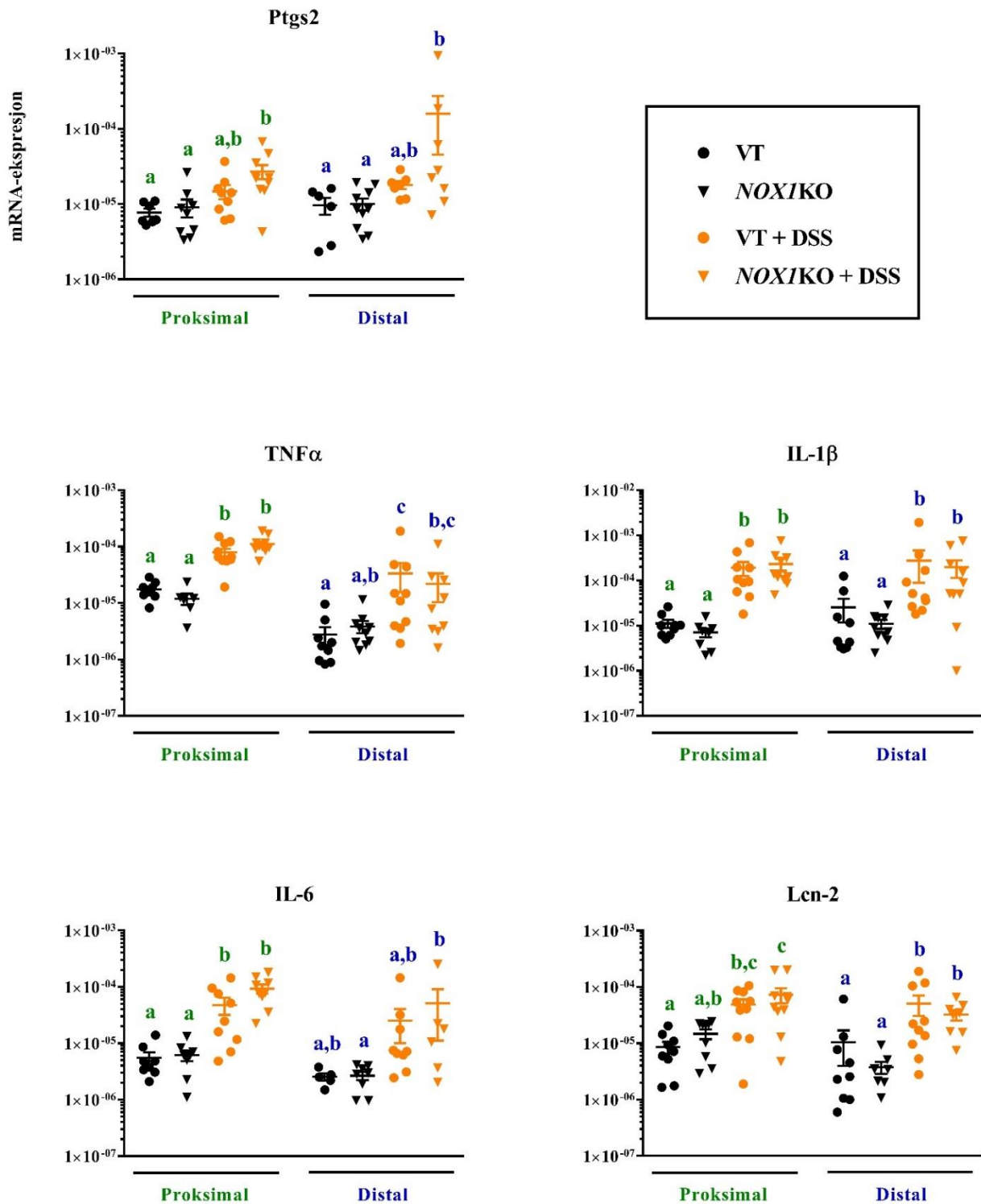
Genekspresjonsdataene fra ble analysert på to måter. Først ble det gjort sammenligning av mRNA-nivåene mellom de ulike eksperimentelle gruppene innad i hvert tykktarmssegment, ved toveis ANOVA (figur 3.13, p-verdier i tabell F.4 i bilag F). Analysen av proksimal tykktarm viste at mRNA-nivåer fra *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  og *IL-6* var signifikant høyere for både VT DSS og *NOX1*KODSS, sammenlignet med deres korresponderende kontrollgrupper. For *Lcn-2* og *Ptgs2* ble det ikke observert noen signifikant forskjell, men en trend hvor nivåene var høyere i DSS-eksponerte grupper. Tilsvarende resultater ble observert for distal tykktarm. Videre ble ikke påvist noen signifikant forskjell i ekspresjon mellom VT og *NOX1*KO, verken med eller uten DSS-behandling. Toveis ANOVA avdekket ingen interaksjonseffekter mellom DSS-eksponering og genotype, kun hovedeffekt av DSS på ekspresjon av samtlige gener.

Etter den innledende analysen, ble det sett på hvor mange ganger hvert gen ble oppregulert med DSS, slik det ble gjort for pilot- og etableringsforsøket (figur 3.14). Forskjellen fra de to andre forsøkene, var at vi her hadde *to* kontrollgrupper (VT og *NOX1*KO) og *to* DSS-grupper (VT DSS og *NOX1*KODSS). Ekspresjonsdata for VT(DSS) ble derfor normalisert til gjennomsnittlig ekspresjon for VT, mens *NOX1*KO(DSS) ble normalisert til *NOX1*KO. I tråd med den innledende analysen, viste VT DSS og *NOX1*KODSS signifikant oppregulering av samtlige inflammasjonsrelaterte gener. Men med unntak av *TNF $\alpha$* , viste sammenligning av VT DSS og *NOX1*KODSS at oppreguleringen var lik for de to gruppene. Det ble heller ikke observert noen forskjeller i oppregulering mellom proksimal og distal tykktarm.

Oppsummert viste analysen, at de inflammasjonsrelaterte genene var

- (1) Oppregulert i DSS-eksponerte grupper sammenlignet med kontroll.
- (2) Tilsvarende oppregulert i VT DSS og *NOX1*KODSS innad i tykktarmssegmentene, med unntak av *TNF $\alpha$*  i proksimal tykktarm.
- (3) Tilsvarende oppregulert i proksimal og distal tykktarm for begge DSS-eksponerte grupper.

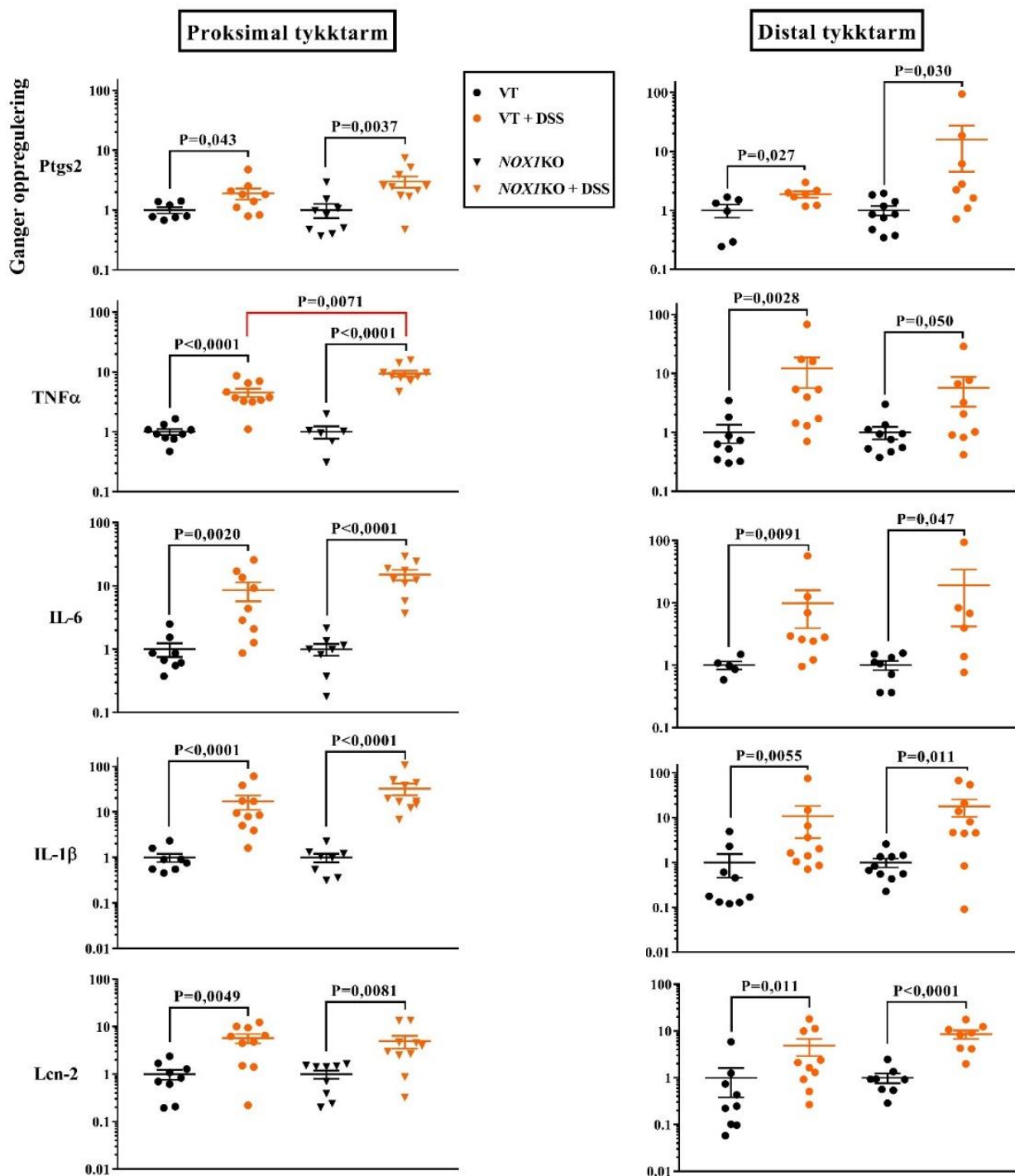
## RESULTATER



**Figur 3.13 mRNA-nivåer for inflammasjonsrelaterte gener i KO-forsøk**

mRNA-nivåer for inflammasjonsrelaterte gener (*Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *Lcn-2*) i slimhinne fra proksimal og distal tykktarm i KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n = 5-10). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom eksperimentelle grupper innad i proksimal og distal tykktarm, analysert ved toveis ANOVA/Kruskal-Wallis med Tukeys/Dunns multiple sammenligningstest som posttest (p<0,05 som signifikanskriterium).

## RESULTATER



**Figur 3.14 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener i KO-forsøk**

Ganger oppregulering av mRNA fra inflammasjonsrelaterte gener (*Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *Lcn-2*) i slimhinne fra proksimal og distal tykktarm i KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n = 5-10). Sammenligninger ble gjort mellom VTDSS/NOX1KODSS og VT/NOX1KO, samt mellom VTDSS og NOX1KODSS. P-verdier ble kalkulert ved tosidig Students t-test, med eller uten Welch korreksjon. I tillegg ble VTDSS/NOX1KODSS mellom proksimal og distal tykktarm sammenlignet, ved bruk av tosidig, parvis Students t-test (ingen signifikante forskjeller). I alle tilfeller ble  $p < 0,05$  ansett som signifikant.



## RESULTATER

### 3.2.4 *NOX1* knockout gir ikke økt oppregulering av ROS-relaterte gener

Når proteinet *NOX1* ikke dannes i cellen, blir det produsert mindre ROS. Siden mye tyder på at *NOX1*-generert ROS har viktige funksjoner, kan det derfor tenkes at kroppens celler vil kompensere ved økt produksjon av andre ROS-genererende proteiner. For å undersøke dette, ble mRNA-ekspressjon av ROS-relaterte gener analysert på samme måte som for inflammasjonsrelaterte gener (se delkapittel 3.2.3 for detaljer). Det ble først sett på mRNA-nivåer for alle eksperimentelle grupper (figur 3.15, p-verdier i tabell F.5 i bilag F), og deretter på «ganger oppregulering» i DSS-gruppene sammenlignet med deres korresponderende kontrollgrupper (figur 3.16).

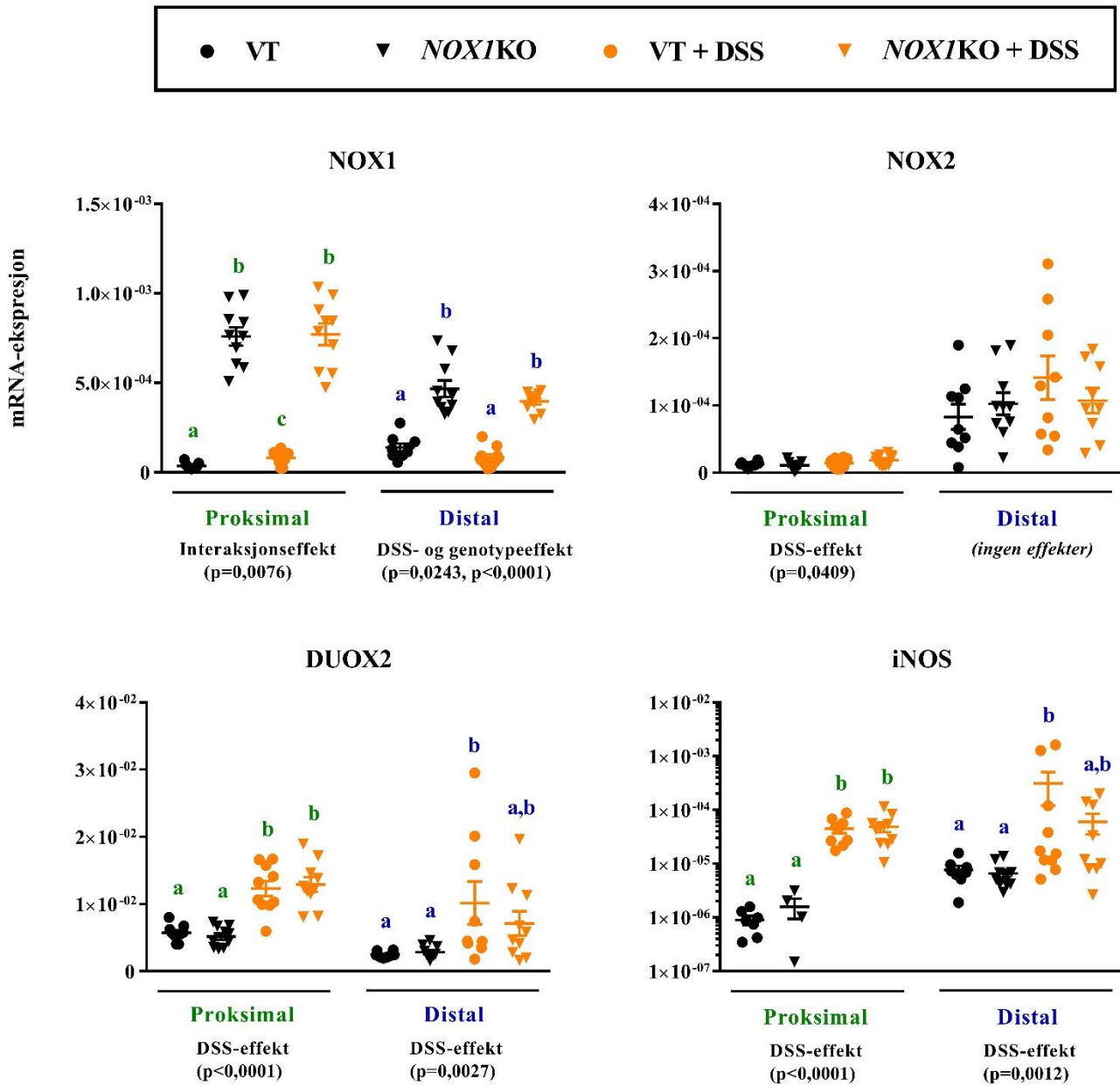
Heller ikke for de ROS-relaterte genene ble det observert noen interaksjonseffekt av DSS og genotype på mRNA-nivåer, analysert ved toveis ANOVA. I overensstemmelse med observasjoner fra etableringsforsøket, førte DSS-eksponering til signifikant oppregulering av *DUOX2* og *iNOS* i begge DSS-gruppene. For *NOX2* ble det observert en signifikant, men beskjeden oppregulering for *NOX1*KODSS i proksimal tykktarm. Til forskjell fra de andre forsøkene, ble det observert en signifikant, men svak, oppregulering av *NOX1* i DSS-eksponerte villtypemus. Hvis man ser bort fra *NOX1*, som i *NOX1* knockoutmus ikke koder for et funksjonelt protein, ble det ikke observert noen forskjeller mellom VTDSS og *NOX1*KODSS, verken i mRNA-nivåer eller oppregulering.

