

# DE ROL VAN PROLYL-HYDROXYLASE 1 IN DE ONTWIKKELING VAN INTESTINALE FIBROSE.

Van den Bossche Freek

Stamnummer: 01504176

Promotor: Dr. Ir. Van Welden Sophie

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2018 – 2020



# DE ROL VAN PROLYL-HYDROXYLASE 1 IN DE ONTWIKKELING VAN INTESTINALE FIBROSE.

Van den Bossche Freek

Stamnummer: 01504176

Promotor: Dr. Ir. Van Welden Sophie

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2018 - 2020

Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.  
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.  
Ghent University, Library, 2021.

## Woord vooraf

De keuze voor een preklinisch thesisonderwerp is binnen de opleiding geneeskunde eerder uitzondering dan regel. Moleculaire biologie in al zijn facetten komt immers beperkt aan bod in onze zesjarige opleiding.

Toch was deze keuze in mijn geval niet zo uitzonderlijk. De minutieus geregelde, microscopische mechanismen die alles in ons lichaam in goeie (en soms ook in slechte) banen leiden, hebben me steeds sterk geïntregeerd en verwonderd. Een verbazing die tijdens deze masterproef overigens enkel sterker is geworden.

Hoewel er geen gebrek was aan leergierigheid en motivatie, was dat er aan de start zeker wel aan praktische kennis. Ik ben dan ook zeer dankbaar voor de begeleiding die ik gekregen heb om deze thesis tot een goed einde te brengen.

In de eerste plaats wil ik mijn promotor, Dr. Ir. Sophie Van Welden, bedanken voor de excellente begeleiding de afgelopen twee jaar. Zij was het die me steeds met raad en daad bijstond over het verloop van deze thesis. Van een absolute laboleek, met enkel theoretische kennis, transformeerde ze me, met eindeloos geduld en veel enthousiasme, in een ware Pipetboy met meer praktische kennis van zake. De aangename sfeer en de vele fijne en amusante gesprekken deden me steeds met plezier terugkomen en hebben voor mooie herinneringen gezorgd. Zo zal ik me o.a. nog lang herinneren hoe je mijn agrarisch lexicon (verpotten, uitplanten) hebt omgebogen naar correcte wetenschappelijke terminologie. Een welgemeende dankjewel voor de afgelopen twee jaar, Sophie. Een betere promotor had ik me niet kunnen indenken.

Vervolgens had ik graag alle medewerkers van het labo willen bedanken en in het bijzonder Cara, Simon, Griet, Hilde en Petra. In de eerste plaats voor de goeie sfeer, waar ook zij heel erg aan bijdroegen, anderzijds om steeds klaar te staan voor vragen en uitleg bij twijfel of onduidelijkheden langs mijn kant. Ook aan jullie hartelijk bedankt.

Ten slotte zou ik enkele mensen willen bedanken die me heel erg nauw aan het hart liggen.

De 'kleinen' zijn, ben ik na meer dan 20 jaar al goed gewoon, en ik moet eerlijk zijn: ik heb er nog geen nadelen van ondervonden. Brecht en Dries, bedankt voor alle steun die ik van jullie al mocht ontvangen. Jullie zijn als voorbeelden steeds een drijfveer geweest voor mij. Bedankt om van kleins af aan zoveel bij te leren, die nieuws- en leergierigheid heb ik voor een groot deel aan jullie te danken.

De personen aan wie ik het meeste te danken heb, zijn mijn ouders. Niet alleen tijdens deze thesis, maar ondertussen al bijna 23 jaar, staan jullie elke dag paraat voor mij met alle

mogelijke ondersteuning die ik me maar kan wensen. Met alles kan ik bij jullie terecht en niks is jullie ooit teveel, zelfs al zit mijn humeur door de stress wel eens onder nul. Geen paragraaf op een blad, zelfs geen thesis vol kan jullie genoeg bedanken. Bedankt om steeds in mij te geloven, bedankt voor alle liefde, ik zie jullie graag.

Bedankt allemaal, voor deze thesis en voor het plezier ik reeds heb geput uit mijn studies, het is stuk voor stuk dankzij jullie.

# Inhoudstafel

1	Abstract.....	1
2	Inleiding.....	3
2.1	Inflammatoire darmziekten (IBD).....	3
2.1.1	Algemeen.....	3
2.1.2	Epidemiologie van IBD.....	3
2.1.3	Histopathologie en symptomatologie.....	3
2.1.4	Etiologie.....	4
2.1.5	Pathofysiologie.....	6
2.1.6	Diagnose en behandeling van inflammatoire darmziekten.....	8
2.2	Intestinale fibrose bij IBD.....	9
2.2.1	Inleiding.....	9
2.2.2	Pathofysiologie van intestinale fibrose bij IBD.....	9
2.2.3	Experimentele targets voor de behandeling van intestinale fibrose.....	14
2.3	Prolyl-hydroxylasen (PHD's).....	15
2.3.1	De functie van de PHD's binnen de HIF-pathway.....	15
2.3.2	Het gekende effect van panhydroxylase remmers.....	16
2.3.3	PHD-isotypes en hun specifiek effect op inflammatie en fibrose bij IBD.....	17
2.4	Induceerbare Cre/LoxP recombinatie voor conditionele gen knock-out.....	18
2.5	DSS geïnduceerde colitis als muismodel voor IBD en fibrose.....	20
3	Probleemstelling.....	20
4	Materialen en Methoden.....	21
4.1	<i>In-vivo procedures</i> .....	21
4.1.1	Dieren.....	21
4.1.2	Genotypering van de muizen d.m.v. kwalitatieve PCR en gelelektroforese.....	21
4.1.3	Chronische DSS en klinische opvolging.....	22
4.1.4	Tamoxifen-geïnduceerde Cre/Loxp-gemedieerde <i>Phd1</i> knock-out.....	23
4.1.5	Staalafnames bij de muizen.....	24
4.1.6	Massons's Trichroom kleuring en de histologische evaluatie van fibrose.....	24

4.2	<i>In-vitro</i> procedures .....	25
4.2.1	Isolatie van intestinale muis fibroblasten .....	25
4.2.2	Flowcytometrie .....	26
4.2.3	RNA-isolatie, cDNA synthese en Real-Time qPCR .....	27
4.2.4	Interleukine 6 luminex bead-based assay.....	28
4.2.5	Optimalisatie van de TGF-stimulatie.....	29
4.2.6	Optimalisatie van de DMOG-stimulatie.....	29
4.2.7	Stimulatie-experimenten met TGF- $\beta$ 1 en DMOG .....	30
4.3	Statistische analyse.....	30
5	Resultaten.....	31
5.1	<i>In-vivo</i> experimenten.....	31
5.1.1	Genotypering.....	31
5.1.2	<i>Phd1</i> knock-out muizen zijn niet beschermd tegen intestinale inflammatie en fibrose tijdens chronische DSS-colitis.....	31
5.1.3	Optimalisatie van de tamoxifen-geïnduceerde conditionele <i>Phd1</i> knock-out. ..	34
5.2	<i>In-vitro</i> experimenten.....	37
5.2.1	De isolatieprocedure is selectief voor fibroblasten.....	37
5.2.2	Dosisoptimalisatie van TGF en DMOG.....	37
5.2.3	<i>Phd1</i> deletie remt TGF-gemedieerde fibroblastactivatie niet .....	37
6	Discussie.....	39
6.1	<i>In-vivo</i> resultaten .....	39
6.2	<i>In-vitro</i> resultaten .....	43
7	Conclusie .....	47
8	Referenties.....	47
9	Addendum	

# 1 Abstract

## *Introductie*

Intestinale fibrose is een ernstige en veelvoorkomende complicatie van inflammatoire darmziekten (IBD), die zich uit onder de vorm van stricturen en obstructies. Ondanks een goede controle van inflammatie, zijn huidige IBD-therapieën niet in staat het fibrotisch proces af te remmen. De standaardbehandeling is nog steeds heilkunde, met een risico op complicaties en een hoge recidiveringsgraad. Recent preklinisch onderzoek toonde aan dat dimethyloxallylglycine (DMOG), een panhydroxylase inhibitor, zowel *in-vivo* als *in-vitro* een antifibrotisch effect uitoefent. Omwille van gevreesde langetermijncomplicaties zoals kanker en polycythaemia is het therapeutisch gebruik van deze drug echter controversieel. Selectieve prolyl-hydroxylase (PHD) isotype inhibitie zou een manier zijn om deze complicaties te mijden. Om tal van redenen wordt PHD1-inhibitie gesuggereerd als het mechanisme achter de werking van DMOG. Het doel van deze studie was dan ook het potentieel antifibrotische effect van PHD1-inhibitie te onderzoeken.

## *Materialen en methoden*

Wildtype (wt) en *Phd1*<sup>-/-</sup> knock-out (ko) muizen ondergingen een chronische DSS-proef met inductie van intestinale fibrose. De mate van fibrose werd zowel op basis van sacrificatieparameters als histologisch gescoord. Daarnaast werd ook een model geoptimaliseerd voor fibroblastspecifieke, tamoxifengeïnduceerde, conditionele *Phd1* knock-out (cko). Evaluatie van het succes van dit model werd nagegaan a.d.h.v. de mRNA-expressie van het wt en cko allel, gekwantificeerd met RT-qPCR. *In-vitro* werden fibroblasten (MIF's) geïsoleerd uit het colon van wt en *Phd1* ko muizen. De zuiverheid werd gevalideerd met flowcytometrie. MIF's werden gestimuleerd met Transforming growth factor bèta (TGF) en DMOG waarna fibroblastactivatie werd nagegaan a.d.h.v. profibrotische genexpressie en IL-6-secretie, gekwantificeerd met respectievelijk RT-qPCR en luminex.

## *Resultaten*

Na de chronische DSS-proef kon, noch op basis van de sacrificatieparameters, noch histologisch een verschil aangetoond worden in intestinale fibrose tussen wt en *Phd1*<sup>-/-</sup> ko muizen. Een dagelijkse intraperitoneale toediening van 2 mg tamoxifen gedurende vijf dagen bleek zeer succesvol in het bekomen van *Cre*-gemedieerde *Phd1* deletie. *In-vitro* werd de fibroblastselectiviteit van de isolatieprocedure bevestigd. Op niveau van profibrotische genen konden geen expressieverschillen aangetoond worden tussen de twee genotypes. Hoewel insignificant, was de IL-6 concentratie wel lager in het supernatans van *Phd1* ko MIF's. Dit laatstgenoemde, inhiberend effect van fibroblastactivatie was afwezig bij het evalueren van de inductie van de IL-6-secretie.



### *Conclusie*

In dit onderzoek kon geen beschermend effect van de *Phd1*-deletie op de ontwikkeling van fibrose aangetoond worden. Mogelijk is dit te wijten aan celspecifieke responsen op de deletie, een combinatie van anti- en profibrotische responsen met een netto neutraal effect. Op basis van voorgaand, preklinisch onderzoek vermoeden we een antifibrotisch effect van de *Phd1* knock-out in fibroblasten. Fibroblastspecifieke *Phd1*-deletie biedt vermoedelijk wel bescherming tegen intestinale fibrose bij chronische DSS-colitis. Om dit te bewijzen in vervolgonderzoek, optimaliseerden we een model van *Cre*-gemedieerde conditionele knock-out dat zeer succesvol bleek in het genereren van fibroblastspecifieke *Phd1*-deleties.

Verder was er geen verschil in profibrotische genexpressie tussen ko's en wt's na TGF-gemedieerde MIF-activatie, potentieel het gevolg van een te lage steekproefgrootte en een te hoge concentratie TGF. De relatief lagere IL-6-concentratie in het supernatans van *Phd1* ko fibroblasten pleit eveneens voor een mogelijk gemist effect. Samengevat konden we noch *in-vivo*, noch *in-vitro*, een significant antifibrotisch effect van *Phd1*-inhibitie aantonen. Vervolgonderzoek met grotere steekproefpopulaties en gebruik van fibroblastspecifieke *Phd1*-deletie is echter zeker nodig om sluitende conclusies te trekken over de impact van PHD1 op ontwikkeling van intestinale fibrose.

## 2 Inleiding

### 2.1 Inflammatoire darmziekten (IBD)

#### 2.1.1 Algemeen

Het begrip 'inflammatoire darmziekten' (Inflammatory bowel diseases – IBD) wordt gebruikt als overkoepelende term om twee chronische, relapsing, inflammatoir gemedieerde darmaandoeningen te benoemen: enerzijds de Ziekte van Crohn (CD) en anderzijds Colitis Ulcerosa (UC) (1-4).

#### 2.1.2 Epidemiologie van IBD

IBD komt wereldwijd voor en is een niet te onderschatten aandoening met toenemende incidentie (1, 4). De hoogste incidentie is terug te vinden in Noord-Europa, het Verenigd Koninkrijk en Noord-Amerika, waarbij die van UC overal, op Canada na, hoger is.

Ook de prevalentie is niet gering. In Europa varieert deze van CD van 8 tot 214 zieken per 100'000 inwoners, tegenover 21 tot 294 bij UC. Op basis van deze gegevens zouden in de Europese Gemeenschap alleen al zo'n 1 miljoen CD- en 1,4 miljoen UC-patiënten leven (1).

De diagnose van CD wordt het vaakst gesteld bij twintigers. Dertigers, daarentegen, worden vaker geconfronteerd met UC. Ten slotte is er voor elke aandoening een predispositie op basis van het geslacht. Zestig procent van de UC-patiënten zijn mannen, terwijl CD twintig tot dertig procent meer voorkomt bij vrouwen (1).

#### 2.1.3 Histopathologie en symptomatologie

Hoewel ze sterk op elkaar lijken, worden zowel UC als CD gekenmerkt door een verschillend pathofysiologisch mechanisme. Ze kennen dan ook elk een ander patroon van weefselschade (2). CD wordt getypeerd door een transmurale inflammatie van de darmwand, met laesies die overal in de gastro-intestinale tractus kunnen voorkomen. Het terminale ileum en de perianale regio blijven echter voorkeurslocaties (1, 3, 4). De laesies zijn vaak gekenmerkt door de aanwezigheid van granulomen (5). De inflammatoire zones vormen bovendien ook geen continu geheel maar uiten zich onder de vorm van zogenaamde *skip lesions*. Dit slaat op de aanwezigheid van inflammatoire zones die niet met elkaar verbonden zijn, er zijn tussenliggende gebieden waar inflammatie afwezig is (1, 4).

De inflammatie bij UC, daarentegen, is quasi steeds beperkt tot de mucosale laag. De inflammatoire zone vormt er een continu geheel dat beperkt is tot het colon. Deze zone ontstaat meestal in het rectum en breidt dan retrograad uit (1, 3, 4). De histologie, complicaties en symptomen van de twee staan opgesomd in Tabel 1.

Beide vormen van IBD worden gekenmerkt door complicaties op lange termijn. Abcedatie en fistelvorming komen veel frequenter voor bij CD dan UC (4). De vorming van een toxisch megacolon is, daarentegen, de meest gevreesde complicatie bij UC (6). Fibrose en de daaraan

gekoppelde stenose zijn eveneens ernstige complicaties van IBD (7, 8). Deze worden verderop in meer detail besproken.

Tabel 1: Beschrijving van de histologische kenmerken en klinische symptomen van zowel de Ziekte van Crohn (CD) als Colitis Ulcerosa (UC) (1, 3-8).

Eigenschappen	Ziekte van Crohn (CD)	Colitis Ulcerosa (UC)
Histopathologie		
Patroon van inflammatie	Transmuraal doorheen de wand	Beperkt tot de mucosa
Locatie van de laesies	Overall in de gastro-intestinale tractus	Beperkt tot het colon
Voorkeurslocatie	Terminale ileum, perianale regio	rectum
Verloop	Niet-continu, met <i>skip lesions</i>	Continu, retrograad vanuit rectum
Granulomen aanwezig	+++	+
Symptomen		
Algemeen		
Vermoeidheid	+++	++
Gewichtsverlies	+++	+
Koorts	+++	+
Onset van de klachten	Relatief snel (dagen tot weken)	Meer indolent (weken tot maanden)
Abdominale klachten		
Persisterende diarree	+++	+++
Rectaal bloedverlies	+	++
Abdominale pijn	Rechter onderkwadrant	Linker onderkwadrant
Extra-intestinaal	++	+
Complicaties	Abcedatie, fistelvorming, fibrose	Toxisch megacolon, fibrose

+, de graad van prevalentie.

IBD patiënten klagen over vermoeidheid, koorts en persisterende diarree, die vaak bloed en slijm bevat. Rectaal bloedverlies is frequenter bij UC, terwijl koorts eerder bij CD voorkomt (5). Zowel UC als CD patiënten hebben abdominale pijnklachten. De voorkeurslocaties zijn respectievelijk het linker en rechter onderkwadrant van de buik (3). Beide aandoeningen verschillen ook in de wijze van aanvang: waar de klachten van CD een relatief snel ontstaan kennen (dagen tot weken), begint UC vaak meer sluimerend over het verloop van weken tot maanden (5).

Ten slotte presenteren zich bij zowel UC als CD ook extra-intestinale manifestaties. De meest voorkomende zijn artritis, erythema nodosum, anterieure uveïtis, afteuze stomatitis en pyoderma gangrenosum (1, 5). Deze zijn meer prevalent bij CD dan bij UC (5).

## 2.1.4 Etiologie

### 2.1.4.1 Algemeen

De precieze oorzaak van deze inflammatoire aandoeningen is nog niet gekend. Men weet echter wel dat IBD gekenmerkt wordt door een multifactoriële etiologie waarvan reeds

verschillende actoren werden blootgelegd. Zowel genetische susceptibiliteit, de samenstelling van het microbioom als omgevingsfactoren spelen een rol (1-4, 9).

#### 2.1.4.2 Specifieke factoren

##### *Genetische susceptibiliteit*

Via genoombrede associatiestudies (GWAS) werden al meer dan 230 single nucleotide polymorfismen (SNP's) in associatie gebracht met de ziekte (10). De mutaties zijn gelinkt aan defecten in aangeboren en adaptieve immuniteit en epitheliale barrièrefunctie (11). Defecten in pathogeengeassocieerde moleculaire patroon (PAMP) receptoren, zoals Toll-like receptoren (TLR) op de celmembraan of Nod-like receptoren (NLR) in het cytosol, zijn slechts enkele voorbeelden. Ook SNP's in genen van cytokines en hun receptoren, zoals Interleukine 10 (IL-10) en de IL-23 receptor, of in genen betrokken bij apoptose of autofagie, zoals NOD2 en Autofagie gerelateerd proteïne 16-1 (ATG16L1), zijn frequent (12-15). Ondanks de vele genetische mutaties geassocieerd aan IBD, verklaren slechts 20 – 25% van de SNP's de overerfbaarheid van de ziekte (4).

Epigenetische regulatiemechanismen zijn ook geassocieerd aan de ziekte. Dit zijn wijzigingen in de DNA-methylatie of chromatinestructuur met een verhoogde of verlaagde genexpressie als gevolg. De patronen van DNA-methylatie verschillen zeer sterk tussen gezonde en inflammatoire darmmucosa van CD en UC-patiënten. Zo zou de expressie van tumor necrose factor alfa (TNF- $\alpha$ ) en IL-1 $\beta$ , twee pro-inflammatoire cytokines, er onder andere epigenetisch gereguleerd zijn (16).

##### *Microbiële darmflora*

De menselijke darm is een broedplaats voor bacteriën. Door middel van metagenomische sequencing ontdekten Qin *et al.* dat er tussen de 1000 en 1150 species voorkomen, waarvan elk individu er minstens 160 herbergt (17). Uit diermodellen blijkt dat de aanwezigheid van die darmbacteriën essentieel is voor de ontwikkeling van een immuungemedieerde darmontsteking (18, 19). Daarenboven zijn locaties met hoge concentraties aan bacteriën voorkeursplaatsen voor het ontstaan van IBD-gerelateerde inflammatie (2).

Een belangrijk kenmerk van IBD is de veranderde samenstelling van het intestinale microbioom, ook wel dysbiose genoemd (20). De meeste studies rapporteren een daling van de bacteriële diversiteit als uiting hiervan (4, 20). Ook zijn er vaak specifieke bacteriële phyla minder of meer vertegenwoordigd, zoals respectievelijk de Firmicutes en Proteobacteria (20). Dankzij de verminderde afweer- en barrièrefunctie, kenmerkend voor IBD *cfr. infra*, is er bijvoorbeeld vaak een verhoogde aanwezigheid van pro-inflammatoire, Gram-negatieve, adherent-invasieve *E. Coli* stammen. Deze kunnen zich enerzijds gemakkelijk vasthechten op het epitheel en anderzijds intracellulair van gastcellen overleven en delen (16).

IBD wordt daarnaast ook gekenmerkt door de gedaalde stabiliteit van het microbioom (4). Ten slotte is de concentratie van commensalen, geassocieerd aan de darmmucosa en de intestinale slijmlaag, verhoogd (21, 22).

#### *Omgevingsfactoren*

Verskillende omgevingsfactoren met een invloed op CD en UC zijn gekend. Roken heeft een verschillend effect op UC en CD. Het werkt enerzijds beschermend bij UC en leidt tot een daling van het aantal relapses. Anderzijds leidt het tot een verhoogd risico op het ontwikkelen van CD en op post-operatieve ziekte na heekunde voor deze aandoening (23).

In verschillende grootschalige studies werd het beschermende effect van de appendectomie op het ontwikkelen van UC aangetoond (24). Volgens Cosnes *et al.* zijn roken en een appendectomie de enige omgevingsfactoren met een echte invloed op het risico om IBD te ontwikkelen (1). Andere zaken, geassocieerd met inflammatoire darmziekten, zijn het dieet, Vitamine D tekort, sociale status, stress en het gebruik van niet-steroïdale anti-inflammatoire drugs (NSAID's) (2, 4).

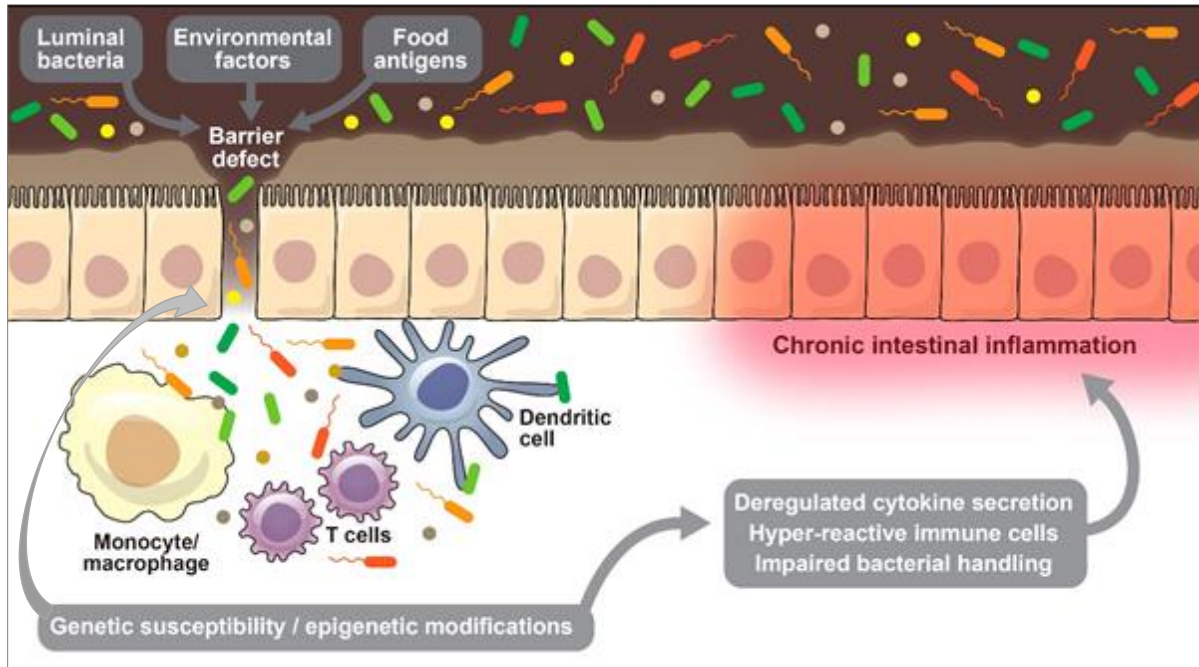
#### 2.1.5 Pathofysiologie

De chronische inflammatie bij IBD zou te verklaren zijn door een slecht geregelde immuunrespons tegen intraluminale, commensale antigenen in individuen met een genetische predispositie (9). Zoals hierboven reeds vermeld, spelen defecten in adaptieve en aangeboren immuniteit en barrièrefunctie een belangrijke rol in dit pathofysiologisch proces (11). De intestinale barrièrefunctie en aangeboren immuniteit kunnen bij IBD op verschillende manieren gecompromitteerd zijn. Zo leiden mutaties in het NOD2 en ATG16L1 gen, zoals gezien wordt bij CD, tot een gedaalde functie van de Paneth cellen. Hierbij wordt de mogelijkheid tot autofagie gecompromitteerd, net als de secretie van  $\alpha$ -defensines, een klasse van antimicrobiële peptiden (11, 25-27). Daarnaast is, bij zowel UC- als CD-patiënten, de eiwitsamenstelling van de intestinale tight junction complexen (TJs) gewijzigd, wat een verhoogde permeabiliteit van de barrière veroorzaakt (11). De gecompromitteerde barrièrefunctie zorgt op zijn beurt voor een beduidende toename van de translocatie van commensale antigenen met inflammatie en inductie van een immuunrespons als gevolg (3, 11).

Immuuncellen zoals T-cellen, macrofagen en neutrofielen worden gerekruteerd naar de plaats van inflammatie en zorgen voor lokale weefseldestructie. Immungemedieerde zuurstofradicaalvorming leidt tot verlies van epitheelcellen. De immuuncellen secreteren daarenboven grote hoeveelheden matrixmetalloproteasen (MMP's), wat leidt tot degradatie van de extracellulaire matrix (ECM) in de lamina propria, met ulceraties als gevolg (28).

Adaptieve immuniteit bij IBD berust voornamelijk op de werking van T-cellen. De inflammatie bij Crohn is T-helpercel 1 (Th1) gemedieerd met productie van grote hoeveelheden interferon

gamma (IFN- $\gamma$ ). Dit cytokine activeert macrofagen en induceert weefselschade. UC wordt, daarentegen, gekenmerkt door een atypische Th2 gedreven inflammatie in een IL-13 rijk milieu (2, 4). Ook Th17 cellen spelen een rol bij beide vormen van IBD, hun exacte functie is echter nog niet gekend (4). Figuur 1 geeft een beknopt overzicht van de pathofysiologie weer.



Figuur 1: Pathofysiologie van inflammatoire darmziekten (IBD). De chronische darminflammatie, kenmerkend voor IBD, ontstaat door een samenspel van het intestinale microbioom, omgevingsfactoren en een onregelde barrière- en immuunfunctie in genetisch gepredisponeerde individuen. Genetische defecten leiden tot een gedaalde barrièrefunctie, waardoor lumenale antigenen en microben sneller door de wand dringen. Het gevolg van de translocatie en presentatie van microbiële antigenen is een belangrijke inflammatie met rekrutering van immuuncellen. Deze zorgen, via de secretie van proteasen, inflammatoire cytokines en zuurstofradicalen, voor bijkomende weefseldestructie en barrièredysfunctie. Genetische defecten kunnen ook leiden tot een onvermogen om getransloceerde pathogenen te klaren en tot een overmatige secretie van weefselschade-inducerende cytokines, beiden via hyperreactiviteit van de immuuncellen. Het gevolg is een toegenomen translocatie van lumenale bacteriën door de beschadigde barrière met toename van het inflammatoir proces tot chroniciteit bereikt wordt (29).

De chroniciteit van de inflammatie kent verschillende oorzaken. Enerzijds leidt de heftige mucosale inflammatie tot verdere disruptie van de intestinale barrière (3, 11). Zo zorgen zowel TNF- $\alpha$  als IFN- $\gamma$  voor een verhoogde permeabiliteit van de intestinale TJs (11, 30). Ook IL-13 zorgt voor een disruptie, via stimulatie van epitheelcelapoptose en inductie van TJ dysfunctie (11). De inflammatoir gemedieerde destructie van epitheelcellen en de ECM, door zuurstofradicalen en MMP's, zorgt voor verdere degradatie van de barrièrefunctie. (28). Anderzijds zijn er stoornissen in adaptieve en aangeboren immuniteit, waarvan sommigen tot chroniciteit leiden door een bemoeilijkte klaring van microben, zoals het defect in autofagocytose, *cf. supra*. Anderen leiden tot chroniciteit d.m.v. een overdreven immuunrespons met excessieve weefselschade. Voorbeelden hiervan kunnen opnieuw teruggevonden worden bij een defect in NOD2, wat leidt tot een disinhibitie van de TLR2 pathway en generatie van een excessieve Th1-gedreven respons (31). Ook de

immuuntolerantie is verstoord in een bepaalde NOD2-mutatie (32). Ten slotte leidt chronische inflammatie tot hypoxie, wat *in se* ook pro-inflammatoir werkt via activatie van de NF- $\kappa$ B pathway, zoals hieronder beschreven is (33).

### 2.1.6 Diagnose en behandeling van inflammatoire darmziekten

Bij het stellen van de diagnose wordt in de eerste plaats rekening gehouden met de anamnese en het klinisch onderzoek. Abdominale palpatie kan pijnlijk zijn, soms kan een distensie gevoeld worden. Er zijn verschillende diagnostische labotests voorhanden, waaronder de bepaling van lactoferrine en calprotectine in de stoelgang en C-Reactief Proteïne in het serum. Calprotectine, een eiwit geproduceerd door inflammatoire cellen en bijgevolg een biomarker voor darminflammatie is de meest betrouwbare test. Endoscopie van de darm blijft echter de gouden standaard voor zowel diagnose als differentiatie van IBD. Hierbij wordt macroscopisch de morfologie van darm en het patroon van de inflammatie geëvalueerd. Er worden ook bipten genomen die belangrijk zijn voor de histologische differentiatie (5).

De huidige therapieën om IBD te behandelen bestaan uit 5-aminosalicylaten (5-ASA), immunomodulatoren zoals methotrexaat en azathioprine, corticosteroïden, cyclosporine en biologicals. Ze werken via de onderdrukking van het immuunsysteem, zowel lokaal als systemisch (6, 34). Op het gebied van biologicals beschikt men enerzijds over de anti-cytokines en anderzijds over de anti-celadhesiemoleculen. Ze blokkeren respectievelijk de pro-inflammatoire cytokines zoals TNF- $\alpha$  (Adalimumab, Infliximab) of IL-12 en 23 (Ustekinumab), en de moleculen noodzakelijk voor homing en leukocytenadhesie zoals het  $\alpha$ 4 $\beta$ 7-integreine (Vedolizumab), verantwoordelijk voor de T-celmigratie naar de intestinale mucosa (34, 35). Wat men gebruikt, is afhankelijk van de variant, het verloop en de complicaties van de aandoening. Men kan bovendien kiezen voor een *step-down* of *step-up* aanpak. Bij *step-down* start men met het meest effectieve product op de markt in de hoop remissie te bereiken en nadien te kunnen afbouwen. Bij *step-up* therapie probeert men met de klassieke medicatie de ziekte te controleren en bouwt men op naargelang de noodzaak (6). De huidige therapieën zijn ondanks hun potente anti-inflammatoire capaciteit niet in staat om complicaties zoals fibrose en stenoserings tegen te gaan. Chirurgie is hierbij dus de gouden standaard. Een operatie is echter niet feilloos en gaat gepaard met een hoge graad van recidive (9, 36). Om dit probleem aan te pakken is een grondige kennis over de pathofysiologie van intestinale fibrose vereist.

## 2.2 Intestinale fibrose bij IBD

### 2.2.1 Inleiding

Intestinale fibrose (IF) is een ernstige en frequente complicatie van IBD, waarbij heekunde vaak onvermijdelijk is. De chronische of recurrenente inflammatie bij CD en UC leidt tot een excessieve depositie van ECM-moleculen in de darmwand (7, 8, 36). Deze langetermijncomplicatie treedt op bij minstens 30 – 40% van de CD en 5% van de UC patiënten (37). Het patroon van extracellulaire matrix depositie volgt dat van de inflammatie bij zowel CD als UC. Zo is de fibrosering bij UC beperkt tot de submucosa, het colon wordt hierdoor korter en verliest zijn mobiliteit. Op beeldvorming krijgt de dikke darm het aspect van een loden pijn. Bij CD, daarentegen, vindt ECM depositie plaats in alle lagen van de darmwand. Door dit transmuraal karakter ontstaan er stenoses en obstructies (7, 8, 38).

### 2.2.2 Pathofysiologie van intestinale fibrose bij IBD

#### 2.2.2.1 Algemeen

Het ontstaansmechanisme van IF wordt door verschillende auteurs beschouwd als een niet-gecontroleerde mucosale wondheling onder chronische inflammatie (9, 39-42).

In normale, gecontroleerde omstandigheden leidt weefselschade tot lokale inflammatie, gemedieerd door gerekruteerde macrofagen en neutrofielen. Deze secreteren zowel pro-inflammatoire en profibrotische mediators als ECM-degraderende enzymen. Matrixdegradatie leidt tot het vrijstellen van matrixgebonden pro-inflammatoire en profibrotische groeifactoren, chemokines en cytokines, die het inflammatoire en fibrogene milieu enkel versterken. De vrijgestelde factoren rekruteren meer inflammatoire cellen, maar ook mesenchymale cellen zoals fibroblasten, myofibroblasten en gladde spiercellen (28, 40). Deze cellen prolifereren in de profibrotische omgeving onder invloed van groeifactoren. Ze worden daarenboven geactiveerd tot een fibrogeen fenotype, wat leidt tot een verhoogde productie van ECM (28, 40, 42). Verschillende bronnen beschouwen de myofibroblast als de belangrijkste cellulaire mediator van fibrogenese (ECM-productie) en wondheling (9, 43). De migratiecapaciteit, ECM-productie en ten slotte wondcontractie van deze cellen zijn immers onmisbaar voor dit laatste proces (9, 28). Dankzij eliminatie van fibrogene cellen en degradatie van de overtollige ECM worden resolutie van de wondheling en een normale intestinale architectuur bereikt (8, 39, 42).

De pathofysiologische mechanismen, die intestinale fibrose in de hand werken, zijn het gevolg van het langdurig gewijzigde cytokinemilieu tijdens chronische inflammatie (8). Er wordt een pathologische overmaat aan fibrogene cellen geactiveerd en gerekruteerd, met een sterk verhoogde ECM-productie als gevolg (8, 9, 28, 39, 40, 44, 45). Deze cellen worden daarenboven niet geëlimineerd, zoals het hoort op het einde van de wondheling, maar persisteren en prolifereren (8, 9, 28).



Een laatste mechanisme omvat de wanbalans tussen ECM-productie en afbraak, wat leidt tot een netto accumulatie van extracellulaire matrixproteïnen (8, 9, 40, 45, 46). Ten slotte is het ook belangrijk te onderkennen dat IF, na de inflammatie-afhankelijke start, een autopropagatief proces wordt (43). Alle bovengenoemde mechanismen worden hieronder verder verduidelijkt.

#### 2.2.2.2 Een overmaat aan geactiveerde, fibrogene cellen

##### *ECM-producerende cellen als effectoren bij intestinale fibrose*

Mesenchymale cellen zijn de belangrijkste producenten van ECM-proteïnes (28). In het intestinale milieu bestaan ze uit een heterogene populatie van fibroblasten (FØ's), myofibroblasten (MF's) en gladde spiercellen (SMC's) (8, 9). Ze worden gedifferentieerd op basis van hun cytoskeletale proteïnen, met name vimentine (V), desmine (D) en alfa-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA, ACTA-2, A) (8).

Net zoals bij de wondheling, hebben myofibroblasten<sup>(V+, A+, D-)</sup> het grootste aandeel in fibrose (8, 9, 43, 44). Latella *et al.* beschouwen MF's als geactiveerde fenotypes van zowel mesenchymale als niet-mesenchymale cellen. Het geactiveerde fenotype wordt gekenmerkt door de verhoogde productie van ECM, MMP's en profibrotische mediators (45). Bij de transitie naar een geactiveerde myofibroblast is een belangrijke conformatieverandering van het cytoskelet noodzakelijk (44). De aanwezigheid van  $\alpha$ -SMA in fibroblastachtige cellen zou gecorreleerd zijn met deze activatie (28).

Er zijn echter ook onder normale, fysiologische condities myofibroblasten voorhanden in de darm. Zowel de interstitiële cellen van Cajal (ICC) als de subepitheliale myofibroblasten (SEMF), twee soorten MF's, zijn er steeds aanwezig. Deze kunnen in een profibrotisch milieu aangespoord worden tot verhoogde expressie van ECM, wat erop wijst dat myofibroblasten ook niet-geactiveerd kunnen voorkomen (8, 9, 40).

##### *De geactiveerde, fibrogene celpool vindt zijn oorsprong in tal van celtypes*

Zoals reeds gesteld, dragen verschillende celtypes bij tot de pool van geactiveerde fibroblasten. Alle precursoren en de belangrijkste inductoren zijn aangegeven in addendum IV, figuur 1.

De belangrijkste bron van ECM-producerende myofibroblasten zijn de mesenchymale cellen. Zowel fibroblasten<sup>(V+, A-, D-)</sup> als gladde spiercellen<sup>(V-, A+, D+)</sup> kunnen, onder de profibrotische omstandigheden van chronische inflammatie, transdifferentiëren tot geactiveerde ECM-producerende myofibroblasten. Transforming growth factor bèta 1 (TGF- $\beta$ 1, TGF) speelt een erg belangrijke rol bij deze transdifferentiatie (8).

De toename van fibroblasten is een essentieel gegeven in de pathofysiologie van het fibrotisch proces (8, 9). Twee belangrijke mechanismen dragen bij tot de toename van fibroblasten in de inflammatoire regio. Enerzijds neemt de proliferatie toe o.i.v. van groeifactoren zoals TGF- $\beta$ 1, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth

factor (EGF), connective-tissue growth factor (CTGF), platelet-derived growth factor (PDGF) en pro-inflammatoire cytokines zoals IL-1 $\beta$ , IL-6 en TNF- $\alpha$  (9). Anderzijds migreren de fibroblasten, doorheen de ECM, vanuit niet-geaffecteerde zones naar de inflammatoire zone. Fibronectine, een proteïne van de extracellulaire matrix, blijkt hiervoor essentieel te zijn. Het is de krachtigste autocriene inductor van fibroblast migratie, die leidt tot actieve, random migratie (chemokinese). Daarnaast is paracrien gemedieerde migratie volgens een chemotactische gradiënt ook fibronectine-afhankelijk. De belangrijkste paracriene stimuli voor migratie zijn PDGF-A en B, EGF, IGF-1 en TGF- $\beta$ 1. Bepaalde cytokines zoals IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$  verhinderen net deze migratie (8, 9, 28).

Gladde spiercellen bevinden zich in de darm voornamelijk in de muscularis mucosae. Naast activatie tot een ECM-producerende myofibroblast, kunnen gladde spiercellen ook zelf een fibrogeen fenotype verwerven onder invloed van TGF- $\beta$ 1 en IL-1 $\beta$ . Daarbij is de productie van MMP's, ECM proteïnes en ook IL-6 sterk verhoogd (8, 9).

Naast bovenstaande mesenchymale cellen kunnen ook stellaatcellen, pericyten, epitheel- en endotheelcellen, mesenchymale stamcellen uit het beenmerg en in het bloed circulerende fibrocyten omgevormd worden tot geactiveerde myofibroblasten (8, 9, 45). Transdifferentiatie gebeurt onder invloed van signalen afkomstig uit immuuncellen, adipocyten, endotheelcellen, fibrocyten en fibroblasten. De signalen zijn talrijk en omvatten o.a. PDGF, EFG, IGF-1 en 2, CTGF, IL-1, IL-13, stamcel factor (SCF), endothelines (ET), Angiotensine II (ANG II), TGF- $\alpha$ , bFGF, Peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR $\gamma$ ) en de belangrijkste: TGF- $\beta$  (8, 9). Ten slotte zijn ook mechanische tensie, PAMP's van getransloceerde microben en schade geassocieerde moleculaire patronen (DAMP's) inductoren van de transitie tot de geactiveerde myofibroblast (8, 9, 28, 43, 45). Bovengenoemde signalen en processen dragen overigens bij tot de proliferatie van myofibroblasten en verdere activatie van hun ECM-productie (9).

Stellaatcellen zijn mesenchymale precursoren die kunnen transdifferentiëren naar geactiveerde MF's. Stellaatcellen, geïsoleerd uit IBD-mucosa, differentiëren en prolifereren sneller en produceren, eenmaal geactiveerd, meer ECM dan de controles uit gezonde personen (8, 9). Pericyten omgeven endotheliale cellen van capillairen en kleine bloedvaatjes. Ze beïnvloeden de differentiatie en signaaltransductie van endotheelcellen, net als angiogenese. Pericyten vormen een intermediair fenotype tussen vasculaire SMC's en F $\emptyset$ 's, wat differentiatie tot MF's vlot toelaat (8, 9).

Zoals reeds aangegeven, dragen ook niet-mesenchymale cellen bij aan de pool ECM-producerende myofibroblasten. Endotheliale-mesenchymale transitie (EndoMT) en epitheliale-mesenchymale transitie (EMT) zijn processen waarbij respectievelijk endotheel- en epitheelcellen hun fenotypische en functionele kenmerken verliezen en vervolgens

mesenchymale eigenschappen verwerven (8, 9, 41). Zowel EMT als EndoMT hebben een bewezen aandeel in fibrose (41, 47, 48). TGF- $\beta$ 1 is de sterkste activator van deze transitie. Daarnaast worden endotheel- en epitheelcellen ook aangestuurd tot transdifferentiatie door disruptie van de basale membraan en bepaalde ECM-moleculen, zoals fibronectine (8, 41). Een laatste, gekende bron van geactiveerde myofibroblasten zijn mesenchymale stamcellen (MSC) uit het beenmerg. Na differentiatie circuleren deze in het bloed als fibrocyten, voorlopers van mesenchymale cellen. In fysiologische omstandigheden ontwikkelen ze tot weefselmacrofagen en dendritische cellen. IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 en serum amyloid P (SAP) drijven hun differentiatie in de richting van myofibroblasten (8, 9).

#### *Gedaalde eliminatie van ECM-producerende cellen*

In normale omstandigheden treedt op het einde van de wondheling een resolutiefase op. Geactiveerde myofibroblasten worden gedeactiveerd of geëlimineerd en de netto accumulatie van de ECM wordt gedegeerd. Bij fibrose vindt deze eliminatie niet plaats. Er worden net meer fibrogene cellen gerekruteerd die gaan prolifereren, *cfr supra*. Dit zou te wijten kunnen zijn aan een netto proliferatief effect van mediators zoals TGF- $\beta$ 1 en alle andere groeifactoren en cytokines hierboven beschreven. Er zijn echter ook enkele specifieke mechanismen die inwerken op apoptose en zo eliminatie van fibrogene cellen tegengaan. Zo wordt NOD2, één van de genen waarvan mutaties een predispositie vormen voor het ontwikkelen van IBD *cfr supra*, ook tot expressie gebracht in myofibroblasten (49). In normale omstandigheden leidt stimulatie van NOD2 tot activatie van de caspases betrokken bij apoptose (8). Het is dan ook niet verwonderlijk dat mutaties in NOD2 geassocieerd zijn met een fibrostenotisch verloop van CD (50).

Naast deze genetische factoren zou ook tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), *cfr infra*, een rol spelen. Zo werd in hepatische stellaatcellen aangetoond dat TIMP-1 apoptose onderdrukt via zijn inhiberend effect op de MMP's (51). MMP's induceren immers mesenchymale apoptose via degradatie van fibronectine (8). TIMP-1 is opgeregeerd in fibrostenotische darmsegmenten van CD patiënten, wat dit effect waarschijnlijker maakt (45).

#### 2.2.2.3 De wanbalans tussen ECM productie en degradatie

Door enerzijds de sterk toegenomen influx en proliferatie van geactiveerde fibroblasten, en anderzijds hun verminderde eliminatie is er dus een overmaat aan ECM-producerende fibrogene cellen en bijgevolg een sterk verhoogde ECM-productie (9).

De balans tussen ECM-synthese en -degradatie is strikt geregeld door een systeem van matrixmetalloproteasen (MMP's) en hun inhibitoren: TIMP en  $\alpha_2$ -macroglobuline (9, 40, 45). MMP's vormen een heterogene groep van calcium-geactiveerde en zink-afhankelijke endopeptidasen, die als zymogenen gesecreteerd worden door mesenchymale en

inflammatoire cellen (9, 45). Fibroblasten hebben hierin het grootste aandeel (52). TIMP's worden door dezelfde celtypes gesecreteerd (9).

De differentiële expressie van de verschillende MMP's en hun inhibitoren in IBD werd reeds veelvuldig onderzocht: verschillende MMP's zijn er verhoogd. Baugh *et al.* rapporteerde een stijging van de MMP1, 2, 3 en 9 activiteit in geïntestineerd weefsel van CD en UC patiënten i.v.m. gezonde controles (53). De resultaten van de groep van Meijer sluiten hierbij aan (54). Deze toename in MMP-activiteit begunstigt mogelijk het proces van fibrogene celinflux en fibroblastmigratie, processen die fibrose in de hand werken (9).

Het precieze werkingsmechanisme en aandeel van de MMP's in fibrose is echter nog niet helemaal gekend. Om een netto accumulatie te verkrijgen verwacht men in de eerste plaats dat de MMP activiteit gedaald is en/of de TIMP-1 activiteit toegenomen is (9). Bij fibrose rapporteren de meeste auteurs een opregulatie van zowel MMP's als hun inhibitoren. Zo werden in fibrotisch weefsel bij radio-enteritis verhoogde mRNA-niveaus gevonden van MMP1, 2, 3, 14, 18 en 19, maar ook van TIMP-1 en 2 (55). Ook in een muismodel van intestinale fibrose werd een verhoogde expressie van zowel *Mmp1* als *Timp-1* waargenomen (56). Dit wijst erop dat de overmatige ECM-accumulatie geen statisch proces is, maar het gevolg van een continue fibrogenese en fibrolyse, met een netto fibrogenese (9, 55). Matrix *turnover* is dus een continu proces en werd ook geobserveerd bij reeds gemanifesteerde orgaanfibrose (40).

De werking van de MMP's is echter ingewikkelder dan de balans betreffende matrix *turnover* en is overigens nog verre van opgehelderd. Zo hebben MMP's pleiotrope functies en werken ze ook enzymatisch in op niet-ECM substraten. Inhibitie van *Mmp9* in muizen zorgt bijvoorbeeld voor bescherming in een model van intestinale fibrose (40).

Ten slotte speelt autofagie ook een rol in zowel ECM-secretie als degradatie. TGF- $\beta$ 1 verstoort het autofagie proces en leidt zo tot een wanbalans in het voordeel van fibrose. Mensen met een mutatie in het ATG16L1-gen, een autofagie-gen, hebben naast een predispositie voor IBD, ook een verhoogd risico op fibrose (8).

#### 2.2.2.4 Fibrose: van een inflammatoir geïnduceerd naar een autopropagatief proces

De aanwezigheid van inflammatie is een vereiste voor de inductie van het fibroseproces (9). Anti-inflammatoire therapieën blijken echter geen invloed te hebben op de progressie van fibrose in IBD-patiënten (9, 36). Ook in muizen werd aangetoond dat intestinale fibrose zich verder kan ontwikkelen na het laattijdig onderdrukken van de inflammatie (57). Mechanismen die inflammatie reguleren lijken dus verschillend te zijn van de mechanismen die het fibrotisch proces onderhouden (8, 9).

Een mogelijke verklaring voor de inflammatie-onafhankelijke progressie van fibrose wordt gegeven door Johnson *et al.* Fibrose zou autopropagatief worden door de zelf-geïnduceerde mechanische tensie. In humane colonfibroblasten zorgde groei op een matrix, met een gelijkaardige stijfheid als die van stricturen, voor een conformatieverandering en een toegenomen  $\alpha$ -SMA-productie. Daarnaast werd er ook een fibrogene genexpressie geïnduceerd (43). Weefselstijfheid zorgt met andere woorden voor de transdifferentiatie van een fibroblast naar een geactiveerde myofibroblast.

De stijfheid in stricturen door o.a. de ECM-accumulatie en myofibroblast-contractie zorgt voor verdere activatie van fibrogene cellen waardoor het proces zichzelf in stand houdt (43). Dit is slechts één van de mogelijke oorzaken, verder onderzoek naar deze principes is zeker aangewezen.

### 2.2.3 Experimentele targets voor de behandeling van intestinale fibrose.

Tot op heden is er geen courante behandeling om fibrose tegen te gaan. Toch zijn er verschillende targets binnen de pathofysiologie van fibrose waarop ingegrepen kan worden. Enerzijds kan het teveel aan fibrogene cellen gecounterd worden door activatie, proliferatie en influx tegen te gaan of door eliminatie te bevorderen. Anderzijds kan het moleculair aspect van fibrose gecounterd worden door ECM-degradatie te stimuleren of de ECM-synthese te beperken.

Sommige experimentele therapieën werken in op één aspect van bovengenoemde targets. Zo heeft Triptolide een gunstig effect op colonfibrose in een experimenteel ratmodel via een gedaalde collageensynthese (58). Andere therapieën incorporeren meerdere targets in hun werkingsmechanisme, een voorbeeld hiervan is inhibitie van het Rho-associated protein kinase (ROCK). Dit verhindert intestinale fibrose en keert het proces zelfs om, door activatie en transdifferentiatie tot myofibroblasten tegen te gaan en autofagie te stimuleren (44).

Een heel belangrijk target binnen de pathofysiologie van fibrose is de TGF- $\beta$  pathway. Stimulatie van deze pathway zorgt voor myofibroblast proliferatie, activatie en transdifferentiatie, EMT, EndoMT, remming van de apoptose en stimulatie van de ECM-secretie, *cf. supra*. De TGF- $\beta$  signaaltransductie verloopt via verschillende pathways. Enerzijds via de canonieke TGF- $\beta$ /small mother against decapentaplegic (Smad) pathway en anderzijds via de niet-canonieke mitogen-activated protein kinase (MAPK) of Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription proteins (STAT) pathways (9).

Inhibitie van de TGF- $\beta$ 1/Smad pathway in subepitheliale myofibroblasten, via vitamine D receptor (VDR) inductie, verklaart zo het profylactisch effect op intestinale fibrose in vitamine D-deficiënte muizen met chronische colitis (59).

Ten slotte lijken ook prolyl-hydroxylasen een mogelijk target te zijn om fibrose tegen te gaan. Dit wordt hieronder verder verduidelijkt.

## 2.3 Prolyl-hydroxylasen (PHD's)

### 2.3.1 De functie van de PHD's binnen de HIF-pathway

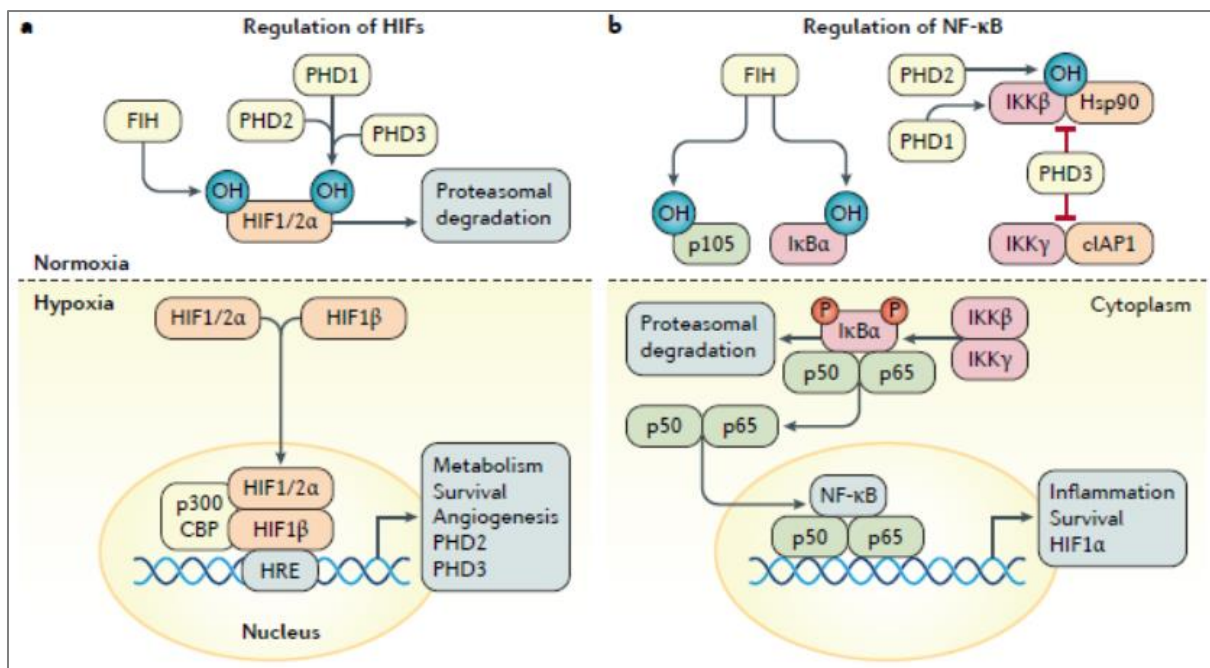
PHD 1, 2 en 3 zijn prolyl-hydroxylase-domein bevattende enzymen van de oxygenase familie. Samen met factor inhibiting HIF (FIH), ook een lid van de oxygenase familie, reguleren ze de activiteit van hypoxia-inducible factor (HIF) en nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) bij hypo- en normoxie. Zowel de PHD's als FIH maken bij hun enzymatische werking gebruik van cosubstraten, *i.e.* zuurstof ( $O_2$ ) en 2-oxoglutaaraat, en hun cofactoren, *i.e.* ijzer ( $Fe^{2+}$ ) en ascorbinezuur. Zuurstof is de belangrijkste factor voor de hydroxylase activiteit, waardoor hypoxie de enzymwerking compromitteert.

HIF's (HIF-1, 2 en 3) zijn heterodimere proteïnen die fungeren als transcriptiefactoren voor genen betrokken bij angiogenese, celoverleving en celmetabolisme. Ze bestaan uit een stabiele, constante bèta-subunit, de aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) en een variabele alfa-subunit (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  en HIF-3 $\alpha$ ). Deze laatste wordt gereguleerd door de PHD's en FIH onder invloed van de zuurstofspanning.

In normoxische omstandigheden zorgt FIH, via hydroxylatie, voor de inhibitie van HIF door te verhinderen dat HIF- $\alpha$  bindt met zijn transcriptionele cofactoren, cAMP-response element binding protein (CBP) en histon acetyltransferase p300. PHD's zorgen voor inhibitie van HIF via de hydroxylatie van twee sterk geconserveerde prolineresidu's in het  $O_2$ -dependente degradatiedomein van HIF- $\alpha$ . Op deze gehydroxyleerde prolineresidu's kan het Von Hippel-Lindau (pVHL) E3 ubiquitine ligase binden, wat leidt tot ubiquitinatie en proteasomale degradatie van HIF- $\alpha$ .

Onder invloed van hypoxie ontstaat, door een gedaalde enzymatische activiteit van de PHD's en FIH, stabilisatie van HIF- $\alpha$ . Na migratie naar de nucleus, dimeriseert de alfa-subunit met ARNT tot de actieve transcriptiefactor HIF. Naast genen betrokken bij celoverleving en dergelijke, *cfr. supra*, zijn PHD2 en PHD3 zelf ook transcriptietargets van HIF (60, 61).

Bij normoxie remmen de PHD's overigens ook de canonieke NF- $\kappa$ B pathway via inhibitie van de inhibitor kappa B ( $I\kappa$ B) kinasen (IKK)  $\beta$  en  $\gamma$ . Hierdoor wordt de NF- $\kappa$ B-inhibitor,  $I\kappa$ B $\alpha$  niet gefosforyleerd en bijgevolg niet geubiquitineerd en proteasomaal gedegradeerd. Bij een te lage zuurstofspanning, zoals in het geval van chronische inflammatie, wordt NF- $\kappa$ B actief door disinhibitie van de PHD's. FIH hydroxyleert ook targets binnen deze cascade, dit leidt echter niet tot verhoogde activatie van NF- $\kappa$ B. De hele PHD pathway is weergegeven op Figuur 2 (33).



Figuur 2: Regulatie van hypoxia-inducible factor (HIF) en nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) door de prolyl-hydroxylases (PHD) en factor inhibiting HIF (FIH). a. Bij een normale zuurstofconcentratie wordt HIF- $\alpha$  gehydroxyleerd door FIH en de PHD's met respectievelijk inhibitie en proteasomale degradatie tot gevolg. Bij hypoxie is de enzymatische activiteit van FIH en de PHD's gecompromitteerd, waardoor een gestabiliseerd HIF- $\alpha$  kan migreren naar de nucleus. Daar vindt dimerisatie met HIF- $\beta$  plaats tot de actieve transcriptiefactor HIF, gevolgd door transcriptie van de HIF-responsieve genen. b. Onder normoxische omstandigheden remmen PHD's de activiteit van NF- $\kappa$ B via inhibitie van de NF- $\kappa$ B-inhibitor kappa B ( $I\kappa$ B) kinases (IKK)  $\beta$  en  $\gamma$ . FIH speelt, ondanks hydroxylatie van bepaalde elementen, geen rol in de activatie van NF- $\kappa$ B. Wanneer de zuurstofspanning te laag wordt, valt de remming op IKK $\beta$  en  $\gamma$  weg, waardoor  $I\kappa$ B proteasomaal gedegradeerd en NF- $\kappa$ B geactiveerd wordt (33).

Uit dierproeven blijkt bovendien dat de HIF-1 pathway een belangrijke rol speelt binnen inflammatoire darmziekten. Meer specifiek in muismodellen, zorgden overexpressie van *Hif-1 $\alpha$*  en knock-out van *Hif-1 $\beta$*  respectievelijk voor een milder en een agressiever verloop van de intestinale inflammatie (62, 63). Dit beschermend effect van HIF-1 bij IBD wekte interesse om de HIF-1 activiteit op te drijven en leidde tot preklinische evaluatie van het effect van panhydroxylase inhibitoren op darminflammatie.

### 2.3.2 Het gekende effect van panhydroxylase remmers

Panhydroxylase inhibitoren zijn substanties die zorgen voor inhibitie of inactivatie van alle PHD isotypes (33). Meerdere studies beschrijven het gunstige effect van verschillende panhydroxylase inhibitoren in muismodellen van IBD. Zo beschrijft Cummins *et al.* het beschermende effect van de panhydroxylase inhibitor, dimethyloxallylglycine (DMOG), in een dextran natriumsulfaat (DSS) muismodel van colitis. Toediening van DMOG leidde tot een gedaalde apoptose van epitheelcellen, wat zorgde voor een betere barrièrefunctie (64). Ook in een TNF- $\alpha$  geïnduceerd muismodel van chronische terminale ileïtis werkte DMOG beschermend via inhibitie van apoptose. Dit effect werd bekomen via een *Hif-1 $\alpha$*  gemedieerde

repressie van het Fas-associated death domain (*Fadd*), een belangrijk eiwit in de apoptosecascade (65).

Er zijn verschillende inhibitoren zoals DMOG gekend, voor een uitgebreid overzicht verwijst ik naar de review van Van Welden *et al.* (33). Sommige van deze varianten worden al in studieverband gebruikt voor het behandelen van anemie bij patiënten met chronische nierinsufficiëntie. Hoewel bij deze patiënten geen belangrijke bijwerkingen werden waargenomen, zijn nog geen langetermijnresultaten beschikbaar en kan de veiligheid bijgevolg nog niet gegarandeerd worden. Op basis van het werkingsmechanisme en preklinische data wordt immers gevreesd voor complicaties bij deze therapie. In de eerste plaats vermoedt men een verhoogde carcinogenese onder DMOG e.a., gemedieerd via activatie van *Hif-2*. Aanwezigheid van polycythaemia door opregulatie van erythropoëtine zou de behandeling eveneens kunnen compliceren. Ten slotte zou het gebruik van panhydroxylase inhibitoren ook leiden tot fibrose. Zo leidt activatie van HIF-1 $\alpha$  in epitheelcellen tot EMT en epitheliale celmigratie. In aansluiting hierbij, heeft hepatocyt-specifieke deletie van HIF-1 $\alpha$  een beschermend effect op leverfibrose via downregulatie van profibrotische genen zoals  $\alpha$ -SMA en collageen type 1. Tot slot zorgt de HIF-1 signaaltransductie voor een verhoogde TGF- $\beta$ 1 expressie in fibroblasten (33).