For både VTDSS og *NOX1*KODSS, var oppreguleringen av *iNOS*, relativ til deres korresponderende kontrollgrupper, høyere i proksimal enn distal tykktarm. Det samme gjaldt for *NOX1* i VTDSS-gruppen. Dette betyr likevel ikke at ekspressjonen i seg selv (dvs. mRNA-nivåene) var høyere i proksimal tykktarm, noe vi kommer tilbake til i neste delkapittel.

Oppsummert viste analysen av de ROS-relaterte genene, at

- (1) *DUOX2* og *iNOS* ble oppregulert for både VTDSS og *NOX1*KODSS, mens *NOX2* kun ble oppregulert for *NOX1*KODSS i proksimal tykktarm.
- (2) *NOX1* viste svak oppregulering for VTDSS i proksimal tykktarm.
- (3) Graden av oppregulering varierer mellom tykktarmssegmenter for enkelte gener.

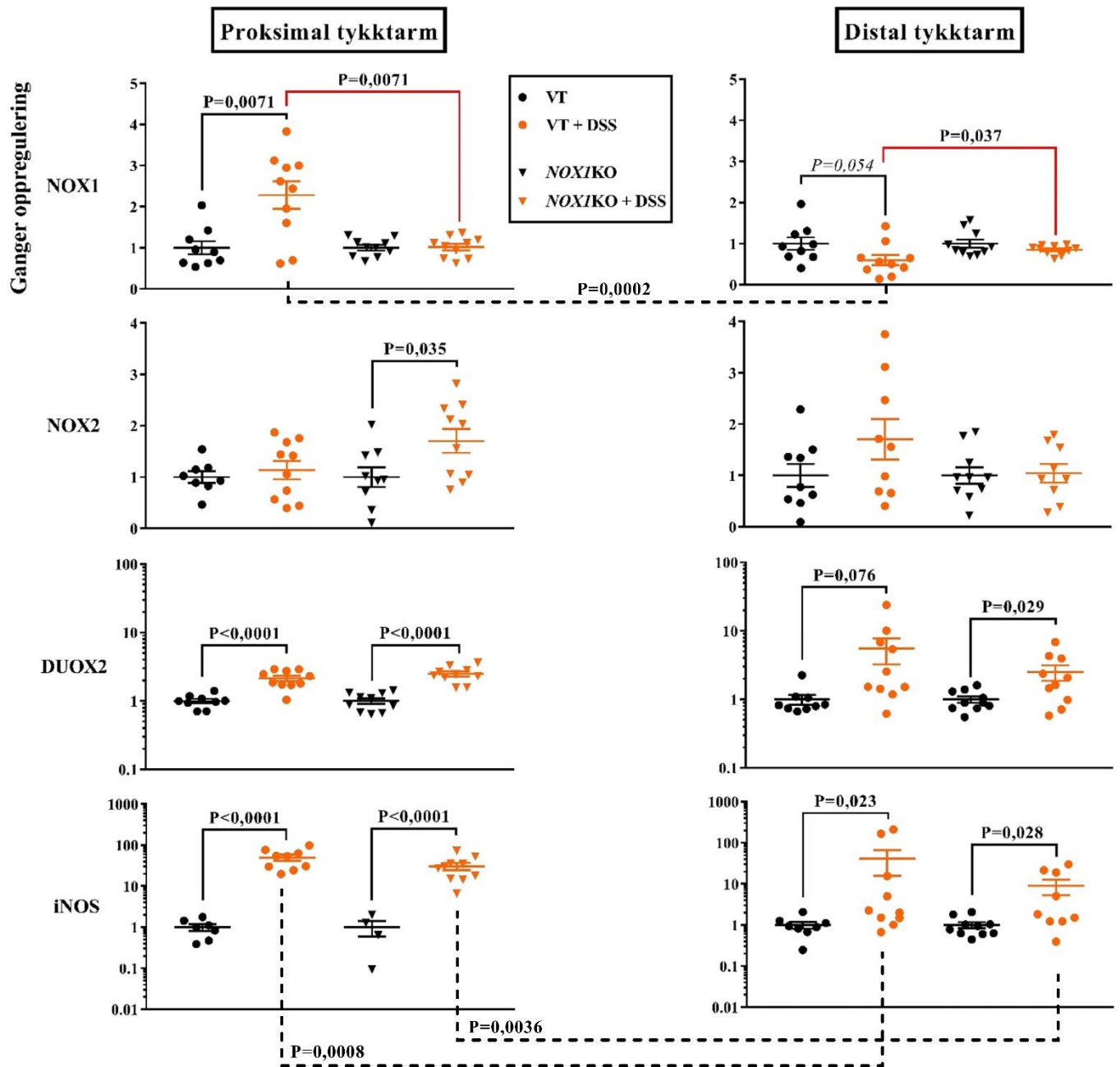
## RESULTATER



**Figur 3.15 mRNA-nivåer for ROS-relaterte gener i KO-forsøk**

mRNA-nivåer for ROS-relaterte gener (*NOX1*, *NOX2*, *DUOX2*, *iNOS*) i slimhinne fra proksimal og distal tykktarm i KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM ( $n = 4-10$ ). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom eksperimentelle grupper innad i proksimal og distal tykktarm, analysert ved toveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest ( $p<0,05$  som signifikanskriterium).

## RESULTATER



**Figur 3.16 Oppregulering av mRNA-ekspresjon av ROS-relaterte gener i KO-forsøk**

Ganger oppregulering av mRNA fra ROS-relaterte gener (*NOX1*, *NOX2*, *DUOX2*, *iNOS*) i slimhinne fra proksimal og distal tykktarm i KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n = 4-10). Sammenligninger ble gjort mellom VT/DSS/*NOX1KO*/DSS og VT/*NOX1KO*, samt mellom VT/DSS og *NOX1KO*/DSS. P-verdier ble kalkulert ved tosidig Students t-test, med eller uten Welch korreksjon, eller ved tosidig Mann-Whitney test. I tillegg ble VT/DSS/*NOX1KO*/DSS mellom proksimal og distal tykktarm sammenlignet, ved bruk av tosidig, parvis Students t-test. I alle tilfeller ble p<0,05 ansett som signifikant.

### 3.2.5 Genekspresjon – proksimal versus distal tykktarm

Siden det ble tatt slimhinneprøver fra både proksimal og distal tykktarm, gav dette mulighet for å sammenligne nivåene av mRNA i de to segmentene, for de ulike eksperimentelle gruppene. Forskjellen fra de tidligere beskrivelsene er at vi her ser på mRNA-nivåene i seg selv, og ikke «ganger oppregulering».

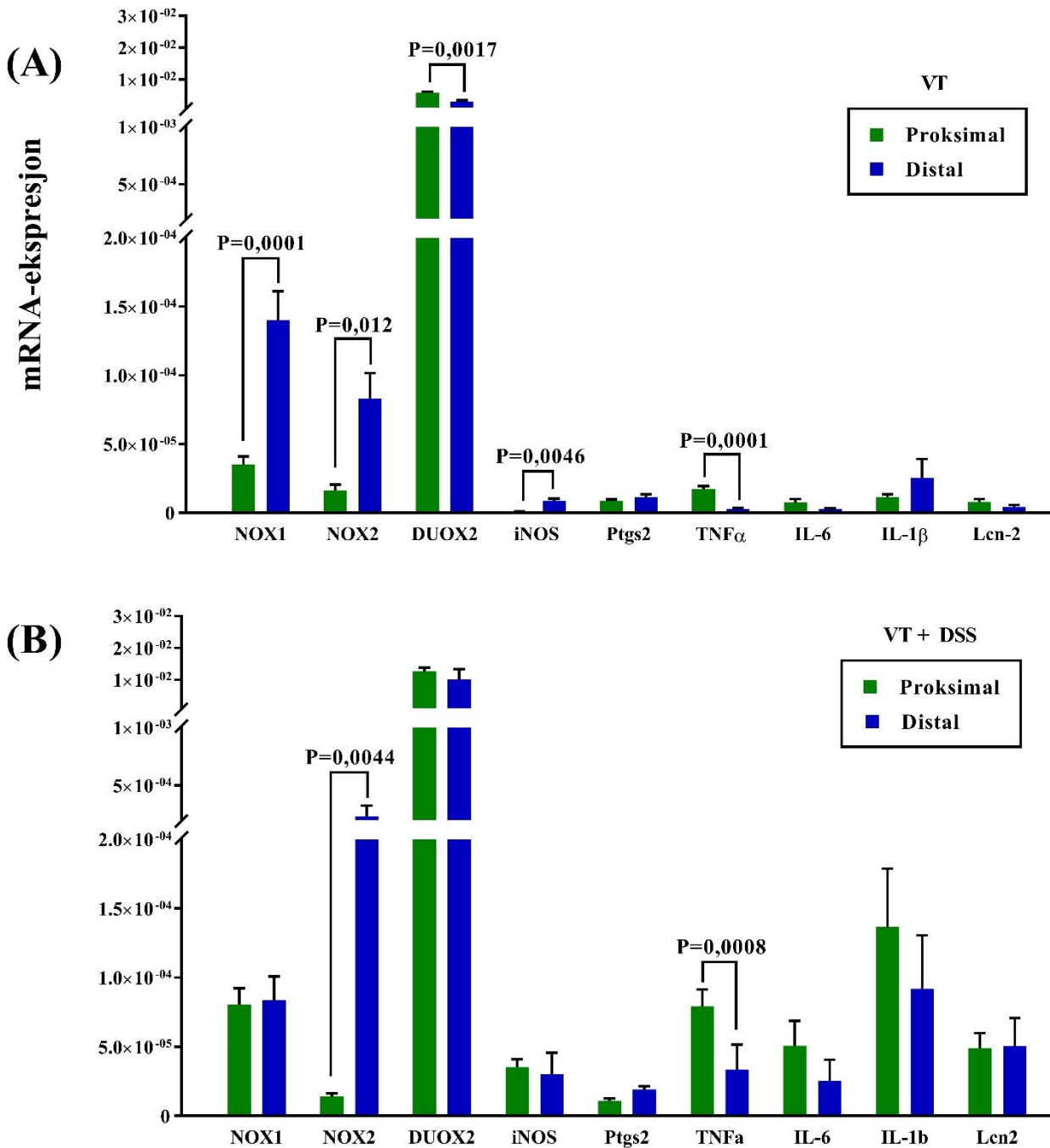
Figur 3.17 A/B viser mRNA-nivåene for henholdsvis VT og VTDSS. I fravær av DSS-eksponering, var alle de ROS-relaterte genene uttrykt signifikant forskjellig i de to tykktarmssegmentene. *NOX1*, *NOX2* og *iNOS* var høyere uttrykt i distal tykktarm, mens det motsatte var tilfelle for *DUOX2*. Med DSS-eksponering ble disse forskjellene derimot jevnet ut, med unntak av *NOX2*. Årsaken til utjevningen kan forklares med at *NOX1* og *iNOS* viste høyere oppregulering i proksimal tykktarm, som beskrevet tidligere. Av de inflammasjonsrelaterte genene, var kun *TNF $\alpha$*  uttrykt forskjellig i tykktarmssegmentene, med høyere ekspresjon i proksimal tykktarm. Denne forskjellen ble større med DSS-eksponering.

Figur 3.17 C/D viser mRNA-nivåene for henholdsvis *NOX1KO* og *NOX1KODSS*. Som for VT, var de ROS-relaterte genene uttrykt forskjellig i proksimal og distal tykktarm for *NOX1KO*. Kun *iNOS*-uttrykket jevnet seg ut mellom tykktarmssegmentene med DSS-eksponering. I fravær av DSS-eksponering var *IL-6* og *Lcn-2* uttrykt signifikant forskjellig i proksimal og distal del, men disse forskjellene ble utjevnet med DSS. I tillegg ble det observert stor forskjell i *TNF $\alpha$* -ekspresjon, der uttrykket var størst i proksimal tykktarm.

Oppsummert viste ekspresjonsanalysen av proksimal og distal tykktarm at

- (1) I normalt tilstand er ROS-relaterte gener uttrykt forskjellig i proksimal og distal tykktarm, der nivåene av *NOX1*, *NOX2* og *iNOS* er høyest i distal tykktarm.
- (2) Forskjellene i *NOX1* og *iNOS* utjevnes med DSS-eksponering.
- (3) Inflammasjonsrelaterte gener viser ikke høyere uttrykk i distal tykktarm, verken med eller uten DSS-behandling.

## RESULTATER

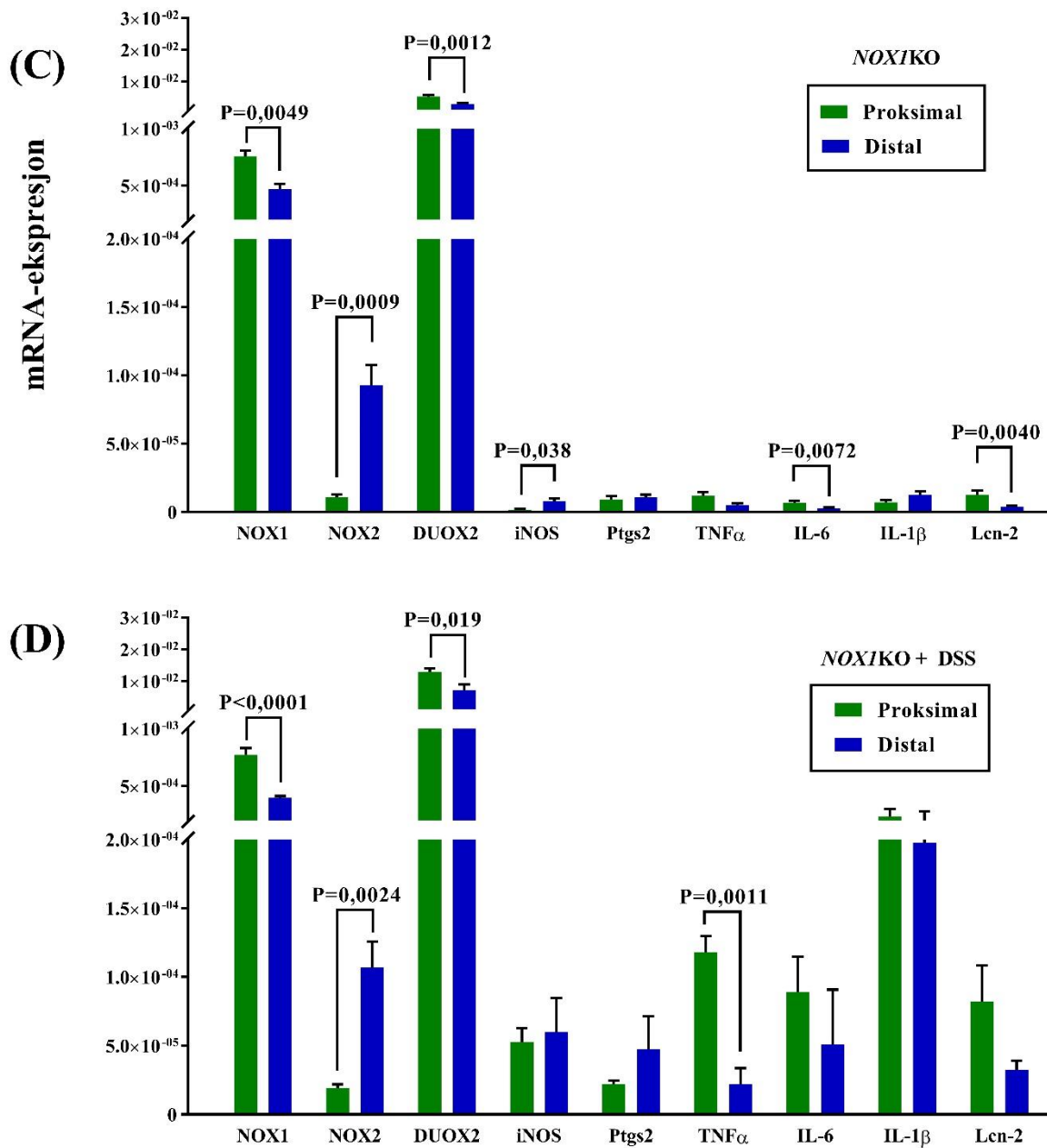


**Figur 3.17 Sammenligning av mRNA-nivåer i proksimal og distal tykktarm**

mRNA-nivåer for ROS- (*NOX1*, *NOX2*, *DUOX2*, *iNOS*) og inflammasjonsrelaterte (*Ptgs2*, *TNFα*, *IL-6*, *IL-1β*, *Lcn-2*) gener i slimhinne fra proksimal og distal tykktarm for VT (A), VTDSS (B), *NOX1KO* (C) og *NOX1KODSS* (D). Variasjon er uttrykt ved SEM (n=4-10). Sammenligninger ble gjort mellom proksimal og distal tykktarm for hvert gen, innad i hver eksperimentelle gruppe, ved tosidig, parvis Students t-test ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium).