In contrast, ontdekten Manresa *et al.* een beschermend effect van DMOG tegen fibrose in een DSS-muismodel van chronische colitis. Ze observeerden *in-vitro* eveneens een antifibrotisch effect van deze molecule, dat overigens HIF-onafhankelijk verliep. DMOG inhibeerde er TGF-gemedieerde fibroblastactivatie via de niet-canonische pathway van TGF- $\beta$ 1 door onderdrukking van de extracellulaire signal-regulated kinases (ERK)/MAPK signaaltransductie. Het is belangrijk te stellen dat dit anti-fibrotisch effect ook waargenomen werd bij gebruik van een andere inhibitor, specifiek voor de PHD's: JNJ1935 (66). Dit maakt een *off-target* effect van DMOG op de TGF- $\beta$  pathway onwaarschijnlijk en suggereert wel degelijk de rol van de PHD's in het werkingsmechanisme.

Bovenstaande mogelijke langetermijncomplicaties hebben geleid tot het bestuderen van de verschillende PHD-isotypes en hun effect. Het is namelijk belangrijk te weten welk isotype de sleutelrol speelt in het werkingsmechanisme van DMOG. Zo wordt isotype specifieke inhibitie mogelijk, zonder het risico op de ernstige langetermijneffecten (33).

### 2.3.3 PHD-isotypes en hun specifiek effect op inflammatie en fibrose bij IBD

Het onderzoek naar PHD-isotypes en hun specifieke effect op inflammatie en fibrose verloopt voornamelijk via murine knock-out experimenten (67-69).

Het gunstige effect van DMOG op het verloop van darminflammatie zou PHD1-gemedieerd kunnen zijn. Enkel homozygote *Phd1*-deficiënte muizen zijn beschermd voor DSS



geïnduceerde colitis, terwijl dit niet het geval is voor de overige isotypes. Een anti-apoptisch effect in epitheelcellen is hiervoor één van de verklaringen. Dit zorgt immers voor een betere barrièrefunctie en een gedaalde translocatie van micro-organismen (70). Een andere verklaring wordt gegeven door de ontwikkeling van een anti-inflammatoire M2 macrofaag gedreven respons. Macrofagen die zich ontwikkelen uit hematopoëtische cellen met een *Phd1*-deficiëntie vertonen een anti-inflammatoir fenotype. Er is een gedaalde inflammatoire respons op microbiële antigenen, wat een mildere inflammatie in de hand werkt (68). Het belang van PHD1 wordt nog groter, daar de expressie van PHD1, en niet van PHD2 of 3, verhoogd is in bipten van IBD patiënten met actieve inflammatie (71).

Onderzoek naar het achterliggende antifibrotische effect van DMOG gebeurde tot op heden enkel in *Phd2*<sup>+/-</sup> heterozygoot deficiënte muizen. Deze muizen bleken even vatbaar te zijn voor fibrose als de wt controles in het DSS model van inflammatoir gemedieerde intestinale fibrose (66). Bovendien leidt de knock-out van *Phd2* in muis intestinale fibroblasten tot stabilisatie van HIF-1 met verhoogde expressie van angiogene groeifactoren en proliferatie van fibroblasten als gevolg. In muis embryonale fibroblasten met een heterozygote deletie van *Phd2* werd ook een verhoogde expressie van  $\alpha$ -*Sma* en *Ctgf* bekomen na TGF- $\beta$ 1 stimulatie. Een deletie van *Phd2* in fibroblasten blijkt dus profibrotisch te werken(60).

De prominente rol van *Phd1* bij intestinale inflammatie en de afwezigheid van een anti-fibrotisch effect bij haploïde deficiëntie van *Phd2*, maakt de rol van *Phd1* in intestinale fibrose een interessant onderzoeksonderwerp.

## 2.4 Induceerbare Cre/LoxP recombinatie voor conditionele gen knock-out.

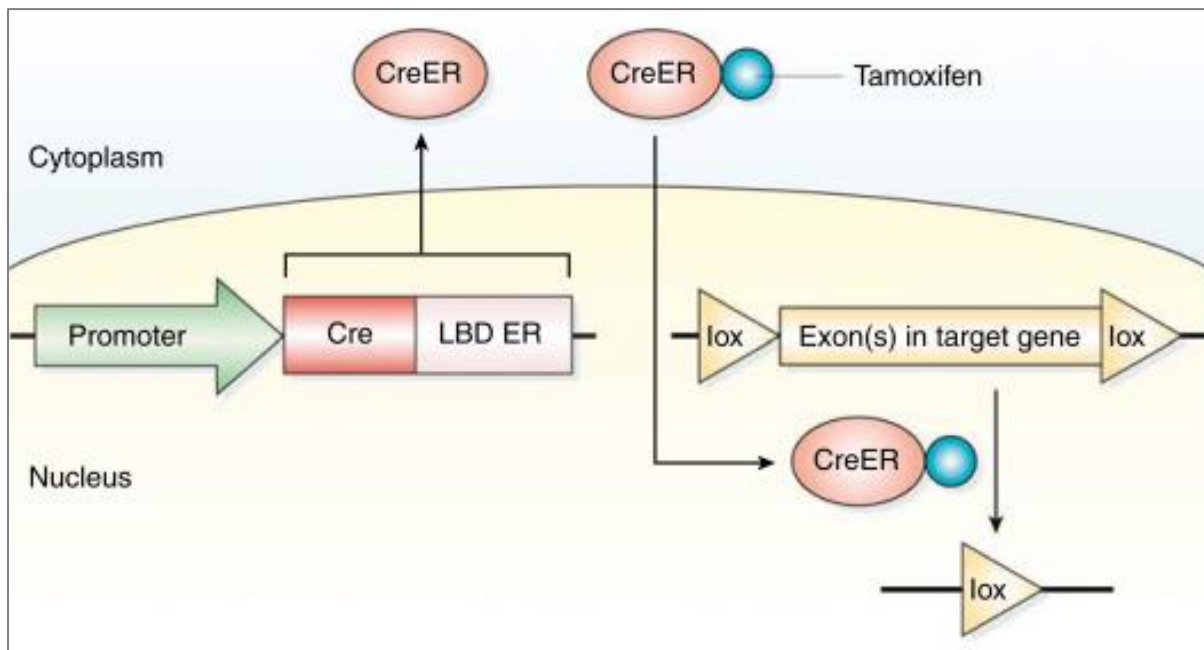
Fibroblasten worden aanzien als de belangrijkste cellulaire mediators van fibrose (7). Om het effect van *Phd1* in fibroblasten na te gaan, is er nood aan een fibroblastspecifieke *Phd1* knock-out. Zo'n conditionele knock-out kan bekomen worden met behulp van *Cre*-recombinatie.

Het *Cre/lox* systeem is een DNA-recombinatiesysteem afkomstig van bacteriofaag P1. *Cre*-recombinase, een enzym van de integrase familie, zorgt voor DNA-recombinatie tussen twee specifieke repeats van 34 basenparen (bp), de loxP-sites. Het type van recombinatie is afhankelijk van de oriëntatie van de loxP-sites. Een gelijke oriëntatie leidt tot de excisie van het tussenliggende (gefloxt) DNA-fragment. Dit wordt vaak gebruikt om knock-outs van een gen te bekomen. Een tegengestelde oriëntatie van de loxP-sites leidt, daarentegen, tot de inversie van het tussenliggende DNA-segment .

Gebruik van het *Cre/LoxP* systeem laat toe DNA-recombinatie te beperken tot één celtype. Dit gebeurt aan de hand van een celspecifiek gen. Stroomafwaarts van de promotor van dit gen wordt het *Cre*-transgen ingevoegd, waardoor *Cre* slechts tot expressie komt in cellen waar deze promotor actief is. Enkel in deze cellen kan *Cre* zijn functie vervullen en zorgt het voor

DNA-recombinatie. Om Cre-gemedieerde recombinatie *in-vivo* te laten doorgaan, moet de Cre-expressie voldoende hoog zijn. Dit is het geval bij voldoende hoge expressie van het celspecifieke gen (72).

Naast de celspecificiteit, kan de recombinatie ook gecontroleerd worden in de tijd. Op die manier is de knock-out pas aanwezig vanaf het gewenste moment en oefent deze bijvoorbeeld geen invloed uit op de groei en ontwikkeling. Bij deze techniek wordt gebruik gemaakt van het nucleair localisatiesignaal (NLS) van het ligand-bindende domein (LBD) van de oestrogeenreceptor. Er wordt een fusieproteïne gevormd tussen Cre en het LBD, geïncapaciteerd voor binding van endogene oestrogenen. LBD kan wel nog binden met tamoxifen, een selectieve oestrogeen receptor modulator (SERM). Na expressie, migreert dit fusieproteïne naar het cytosol, waar Cre zijn recombinatiefunctie niet kan uitoefenen. Toediening van tamoxifen leidt tot translocatie van het fusieproteïne naar de nucleus, waar wel recombinatie optreedt (72, 73). Deze tamoxifen-induceerbare Cre-recombinatie is weergegeven op Figuur 3. Zheng *et al.* rapporteerden het CreER fusiegen, onder controle van de fibroblast-specifieke regulatoire sequentie van het pro-alfa2(I) collageen (*Col1α2*) gen, als een excellent systeem om aan tamoxifen-geïnduceerde fibroblast-specifieke DNA-recombinatie te doen (74).



Figuur 3: Werkingsmechanisme van Cre-gemedieerde DNA-recombinatie. Een fusiegen van Cre en het ligand-bindende domein (LBD) van de oestrogeenreceptor (ER) wordt onder controle gesteld van een celspecifieke promotor. Na expressie in het specifieke celttype, migreert het CreER fusieproteïne naar het cytosol en verblijft daar in afwezigheid van tamoxifen. Onder invloed van tamoxifen wordt het CreER fusieproteïne getransloceerd naar de nucleus en vindt Cre-gemedieerde DNA-recombinatie plaats ter hoogte van de loxP-sites. In dit geval bestaat de recombinatie uit een excisie van het (gefloxte) DNA-fragment tussen twee gelijk georiënteerde loxP-sites (75).

## 2.5 DSS geïnduceerde colitis als muismodel voor IBD en fibrose

Eén van de mogelijke muismodellen om intestinale fibrose te bestuderen, bekomt men door *per orale* toediening van dextran natriumsulfaat (DSS). Na toediening ontwikkelen muizen een colitis met bloederige stoelgang, ulceraties en gewichtsverlies. De colitis zou enerzijds ontstaan door het toxisch en beschadigend effect op de epitheliale barrière en anderzijds door de activatie van intestinale macrofagen (76). Meerdere cycli met DSS leiden tot herhaalde epitheliale schade en wondheling. Uiteindelijk ontstaat zo een niet-zelflimiterende chronische colitis (77).

## 3 Probleemstelling

Intestinale fibrose is een ernstige en veelvoorkomende complicatie van inflammatoire darmziekten, die zich uit onder de vorm van stricturen en obstructies (7, 8). De huidige anti-inflammatoire behandelingen hebben geen invloed op ontwikkeling of remming van het fibrotisch proces (9). De standard of care behandeling bestaat momenteel uit heelkundig herstel. Dit houdt naast risico's, ook een hoge graad van recidive in (36). Gezien de hoge prevalentie van IBD, vormt intestinale fibrose dus een niet te onderschatten probleem (1). De nood aan de ontwikkeling van een krachtige antifibrotische therapie is dan ook hoog.

Panhydroxylase inhibitoren, zoals DMOG, blijken een beschermend effect te hebben op de ontwikkeling van intestinale fibrose in een muismodel (66). Ze zouden bijgevolg een target kunnen zijn voor een anti-fibrotische behandeling. Hun klinisch gebruik is echter nog niet aangewezen. Langdurige behandeling met deze therapeutica kan immers leiden tot ernstige complicaties zoals kanker en polycythaemia. Een mogelijke oplossing om deze langetermijneffecten te vermijden is isotype selectieve inhibitie van PHD. Belangrijk is dus te achterhalen welke isovorm een sleutelrol vervult in de ontwikkeling van intestinale fibrose (33). *Phd2* bleek alvast geen aandeel te hebben in dit effect (66). De bijdrage van *Phd1* in dit proces werd nog niet onderzocht. Van *Phd1*-deleties is echter wel gekend dat ze inflammatie onderdrukken in een muismodel van colitis (68, 70, 71).

Op basis van deze gegevens vermoeden we een sleutelrol van PHD1 in het werkingsmechanisme van panhydroxylase inhibitoren. In dit onderzoek willen we dan ook nagaan of de afwezigheid van PHD1 leidt tot een gedaalde graad van fibrose.

Enerzijds werd dit *in-vivo* nagegaan door *Phd1* knock-out en wild type muizen chronisch bloot te stellen aan DSS en de graad van intestinale fibrose te evalueren. Anderzijds werd *in-vitro* de TGF-gemedieerde transitie van fibroblast naar geactiveerde myofibroblast vergeleken tussen *Phd1* wild type en knock-out fibroblasten.

## 4 Materialen en Methoden

### 4.1 *In-vivo procedures*

#### 4.1.1 Dieren

*Col1 $\alpha$ 2:Cre/ERT* muizen (The Jackson Laboratory, Maine – VS, #029567) en *Phd1<sup>ff</sup>* muizen (reeds aanwezig in het animalarium), beiden op een C57BL/6 achtergrond, werden onderling gekruist om heterozygote en homozygote conditionele knockout van *Phd1* te bekomen in collageen expresserende cellen: *Phd1<sup>fl/+</sup> Col1 $\alpha$ 2:Cre/ERT* en *Phd1<sup>fl/fl</sup> Col1 $\alpha$ 2:Cre/ERT*. Volledige *Phd1* knock-out muizen en wildtype nestgenoten waren reeds aanwezig in het animalarium. De muizen werden gekweekt en ondergebracht in individueel geventileerde kooien met vrije toegang tot water en commerciële voeding (Carfil Quality, Oud-Turnhout – België, Ratten & Muizen Onderhoud). De temperatuur in het lokaal werd op 22°C gehouden en er was een licht/donkericyclus van 12 uur. Alle experimenten hadden de goedkeuring van de Ethische Commissie Dierproeven van de Faculteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen van Universiteit Gent (ECD17/20 en ECD19/85).

#### 4.1.2 Genotypering van de muizen d.m.v. kwalitatieve PCR en gelelektroforese

Gekweekte muizen werden genotypisch gekarakteriseerd op basis van de aanwezigheid van het *Cre*-gen en LoxP-sites op de *Phd1*-loci of op de aan- of afwezigheid van het wild type en knock-out allel van *Phd1*. Dit gebeurde aan de hand van een polymerase chain reaction (PCR). Genetisch materiaal van de muis werd gewonnen door een teentje 60 minuten op te koken in extractiebuffer (Samenstelling: zie addendum I) bij 95°C.

De PCR's werden uitgevoerd met behulp van de BIOTAQ™ DNA Polymerase set van Bioline (Bioline, Londen – VK, 21060). Deze kit bevat 5 units/ml DNA Polymerase, 10x NH<sub>4</sub> reactiebuffer en een 50 mM MgCl<sub>2</sub>-oplossing. Daarnaast werden ook deoxynucleoside trifosfaten (dNTP) gebruikt, met name de 10mM dNTP Mix van Bioline (Bioline, 39053). De primers, in een werkconcentratie van 10  $\mu$ M, waren afkomstig van Biolegio (Biolegio, Nijmegen – Nederland). De nucleotidensequentie van deze primers, hun functie en de grootte van het amplificatieproduct zijn terug te vinden in addendum II, tabel 1.

Per DNA-staal werd een mastermix gemaakt van nuclease-vrij water met bovengenoemde reagentia. Bij de *Cre*-genotypering bestond deze mix uit 0,25  $\mu$ l DNA Polymerase, 5  $\mu$ l 10x NH<sub>4</sub> reactiebuffer, 1  $\mu$ l dNTP Mix (0,2 mM), 2 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 2,5  $\mu$ l van elke primer (0,5  $\mu$ M) (Cre 850, Cre 403, Endo 1, Endo 2) en ten slotte 1  $\mu$ l Template DNA. Deze oplossing werd aangevuld met nuclease-vrij water tot een totaalvolume van 50  $\mu$ l. De samenstelling van de mix bij de *Phd1* conditionele knock-out allel (cko) genotypering was gelijkaardig, op twee

verschillen na: er werden andere primers gebruikt (mPhd1cko forward en reverse) en het volume template DNA bedroeg er 2 µl i.p.v. 1 µl. De rest van de reactie verliep analoog.

De genotypering van de knock-out en wild type muizen verliep via twee PCR's, waarvan de amplificatieproducten per muis na de reactie werden samengevoegd alvorens een agarosegel te laden. De mastermixen voor deze twee reacties bevatten per staal slechts 1 µl van elke primer en 1 µl template DNA. In de eerste reactie vond amplificatie plaats van het wild type allel (mPhd1-3 en mPhd1-4), in de tweede van het ko allel (mPhd1 forward en reverse).

De PCR-reactie werd uitgevoerd in de T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules – VS). Er werd gedurende 2 minuten geïncubeerd bij 94°C waarna vervolgens 34 keer een sequentie van drie stappen werd doorlopen. Eerst werd het DNA gedurende 30 seconden gedeneatureerd bij 94 °C. Hierop volgde 30 seconden lang hybridisatie van primers en matrijs DNA bij 60°C. De laatste stap van de sequentie duurde 45 seconden en bestond uit de elongatie van het DNA bij 72°C. Ten slotte werd het reactiemengsel nog 10 minuten geïncubeerd bij 72 °C.

Met Invitrogen™ Ultrapure™ Agarose (ThermoFisher Scientific, Waltham – VS, 16500500) en 1x TAE-buffer (Samenstelling: zie addendum I) werd een 3% agarosegel gemaakt. Aan elk staal werd 5 µl 10x ladingsbuffer (Samenstelling: zie addendum I) toegevoegd om vervolgens te laden op de agarosegel. Als referentie gebruikten we de Hyperladder™ 100bp (Bioline, BIO-33056). Bij het aanleggen van een spanningsbron over de gel werden DNA-amplificatieproducten van verschillende groottes van elkaar gescheiden door een verschil in migratiesnelheid door de gel.

Na incubatie in een waterige oplossing met 0.5 µg/ml ethidiumbromide (Sigma-Aldrich, Saint-Louis – VS, E1510) vond visualisatie plaats in de Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad). Aanwezigheid van het *Cre*-gen uitte zich als een dense band t.h.v. 500 basenparen (bp). Voor de interne controle viel deze band rond 800 bp. Bij de *Phd1* cko genotypering gaf een band t.h.v. 290 bp de aanwezigheid van een *Phd1* wildtype allel aan. Een densiteit rond 340 bp wees, daarentegen, op de aanwezigheid van een gefloxt *Phd1* allel. Bij *Phd1* knock-out genotypering wees een amplificatieproduct van 380 bp op een knock-out allel i.t.t. 350 bp wat de wildtype variant voorstelde.

#### 4.1.3 Chronische DSS en klinische opvolging

De chronische DSS proef bestond uit drie cycli van telkens 14 dagen. Per cyclus werden muizen de eerste zeven dagen blootgesteld aan DSS (MP Biomedicals, Santa-Ana – VS 9011-18-1) in hun drinkwater, de volgende zeven dagen van de cyclus werd niet behandeld. Het klinisch welzijn van de muizen werd om de twee à drie dagen geëvalueerd. In de eerste plaats gebeurde dit via de opvolging van het gewicht, wat werd uitgedrukt als procent van het startgewicht. De ernst werd gescoord als 0, 1, 2 en 3 bij respectievelijk geen, 0 – 10%, 10 –

20% en meer dan 20% gewichtsdaaling t.o.v. het startgewicht. 80% van het startgewicht werd gezien als humaan eindpunt, bij een verdere daling werd de muis geëuthanaseerd.

Daarnaast werd ook het bloedverlies *per anum* nagegaan m.b.v. de ColoScreen® test (Helena Laboratories, Beaumont – VS, 5073) voor de opsporing van fecaal occult bloed. Een positieve test werd gescoord als 1 voor de aanwezigheid van microscopisch bloed. Macroscopisch bloed werd ernstiger gescoord als 2. Een negatieve test kreeg score 0. Ten slotte werd consistentie van de stoelgang nagegaan waarbij een score van 0 tot 2 gegeven werd met 0 als normaal en 2 als diarree. Hierbij betekende 0,5 korrelige en licht smeerbare stoelgang, 1 plattere stoelgang met een minder mooie vorm en 1,5 licht vloeibare stoelgang.

De ‘Disease Activity Index’ (Ziekteactiviteitsindex DAI) werd gebruikt als overkoepelende score om klinisch de ernst van inflammatie te kwantificeren. Ze is de sommatie van de scores bij elke bovenstaande parameter.

#### 4.1.4 Tamoxifen-geïnduceerde Cre/Loxp-gemedieerde *Phd1* knock-out

Ter optimalisatie van de conditionele *Phd1* knock-out werden drie verschillende experimenten opgezet. In de eerste plaats werden drie *Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>/ERt* en drie *Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>-/-</sup>/ERt* muizen, allen heterozygoot gefloxt over *Phd1*, eenmalig intraluminaal (IL) behandeld met 40 mg/kg 4-hydroxytamoxifen (4-OH Tam) (Sigma-Aldrich, H6278). Dit gebeurde volgens het artikel van Gerling *et al.* 50 mg 4-OH Tam werd opgelost in 2,5 ml 99,5% ethanol. Vervolgens werd de oplossing één over twee verdund in maïsolie tot 10 mg/ml, gevortext en 30 minuten gesoniceerd bij 37°C in een warmwaterbad. Een muis van 25 g werd behandeld met 100  $\mu$ l (1 mg) van deze oplossing, wat neerkomt op 40 mg/kg muis (78).

In een tweede proefopzet, werden drie *Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>-/-</sup>/ERt*, drie *Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>/ERt* en zeven *Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>/ERt* muizen, allen homozygoot gefloxt over *Phd1*, respectievelijk niet behandeld (controle), behandeld met een eenmalige IL toediening van 40 mg/kg 4-OH Tam en ten slotte driemaal om de 36 uur behandeld met een intraperitoneale (IP) toediening van 250 mg/kg Tamoxifen (Sigma-Aldrich, T5648) volgens het protocol van Corriden *et al.* Voor de IP toediening werd het tamoxifenpoeder opgelost in maïsolie tot 25 mg/ml (79).

Bij het laatste experiment werd uit een groep van acht muizen (*Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>/ERt* en homozygoot gefloxt over *Phd1*) vier muizen IP behandeld met een dagdosis van 2 mg tamoxifen (Tam) (Sigma-Aldrich, T5648) gedurende vijf dagen zoals beschreven door Rotheneichner *et al.* Het tamoxifenpoeder werd hiervoor opgelost in maïsolie tot een concentratie van 10 mg/ml (80). De onbehandelde muizen fungeerden als negatieve controles.

#### 4.1.5 Staalafnames bij de muizen

Sacrificatie van de proefdieren vond plaats door middel van cervicale dislocatie door de proefleider. Via een incisie op de mediaanlijn van de buikwand werd toegang verkregen tot de peritoneale holte. Een stuk van de lever werd geïsoleerd, net als het gehele colon, van de aars tot het caecum.

Het colon werd gespoeld met Gibco™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline zonder calcium en magnesium (DPBS-/-) (ThermoFisher Scientific, 14200067). Na verwijderen van vet en bindweefsel werden stukjes van het colon geknipt. Een klein fragment van 0,5 cm werd ondergedompeld in Invitrogen™ RNA<sup>later</sup>™ Stabilization Solution (ThermoFisher Scientific, M7021) en vervolgens gesnapfrozen in vloeibare stikstof in functie van latere RNA-isolatie en RT-qPCR (zie 4.2.3). Hetzelfde gebeurde met het deeltje van de lever. Het resterende colon werd, na goed spoelen, opengeknipt en ondergedompeld in ijskoude DPBS-/- voor de isolatie van intestinale fibroblasten (MIF) (zie 4.2.1). Bij de chronische DSS proef werden lengte en gewicht van het colon bepaald alvorens dit op te knippen in het proximale, middelste en distale colon. Kleine dwarsdoorsnedes van elk van deeltje werden rechtgezet in een fixatiecassetje en vervolgens gedurende 24 uur gefixeerd in 4% formaldehyde (KliniPath, Duiven – Nederland, 4078-9010) i.f.v. histologische evaluatie. Er werd bij deze proef geen ander weefsel gebruikt.

#### 4.1.6 Masson's Trichroom kleuring en de histologische evaluatie van fibrose

Na fixatie draaiden de cassetjes mee in de carousel van ethanol- en xyleenbaden op de anatomopathologische dienst van UZ Gent om vocht te onttrekken. Tot slot werden de stalen er ook ingebed in paraffine. Met de microtoom werden transversale coupes van vier µm gesneden. Eenmaal op het draagglasje werden deze 24 uur gedroogd in een incubator bij 37°C waarna de coupes werden gekleurd met een Masson's Trichroom kleuring (MTS). De stalen werden gedeparaffineerd en gerehydrateerd via het doorlopen van een sequentie xyleen- en ethanolbaden voor telkens vijf minuten. Deze sequentie bestond uit drie xyleenbaden (KliniPath, 4055-9005), 2 baden van 99% ethanol (KliniPath, 4098-9005) en ten slotte twee baden van 96% ethanol (Chemlab, CL0018075000)

Vervolgens werden ze 15 minuten ondergedompeld in Bouin's oplossing (Samenstelling: zie addendum I) bij 56°C. Na twee minuten spoelen met kraantjeswater volgde een vijf minuten durend bad met Mayer's Haematoxyline (Sigma-Aldrich, MHS128). Er werd gedurende drie minuten gespoeld, twee met stromend kraantjeswater, één minuut in een bad met gedeïoniseerd water. In navolging van de spoeling werden de coupes omcirkeld met een Dako Pen (Agilent, Santa-Clara – VS, S200230-2) en vervolgens voor vijf minuten gesatureerd met Biebrich's Scarlet Acid Fuchsin solution (Sigma-Aldrich, HT151). De coupes werden opnieuw

gespoeld met gedeïoniseerd water en dan gedurende vijf minuten gesatureerd met Phosphotungstic/phosphomolybdic oplossing (Samenstelling: zie addendum I). De volgende vijf minuten werden de stalen geïncubeerd met Amaline Blue (Sigma-Aldrich, HT154), waarna ze twee minuten ondergedompeld werden in een bad met een 1% azijnzuur oplossing. Ten slotte werden ze twee minuten gespoeld met kraantjeswater en opnieuw gedehydrateerd door de sequentie van xyleen- en ethanolbaden in de omgekeerde richting te door lopen. Er werd een dekglasje bevestigd m.b.v. Mounting Medium (Sigma-Aldrich, 06522). Histologische afbeeldingen van de coupes werden gemaakt via Cell D software (Olympus).

De intestinale fibrose werd histologisch gekwantificeerd door middel van een gecombineerde score op basis van ernst, circulariteit en uitgebreidheid zoals beschreven door Holvoet *et al.* (44). Ernst werd geëvalueerd aan de hand van de betrokken weefsellagen in het fibrotisch proces. Hierbij betekende 0 de afwezigheid van fibrose, 1 een verhoogde ECM depositie in de mucosa, 2 een verhoogde ECM depositie in de submucosa, 3 een verdikking van de muscularis mucosae, 4 een verdikking van de muscularis propria en 5 ten slotte ECM depositie in de sereuze lagen. De circulariteit betrof het percentage van de coupe dat aangetast was. Een circulariteit van 0 – 25% kwam overeen met 1 punt. Per 25% kwam er een punt bij, met een maximum van 4 (75% - 100%). Ten slotte werd de uitgebreidheid nagegaan. Indien het fibrotisch proces enkel aanwezig was in het distaal colon werd 1 punt toegekend. Wanneer er ook fibrose was in het middelste deel van het colon werden dit twee punten enzovoort. De som van deze scores werd gebruikt ter evaluatie van het fibrotisch proces (44).

## 4.2 *In-vitro* procedures

### 4.2.1 Isolatie van intestinale muis fibroblasten

Na sacrificatie van wt en *Phd1*<sup>-/-</sup> ko muizen, werd het colon verwijderd en driemaal gewassen in een oplossing van 1x Gibco™ Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (ThermoFisher Scientific, 14185052) met 1x Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (Anti/anti) (ThermoFisher Scientific, 15240062). Vervolgens werd het opgeknipt in segmenten van 1 cm en gespoeld met de HBSS/anti/antioplossing. Het weefsel werd gedurende 20 minuten geïncubeerd in een HBSS-oplossing met 5 mM EDTA, 1x Anti/anti en 1 mM DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, 43819) in een orbital shaker aan 230 toeren per minuut (RPM) bij 37°C. Na incubatie volgden opnieuw verscheidene spoelingen met de HBSS/anti/antioplossing tot een heldere suspensie overbleef. Vervolgens werd er één uur geïncubeerd in een digestie-oplossing bij 37°C aan 230 RPM. Het digest bestond uit 300 U/ml Collagenase XI (Sigma-Aldrich, C7657) en 0,08 U/ml Dispase II (Sigma-Aldrich, D4693) opgelost in Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific, 31966-021). De colonsuspensies werden ten slotte 10 minuten afgedraaid op kamertemperatuur aan 280 g, waarna de gevormde pellet opgelost werd in muis intestinaal fibroblasten (MIF) medium (Samenstelling: zie addendum I). De



opgeloste pellet werd uitgezaaid in een CELLSTAR® standaard celweekfles van 25cm<sup>2</sup> (T25) (Greiner Bio-One, Kremsmünster – Oostenrijk, 690160) die bewaard werd in een incubator met vochtige atmosfeer en 5% CO<sub>2</sub> bij 37°C. Na 24 uur werden de fibroblasten, ondertussen aangehecht op de bodem van de T25, driemaal gespoeld met DPBS-/- met 1x anti/anti. Bij confluentie werden de cellen gesplitst met behulp van Gibco™ 0,05% Trypsine (ThermoFisher Scientific, 25300062) en vervolgens uitgezaaid in een CELLSTAR® Celweekfles met filterdop van 75cm<sup>2</sup> (T75) (Greiner Bio-One, 658175). Eens confluentie bereikt werd in de T75, werd een deel van de cellen geanalyseerd d.m.v. flowcytometrie (zie 4.2.2), de resterende fractie werd verder opgekweekt om voldoende cellen te bekomen voor volgende experimenten (zie 4.2.5, 4.2.6 en 4.2.7).

#### 4.2.2 Flowcytometrie

De proportie fibroblasten in de geïsoleerde celpopulaties van vijf muizen, werd bepaald via flowcytometrie. Extracellulaire antigenen werden aangekleurd m.b.v. eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506 (ThermoFisher Scientific, 65-0866-14), CD45 PE-Cy™5 Rat Anti-Mouse CD45 Clone 30-F11 (BD Biosciences, San Jose – VS, 553082) en Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) (BD Biosciences, 553142), respectievelijk 200, 500 en 200 keer verdund. Intracellulaire antigenen werden gemerkt m.b.v. Anti-Vimentin antibody [EPR3776] - Cytoskeleton Marker (Alexa Fluor® 647) (Abcam, Cambridge – VK, ab194719) en Dako Rabbit Serum (Normal) (Agilent, Santa Clara – VS, X0902) in respectievelijk verdunningen van 1/500 en 1/50.

*Tabel 2: Samenstelling van de mastermixes per conditie bij incubatie met FACS-stains*

Conditie	Incubatie met membraanmarkers			Incubatie met intracellulaire markers	
	Viability dye	Anti-muis CD45	Muis Fc-block	Anti-muis Vimentine	Konijnenserum
ALL IN	+	+	+	+	+
Unstained	-	-	-	-	-
Levend/dood	+	-	+	-	+
CD45	-	+	+	-	+
Vimentine	-	-	+	+	+
FMO CD45	+	-	+	+	+
FMO vimentine	+	+	+	-	+

FACS, fluorescence-activated cell sorting; FMO, fluorescence minus one

Deze producten werden gebruikt in verschillende condities en combinaties, weergegeven in Tabel 2. Voor de ALL-IN conditie werden telkens cellen van één muis gebruikt, in tegenstelling tot single stain (SS) condities waarvoor gepoolde cellen van de 5 muizen benut werden. SS werden meegenomen i.f.v. kleurcompensatie voor de mogelijke spectrale overlap tussen fluorochromen.

Na trypsinisatie van de cellen in de T75 (zie 4.2.1), werd hun concentratie in de suspensie manueel bepaald met een Bürker telkamer. Er werd gemeten met 10 µl van een mix bestaande uit één volume celsuspensie en een gelijk volume trypaanblauw 0,4% (ThermoFisher Scientific, 15250061) om de levende en dode cellen bij de telling te kunnen differentiëren. Per conditie voor flowcytometrische evaluatie werden 400'000 cellen opgelost in 100 µl ijskoude DPBS/- en overgebracht op een conische 96-well plaat. Alvorens dit te doen, werd de helft van de cellen voor de levend/dood SS gedood i.f.v. de gating later.

De hele procedure vond plaats bij 4°C tenzij anders aangegeven, incubatie gebeurde daarnaast steeds in het donker. Na afdraaien werd telkens het supernatans verwijderd.

De cellen werden gedurende vijf minuten gecentrifugeerd aan 1200 RPM. Vervolgens werden verschillende membraanmerkers aangekleurd door 30 minuten te incuberen met een 100 µl ijskoude DPBS/- oplossing, waarvan de samenstelling varieerde volgens de respectievelijke conditie (zie Tabel 2). Na incubatie werd elke well gewassen met 100 µl FACS-buffer (Samenstelling: Zie addendum I) en vervolgens 3 minuten gecentrifugeerd aan 400g bij kamertemperatuur (KT). Daarop volgde 45 minuten incubatie met 100 µl fixatie/permeabilisatiebuffer (Samenstelling: zie addendum I) om celstructuren te fixeren en de membraan permeabel te maken. Na 3 minuten afdraaien aan 400g, werd er gewassen met 100 µl koude 1x permeabilisatiebuffer (Samenstelling: zie addendum I) en opnieuw afgedraaid onder dezelfde condities.

Vervolgens werden de cellen 30 minuten geïncubeerd met 100 µl 1x permeabilisatiebuffer met antilichamen voor de intracellulaire merkers, waarbij de samenstelling van elke oplossing correspondeerde met de respectievelijke conditie, zoals weergegeven in Tabel 2. Daarna werd tweemaal gewassen met 150 µl 1x permeabilisatiebuffer, waarbij na het wassen steeds drie minuten afgedraaid werd aan 400g.

Ten slotte werd de pellet opgelost in 150 µl FACS buffer met 1% paraformaldehyde (PFA) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe – Duitsland, 0335.3), waarna de suspensie in polystyreen FACS-buisjes gepipetteerd werd. De stalen werden afgelezen op de BD LSR Fortessa™ cell analyzer (BD Biosciences). Resultaten en figuren werden nadien gegenereerd met behulp van de FlowJo® v9 software (FlowJo, LLC, Ashland – VS).

#### 4.2.3 RNA-isolatie, cDNA synthese en Real-Time qPCR

De methodologie voor de RNA-isolatie verschilde voor weefsel en gecultiveerde cellen. Totaal RNA uit weefsel, gepreserveerd in RNA $later^{\text{TM}}$ , werd geïsoleerd met de Arium™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, 7326820) volgens het bijgevoegd protocol. Met behulp van de BioPhotometer™ plus (Eppendorf AG, Hamburg – Duitsland) werd de zuiverheid en de RNA-concentratie bepaald in de oplossing. Onzuivere stalen met een  $A_{260}/A_{280}$  ratio onder 1,8 of

boven 2,2 werden geëxcludeerd. Elke staal werd verdund met nuclease-vrij water tot een RNA-concentratie van 100 ng/µl.

Gecultiveerde cellen werden eerst gewassen met DPBS/- en vervolgens gelyseerd met 350 µl lysisbuffer (Samenstelling: zie addendum I). Voor de RNA-isolatie werd de RNeasy Microkit (Qiagen GmbH, Hilden – Duitsland, 74004) gebruikt. Het bijgevoegd protocol werd hierbij ook gevolgd, op de laatste stap na, waarbij geëluëerd werd met 28 µl nuclease-vrij water i.p.v. 14 µl. Zo was het volume hoog genoeg om eveneens de concentratie en zuiverheid te bepalen. De stalen werden met nuclease-vrij water verdund tot 50 ng/µl RNA.

CopyDNA (cDNA) werd gesynthetiseerd met de Sensifast™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, BIO-65053), waarvoor telkens 10 µl RNA werd toegevoegd aan 10µl mastermix bestaande uit 4 µl 5x Transamp™ buffer, 1 µl 20x Reverse Transcriptase en 5µL nuclease vrij water. Na 10, 15 en 5 minuten in de Thermocycler op respectievelijk 25, 42 en 85°C werd zo 20 µl van 50 ng/µl en 25 ng/µl cDNA bekomen voor respectievelijk weefsel en gecultiveerde cellen.

De messengerRNA (mRNA) expressie werd gekwantificeerd aan de hand van Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). Deze reactie werd uitgevoerd met de Sensimix™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, QT650-05).

Voor elk onderzocht gen werd een specifieke primermix gebruikt, met 2 µM *forward* en 2 µM *reverse primer* (Biolegio, Nijmegen – Nederland). De genen van interesse staan opgesomd in addendum II (tabel 2), samen met de primersequenties en -efficiënties. Het cDNA werd met nuclease-vrij water verdund tot 5 ng/µl, waarna voor elk gen 3 µl van elke staal *in duplo* op een 384 well plaat werd gepipetteerd. Aan elke well werd vervolgens 4 µl Sensimix en 1 µl van de specifieke primermix toegevoegd.

De reactie, gerund op een LightCycler® 480 II toestel (Roche, Rotkreuz – Zwitserland), liep 10 minuten bij 95°C en vervolgens 45 cycli van tien seconden bij 95°C en één minuut bij 60°C. Elke reactie werd uitgevoerd *in duplo* waarbij C<sub>T</sub>-waarden met een standaarddeviatie van meer dan 0,7 werden geëxcludeerd. Resultaten werden genormaliseerd t.o.v. de expressie van de meest stabiele huishoudgenen. Huishoudgenen gebruikt in dit onderzoek waren deze die codeerden voor succinaat dehydrogenase complex subunit A (*Sdha*), glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase (*Gapdh*), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Hprt*) en ten slotte hydroxymethylbilane synthase (*Hmbs*). De meeste stabiele huishoudgenen werden bepaald via het GeNorm™ algoritme zoals beschreven door Vandesompele *et al.* (81).

#### 4.2.4 Interleukine 6 luminex bead-based assay

De concentratie van interleukine 6 (IL-6) in het supernatans van fibroblastculturen werd bepaald via luminex met de Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex Assay (Bio-Rad, #M60009RDPD). Deze kit bevat onder andere assay en wash buffer, standard diluent, detection antibody diluent en Streptavidine-PE. De IL-6 standaarden en magnetische beads

werden uit externe kits gebruikt, respectievelijk de Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Standards Group I (Bio-Rad, 171I50001) en Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine IL-6 Set (Bio-Rad, 171G50007M). Het bijgevoegde protocol werd gevolgd op één stap na: de beads werden 20x verdund i.p.v. 10x.

De fluorescenties van de standaarden en stalen werden bepaald in de Bio-Plex MagPix – Multiplex Reader (Bio-Rad). Resultaten werden gegenereerd en geëxporteerd met de Bio-Plex Results Generator (Bio-Rad) en Bio-Plex Manager (Bio-Rad).

#### 4.2.5 Optimalisatie van de TGF-stimulatie

Primaire intestinale fibroblasten van een wt muis werden uitgezaaid op 12-well platen aan 194'000 cellen per well in MIF medium. Na 24 uur werd het medium op de 12 well platen afgenomen en werden telkens drie wells gevuld met alleen serum-vrij DMEM medium of een verdunningsreeks van Transforming Growth Factor bèta (TGF- $\beta$ 1, TGF) (ThermoFisher Scientific, 14834282): 5, 10, 20 en 40 ng/ml in DMEM zonder serum. Na 48 uur stimulatie werden de cellen geoogst voor RNA-isolatie en werd de expressie van TGF-geïnduceerde genen geanalyseerd m.b.v. qPCR.

#### 4.2.6 Optimalisatie van de DMOG-stimulatie

##### *Toxiciteitstesten met behulp van MTT en LDH assays*

De toxiciteit van dimethyloxalylglycine (DMOG) (Sigma-Aldrich, 400091) werd geëvalueerd aan de hand van de celproliferatie en de directe cytotoxiciteit. Hiervoor werd respectievelijk gebruik gemaakt van de Roche Cell Proliferation Kit I (Sigma-Aldrich, 11465007001) en de Roche Cytotoxicity Detection Kit (Sigma-Aldrich, 11644793001).

Op een 96 well plaat werden 18 wells gevuld met 2'000 cellen per well, MIF's van één wildtype muis. Dit gebeurde in 200  $\mu$ l serum-vrij DMEM met 1x anti/anti. Na 24 uur werden de cellen in drievoud gestimuleerd met DMOG in oplopende concentraties: 0  $\mu$ M (negatieve controle), 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M en ten slotte 1 mM in DMEM/anti/anti zonder serum. Als positieve controle werden cellen in drievoud gestimuleerd met 2% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, T8787). Na 24 uur DMOG-stimulatie werden de proliferatie- en cytotoxiciteitstesten uitgevoerd.

Voor de Lactaatdehydrogenase (LDH) assay werd 100  $\mu$ l van het supernatans uit de wells overgebracht op een andere 96-well plaat en 30 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur met 100  $\mu$ l reaction mix (1/45 fles 1 + 44/45 fles 2 volgens de instructies van de fabricant). Absorbanties werden vervolgens gemeten bij 492 nm en 690 nm (referentie) met de xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-rad).

Aan de overige 100  $\mu$ l in de originele plaat werd vervolgens, uit de proliferation kit, 10  $\mu$ l 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) toegevoegd in een concentratie van 5mg/ml. Er werd 2 uur geïncubeerd bij 37°C, waarna het supernatans werd

verwijderd en in elke well 100  $\mu$ l Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, D4540) werd gepipetteerd. Na 10 seconden goed schudden, gebeurde het aflezen in de spectrofotometer bij 570 en 690 nm, met deze laatste opnieuw als referentie. Ditzelfde experiment werd ook herhaald met 2 andere DMOG condities, één van 25 en één van 50  $\mu$ M, volgens hetzelfde protocol.

#### *Dosisrespons optimalisatie van de DMOG stimulatie*

Op een 12 well plaat werden wt MIF's uitgezaaid aan 100'000 cellen per well in serumvrij DMEM met 1x anti/anti. Na 24 uur werd het medium verversst of vervangen door medium met 50  $\mu$ M DMOG, telkens in triplicaat. De volgende dag werd het medium opnieuw verversst en werden dezelfde cellen opnieuw gestimuleerd met 50  $\mu$ M DMOG, ditmaal voor 48 uur. Hierna werden de cellen geoogst voor RNA-isolatie, gevolgd door genexpressie analyse d.m.v. qPCR.

#### 4.2.7 Stimulatie-experimenten met TGF- $\beta$ 1 en DMOG

MIF van wt en *Phd1*<sup>-/-</sup> ko muizen werden uitgezaaid op een 12-well plaat aan 200'000 cellen per well. De volgende dag werd het medium afgenomen en werden de MIF's enkel geïncubeerd in serumvrij DMEM met anti/anti of gestimuleerd met 50  $\mu$ M DMOG om reeds panhydroxylase inhibitie te bewerkstelligen. Na 24 uur werd het medium opnieuw afgenomen en werden de cellen voor 36 of 24 uur gestimuleerd met vers serumvrij DMEM met anti/anti, 50  $\mu$ M DMOG, 20 ng/ml TGF- $\beta$ 1 of de combo van DMOG en TGF (alles in serumvrij DMEM met anti/anti). Vervolgens werd het supernatans afgenomen voor de concentratiebepaling van IL-6 via luminex en werden de cellen gelyseerd voor RNA-isolatie en analyse van de genexpressie.

### 4.3 Statistische analyse

Alle statistische analyses werden uitgevoerd met behulp van SPSS v.26 (IBM Corp, Armonk – VS, SPSS Statistics for Windows - Version 26.0). Wegens de zeer kleine steekproefgroottes werd de assumptie van normaliteit aangenomen en werden bijgevolg parametrische testen uitgevoerd. Er werd steeds tweezijdig getoetst met significantieniveau  $\alpha = 0,05$ . *Post-hoc* werd Bonferroni-correctie toegepast, tenzij anders aangegeven.

Opvolging van de DAI en de klinische parameters van deze score gebeurde door middel van general linear models (GLM) met herhaalde metingen, hierbij werden genotype, tijd en interactie geïncubeerd als onafhankelijke variabelen. Correctie voor asfericiteit bij een significante Mauchly gebeurde via de Greenhouse-Geisser benadering.

Verschillen in gemiddeldes van histologische scores en sacrificatieparameters na chronische DSS, net als verschillen in gemiddelde *Phd1* wt en cko allel expressie op weefsel- en celniveau, maar ook genexpressieverschillen tijdens de optimalisatieprocedure van DMOG,

werden geëvalueerd met ongepaarde t-testen. Indien nodig werd gecorrigeerd voor ongelijke varianties m.b.v. de Levene's test.

Resultaten van de DMOG-toxiciteitstesten en de optimalisatietest voor TGF- $\beta$ 1 werden geanalyseerd met een One-way ANOVA, al dan niet gecorrigeerd met de test van Levene en met de Tamhane's T2 *post-hoc* test bij inhomogeniteit van varianties.

Ten slotte werd de data van het stimulatie-experiment met DMOG en TGF- $\beta$ 1 bestudeerd met een mixed model variantieanalyse. Genotype, conditie en hun interactie werden in het model geïncorporeerd als fixed factors. Van elke muis werden de cellen blootgesteld aan de vier condities. Om te correleren voor herhaalde metingen in één muis, werden drie verschillende covariantiepatronen gemodelleerd: *Autoregressive-1*, *Compound symmetry* en *Toeplitz*. Het model met de beste fit (*i.e.* laagste 'Akaike information Criterion' (AIC)) werd geselecteerd. Significante effecten werden *Post-hoc* getest met gepaarde t-testen. Grafieken werden ontworpen met GraphPad Prism versie 6.00 voor Windows (GraphPad Software, La Jolla – USA). Resultaten zijn voorgesteld met het gemiddelde en de standaardfout van het gemiddelde.

## 5 Resultaten

### 5.1 *In-vivo* experimenten

#### 5.1.1 Genotypering

Voor deze resultaten wordt verwezen naar addendum III.

#### 5.1.2 *Phd1* knock-out muizen zijn niet beschermd tegen intestinale inflammatie en fibrose tijdens chronische DSS-colitis

Er werd door Tambuwala *et al.* reeds gerapporteerd dat *Phd1*-deficiënte muizen beschermd zijn tegen acute darminflammatie (70). Tijdens chronische inflammatie werden mogelijke effecten echter nog niet onderzocht. In eerste instantie wilden we daarom nagaan of muizen zonder *Phd1* beschermd zouden zijn tijdens chronische DSS-geïnduceerde colitis. In tweede instantie werd het effect van de *Phd1* knock-out op de ontwikkeling van fibrose bestudeerd. Hiervoor werden vier *Phd1*<sup>-/-</sup> ko en drie *Phd1* wt muizen gedurende drie cycli behandeld met DSS, ter inductie van chronische colitis en fibrose.

##### 5.1.2.1 Geen verschil in klinische inflammatie

Het klinisch welzijn van de muizen werd geëvalueerd aan de hand van het gewichtsverlies, de stoelgangconsistentie, het rectaal bloedverlies en de DAI-score. We beschouwden de eerste DSS-cyclus als de acute fase, de chronische proef werd geanalyseerd over het verloop van de drie cycli heen. Noch in de acute fase, noch in de chronische proef kon een verschil in

ziekteverloop aangetoond worden tussen *Phd1* wt's en ko's. De evolutie van bovenstaande klinische parameters doorheen de proef is weergegeven in addendum IV, figuur 2.

#### *Acute fase van de DSS-colitis – 1<sup>ste</sup> cyclus*

Na de eerste cyclus, waarin muizen zeven dagen werden blootgesteld aan 2% DSS, was geen significant effect te observeren in de algemene evolutie van het gewicht [ $p=0,240$ ]. Toch was een dalende trend aanwezig, zo daalde het gewicht gemiddeld tot 97,37% van het startgewicht op dag negen, waarna het weer toenam.

I.t.t. het gewicht, verschilden rectaal bloedverlies [ $p<0,001$ ], stoelgangconsistentie [ $p=0,002$ ] en DAI-score [ $p<0,001$ ] wel significant over de verschillende meetmomenten. Deze parameters waren het ernstigste verstoord op dag zeven van de eerste cyclus. De DAI-score was er gemiddeld 2,74; 1,91 en 1,80 keer hoger dan respectievelijk aan de start [ $p=0,003$ ] op dag twee [ $p=0,003$ ] en op dag vier [ $p=0,009$ ]. De belangrijkste bijdragende parameter aan het resultaat van deze score was het rectaal bloedverlies. Bloedverlies werd op dag zeven gemiddeld 1,625; 1,531 en 1,458 punten ernstiger gescoord dan aan het begin van de proef [ $p=0,014$ ], op dag twee [ $p=0,015$ ] en op dag vier [ $p=0,024$ ] respectievelijk. Stoelgangconsistentie droeg minder bij aan de DAI-score, t.o.v. dag zeven was de consistentiescore gemiddeld 0,698; 0,542 en 0,635 punten lager dan op respectievelijk dag nul [ $p=0,003$ ], dag twee [ $p=0,044$ ] en dag vier [ $p=0,028$ ]. Naast de maximale klinische tekenen van inflammatie op dag zeven, was er ook een trend tot snelle resolutie. Op dag negen waren respectievelijk de bloedverlies-, consistentie- en DAI-score gedaald met gemiddeld 1,427 [ $p=0,126$ ]; 0,344 [ $p=1,000$ ] en 1,479 [ $p=0,056$ ] punten. Ten opzicht van de start van het experiment was de DAI-score op dag negen toch nog steeds significant hoger, gemiddeld 1,26 punten [ $p=0,009$ ].

In de acute fase kon noch een trend, noch een significant effect van de aan- of afwezigheid van *Phd1* waargenomen worden op basis van respectievelijk gewichtsverlies, bloedverlies-, consistentie- en DAI-score [ $p=0,793$ ;  $p=0,158$ ;  $p=0,466$ ;  $p=0,476$ ]. Dit was ook het geval wanneer de interactie tussen genotype en tijd bestudeerd werd voor deze vier parameters [ $p=0,967$ ;  $p=0,983$ ;  $p=0,623$ ;  $p=0,961$ ].

Volgens onze resultaten, biedt *Phd1*-deletie dus geen bescherming tijdens acute DSS-colitis. Omdat in deze eerste cyclus geen significante daling van het gewicht werd bereikt, werd de dosis DSS in cyclus twee opgedreven tot 2,5%. Ook na de tweede cyclus was de gewichtsval niet significant. Tijdens de derde werd om die reden 3% DSS aan het drinkwater toegevoegd.

#### *Chronische DSS-colitis*

Na drie cycli werden alle meetmomenten samen geanalyseerd als een chronisch DSS-model. Over het verloop van de hele proef, waren duidelijke trends en fluctuaties aanwezig in gewicht,

maar deze waren slechts borderline significant [ $p=0,054$ ]. *Post-hoc* werden geen significante verschillen gevonden tussen de meetmomenten. Aan de start van elke nieuwe cyclus was bij benadering het startgewicht opnieuw bereikt. Dit was gemiddeld 100,83% (1,212%) en 99,26% (1,105%) van het startgewicht aan het begin van respectievelijk cyclus twee en drie. De maximale daling van het gewicht werd voor elke cyclus bereikt op dag negen. Hoe hoger de concentratie DSS was, hoe meer het gewicht daalde. Zo bedroeg het gemiddelde gewicht op dag negen van cyclus één, twee en drie respectievelijk 97,37% (1,502%), 94,55% (1,779%) en 89,94% (2,745%) van het startgewicht. Afwezigheid van *Phd1 in se* [ $p=0,775$ ], noch de interactie ervan met het tijdsverloop [ $p=0,981$ ] vertoonden trends.

Anders dan het gewicht, verschilden bloedverlies- [ $p<0,001$ ], stoelgangconsistentie- [ $p=0,004$ ] en DAI-score [ $p=0,001$ ] wel significant over het verloop van de proef. Bij DSS-toediening was bloedverlies in elke cyclus een snel opkomend symptoom, bovendien werd het maximaal bloedverlies sneller bereikt met elke nieuwe cyclus, en dus naarmate de DSS-concentratie toenam. In de eerste cyclus werd maximaal bloedverlies bereikt op dag zeven, bij de volgende was dit reeds op dag vier. Enkel in de derde verschilde de score significant t.o.v. baseline, de score op dag vier en zeven was er maximaal verschillend van de startwaarde [ $p<0,001$ ]. Ten slotte was er in elke cyclus ook een snelle resolutie van het bloedverlies, op dag negen en elf was de gemiddelde score nagenoeg nul. In cyclus drie was dit verschil opnieuw significant, de score was er op dag elf gemiddeld 1,833 punten lager dan op dag zeven [ $p=0,005$ ].

Wat betreft stoelgangsconsistentie waren dezelfde grote lijnen waar te nemen, op enkele verschillen na. Zo was er alleen een significant scoreverschil in cyclus één: op dag zeven was de score er gemiddeld 0,698 punten hoger dan aan de start van de proef [ $p=0,037$ ]. De stoelgang bleef ook gemiddeld slapper doorheen de proef, er was geen terugkeer naar baseline consistentie. Na elke behandeling daalde de consistentiescore wel, maar deze daling was beperkt.

Ten slotte kende ook de DAI hetzelfde verloop in de tijd. De score werd hoger en voornamelijk vlugger hoger met elke nieuwe, hoger gedoseerde cyclus. In de eerste cyclus bedroeg de gemiddelde score op dag zeven 2,74 punten meer dan aan de start [ $p=0,037$ ] en 1,906 punten meer dan op dag twee [ $p=0,041$ ]. Daarnaast verschilde de score ook significant over de meetmomenten in cyclus drie. Op dag vier en zeven was de gemiddelde score er respectievelijk 3,40 [ $p=0,002$ ] en 4,23 [ $p=0,15$ ] punten hoger dan aan de start van de chronische proef. Ook was de score in de derde cyclus op dag zeven significant hoger dan op dag 2, het gemiddelde verschil bedroeg 2,48 punten [ $p=0,042$ ]. Net zoals bij de consistentiescore was er doorheen het experiment geen volledige terugkeer meer naar baseline. Toch daalde de DAI-score sterk na elke cyclus, zo was in de eerste cyclus de maximale DAI-score op dag zeven gemiddeld 2,05 punten hoger dan het minimum op dag



twee van de tweede cyclus [ $p=0,014$ ]. Na de tweede cyclus daalde de score na het maximum minder intens, de grootte van het verschil bedroeg er gemiddeld 1,1 punten [ $p=1,000$ ].

Deletie van *Phd1* had geen effect op de bloedverliesscore [ $p=0,982$ ], de consistentiescore [ $p=0,733$ ] of de DAI-score [ $p=0,748$ ]. Ook de interactie tussen genotype en meetmomenten had op geen van drie bovenstaande parameters een significante invloed [ $p=0,833$ ], [ $p=0,621$ ], [ $p=0,982$ ]. Bijgevolg kan geconcludeerd worden dat afwezigheid van *Phd1* ook in een chronisch DSS-model geen bescherming biedt.

#### 5.1.2.2 Geen verschil in post-inflammatoire, intestinale fibrose

Op het einde van de derde cyclus werden de proefdieren gesacrificeerd. Ontwikkeling van intestinale fibrose werd in de eerste plaats geëvalueerd aan de hand van het gewicht en de lengte van het colon bij sacrificatie.

Het gemiddeld colongewicht van de drie wt muizen bedroeg 350,7 mg (5,51 mg), de colonlengte was er gemiddeld 8,10 cm (0,854 cm). Bij de vier *Phd1* knock-outs bedroegen gemiddeld gewicht en lengte respectievelijk 359,0 mg (58,77 mg) en 8,03 cm (0,608 cm). De ratio tussen beiden, een goeie indicator voor intestinale fibrose, was gemiddeld 43,66 mg/cm (5,220 mg/cm) bij de wildtype muizen tegenover 45,286 mg/cm bij de knock-outs. Figuur 3 in addendum IV geeft de gemiddeldes weer voor bovenstaande parameters. Er waren geen trends aanwezig tussen de twee groepen.

De mate van fibrose werd daarenboven ook histologisch geëvalueerd en gescoord d.m.v. een Masson's trichroom kleuring. Figuur 4A en 4B, uit addendum IV, tonen de transversale doorsnede van het distale colon van een *Phd1* wildtype muis na zo'n kleuring, respectievelijk in overzichts- en detailopname. Er was geen verschil in histologische score tussen de twee groepen [ $p=1,000$ ] (Figuur 4C, addendum IV). *Phd1*-deletie beschermt muizen dus niet tegen de ontwikkeling van fibrose in een chronisch DSS-colitis model.

### 5.1.3 Optimalisatie van de tamoxifen-geïnduceerde conditionele *Phd1* knock-out.

Tot nog toe werd enkel het effect van een totale (*i.e.* in alle lichaamscellen) *Phd1* knock-out nagegaan op *in-vivo* fibrose door chronische DSS-colitis. Hoewel quasi alle celtypes wel een rol spelen in fibrose, worden fibroblasten toch benoemd als de belangrijkste cellulaire mediators (7). Om in vervolgonderzoek te bestuderen of fibroblastspecifieke deletie van *Phd1* de ontwikkeling van fibrose *in-vivo* afremt, optimaliseerden we in deze studie een tamoxifen-geïnduceerde conditionele *Phd1* knock-out in intestinale fibroblasten.

#### *Intraluminale toediening van tamoxifen in heterozygoot geflopte *Phd1*<sup>f/+</sup> muizen*

In deze eerste proef werden drie *Phd1*<sup>f/+</sup>*Col1a2:Cre*<sup>+/-</sup>*ERT* en drie *Phd1*<sup>f/+</sup>*Col1a2:Cre*<sup>-/-</sup>*ERT* muizen éénmalig IL behandeld met 40 mg/kg 4-OH Tam. Na zeven dagen vond sacrificatie

plaats. Genexpressies, weergegeven op figuur 5A (addendum IV), werden bestudeerd in het colon, de lever en in gecultiveerde MIF's.

*Phd1* wildtype allel expressie was in het colon [ $p=0,702$ ] en in de lever [ $p=0,164$ ] niet significant verschillend tussen de twee groepen. I.t.t. in het colon was in de lever wel een duidelijke trend aanwezig, wt allel expressie was er gemiddeld 0,62 fold hoger in *Cre*-positieve muizen. Strijdig met deze observatie, was ook de cko allel expressie in de lever insignificant verhoogd bij deze muizen, gemiddeld zo'n 0,84 fold [ $p=0,248$ ]. De verhoogde expressie van het *Phd1* cko allel expressie in het colon lag wel in de lijn van verwachtingen. Bij *Cre*-positieve muizen was de expressie gemiddeld 0,67 fold hoger [ $p=0,026$ ].

Ten slotte werd geen significante *Phd1* knock-out geobserveerd in *Cre*-positieve fibroblasten. Expressie van het wildtype allel was er wel gemiddeld 0,33 fold lager [ $p=0,170$ ]. Het verschil in cko allel expressie tussen de twee groepen was eveneens niet significant. De trend was echter wel veel duidelijker met gemiddeld zo'n 3,37 fold hogere expressie in aanwezigheid van *Cre* [ $p=0,346$ ].

De stijgende trend van cko allel expressie in de lever bij *Cre*-positieve muizen wijst op *Cre*-recombinatie en doet bijgevolg vermoeden dat de IL aanpak niet specifiek was voor intestinale fibroblasten. Op basis van dit vermoeden, en op basis van het feit dat geen significante daling van de wt allel expressie kon aangetoond worden op celniveau, werd een tweede experiment uitgevoerd met IP behandelde muizen.

#### *Intraluminale en intraperitoneale toediening van tamoxifen in homozygoot geflopte *Phd1<sup>ff</sup>* muizen*

Bij het tweede opzet werden drie *Phd1<sup>ff</sup>Col1a2:Cre<sup>-/-</sup>ERT*, drie *Phd1<sup>ff</sup>Col1a2:Cre<sup>+/-</sup>ERT* en zeven *Phd1<sup>ff</sup>Col1a2:Cre<sup>+/-</sup>ERT* muizen respectievelijk niet behandeld (negatieve controle), eenmalig IL behandeld met 40 mg/kg 4-OH Tam en driemaal IP behandeld met 250 mg/kg Tam. Slechts één van de zeven muizen overleefde de IP behandeling. De IL behandeling was dezelfde als bij de vorige proef, al betrof het ditmaal homozygoot geflopte muizen. Fibroblasten uit het colon werden geïsoleerd en uitgezaaid. Door afwezigheid van proliferatie en hoge celdood, konden enkel fibroblasten van twee IL en twee niet-behandelde muizen in cultuur gebracht worden. De expressie van de verschillende *Phd1* allelen werd bepaald in het colon en in de intestinale fibroblasten (figuur 5FiguurB, addendum IV).