*Figur fortsetter på neste side*

## RESULTATER



Figur 3.17 Fortsettelse fra forrige side

## RESULTATER

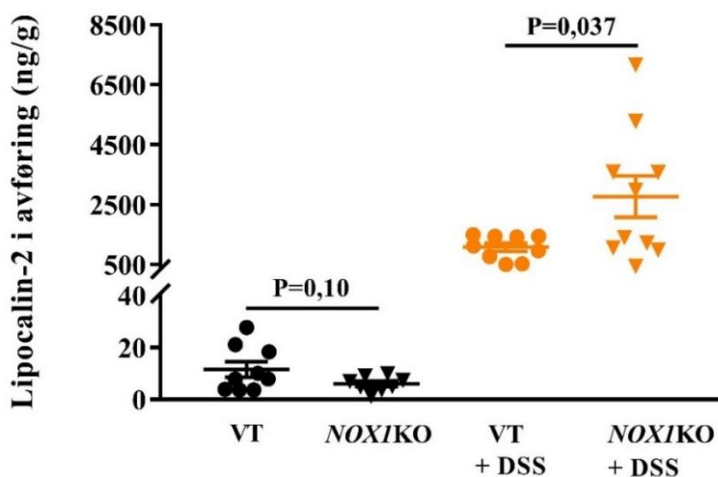
### 3.2.6 *NOX1* knockout påvirker Lcn-2-nivåer ved mild inflammasjon

I tillegg til ekspresjonsanalyse av inflammasjonsrelaterte gener (mRNA), ble det testet om nivåer av proteinet Lcn-2 i avføring kan fungere som en bedre indikator for mild inflammasjon i tykktarm. Tilsvarende DSS-forsøk har tidligere vist at Lcn-2 i avføring er en svært sensitiv markør for inflammasjon i tarm, med en oppregulering på mer enn 10 og 10000 ganger for henholdsvis 0,25 og 4% DSS i drikkevann (Chassaing et al., 2012).

Lcn-2 i avføring innhentet på dag 6 av KO-forsøk ble målt ved bruk av ELISA. Toveis ANOVA avdekket signifikant interaksjonseffekt ( $p=0,04$ ) mellom DSS og genotype. Dette betyr at observerte forskjeller mellom gruppene ikke er avhengig av behandling (kontroll/DSS) eller genotype alene, men at observerte forskjeller mellom behandlinger er avhengig av dyrenes genotype.

Som vist i figur 3.18, var nivået av Lcn-2 i avføring fra DSS-gruppene markant høyere sammenlignet med deres korresponderende kontrollgrupper, henholdsvis ca. 85 og 450 ganger oppregulert for VTDSS og *NOX1*KODSS. Ved statistisk sammenligning innad i hver behandling, ble det påvist signifikant forskjell mellom VTDSS og *NOX1*KODSS, hvor sistnevnte hadde omtrent 2,6 ganger høyere nivå av Lcn-2.

Til sammen gav analysen av Lcn-2 støtte til hypotesen om at *NOX1* har en positiv effekt under mild inflammasjon. Det bør likevel poengteres at det var stor variasjon innad i *NOX1*KODSS.



Figur 3.18 Lipocalin-2 i avføring fra KO-forsøk

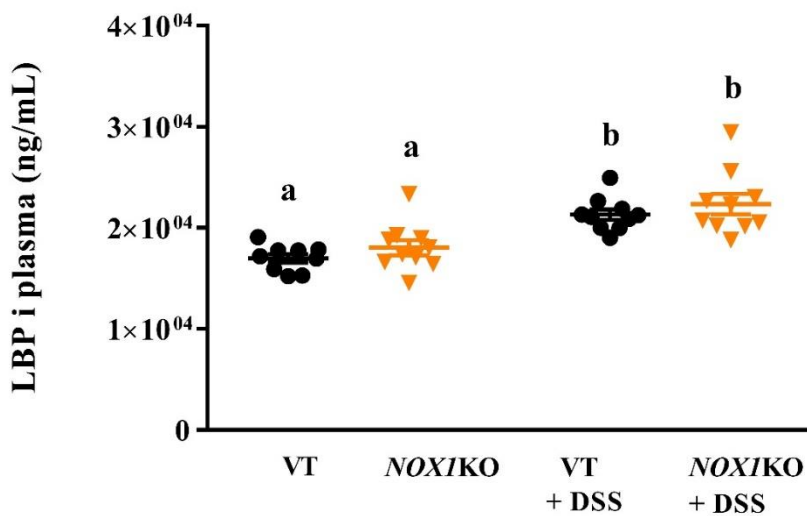
Lipocalin-2 i avføring (ng/g) på dag 6 av KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM ( $n=9,8,9,10$ ). P-verdier ble kalkulert ved tosidig Students t-test innad i hver behandling (vann med/uten DSS), med Welchs korreksjon for ulikt SD i gruppene.  $P<0,05$  ble ansett som signifikant.

## RESULTATER

### 3.2.7 *NOX1* knockout påvirker ikke LBP-nivåer i plasma

For å undersøke i hvilken grad fraværet av *NOX1* påvirker barrierefunksjonen (gjennomtrengeligheten) til slimhinnen i tykktarm, ble det utført LBP ELISA på plasma innhentet på dag 6 av KO-forsøket. Forhøyede nivåer av LBP i plasma er en god indikasjon på forhøyede LPS-nivåer, noe som igjen tyder på svekket barrierefunksjon der LPS har passert tykktarmens slimhinne og entret blodet. Hypotesen var at *NOX1*-generert ROS bidrar til opprettholdelse av denne barrierefunksjon.

Som forventet, ble det observert en klar forskjell mellom DSS-gruppene og deres korresponderende kontrollgrupper (figur 3.19). Det ble imidlertid ikke påvist noen signifikant forskjell mellom VT DSS og *NOX1*KODSS, verken med eller uten DSS-eksponering.



**Figur 3.19 LBP i plasma fra KO-forsøk**

LBP-nivåer i plasma (ng/mL) innhentet ved hjertepunktur på dag 6 av KO-forsøk. Variasjon innad i gruppene er uttrykt ved SEM (n=9,10,10,10). Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell analysert ved toveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest ( $p < 0,05$  som signifikanskriterium).



## 4 DISKUSJON

---

Selv om utvikling av tarmsykdom som ulcerøs kolitt og tarmkreft har blitt assosiert med forhøyet produksjon av ROS, har andre studier derimot vist at NOX1-generert ROS kan ha positive effekter, deriblant ved restitusjon av epitel i etterkant av skade. I tillegg har det blitt observert forhøyede nivåer av ROS ved svak irritasjon av tarm, men uten at kilden til den forhøyede ROS-produksjonen ble nærmere bestemt.

Hensikten med dette prosjektet var derfor å undersøke rollen til NOX1 i tykktarm, i en situasjon hvor tarmen har blitt utsatt for en mild irritasjon. Nærmere bestemt ville vi undersøke om NOX1-generert ROS har en positiv eller negativ effekt på inflammasjon og barrierefunksjon i den gitte situasjonen.

Gjennom prosjektet ble det vist at fravær av NOX1 i liten grad påvirker synlig sykdomsgrad, ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener eller tarmbarrierens gjennomtrengelighet for bakterielle produkter som LPS, ved lavgrads inflammasjon. På den andre siden ble det observert forhøyede verdier av inflammasjonsmarkøren Lcn-2 i avføring i *NOX1* knockoutmus sammenlignet med villtype, samt at produksjonen av ROS ble kraftig redusert.

I dette kapittelet vil følgende punkter diskuteres ytterligere:

- Hvilke observasjoner som ble gjort og hvilke lærdommer som ble tilegnet under etableringsprosessen av inflammasjonsmodellen.
- Hvordan NOX1 bidrar til observert ROS-signal fra tykktarm.
- Hvordan fravær av NOX1 påvirket tarmbarrierens gjennomtrengelighet, sykdomsgrad og inflammasjon i den etablerte modellen.
- Mulige tolkninger av forhøyede Lcn-2-nivåer i avføring fra *NOX1* knockoutmus sammenlignet med villtype.
- Motivasjonen for sammenligning av genekspressjon i proksimal og distal tykktarm.
- Metodologiske betraktninger.
- Den naturlige veien videre.

## 4.1 ETABLERING AV LAVGRADS INFLAMMASJONSMODELL I TYKKTARM

Formålet med prosjektets første del, var å etablere en lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm. Med uttrykket «lavgrads inflammasjon» menes her en tilstand hvor tykktarmsepitelet har blitt utsatt for en mild DSS-indusert irritasjon som resulterer i en svak oppregulering av typiske inflammasjonsrelaterte gener, samtidig som dyrene viser få eller ingen synlige tegn på sykdom. I den sammenheng ble det gjennomført to dyreforsøk, hvor til sammen DSS-dosene 0,5, 1, 2 og 4 % i drikkevann ble testet. 4 og 2 % DSS i pilotforsøket (6 dager) og 0,5, 1 og 2 % DSS i etableringsforsøket (8 dager). Basert på evaluering av synlig sykdomsgrad og mRNA-ekspressjon av inflammasjonsrelaterte gener, ble det klart at eksponering for 1 % DSS i drikkevann i 6 dager ville være tilstrekkelig for induksjon av den ønskede tilstanden.

I etableringsforsøket viste 1 % DSS-gruppen enkelte endringer i avføringskvalitet etter 6 dagers eksponering. Av den grunn ble det besluttet å redusere forsøkets lengde fra 8 til 6 dager i KO-forsøket, siden synlig sykdom ikke var ønsket.

Til pilotforsøket ble det brukt relativt høye konsentrasjoner av DSS i drikkevann (2 og 4 %). Selv om effekten av høye doser ikke var av primær interesse, var et slikt forsøk viktig av to årsaker. For det første var det ikke blitt gjennomført DSS-forsøk ved denne dyrefasiliteten tidligere, og direkte sammenligninger av andres erfaringer er vanskelig fordi oppstallingsmiljøet (mikrobiell status, dyrepleier, lysforhold, temperatur, o.l.) kan variere mellom ulike forsøksdyrenheter og innvirke på resultatet. Spesielt har tarmmikrobiotaen i dyrene vist seg å være avgjørende (Li et al., 2017; Roy et al., 2017). For det andre kan kvaliteten på innkjøpt DSS varierer mellom ulike merker/batcher (Bamba et al., 2012; Chassaing et al., 2014). Av den grunn er det standard prosedyre å teste ut ulike DSS-doser i et pilotforsøk. Som forventet gav eksponering for 4 % DSS kraftige, synlige symptomer på kolitt. Nokså uventet, viste dyrene i 2 % DSS-gruppen få symptomer på sykdom, hovedsakelig i form av endret avføringskvalitet. Genekspresjonsanalysen bekreftet likevel sterk respons på 2 % DSS, i form av oppregulering av inflammasjonsrelaterte gener. Årsaken til at dyrene i 4 % DSS-gruppen viste svakere, og for to av tre gener ikke-signifikant oppregulering, er uklar, men lignende observasjoner har blitt gjort av andre (Egger et al., 2000).

## DISKUSJON

For å avgjøre hvilken DSS-dose som var optimal for induksjon av lavgrads inflammasjon, ble oppregulering av de inflammasjonsrelaterte genene *Ptgs2*, *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6* og *Lcn-2* målt i slimhinneprøver fra tykktarm. Disse genene skulle i hovedsak fungere som robuste inflammasjonsmarkører, og ikke for videre tolkning av spesifikke signalveier. For de cytokin-kodende genene (*TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-6*) er videre tolkninger spesielt vanskelig, da disse skilles ut av og virker på en rekke ulike celletyper (Beck & Wallace, 1997; Zhang & An, 2007). Ved å sammenligne ekspresjonsdataene for de ulike markørene i etableringsforsøket, pekte *TNF $\alpha$*  seg ut som en spesielt egnet markør for lavgrads inflammasjon, da det ble observert signifikant forskjell mellom alle DSS-eksponerte grupper sammenlignet med kontroll.

I forhold til de ROS-relaterte genene, ble det observert oppregulering av *iNOS* ved alle DSS-doser, utenom 0,5 %. Videre ble *NOX2* signifikant oppregulert med 2 % DSS i etableringsforsøket, men ikke i pilotforsøket. Dette kan skyldes varigheten av DSS-behandling, hvor forlenget eksponering kan gi økt infiltrasjon av NOX2-aktive immunceller. For *NOX1* ble det ikke observert oppreguleringen i noen av forsøkene. Dette stemmer overens med hva andre har observert (Ramonaitė et al., 2014). Siden veien er lang mellom mRNA-ekspressjon og aktivt protein, kan det derfor være en idé å måle proteinmengde, eller i alle fall inkludere mRNA-målinger av NOX1s aktiverende underenheter. Immunfarging av epitelvev har for eksempel vist økt forekomst av NOX1-protein etter eksponering med 2 % DSS (Kato et al., 2016).

Under pilotforsøket ble det utført både *in vivo*- og *ex vivo*-avbildning med den ROS-spesifikke proben L-012. Med *in vivo*-avbildningen ønsket vi å følge den tidsavhengige produksjonen av ROS, i takt med at inflammasjonsgraden i tykktarmen til dyrene økte. Hypotesen var at ROS-produksjonen, og da også L-012-signalet, ville øke i takt med sykdomsutviklingen. Metoden viste seg derimot å være uegnet til dette formålet på grunn av stor variasjon mellom dyrene, i samsvar med hva andre har konkludert tidligere (Asghar et al., 2014). Dette betyr likevel ikke at *in vivo*-avbildning med L-012 er uegnet til måling av ROS generelt, da man har oppnådd tilfredsstillende resultater med andre inflammasjonsmodeller, som ved LPS-indusert inflammasjon (Kielland et al., 2009) og genetiske modeller som K8 KO og NOD-mus (Asghar et al., 2014). I disse modellene ble det derimot ikke gjort repeterte målinger over lenger tidsperioder. På tross av store variasjoner mellom dyrene, foreslo Asghar og kollegaer at *in vivo*-avbildning med L-012 i DSS-modellen (2 % DSS, 8 dager), kan fungere som en tidlig markør for kolitt, ettersom de observerte en trend der signalet steg de første dagene med DSS-eksponering, før det falt igjen mot dag 8

## DISKUSJON

(Asghar et al., 2014). I vårt forsøk ble det observert lignende trender for hanndyr, men ikke for hunddyr. De store variasjonene gjør det uansett vanskelig å trekk en entydig konklusjon. Bruk av et større antall dyr kunne ha gitt et klarere bilde. I tillegg ville det vært nyttig å gjøre flere avbildninger ved normaltilstand (uten DSS-eksponering) for å få et bedre innblikk i hvordan signalet da varierer. En siste bemerkning i forhold til *in vivo*-avbildning, er at man ikke vet nøyaktig hvor signalet kommer fra. For å få mer lokasjonsspesifikk informasjon, bør derfor *ex vivo*-avbildning benyttes.