Hoewel de IL muizen ditmaal homozygoot geflopt waren over *Phd1*, was de daling in wt allel expressie in het colon nog steeds insignificant t.o.v. de controles, gemiddeld 0,19 fold [ $p=0,136$ ]. *Phd1* wt allel expressie in het colon van de IP behandelde muis was bovendien nog 0,07 fold lager dan de gemiddelde expressie bij de IL behandelde groep. Wat cko allel expressie in het colon betreft, waren er geen verschillen tussen controles en IL behandelde

muizen [ $p=0,805$ ]. De gemiddelde expressie in deze laatste groep was wel 1,9 fold lager dan in de IP behandelde muis.

Op celniveau was de wt allel expressie gemiddeld 0,12 fold (0,063 fold) lager in de IL behandelde muizen. De cko allel expressie was er gemiddeld 2,91 fold (0,401 fold) hoger. Wederom kon op celniveau geen significante daling in wt allel expressie aangetoond worden na IL behandeling. Om deze reden en omdat de IP behandelde muis in het colon respectievelijk de hoogste cko allel en laagste wt allel expressie vertoonde, werd een derde proef opgestart. Hierin werd de focus gelegd op de IP-behandeling. Om de grote sterfte bij de drievoudige IP-behandeling met 250 mg/kg Tam uit de weg te gaan, werd voor het derde experiment een lagere dosis toegekend op frequentere tijdstippen.

*Intraperitoneale toediening van laaggedoseerde tamoxifen in homozygoot geflopte  $Phd1^{ff}$  muizen*

In de laatste proef werden vier van acht  $Phd1^{ff}Col1\alpha2:Cre^{+/-}$  muizen dagelijks behandeld met 2 mg Tam gedurende vijf dagen. De overige vier fungeerden als negatieve controles. Fibroblasten uit het colon werden geïsoleerd en uitgezaaid. Door beperkte proliferatie kon echter geen RNA geïsoleerd worden van MIF's uit één onbehandelde muis. Expressie in de lever werd geëvalueerd om na te gaan in welke mate er recombinatie plaatsvond onder deze systemische, intraperitoneale behandeling. Figuur 5C (addendum IV) geeft een grafische weergave van de resultaten.

In colonweefsel kon geen significant verschil in wt allel expressie geobserveerd worden tussen de twee groepen [ $p=0,872$ ]. Hetzelfde gold voor de lever, hoewel er o.i.v. tamoxifen toch een stijgende trend van 0,21 fold was [ $p=0,616$ ]. Cko allel expressie in het colon was wel significant verschillend tussen beide groepen. Na behandeling met tamoxifen was de expressie er gemiddeld 17,07 fold hoger [ $p=0,009$ ]. I.v.m. het colon, was de cko allel expressie in de lever o.i.v. tamoxifen veel minder gestegen. Ze was er slechts 0,97 fold hoger na behandeling [ $p=0,348$ ].

Algemeen was er dus een zeer lage  $Phd1$  cko allel expressie in de lever tegenover een hoge expressie in het colon van muizen onder tamoxifen. Dit wijst erop dat ondanks systemische, intraperitoneale toediening van tamoxifen,  $Cre$ -recombinatie toch vooral plaatsvond in het colon. De afwezigheid van een daling in de wt allel expressie in de lever na behandeling met tamoxifen pleit ook voor deze stelling.

Op MIF-niveau was de cko allel expressie gemiddeld 60,208 fold hoger in cellen van behandelde muizen [ $p<0,001$ ].  $Phd1$  wt expressie was ook significant verschillend tussen de twee condities. Ze was gemiddeld 0,53 fold lager in MIF's blootgesteld aan tamoxifen [ $p=0,012$ ]. In drie van de vier behandelde muizen was de expressie overigens meer dan 0,6 fold gedaald.

De dagelijkse IP behandeling aan lage doses tamoxifen is bijgevolg succesvol in het activeren van de *Cre*-gemedieerde DNA-recombinatie, die ondanks het systemisch karakter van de therapie, toch vooral in het colon plaatsvindt.

## 5.2 *In-vitro* experimenten

*In-vitro* werd het hypothetische inhiberend effect van een *Phd1*-deletie op TGF-gemedieerde fibroblastactivatie nagegaan. Alvorens dit effect te evalueren werd de zuiverheid van de primaire fibroblastenkolonie getoetst en werden TGF- en DMOG-concentraties geoptimaliseerd.

### 5.2.1 De isolatieprocedure is selectief voor fibroblasten

Voor deze resultaten wordt verwezen naar addendum III.

### 5.2.2 Dosisoptimalisatie van TGF en DMOG

Voor de resultaten van deze optimalisatieprocedures wordt verwezen naar addendum III.

### 5.2.3 *Phd1* deletie remt TGF-gemedieerde fibroblastactivatie niet

Aan de hand van stimulatieproeven met TGF en DMOG vergeleken we fibroblastactivatie tussen drie wildtype en twee *Phd1*-gedeelteerde muizen. Fibroblasten werden gestimuleerd met TGF om hun activatie te bewerkstelligen. Simultane stimulatie met DMOG fungeerde als negatieve controle bij TGF-stimulatie (66). Tevens liet DMOG-stimulatie toe te controleren of mogelijke effecten van panhydroxylase inhibitie zich ook manifesteerden onder *Phd1*-deletie en bijgevolg *Phd1*-afhankelijk waren. Fibroblastactivatie werd enerzijds bestudeerd via profibrotische genexpressie en anderzijds via de profibrotische IL-6 secretie in het supernatans.

#### 5.2.3.1 Op basis van profibrotische genexpressie

Globaal genomen verschilde de expressie van *Ctgf* [ $p=0,005$ ], *Mmp9* [ $p<0,001$ ], *Col1 $\alpha$ 2* [ $p=0,001$ ] en *Glut-1* [ $p=0,001$ ] significant tussen de verschillende stimulatiecondities, zoals weergegeven op figuur 8, addendum IV.

TGF zorgde voor een significante toename van de *Ctgf*- en *Mmp9*-expressie, respectievelijk 1,21 [ $p=0,009$ ] en 8,67 fold [ $p<0,001$ ]. Ondanks de wijziging van 48 naar 36 uur blootstelling was de expressie van *Col1 $\alpha$ 2* lager na stimulatie met TGF, gemiddeld 0,43 fold i.v.m. ongestimuleerde fibroblasten [ $p=0,003$ ]. Daarenboven was er na stimulatie met TGF, hoewel verwacht, geen significante toename in de expressie van *Acta-2* of *Vegf*. Ondanks de insignificantie, was expressie van dit laatste gen wel verhoogd. Ten slotte had TGF *in se* geen invloed op de *Glut-1* expressie.

In tegenstelling tot de proef beschreven in 5.2.2, kon hier geen significante opregulatie van *Vegf* en *Glut-1* aangetoond worden na incubatie met DMOG. Desondanks was de expressie

van deze respectievelijke genen er gemiddeld 0,26 en 0,20 fold hoger i.v.m. de controleconditie. Bij *Acta-2*, *Ctgf* en *Col1 $\alpha$ 2* was er geen trend of significant verschil in expressie tussen enerzijds de ongestimuleerde en DMOG-conditie en anderzijds de TGF- en combinatieconditie. DMOG oefende m.a.w. geen effect uit op de expressie van deze genen. Hoewel DMOG op zichzelf de expressie van *Mmp9* niet beïnvloedde, zorgde DMOG voor en tijdens TGF-stimulatie wel voor een gemiddeld 3,31 fold lagere *Mmp9*-expressie in vergelijking met wanneer enkel met TGF werd gestimuleerd [ $p=0,003$ ]. Panhydroxylase inhibitie in fibroblasten inhijbeert bijgevolg de opregulatie van het profibrotische *Mmp9* na TGF-stimulatie. Ten slotte werd ook de *Glut-1* expressie significant beïnvloed door de combo van DMOG en TGF, ze oefenden een additief effect uit. Expressie was er gemiddeld 1,06 fold, 0,86 fold en 0,78 fold hoger dan wanneer fibroblasten respectievelijk niet [ $p=0,001$ ], enkel met DMOG [ $p=0,003$ ] of enkel met TGF [ $p=0,001$ ] werden gestimuleerd.

Bij het vergelijken van de verschillende condities, kon noch bij de expressie van *Ctgf* [ $p=0,842$ ], *Acta-2* [ $p=0,420$ ], *Mmp9* [ $p=0,676$ ] en *Col1 $\alpha$ 2* [ $p=0,434$ ], noch bij de expressie van *Glut-1* [ $p=0,376$ ] en *Vegf* [ $p=0,240$ ], een significant verschil aangetoond worden tussen de twee genotypes. *Vegf*-expressie was echter wel lager in *Phd1*<sup>-/-</sup> fibroblasten, maar dit was niet significant [ $p=0,625$ ].

Er wordt geconcludeerd dat *Phd1* knock-out in fibroblasten niet zorgt voor inhibitie van de TGF-gemedieerde fibroblastactivatie, daar er geen inhibitie is van de profibrotische genexpressie.

### 5.2.3.2 Op basis van profibrotische eiwitsecretie

Zowel de absolute concentratie IL-6 in het supernatans [ $p<0,001$ ] als de fold change t.o.v. de corresponderende ongestimuleerde conditie [ $p<0,001$ ] verschilden sterk tussen de verschillende condities (figuur 9, addendum IV). Zoals verwacht zorgde TGF voor een toename in zowel absolute concentratie als in inductie. Deze bedroeg respectievelijk 52,66 pg/ml [ $p<0,001$ ] en 0,45 fold [ $p=0,009$ ] ten opzichte van de controlegroep. DMOG oefende geen effecten uit op IL-6 concentratie of inductie, zowel *in se* als in combinatie met TGF.

Er was een borderline significant effect aanwezig van de interactie tussen het genotype en de verschillende condities op de absolute concentraties in het supernatans [ $p=0,085$ ]. *Post-hoc*, hoewel insignificant, was de IL-6-concentratie in het supernatans na TGF stimulatie bij wt MIF's gemiddeld 17,58 pg/ml hoger dan bij *Phd1* ko's. In combinatie met DMOG nam dit verschil zelfs nog toe tot gemiddeld 29,86 pg/ml, het bleef echter wel insignificant. Gelijktijdige inhibitie van de andere prolyl-hydroxylasen lijkt dus nog meer inhiberend te werken.

Ook in de TGF-vrije condities was de concentratie insignificant lager in *Phd1* knock-outs. Het verschil tussen de genotypes bedroeg gemiddeld 14,18 en 5,53 pg/ml in respectievelijk de ongestimuleerde en de DMOG conditie. De basale IL-6 secretie lijkt dus ook verlaagd te zijn in *Phd1*<sup>-/-</sup> intestinale fibroblasten. Deze secretie inhiberende trends waren echter niet zichtbaar

bij de inductie. Integendeel, hoewel insignificant, was de secretie van IL-6 o.i.v. TGF gemiddeld 0,24 fold hoger bij de *Phd1* gedeleteerde fibroblasten [ $p=0,171$ ]. Bij concomitante DMOG-stimulatie werd dit verschil navenant nihil. Hoewel de supernatansconcentratie IL-6 bij een *Phd1*-deletie dus lager lijkt te zijn, werd aangetoond dat de deletie TGF-gemedieerde fibroblastactivatie niet inhibeert.

## 6 Discussie

In dit onderzoek onderzochten we de invloed van het *Phd1*-gen *in-vivo* op de ontwikkeling van fibrose in een muismodel en *in-vitro* op de TGF-gemedieerde fibroblastactivatie.

### 6.1 *In-vivo* resultaten

*In-vivo* vergeleken we de ontwikkeling van intestinale fibrose tussen wildtype en *Phd1*<sup>-/-</sup> knock-out muizen tijdens een chronisch DSS-colitismodel.

In de eerste plaats gingen we, zowel bij de eerste cyclus (acute fase) als over de drie cycli (chronische proef) heen, de ernst van de colitis na a.d.h.v. volgende klinische parameters: gewichtsverlies, rectaal bloedverlies, stoelgangconsistentie en DAI-score. Bij geen enkel van deze parameters kon een verschil aangetoond worden tussen de twee genotypes, noch in de acute fase, noch over het gehele verloop. Hoewel, tot zover we weten, nog geen chronische DSS-proef uitgevoerd werd met *Phd1*-deficiënte muizen, staan onze resultaten betreffende het acute verloop tegenover die van Tambuwala *et al.* *Phd1* knock-out muizen waren er immers beschermd tijdens acute DSS-colitis. Het gewichtsverlies en de DAI-score waren er significant lager in vergelijking met wildtypes, net als inflammatie, geobjectiveerd met histologie en in myeloperoxidase assays (70). Een mogelijke verklaring voor de discrepantie tussen onze resultaten en die van hen is het verschil in methodologie. In tegenstelling tot de C57BL/6 achtergrond in dit onderzoek, werden door Tambuwala *et al.* muizen gebruikt op een gemengde Swiss/129-achtergrond. Uit de literatuur blijkt dat de genetische achtergrond een belangrijke rol speelt in de susceptibiliteit aan en de respons op DSS-colitis (77). Daarnaast werden muizen er blootgesteld aan 5% DSS i.t.t. de 2% (tijdens de eerste cyclus) in dit onderzoek. Intestinale inflammatie is direct gecorreleerd met de concentratie DSS (77, 82). Een verschil in inflammatie tussen de knock-outs en wildtypes zou mogelijk pas tot uiting kunnen komen bij een voldoende hoge ernst van inflammatie.

Hierbij aansluitend, merkten we op dat de muizen in dit onderzoek, i.v.m. de literatuur, niet alleen veel minder susceptibel waren aan de DSS-colitis, maar ook veel sneller herstelden. Maximaal gewichtsverlies werd telkens bereikt op dag negen, de andere parameters waren steeds maximaal op dag zeven. Hoewel de consistentie- en DAI-scores nooit meer het startniveau bereikten, zakten ze wel heel sterk bij het stoppen van de DSS. Bloedverliesscore en gewicht bereikten in elke cyclus hun baselinewaarde respectievelijk twee en zeven dagen

na het stoppen van de DSS-toediening. Dit staat in schril contrast met de resultaten van Suzuki *et al.* Muizen (C57BL/6) werden er vijf dagen blootgesteld aan 3% DSS en de DAI-score bereikte er pas een maximum drie dagen na de DSS-stop. Normalisatie van stoelgangconsistentie en afwezigheid van fecaal bloed vonden respectievelijk niet en negen dagen na DSS-stop plaats (83). Melgar *et al.* beschrijven gelijkaardige bevindingen onder dezelfde condities, daarenboven rapporteren ze ook gewichtsdeling tot één week na DSS-stop (84). Het opzet in bovenstaande experimenten vertoont sterke gelijkenissen met onze DSS-cycli, wat het verschil in klinische inflammatie vreemd maakt.

De eerste 'acute' cyclus in huidig onderzoek werd uitgevoerd met 2% DSS, wat minder inflammatie induceert dan 3%. Daarenboven blijkt uit ongepubliceerde data dat de eerste cyclus de meest intense is. Een mogelijke verklaring is dus dat 2% DSS te laag was om een even sterk inflammatoir antwoord te verkrijgen. De respons op de 3% DSS in de derde cyclus was hier dan geattenuëerd door chroniciteit en was mogelijk sterker geweest zijn in acute fase. Susceptibiliteit voor DSS-colitis wordt daarnaast ook bepaald door het geslacht van de muis, vrouwelijke muizen op een C57BL/6 achtergrond blijken minder gevoelig te zijn (77). Dit zou eveneens een mogelijke verklaring zijn voor de lage susceptibiliteit in deze proef, met zes van de zeven muizen vrouwtjes. Er werd hiervoor echter gecorrigeerd in de publicatie van Suzuki *et al.* door enkel gebruik te maken van vrouwelijke muizen (83).

Een belangrijke tekortkoming van dit experiment is de beperkte steekproefgrootte, zowel bij het beoordelen van fibrose als inflammatie. Mogelijk was de steekproefgrootte te klein om een significant verschil aan te tonen. Belangrijker echter, is het feit dat de resultaten van dit onderzoek omwille van de kleine aantallen in elke groep niet extrapoleerbaar zijn naar de algemene populatie muizen. We stellen bijgevolg voor dit onderzoek te herhalen met een grotere populatie en drie cycli van minstens 3% DSS. Het is hierbij ook aangewezen een derde populatie te introduceren, als controlegroep die niet werd blootgesteld aan DSS. Op die manier kunnen resultaten geïnterpreteerd worden t.o.v. een gezonde referentie. Ten slotte is het dan ook belangrijk de drie populaties te matchen voor geslacht zodat vergelijkingen omtrent susceptibiliteit niet gebiased zijn. Bovenstaande opmerkingen gelden overigens ook voor de evaluatie van fibrose.

In tweede instantie werd de ontwikkeling van intestinale fibrose (IF) na chronische DSS-blootstelling geëvalueerd. IF werd enerzijds histologisch gescoord na een Massons's trichroom kleuring en anderzijds geëvalueerd aan de hand van colongewicht en -lengte bij de sacrificatie. Langs geen van beide uitgangspunten kon een significant verschil aangetoond worden tussen wt's en ko's.

Een controlegroep werd niet geïncubeerd in dit experiment. Om toch een idee te hebben van de grootteorde van deze parameter in een gezonde populatie, werden resultaten uit de studie van Holvoet *et al.* geraadpleegd. De opbouw van dat experiment was immers gelijkaardig aan

deze studie, op de rustperiode na. Muizen werden er zeven dagen blootgesteld aan 2,5% DSS, waarna twee weken rust volgde. Er werden ook drie zo'n cycli uitgevoerd.

De gemiddelde colongewicht/lengteratio in DSS-behandelde muizen uit huidig experiment was ongeveer 20mg/cm hoger dan die van de onbehandelde muizen van Holvoet *et al.* In vergelijking met gezonde muizen was dus zeker IF aanwezig bij de DSS-muizen uit huidig onderzoek. Toch was een sterk verschil op te merken bij het vergelijken van de colongewicht/lengteratio tussen de DSS-behandelde groepen uit beide experimenten. Fibrose was ernstiger na de DSS-proef door Holvoet *et al.*, de ratio bedroeg er ongeveer 18mg/cm meer. Dit kan voor een deel te verklaren zijn door de significante gewichtsval en significante inflammatie die er gerapporteerd werd tijdens de DSS-toediening (44). Daarnaast werd ook gebruik gemaakt van mannelijke muizen, die gekend zijn voor een hogere susceptibiliteit t.o.v. DSS (77) tegenover het gebruik van voornamelijk vrouwelijke muizen in ons onderzoek. In tegenstelling tot de parameters bij sacrificatie, was in de histologische fibroscore geen verschil tussen beide experimenten (44).

Het is cruciaal op te merken dat er geen globale consensus is over het te volgen DSS-doseringsschema in een chronisch DSS-colitis model ter inductie van IF. Op het onderzoek van Dieleman *et al.* (Swiss Webster muizen) na, gebeurde elk van onderstaand beschreven experimenten met muizen op een C57BL/6 achtergrond. Wirtz, Scheibe en Holvoet *et al.* beschrijven de tricyclische DSS-toediening als de optimale methode om intestinale fibrose te induceren, elke cyclus bestaande uit zeven dagen 1,5% - 3% DSS-blootstelling en één à twee weken rust (concentratie en rustduur afhankelijk van het onderzoek) (44, 77, 85). De methodologie volgens Pucilowska *et al.* ligt in dezelfde lijn, al gaat het daar om twee cycli DSS aan een hogere dosis van 3%-5% DSS (42). Naast de cyclische methode zijn er ook auteurs die fibrose-ontwikkeling observeren na een acute 3% DSS-colitis van 5 à 6 dagen (83, 84). Dit wordt echter tegengesproken door Wirtz en Pucilowska die respectievelijk aangeven dat een acute DSS-colitis zelflimiterend is en niet leidt tot intestinale fibrose (42, 77). Gezien verschillende auteurs de tricyclische manier als gunstig beschreven en er geen argumenten zijn tegen deze methode, gebruikten we deze tactiek in dit experiment.

Een mogelijke oorzaak voor de afwezigheid van een antifibrotisch effect van een totale *Phd1* knock-out kan teruggevonden worden in de beperkte inflammatoire respons tijdens de verschillende DSS-cycli. Zoals reeds gesteld was coloninflammatie mogelijk niet sterk genoeg om een verschil in inflammatie aan te tonen tussen de twee genotypes. In analogie was door de beperkte inflammatie ook de fibrose mogelijk niet sterk genoeg om toe te laten significante effecten te observeren. Het feit dat fibrose wel aanwezig was, maar in een lagere graad dan in het onderzoek van Holvoet *et al.* draagt bij aan deze hypothese (44).

Daarenboven is het belangrijk de mogelijkheid te overwegen dat de *Phd1* knock-out netto geen significant effect kon uitoefenen op de ontwikkeling van fibrose omdat *Phd1* gedeleteerd was



in alle cellen. Aangezien fibroblasten beschouwd worden als de voornaamste cellulaire mediators van fibrose (7), er een sterke toename is van fibroblasten in fibrotische UC en CD-biopten (86) en *Phd1* ten slotte sterk opgeregeerd is in geïnflammeerde UC en CD biopten (60, 71), zou fibroblastspecifieke *Phd1*-inhibitie wel een significante daling van de fibrose teweeg kunnen brengen. Een afwezig netto-effect van de *Phd1*-deletie zou immers deels verklaard kunnen worden door macrofaag polarisatie. Van Welden *et al.* stelde vast dat *Phd1* deletie in macrofagen gepaard gaat met een verhoogde predispositie tot differentiatie naar een M2-macrofaag (68). Dit type macrofagen is gekend om zijn profibrotische werking. Zo zorgen M2 macrofagen onder andere voor een toename van de fibroblastactivatie en een verhoogde collageenproductie via secretie van TGF- $\beta$ 1 en Chemokine ligand 18 (CCL18) (87, 88). M2-polarisatie kan bijgevolg een verklaring zijn voor de afwezigheid van een netto antifibrotisch effect bij *Phd1*-deletie in muizen (89). Verder werd in dit onderzoek een methode geoptimaliseerd om fibroblast specifieke *Phd1* knock-out te verkrijgen, precies om in een latere fase na te kunnen gaan in hoeverre dit een beschermend effect heeft tegen IF.

We toonden aan dat een dagelijkse intraperitoneale toediening van 2mg tamoxifen gedurende vijf dagen succesvol was in het bekomen van tamoxifen-geïnduceerde *Cre*-recombinatie. Op basis van de daling in de *Phd1* wildtype allel expressie bleek deze methode optimaal. *Phd1* was gefloxt over exon drie en vier. qPCR-primers voor wt allel cDNA amplificatie bonden sequenties van exon twee en exon drie (forward en reverse, respectievelijk). Forward en reverse primers voor cko allel cDNA amplificatie hybridiseerden respectievelijk met de transitieplaats tussen exon twee en vijf, pas aanwezig was na de *Cre*-gedieerde DNA-recombinatie en met exon 5.

De inductie van cko allel expressie was in leverweefsel veel lager dan in colonweefsel. Daar expressie van dit allel het bewijs is van recombinatie, hadden we bij deze systemische toediening gelijkwaardige expressies verwacht in beide organen, of zelfs een hogere expressie in de lever. Tamoxifen wordt immers in de lever omgezet tot 4-hydroxytamoxifen (4-OH Tam), zijn geactiveerde metabool, die veel sterker is in het activeren van de *Cre*-recombinatie (90). Een lagere expressie in de lever kan simpelweg te wijten zijn aan een lagere expressie van *Col1 $\alpha$ 2* in de lever. Hiertegen pleit echter de gelijkaardige expressie van het cko allel in colon en lever na IL toediening van 4-OH Tam, een observatie die bovendien onverwacht was. Het doel van de IL behandeling was immers om colonsselectieve recombinatie te bereiken. De gelijke graad van recombinatie wijst erop dat de 4-OH Tam na toediening toch snel wordt opgenomen en via een *first-pass* effect hepatische recombinatie induceert.

Met behulp van dit succesvolle conditionele knock-out model is het wenselijk de DSS-proef te herhalen om mogelijke verborgen, protectieve effecten van een fibroblastspecifieke *Phd1* knock-out bloot te leggen.

## 6.2 *In-vitro* resultaten

Naast de muismodellen, evalueerden we ook *in-vitro* het effect van een *Phd1*-deletie. We gingen de differentiatie na van fibroblast naar myofibroblast onder TGF- $\beta$ 1.

Aangezien reeds gerapporteerd werd dat isolatie van fibroblasten gepaard kan gaan met contaminatie met hematopoëtische stamcellen (HSC) (91, 92), werd flowcytometrie toegepast om dit in deze context uit te sluiten. Hiervoor gingen we in de eerste plaats de proportie CD45-positieve cellen na. CD45 is een membraanproteïne dat exclusief in genucleëerde hematopoëtische cellen en dan vooral in leukocyten tot expressie wordt gebracht (93). Daarenboven gingen we aanwezigheid van vimentine na, een intermediair filament specifiek voor myo- en fibroblasten (8, 94). Flowcytometrie toonde dat de geïsoleerde celpopulaties voornamelijk uit (myofibro- en) fibroblasten bestonden en HSC's of leukocyten amper aanwezig waren. Een mogelijk verstorend effect door dode cellen werd ook uitgesloten omdat proporties enkel werden bepaald uit de levende celpopulatie.

TGF-concentraties werden geoptimaliseerd in wildtype MIF's voor aanvang van vergelijkende experimenten. We observeerden een voorziene dosisafhankelijke opregulatie van *Il-6* en *Ctgf*. Beide genen waren significant opgereguleerd vanaf 20ng/ml, wat om die reden sindsdien beschouwd werd als optimale concentratie. Onverwacht, was de neerregulatie van zowel *Acta-2* als *Col1 $\alpha$ 1*, twee TGF-responsieve genen. We vermoedden een negatief feedback mechanisme en stimuleerden bijgevolg 24 uur i.p.v. 48 uur in verdere experimenten.

Ondanks deze kortere stimulatieperiode, was er in de eigenlijke proef nog steeds neerregulatie van collageenexpressie, ditmaal van *Col1 $\alpha$ 2*. *Acta-2* was deze keer niet beïnvloed door de TGF-stimulatie. Verschillende auteurs beschrijven echter wel een opregulatie van *Col1 $\alpha$ 1* en/of *Col1 $\alpha$ 2* aan onder invloed van TGF. Gezien de TGF-concentratie veel lager was in die experimenten (1-10 ng/ml) en toch opregulatie gaf (44, 95-98), is de neerregulatie van collageen type 1 genen die we observeerden vermoedelijk het gevolg van een dosisafhankelijke negatief feedback mechanisme. Zowel Fragiadaki *et al.* als Liu *et al.* hebben onderzoek gedaan naar dit mechanisme en rapporteren respectievelijk een bewezen en een hypothetisch mechanisme (95, 98). Fragiadaki geeft aan dat TGF-concentraties in een range van 1 tot 10ng/ml aanleiding geven tot toename van *Col1 $\alpha$ 1* mRNA en eiwit, met 2 ng/ml als meest potente inductieconcentratie. Vanaf 10ng/ml is er echter een significante opregulatie gerapporteerd van het TGF-afhankelijke Cut Like Homeobox 1 gen (*Cux-1*) met repressie van de collageen expressie tot gevolg (95). Een gelijkaardige trend is terug te vinden in ons optimalisatie-experiment, waarbij expressie van *Col1 $\alpha$ 1* afnam vanaf 10ng/ml TGF. De kleine steekproefgroottes verklaren mogelijk het onvermogen een stijging waar te nemen bij 5ng/ml. Liu *et al.* geven een ander mogelijk dosisgerelateerd feedbackmechanisme aan via de WNT-pathway, dat overigens ook de *Acta-2* expressie zou beïnvloeden. Zij observeerden in dermale

fibroblasten een opregulatie van  $\beta$ -Catenine o.i.v. TGF. De TGF-gemedieerde fibroblastactivatie en profibrotische genexpressie werd er geattenuëerd door overexpressie van  $\beta$ -Catenine, geïnduceerd via een expressievector. Mogelijk zouden te hoge concentraties TGF leiden tot opstapeling van  $\beta$ -Catenine en zo zorgen voor een negatieve feedback, een effect dat wel celtype specifiek zou zijn. Ook is het exacte mechanisme met downstream spelers nog verre van opgehelderd (98). In tegenstelling tot *Cux-1* is de rol van de WNT/Catenine pathway dus eerder speculatief.

De stimulatie duur zou geen rol spelen in dit feedbackmechanisme. 24 uur is volgens verschillende auteurs optimaal om opregulatie te krijgen van *Col1 $\alpha$ 1* en/of *Col1 $\alpha$ 2* (96-98).

Er zijn verschillende resultaten gepubliceerd over de optimale stimulatie duur van *Acta-2*, gaande van 24 tot vooral 48 uur (97-101). De voorkeur aan 48 uur stimulatie om *Acta-2* expressie na te gaan is ook een mogelijke verklaring, waarom in de eigenlijke proef geen effect viel te observeren op de expressie na slechts 24 uur.

Net als bij de collageenexpressie blijkt ook de neerregulatie of het gebrek aan responsiviteit van *Acta-2* onder TGF voornamelijk dosisafhankelijk te zijn. Wong *et al.* geeft aan dat de proportie myofibroblasten sterk toeneemt onder 1-10 ng/ml TGF, maar even sterk afneemt vanaf 20 ng/ml (99). Gezien transdifferentiatie naar geactiveerd myofibroblast gepaard gaat met *Acta-2* expressie en geëvalueerd kan worden als conformatieveranderingen van de cellen, wijst een lagere proportie myofibroblasten op een lagere productie van *Acta-2* (28, 44). Liu beschrijft, zoals reeds geponeerd *cf. supra*, een negatieve feedback op de *Acta-2* expressie onder TGF, mogelijk gemedieerd door de WNT/Catenine pathway. Onder 10 ng/ml TGF beschrijven ze wel een opregulatie van dit gen (98). Daarbij aansluitend, beschrijven verschillende auteurs een opregulatie of verhoogde productie bij concentraties onder de 10 ng/ml (97, 100, 101). Net zoals bij de collageenexpressie is de afwezigheid van opregulatie bij 5 ng/ml tijdens de optimalisatie mogelijk het gevolg van een te lage steekproefgrootte. Bovendien werden de optimalisatie-experimenten uitgevoerd in fibroblasten van één muis, deze kan minder responsief geweest zijn.

Opregulatie van *Acta-2* expressie is noodzakelijk voor de conformatieverandering tot geactiveerde myofibroblast (28, 44). Alvorens het stimulatie-experiment met *Phd1* wildtype en knock-out fibroblasten te herhalen met een grotere populatie per groep, lijkt het noodzakelijk eerst de optimalisatieprocedure te herhalen. Enerzijds bij cellen van verschillende muizen en anderzijds bij verschillende concentraties, tot de *Col1 $\alpha$ 1* en voornamelijk de *Acta-2* expressie significant opgereguleerd zijn. Zonder zo'n opregulatie is er immers geen sprake van een geactiveerde fenotype en is het bijgevolg niet mogelijk een verschil in fibroblastactivatie aan te tonen tussen beide genotypes.

Naast TGF stimuleerden we fibroblasten ook met DMOG. Manresa *et al.* beschreven reeds een inhiberend effect van deze molecule op TGF-gemedieerde colonfibroblastactivatie. Naast een gedaalde proportie geactiveerde myofibroblasten, rapporteerden ze ook minder stressfibers en een gedaalde productie van  $\alpha$ -SMA en COL1 bij concomitante stimulatie met DMOG (66). DMOG werd hier dan ook in de eerste plaats meegenomen als negatieve controle onder TGF. Daarnaast werd het ook gebruikt om *Phd1*-deletie te kunnen vergelijken met panhydroxylase inhibitie. Na initiële testen met 1mM (resultaten niet weergegeven) werd een toxisch effect vermoed. Met behulp van MTT- en LDH-assays konden we aantonen dat 50 $\mu$ M DMOG een veilige concentratie is om fibroblasten te stimuleren. Bovendien was deze concentratie hoog genoeg om te zorgen voor significante opregulatie van HIF-targetgenen *Phd3* en *Glut-1*. Ze werd bijgevolg als optimaal beschouwd om prolyhydroxylase inhibitie te bekomen. In lijn met onze resultaten testten ook Agis *et al.* de toxiciteit van DMOG en namen 100  $\mu$ M DMOG aan als veilige concentratie. Zij rapporteerden een significante opregulatie van *Vegf* onder die concentratie (102).

Bij het vergelijken van de genexpressies tussen *Phd1* wildtype en knock-out MIF's onder de verschillende condities, observeerden we geen verschillen of trends tussen de twee genotypes. *Ctgf* was net zoals in de optimalisatietesten sterk opgereguleerd onder TGF. PHD-inhibitie door behandeling met DMOG leidde bij ons niet tot een verschil in expressie, hoewel we dit wel hadden verwacht. Manresa *et al.* beschreven per slot van rekening een attenuatie van de TGF-afhankelijke fibroblastactivatie o.i.v. DMOG, *cf. supra* (66). Een vergelijking maken met het artikel van Manresa is echter wel verraderlijk. *Col1 $\alpha$ 1/2* en  *$\alpha$ -Sma* zijn immers de genen waarop Manresa *et al.* zich baseerden bij het beschouwen van de fibroblastactivatie, en het zijn net deze genen die in dit onderzoek niet te interpreteren zijn omwille van negatieve feedback.

Wat betreft de andere genen, rapporteerde Hong *et al.* in dermale fibroblasten een opregulatie van *Ctgf* onder invloed van hypoxie, sterk verwant met PHD-inhibitie (103). *Ctgf*-expressie o.i.v. DMOG werd vooral in andere celtypes bestudeerd, daarop kan echter moeilijk voortgegaan worden, want de respons blijkt celtipe specifiek te zijn (104). Zo leidt DMOG tot een toename van TGF-geïnduceerde *Ctgf* expressie in endotheelcellen (105, 106). In renale tubulaire epitheelcellen zorgt DMOG daarentegen voor neerregulatie (104, 107). Verder onderzoek is nodig om de relevantie van deze gegevens te evalueren, bovendien is het niet aangewezen om af te gaan op onze resultaten met DMOG, daar slechts waarden van één muis geanalyseerd konden worden in de knock-out conditie.

In overeenstemming met de literatuur, observeerden we een significante opregulatie van *Mmp9* na TGF-behandeling (108, 109). Bij voorbehandeling met DMOG was deze opregulatie significant verminderd. Dit sluit aan bij de DMOG-gerelateerde inhibitie van TGF-gemedieerde fibroblastactivatie zoals gerapporteerd door Manresa (66).

Saed *et al.* beschrijven een gelijkaardige situatie in muriene fibroblasten, weliswaar onder hypoxie i.p.v. onder DMOG. Hypoxie leidde er tot een 80% afname in TGF-gemedieerde *Mmp9* expressie (109). Panhydroxylase inhibitie heeft hier dus duidelijk een inhiberend effect op de *Mmp9*-expressie. Zoals hierboven reeds aangegeven kon een selectieve *Phd1*-deletie dit effect niet nabootsen.

*Glut-1* en *Vegf* waren hier, in tegenstelling tot de optimalisatieprocedure, veel minder sterk tot zelfs niet opgereguleerd o.i.v. DMOG. Zowel *Vegf*- als *Glut-1* expressie kenden een stijgende trend in de TGF conditie en verrassend genoeg was er in de expressie van beide genen een additief effect van DMOG en TGF aanwezig. Dit versterkende effect werd reeds beschreven voor *Vegf* (110). Ook werd TGF-geïnduceerde opregulatie van *Glut-1* al geobserveerd (111). Ten slotte bepaalden we ook de IL-6 concentratie in het supernatans. Wat betreft de absolute concentraties IL-6 in het supernatans, was een duidelijke trend aanwezig: na stimulatie met TGF was deze lager bij *Phd1*-gedeleteerde dan bij TGF-gestimuleerde wt fibroblasten. Bij het beschouwen van de inductie was er in de TGF-gestimuleerde condities van dit beschermende effect echter geen sprake meer. Mogelijke verklaringen voor deze discrepantie konden we niet geven.

TGF is ervoor gekend om de IL-6-expressie en -secretie dosisafhankelijk te verhogen (112). Over de invloed van DMOG is echter nog geen consensus. Panhydroxylase inhibitie had in deze proef geen effect op de IL-6 concentratie, noch *in se* ten opzichte van baseline, noch concomitant met TGF t.o.v. TGF op zich.

Agis *et al.* beschreven gelijkaardige resultaten in humane gingivale fibroblasten (102). Shang *et al.* rapporteren echter een negatieve trend in datzelfde type cellen. Na blootstelling aan *Fusobacterium nucleatum* werd de IL-6 secretie er significant onderdrukt door DMOG (113). Hierbij is natuurlijk wel belangrijk op te merken dat de IL-6 secretie in deze onderzoeken verliep via verschillende pathways (102, 113).

Totaal haaks op bovengenoemde bevindingen is de significante opregulatie van *Il-6* in fibroblasten onder hypoxie, een situatie die DMOG stimulatie goed nabootst (114). Daarenboven activeren DMOG en hypoxie de NF- $\kappa$ B pathway in macrofagen met een verhoogde IL-6-secretie als gevolg (68). IL-6 is een belangrijk target van NF- $\kappa$ B, o.i.v. PHD-inhibitie is dus inderdaad een stijging van de IL-6 concentratie te verwachten.

Hoewel Ambler dit tegenspreekt, lijken onze resultaten net als die van Shang en Agis aan te geven dat DMOG in fibroblasten niet leidt tot NF- $\kappa$ B activatie, daar dit steeds gepaard gaat met IL-6 productie (102, 113, 114).

Het is aangewezen deze proef te herhalen met een grote steekproef en aan de optimale TGF-concentratie, om enerzijds de discrepantie tussen IL-6 inductie en concentratie verder te onderzoeken en anderzijds de IL-6 secretie onder DMOG en de rol van NF- $\kappa$ B hierin op te helderen.

## 7 Conclusie

In dit onderzoek kon geen beschermend effect van de *Phd1*-deletie op de ontwikkeling van fibrose aangetoond worden. Mogelijk is dit te wijten aan celspecifieke responsen op de deletie, een combinatie van anti- en profibrotische responsen met een netto neutraal effect. Op basis van voorgaand, preklinisch onderzoek vermoeden we een antifibrotisch effect van de *Phd1* knock-out in fibroblasten. Fibroblastspecifieke *Phd1*-deletie biedt vermoedelijk wel bescherming tegen intestinale fibrose bij chronische DSS-colitis. Om dit te bewijzen in vervolgonderzoek, optimaliseerden we een model van *Cre*-gemedieerde conditionele knock-out dat zeer succesvol bleek in het genereren van fibroblastspecifieke *Phd1*-deleties.

Verder was er geen verschil in profibrotische genexpressie tussen ko's en wt's na TGF-gemedieerde MIF-activatie, potentieel het gevolg van een te lage steekproefgrootte en een te hoge concentratie TGF. De relatief lagere IL-6-concentratie in het supernatans van *Phd1* ko fibroblasten pleit eveneens voor een mogelijk gemist effect. Samengevat konden we noch *in-vivo*, noch *in-vitro*, een significant antifibrotisch effect van *Phd1*-inhibitie aantonen. Vervolgonderzoek met grotere steekproefpopulaties en gebruik van fibroblastspecifieke *Phd1*-deletie is echter zeker nodig om sluitende conclusies te trekken over de impact van PHD1 op ontwikkeling van intestinale fibrose.

## 8 Referenties

1. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1785-94.
2. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006;12(30):4807-12.
3. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*. 2014;7:113-20.
4. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):91-9.
5. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Primary care*. 2017;44(4):673-92.
6. Kuhbacher T, Fölsch UJWjogW. Practical guidelines for the treatment of inflammatory bowel disease. 2007;13(8):1149.
7. Rieder F, Fiocchi CJNrg, hepatology. Intestinal fibrosis in IBD—a dynamic, multifactorial process. 2009;6(4):228.
8. Lawrance IC, Rogler G, Bamias G, Breynaert C, Florholmen J, Pellino G, et al. Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis. *J Crohns Colitis*. 2017;11(12):1491-503.
9. Specca S, Giusti I, Rieder F, Latella G. Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(28):3635-61.
10. Turpin W, Goethel A, Bedrani L, Croitoru M, Kenneth. Determinants of IBD heritability: Genes, bugs, and more. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(6):1133-48.
11. Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(1):362-81.
12. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.
13. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007;39(5):596-604.

14. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314(5804):1461-3.
15. Engelhardt KR, Grimbacher B. IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:1-18.
16. Yadav V, Varum F, Bravo R, Furrer E, Bojic D, Basit AW. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. *Translational Research*. 2016;176:38-68.
17. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
18. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*. 1998;66(11):5224-31.
19. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*. 1994;180(6):2359-64.
20. Matsuoka K, Kanai T, editors. *The gut microbiota and inflammatory bowel disease. Seminars in immunopathology*; 2015: Springer.
21. Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology*. 1999;117(5):1089-97.
22. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):44-54.
23. Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(2):144-9.
24. Sahami S, Kooij IA, Meijer SL, Van den Brink GR, Buskens CJ, Te Velde AA. The Link between the Appendix and Ulcerative Colitis: Clinical Relevance and Potential Immunological Mechanisms. *Am J Gastroenterol*. 2016;111(2):163-9.
25. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *2010;11(1):55*.
26. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *2008;456(7219):259*.
27. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *2004;53(11):1658-64*.
28. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*. 2007;56(1):130-9.
29. Rogler G, Biedermann L, Scharl M. New insights into the pathophysiology of inflammatory bowel disease: microbiota, epigenetics and common signalling pathways. *Swiss Med Wkly*. 2018;148:w14599.
30. Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, SCHULZKE JD, Bentzel CJ, Fromm MJAotNYAoS. Epithelial Barrier Defects in HT-29/B6 Colonic Cell Monolayers Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *2000;915(1):193-203*.
31. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*. 2004;5(8):800-8.
32. Noguchi E, Homma Y, Kang X, Netea MG, Ma XJNi. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *2009;10(5):471*.
33. Van Welden S, Selfridge AC, Hindryckx P. Intestinal hypoxia and hypoxia-induced signalling as therapeutic targets for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(10):596-611.
34. de Mattos BRR, Garcia MPG, Nogueira JB, Paiatto LN, Albuquerque CG, Souza CL, et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:11.
35. Chan HC, Ng SC. Emerging biologics in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2017;52(2):141-50.
36. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre JJG. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *2005;54(2):237-41*.
37. Specia S, Rousseaux C, Dubuquoy C, Rieder F, Vetuschi A, Sferra R, et al. Novel PPARgamma Modulator GED-0507-34 Levo Ameliorates Inflammation-driven Intestinal Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(2):279-92.

38. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *2002;8(4):244-50.*
39. Principi M, Giorgio F, Losurdo G, Neve V, Contaldo A, Di Leo A, et al. Fibrogenesis and fibrosis in inflammatory bowel diseases: Good and bad side of same coin? *World J Gastrointest Pathophysiol. 2013;4(4):100-7.*
40. Rieder F, Fiocchi C, Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology. 2017;152(2):340-50.e6.*
41. Flier SN, Tanjore H, Kokkotou EG, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. *J Biol Chem. 2010;285(26):20202-12.*
42. Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000;279(4):G653-9.*
43. Johnson LA, Rodansky ES, Sauder KL, Horowitz JC, Mih JD, Tschumperlin DJ, et al. Matrix stiffness corresponding to strictured bowel induces a fibrogenic response in human colonic fibroblasts. *Inflamm Bowel Dis. 2013;19(5):891-903.*
44. Holvoet T, Devriese S, Castermans K, Boland S, Leysen D, Vandewynckel YP, et al. Treatment of Intestinal Fibrosis in Experimental Inflammatory Bowel Disease by the Pleiotropic Actions of a Local Rho Kinase Inhibitor. *Gastroenterology. 2017;153(4):1054-67.*
45. Latella G, Di Gregorio J, Flati V, Rieder F, Lawrance IC. Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol. 2015;50(1):53-65.*
46. Li AC, Thompson RP. Basement membrane components. *J Clin Pathol. 2003;56(12):885-7.*
47. Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la Motte C, Sadler TM, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol. 2011;179(5):2660-73.*
48. Scharl M, Huber N, Lang S, Fürst A, Jehle E, Rogler G. Hallmarks of epithelial to mesenchymal transition are detectable in Crohn's disease associated intestinal fibrosis. *Clinical and translational medicine. 2015;4(1):1.*
49. Otte JM, Rosenberg IM, Podolsky DK. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology. 2003;124(7):1866-78.*
50. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology. 2002;123(3):679-88.*
51. Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem. 2002;277(13):11069-76.*
52. Lanzoni G, Roda G, Belluzzi A, Roda E, Bagnara GP. Inflammatory bowel disease: moving toward a stem cell-based therapy. *World journal of gastroenterology: WJG. 2008;14(29):4616.*
53. Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, et al. Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology. 1999;117(4):814-22.*
54. Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, Van Der Zon A, van Duijn W, van Hogezaand RA, Sier CF, et al. Increased mucosal matrix metalloproteinase-1,-2,-3 and-9 activity in patients with inflammatory bowel disease and the relation with Crohn's disease phenotype. *Digestive and Liver Disease. 2007;39(8):733-9.*
55. Strup-Perrot C, Mathé D, Linard C, Violot D, Milliat F, François A, et al. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2004;287(4):G875-G885.*
56. Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, et al. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF- $\kappa$ B. *Gastroenterology. 2003;125(6):1750-61.*
57. Johnson LA, Luke A, Sauder K, Moons DS, Horowitz JC, Higgins PD. Intestinal fibrosis is reduced by early elimination of inflammation in a mouse model of IBD: impact of a "Top-Down" approach to intestinal fibrosis in mice. *Inflamm Bowel Dis. 2011;18(3):460-71.*
58. Tao Q, Wang B, Zheng Y, Li G, Ren J. Triptolide ameliorates colonic fibrosis in an experimental rat model. *Mol Med Rep. 2015;12(2):1891-7.*
59. Tao Q, Wang B, Zheng Y, Jiang X, Pan Z, Ren J, et al. Vitamin D prevents the intestinal fibrosis via induction of vitamin D receptor and inhibition of transforming growth factor-beta1/Smad3 pathway. *2015;60(4):868-75.*



60. Van Welden S, Selfridge AC, Hindryckx P. Intestinal hypoxia and hypoxia-induced signalling as therapeutic targets for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017;14:596.
61. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008;30(4):393-402.
62. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. 2004;114(8):1098-106.
63. Glover LE, Bowers BE, Saeedi B, Ehrentraut SF, Campbell EL, Bayless AJ, et al. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. *Gastroenterology*. 2013;110(49):19820-5.
64. Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, et al. The hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine is protective in a murine model of colitis. *Gastroenterology*. 2008;134(1):156-65.
65. Hindryckx P, De Vos M, Jacques P, Ferdinande L, Peeters H, Olievier K, et al. Hydroxylase inhibition abrogates TNF- $\alpha$ -induced intestinal epithelial damage by hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of FADD. *Cell*. 2010;185(10):6306-16.
66. Manresa MC, Tambuwala MM, Radhakrishnan P, Harnoss JM, Brown E, Cavadas MA, et al. Hydroxylase inhibition regulates inflammation-induced intestinal fibrosis through the suppression of ERK-mediated TGF- $\beta$ 1 signaling. [corrected]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016;311(6):G1076-g90.
67. Aragonés J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, et al. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Cell*. 2008;40(2):170.
68. Van Welden S, De Vos M, Wielockx B, Tavernier SJ, Dullaers M, Neyt S, et al. Haematopoietic prolyl hydroxylase-1 deficiency promotes M2 macrophage polarization and is both necessary and sufficient to protect against experimental colitis. *J Pathol*. 2017;241(4):547-58.
69. Mazzone M, Dettori D, de Oliveira RL, Loges S, Schmidt T, Jonckx B, et al. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell*. 2009;136(5):839-51.
70. Tambuwala MM, Cummins EP, Lenihan CR, Kiss J, Stauch M, Scholz CC, et al. Loss of prolyl hydroxylase-1 protects against colitis through reduced epithelial cell apoptosis and increased barrier function. *Cell*. 2010;139(6):2093-101.
71. Van Welden S, Laukens D, Ferdinande L, De Vos M, Hindryckx P. Differential expression of prolyl hydroxylase 1 in patients with ulcerative colitis versus patients with Crohn's disease/infectious colitis and healthy controls. *Gastroenterology*. 2013;10(1):36.
72. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*. 2000;26(2):99-109.
73. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(22):4324-7.
74. Zheng B, Zhang Z, Black CM, de Crombrughe B, Denton CP. Ligand-dependent genetic recombination in fibroblasts : a potentially powerful technique for investigating gene function in fibrosis. *Am J Pathol*. 2002;160(5):1609-17.
75. Kohan DE. Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Nat Rev Physiol*. 2008;74(4):427-37.
76. Rieder F, Kessler S, Sans M, Fiocchi C. Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(7):G786-801.
77. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature protocols*. 2017;12(7):1295.
78. Gerling M, Büller NV, Kirn LM, Joost S, Frings O, Englert B, et al. Stromal Hedgehog signalling is downregulated in colon cancer and its restoration restrains tumour growth. *Nat Commun*. 2016;7:12321.
79. Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, et al. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun*. 2015;6:8369.
80. Rotheneichner P, Romanelli P, Bieler L, Pagitsch S, Zaunmair P, Kreutzer C, et al. Tamoxifen Activation of Cre-Recombinase Has No Persisting Effects on Adult Neurogenesis or Learning and Anxiety. *Front Neurosci*. 2017;11:27.

81. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *2002*;3(7):research0034. 1.
82. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, et al. The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview. *Comparative clinical pathology*. 2010;19(3):235-9.
83. Suzuki K, Sun X, Nagata M, Kawase T, Yamaguchi H, Sukumaran V, et al. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathology international*. 2011;61(4):228-38.
84. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;288(6):G1328-G38.
85. Scheibe K, Kersten C, Schmied A, Vieth M, Primbs T, Carlé B, et al. Inhibiting interleukin 36 receptor signaling reduces fibrosis in mice with chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2019;156(4):1082-97. e11.
86. Rieder F, Zimmermann EM, Remzi FH, Sandborn WJ. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut*. 2013;62(7):1072-84.
87. Hou J, Shi J, Chen L, Lv Z, Chen X, Cao H, et al. M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis. *Cell Communication and Signaling*. 2018;16(1):89.
88. Zhang L, Wang Y, Wu G, Xiong W, Gu W, Wang CY. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? *Respir Res*. 2018;19(1):170.
89. Braga TT, Agudelo JS, Camara NO. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front Immunol*. 2015;6:602.
90. Valny M, Honsa P, Kirdajova D, Kamenik Z, Anderova M. Tamoxifen in the mouse brain: implications for fate-mapping studies using the tamoxifen-inducible Cre-loxP system. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:243.
91. Koliaraki V, Kollias G. Isolation of intestinal mesenchymal cells from adult mice. *Bio Protoc*. 2016;6:e1940.
92. Sung J, Yang H-M, Park J, Choi G-S, Joh J-W, Kwon C, et al., editors. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplantation proceedings*; 2008: Elsevier.
93. Holmes N. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*. 2006;117(2):145-55.
94. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, et al. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest*. 2009;119(7):1763-71.
95. Fragiadaki M, Ikeda T, Witherden A, Mason RM, Abraham D, Bou-Gharios G. High doses of TGF- $\beta$  potentially suppress type I collagen via the transcription factor CUX1. *Molecular biology of the cell*. 2011;22(11):1836-44.
96. Goffin L, Seguin-Estévez Q, Alvarez M, Reith W, Chizzolini C. Transcriptional regulation of matrix metalloproteinase-1 and collagen 1A2 explains the anti-fibrotic effect exerted by proteasome inhibition in human dermal fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(2):R73.
97. Goldberg MT, Han Y-P, Yan C, Shaw MC, Garner WL. TNF- $\alpha$  suppresses  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(11):2645-55.
98. Liu J, Wang Y, Pan Q, Su Y, Zhang Z, Han J, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF- $\beta$ 1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *Journal of dermatological science*. 2012;65(1):38-49.
99. Wong M, Mudera V. Feedback inhibition of high TGF- $\beta$ 1 concentrations on myofibroblast induction and contraction by Dupuytren's fibroblasts. *Journal of Hand Surgery*. 2006;31(5):473-83.
100. Juneja S, Chen T, Farhat Y, Veillette C. In Vitro Effect of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) on Gene Expression in Human Flexor Digitorum Profundus Tendon Cells. *Orthop Muscular Syst*. 2016;5(218):2161-0533.1000218.
101. Roy SG, Nozaki Y, Phan SH. Regulation of  $\alpha$ -smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001;33(7):723-34.
102. Agis H, Watzek G, Gruber R. Prolyl hydroxylase inhibitors increase the production of vascular endothelial growth factor by periodontal fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 2012;47(2):165-73.
103. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clinical & Experimental Immunology*. 2006;146(2):362-70.

104. Preisser F, Giehl K, Rehm M, Goppelt-Struebe M. Inhibitors of oxygen sensing prolyl hydroxylases regulate nuclear localization of the transcription factors Smad2 and YAP/TAZ involved in CTGF synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863(8):2027-36.
105. Samarin J, Wessel J, Cicha I, Kroening S, Warnecke C, Goppelt-Struebe M. FoxO proteins mediate hypoxic induction of connective tissue growth factor in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(7):4328-36.
106. Cicha I, Goppelt-Struebe M. Connective tissue growth factor: Context-dependent functions and mechanisms of regulation. *Biofactors*. 2009;35(2):200-8.
107. Kroening S, Neubauer E, Wessel J, Wiesener M, Goppelt-Struebe M. Hypoxia interferes with connective tissue growth factor (CTGF) gene expression in human proximal tubular cell lines. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009;24(11):3319-25.
108. Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H. Matrix metalloproteinases-2 and-9 are secreted from human fibroblasts. *Acta dermato-venereologica*. 2003;83(2).
109. Saed GM, Zhang W, Diamond MP. Effect of hypoxia on stimulatory effect of TGF-beta 1 on MMP-2 and MMP-9 activities in mouse fibroblasts. *J Soc Gynecol Investig*. 2000;7(6):348-54.
110. Jeon SH, Chae BC, Kim HA, Seo GY, Seo DW, Chun GT, et al. Mechanisms underlying TGF-beta1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2007;81(2):557-66.
111. Andrianifahanana M, Hernandez DM, Yin X, Kang J-H, Jung M-Y, Wang Y, et al. Profibrotic up-regulation of glucose transporter 1 by TGF-beta involves activation of MEK and mammalian target of rapamycin complex 2 pathways. *The FASEB Journal*. 2016;30(11):3733-44.
112. Eickelberg O, Pansky A, Mussmann R, Bihl M, Tamm M, Hildebrand P, et al. Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(18):12933-8.
113. Shang L, Kang W, Li S, Ge S. Prolyl hydroxylase inhibitor DMOG suppressed inflammatory cytokine production in human gingival fibroblasts stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical oral investigations*. 2019;23(7):3123-32.
114. Ambler DR, Fletcher NM, Diamond MP, Saed GM. Effects of hypoxia on the expression of inflammatory markers IL-6 and TNF-a in human normal peritoneal and adhesion fibroblasts. *Systems biology in reproductive medicine*. 2012;58(6):324-9.

**DE ROL VAN PROLYL-HYDROXYLASE**  
**1 IN DE ONTWIKKELING VAN**  
**INTESTINALE FIBROSE.**

**ADDENDUM**



## I. Buffers en oplossingen (in alfabetische volgorde)

**Bouin's oplossing** (Masson's Trichroom Kleuring) voor 200 ml:

- 142 ml 1,3% Picrinezuur (Sigma-Aldrich, P6744)
- 48 ml 37% Formaldehyde (Sigma-Aldrich, 252549)
- 10 ml 100% Azijnzuur (UCB-RPL, Leuven, 90050034)

**Extractiebuffer** (genotypering): 25 mM NaOH (Sigma-Aldrich, 655104 en 0,2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, ED2SS) in nuclease-vrij water (QIAGEN GmbH, Hilden – Duitsland, 129117)

**FACS-buffer** (flowcytometrie): 2 mM EDTA en 0,5% BSA (Sigma-Aldrich, A9647) in DPBS-/-

**Fixatie/Permeabilisatiebuffer** (flowcytometrie) samenstelling van:

- 75% Invitrogen™ eBioscience™ Fixation/Permeabilization Diluent (ThermoFisher Scientific, Waltham – VS, 00-5223-56)
- 25% Invitrogen™ eBioscience™ Fixation/Permeabilization Concentrate (ThermoFisher Scientific, Waltham – VS, 00-5123-43)

**Ladingsbuffer** (genotypering) voor 2 ml:

- 1 ml glycerol (Sigma-Aldrich, G5516)
- 200 µl 10% Natrium dodecyl sulfaat (SDS) (Sigma-Aldrich, L3771)
- 800 µl gedeïoniseerd H<sub>2</sub>O
- Drie druppels broomfenolblauw (Sigma-Aldrich, 510998)

**Lysisbuffer** (celkweek): 10 µl β-mercaptoëthanol (Sigma-Aldrich, M6250) per ml Lysisbuffer RLT (Qiagen GmbH, 1015750)

**Muis intestinale fibroblasten (MIF) medium** (celkweek):

- 1x Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (ThermoFisher Scientific, 15240062)
- 1x Gibco™ Heat-inactivated Foetal Bovine Serum (HI-FBS) (ThermoFisher Scientific, 16140-071)
- In Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ThermoFisher Scientific, 31966-021)

**Permeabilisatiebuffer (1x)** (flowcytometrie): Invitrogen™ eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X) (ThermoFisher Scientific, 00-8333-56) tienmaal verdunnen (met gedeïoniseerd water)

**Phosphotungstic/Phosphomolybdic oplossing** (Masson's Trichroom Kleuring) voor 20 ml:

- 5ml Phosphotungstic oplossing (Sigma-Aldrich, HT152)
- 5ml Phosphomolybdic oplossing (Sigma-Aldrich HT153)
- 10 ml gedeïoniseerd water

**TAE-buffer (1x)** (genotypering) op 1 liter:

- 4,84 g UltraPure™ Tris Invitrogen™ (ThermoFisher Scientific, 15504-020)
- 1,142 ml 100% Azijnzuur (UCB-RPL, Leuven, 90050034)
- 2 ml 0,5M EDTA, pH:8
- Aanvullen met gedeïoniseerd water

## II. PCR- en RT-qPCR-primers

### a. PCR-primers

Tabel 1: Primers gebruikt tijdens de genotypering, hun nucleotidensequentie, functie en de grootte van het geamplificeerde DNA-segment.

Naam	Primers (5'-3')	Functie	Grootte (bp)
mPhd1cko (forward)	GAGGCTCCTTGAGTCTGGAGCCTC	Amplificatie gefloxt <i>Phd1</i> allel en/of <i>Phd1</i> wt allel	290: wt allel 340: gefloxt allel
mPhd1cko (reverse)	ATTTAGTTCAGTTCTCAGCA		
Cre 850 (forward)	CGCCGTAAATCAATCGATGAGTTGCTTC	Amplificatie <i>Cre</i> gen	500
Cre 403 (reverse)	GATGCCGGTGAACGTGCAAAACAGGCTC		
Endo 1 (forward)	CAAACCTGCTACCCGAAGGT	Interne controle bij de <i>Cre</i> -PCR	800
Endo 2 (reverse)	CAGTATGCGGAAGTTCTAGG		
mPhd1-3	GAAGGAGGACAAAGGTCTCTTGG	Amplificatie <i>Phd1</i> wild type allel	350
mPhd1-4	GGGCCACAGTCAGCTAAAG		
mPhd1 (forward)	AGAGGCCACTTGTGTAGCGC	Amplificatie <i>Phd1</i> kiemlijn knock-out allel	380
mPhd1 (reverse)	CCTATATTCACGGGACAGATCCTG		

mPhd1cko, murien Prolyl-hydroxylase 1 conditionele gen knock-out; wt, wild type; bp, basenparen

## b. RT-qPCR-primers

Tabel 2: Genen van interesse bij de RT-qPCR, de respectievelijke PCR-primers en hun efficiëntie.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	PCR Efficiëntie (%)
<i>Acta-2</i>	CCAGCACCATGAAGATCAAG	TGGAAGGTAGACAGCGAAGC	90,3
<i>Col1<math>\alpha</math>1</i>	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG	106
<i>Col1<math>\alpha</math>2</i>	GGTGAGCCTGGTCAAACGG	ACTGTGTCCTTTCACGCCTTT	92,2
<i>Ctgf</i>	GGACACCTAAATCGCCAAGC	ACTTAGCCCTGTATGTCTTCACA	93
<i>Gapdh</i>	CATGGCCTCCGTGTTCTTA	GCGGCACGTCAGATCCA	87
<i>Glut-1</i>	GCT TAT GGG CTT CTC CAA ACT	GT GAC ACC TCT CCC ACA TAC	95
<i>Hmbs</i>	AAGGGCTTTTCTGAGGCACC	AGTTGCCCATCTTTCATCACTG	95
<i>Hprt</i>	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA	AGGGCATATCCAACAACAAACTT	96
<i>Il-6</i>	GCTGGTGACAACCACGGCCT	AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT	92
<i>Mmp 9</i>	GGACCCGAAGCGGACATTG	CGTCGTCGAAATGGGCATCT	115
<i>Phd1cko</i>	AATGGGCGCACCAAGGTACG (Transitiesite tussen exons 2 & 5)	GTGATACTGGTACTTAACACC Site op exon 5	Onbekend
<i>Phd1wt</i>	TCACGTGGACGCAGTAATCC (Site op exon 2)	TAATAGATACAGGTGATGCAGC (Site op exon 3)	Onbekend
<i>Phd2</i>	AACGTAAAGGACGGGCGGGC	AGGTCGGTCAAGCGCGAGA	107
<i>Phd3</i>	CAGACCGCAGGAATCCACAT	TTCAGCATCGAAGTACCAGACAGT	101
<i>Sdha</i>	CTTGAATGAGGCTGACTGTG	ATCACATAAGCTGGTCCTGT	103
<i>Vegf</i>	ACTCGGATGCCGACACGGGA	CCTGGCCTTGCTGCTCCCC	98

RT-qPC, Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction; *Acta-2*, actine alfa2; *Col1 $\alpha$ 2* collageen type1 alfa 2; *Ctgf*, connective tissue growth factor; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase; *Glut-1*, Glucose transporter 1; *Hmbs*, hydroxymethylbilane synthase; *Hprt*, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; *Il-6*, interleukine 6; *Mmp*, matrixmetalloprotease; *Phd*, prolyl-hydroxylase met wt, wild type allel en cko, conditional knock-out allel; *Sdha*, succinaat dehydrogenase complex subunit A; *Vegf*, vascular endothelial growth factor.

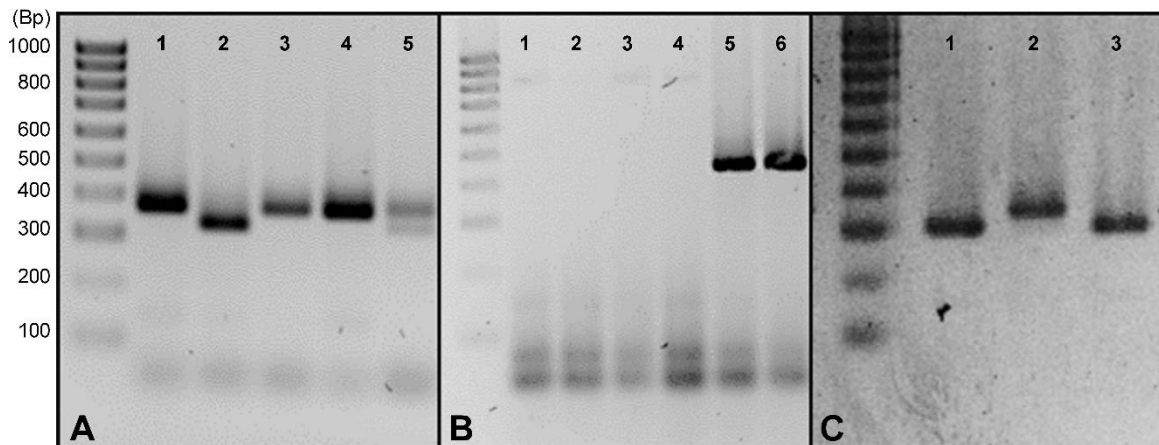


### III. Supplementaire resultaten

#### a. Genotypering

Ter illustratie van de verschillende genotyperingen die tijdens dit onderzoek werden uitgevoerd, zijn in figuur 1 (addendum III) enkele voorbeelden weergegeven. Figuur 1A toont het resultaat van een *Phd1* cko genotypering bij vijf muizen. In laan 1, 3 en 4 is enkel ter hoogte van 340 bp een dense band aanwezig, wijzend op homozygoot gefloxe *Phd1* allelen. Laan 2 geeft, met een solitaire densiteit t.h.v. 290 bp, homozygotie aan voor de wildtype variant. Een combinatie van beide patronen, zoals terug te vinden in laan 5, duidt op een heterozygoot genotype.

Het resultaat van een *Cre*-genotypering bij zes muizen is afgebeeld op figuur 1B. Hierbij wijst een amplificatieproduct van 500 bp, zoals waar te nemen in laan 5 en 6, op de aanwezigheid van het *Cre*-gen. Laan 1 t.e.m. 4 bevat bijgevolg DNA afkomstig van *Cre*<sup>-/-</sup> muizen. De interne controle, normaal aanwezig t.h.v. 800 bp, kon in dit onderzoek niet gevisualiseerd worden. Ten slotte is figuur 1C een voorbeeld van een volledige *Phd1* knock-out/wildtype genotypering. Laan 1 en 3 tonen er een dense band t.h.v. 350 basenparen, indicatief voor wildtype muizen. Het solitaire amplificatieproduct van 380 bp in laan 2 wijst op een homozygote knock-out van *Phd1*. Heterzygotie van de *Phd1*-knock-out, *i.e.* een band bij 350 en 380 bp, is op deze figuur niet weergegeven.



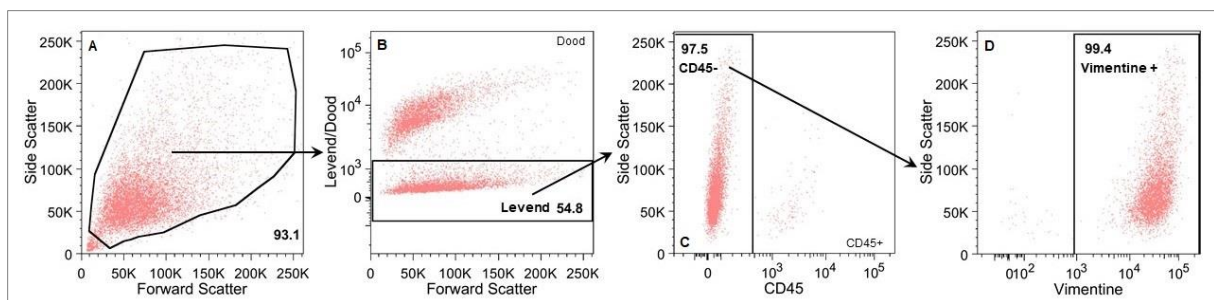
Figuur 1: Illustratie van de (A) *Phd1* conditionele knock-out (cko), (B) *Cre*- en (C) volledige *Phd1* knock-out/wildtype (ko/wt) genotypering. A: Solitaire densiteiten t.h.v. 290 (laan 2) en 340 (laan 1, 3 en 4) basenparen (bp) stellen respectievelijk de aanwezigheid van homozygote cko en wt allelen voor. Laan 5 geeft een heterozygoot genotype aan. B: Het *Cre*-gen is aanwezig bij een amplificatieproduct van 500 bp (laan 5 en 6). C: Een solitair amplificatieproduct van 350 bp (laan 1 en 3) wijst op een homozygoot wildtype, één van 380 bp op een homozygote ko.

## b. De isolatieprocedure is selectief voor fibroblasten

In de eerste plaats werd gecontroleerd of de isolatieprocedure, zoals beschreven in 4.2.1, specifiek is voor fibroblasten. Via flowcytometrie werd de proportie fibroblasten in de geïsoleerde celpopulaties van vijf muizen nagegaan. Van elke muis werden 400'000 geïsoleerde cellen gekleurd, waarvan er telkens 10'000 door het toestel gesampled werden voor analyse. Een eerste selectie gebeurde op basis van de grootte (Forward Scatter, FSC) en granulariteit van de cellen (Side Scatter, SSC), deze gating is voor één muis geïllustreerd op figuur 2A (addendum III). Debris wordt typisch gekenmerkt door lage FSC en SSC-niveaus, events in de linkeronderhoek van de FSC vs. SSC dichtheidsplot werden bijgevolg als dusdanig aanzien en geëxcludeerd. Op deze manier kon gemiddeld 90,6% (1,11%) van de gesampelde cellen gebruikt worden voor verdere analyse.

Een levend/doodkleuring identificeerde de proportie levende cellen in bovenstaande selectie (figuur 2B), gemiddeld 38,7% in dit opzet (4,70%). Daaropvolgend werd de aanwezigheid van CD45 nagegaan in de levende celpopulatie. De proportie van cellen zonder CD45, een membraanmarker van genucleëerde hematopoëtische cellen en voornamelijk leukocyten (93), was er gemiddeld 97,7% (0,394%). Zoals aangegeven voor één muis op figuur 2C, was het aandeel levende, CD45-positieve cellen in de cultuur dus erg klein.

Ten slotte werd het aandeel fibroblasten binnen deze CD45-negatieve populatie bepaald middels de aanwezigheid van vimentine, een cytoskeletaal proteïne in myo- en fibroblasten, niet-expressief in andere mesenchymale cellen (8). Deze laatste gating is voorgesteld op figuur 2D. Gemiddeld 99,0% van de levende, CD45-negatieve cellen was vimentine positief. Bijgevolg is de isolatieprocedure selectief voor fibroblasten en gebeurden alle *in-vitro* experimenten met dit celtype.



Figuur 2: De isolatieprocedure is selectief voor fibroblasten. A: Forward Scatter (FSC) vs. Side scatter (SSC) dichtheidsplot van 10'000 gesampelde cellen van één muis. Op basis van de grootte (FSC) en granulariteit van de cellen (SSC) werd een subpopulatie omschreven, waarbij debris, gekenmerkt door lage FSC en SSC niveaus, werd geëxcludeerd. Bij deze muis bevatte de subpopulatie 93,1% van alle gesampelde cellen. B: D.m.v. een levend/dood kleuring werd de nader omschreven populatie uit A verdeeld in dode en levende, hier 54,8%, cellen. C: Aanwezigheid van CD45 werd nagegaan op het membraan van de levende cellen uit B. Bij deze muis was 97,5% ervan CD45-negatief. D: Van de selectie CD45-negatieve cellen uit C werd tot slot de proportie Vimentine positieve cellen bepaald, 99,4% bij deze muis.

### c. TGF-dosisoptimalisatie voor fibroblastactivatie

TGF- $\beta$ 1 is een sterk profibrotische groeifactor, die leidt tot transdifferentiatie van fibroblasten naar geactiveerde myofibroblasten, een proces dat gepaard gaat met verhoogde expressie en secretie van profibrotische groeifactoren en cytokines. In deze proef werd de optimale TGF-concentratie bepaald, die in fibroblasten leidt tot een geactiveerd fenotype met significante opregulatie van onderstaande profibrotische genen.

Na 48 uur stimulatie met TGF verschilde de expressie van zowel *Ctgf* [ $p < 0,001$ ] als van *Il-6* [ $p = 0,002$ ] significant tussen verschillende concentraties. *Ctgf* expressie kende, zoals verwacht, een dosis-respons patroon, waarbij de expressie steeds toenam bij stijgende concentraties (figuur 6A, addendum IV). Vanaf 5 ng/ml TGF was de expressie gemiddeld 0,61 fold hoger dan in de ongestimuleerde conditie [ $p = 0,001$ ]. Bij stimulatie met 10, 20 en 40 ng/ml was dit verschil respectievelijk 0,86 fold, 0,88 en 1,05 fold hoger [ $p < 0,001$ ]. Ten slotte was er ook een significant verschil tussen stimulatie met 5 en 40 ng/ml. Bij deze laatste conditie was de expressie gemiddeld 0,43 fold hoger dan wanneer gestimuleerd werd met 5 ng/ml [ $p = 0,009$ ].

Hoewel zelfs bij lagere concentraties TGF al een duidelijke trend aanwezig was, werd de toename van de *Il-6* expressie pas significant bij stimulatie met 20 ng/ml. Ze was er gemiddeld 1,56 fold hoger dan in de ongestimuleerde conditie [ $p = 0,022$ ]. Naarmate de concentratie TGF verder toenam, nam ook de *Il-6* expressie verder toe. Figuur 6B (addendum IV) geeft de *Il-6* expressie grafisch weer. Bij 40 ng/ml was het verschil in expressie met de ongestimuleerde cellen gemiddeld 2,26 fold [ $p = 0,002$ ]. Opnieuw was er ook een significant verschil tussen de 5 en 40 ng/ml condities, expressie was er in deze laatste gemiddeld 1,38 fold hoger [ $p = 0,049$ ].

Noch in de expressie van *Acta-2* [ $p = 0,069$ ], noch in die van *Col1 $\alpha$ 1* [ $p = 0,768$ ] konden significante verschillen aangetoond worden (figuur C en D (addendum IV), respectievelijk). Er waren echter wel onverwachte trends aanwezig, zo was er een daling in de expressie van *Col1 $\alpha$ 1* vanaf 10 ng/ml TGF. Bij *Acta-2* kende de expressie een daling bij 5 ng/ml, deze normaliseerde echter naar de controlewaarden naarmate de concentratie TGF toenam.

Steunend op de significante opregulatie van *Il-6* en *Ctgf* vanaf 20 ng/ml TGF, werd deze concentratie in verdere proeven gebruikt (zie 5.2.3).

#### *d. Stimulatie met 50 $\mu$ M DMOG is veilig en effectief in het verwerven van panhydroxylase inhibitie in fibroblasten*

Net als bij TGF- $\beta$ 1, werd ook de DMOG-stimulatie geoptimaliseerd. Het meest geschikt was de concentratie die, in afwezigheid van cytotoxische effecten, leidde tot een opregulatie van HIF-gereguleerde targetgenen (*i.e.* maat voor het succes van de panhydroxylase inhibitie).

Uit preliminaire data bleek dat DMOG aan 1 mM toxisch was voor de fibroblasten. Om te weten in welke grootteorde de toxische grens van DMOG zich bevindt, werd in de eerste plaats celproliferatie en cytotoxiciteit nagegaan na incubatie met 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M en 1  $\mu$ M DMOG. Daarnaast werden ook een negatieve controle, met enkel serum-vrij DMEM, en een positieve controle, met Triton X-100, geïncubeerd. Deze laatste conditie werd beschouwd als positieve controle omdat Triton X-100 leidt tot permeabilisatie van celmembranen en dus cytotoxisch werkt. Resultaten zijn weergegeven op figuur 7FiguurA, addendum IV.

Zowel celproliferatie [ $p < 0,001$ ] als cytotoxiciteit [ $p = 0,001$ ] verschilden significant tussen de condities. Wat betreft de cytotoxiciteit, werden paarsgewijze *post-hoc* uitgevoerd met de Tamhane's T2 omwille van de inhomogeniteit van varianties. De LDH-absorbantie, een maat voor de cytotoxiciteit, was 0,287 eenheden hoger in de positieve controle dan in de 10  $\mu$ M DMOG conditie [ $p = 0,032$ ]. Verschillen tussen de andere condities waren insignificant, toch was een duidelijke trend aanwezig. De absorbantie was maximaal bij stimulatie met 1 mM DMOG, zelfs hoger dan in de positieve controle, en daalde dosisafhankelijk.

MTT-absorbantie, een maat voor de celproliferatie, was in de negatieve controle gemiddeld 0,094 [ $p < 0,001$ ], 0,072 [ $p < 0,001$ ] en 0,037 [ $p = 0,001$ ] eenheden hoger dan in de conditie waar gestimuleerd werd met respectievelijk 2% triton, 1mM DMOG en 100 $\mu$ M DMOG. Triton was sterk significant verschillend van elke conditie [ $p < 0,001$ ], behalve van de conditie met 1mM DMOG. De absorbantie in deze laatstgenoemde was slechts 0,022 eenheden hoger dan in de triton conditie [ $p = 0,055$ ]. Celproliferatie was dus in alle condities op 1mM DMOG na significant hoger dan de positieve controle. Proliferatie onder 1mM DMOG was bovendien ook significant lager dan die onder 100 $\mu$ M [ $p = 0,001$ ], 10 en 1 $\mu$ M DMOG [ $p < 0,001$ ]. De respectievelijke absorbantie was er gemiddeld 0,035; 0,055 en 0,062 keer hoger. Ten slotte was ook de absorbantie bij de 1 $\mu$ M conditie gemiddeld 0,026 keer hoger dan wanneer de cellen met 100 $\mu$ M gestimuleerd werden [ $p = 0,014$ ].

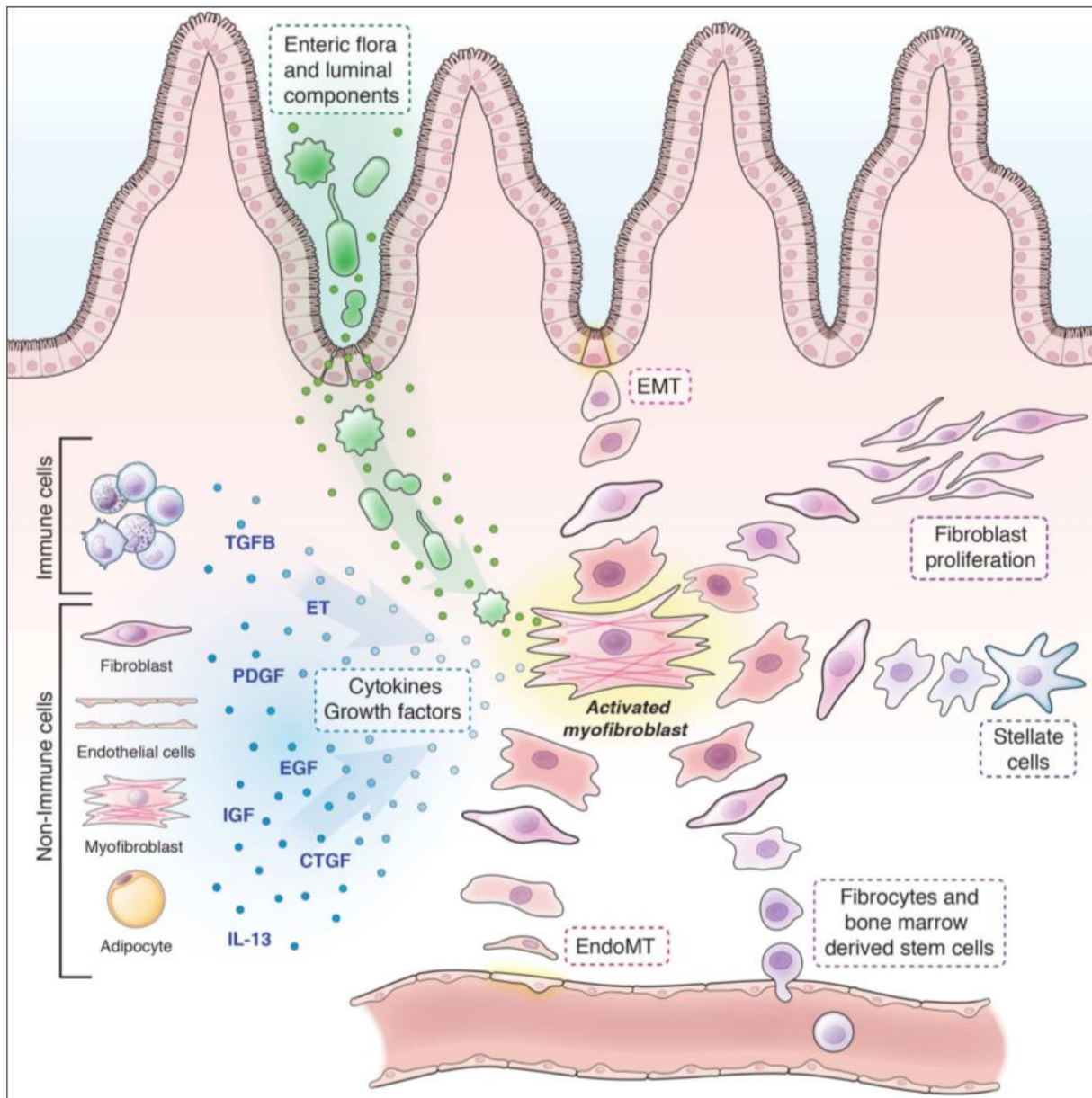
Uit bovenstaande experimenten kwam 10 $\mu$ M DMOG naar voor als de hoogst mogelijke concentratie die op beide vlakken significant verschildte van de positieve controle. Bijgevolg werden wildtype MIF gestimuleerd met 10  $\mu$ M DMOG om ook de effectiviteit van deze concentratie te evalueren. 10  $\mu$ M DMOG bleek echter te laag om een significante opregulatie van HIF-gereguleerde targetgenen te bewerkstelligen. Vandaar dat een nieuw

toxiciteitsexperiment uitgevoerd werd met 25 en 50  $\mu\text{M}$  DMOG als stimulatieconcentraties (figuur 7B, addendum IV).

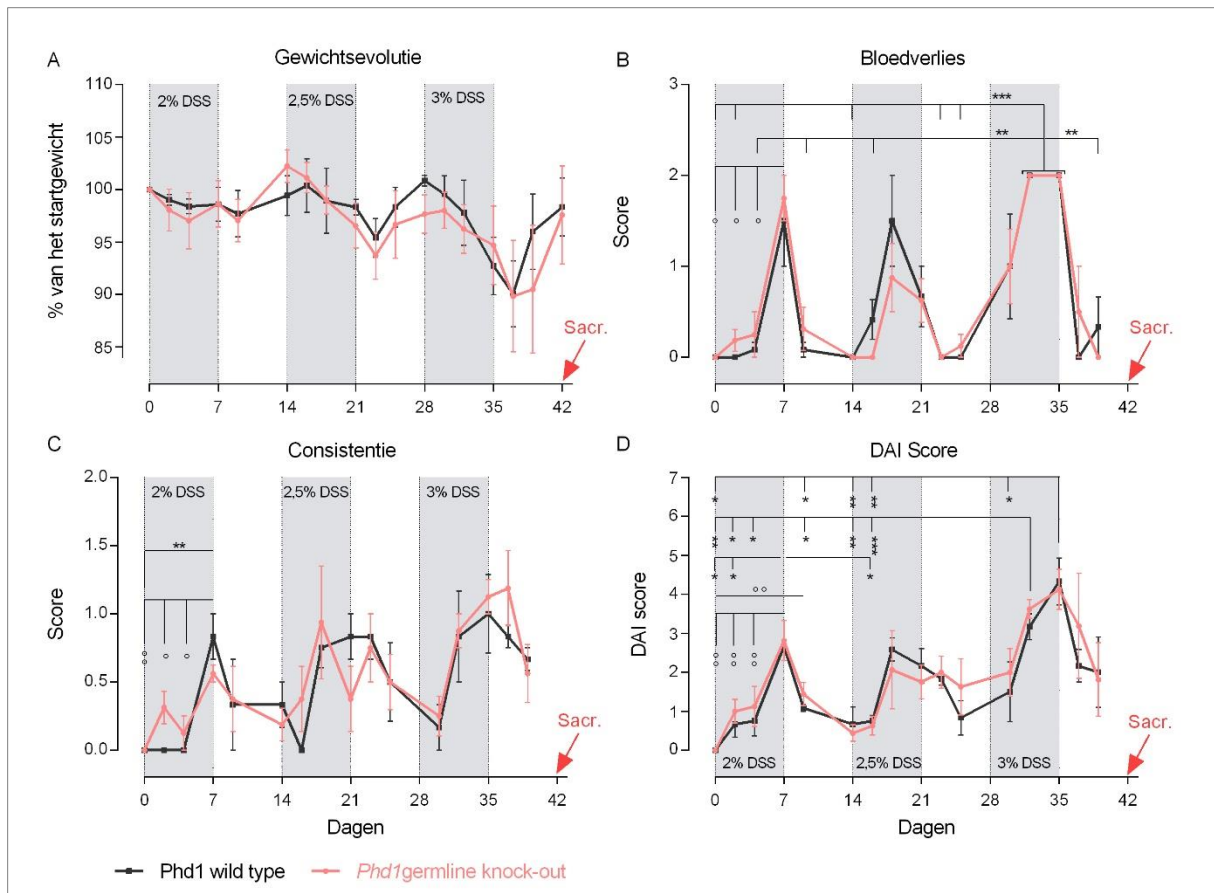
*Omnibus*-testen gaven opnieuw duidelijk significante verschillen aan in gemiddelde absorbanties tussen de verschillende condities, zowel voor de LDH-assay [ $p < 0,001$ ] als voor de MTT-assay [ $p < 0,001$ ]. Er was geen significant verschil in celtoxiciteit tussen de controle, de 25  $\mu\text{M}$  en 50  $\mu\text{M}$  DMOG conditie. De LDH-absorbantie was bij de positieve controle met triton wel gemiddeld 0,31; 0,42 en 0,38 eenheden hoger dan in respectievelijk de ongestimuleerde [ $p = 0,006$ ], de 25  $\mu\text{M}$  [ $p = 0,001$ ] en de 50  $\mu\text{M}$  DMOG conditie [ $p = 0,001$ ]. Analoge resultaten waren terug te vinden bij de MTT-assay. Celproliferatie was niet significant verschillend tussen de controle en de DMOG-condities. Proliferatie onder triton was wel significant lager dan in de ander condities, de MTT-absorbantie was er gemiddeld 0,27 en 0,25 eenheden lager dan in respectievelijk de controle en DMOG-condities [ $p < 0,001$ ]. Aangezien er geen verschil was in toxiciteit en proliferatie tussen de DMOG-condities, werd HIF-gereguleerde genexpressie nagegaan bij stimulatie met 50  $\mu\text{M}$ .

De qPCR-data, afgebeeld op figuur 7C (addendum IV), toonden aan dat 50  $\mu\text{M}$  DMOG voldoende was om een significante opregulatie te verkrijgen van *Phd3* en *Glut-1*. Ten opzichte van de ongestimuleerde controle was de gemiddelde expressie van deze genen respectievelijk 1,24 [ $p < 0,001$ ] en 0,45 fold [ $p = 0,009$ ] hoger. Hoewel de gemiddelde expressie wel gestegen was onder stimulatie met 50  $\mu\text{M}$  DMOG, kon voor zowel *Phd2* [ $p = 0,115$ ] als *Vegf* [ $p = 0,058$ ] geen significante opregulatie aangetoond worden. Op basis van de afwezigheid van toxiciteit en significante opregulatie van *Phd3* en *Glut-1* is 50  $\mu\text{M}$  DMOG de optimale concentratie voor het verwerven van panhydroxylase activiteit in fibroblasten.

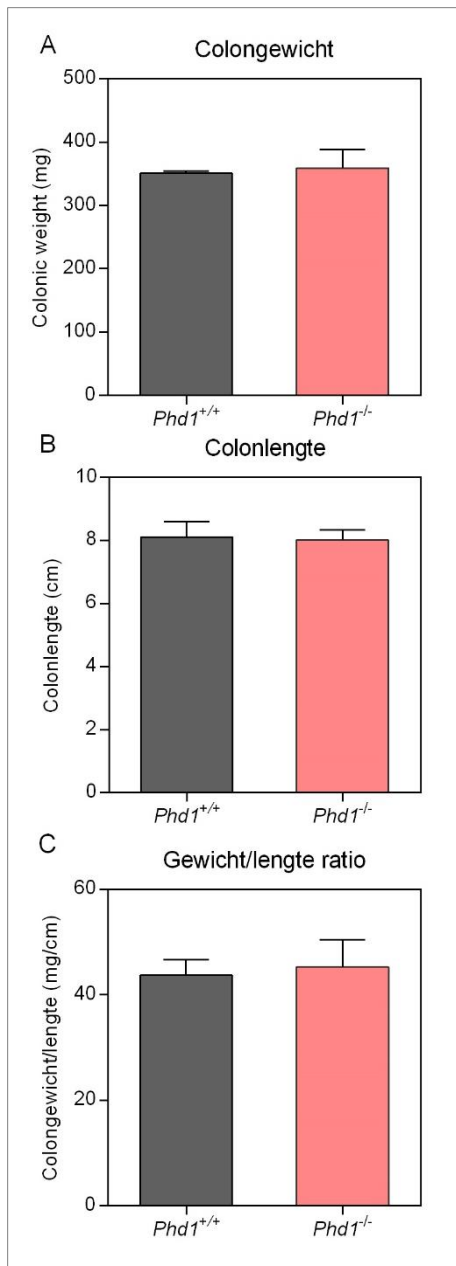
## IV. Supplementaire figuren



Figuur 1: De ECM-producerende myofibroblasten vinden hun oorsprong in verschillende celtypes. Naast proliferatie en activatie van lokale precursoren zoals fibroblasten en gladde spiercellen, dragen ook epitheel- en endotheelcellen bij tot deze pool. Ze doen dit respectievelijk via epitheliale-mesenchymale (EMT) en endotheliale-mesenchymale transitie (EndoMT). Ook intestinale stellaatcellen, circulerende fibrocyten en mesenchymale stamcellen uit het beenmerg kunnen differentiëren tot myofibroblasten. Transdifferentiatie, activatie en rekrutering gebeurt door middel van cytokines en groeifactoren vrijgesteld door immuuncellen, fibroblasten, endotheelcellen, myofibroblasten en adipocyten. De belangrijkste van deze cytokines en groeifactoren zijn Transforming growth factor beta ( $TGF-\beta$ ), endothelinen (ET), platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), connective-tissue growth factor (CTGF) en Interleukine 13 (IL-13). Ten slotte speelt ook bacteriële translocatie een rol in het activeren van cellen tot een geactiveerd, fibrogeen fenotype via bacteriële sensing receptoren (40).

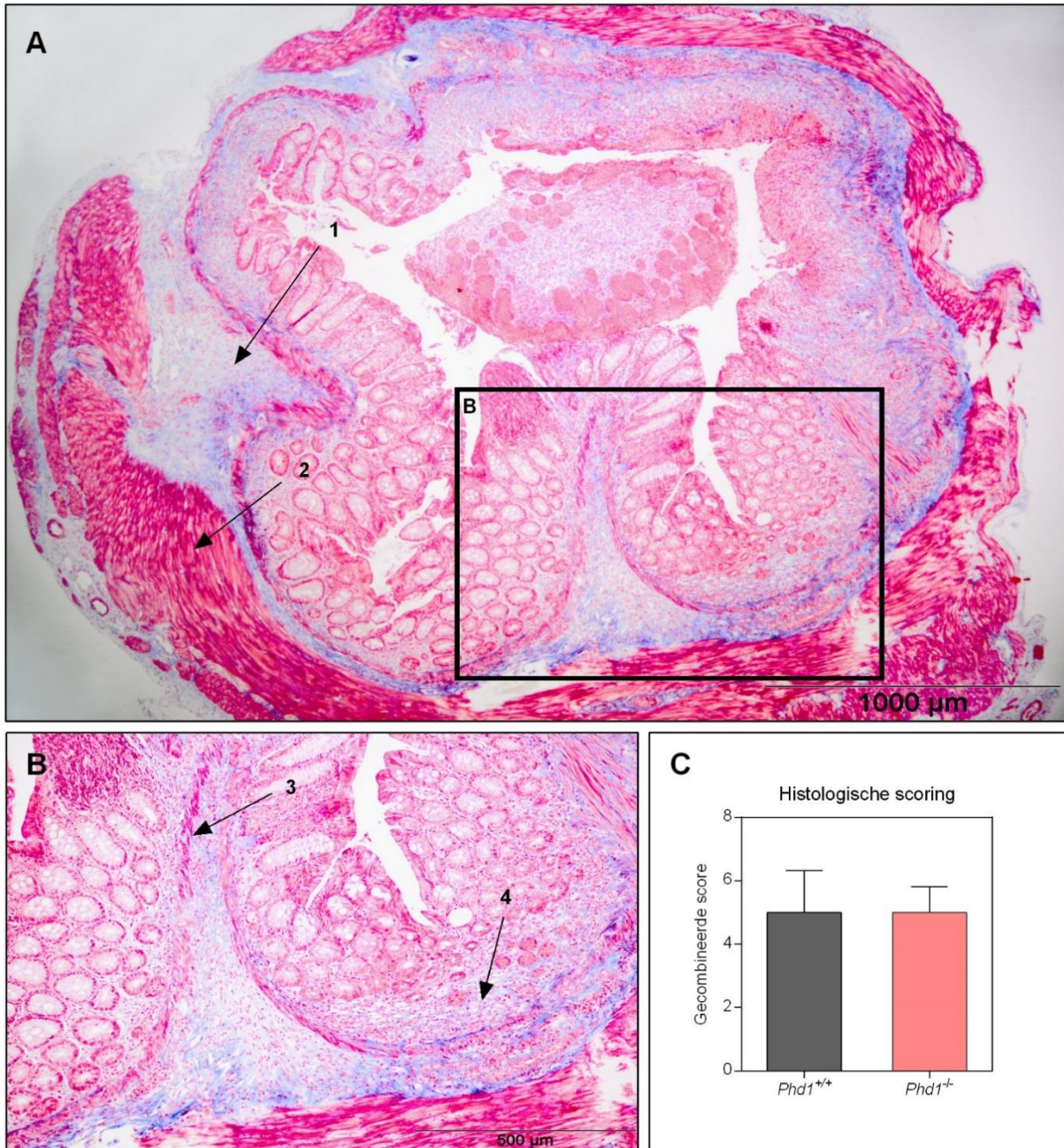


**Figuur 2: Phd1 knock-out beschermt niet tegen intestinale inflammatie tijdens acute of chronische DSS-colitis.** A) Gewichtsevolutie als percentage van het startgewicht, B) Bloedverliesscore, C) Stoelgang-consistentiescore en D) Ziekteactiviteitsindex (DAI) van wildtype en *Phd1*<sup>-/-</sup> knock-out muizen tijdens chronische dextran natriumsulfaat (DSS) geïnduceerde colitis. Wild type (n=3) en *Phd1*<sup>-/-</sup> knock-out (n=4) muizen werden blootgesteld aan drie cycli DSS. Elk grijs blok stelt zeven dagen voor waarop de muizen een bepaalde concentratie DSS ontvingen via het drinkwater. De eerste cyclus, waar behandeld werd met 2% DSS, werd beschouwd als een model voor acute DSS-colitis. In de tweede en de derde cyclus werd respectievelijk behandeld met 2,5% en 3% DSS. Tussen elke DSS-week was een behandelvrij interval van eveneens zeven dagen, de witte kolommen in deze figuur. De drie cycli samen vormden de chronische DSS-proef. Op het einde van de derde cyclus vond sacrificatie (Sac.) plaats. Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde. Chronische DSS-proef: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. Acute DSS-colitis: ° p < 0,05 °° p < 0,01

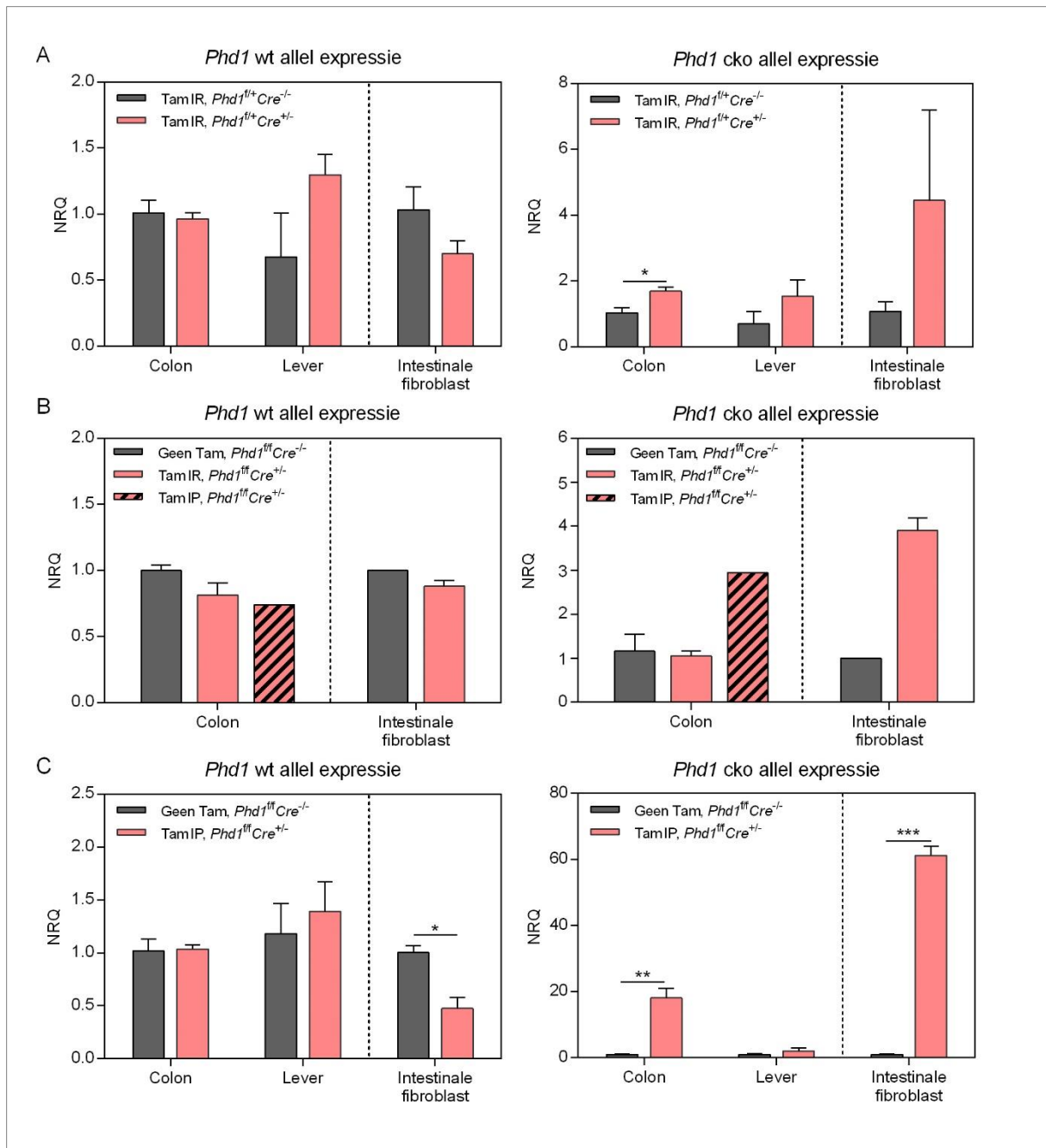


*Figuur 3: Knock-out van Phd1 heeft geen invloed op de ontwikkeling van intestinale fibrose na chronische DSS. A: Colongewicht, B: Colonlengte en C: de ratio ertussen, bij sacrificatie van Phd1 wildtype ( $Phd1^{+/+}$ , n=3) en knock-out ( $Phd1^{-/-}$ , n=4) muizen na chronische dextran natriumsulfaat (DSS) geïnduceerde colitis. Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde (SEM).*

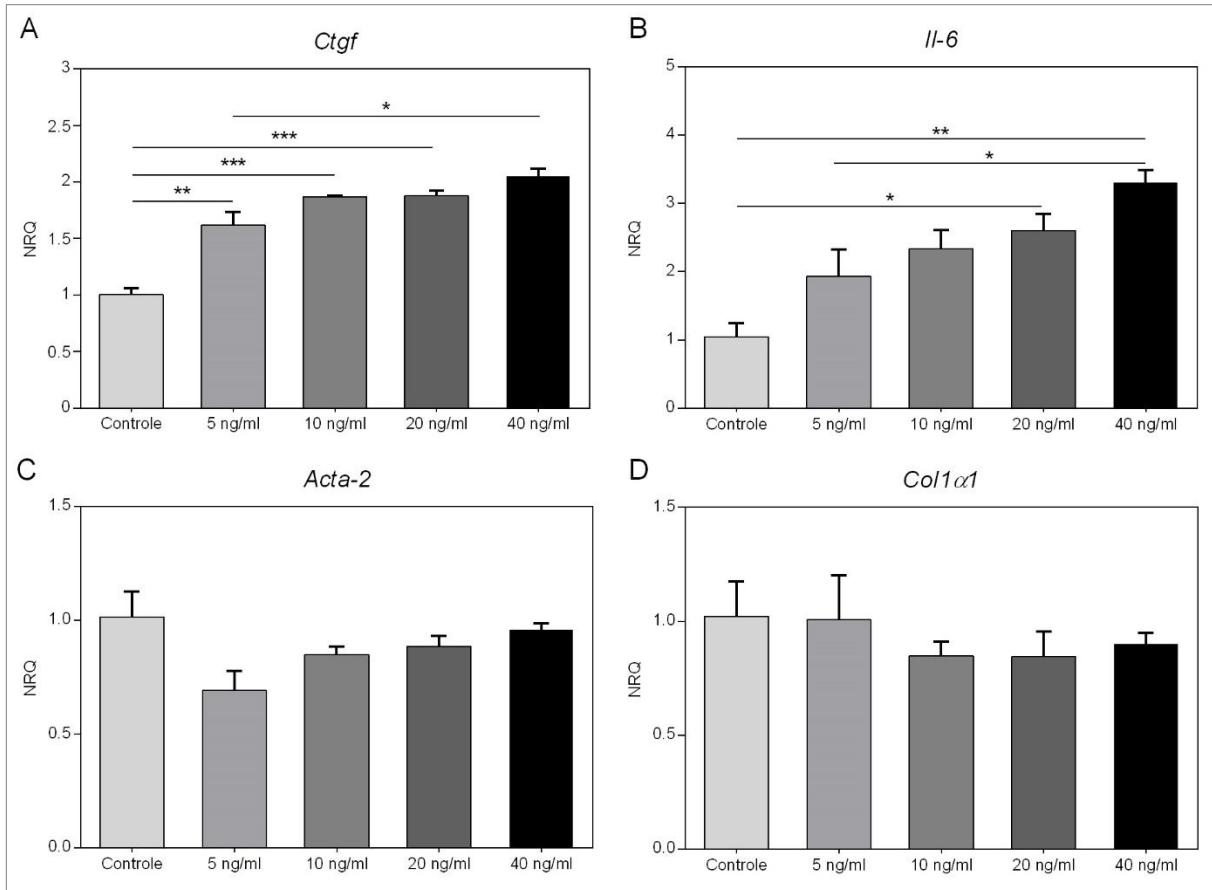




Figuur 4A: Transversale doorsnede onder Masson's Trichroom kleuring (MTS) van het distale colon van een *Phd1* wildtype muis na chronische DSS blootstelling, 40x vergroot. Op de figuur is een duidelijke toename van extracellulaire matrix (ECM) te zien in de submucosa (1). ECM-moleculen kleuren blauw aan. De muscularis propria (2) is ook verdikt. B: Detailbeeld van de coupe, 100x vergroot. De muscularis mucosae (3) is toegenomen in dikte en er is ECM depositie in de lamina propria (4). Op deze snede is duidelijk intestinale fibrose aanwezig. Kwantificatie van de fibrose gebeurde volgens de score in het artikel van Holvoet et al. (44). Op basis van de verdikking van de muscularis propria wordt de ernst van de fibrose op deze coupe gescoord als 4. Daar dit in ongeveer 50% van de doorsnede aanwezig is, wordt voor circulariteit een score 2 toegekend. C: Overzicht van de histologische fibrose scores na chronische DSS. *Phd1*<sup>+/+</sup>, wildtype (n=4); *Phd1*<sup>-/-</sup>, knock-out (n=3). Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde (SEM).

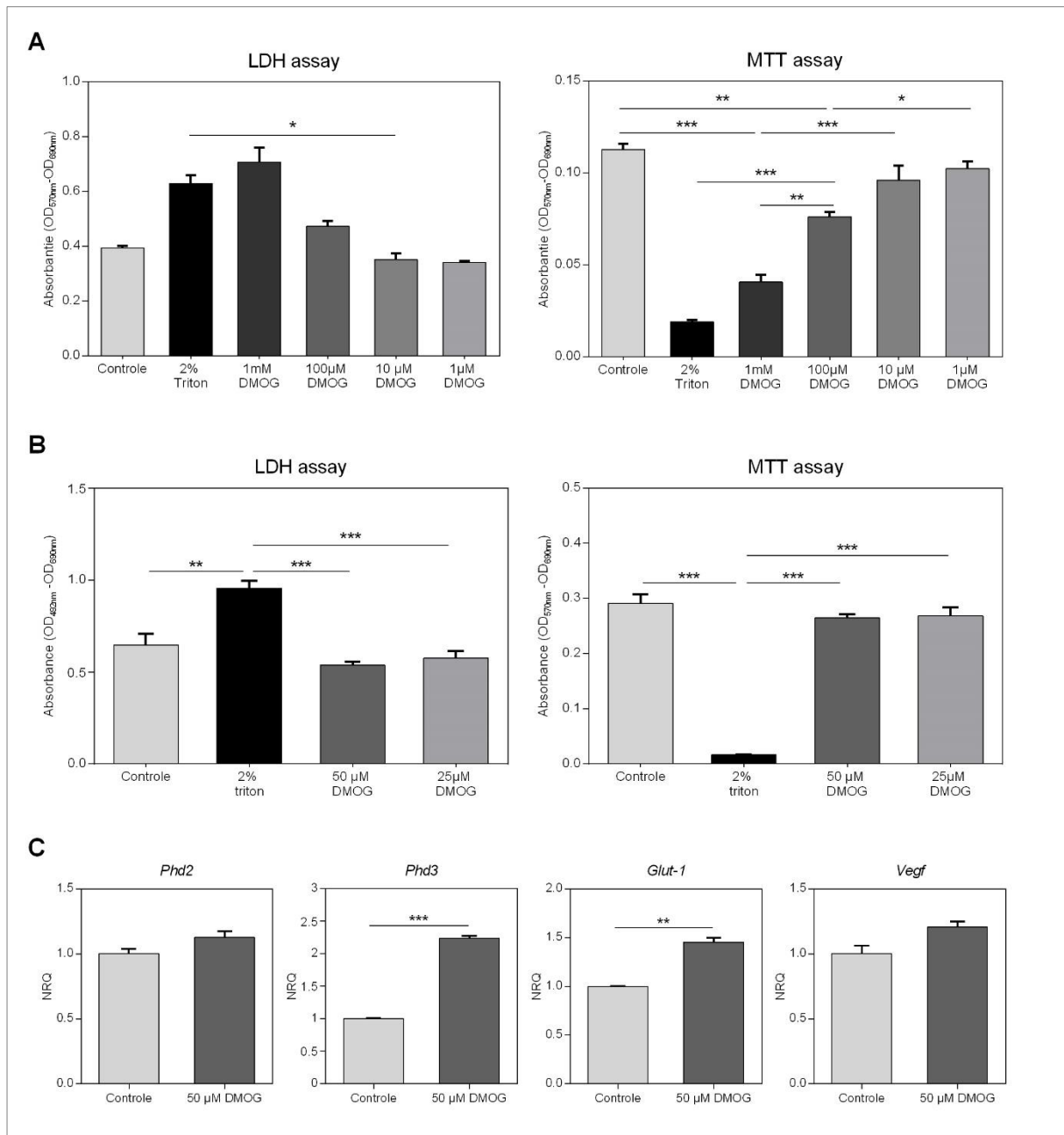


Figuur 5: Optimalisatie van de tamoxifen-geïnduceerde conditionele *Phd1* knock-out. Expressie van *Phd1* wt (wildtype) en cko (conditional knock-out) allel expressie in het colon, intestinale fibroblasten (MIF) en eventueel de lever van A: *Phd1<sup>fl/fl</sup>Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>ERT* (n=3) en *Phd1<sup>fl/fl</sup>Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>-/-</sup>ERT* (n=3) muizen, na éénmalige intraluminale (IL) behandeling met 40 mg/kg 4-hydroxytamoxifen. B: *Phd1<sup>fl/fl</sup>Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>-/-</sup>ERT* (n=3), *Phd1<sup>fl/fl</sup>Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>ERT* (n=3) en *Phd1<sup>fl/fl</sup>Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>ERT* (n=1) muizen, respectievelijk niet behandeld (controle), eenmalig IL behandeld en driemaal intraperitoneaal (IP) behandeld met 250 mg/kg tamoxifen. Op MIF niveau werden cellen van slechts twee muizen uit de IL en twee uit de onbehandelde groep gecultiveerd. C: *Phd1<sup>fl/fl</sup>Col1 $\alpha$ 2:Cre<sup>+/-</sup>* (n=8) muizen waarvan vier, gedurende vijf dagen, elke dag behandeld werden met 2 mg tamoxifen. Fibroblasten van één muis uit de onbehandelde groep konden niet gebruikt worden. Genexpressie is uitgedrukt als de genormaliseerde relatieve kwantiteit (NRQ) ten opzichte van een controleconditie waar het DNA geen recombinatie onderging. Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



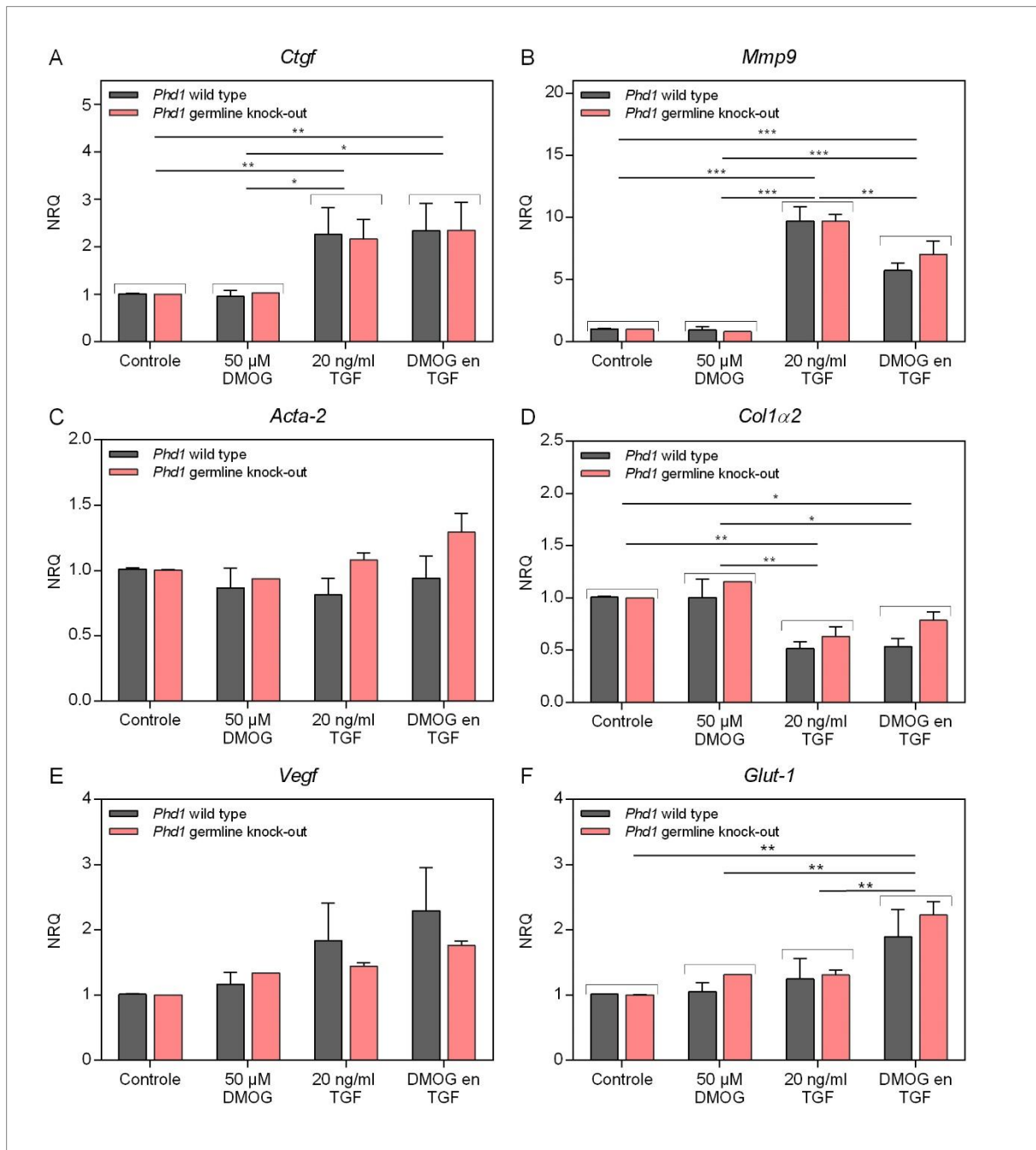
Figuur 6: Stimulatie met 20 ng/ml TGF-β1 leidt tot activatie van fibroblasten. Genexpressie van A: Connective tissue growth factor (Ctgf), B: Interleukine 6 (Il-6), C: alfa 2 Actine (Acta-2) en D: Collageen type 1 alfa1 (Col1α1) in intestinale fibroblasten van één wild type muis bij 0 (=negatieve controle), 5, 10, 20 en 40 ng/ml Transforming Growth Factor beta 1 (TGF-β1) in serum-vrij DMEM-medium. De fibroblasten werden gedurende 48 uur geïncubeerd. Genexpressie is uitgedrukt als de genormaliseerde relatieve quantiteit (NRQ) ten opzichte van de controleconditie.

Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde van de technische replicaten met de standaardfout op het gemiddelde (SEM). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

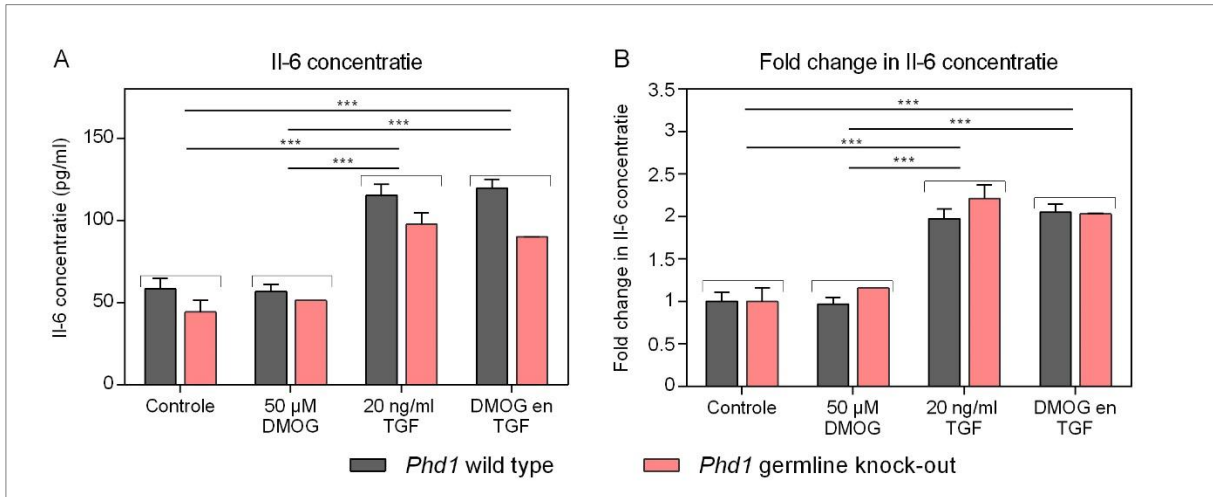


**Figuur 7: Stimulatie met 50µM DMOG is veilig en effectief in het verwerven van panhydroxylase inhibitie in fibroblasten.** A: Toxiciteitstesten a.d.h.v. een lactaatdehydrogenase (LDH)-assay en een 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)-assay, respectievelijk ter bepaling van de cytotoxiciteit en celproliferatie. Intestinale fibroblasten van één Phd1 wildtype (wt) muis werden gestimuleerd met 1mM, 100µM, 10µM en 1µM dimethylxaloylglycine (DMOG). Een 2% tritonconditie werd geïntroduceerd als positieve controle, door zijn cytotoxisch karakter, in de negatieve controleconditie (controle) werd niet gestimuleerd. Proliferatie en cytotoxiciteit werden uitgedrukt als de absorbantie van respectievelijk MTT bij (OD<sub>570nm</sub>-OD<sub>690nm</sub>) en LDH bij (OD<sub>492nm</sub>-OD<sub>690nm</sub>). OD, optische densiteit; nm, nanometer (golflengte). B: MTT- en LDH-assay bij een ongestimuleerde conditie en bij stimulatie met 25 en 50 µM DMOG en 2% triton in intestinale fibroblasten van één wt muis. C: Genexpressie van Prolyl-hydroxylase 2 en 3 (Phd2 en3), Glucose-transporter 1 (Glut-1) en Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) in intestinale fibroblasten van één Phd1 wt muis in een ongestimuleerde controleconditie en bij 50 µM DMOG. Genexpressie is uitgedrukt als de genormaliseerde relatieve hoeveelheid (NRQ) ten opzichte van de controleconditie.

De drie waarden bij elke conditie zijn de technische replicaten van het stimulatie-experiment. Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde. De drie waarden bij elke conditie zijn de technische replicaten. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



Figuur 8: *Phd1* deletie verhindert na TGF-gemedieerde profibrotische genexpressie en fibroblastactivatie niet. Expressie van A: Connective Tissue Growth Factor (*Ctgf*), B: Matrixmetalloprotease 9 (*mmp9*), C: alfa 2 Actine (*Acta-2*), D: Collageen type 1 alfa 2 (*Col1α2*), E: Vascular Endothelial Growth factor (*Vegf*) en F: Glucose Transporter 1 (*Glut-1*) in intestinale fibroblasten van *Phd1* wildtype ( $n=3$ ) en knock-out ( $n=2$ ) muizen werd vergeleken bij 4 verschillende stimulatiecondities. In de controleconditie, de dimethyloxaloylglycine (DMOG) en de Transforming Growth Factor beta 1 ( $TGF-\beta 1$ ) conditie werd respectievelijk niet, met 50  $\mu M$  DMOG en met 20 ng/ml TGF gestimuleerd. In de combinatieconditie werden fibroblasten zowel met DMOG als TGF gestimuleerd. Genexpressie is uitgedrukt als de genormaliseerde relatieve kwantiteit (NRQ) ten opzichte van de controleconditie. Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



*Figuur 9: Phd1 deletie leidt niet tot gedaalde IL-6 secretie na TGF-gemedieerde fibroblastactivatie. A: De absolute IL-6 concentratie en B: De fold change in IL-6 concentratie in het supernatans van intestinale fibroblasten van Phd1 wildtype (n=3) en knock-out (n=2) muizen in verschillende stimulatiecondities. In de controleconditie, de dimethyloxaloylglycine (DMOG) en de Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) conditie werd respectievelijk niet, met 50  $\mu$ M DMOG en met 20 ng/ml TGF gestimuleerd. In de combinatieconditie werd concomitant gestimuleerd met DMOG en TGF. De fold change werd berekend als de genormaliseerde concentratie ten opzichte van de controleconditie. Resultaten zijn weergegeven als het gemiddelde met de standaardfout op het gemiddelde. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.*

## V. Afkortingenlijst

<b>Afkorting</b>	<b>Betekenis</b>
4-OH Tam	4-hydroxytamoxifen
ACTA-2	Actine alfa 2 ( $\alpha$ -SMA)
Anti-anti	Antibiotic-Antimycotic
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
$\alpha$ -SMA	alfa Smooth muscle actin (ACTA-2)
ATG16L1	Autofagie gerelateerd proteïne 16-1
bp	Basenparen
CBP	CREB binding proteïen
CD	Ziekte van Crohn
cko	Conditionele knock-out
COL1 $\alpha$ x	Collageen type 1 alfa x
CREB	cAMP-response element binding
CTGF	Connective-tissue growth factor
DAI	Ziekteactiviteitsindex (Disease Activity Index)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMOG	Dimethyloxallylglycine
dNTP	Deoxynucleoside trifosfaten
DPBS-/-	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline zonder Calcium en Magnesium
DSS	Dextran sodium sulfaat
DTT	DL-Dithiothreitol
ECM	Extracellulaire matrix
EMT	Epitheliale-mesenchymale transitie
EndoMT	Endotheliale-mesenchymale transitie
ER	Oestrogeen receptor
ET	Endotheline
FIH	factor inhibiting HIF
FØ	Fibroblast
FSC	Forward scatter

GAPDH	Glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase
GLUT-1	Glucose transporter 1
GWAS	Genoombrede associatie studies
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HIF-x	Hypoxia-inducible factor x
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HSC	Hematopoëtische stamcellen
IBD	Inflammatoire darmziekten
IF	Intestinale fibrose
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
I $\kappa$ B	Inhibitor kappa B
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	Intraluminaal
IL-x	Interleukine x
IP	Intraperitoneaal
JAK/STAT	Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription proteins
ko	Knock-out
LBD	Ligand bindend domein van de ER
LDH	Lactaat dehydrogenase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MF	Myofibroblast
MIF	Muis intestinale fibroblast
MMPx	Matrixmetalloprotease x
MSC	Mesenchymale stamcellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	Nod-like receptor
NLS	Nucleair localisatiesignaal
PAMP	Pathogeengeassocieerd moleculair patroon



PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHD x	Prolyl-hydroxylase x
pVHL	Von Hippel-Lindau E3 ubiquitine ligase
RPM	Toeren per minuut
RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR (qPCR)
SDHA	Succinaat dehydrogenase complex subunit A
SERM	Selectieve oestrogeen receptor modulator
Smad	Small mother against decapentaplegic
SMC	Gladde spiercel
SNP	Single nucleotide polymorfisme
SS	Single stain
SSC	Side scatter
TAE	Tris-acetaat-EDTA
Tam	Tamoxifen
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1 (TGF)
Th-x	T-helper x cel
TIMP-1	Tissue inhibitor of metallopeptidase 1
TJ	Tight junction
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alfa
UC	Colitis Ulcerosa
VEGF	Vascular endothelial growth factor
wt	Wildtype