Ved *ex vivo*-avbildning av tykktarm, skilte 4 % DSS-gruppen seg tydelig fra de øvrige. Hvorfor signalet i 2 % DSS-gruppen ikke skilte seg fra kontrollgruppen er uklart, spesielt med tanke på at både 2 og 4 % DSS førte til kraftig oppregulering av *iNOS*. Som tidligere forklart, kan *iNOS*-generert nitrogenoksid danne peroksinitt gjennom reaksjon med superoksid. Videre, siden L-012 trolig er sensitiv for peroksinitt, ville man da forventet et høyt L-012-signal, også i 2 % DSS-gruppen. En mulig forklaring kan være at L-012 også reagerer med hypoklorsyre, som dannes ved reaksjon mellom klor og hydrogenperoksid. Denne reaksjonen katalyseres av enzymet MPO, som er aktivt ved inflammasjon. Andre har vist at MPO-aktiviteten i tykktarmsvev øker ved DSS-eksponering (Alex et al., 2009; Banerjee et al., 2015; Chassaing et al., 2012; Mitrovic et al., 2010; Yan et al., 2009), men sammenligning av 2 og 4 % DSS-eksponering med hensyn på MPO-aktivitet, har så vidt vi vet ikke blitt undersøkt tidligere. *Ex vivo*-avbildning med L-012 har heller ikke tidligere blitt brukt til å måle ROS-produksjon i DSS-modellen.

Den kanskje viktigste erfaringen fra etableringsprosessen, var at det kan være stor variasjon i hvordan dyrene reagerer på den samme DSS-dosen. I pilotforsøket gikk dyrene i 2 % DSS-gruppen ned maksimalt 5 % i vekt, mens vekttapet i etableringsforsøket varierte fra 5-29 %. Store variasjoner mellom dyrene har også blitt påpekt som en ulempe ved DSS-modellen av andre (Jiminez et al., 2015; Low et al., 2013). Variasjonen mellom forsøkene kunne blitt forklart med varigheten av DSS-eksponering, hadde det ikke vært for at dyrene i 2 % DSS-gruppen i etableringsforsøket begynte å gå ned i vekt allerede fra dag 4. Hvis man antar at dyrene i våre forsøk har blitt utsatt for det samme miljøet, kan en mulig forklaring være ulikt inntak av DSS. Under forsøkene ble vanninntaket kontrollert for hvert bur, men ikke for hvert enkelt individ. Videre kan ulikt inntak av DSS kan også være med på å forklare de observerte variasjonene i ekspresjon av proinflammatoriske gener, samt ROS-relaterte gener som typisk blir oppregulert ved inflammasjon (*iNOS*, *DUOX2*, *NOX2*).

## 4.2 EFFEKT AV *NOX1* KNOCKOUT PÅ *EX VIVO*-AVBILDNING

Fravær av *NOX1* førte til reduksjon i L-012-signal, både ved normalt tilstand og ved DSS-eksponering. Videre ble det ikke observert noen forskjell mellom *NOX1KO* og *NOX1KODSS*, mens signalet var signifikant oppregulert etter DSS-eksponering i villtypemus. Det er derfor ingen tvil om at *NOX1*-generert ROS er en viktig bidragsyter til L-012-signalet. Lignende observasjoner har blitt gjort for TNBS-indusert tykktarmsinflammasjon (Yokota et al., 2017).

Ettersom *iNOS*, men ikke *NOX1*, ble kraftig oppregulert med DSS-eksponering, skyldes trolig det økte L-012-signalet i villtypemus økt produksjon av nitrogenoksid, og ikke superoksid. Fravær av signal i *NOX1KODSS* tyder videre på, at både *iNOS*- og *NOX1*-ekspressjon er nødvendig for kraftig L-012-signal ved DSS-eksponering. Til sammen gir dette en sterk indikasjon på at peroksintritt, dannet fra reaksjon mellom nitrogenoksid og superoksid, er det primære opphavet til signalet. Lignende funn har også blitt gjort av andre, ved bruk av *iNOS* og *NOX1* knockoutmus (Matziouridou et al., 2017).

Som tidligere diskutert for *ex vivo*-avbildning under pilotforsøk, kan vi ikke være helt sikre på at L-012-signalet kun stammet fra peroksintritt, siden tidligere studier har vist at MPO har økt aktivitet ved 1 % DSS-indusert inflammasjon (Chassaing et al., 2012). Den store forskjellen mellom *VTDSS* og *NOX1KODSS*, og fravær av økt signal i knockoutmus etter DSS-eksponering, gir likevel en sterk indikasjon på at peroksintritt er hovedkilden til signalet i vårt forsøk. Dette støttes av at farmakologisk blokkering av NO-produksjon med L-NAME fjerner L-012-signal fra tarm ved LPS-indusert inflammasjon (Kielland et al., 2009).

### 4.3 EFFEKT AV *NOX1* KNOCKOUT PÅ TARBARRIERENS GJENNOMTRENGELIGHET

For å evaluere om fravær av *NOX1* bidro til svekket tarmbarriere i form av økt gjennomtrengelighet for bakterielle produkter, ble nivåene av proteinet LBP målt i plasma. Vi observerte at eksponering for 1 % DSS i seg selv førte til signifikant oppregulering av plasma-LBP, men at det ikke var noen signifikant forskjell mellom *NOX1*KODSS og VTDSS. Det ble heller ikke observert noen trend hvor nivåene fra høyere for knockoutmus.

Selv med signifikant oppregulering etter DSS-eksponering, bør det likevel poengteres at oppreguleringen var marginal, hvor nivåene ikke engang var doblet. Lignende DSS-forsøk (2,5 %) har vist både signifikant oppregulering (Wolk et al., 2007) og ingen forskjell i LBP-nivåer (Zhang et al., 2016), i henholdsvis BALB/c og C57BL/6J etter 7 og 5 dagers DSS-eksponering. Til sammen kan det derfor stilles spørsmålsteget ved om måling av LBP i plasma er en sensitiv nok metode for å påvise eventuelle forskjeller mellom *NOX1* knockout- og villtypemus, når tykktarm kun utsettes for mild irritasjon.

### 4.4 EFFEKT AV *NOX1* KNOCKOUT PÅ SYKDOMSGRAD OG INFLAMMASJONSMARKØRER

For å vurdere inflammasjonsgrad hos dyr i KO-forsøket, ble synlig sykdomsgrad evaluerte, ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener analysert, og nivåer av inflammasjonsmarkøren Lipocalin-2 målt i avføring. Kort oppsummert gjorde vi følgende observasjoner:

- Ingen forskjeller i synlig sykdomsgrad mellom *NOX1* knockout- og villtypemus.
- Minimale forskjeller i ekspresjon av inflammasjonsrelaterte gener mellom *NOX1* knockout- og villtypemus.
- Forhøyet oppregulering av Lcn-2 i avføring fra *NOX1* knockoutmus sammenlignet med villtype.

### **Evaluering av synlig sykdomsgrad**

Som forventet, ble det ikke observert noen forskjeller mellom *NOX1* knockout- og villtypemus i fravær av DSS-eksponering. Ved bruk av ulike DSS-doser (2-5 %), observert Treton og kollegaer at *NOX1* knockoutmus ikke skiller seg fra villtypemus med tanke på reduksjon i kroppsvekt eller andre synlige sykdomstegn (Treton et al., 2014). I samsvar med dette, observert heller ikke vi økt sykdomsgrad i knockoutmus sammenlignet med villtype etter DSS-eksponering. Mer spesifikt observert vi ingen endring i kroppsvekt for noen av gruppene, mens reduksjon i tykktarmslengde og endret avføringskvalitet var lik i begge grupper. I forhold til avføringskvalitet, ble det nok en gang demonstrert at respons på samme DSS-dose kan variere mellom dyr. I etableringsforsøket ble det observert endringer fra dag 6 med 1 % DSS, mens det i KO-forsøket ble observert endringer i enkelte dyr allerede fra dag 4. Som tidligere diskutert, kan dette skyldes ulikt inntak av DSS.

### **Genekspresjon**

Ved litteratursøk ble det ikke funnet andre studier som har sammenlignet mRNA-ekspressjon av inflammasjonsrelaterte gener mellom *NOX1* knockout- og villtypemus etter DSS-eksponering. Så vidt vi vet, er kun sammenligning ved normaltilstand tilgjengelig (Treton et al., 2014; Yokota et al., 2017). Det var derfor interessant å grundig analysere ekspresjonsdataene ved bruk av ulike statistiske strategier. Først ble mRNA-nivåene for hvert gen, innad i hvert tykktarmssegment (proksimal og distal), analysert ved toveis variansanalyse (ANOVA). Formålet med denne analysen, sammenlignet med å se på «ganger oppregulering», var å avdekke eventuelle interaksjonseffekter. For selv om statistisk testing mellom enkeltgrupper ikke viser signifikant forskjell, kan man ved bruk av ANOVA avdekke om det er interaksjonseffekter til stede. Dette var derimot ikke tilfelle for noen av inflammasjonsgenene, hvor det kun ble påvist signifikant hovedeffekt av DSS.

Videre ble ekspresjonsdataene normaliserte som tidligere beskrevet (VT(DSS) mot VT; *NOX1KO*(DSS) mot *NOX1KO*). Heller ikke dette avdekket forskjeller mellom knockoutmus og villtype, med unntak av en beskjeden økt oppregulering av *TNF $\alpha$*  i proksimal tykktarm for *NOX1KODSS*. Imidlertid observert vi en trend hvor *Lcn-2* var høyere oppregulert for *NOX1KODSS* i distal tykktarm, selv om forskjellen mellom DSS-gruppene ikke var signifikant. Videre ble den samme fremgangsmåten anvendt for analyse av de ROS-relaterte genene. Her var den eneste forskjellen mellom knockoutmus og villtype, en svak oppregulering av *NOX2* i *NOX1KODSS*, som var fraværende i VT(DSS)-mus.

**Lipocalin-2 i avføring**

Tidligere studier har vist at nivåer av proteinet Lcn-2 i avføringsprøver er en svært sensitiv markør for DSS-indusert tykktarmsinflammasjon, med DSS-doser fra 0,25 til 4 % (Chassaing et al., 2012). Vi valgte derfor å analysere Lcn-2 i avføring ved bruk av ELISA. Vår hypotese var at dette kunne avdekke forskjeller i inflammasjonsgrad mellom *NOX1*KODSS og VTDSS, som ikke kom frem ved mRNA-analysen. I tråd med andres funn (Chassaing et al., 2012), observerte vi en markant oppregulering av Lcn-2 med 1 % DSS-eksponering. Gjennomsnittlig oppregulering var på henholdsvis 85 og 450 for VTDSS og *NOX1*KODSS.

Stor variasjon innad i DSS-grupper sammenlignet med kontrollgrupper, gjorde det vanskelig å stadfeste om det var en reell forskjell mellom gruppene. I første omgang ble det forsøkt toveis ANOVA, slik vi gjorde for genekspressjon. Men selv etter log-transformasjon og ekskludering av ekstremverdier, var variasjonen fortsatt for stor. Siden homogen variasjon i gruppene er en viktig antagelse ved variansanalyse (og andre statistiske modeller), kunne vi i liten grad «stole på» de kalkulerte p-verdiene. Videre antydet også analysen at det ikke var noen forskjell mellom de DSS-eksponerte gruppene. Variansanalysen gav uansett en viss indikasjon på interaksjonseffekt mellom DSS og genotype.

Dersom det forekommer interaksjonseffekter, er det mer hensiktsmessig å undersøke forskjeller mellom nivåer av én faktor, gitt den andre. I vårt tilfelle, vil det si å teste for signifikant forskjell mellom genotype, innad i de to behandlingene (kontroll/DSS). Ved denne metoden ble det avdekket en signifikant forskjell *NOX1*KODSS og VTDSS.

Det er kjent at Lcn-2 oppreguleres ved inflammasjon, slik at økt oppregulering kan tolkes som forhøyet inflammasjonsgrad. Men hva betyr dette for den videre tolkningen av våre resultater? Som tidligere beskrevet, hemmer Lcn-2 vekst av bakterier i tarmen ved å binde opp jern, og dermed gjøre det utilgjengelig for bakterier. I en omfattende studie utført av Singh og kollegaer, ble det videre vist at uttrykk av Lcn-2 i stor grad er avhengig av mikrobiotaen i tarmen, og at ved å fjerne Lcn-2 (ved bruk av *Lcn-2* KO-mus) endres det innbyrdes forholdet mellom ulike tarmbakterier betraktelig. Det ble også vist at Lcn-2 er viktig for rekruttering av nøytrofile granulocytter (Singh et al., 2016). For den videre diskusjonen av resultatene i denne oppgaven, er det faktum at oppregulering av Lcn-2 i stor grad er bakterielt indusert, det viktigste poenget.



## DISKUSJON

Med denne bakgrunnsinformasjonen kan følgende resonnement utledes i forhold til observerte Lcn-2-nivåer i vårt forsøk (figur 4.1): Den eneste markante forskjellen mellom knockoutmus og villtype i KO-forsøket, var økt oppregulering av Lcn-2 for *NOX1*KODSS. Siden den eneste *kjente* forskjellen mellom knockout- og villtypemusene, er produksjon av NOX1-generert ROS, er det derfor plausibelt å anta at økt oppregulering av Lcn-2 for *NOX1*KODSS skyldes manglende NOX1-generert ROS. Videre; siden Lcn-2 i stor grad avhenger av tilstedeværelsen av tarmmikrobiota, kan oppregulering av Lcn-2 tyde på økt kontakt mellom mikrobiotaen i lumen og epitelet (og eventuelt underliggende vev). Dersom denne antagelsen stemmer, kan høyere oppregulering av Lcn-2 i knockoutdyrene, sammenlignet med villtype, bety at tarmvevet har mer kontakt med mikrobiotaen i fravær av NOX1-generert ROS. I denne sammenheng er det viktig å påpeke at nivåene av Lcn-2 i knockoutmus kun skilte seg fra villtypemusene etter behandling med DSS. Dette kan bety at fravær av NOX1-generert ROS først utgjør en forskjell når tarmbarrieren også på annet vis har blitt svekket.



**Figur 4.1** Redusert ROS-produksjon resulterer i forhøyede Lcn-2-nivåer i avføring.

Nøyaktige hvordan NOX1-generert ROS er med på å hindre kontakt mellom bakterier og tarmvev, er derimot uklart. En mulig forklaring er at peroksintritt, dannet fra NOX1- og iNOS-generert ROS, har en viktig oppgave i å opprettholde forsvar mot bakterier i den etablerte modellen.

At NOX1/iNOS-generert peroksintritt er en viktig del av tarmens kjemiske barriere har tidligere blitt foreslått av andre (Matziouridou et al., 2017). Matziouridou og kollegaer studerte riktig nok mekanismen i ileum, hvor både *NOX1* og *iNOS* er høyt uttrykk ved normaltilstand. Argumentene bak gruppens teori var blant annet at (1) både iNOS og NOX1 var nødvendig for kraftig L-012-signal, (2) L-012 er en ekstracellulær markør, (3) fjerning av tarmmikrobiotaen ved bruk av antibiotika reduserte både iNOS- og NOX1-ekspressjon, og (4) at *NOX1* og *iNOS* knockoutmus hadde både økt bakteriemengde og endret innbyrdes sammensetning.

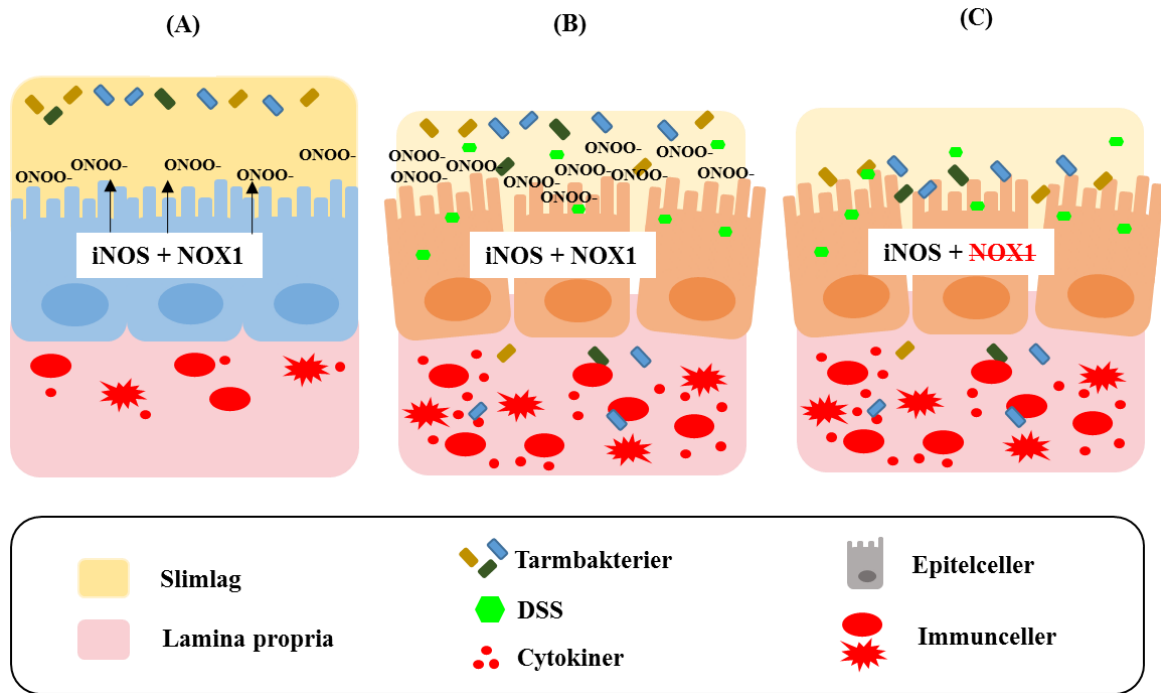
## DISKUSJON

I våre forsøk så vi også at L-012-signalet ble kraftig redusert i *NOX1* knockoutmus, mens DSS-eksponering gav kraftig økning av signal i villtypemus. Ved å bruke samme resonnement som Matziouridou og kollegaer, blir iNOS- og NOX1-generert ROS sannsynligvis skilt ut i tarmlumen, siden L-012 reagerer med ROS utenfor cellene. Dersom dette stemmer, kan man se for seg en situasjon som er illustrert i figur 4.2, hvor manglende dannelse av peroksinitritt i lumen fører til økt kontakt mellom bakterier og vev. Denne hypotesen er selvfølgelig svært spekulativ, og krever videre undersøkelser. Motargumenter kan for eksempel være at dersom NOX1-generert ROS er viktig for bekjempelse av bakterier i en situasjon hvor tarmbarrieren er svekket, hvorfor er ikke NOX1-ekspressjon i tykktarm avhengig av tarmmikrobiota, slik det har blitt illustrert i GF mus (Larsson et al., 2012). I tillegg har andre vist at *NOX1* knockoutmus er delvis beskyttet mot enkelte infeksjoner i tykk- og blindtarm, muligens som resultat av høyere forekomst av begerceller i epitelet (Chu et al., 2016; Pircalabioru et al., 2016). Til sammen utfordrer dette teorien om at NOX1-generert ROS er involvert i direkte forsvar mot bakterier når tarmbarrieren skades.

En alternativ teori kan være at fravær av NOX1-generert ROS fører til endret mikrobiotasammensetning, tilsvarende det som har blitt observert for ileum (Matziouridou et al., 2017). Når tarmbarrieren deretter pådrar seg skade som følge av DSS-eksponering, kan ulike mikrobiota i *NOX1* knockout- og villtypemus føre til ulike inflammasjonsrespons i vevet.

At mikrobiotasammensetningen er avgjørende for utfallet av DSS-eksponering har blitt demonstrert av andre (Li et al., 2017; Roy et al., 2017; Zhang et al., 2016). Li og kollegaer observerte eksempelvis signifikant forskjellige nivåer av Lcn-2 i avføring i ulike batcher av C57BL/6J-mus etter 7 dagers eksponering for 2,5 % DSS i drikkevann, hvor forskjellen ble begrunnet med ulike mikrobiotasammensetning i dyrene (Li et al., 2017). Det ville derfor vært svært interessant å analysere mikrobiotasammensetningen i *NOX1* knockout- og villtypemus under normale forhold og ved DSS-eksponering.

## DISKUSJON



**Figur 4.2** Illustrasjon av mulig hypotese

(A) Ved normalt tilstand er *NOX1* konstitutivt uttrykt i tykktarm, mens *iNOS* er svært lavt uttrykt. Det vil da dannes relativt lave, men målbare mengder peroksintritt.

(B) Ved DSS-indusert barrieresvekkelse får man en kraftig oppregulering av *iNOS*. Sammen med det konstitutive uttrykket av *NOX1*, kan man derfor forvente økt dannelse av peroksintritt i tarmlumen sammenlignet med normalt tilstand. Den svekkede barrieren, med invasjon av tarmbakterier i underliggende vev, trigger inflammatorisk respons i lamina propria.

(C) Når *NOX1* ikke uttrykkes, reduseres dannelsen av peroksintritt, selv om *iNOS* er høyt uttrykt. Dette kan bidra til det blir mer kontakt mellom epitelet og tarmbakteriene, indikert ved høyere nivåer av Lcn-2 i avføring fra *NOX1* knockoutmus, sammenlignet med villtype.

## 4.5 SAMMENLIGNING AV PROKSIMAL OG DISTAL TYKKTARM

Det ble innhentet slimhinneprøver fra både proksimal og distal tykktarm fra alle dyrene i KO-forsøket. Motivasjonen bak dette var i hovedsak to ting. For det første, har man ved tidligere DSS-forsøk (3,5 og 5 % DSS) observert at distal del av tykktarm pådrar seg større histologiske skader sammenlignet med proksimal del (Azuma et al., 2008; Yan et al., 2009), samt høyere uttrykk av proinflammatoriske gener (Yan et al., 2009). Det var derfor interessant å se om vi ville observere den samme effekten ved bruk av lavere DSS-dose. I forhold til KO-forsøket, hadde vi i tillegg følgende teori før forsøkets start: Siden bakteriemengden øker nedover i tarmen, virket det plausibelt at et sterkt forsvarssystem, som holder bakteriene i lumen på god avstand fra epitelet, er spesielt viktig i distal tykktarm. Det at for eksempel slimlaget som dekker epitelet i distal tykktarm hos mus har høyere viskositet enn i proksimal tykktarm, støtter denne teorien (Swidsinski et al., 2007). I tillegg kan tilsvarende gradient av *NOX1*-ekspresjon, tyde på at også *NOX1* har en rolle i dette forsvaret. Vi mistenkte derfor at fjerning av *NOX1* (i *NOX1* knockoutmus) ved DSS-eksponering, kunne gi større negative effekter i distal tykktarm, sammenlignet med proksimal.

Genekspresjonsanalysen avdekket derimot ingen slik effekt etter DSS-eksponering. Ingen av de inflammasjonsrelaterte genene viste høyere oppregulering i distal enn i proksimal tykktarm, og den var ingen markante forskjeller mellom i oppregulering mellom *NOX1*KODSS og VTDSS innad i tykktarmssegmentene. Lignende observasjoner ble gjort for de ROS-relaterte genene.

## 4.6 METODOLOGISKE BETRAKNINGER

Som tidligere beskrevet ble de brukte knockout- og villtypemusene avlet frem gjennom homozygot avl. Sammenlignet med heterozygot avl er dette enklere rent praktisk, men det kan også ha sine ulemper. For eksempel vil knockout- og villtypemusene kunne bli utsatt for ulikt miljø ved at de avles opp separat, som igjen kan gjøre villtypemusene uegnede som kontrolldyr. Med dette menes at eventuelle forskjeller mellom mus med ulik genotype, ikke nødvendigvis kan tilskrives genotypen, men heller miljøet de har blitt utsatt for. Ulikt miljø kan for eksempel føre til forskjeller i tarmmikrobiotaen. For å unngå slike problemer, ble forgjengerne til dyrene brukt i dette prosjektet blandet (3-4 uker) rett etter separasjon fra

## DISKUSJON

mødrene, slik at blant annet slimhinnene i tarmen har blitt usatt for de samme bakteriene (Matziouridou et al., 2017). I ettertid har også knockout- og villtypemusene blitt oppstallet ved samme betingelser (samme burstativ, håndtert av samme person), slik at de alltid har vært del av den samme hygieniske enheten. På det måten kan man være relativt trygg på at eventuelle forskjeller i tarmmikrobiotaen ikke skyldes eksponering for ulike miljøer, men heller at dyrenes spesifikke genotype er bestemmende for bakteriefloraen.

I tillegg til miljøforskjeller mellom knockout- og villtypemus, må eventuelle bur-effekter vurderes. Dersom man ønsker å betrakte hvert enkelt dyr i forsøket som en eksperimentell (uavhengig) enhet, bør dyrene plasseres alene i hvert sitt bur. På tross av dette, er det normalt å betrakte dyr som blir holdt i samme bur som uavhengige enheter ved statistisk analyse, selv om dette strengt tatt er feil. For å minimere bur-effekten, uten at dyr ble holdt alene, valgte vi å plassere maksimalt tre dyr i samme bur. Motivasjonen for å ikke holde dyr alene, er at dette kan føre til unødvendig stress for dyrene, som i verste fall kan påvirke resultatene (Kalliokoski et al., 2014).

Videre bør valg av dyrenes diett vurderes nøye (Pellizzon, 2016). I dette prosjektet var det viktig å bruke en diett som i seg selv ikke bidrar til svekket barrierefunksjon eller inflammasjon, siden vi kun ville undersøke effekten av NOX1-generert ROS, og ikke diett. Det var derfor naturlig å bruke standard tørrfôr (RM1), som har et relativt høyt fiberinnhold. For det er vist at lavfiberdietter gir oppblomstring av bakterier som degraderer epitelets slimlag, og sådan bidrar til en svekket tarmbarriere (Desai et al., 2016).

I dette prosjektet ble mRNA-ekspressjon brukt som mål på enzymaktivitet og produksjon av proinflammatoriske cytokiner. Selv om dette er en vanlig strategi, har det sine ulemper, siden mengde mRNA ikke nødvendigvis gjenspeiler situasjonen man har på proteinnivå. Når det kommer til enzymer, som er helt eller delvis avhengig av andre proteiner som fungerer som aktiverende underenheter, bør disse også inkluderes i analysen, både på mRNA- og proteinnivå. Videre, dersom man velger å for eksempel måle proteinnivåene av cytokiner, er det viktig å tenke over i hvilke typer vev man måler dem i. For eksempel viste en studie av kronisk DSS-indusert inflammasjon, at mRNA-nivåene av genene som kodet for gitte cytokiner i tykktarmsvev korresponderte relativt dårlig med proteinnivåene i vevet (Li et al., 2018). Dette ble forklart med at cytokinene entrer sirkulasjonen etter produksjon.

#### 4.7 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID

Grunnet masteroppgavens opplagte tidsbegrensning, ble det ikke utført analyser av tarmmikrobiotaen i noen av forsøkene. En naturlige videreføring av prosjektet vil derfor være å undersøke om fravær av *NOX1*-generert ROS har innvirkning på både bakteriesammensetning og -mengde i tykktarm, slik man tidligere har gjort for tynntarm (Matziouridou et al., 2017). På den måten kan man, som tidligere diskutert, få klarhet i om ulike mikrobiota kan være årsaken til svakt forhøyet inflammasjonsgrad i *NOX1* knockoutmus sammenlignet med villtype. Videre bør også *iNOS* knockoutmus (eventuelt *NOX1 iNOS* dobbel-knockout) benyttes, på grunn av det mulige samarbeidet mellom *NOX1*- og *iNOS*-generert ROS i beskyttelse av tarmbarrieren gjennom dannelse av peroksinitritt. Dersom man er interessert i påvirkningen av ROS mer generelt, kan det også være interessant å inkludere studier av *DUOX2*, som i tillegg til *NOX1* er høyt uttrykt i tykktarm.

I tillegg til rene ROS-studier, kan den etablerte lavgrads inflammasjonsmodellen også brukes til å undersøke hvordan andre faktorer bidrar til opprettholdelsen av barrierefunksjon og demping/forverring av inflammatoriske prosesser når epitelet blir utsatt for milde skader. Det kan være spesielt interessant å undersøke hvordan kosthold bidrar ved milde tarmskader, da dette kan være relevant i forhold til utvikling av sykdom i mennesker.

## 5 KONKLUSJON

---

Vi etablerte en lavgrads inflammasjonsmodell i tykktarm gjennom testing av ulike orale DSS-doser. Etter 6 dagers eksponering for 1 % DSS i drikkevann, fant vi en svak oppregulering av inflammasjonsrelaterte gener og markører, samtidig som dyrene viste få eller ingen synlige tegn på sykdom. I tillegg ble det observert en klar oppregulering av de ROS-relaterte genene *iNOS* og *DUOX2*.

Ved å videre benytte den etablerte modellen til å indusere lavgrads tykktarmsinflammasjon i *NOX1* knockout- og villtypemus, ble det klart at fravær av *NOX1* påvirker inflammasjonsgrad og barrierefunksjon i minimal grad. Ved måling av den sensitive inflammasjonsmarkøren *Lcn-2* i avføring, ble det derimot observert signifikant forskjell mellom gruppene, hvor oppreguleringen var markant høyere i *NOX1* knockoutmus. Siden forhøyede verdier av *Lcn-2* i tarmen er forbundet med tilstedeværelse av tarmmikrobiota, antyder observasjonen at fravær av *NOX1*-generert ROS resulterer i økt kontakt mellom bakterier i lumen og tarmvevet.

Videre viste resultatene fra KO-forsøket at ROS-produksjon, målt ved *ex vivo*-avbildning med L-012, var påvirket av mild inflammasjon. I tillegg var det tydelig at *NOX1* er viktig for ROS-produksjonen, både ved normaltilstand og ved lavgrads inflammasjon.

Til sammen gav resultatene en viss indikasjon på at *NOX1*-generert ROS har en positiv effekt ved lavgrads, DSS-indusert tykktarmsinflammasjon. Nøyaktig hvilke mekanismer som fører til den positive effekten er derimot uklart, og krever videre undersøkelser. En naturlig videreføring av prosjektet vil være å undersøke om fravær av *NOX1*-generert ROS fører til endringer i tykktarmens mikrobiotasammensetning, som tidligere observert for nedre del av tynntarm.

## REFERANSER

- 
- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., Centola, M. & Li, X. (2009). Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 15 (3): 341-52. doi: 10.1002/ibd.20753.
- Araki, Y., Andoh, A. & Fujiyama, Y. (2003). The free radical scavenger edaravone suppresses experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Int J Mol Med*, 12 (1): 125-9.
- Araki, Y., Sugihara, H. & Hattori, T. (2006). The free radical scavengers edaravone and tempol suppress experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med*, 17 (2): 331-4.
- Araki, Y., Mukaisyo, K., Sugihara, H., Fujiyama, Y. & Hattori, T. (2010). Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncol Rep*, 24 (4): 869-74.
- Asghar, M. N., Emani, R., Alam, C., Helenius, T. O., Gronroos, T. J., Sareila, O., Din, M. U., Holmdahl, R., Hanninen, A. & Toivola, D. M. (2014). In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in murine colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 20 (8): 1435-47. doi: 10.1097/MIB.000000000000118.
- Aviello, G. & Knaus, U. G. (2016). ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue or Sabotage? *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.13428.
- Aviello, G. & Knaus, U. G. (2018). NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/s41385-018-0021-8.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72: 4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Azuma, Y. T., Hagi, K., Shintani, N., Kuwamura, M., Nakajima, H., Hashimoto, H., Baba, A. & Takeuchi, T. (2008). PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *J Cell Physiol*, 216 (1): 111-9. doi: 10.1002/jcp.21381.
- Bamba, S., Andoh, A., Ban, H., Imaeda, H., Aomatsu, T., Kobori, A., Mochizuki, Y., Shioya, M., Nishimura, T., Inatomi, O., et al. (2012). The severity of dextran sodium sulfate-induced colitis can differ between dextran sodium sulfate preparations of the same molecular weight range. *Dig Dis Sci*, 57 (2): 327-34. doi: 10.1007/s10620-011-1881-x.
- Banerjee, A., Bizzaro, D., Burra, P., Di Liddo, R., Pathak, S., Arcidiacono, D., Cappon, A., Bo, P., Conconi, M. T., Crescenzi, M., et al. (2015). Umbilical cord mesenchymal stem cells modulate dextran sulfate sodium induced acute colitis in immunodeficient mice. *Stem Cell Res Ther*, 6: 79. doi: 10.1186/s13287-015-0073-6.
- Barrett, K. E. (2014). *Gastrointestinal Physiology*. 2. utg. United States of America: McGraw-Hill Education.
- Becattini, S., Taur, Y. & Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med*, 22 (6): 458-478. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.003.
- Beck, P. L. & Wallace, J. L. (1997). Cytokines in inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm*, 6 (2): 95-103. doi: 10.1080/09629359791785.
- Beckman, J. S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*, 9 (5): 836-44. doi: 10.1021/tx9501445.



## REFERANSER

- Bedard, K. & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87 (1): 245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
- Bio-Rad. (2016). *The Mucosal Immune Response in Health and Disease*. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/mucosal-immunology-minireview.html> (lest 13.07.2018).
- Borish, L. C. & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*, 111 (2 Suppl): S460-75.
- Brown, D. I. & Griendling, K. K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 47 (9): 1239-53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023.
- Cha, H., Lee, S., Hwan Kim, S., Kim, H., Lee, D. S., Lee, H. S., Lee, J. H. & Park, J. W. (2017). Increased susceptibility of IDH2-deficient mice to dextran sodium sulfate-induced colitis. *Redox Biol*, 13: 32-38. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.009.
- Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M. A., Young, A. N., Gewirtz, A. T. & Vijay-Kumar, M. (2012). Fecal lipocalin 2, a sensitive and broadly dynamic non-invasive biomarker for intestinal inflammation. *PLoS One*, 7 (9): e44328. doi: 10.1371/journal.pone.0044328.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, 104: Unit 15.25. doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.
- Chavez, V., Mohri-Shiomi, A. & Garsin, D. A. (2009). Ce-Duox1/BLI-3 generates reactive oxygen species as a protective innate immune mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun*, 77 (11): 4983-9. doi: 10.1128/IAI.00627-09.
- Chen, S. X. & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem*, 260 (3): 726-35.
- Chu, F. F., Esworthy, R. S., Doroshov, J. H. & Shen, B. (2016). NADPH oxidase-1 deficiency offers little protection in *Salmonella typhimurium*-induced typhilitis in mice. *World J Gastroenterol*, 22 (46): 10158-10165. doi: 10.3748/wjg.v22.i46.10158.
- Corthesy, B. (2013). Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol*, 4: 185. doi: 10.3389/fimmu.2013.00185.
- Daiber, A., Oelze, M., Steven, S., Kroller-Schon, S. & Munzel, T. (2017). Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system. *Redox Biol*, 12: 35-49. doi: 10.1016/j.redox.2017.02.001.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., et al. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505 (7484): 559-63. doi: 10.1038/nature12820.
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., et al. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, 167 (5): 1339-1353 e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.043.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 14 (1): 20-32. doi: 10.1038/nrmicro3552.
- Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y. M., Ghezzi, P., Gorlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U. G., Lopez, M. G., Olaso-Gonzalez, G., et al. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol*, 13: 94-162. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.007.

## REFERANSER

- Egger, B., Bajaj-Elliott, M., MacDonald, T. T., Inglin, R., Eysselein, V. E. & Buchler, M. W. (2000). Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion*, 62 (4): 240-8. doi: 10.1159/000007822.
- El Hassani, R. A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., Morand, S., Gnidehou, S., Agnandji, D., Ohayon, R., et al. (2005). Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288 (5): G933-42. doi: 10.1152/ajpgi.00198.2004.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., et al. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science*, 341 (6141): 1237439. doi: 10.1126/science.1237439.
- Forstermann, U. & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33 (7): 829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Fukuyama, M., Rokutan, K., Sano, T., Miyake, H., Shimada, M. & Tashiro, S. (2005). Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett*, 221 (1): 97-104. doi: 10.1016/j.canlet.2004.08.031.
- Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K. & Leto, T. L. (2003). Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*, 17 (11): 1502-4. doi: 10.1096/fj.02-1104fje.
- Gianolio, E., Boffa, C., Orecchia, V., Bardini, P., Catanzaro, V., Poli, V. & Aime, S. (2016). A relaxometric method for the assessment of intestinal permeability based on the oral administration of gadolinium-based MRI contrast agents. *NMR Biomed*, 29 (4): 475-82. doi: 10.1002/nbm.3471.
- Giepmans, B. N. & van Ijzendoorn, S. C. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochim Biophys Acta*, 1788 (4): 820-31. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.07.015.
- Goiffon, R. J., Martinez, S. C. & Piwnicka-Worms, D. (2015). A rapid bioluminescence assay for measuring myeloperoxidase activity in human plasma. *Nat Commun*, 6: 6271. doi: 10.1038/ncomms7271.
- Grasberger, H., Gao, J., Nagao-Kitamoto, H., Kitamoto, S., Zhang, M., Kamada, N., Eaton, K. A., El-Zaatari, M., Shreiner, A. B., Merchant, J. L., et al. (2015). Increased Expression of DUOX2 Is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine. *Gastroenterology*, 149 (7): 1849-59. doi: 10.1053/j.gastro.2015.07.062.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C. & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. *Handb Exp Pharmacol*, 239: 1-16. doi: 10.1007/164\_2016\_118.
- Grice, E. A. & Segre, J. A. (2012). The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 13: 151-70. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
- Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S. & Lee, W. J. (2005). A direct role for dual oxidase in Drosophila gut immunity. *Science*, 310 (5749): 847-50. doi: 10.1126/science.1117311.
- Hayes, P., Dhillon, S., O'Neill, K., Thoeni, C., Hui, K. Y., Elkadri, A., Guo, C. H., Kovacic, L., Aviello, G., Alvarez, L. A., et al. (2015). Defects in NADPH Oxidase Genes NOX1 and DUOX2 in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1 (5): 489-502. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.06.005.

## REFERANSER

- Hernandez-Chirlaque, C., Aranda, C. J., Ocon, B., Capitan-Canadas, F., Ortega-Gonzalez, M., Carrero, J. J., Suarez, M. D., Zarzuelo, A., Sanchez de Medina, F. & Martinez-Augustin, O. (2016). Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J Crohns Colitis*, 10 (11): 1324-1335. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw096.
- Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V. & Perez Perez, G. I. (2017). Gut Microbiome and Antibiotics. *Arch Med Res*, 48 (8): 727-734. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.11.004.
- Indrelid, S. (2017). *The Soil Bacterium Methylococcus capsulatus Bath and its Interactions with Human Immune Cells in vitro*. Doktoravhandling. Ås: Norwegian University of Life Sciences. Tilgjengelig fra: <http://hdl.handle.net/11250/2500633> (lest 06.07.2018).
- Jiminez, J. A., Uwiera, T. C., Douglas Inglis, G. & Uwiera, R. R. (2015). Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog*, 7: 29. doi: 10.1186/s13099-015-0076-y.
- Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Sjoberg, K. E., Petersson, J., Holm, L., Sjobvall, H. & Hansson, G. C. (2010). Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One*, 5 (8): e12238. doi: 10.1371/journal.pone.0012238.
- Jones, R. M., Luo, L., Ardita, C. S., Richardson, A. N., Kwon, Y. M., Mercante, J. W., Alam, A., Gates, C. L., Wu, H., Swanson, P. A., et al. (2013). Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species. *EMBO J*, 32 (23): 3017-28. doi: 10.1038/emboj.2013.224.
- Kalliokoski, O., Teilmann, A. C., Jacobsen, K. R., Abelson, K. S. & Hau, J. (2014). The lonely mouse - single housing affects serotonergic signaling integrity measured by 8-OH-DPAT-induced hypothermia in male mice. *PLoS One*, 9 (12): e111065. doi: 10.1371/journal.pone.0111065.
- Kamizato, M., Nishida, K., Masuda, K., Takeo, K., Yamamoto, Y., Kawai, T., Teshima-Kondo, S., Tanahashi, T. & Rokutan, K. (2009). Interleukin 10 inhibits interferon gamma- and tumor necrosis factor alpha-stimulated activation of NADPH oxidase 1 in human colonic epithelial cells and the mouse colon. *J Gastroenterol*, 44 (12): 1172-84. doi: 10.1007/s00535-009-0119-6.
- Kato, M., Marumo, M., Nakayama, J., Matsumoto, M., Yabe-Nishimura, C. & Kamata, T. (2016). The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Exp Anim*, 65 (3): 197-205. doi: 10.1538/expanim.15-0127.
- Kawada, M., Arihiro, A. & Mizoguchi, E. (2007). Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 13 (42): 5581-93.
- Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Kishi, K., Tsunawaki, S., Hirayama, T. & Rokutan, K. (2004). Role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 172 (5): 3051-8.
- Kerr, T. A., Ciorba, M. A., Matsumoto, H., Davis, V. R., Luo, J., Kennedy, S., Xie, Y., Shaker, A., Dieckgraefe, B. K. & Davidson, N. O. (2012). Dextran sodium sulfate inhibition of real-time polymerase chain reaction amplification: a poly-A purification solution. *Inflamm Bowel Dis*, 18 (2): 344-8. doi: 10.1002/ibd.21763.
- Kielland, A., Blom, T., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., Blomhoff, R. & Carlsen, H. (2009). In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radic Biol Med*, 47 (6): 760-6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.013.

## REFERANSER

- Kiesler, P., Fuss, I. J. & Strober, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1 (2): 154-170. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H. & Fukumoto, M. (2000). NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene*, 254 (1-2): 237-43.
- Kim, Y. S. & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep*, 12 (5): 319-30. doi: 10.1007/s11894-010-0131-2.
- Kitajima, S., Takuma, S. & Morimoto, M. (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim*, 48 (3): 137-43.
- Konig, J., Wells, J., Cani, P. D., Garcia-Rodenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F. & Brummer, R. J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin Transl Gastroenterol*, 7 (10): e196. doi: 10.1038/ctg.2016.54.
- Krieglstein, C. F., Cerwinka, W. H., Laroux, F. S., Salter, J. W., Russell, J. M., Schuermann, G., Grisham, M. B., Ross, C. R. & Granger, D. N. (2001). Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med*, 194 (9): 1207-18.
- Kundu, K., Knight, S. F., Willett, N., Lee, S., Taylor, W. R. & Murthy, N. (2009). Hydrocyanines: a class of fluorescent sensors that can image reactive oxygen species in cell culture, tissue, and in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48 (2): 299-303. doi: 10.1002/anie.200804851.
- Lakatos, P. L. & Lakatos, L. (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*, 14 (25): 3937-47.
- Lambeth, J. D. & Neish, A. S. (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol*, 9: 119-45. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104651.
- Laroui, H., Ingersoll, S. A., Liu, H. C., Baker, M. T., Ayyadurai, S., Charania, M. A., Laroui, F., Yan, Y., Sitaraman, S. V. & Merlin, D. (2012). Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One*, 7 (3): e32084. doi: 10.1371/journal.pone.0032084.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y. S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., Nielsen, J., Ley, R. E. & Backhed, F. (2012). Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut*, 61 (8): 1124-31. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301104.
- Leoni, G., Alam, A., Neumann, P. A., Lambeth, J. D., Cheng, G., McCoy, J., Hilgarth, R. S., Kundu, K., Murthy, N., Kusters, D., et al. (2013). Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest*, 123 (1): 443-54. doi: 10.1172/JCI65831.
- Leto, T. L. & Geiszt, M. (2006). Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10): 1549-61. doi: 10.1089/ars.2006.8.1549.
- Li, M., Wu, Y., Hu, Y., Zhao, L. & Zhang, C. (2017). Initial gut microbiota structure affects sensitivity to DSS-induced colitis in a mouse model. *Sci China Life Sci*. doi: 10.1007/s11427-017-9097-0.
- Li, Y. H., Adam, R., Colombel, J. F. & Bian, Z. X. (2018). A characterization of pro-inflammatory cytokines in dextran sulfate sodium-induced chronic relapsing colitis mice model. *Int Immunopharmacol*, 60: 194-201. doi: 10.1016/j.intimp.2018.05.001.

## REFERANSER

- Low, D., Nguyen, D. D. & Mizoguchi, E. (2013). Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des Devel Ther*, 7: 1341-57. doi: 10.2147/dddt.s40107.
- Machery-Nagel. (2014). *RNA and protein purification*. User manual. Tilgjengelig fra: <http://www.mn-net.com/tabid/1467/default.aspx> (lest 25.05.2018).
- Martinez, I., Muller, C. E. & Walter, J. (2013). Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. *PLoS One*, 8 (7): e69621. doi: 10.1371/journal.pone.0069621.
- Matlock, B. (2015). *Technical Note: Assessment of Nucleic Acid Purity*: Thermo Fisher Scientific. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers/nanodrop-nucleic-acid-quantification.html> (lest 29.05.2018).
- Matziouridou, C., Rocha, S. D. C., Haabeth, O. A., Rudi, K., Carlsen, H. & Kielland, A. (2017). iNOS- and NOX1-dependent ROS production maintains bacterial homeostasis in the ileum of mice. *Mucosal Immunol*. doi: 10.1038/mi.2017.106.
- McDonald, S. A., Preston, S. L., Lovell, M. J., Wright, N. A. & Jankowski, J. A. (2006). Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3 (5): 267-74. doi: 10.1038/ncpgasthep0473.
- Melgar, S., Karlsson, A. & Michaelsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288 (6): G1328-38. doi: 10.1152/ajpgi.00467.2004.
- Mitrovic, M., Shahbazian, A., Bock, E., Pabst, M. A. & Holzer, P. (2010). Chemo-nociceptive signalling from the colon is enhanced by mild colitis and blocked by inhibition of transient receptor potential ankyrin 1 channels. *Br J Pharmacol*, 160 (6): 1430-42. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00794.x.
- Mizoguchi, A., Takeuchi, T., Himuro, H., Okada, T. & Mizoguchi, E. (2016). Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease. *J Pathol*, 238 (2): 205-19. doi: 10.1002/path.4640.
- Moschen, A. R., Adolph, T. E., Gerner, R. R., Wieser, V. & Tilg, H. (2017). Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. *Trends Endocrinol Metab*, 28 (5): 388-397. doi: 10.1016/j.tem.2017.01.003.
- Motulsky, H. J. (u. å.). "Choosing a normality test", *GraphPad Statistics Guide*. Tilgjengelig fra: [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat\\_choosing\\_a\\_normality\\_test.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_choosing_a_normality_test.htm) (lest 18.05.2018).
- Mowat, A. M. & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, 14 (10): 667-85. doi: 10.1038/nri3738.
- Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136 (1): 65-80. doi: 10.1053/j.gastro.2008.10.080.
- Neish, A. S. (2014). Mucosal immunity and the microbiome. *Ann Am Thorac Soc*, 11 Suppl 1: S28-32. doi: 10.1513/AnnalsATS.201306-161MG.
- NHI. (2017). *Ulcerøs kolitt og risiko for å få kreft i tykktarmen*. Tilgjengelig fra: <https://nhi.no/sykdommer/magetarm/inflammatorisk-tarmsykdom/ulceros-kolitt-og-kolorektal-kreft/> (lest 14.07.2018).
- Parray, F. Q., Wani, M. L., Malik, A. A., Wani, S. N., Bijli, A. H., Irshad, I. & Nayeem Ul, H. (2012). Ulcerative colitis: a challenge to surgeons. *Int J Prev Med*, 3 (11): 749-63.

## REFERANSER

- Pelaseyed, T., Bergstrom, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schutte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodriguez-Pineiro, A. M., Nystrom, E. E., et al. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*, 260 (1): 8-20. doi: 10.1111/imr.12182.
- Pellizzon, M. (2016). Choice of laboratory animal diet influences intestinal health. *Lab Anim (NY)*, 45 (6): 238-9. doi: 10.1038/labani.1014.
- Perse, M. & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 718617. doi: 10.1155/2012/718617.
- Peterson, L. W. & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14 (3): 141-53. doi: 10.1038/nri3608.
- Pircalabioru, G., Aviello, G., Kubica, M., Zhdanov, A., Paclat, M. H., Brennan, L., Hertzberger, R., Papkovsky, D., Bourke, B. & Knaus, U. G. (2016). Defensive Mutualism Rescues NADPH Oxidase Inactivation in Gut Infection. *Cell Host Microbe*, 19 (5): 651-63. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.007.
- Podolsky, D. K. (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 347 (6): 417-29. doi: 10.1056/NEJMra020831.
- R&D Systems. (u. å.). *Quantikine HS ELISA Principle, Streptavidin-HRP Polymer*. Tilgjengelig fra: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/quantikine-hs-elisa-principle-streptavidin-hrp-polymer> (lest 29.06.2018).
- Rada, B., Hably, C., Meczner, A., Timar, C., Lakatos, G., Enyedi, P. & Ligeti, E. (2008). Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol*, 30 (3): 237-53. doi: 10.1007/s00281-008-0126-3.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339 (1): 62-6.
- Ramonaite, R., Skieceviciene, J., Juzenas, S., Salteniene, V., Kupcinskas, J., Matusевичius, P., Borutaite, V. & Kupcinskas, L. (2014). Protective action of NADPH oxidase inhibitors and role of NADPH oxidase in pathogenesis of colon inflammation in mice. *World J Gastroenterol*, 20 (35): 12533-41. doi: 10.3748/wjg.v20.i35.12533.
- Rezaie, A., Parker, R. D. & Abdollahi, M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci*, 52 (9): 2015-21. doi: 10.1007/s10620-006-9622-2.
- Rigoni, A., Poulosom, R., Jeffery, R., Mehta, S., Lewis, A., Yau, C., Giannoulatou, E., Feakins, R., Lindsay, J. O., Colombo, M. P., et al. (2017). Separation of Dual Oxidase 2 and Lactoperoxidase Expression in Intestinal Crypts and Species Differences May Limit Hydrogen Peroxide Scavenging During Mucosal Healing in Mice and Humans. *Inflamm Bowel Dis*, 24 (1): 136-148. doi: 10.1093/ibd/izx024.
- Roy, U., Galvez, E. J. C., Iljazovic, A., Lesker, T. R., Blazejewski, A. J., Pils, M. C., Heise, U., Huber, S., Flavell, R. A. & Strowig, T. (2017). Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells. *Cell Rep*, 21 (4): 994-1008. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.097.
- Schwerd, T., Bryant, R. V., Pandey, S., Capitani, M., Meran, L., Cazier, J. B., Jung, J., Mondal, K., Parkes, M., Mathew, C. G., et al. (2018). NOX1 loss-of-function genetic variants in patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol*, 11 (2): 562-574. doi: 10.1038/mi.2017.74.
- Singer, II, Kawka, D. W., Scott, S., Weidner, J. R., Mumford, R. A., Riehl, T. E. & Stenson, W. F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 111 (4): 871-85.

## REFERANSER

- Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., et al. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*, 15 (1): 73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- Singh, V., Yeoh, B. S., Chassaing, B., Zhang, B., Saha, P., Xiao, X., Awasthi, D., Shashidharamurthy, R., Dikshit, M., Gewirtz, A., et al. (2016). Microbiota-inducible Innate Immune, Siderophore Binding Protein Lipocalin 2 is Critical for Intestinal Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2 (4): 482-498 e6. doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.03.007.
- Sommer, F. & Backhed, F. (2015). The gut microbiota engages different signaling pathways to induce Duox2 expression in the ileum and colon epithelium. *Mucosal Immunol*, 8 (2): 372-9. doi: 10.1038/mi.2014.74.
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K. & Lambeth, J. D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401 (6748): 79-82. doi: 10.1038/43459.
- Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H. & Tanaka, T. (2006). Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27 (1): 162-9. doi: 10.1093/carcin/bgi205.
- Swidsinski, A., Sydora, B. C., Doerffel, Y., Loening-Baucke, V., Vanechoutte, M., Lupicki, M., Scholze, J., Lochs, H. & Dieleman, L. A. (2007). Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*, 13 (8): 963-70. doi: 10.1002/ibd.20163.
- Szanto, I., Rubbia-Brandt, L., Kiss, P., Steger, K., Banfi, B., Kovari, E., Herrmann, F., Hadengue, A. & Krause, K. H. (2005). Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol*, 207 (2): 164-76. doi: 10.1002/path.1824.
- Taghipour, N., Molaei, M., Mosaffa, N., Rostami-Nejad, M., Asadzadeh Aghdaei, H., Anissian, A., Azimzadeh, P. & Zali, M. R. (2016). An experimental model of colitis induced by dextran sulfate sodium from acute progresses to chronicity in C57BL/6: correlation between conditions of mice and the environment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 9 (1): 45-52.
- Tanaka, M. & Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int*, 66 (4): 515-522. doi: 10.1016/j.alit.2017.07.010.
- The Jackson Laboratory. (2017). "*Nox1tm1Kkr Alternate 1*", *Genotyping Protocol*. Tilgjengelig fra: [https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5\\_MASTER\\_PROTOCOL\\_I\\_D,P5\\_JRS\\_CODE:21317,018787](https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_I_D,P5_JRS_CODE:21317,018787) (lest 28.05.2018).
- Thursby, E. & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*, 474 (11): 1823-1836. doi: 10.1042/BCJ20160510.
- Treton, X., Pedruzzi, E., Guichard, C., Ladeiro, Y., Sedghi, S., Vallee, M., Fernandez, N., Bruyere, E., Woerther, P. L., Ducroc, R., et al. (2014). Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice. *PLoS One*, 9 (7): e101669. doi: 10.1371/journal.pone.0101669.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A. & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29 (1): 52, 54.

## REFERANSER

- Umoh, F. I., Kato, I., Ren, J., Wachowiak, P. L., Ruffin, M. T. t., Turgeon, D. K., Sen, A., Brenner, D. E. & Djuric, Z. (2016). Markers of systemic exposures to products of intestinal bacteria in a dietary intervention study. *Eur J Nutr*, 55 (2): 793-798. doi: 10.1007/s00394-015-0900-7.
- Van Dyke, K., Ghareeb, E., Van Dyke, M. & Van Thiel, D. H. (2007). Ultrasensitive peroxynitrite-based luminescence with L-012 as a screening system for antioxidative/antinitrating substances, e.g. Tylenol (acetaminophen), 4-OH tempol, quercetin and carboxy-PTIO. *Luminescence*, 22 (4): 267-74. doi: 10.1002/bio.959.
- Viennois, E., Chen, F., Laroui, H., Baker, M. T. & Merlin, D. (2013). Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC Res Notes*, 6: 360. doi: 10.1186/1756-0500-6-360.
- Wang, J., Goepfert, C., Mueller, N., Piersigilli, A., Lin, R., Wen, H., Vuitton, D. A., Vuitton, L., Mueller, C. & Gottstein, B. (2018). Larval *Echinococcus multilocularis* infection reduces dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by attenuating T helper type 1/type 17-mediated immune reactions. *Immunology*, 154 (1): 76-88. doi: 10.1111/imm.12860.
- Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W. D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H. D., Wittig, B. M. & Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol*, 178 (9): 5973-81.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmaso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V. & Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One*, 4 (6): e6073. doi: 10.1371/journal.pone.0006073.
- Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E. & Menevse, S. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. I: Hernandez-Rodriguez, P. (red.) *Polymerase Chain Reaction*: IntechOpen. Tilgjengelig fra: <https://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/real-time-pcr-for-gene-expression-analysis>. doi: 10.5772/37356.
- Yokota, H., Tsuzuki, A., Shimada, Y., Imai, A., Utsumi, D., Tsukahara, T., Matsumoto, M., Amagase, K., Iwata, K., Nakamura, A., et al. (2017). NOX1/NADPH Oxidase Expressed in Colonic Macrophages Contributes to the Pathogenesis of Colonic Inflammation in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Murine Colitis. *J Pharmacol Exp Ther*, 360 (1): 192-200. doi: 10.1124/jpet.116.235580.
- Zhang, J. M. & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45 (2): 27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- Zhang, Q., Wu, Y., Wang, J., Wu, G., Long, W., Xue, Z., Wang, L., Zhang, X., Pang, X., Zhao, Y., et al. (2016). Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium. *Sci Rep*, 6: 27572. doi: 10.1038/srep27572.
- Zielonka, J., Lambeth, J. D. & Kalyanaraman, B. (2013). On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radic Biol Med*, 65: 1310-4. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.017.



## BILAG

**Bilag A – Programvarer og instrumenter****Tabell A.1** Programvarer.

Programvare	Referanse
2100 Expert Software	Agilent Technologies (2003). <i>2100 Expert Software</i> (Versjon B.02.07.SI532). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="https://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2213">https://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2213</a> (lest 30.05.2018).
GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc. (2016). <i>GraphPad Prism 7</i> (Versjon 7.01). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="https://www.graphpad.com/how-to-buy/">https://www.graphpad.com/how-to-buy/</a> (lest 18.05.2018).
Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories (2013). <i>Image Lab Software</i> (Versjon 5.0, build 8). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="http://www.bio-rad.com/en-no/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z">http://www.bio-rad.com/en-no/product/image-lab-software?ID=KRE6P5E8Z</a> (lest 05.07.2018)
LightCycler® 480 Software	Idaho Technology (2004). <i>LightCycler 480 Software</i> (Versjon 1.5.1.62). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="https://lifescience.roche.com/en_no/products/lightcycler14301-480-software-version-15.html">https://lifescience.roche.com/en_no/products/lightcycler14301-480-software-version-15.html</a> (lest 05.07.2018)
LinRegPCR	Ruijter, J. M. (2017). <i>LinRegPCR</i> (Versjon 2017.1). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&amp;fileName=LinRegPCR.zip&amp;description=LinRegPCR:%20qPCR%20data%20analysis&amp;sub=LinRegPCR#references">http://www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main=files&amp;fileName=LinRegPCR.zip&amp;description=LinRegPCR:%20qPCR%20data%20analysis&amp;sub=LinRegPCR#references</a> (lest 24.05.2018).
Living Image® Software	PerkinElmer (2015). <i>Living Image Software</i> (Versjon 4.5.2). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="http://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/resources/in-vivo-imaging-software-downloads.html">http://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/resources/in-vivo-imaging-software-downloads.html</a> (lest 30.05.2018)
Magellan™ - Data Analysis Software	Tecan Trading AG (ukjent). <i>Magellan - Data Analysis Software</i> (Versjon 6.6). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="https://lifesciences.tecan.com/products/software/magellan_data_analysis_software">https://lifesciences.tecan.com/products/software/magellan_data_analysis_software</a> (lest 24.05.2018).
Nanodrop 2000/2000c Operating Software	Thermo Scientific Inc (2009-2014). <i>Nanodrop 2000/2000c</i> (Versjon 1.6.198). Programvare. Tilgjengelig fra: <a href="https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis/uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers/nanodrop-software-download.html">https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/ultraviolet-visible-visible-spectrophotometry-uv-vis-vis/uv-vis-vis-instruments/nanodrop-microvolume-spectrophotometers/nanodrop-software-download.html</a> (lest 13.07.2018)

**Tabell A.2** Instrumenter.

Produktnavn	Leverandør
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
C1000 Thermal Cycler with Dual 48/48 Fast Reaction Module (185-1048R)	Bio-Rad Laboratories
Gel Doc Ez Imager (1708270EDU) + UV Sample Tray (1708271EDU)	Bio-Rad Laboratories
IVIS Lumina II	Perkin Elmer, Waltham, MA
LightCycler 480 Instrument II Roche	Applied Science, Indianapolis, IN, USA
NanoDrop 2000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
PTC-200 Thermal Cycler (8252-30-0001)	MJ research, Waltham, MA, USA
Sunrise absorbance reader	Tecan Trading AG, Østerrike

**Bilag B – Materialer****Tabell B.1** Kit.

Produktnavn	Leverandør
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mouse LBP Quantification ELISA kit	Biometec, Greifswald, Tyskland
Mouse Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA	R&D Systems Europe, Abingdon, UK
NucleoSpin RNA/Protein Purification kit	Machery-Nagel, Düren, Germany

**Tabell B.2** Materialer spesifikt for (q)PCR.

Produktnavn	Leverandør
5x HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load with 10 mM MgCl <sub>2</sub>	Solis BioDyne, Tartu Estland
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	Solis BioDyne, Tartu, Estland
DNA Ladder Ready to Load (0,1 µg/µL)	Solis BioDyne, Tartu, Estland
GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10.000x in Water	Biotium, Hayward, CA
LightCycler 480 Multiwell Plate 96w, white	Life science Roche

**Tabell B.3** Andre kjemikalier (fortsetter på neste side).

Produktnavn	Leverandør
2-Mercaptoethanol, >= 99 % (M7522-250ML) (β-mercaptoetanol)	Sigma-Aldrich
Acetic acid, ≥99.7 % (320099-2.5L)	Sigma-Aldrich
Delbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (L0615)	Biowest
Dextran Sulfate Sodium Salt Colitis Grade (36,000-50,000 M. Wt.) (02160110)	MP Biomedicals
Ethanol 96 % vol (20824.365)	VWR Chemicals
Ethanol absolute (20821.310)	VWR Chemicals
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution (E7889) (Dinatrium EDTA)	Sigma-Aldrich
Fentadon vet (545281) (50 mg/mL)	Dechra Veterinary Products AS
IsoFlo vet 100 % (Vnr 002185) (isofluran)	Zoetis
L-012 (120-04891)	Wako Chemical
Lithium Chloride, Molecular Biology Grade (438002)	EMD Millipore
Natriumklorid (9 mg/mL) (Vnr 043919)	Fresenius Kabi

## BILAG

**Tabell B.3** (Fortsettelse fra forrige side).

Produktnavn	Leverandør
RNALater (R0901-500ML-PW)	Sigma-Aldrich
RNaseZAP™ (R2020-250ML)	Sigma-Aldrich
Rompun vet (Vnr 023446) (20 mg/mL)	Bayer Animal Health
SeaKem LE Agarose (50004)	Lonzo
Sodium acetate (S5636-500G)	Sigma-Aldrich
Sodium hydroxide (28244.364)	VWR Chemicals
Tris-HCl (-)	Millipore
TWEEN® 20 (P1379)	Sigma-Aldrich
Water (W4502) (DNase-, RNase- og proteasefritt)	Sigma-Aldrich
Zoletil Forte (250 mg/mL) (Vnr 485292)	Virbac

**Tabell B.4** Virkestoffer i ZRF-cocktail.

Virkestoff	Mengde per mL 0,9 % steril isotonisk NaCl
Fentanyl	2,6 µg
Tiletamine	3,3 mg
Xylazine	0,45 mg
Zolazepam	3,3 mg

## BILAG

### Bilag C – Primere

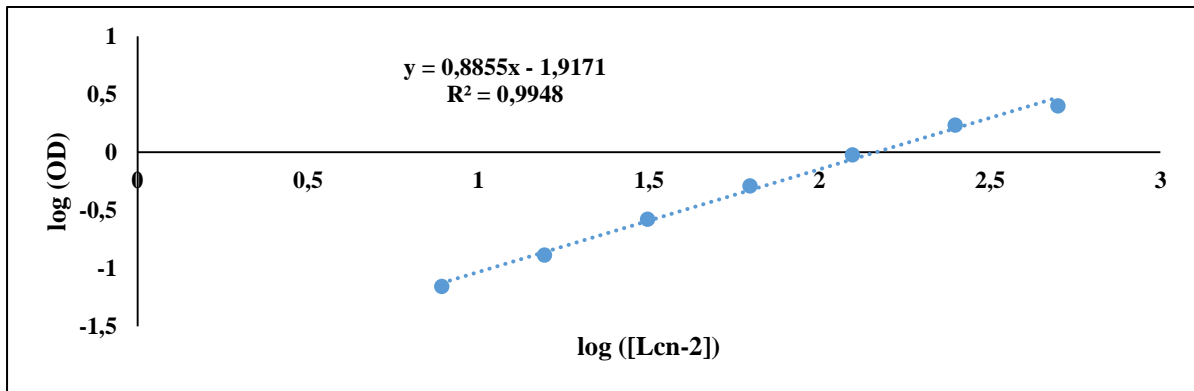
**Tabell C.1** Sekvens og produktlengde til primere brukt ved qPCR-analyser. Primere ble designet ved vårt laboratorium og bestilt fra Thermo Fisher Scientific (USA). Alle primere spente over ekson-ekson-sammenføyinger, slik at det ikke skulle oppstå problemer ved qPCR dersom det var gDNA i prøvene.

Gen	Primer	Sekvens (5'→3')	Produktlengde (bp)	Annealing temperatur ved qPCR (°C)
<i>GAPDH</i>	Forward	CTTCAACAGCAACTCCCACTCTT	103	60
	Reverse	GCCGTATTCATTGTCATACCAGG		
<i>NOX1</i>	Forward	GTGATTACCAAGGTTGTCATGC	65	64
	Reverse	AAGCCTCGCTTCCTCATCTG		
<i>NOX2</i>	Forward	GGGAACTGGGCTGTGAATGA	147	61
	Reverse	CAGTGCTGACCCAAGGAGTT		
<i>iNOS</i>	Forward	GACATTACGACCCCTCCCAC	57	62
	Reverse	ACTCTGAGGGCTGACACAAG		
<i>Ptgs2</i>	Forward	AATATCAGGTCATTGGTGGAGA	58	61
	Reverse	TCTACCTGAGTGTCTTTGACTG		
<i>DUOX2</i>	Forward	TGTGAATGACGGGTCCAAGT	118	59
	Reverse	GGAGGCCAAGACGTACATGA		
<i>TNFα</i>	Forward	CTGTCTACTGAACTTCGGGGTGAT	88	61
	Reverse	GGTCTGGGCCATAGAACTGATG		
<i>IL-1β</i>	Forward	GCAGCTGGAGAGTGTGGAT	97	61
	Reverse	AAACTCCACTTTGCTCTTGACTT		
<i>IL-6</i>	Forward	CGTGGAATGAGAAAAGAGTTGT	63	61
	Reverse	AGTGCATCATCGTTGTTTCATACA		
<i>Lcn-2</i>	Forward	CACCACGGACTACAACCAG	92	59
	Reverse	TGGTCTTCCATACAGGGTAAT		

**Tabell C.2** Sekvens og produktlengde til primere brukt ved genotyping. Primere ble bestilt fra Thermo Fisher Scientific (USA).

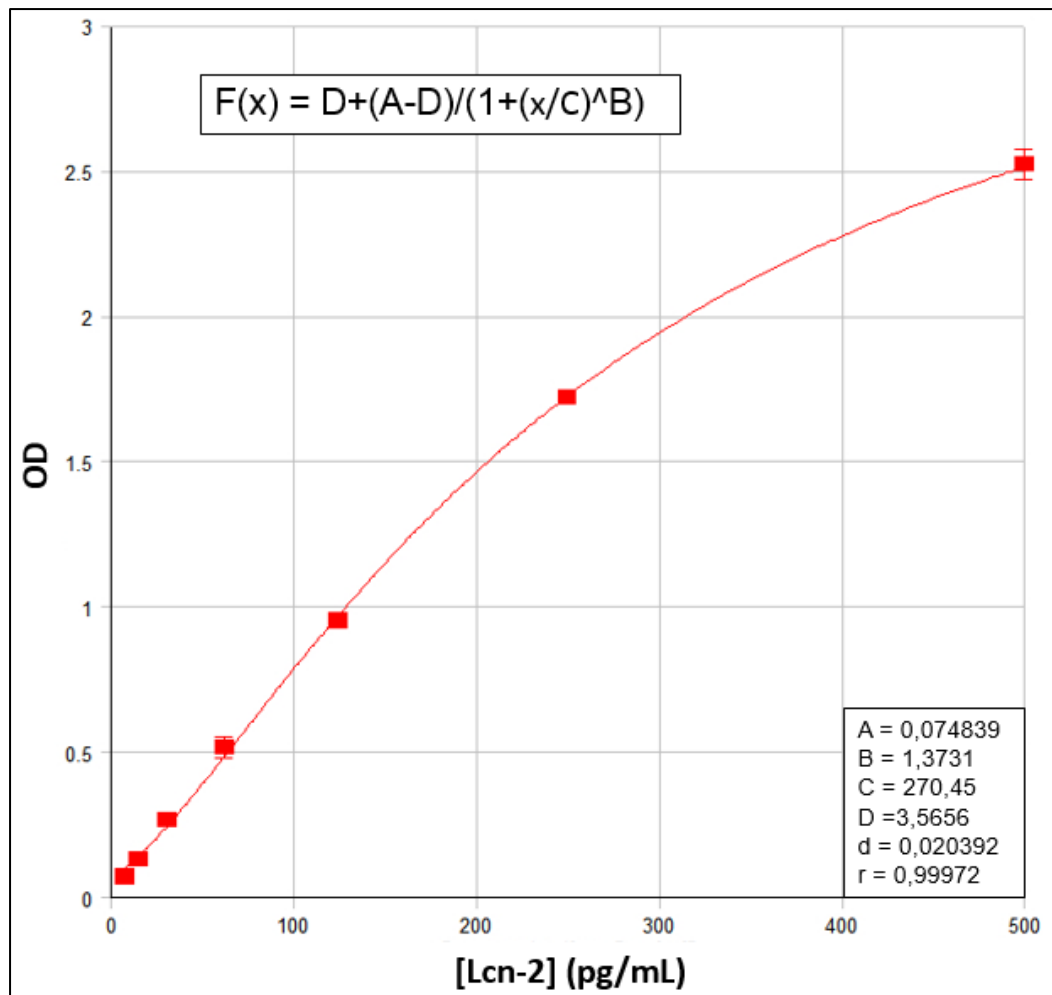
Gen	Primer	Sekvens (5'→3')	Produktlengde (bp)
<i>NOX1</i>	Wild type Reverse	AAATGGAAC CCTTGGAGCA	NOX1KO: 200 VT: 244
<i>NOX1</i>	Common (forward)	TTGAAAGGTTGGGTTTAGCTG	
<i>NOX1</i>	Mutant Reverse	CGGTCCTCAAGAAGGAATC	

## Bilag D – Standardkurver for Lcn-2 ELISA



**Figur D.1 Lineær standardkurve Lcn-2 ELISA**

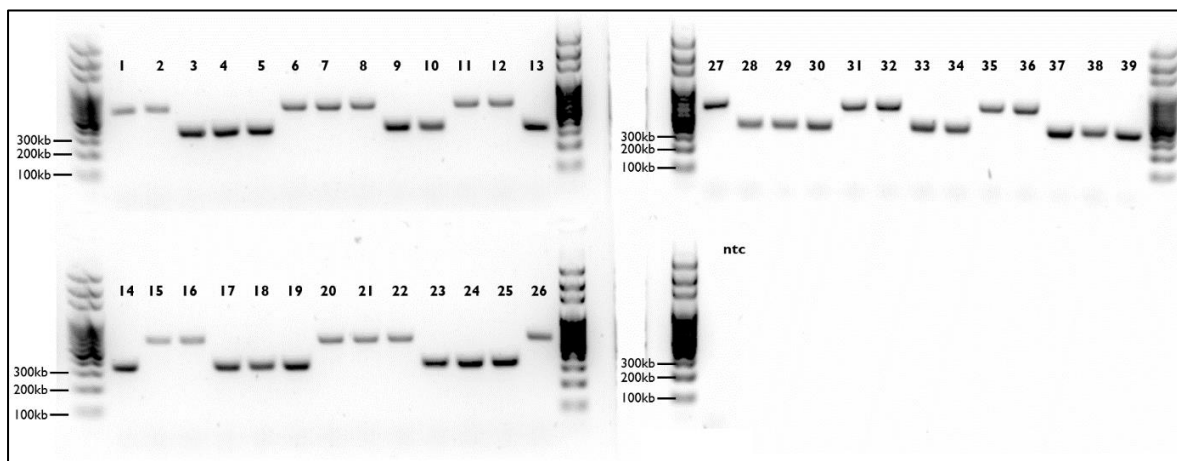
Log<sub>10</sub> av optisk tetthet (OD) plottet mot log<sub>10</sub> av teoretisk Lcn-2-konsentrasjon (pg/mL) for standardprøver. Standardkurve ble laget ved lineær regresjon, utført i Microsoft Excel 2016.



**Figur D.2 4-PL standardkurve Lcn-2 ELISA**

Optisk tetthet (OD) plottet mot teoretisk Lcn-2-konsentrasjon (pg/mL) for standardprøver. Standardkurve ble laget ved 4-parameter logistisk (4-PL) kurvetilpassing, utført i Magellan™ - Data Analysis Software.

## Bilag E – Bestemmelse av genotype



**Figur E.1 Bestemmelse av genotype av dyr i KO-forsøk**

Bilder fra gel-elektroforese for bestemmelse av genotype av dyr i KO-forsøk. Prøver er indikert med tall 1 til 39. Forventet produktlengde for VT og *NOX1*KO var på henholdsvis 244 og 200 bp. «ntc» står for «no template control».

## Bilag F – P-verdier fra en- og toveis ANOVA

**Tabell F.1 P-verdier for genekspressjon i pilotforsøk**

P-verdier kalkulert ved enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest. Analysen ble utført for ett og ett gen.  $P < 0,05$  ble ansett som signifikant (fet skrift). Kontroll:  $n=2$ , DSS:  $n=4$ . Tabellen hører til figur 3.6.

<i>Sammenligning</i>	NOX1	NOX2	iNOS	Ptgs2	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$
<i>Kontroll vs. 2 % DSS</i>	0,82	0,26	<b>0,0042</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,026</b>
<i>Kontroll vs. 4 % DSS</i>	0,64	0,67	<b>0,024</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,25	0,56
<i>2 % DSS vs. 4 % DSS</i>	0,92	0,58	0,26	0,11	<b>0,034</b>	0,054

**Tabell F.2 P-verdier for inflammasjonsrelaterte gener i etableringsforsøk**

P-verdier kalkulert ved enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest. Analysen ble utført for ett og ett gen.  $P < 0,05$  ble ansett som signifikant (fet skrift).  $N=5-6$ . Tabellen hører til figur 3.8.

<i>Sammenligning</i>	Ptgs2	TNF $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$	Lcn-2
<i>Kontroll vs. 0,5 % DSS</i>	0,95	<b>0,044</b>	0,66	>0,99	>0,99
<i>Kontroll vs. 1 % DSS</i>	<b>0,016</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0009</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,025</b>
<i>Kontroll vs. 2 % DSS</i>	<b>0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>0,5 % vs. 1 % DSS</i>	<b>0,0047</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,008</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,031</b>
<i>0,5 % vs. 2 % DSS</i>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>1 % vs. 2 % DSS</i>	0,19	0,14	0,49	0,36	<b>0,004</b>

## BILAG

**Tabell F.3 P-verdier for ROS-relaterte gener i etableringsforsøk**

P-verdier kalkulert ved enveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest. Analysen ble utført for ett og ett gen. P < 0,05 ble ansett som signifikant (fet skrift). N=4-6. Tabellen hører til figur 3.9.

<i>Sammenligning</i>	<b>NOX1</b>	<b>NOX2</b>	<b>iNOS</b>	<b>DUOX2</b>
<i>Kontroll vs. 0,5% DSS</i>	0,88	0,97	0,75	0,99
<i>Kontroll vs. 1% DSS</i>	>0,99	0,55	<b>0,0014</b>	<b>0,027</b>
<i>Kontroll vs. 2% DSS</i>	0,96	<b>0,014</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>0,5% vs. 1% DSS</i>	0,93	0,30	<b>0,0049</b>	<b>0,045</b>
<i>0,5% vs. 2% DSS</i>	0,99	<b>0,0049</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>1% vs. 2% DSS</i>	0,99	0,20	0,13	<b>0,048</b>

**Tabell F.4 P-verdier for inflammasjonsrelaterte gener i KO-forsøk**

P-verdier for sammenligning av eksperimentelle grupper i KO-forsøk, for ett og ett gen, i proksimal og distal tykktarm. P-verdier ble kalkulert ved toveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest. P<0,05 ble ansett som signifikant (fet skrift). N=4-10. Tabellen hører til figur 3.13.

<i>Sammenligning</i>	<b>Proksimal tykktarm</b>					<b>Distal tykktarm</b>				
	<b>Ptgs2</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Lcn-2</b>	<b>Ptgs2</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Lcn-2</b>
<i>VT vs. NOXIKO</i>	>0,99	0,99	>0,99	0,58	>0,99	>0,99	0,77	>0,99	>0,99	0,99
<i>VT vs. VTDSS</i>	0,34	<b>0,0006</b>	<b>0,0011</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0154</b>	0,45	<b>0,0039</b>	0,12	<b>0,018</b>	<b>0,0070</b>
<i>VT vs. NOXIKO DSS</i>	<b>0,0068</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,018</b>	<b>0,024</b>	0,07	<b>0,034</b>	<b>0,0058</b>
<i>NOXIKO vs. VTDSS</i>	0,24	<b>0,0008</b>	<b>0,0016</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,28	0,48	<b>0,038</b>	0,050	<b>0,0097</b>	<b>0,0048</b>
<i>NOXIKO vs. NOXIKO DSS</i>	<b>0,0026</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0319</b>	<b>0,011</b>	0,17	<b>0,030</b>	<b>0,019</b>	<b>0,0040</b>
<i>VTDSS vs. NOXIKO DSS</i>	0,24	0,094	0,065	0,73	>0,99	0,34	0,92	0,95	0,99	0,99

## BILAG

**Tabell F.5 P-verdier for ROS-relaterte gener i KO-forsøk**

P-verdier for sammenligning av eksperimentelle grupper i KO-forsøk, for ett og ett gen, i proksimal og distal tykktarm. P-verdier ble kalkulert ved toveis ANOVA med Tukeys multiple sammenligningstest som posttest. P<0,05 ble ansett som signifikant (fet skrift). N=5-10. Tabellen hører til figur 3.15.

Sammenligning	Proksimal tykktarm				Distal tykktarm			
	NOX1	NOX2	DUOX2	iNOS	NOX1	NOX2	DUOX2	iNOS
<i>VT vs. NOX1KO</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,96	0,78	0,96	<b>&lt;0,0001</b>	0,92	>0,99	>0,99
<i>VT vs. VTDSS</i>	<b>0,0018</b>	0,95	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,50	0,28	<b>0,038</b>	<b>0,041</b>
<i>VT vs. NOX1KODSS</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,24	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,87	0,31	0,25
<i>NOX1KO vs. VTDSS</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,71	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,60	<b>0,037</b>	<b>0,017</b>
<i>NOX1KO vs. NOX1KODSS</i>	>0,99	0,078	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,23	>0,99	0,34	0,14
<i>VTDSS vs. NOX1KO DSS</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,46	0,97	>0,99	<b>&lt;0,0001</b>	0,71	0,65	0,82







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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway