

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven er den avsluttende delen av min mastergrad ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap på Universitetet for miljø- og biovitenskap. Den har blitt utført ved Nofima, divisjon for mat og helse.

Arbeidet med oppgaven har blitt gjort ved Nofima i perioden august 2011-mai 2012. Jeg vil gjerne takke både Nofima og instituttet for muligheten til å utføre denne oppgaven.

Jeg ønsker spesielt å uttrykke min takknemlighet til mine dyktige veiledere stipendiat Anne Rieder og forsker Stine Grimmer for god hjelp og støtte under hele prosessen både med laboratoriearbeid og oppgaveskriving. Deres kunnskap og vennlighet har virkelig inspirert meg og vært til stor hjelp. Jeg vil også takke alle på biokjemilaben og cellegruppa for selskap og teknisk hjelp.

Jeg vil også takke min veileder ved UMB, professor Tor Lea for god veiledning og tilbakemeldinger under skriveprosessen.

Til slutt vil jeg takke familien min og venner for støtte gjennom prosessen, og ikke minst mine medstudenter her ved Nofima for sosialt samvær og støtte.

Ås, 15. mai 2012

Janne Sølvernes

Sammendrag

β -glukaner er kostfiber funnet i celleveggen hos gjær, sopp, bakterier og korn. β -glukaner fra korn finnes i størst grad i havre og bygg. Det har blitt vist i ulike forsøk at β -glukaner har effekt på immunsystemet, ved å styrke immunforsvarets evne til å oppdage og eliminere farer. I den forbindelse har det vært av interesse å undersøke den immunmodellerende effekten til β -glukaner fra bygg og havre siden mesteparten av studiene er utført på β -glukaner fra sopp.

THP-1 celler, differensierte THP-1 celler (makrofager) og PBMC ble inkubert med ulike β -glukaner fra bygg, havre og gjær. Deretter ble cytokinsekresjonen fra cellene målt ved bruk av ELISA. Forsøkene viste at inkubering med β -glukanene 40 kDa, 359 kDa og h.v oat (fra korn) ga en økning i sekresjonen av TNF- α , IL-8 og IL-1 β , mens løselig og uløselig Wellmune (fra gjær) ga økt sekresjon av IL-8 og IL-1 β . Resultatene fra forsøkene med THP-1 og makrofager ble sammenlignet med resultatene fra forsøkene med PBMC, og det viste seg at cellelinjen THP-1 og THP-1 deriverte makrofager var relativt gode modeller til immuncellene isolert fra humant blod.

For å sjekke om den observerte effekten på cytokinsekresjonen skyldtes selve β -glukanene eller LPS-kontaminering ble det utført forsøk med polymyxin, tilsetning av TLR-4 antistoff for å blokkere bindingssteder for LPS på cellene (TLR-4), og degradering av β -glukanene ved bruk av enzymene cellulase og lichenase. Forsøkene antydte at enkelte av prøvene kunne være kontaminert med LPS. På grunn av mistanken om kontaminasjon av prøvene kan man ikke fastslå noen effekt av β -glukaner på cytokinsekresjonen, fordi det ikke er konstatert om det er β -glukanene som stimulerer til økt cytokinsekresjon eller om det rett og slett er LPS som stimulerer.

Abstract

β -glucans are fibers found in the cell wall of yeast, fungi, bacteria and cereals. In cereals, especially barley and oat are rich in β -glucans. It has been shown in various experiments that β -glucans have an effect on the immune system by strengthening the immune system's ability to detect and eliminate threats. In this connection it has been of interest to investigate the β -glucans from barley and oat and their immune- modulating properties since most of the studies have been performed on β -glucans from fungi.

THP-1 cells, differentiated THP-1 cells (macrophages) and PBMC were incubated with various β -glucans from barley, oats and yeast. Subsequently, the secretion of cytokines from the different cell types was measured using the ELISA technique. The experiments showed that incubation with the cereal β -glucans 40 kDa, 359 kDa and high viscosity oat gave an increase in the secretion of TNF- α , IL-8 and IL-1 β , while soluble and insoluble Wellmune from yeast stimulated an increased secretion of IL-8 and IL-1 β . The results from the experiments with the THP-1 cells and macrophages were compared with the results from the experiments with PBMC and showed that the THP-1 cell line and its derived macrophages appeared to be relatively good models of immune cells isolated from human blood.

In order to test whether the increased secretion of cytokines was due to the β -glucans or LPS contamination of the β -glucan samples a range of experiments were performed including addition of polymyxin or TLR-4 antibody to inhibit LPS, as well as degradation of β -glucans using the enzymes cellulase and lichenase. The experiments indicated that some of the samples could be contaminated with LPS. Thus, we are not able to conclude whether the increased cytokine secretion observed is due to the β -glucans.

Innholdsfortegnelse

1. INTRODUKSJON	1
2. TEORI	2
2.1 B-GLUKANER	2
2.2 KOSTFIBER OG HELSE	4
2.1.3 B-GLUKANER OG INFLAMMASJON	5
2.2 GENERELT OM IMMUNFORSVARET	7
2.2.1 MEDFØDT IMMUNFORSVAR	8
2.2.2 ADAPTIV IMMUNITET	9
2.3. CYTOKINER	13
2.4 TIDLIGERE FORSØK MED B-GLUKANER OG INFLAMMASJON	16
3. MATERIALER	18
4. METODER	22
4.1 CELLELAB	22
4.1.1 SPLITTING AV CELLER	22
4.1.2 DIFFERENSIERING AV THP-1 CELLER TIL MAKROFAGER	22
4.2 TILLAGING AV B-GLUKANPRØVER	22
4.2.1 DEGRADERING AV B-GLUKANPRØVER VED BRUK AV ENZYMBEHANDLIG	23
4.3 KONTROLL AV ENZYMBEHANDLING AV B-GLUKANENE VED MÅLING AV DANNEDE OLIGOSAKKARIDER	24
4.4 CELLEFORSØK	25
4.4.1 CELLEFORSØK MED LPS, POLYMYXIN	25
4.4.2 TILSETTING AV TLR- ANTISTOFF TIL CELLENE.	25
4.4.3 CELLTITER-GLO [®] LUMINESCENT CELL VIABILITY ASSAY OG MTT TEST	26
4.4.5 ISOLERING AV PERIFERE MONONUKLEÆRE BLODCELLER FRA BUFFYCOAT	27
4.5. MÅLING AV CYTOKINSEKRESJON VED HJELP AV ELISA	29
5. RESULTATER	35
5.1 OPTIMALISERING AV TEST SYSTEMET MED THP-1 CELLER	35
5.2 CYTOKIN SEKRESJON FRA THP-1 CELLER VED STIMULERING MED ULIKE B-GLUKANPRØVER	37
5.3 CYTOKIN SEKRESJON FRA MAKROFAGER VED STIMULANS AV B-GLUKANPRØVER	38
5.4 CYTOKINSEKRESJON FRA PBMC VED STIMULANS AV B-GLUKANPRØVER	42
5.5. UTVELGELSE AV B-GLUKANPRØVER	44
5.6 TEST FOR KARBOHYDRATSPESIFIKK AKTIVITET	46
5.6.1 POLYMYXIN	46

5.6.2. TILSETNING AV TLR-ANTISTOFF	47
5.6.3 EFFEKT AV ENZYMDEGRADERING AV B- GLUKANER	50
5.6.6 MÅLING AV TOKSISITET VED BEHANDLING AV ENZYM	56
6. DISKUSJON	58
<hr/>	
6.1 CYTOKINSEKRESJON FRA THP-1 OG MAKROFAGER ETTER STIMULERING MED ULIKE B-GLUKANPREPARATER	58
6.2 CYTOKINSEKRESJON FRA PBMC VED STIMULANS AV ULIKE B-GLUKANPREPARATER	60
6.3 UTVELGELSE AV B-GLUKANPRØVER	60
6.4 KARBOHYDRAT SPESIFIKK AKTIVITET	61
6.4.1 POLYMYXIN	62
6.4.2 TILSETNINGER AV TLR-4 ANTISTOFF	62
6.4.3 ENZYMDEGRADERING VED BRUK AV CELLULASE	63
6.4.4 ENZYMDEGRADERING VED BRUK AV ENZYMET LICHENASE	65
6.6 BESTEMMELSE AV LPS I B-GLUKANPRØVENE	67
7. KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID	68
<hr/>	
8. REFERANSER	69

1. Introduksjon

β -glukaner er en viktig strukturkomponent i celleveggen til sopp, gjær, bakterier og korn som bygg og havre. I de siste årene har β -glukaner fått mye oppmerksomhet på grunn av sine immunmodulerende egenskaper.

Kroppen vår er under konstant angrep fra trusler, og immunsystemet har i oppgave å beskytte oss mot disse. Det dukker stadig opp nye påstander om at sammensetningen av hva vi spiser har en stor betydning for funksjonen av immunsystemet. Derfor har matvaresammensetning og funksjonell mat fått mye oppmerksomhet de siste årene. På grunn av høyere levestandard og mindre eksponering for mikroorganismer kan det tenkes at en liten stimulering med β -glukaner kan stimulere/trene opp immunforsvaret til å fungere best mulig, men mekanismene rundt dette er ikke helt fastslått. β -glukanene kan være med på å stimulere immunforsvaret, til en immunrespons som gjør at immunsystemet vårt er mer på vakt. Videre bidrar β -glukanene til å styrke immunforsvarets evne til å oppdage trusler.

Mesteparten av forskningen på β -glukaner er utført på β -glukaner fra sopp og gjær. Bygg og havre er også gode kilder til β -glukan og er matvarer som lett kan introduseres i kostholdet. Siden β -glukaner fra korn har en annen struktur en β -glukaner fra sopp og gjær må aktiviteten til disse β -glukaner bli vist i separate forsøk. Det er derfor av interesse å undersøke de immunmodulerende effektene av β -glukaner fra bygg og havre.

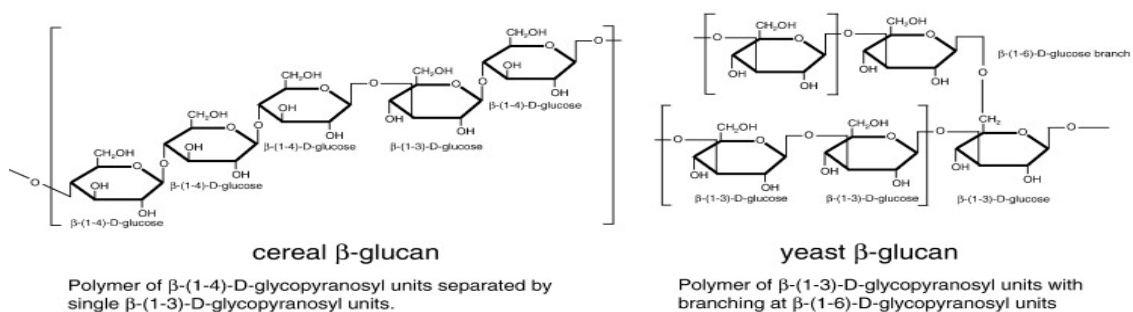
2. Teori

Bygg er fra gammelt av en viktig kornsort i Skandinavia og andre nordlige deler av verden. Bygg krever en kort vekstsesong, som gjør at den gir gode avlinger i kaldere miljø, slik som det er i Norge. En av de dominerende fibertypene i bygg er β -glukan (Holtekjølen, et al., 2006).

2.1 β -glukaner

β -glukan er et karbohydrat bestående av glukosemolekyler bundet sammen. β -glukaner er en viktig strukturkomponent funnet i celleveggen hos gjær, sopp, bakterier og i kornsorter som bygg og havre. β -glukaner finnes som en del av celleveggen i endospermen.

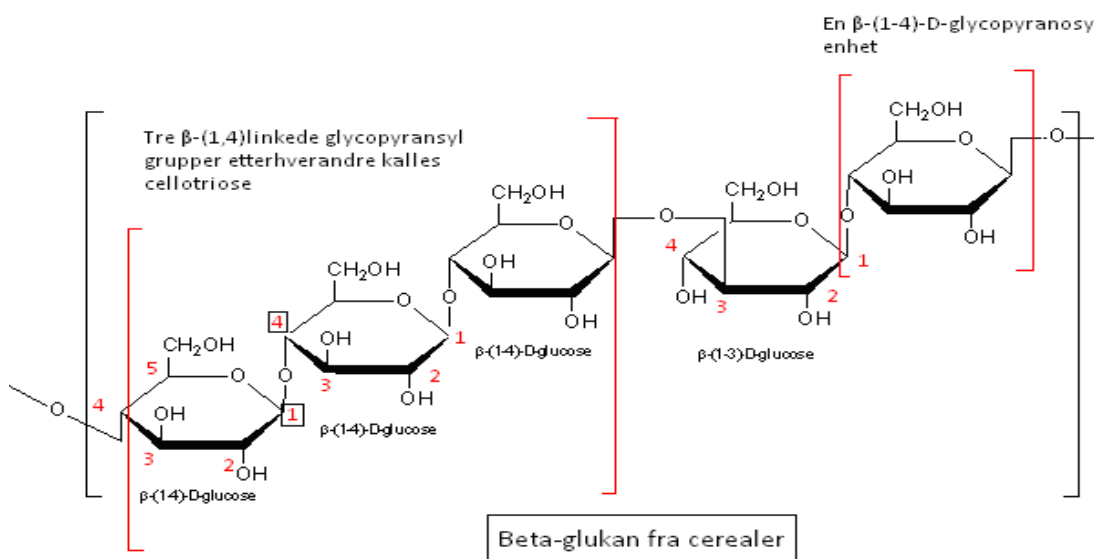
β -glukaner med opphav fra forskjellige kilder har klare forskjeller i strukturen (Figur 1). β -glukaner fra celleveggen til sopp og gjær er satt sammen av en hovedkjede av β -(1,3) koblete glycopyranosylenheter med små mengder β -(1,6) forgreininger. Glycopyranosyl består av glukosemolekyl i 6-ringstruktur bundet til en ny enhet. Bakterielle β -glukaner består av ugreinede koblinger av β -(1,3)-koblet glycopyranosyl (Figur 1) (Volman, et al., 2008).



β -Glucan type	Structure	Description
Bacterial	—————	Linear β 1,3 glucan (i.e. Curdlan)
Fungal	┆┆┆┆┆┆	Short β 1,6 branched, β 1,3 glucan (i.e. Schizophyllan)
Yeast	┆┆┆┆┆┆	Long β 1,6 branched, β 1,3-glucan (i.e. WGP β -glucan, Betafectin TM)
Cereal	—————	Linear β 1,3/ β 1,4-glucan (i.e oat, barley, rye)

Figur 1: (1) Strukturforskjeller mellom β -glukan fra korn og gjær. (2) Skjematisert oversikt over β -glukaner fra ulike kilder (Volman, et al., 2008).

β -glukan fra bygg og havre har ikke noen forgreninger og består av β -(1,3) og β -(1,4)koblet glycopyranosyl (Figur 2) (Volman, et al., 2008).



Figur 2: Skjematisk bilde av oppbygning av et β -glukan. Modifisert fra (sigmaaldrich, 2011).

Figur 2 viser et eksempel på cellotriose, som er 3 glukoseringer bundet β -(1,4). Det finnes også cellotetraose som er 4 glukoseringer bundet β -(1,4) i β -glukan fra korn (ikke vist i Figuren). Disse to strukturene er byggesteinene som β -glukaner fra korn er bygget opp av. De ulike kombinasjonene av cellotriose og cellotetraose er bundet sammen med en glukosering bundet β -(1,3) (β -(1,3)D-glukose). Cellotriose og cellotetraose utgjør ca. 90 % av β -glukan molekylet (Wood, et al., 1994).

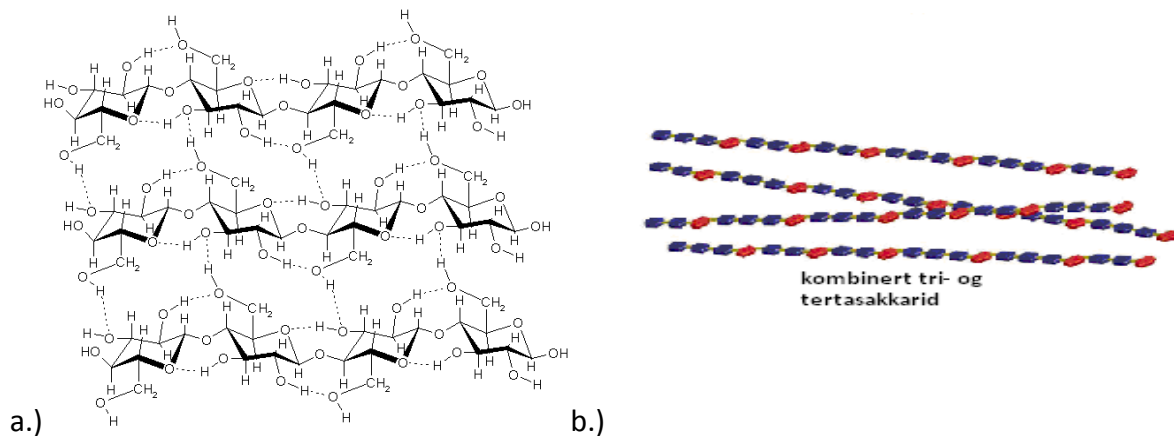
Det er ikke bare strukturen (koblingen og forgreninger) til β -glukaner som varierer med kilden men også løseligheten, molekylvekten, tertiærstrukturen og graden av forgrening. Molekylvekten av β -glukaner varierer fra type korn de kommer fra. Generelt finner vi β -glukaner med høyest molekylvekt hos havre, tett etterfulgt av bygg, mens rug og hvete har β -glukaner med lavere molekylvekt (Beer, et al., 1997).

Molekylvekten og strukturen til β -glukaner påvirker løseligheten og konformasjonen i en løsning. Rene β -glukaner er ofte løselige i vann, men kan kreve høye temperaturer for å løse de fullstendig. De kan danne aggregater som gjør oppløsning i vann vanskeligere. Jo lengre celluloselike sekvenser (sekvenser uten β -(1,3) (β -(1,3)D-glukose) det finnes i et β -glukan

makromolekyl, desto lettere vil de danne aggregater på grunn av sterke hydrogenbindinger mellom de celluloselike sekvenser (sammenlignet med uløselige cellulose makromolekyler).

β - (1,3) bindinger hindrer derimot molekylet å danne en ordnet struktur, og β -glukaner lar seg derfor løses i vann i motsetning til cellulose som er uløselig i vann (Figur 3).

Interaksjonen av β -glukan med reseptorer på celleoverflaten er trolig avhengig av β -glukanets struktur, molar masse, løselighet og konformasjon i løst tilstand (Lazaridou & Biliaderis, 2007).



Figur 3: (a.) Struktur av cellulose med hydrogenbindinger mellom glukosemolekylene (University of Cambridge, 2004-2012). (b.) β (1,3)-bindinger som ligner strukturen til β -glukaner (Burton, et al., 2010).

2.2 Kostfiber og helse

Karbohydrater er en fellesbetegnelse, og deles inn i 4 hovedgrupper etter hvordan de er bygget opp: monosakkarider, disakkarider, oligosakkarider og polysakkarider. Mono- og disakkaridene er gjerne det vi omtaler som sukkerarter på grunn av den søte smaken, mens polysakkaridene ofte er stivelse eller kostfiber. Stivelse og glykogen er eksempler på fordøyelige polysakkarider, mens polysakkaridene som ikke brytes ned i tynntarmen, slik som cellulose, pektin og hemicellulosene som arabinoxylaner og β -glukaner, kalles ufordøyelige polysakkarider eller kostfiber (Helsedirektoratet, 2000).

Havre og bygg har høyere innhold av løselige kostfiber (som β -glukan og løselig arabinoxylan) enn hvete og rug. Hvete og rug har derimot høyere innhold av uløselig kostfiber (som cellulose og uløselige arabinoxylan). Uløselig kostfiber absorberer vann og myker dermed opp avføringen. Dette gir en raskere passasje av feces gjennom tarmen og reduserer dermed risikoen for forstoppelse og divertikulitt (utposninger på tykktarmen

oftest som resultat av fiberfattig kost) (Saladin, 2010). Vannløselige kostfiber som β -glukaner gir en nedgang av kolesterolnivåer i blodet. Mekanismene rundt dette er ikke fastslått med 100 % sikkerhet, men mulige mekanismer er at de løselige fibrene danner en viskøs gel i tynntarmen. Dette hindrer opptaket av kolesterol fra maten og reabsorpsjon av galle. Ved redusert reopptak av galle blir produksjonen av gallesalter fra kolesterol økt og dermed vil mer av kolesterolet kunne forlate kroppen (Othman, et al., 2011). Tabell 1 viser en oversikt av kornprodukters effekt på risiko for kroniske sykdommer.

Tabell 1: Kornprodukter og effekt på risiko for kroniske sykdommer (Helsedirektoratet, 2000).

Dokumentasjon for årsaks-sammenheng	Redusert risiko		Økt risiko	
	Eksposering	Sykdom	Eksposering	Sykdom
Sannsynlig årsaks-sammenheng	Matvarer med fiber som belgvekster, fullkornsprodukter, frukt, bær og	Kreft i tykk- og endetarm	Salt (totalt inntak av salt) (1)	Kreft i magesekk
	Fiber (NSP) (17)	Hjerte- og kar-sykdommer		
	Fullkorn (17)	Hjerte- og kar-sykdommer		
	Matvarer med lav energitettethet (1)	Vektøkning, overvekt og fedme	Matvarer med høy energitettethet (1)	Vektøkning, overvekt og fedme
	Fiber (NSP) (17)	Type 2-diabetes		
	Et kosthold rikt på fiber (> 25 g/d) (12)	Koronar hjertesykdom og hjerte- og karsykdommer		
	Fiberrikt kosthold (12-33 g fiber/d) eller fibertilskudd (opp til 53 g fiber/d) (41)	Hjerte- og kar-sykdommer		
	Kostfiber, 14 gram per 4,2 MJ (1000 kcal) og fullkorn (50 % av korninntaket) (39)	Type 2-diabetes (personer med overvekt og fedme)		
Mulig årsaks-sammenheng	Matvarer med fiber som belgvekster, fullkornsprodukter, frukt, bær og grønnsaker (1)	Kreft i spiserør		
	Folat fra matvarer (1)	Kreft i spiserør, tykk- og endetarm		
	Selen fra matvarer (1)	Kreft i lunge, magesekk, tykk- og endetarm		
	Fiberrikt kosthold (20-27 g fiber/d) (41)	Vektøkning, overvekt og fedme		

2.1.3 β -glukaner og inflammasjon

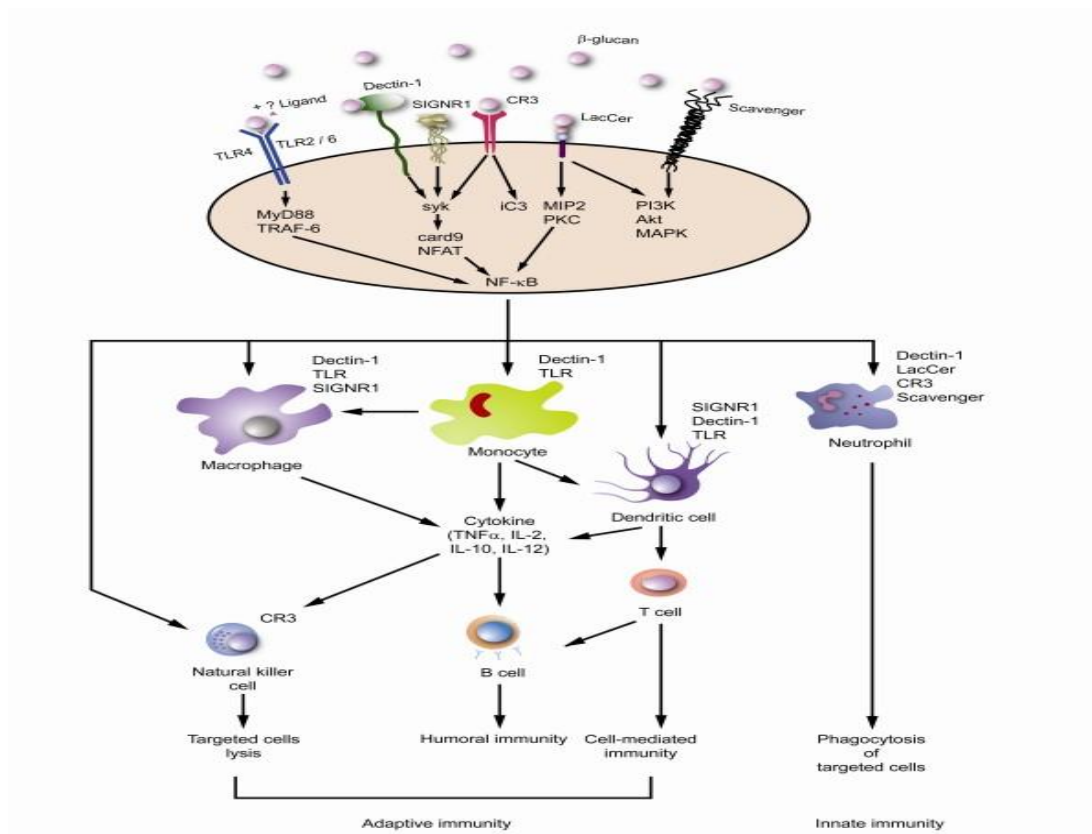
Kronisk inflammasjon er assosiert med økt risiko for utvikling av kreft. Mange av risikofaktorene for økt forekomst av kreft kommer fra omgivelsene, som røyking, asbest og diettfaktorer (f.eks. overvekt) (Grivennikov, et al., 2010). Kolorektal kreft (CRC, colorectal

cancer)er en av de mest utbredte krefttypene i verden, med 1,2 millioner nye tilfeller diagnostisert i 2008, som utgjør om lag 9,7 % av krefttilfellene i verden (Aune, et al., 2011). Matvarer med fiber som f. eks fullkornsprodukter har vist en sannsynlig årsakssammenheng med redusert risiko av kreft i tykk og tynntarm. Men mekanismene for hvordan kostfiber påvirker risikoen er enda ikke fastslått (Helsedirektoratet, 2000).

Det er vist at inflammasjon har en betydelig rolle med tanke på dødeligheten av CRC. Kroniske betennelsessykdommer (inflammasjon) som ulcerøs kolitt og Crohns sykdom, er assosiert med økt risiko for utvikling av CRC. Ved en betennelse vil plasmanivåene av akutt fase protein C-reaktivt protein (CRP) være forhøyet. Forhøyede CRP nivåer er en markør på inflammasjon og kan føre til utvikling av CRC (Erlinger, et al., 2004). Det blir også hevdet av et høyt inntak av kostfiber er med på å beskytte mot utviklingen av kolorektal kreft fordi inntak av kostfiber som β -glukaner senker CRP nivåene og nivåene av proinflammatoriske cytokiner som IL-6 og TNF- α (King, et al., 2007) (Ma, et al., 2008).

β -glukanreseptorer:

β -glukaner kan reagere med flere ulike membranreseptorer på immunceller. Flere β -glukanreseptorer for β -glukan fra sopp er blitt identifisert, blant annet dectin-1, komplementreseptor 3 (CR3), Toll-liknende-reseptor (TLR) 2 og -4, lactosylceramide (LacCer) og ryddereseptorer (scavenger reseptorer). (Brown, 2006) β -glukanene fra korn er vist å binde seg blant annet til reseptorene Dectin-1 og CR3, men med lavere affinitet enn β -glukaner fra sopp (Brown & Gordon, 2001) (Thornton, et al., 1996). Ulike signalveier blir aktivert av β -glukaner, dens forenklete nedstrøms signalvei er vist i Figur 4.



Figur 4: Immunaktivering forårsaket av β -glukaner, forenklete nedstrøms prosesser aktivert av β -glukaner (Chi-Fung Chan, et al., 2009).

Celler med β -glukanreseptorer er monocytter, makrofager, dendritiske celler, nøytrofile og naturlige dreperceller. De immunmodulerende funksjonene induisert av β -glukaner involverer både det medfødte og adaptive immunsystemet, blant annet cytokinsekresjon (Chi-Fung Chan, et al., 2009).

2.2 Generelt om immunforsvaret

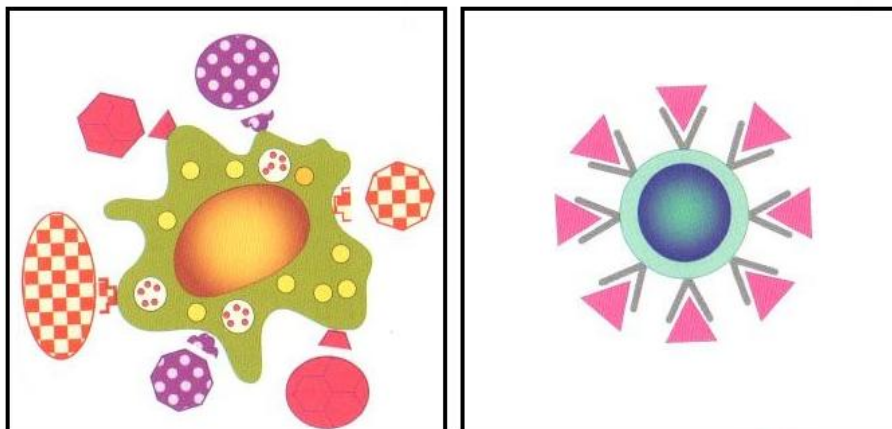
Når en fare for kroppen oppstår er det først den fysiske og kjemiske barrieren som beskytter oss og forhindrer uvedkommende å komme inn. Denne barrieren regnes ikke som en del av immunsystemet, men kalles gjerne for den ytre forsvarsrekken. Det er en fysisk barriere som omfatter hudoverflaten, slimhinnene i luftveiene og fordøyelsessystemet, og en kjemisk barriere som omfatter svette, fett og talg på huden (som produseres av spesielle celler på huden) som hemmer vekstmulighetene til uvedkommende bakterier (Lea, 2006) (Murphy, et al., 2008).

Immunsystemet deles inn i 2 deler, det medfødte immunforsvaret og det adaptive immunforsvaret.

2.2.1 Medfødt immunforsvar

Cellene som tilhører det medfødte immunforsvaret er fagocytterende celler. Fagocytt er en fellesbetegnelse for celler som har i oppgave å sluke og ødelegge patogener. Fagocytterende celler er makrofager, monocytter, nøytrofile og umodne dendrittiske celler.

Disse cellene dreper og fordøyer mikrober ved å produsere giftige kjemikalier eller kraftig degraderende enzymer. Det medfødte immunsystemet er ofte aktivert kun noen timer etter en infeksjon (Lea, 2006) (Murphy, et al., 2008). Medfødt immunitet reagerer raskt mot egenskaper som er felles for mange mikroorganismer, mens det adaptive immunsystemet reagerer på helt spesifikke strukturer som er karakteristiske for den spesifikke bakterien eller viruset (Figur 5) (Lea, 2006).



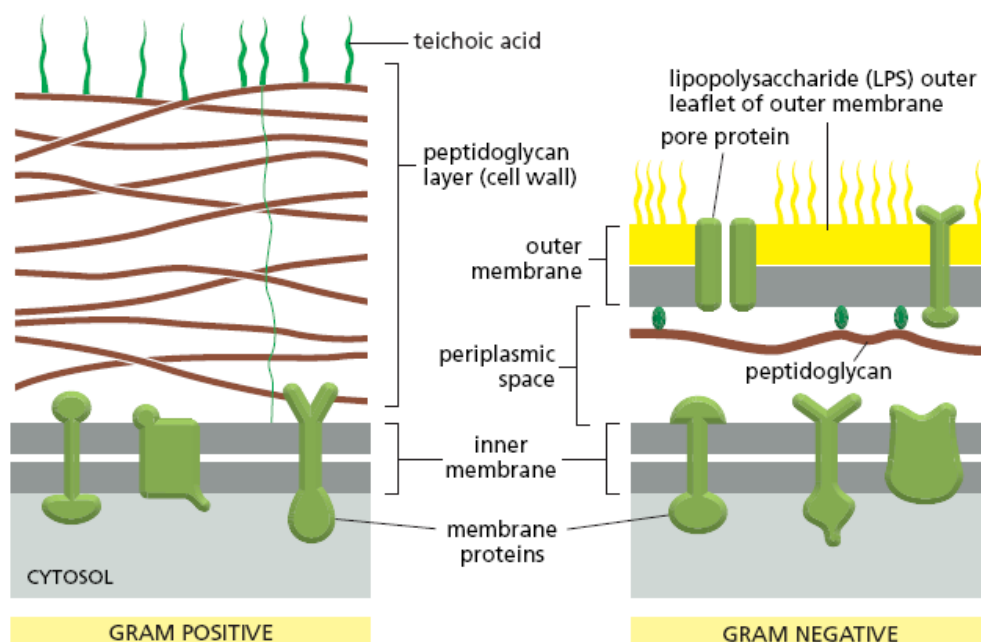
Figur 5: De fundamentale forskjellene mellom gjenkjenning av patogener, (1) i det medfødte, gjenkjenner et mønster av strukturer som finner på flere mikroorganismer. (2) Det adaptive immunsystemet, gjenkjenner kun en enkelt struktur (Lea, 2006).

MAMPs- Microbe-associated molecular patterns

Celler i immunforsvaret har reseptorer på overflaten som gjør at de kan binde seg til og reagere med fremmede mikroorganismer. Mikroorganismer har som regel karakteristiske strukturer eller mønsteregenskaper som cellene gjenkjenner. Disse strukturegenskapene finnes på bakterier, virus og sopp og kalles MAMPs. Bakterier og sopp har gjerne MAMPs i form av glykoproteiner og glykolipider på overflaten, som kan gjenkjennes og bindes av

reseptorer på fagocytter og dendritiske celler. Disse reseptorene som gjenkjenner MAMPs kalles mønstergjenkjennerende reseptorer, PRR (pattern recognizing receptors) (Lea, 2006).

Det finnes ulike PRR som gjenkjenner ulike MAMPs, disse kan igjen deles inn i ulike familier. Toll-liknede-reseptor (TLR) er en familie av PRR som blant annet finnes på fagocytter. Et eksempel er TLR-4 som spesifikt reagerer med lipopolysaccharide (LPS) som er en MAMP på utsiden av gram-negative bakterier (Figur 6). Dette fører til en fagocytisk aktivering. Andre TLR gjenkjenner andre spesifikke MAMPs som peptidoglukan som kun finnes på gram-positive bakterier (Figur 6). Aktivering av fagocytter ved hjelp av MAMPs og RPR trigger blant annet et transmembransignal som resulterer i produksjon av ulike toksiske forbindelser som fører til degradering av de patogene bakteriene (Madigan, et al., 2009).



Figur 6: (1.) Celleveggen til gram positive bakterier med peptidoglukan. (2.) Celleveggen til gram negative bakterie med karakteristiske MAMP som LPS (Alberts, et al., 2008).

2.2. 2 Adaptiv immunitet

I den adaptive delen av immunforsvaret har vi B og T-lymfocytter. Det spesielle med disse cellene er at de har reseptorer som kan binde seg til fremmede strukturer og ulike mikroorganismer og identifisere dem. Når dette skjer utvikler cellene seg til effektorceller. Disse cellene står for bekjempelsen av de sykdomsfremkallende mikrobene. De ulike cellene

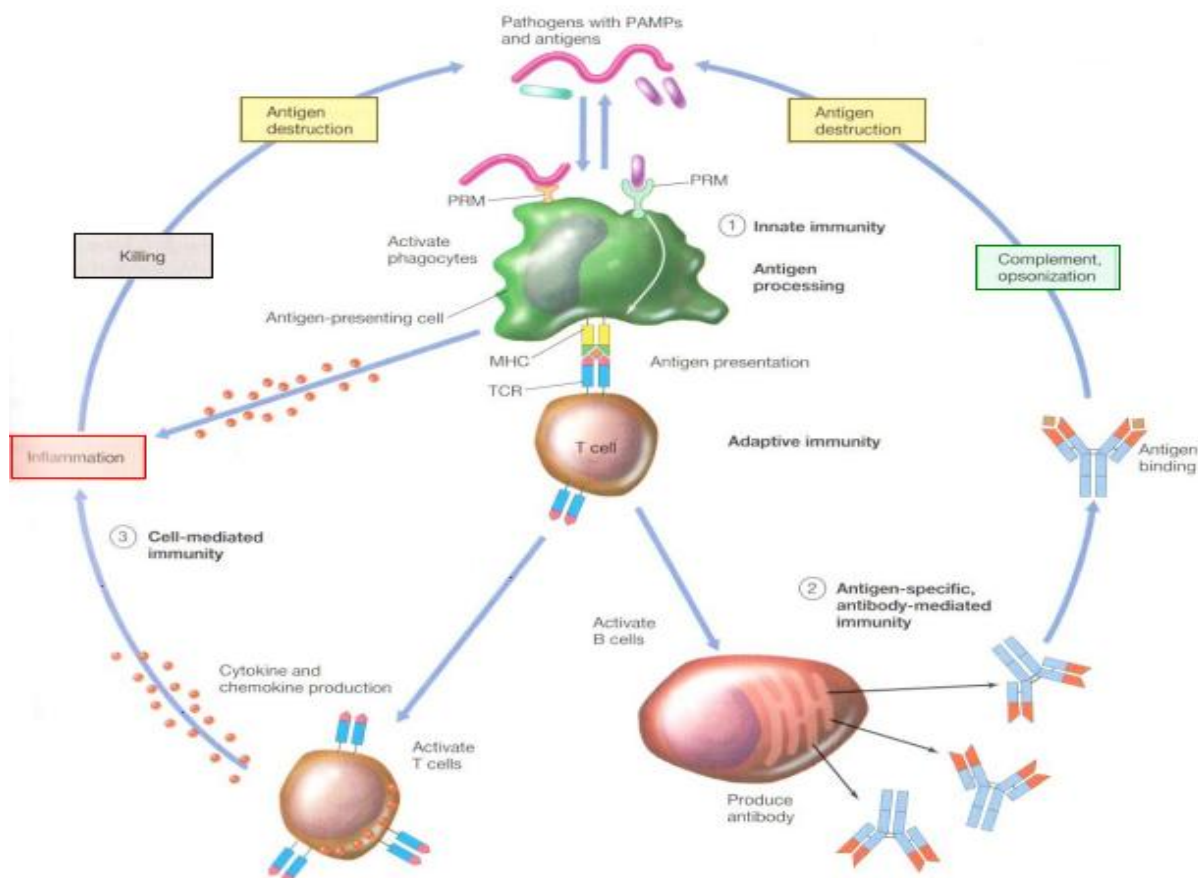
i immunforsvaret vårt har ulike oppgaver. Noen bidrar ved å skille ut forbindelser som påvirker immunsystemet mens andre går direkte til angrep på trusselen.

Antigener

Antigen er en fellesbetegnelse som benyttes om forbindelser eller strukturer som blir gjenkjent av lymfocyttenes reseptorer. De fleste biologiske molekyler kan fungere som antigener som f.eks. sukkerer, lipider, hormoner, komplekse karbohydrater (som f.eks. β -glukaner), fosfolipider, nukleinsyrer og proteiner. Molekylene som starter en immunrespons, også kalt immunogener, må være relativt store. Mindre molekyler (2000-3000Da) må ha hjelp fra såkalte bæremolekyler for å utføre en immunrespons. For at en struktur skal gi en immunrespons må den i tillegg oppfattes som fremmed, altså en trussel for kroppen.

De første cellene som aktiveres ved en immunrespons er fagocytene. Under fagocytose fungerer makrofagene også som antigenpresenterende celler (APCs). De omdanner deler av patogenene til mindre biter, antigener, og viser de fram på celleoverflaten sin. Ved å vise fram antigenene til T-celler blir den adaptive immunresponsen iverksatt ved hjelp av antigenspesifikk interaksjon (Figur 7, del 1) (Madigan, et al., 2009).

Fra aktivering av T-celler deler immunresponsen seg i to, cellemediert og antistoffmediert - immunitet (Madigan, et al., 2009).



Figur 7: En oversikt over immunresponsen: (1) medfødt immunitet, (2) antigen-spesifikk, antistoff-mediert immunitet, (3) celle- mediert immunitet (Madigan, et al., 2009).

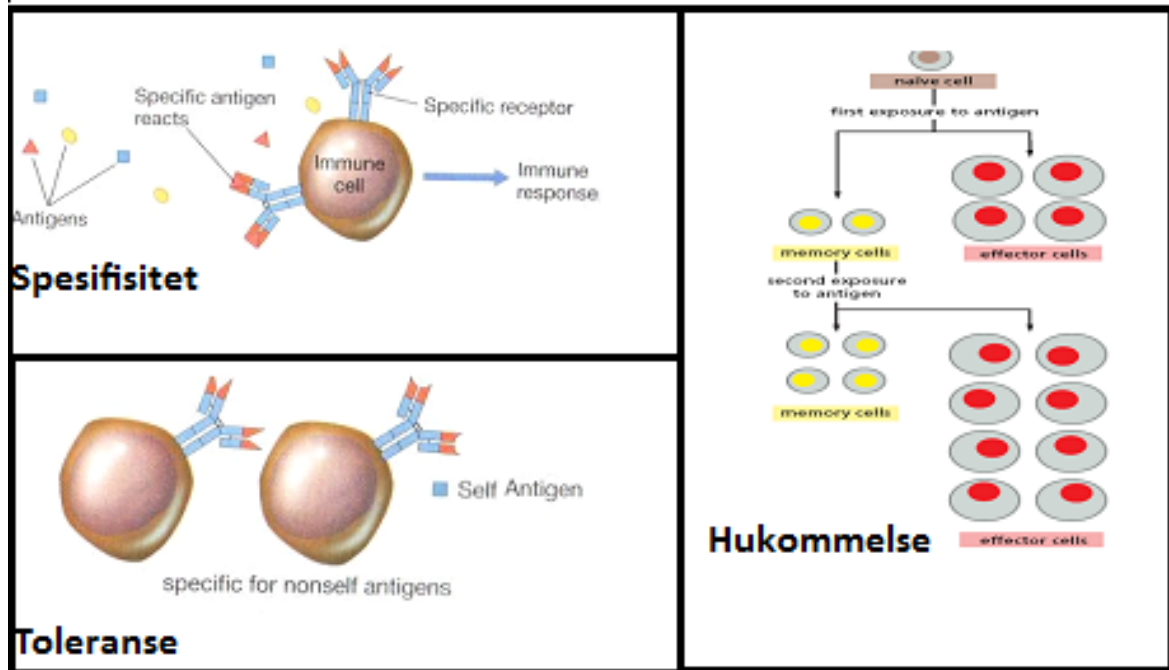
Celle-mediert immunitet

Ved antigenaktivering av T-celler dannes ulike T-celler som $T_{\text{cytotoxic}}$ celler (T_c) og T-hjelper 1 celler (T_H1). T_c cellene har i oppgave å direkte angripe og ødelegge antigenbærende celler. T_H1 cellene arbeider indirekte ved å sekretere cytokiner som aktiverer makrofager til å ødelegge antigenbærende celler (Figur 7 del 3) (Madigan, et al., 2009).

Antistoffmediert immunitet

En annen undergruppe av T-celler er T-hjelper 2 (T_H2) som reagerer med antigenspesifikke B-celler og stimulerer dem til produksjon av antistoffer (immunoglobiner). B-celler produserer antistoff som er spesifikke for et antigen. De løselige antistoffene fester seg spesifikt til antigenet og dette nøytraliserer dem eller merker dem for ødeleggelse (Figur 7 del 2) (Madigan, et al., 2009).

Det adaptive immunsystemet har egenskaper vi ikke finner hos det medfødte immunsystemet. Man sier gjerne at det adaptive immunforsvaret er karakterisert med egenskaper som spesifisitet, hukommelse og toleranse (Figur 8).



Figur 8: Karakteristiske egenskaper ved det adaptive immunsystemet, spesifisitet, toleranse og hukommelse (modifisert fra (Madigan, et al., 2009) og (Alberts, et al., 2008)).

Spesifisitet: Som nevnt tidligere er det store forskjeller mellom det medfødte og det adaptive immunforsvaret. Det medfødte gjenkjenner felles strukturer ved et patogen mens det adaptive gjenkjenner spesifikke strukturer hos et enkelt patogen (Madigan, et al., 2009).

Hukommelse: Det adaptive immunsystemet må møte det bestemte antigenet for å stimulere til produksjon av effektive antigen-spesifikke antistoffer og T-celler (Madigan, et al., 2009). Stimulering av et antigen fører til differensiering og celledeling av native-celler. Mesteparten av cellene blir til effektorceller som utøver sin oppgave og dør. Andre celler blir til hukommelseceller og husker spesifikke antigener. Ved andregangskontakt til samme antigen vil hukommelsecellene svare raskere og mer effektivt enn de native cellene. Videre vil immunresponsen være mye sterkere enn ved førstegangskontakt (Alberts, et al., 2008). Dette prinsippet blir tatt i bruk under vaksinerings, hvor man sprøyter inn døde eller svekkede

patogener for å kunstig stimulere og forbedre immuniteten til farlige patogener (Madigan, et al., 2009).

Toleranse: I et velfungerende immunforsvar må det skilles mellom kroppens egne strukturer, fremmede strukturer fra patogener og ikke-patogener.

Hvis det oppstår feil under utvelgelsen og modningen av lymfocytter kan disse reagere på kroppsegne strukturer slik at immunsystemet går på til angrep på seg selv. Dette kan resultere i autoimmune sykdommer som f. eks leddgikt eller allergier (Lea, 2006), (Murphy, et al., 2008), (Madigan, et al., 2009).

2.3. Cytokiner

Immunresponsen er nøye regulert og krever et tett samarbeid mellom immunceller og deres produkter. Dette samarbeidet kan foregå gjennom direkte kontakt mellom immuncellene som antigenpresentasjon mellom fagocytt og T-celle eller ved signalmolekyler. En stor gruppe av disse signalmolekylene kalles for cytokiner og utgjør en viktig del av reguleringen av immunresponsen (Figur 4) (Lea, 2006).

Cytokiner er små proteiner på rundt 25 kDa som på mange måter ligner hormoner. Men en hovedforskjell er at de fleste cytokinene har lokale effekter i motsetning til hormoners mulighet til å kommunisere over større avstander (Lea, 2006).

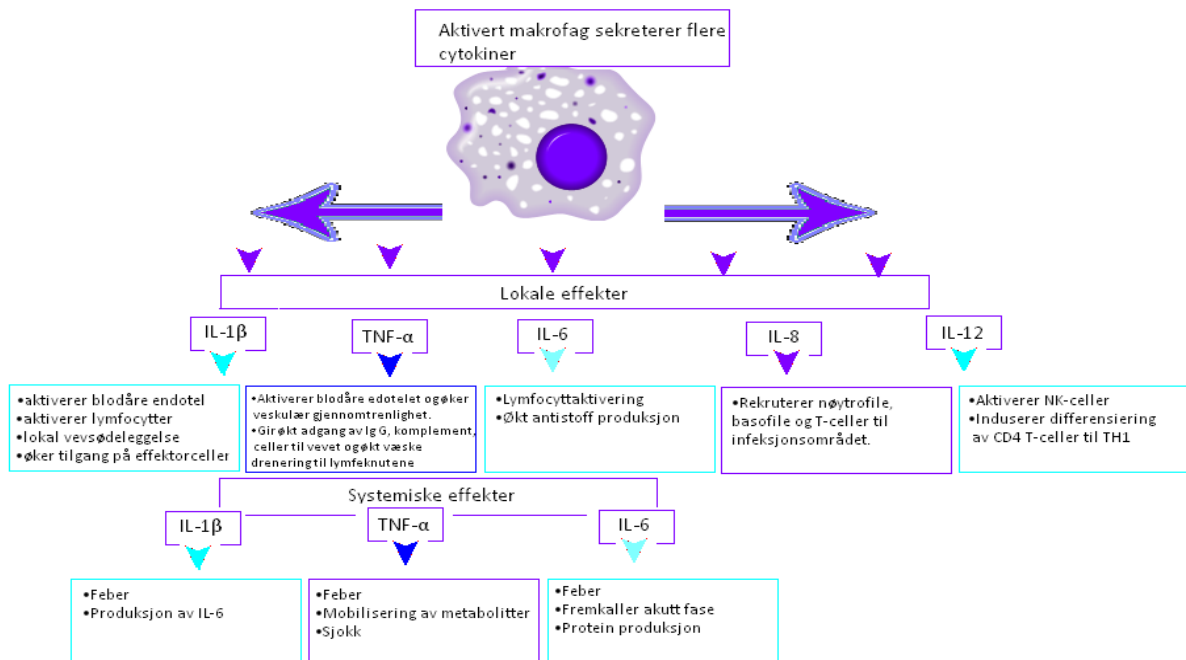
Cytokiner virker som kjemisk kommunikasjon mellom celler, og er for det meste lavmolekylære proteiner eller glykoproteiner. Hvite blodlegemer står for mesteparten av cytokin produksjonen. Flere cytokiner har navn som interleukin-1 (IL-1), inlerleukin-2 (IL-2) osv. Dette er fordi man tidligere trodde at cytokiner kun var kommunikasjon mellom hvite blodlegemer, derfor ble de kalt interleukiner (inter betyr mellom, mens leucos betyr hvit). I dag vet vi at signalmolekylene produseres og benyttes av andre celler enn hvite blodlegemer, derfor er den generelle betegnelsen cytokiner foretrukket (Lea, 2006).

Cytokiner sekretert fra en celle binder seg spesifikt til reseptorer på utsiden av cellen. De kan ha en parakrin effekt, det vil si en effekt på nabocellene. Andre cytokiner binder seg til reseptorer på produserende celle og utfører en selvstimulerende effekt, dette kalles en

autokrin stimulans. Mens noen få cytokiner er mer stabile og har en endokrin aktivitet, altså en effekt på celler langt borte (Lea, 2006) (Murphy, et al., 2008).

Cytokinreseptorbinding aktiverer signaltransduksjonsveier, som sender informasjon over kjernemembranen for å kontrollere aktiviteter som transkripsjon og proteinsyntese. Disse signalene fra cytokinene kan føre til umiddelbare forandringer i cellevekst, differensiering og celledeling (Madigan, et al., 2009). Flere cytokiner kan ha overlappende funksjoner og et cytokin kan utløse mange forskjellige reaksjoner. Cytokinene kan også ha motsatt funksjon eller forsterkende funksjon i tilstedeværelse av andre cytokiner (Lea, 2006).

Celler som tilhører det medfødte immunsystemet stimuleres ved hjelp av mønstergjenkjennende reseptorer og de produserer cytokiner som ved stimulering av MAMPs gir med betennelse-hemmende aktivitet (proinflammatoriske cytokiner). Aktiverte makrofager og monocytter skiller ut en gruppe cytokiner med strukturell variasjon som IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 og TNF- α (Lea, 2006) (Murphy, et al., 2008). Se Figur 9 for utskilling av cytokiner og effekten av disse cytokinene.



Figur 9: Viktige cytokiner og deres oppgaver produsert av makrofager i respons av patogener. Modifisert fra (Murphy, et al., 2008).

IL-1 β , IL-6 og TNF- α (Tumor necrosis factor α) er de cytokinene som ikke bare har en lokal effekt, men også en systemisk effekt, det vil si over større avstander. En av de viktigste effektene de har er på kroppstemperaturen. Gjennom en indirekte mekanisme påvirkes hypotalamus som umiddelbart fører til feber. Økt kroppstemperatur er gunstig for immunsystemet fordi replikasjon av bakterier og virus da vil foregå mindre effektivt mens det adaptive immunforsvaret vil arbeide mer effektivt (Madigan, et al., 2009).

Ved infeksjoner, brannskader, kreftsykdom eller lignende skjer det raske forandringer i proteinmønsteret i serumet. Dette kalles akutfaserresponsen (Lea, 2006). De proteinene som det syntetiseres mer av enn vanlig kalles akutfaseproteiner og syntesen av disse er induert av cytokinene IL-6 og TNF- α . Flere av disse proteinene etterligner handlingene til antistoff (f. eks merking av patogener for raskere fagocytose). Et av disse proteinene er C-reaktivt protein (Madigan, et al., 2009). Disse proteinene har en bred spesifisitet ovenfor MAMPs og med mulighet til å binde et bredere spekter av patogener. Men i motsetning til antistoffene er de produsert i forbindelse med hver stimulans som fører til TNF α og IL-6 sekresjon (Madigan, et al., 2009).

TNF- α produseres i hovedsak av monocytter og makrofager og er viktig i starten av infeksjonsforsvaret. TNF- α er med på å øke blodstrømmen og gjennomtrengeligheten i de små blodårene rundt et infeksjonssted. Dette gir økt transport av viktige plasmaproteiner som antistoff, komplementproteiner og akutfasereaktanter inn i vevet (Lea, 2006).

TNF- α aktiverer også karendotelet til å utrykke celleadhesjonsmolekyler som bidrar til at granulocytter, monocytter og lymfocytter bremses opp i blodbanen og beveger seg mot infeksjonsstedet. Celleadhesjonsmolekylene virker som adresselapper i form av karakteristiske overflatemolekyler som gjør det mulig for lymfocytter og hukommelseceller å finne tilbake til der antigenet opprinnelig kommer fra (Lea, 2006).

IL-6, IL-1 β og TNF- α er pro-inflammatoriske i motsetning til IL-10 som er et anti-inflammatorisk cytokin. IL-10 kalles også for cytokinsynteseinhiberende faktor (CSIF) og produseres i hovedsak av monocytter og har blant annet i oppgave å hemme makrofagfunksjoner (Madigan, et al., 2009).

Cytokinene grupperes etter struktur og funksjon. For eksempel interferoner, interleukiner (IL-1 til IL-28) og tumor-nekrose-faktor-familien (TNF- α). På grunn av struktur kan de igjen deles inn i andre grupper, hematopoietinene som omfatter cytokiner som IL-2 til -12 med unntak av IL-8. Disse har en dominerende α -helixstruktur. Mens IL-8 tilhører kjemokinfamilien som omfatter cytokiner med kombinert α -helix og β -struktur. Kjemokiner skilles gjerne ut av vevet i de tidligste fasene av en infeksjon. (Tidligere mente man at IL-8 var et cytokin derfor kalles det både IL-8 og CXCL8. CXCL8 er et mer beskrivende navn på kjemokinet i forhold til struktur (Lea, 2006) (Madigan, et al., 2009). Videre i oppgaven omtaler vi kjemokinet som IL-8.)

IL-8 mobiliserer og aktiverer nøytrofiler fra blodbanen til å bli vevsmakrofager. IL-8 har en stor rolle i rekruttering av celler og denne oppgaven deles i 2.

1. Ved en infeksjon bidrar IL-8 til at leukocytter forandrer konfirmasjon slik at de klarer å krysse blodåre veggen ved "å presse" seg mellom endotelcellene og inn til inflammasjonen (Madigan, et al., 2009).
2. Kjemokinene viser veien for leukocytene langs en gradient av kjemokinmolekyler bundet til overflaten av endotelcellene. Gradienten øker i konsentrasjon mot infeksjonen (Madigan, et al., 2009).

2.4 Tidligere forsøk med β -glukaner og inflammasjon

Flere *in vitro* testsystemer har vist immunmodulerende effekter av β -glukaner. Ulike forsøk har vist at β -glukaner fra bygg har påvirket komplementaktivering ved å hemme nedbryting av røde blodceller (hemolyse) (Czop & Austen, 1985) (Samuelsen, et al., 2011). Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet og har en viktig rolle når det kommer til inflammasjon og aktivering av fagocytter.

Immunrespons er ofte fastslått ved å måle tilstedeværelse av cytokiner i cellediet etter tilsetninger til dietet med en relativ lang inkuberingstid (ofte flere timer). Flere studier har vist økt cytokinsekresjon fra makrofager og monocytter etter inkubering med β -glukaner fra ulike kornsorter. Makrofager isolert fra mus og fra musecellelinjen P338D1 inkubert med β -glukan fra havre (ObetaG) viste en signifikant økning av IL-1 sekresjon, og en liten økning av TNF- α sekresjon. IL-1 sekresjonen avtok ikke ved å fjerne endotoksiner fra prøven ved bruk

av polymyxin. Det ble også observert at celler fra milten inkubert med ObetaG viste en økt sekresjon av cytokinene IL-2, IFN- γ og IL-4. Det ble konkludert med at ObetaG viste immunmodulerende egenskaper som stimulerer immunfunksjoner *in vitro* og *in vivo* (Estrada, et al., 1997).

I en studie utført på blod fra mennesker inkubert med β -glukaner fra gjær (β -1,3-glukan) ble det påvist en signifikant økning av IL-8 sekresjonen og en mindre økning av TNF- α , IL-6 og IL-10. Studien ble konkludert med at β -glukanet oppregulerte leukocyt aktivitet alene og spesielt i kombinasjon med LPS (Engstad, et al., 2002).

I en studie for å undersøke effekter av matvarekomponenter som β -glukaner fra bygg, ble β -glukaner testet på LPS-stimulerte monocytter og makrofager (THP-1). Ved måling av genekspresjonsnivåene av genene for de ulike inflammatoriske cytokinene IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 og TNF- α , viste tilsetning av β -glukan og LPS en økning i ekspresjonsnivået, sammenlignet med en tilsetning med kun LPS (Chanput, et al., 2010)

Rug β -glukaner med ulik molekylvekt har blitt testet for deres effekt på TNF- α sekresjonen fra humanmonocytter. Alle prøvene inneholdt små mengder LPS, men økningen av TNF- α sekresjonen ved inkubering av β -glukaner var høyere enn responsen av LPS kontaminasjon. En mulig stimulerende effekt av rug β -glukaner ble indikert (Roubroeks, et al., 2000).

Ut i fra disse og flere studier utført (blant annet beskrevet i Volman, et al., 2008) har det blitt hevdet at β -glukaner med ulik opprinnelse kan styrke immunresponsen, i hovedsak ved å påvirke cytokinsekresjonen.

3. Materialer

<u>β-glukanprøver</u>	<u>Produsent</u>	<u>Lot</u>	<u>Lokalisasjon</u>
β-glukanstandarder for molekylvekts bestemmelse M _w = 40.000, 123.000 og 359.000	Megazyme	41105,41103, 90501	Wicklow, Irland
β-glucan (barley), low viscosity	Megazyme	10401	Wicklow, Irland
β-glucan (barley), high viscosity	Megazyme	41001	Wicklow, Irland
β-glucan (oat), medium viscosity	Megazyme	60501b	Wicklow, Irland
β-glucan (oat), high viscosity	Megazyme	60501b	Wicklow, Irland
β-glukan barley, M _w ≈600	Nofima		Ås, Norge
Wellmune, Soluble powder product code F302	BIOThERA	09297-02	Eagan Minnesota USA
Wellmune, Dispersible powder product code F3005	BIOThERA	09240-04	Eagan Minnesota USA

<u>Enzymer</u>	<u>Produsent</u>	<u>Lokalisasjon</u>
endo-cellulase (EGII)	Megazyme	Wicklow, Irland
Lichenase	Megazyme	Wicklow, Irland
Streptavidin HRP (horseradish peroxidase)	BD Biosciences	Durham, USA

<u>Celler/ cellelinjer</u>	<u>Opphav</u>	<u>Lokalisasjon</u>
Buffy Coat	Blodbanken i Oslo	Oslo Universitets- sykehus, Ullevål
THP-1	Svein Olav Kolset	Universitetet i Oslo

<u>Cellekultur utstyr/forbindelse</u>	<u>Produsent</u>	<u>Lokalisasjon</u>
96 br plate (hvit) Nuncleon™ Surface	NUNC™	Danmark
Cellekultur flaske: 25, 75, 175 og 225cm ²	Falcon, BD Biosciences	Durham, USA
Cellekulturplater: 12 og 96 br plate	Falcon, BD Biosciences	Durham, USA
Serological pipettes: 2,5,10 og 25 mL	VWR	Radnor, PA, USA

RPMI-1640 medium	Gibco, Invitrogen™	Carlsbad, CA, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco, Invitrogen™	Carlsbad, CA, USA
L-glutamine 200mM	Gibco, Invitrogen™	Carlsbad, CA, USA
10,000 U/mL penicillin/ 10,000 µg/mL streptomycin	Gibco, Invitrogen™	Carlsbad, CA, USA
2-mercaptoetanol, 50mM	Gibco, Invitrogen™	Carlsbad, CA, USA
Isotonløsning, coulter isoton	Beckman Coulter, inc	Pasadena, CA, USA

Antistoff**Produsent****Lokalisasjon****Capture:**

Biotin goat anti-human IL-1-β	R&D Systems	Minneapolis, USA
Biotin rat anti-human IL-6	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Biotin mouse anti-human IL-8	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Biotin anti-human and viral IL-10	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Biotin mouse anti-human IL-12	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Biotin mouse anti-human TNF	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA

Deteksjon:

Purified goat anti-human IL-1β	R&D Systems	Minneapolis, USA
Purified rat anti-human IL-6	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Purified mouse anti human IL-8	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Purified rat anti-human and viral IL-10	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Purified rat anti-human IL-12	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Purified mouse anti-human TNF	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Recombinant human IL-1beta/IL1 F2	R&D Systems	Minneapolis, USA
Recombinant human IL-6	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Recombinant human IL-8	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Recombinant human IL-10	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA
Recombinant human IL-12	BD Pharmingen™	Franklin Lakes, USA

Materialer

Recombinant human TNF- α BD Pharmingen™ Franklin Lakes, USA

TLR-antistoff:

Purified Mouse Anti-human CD282 (TLR-2) BD Pharmingen™ Franklin Lakes, USA

Purified Mouse anti-human Toll-like receptor BD Pharmingen™ Franklin Lakes, USA

Kjemikalier/løsninger

Produsent

Lokalisasjon

3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidine	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
Bacillus subtilis peptidoglykan	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega	USA
Citric acid	MERCK	Dramstadt,Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
Dulbecco`s Phosphate buffered Saline, PBS	Gibco, Invitrogen™	Carlsbad, CA, USA
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
HCl (37%) i isopropanol	MERCK	Dramstadt,Tyskland
H ₂ SO ₄	MERCK	Dramstadt,Tyskland
KCl	MERCK	Dramstadt,Tyskland
Lipopolysakkarid (LPS) <i>E.coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
Lymphoprep™	Fresenius Kabi Norge AS	Oslo, Norge
MilliQ vann	Millipore	Bedford,MA,USA
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
NaCl	MERCK	Dramstadt,Tyskland
Na ₂ CO ₃	MERCK	Dramstadt,Tyskland
NaHCO ₃	MERCK	Dramstadt,Tyskland
Na ₂ HPO ₄	MERCK	Dramstadt,Tyskland
KH ₂ PO ₄	MERCK	Dramstadt,Tyskland
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
Polymyxin B sulfate, 0,5 µg/mL	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA

Sanquin HPE dilution buffer	Sanquin	Amsterdam, Nederland
Tween 20	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA

<u>Utstyr</u>	<u>Produsent</u>	<u>Lokalisasjon</u>
Eppendorfrør: 1,5 og 2 mL	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
NUNC-immuno plate	NUNC	Roskilde, Danmark
Pipettespisser: 10, 300 og 1000 µL	Biohit	Helsingfors, Finland
Pipettespisser, 300 µL, Finntip®	Thermo scientific	Vantaa, Finland
Pipettespisser, 5000 µL	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Sentrifuge rør: 15 og 50 mL	VWR	Radnor, PA, USA

<u>Instrumenter</u>	<u>Produsent</u>	<u>Lokalisasjon</u>
Cellteller, Z1 Coulter® Particle Counter	Beckman Coulter™	Fullerton, CA, USA
Frysetørker, alpha 1-2 LD plus	Christ	Hannover, Tyskland
Glomax, 96 microplate luminometer	Promega	Fitchburg, WI, USA
Mikroskop, Diavert	Leitz, Leica	Wetzlar, Tyskland
Mikroskop, DMIL	Leica	Wetzlar, Tyskland
Platevasker, wellwash AC	Thermo Electron Corporation	
Plateleser, SPECTROstar ^{Nano}	BMG LABTECH	Ortenberg, Tyskland
Sentrifuge, Labofuge 400 R	Heraeus Instruments	Osterode, Tyskland
Sentrifuge, IEC Centra- M2 centrifuge	International equipment company	USA

<u>Software</u>	<u>Produsent</u>	<u>Lokalisasjon</u>
Microsoft Office XP	Microsoft Corporation	Redmont WA
SPECTROstar Nano	BMG LABTECH	Ortenberg, Tyskland

4. Metoder

4.1 Cellelab

4.1.1 Splitting av celler

Den humane monocytt cellelinjen THP-1 ble dyrket i RPMI-1640 medium tilsatt 10 % FCS, 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 2 mmol/L L-glutamine, 100 U/mL penicillin og 100 µg/mL streptomycin og inkubert i inkubatorskap ved 37°C og 5 % CO₂. RPMI-1640 medium med disse tilsetningstoffene ble benyttet til alle videre forsøk med THP-1 og makrofager.

Cellene ble telt og splittet (fortynnet) 3 ganger i uken. Cellene ble telt ved bruk av en celleteller, og ble da fortynnet 1:20 med isotonløsning, (0,5 mL cellesuspensjon og 9,5 mL isotonløsning). Ved splitting har cellene vanligvis en celletetthet på ca 7-8x10⁵ celler/mL og ble fortynnet til 4x10⁵ celler/mL eller 2,5x10⁵ celler/mL avhengig av hvor mange dager de skulle gå. Fordi cellene forandrer egenskaper over tid ble cellene kastet etter 25 passasjer (ca 2 mnd.) og byttet ut med nye celler lagret i flytende nitrogen.

4.1.2 Differensiering av THP-1 celler til makrofager

Differensiering av THP-1 celler til makrofager ble utført ved å så ut 1*10⁶ celler/mL THP-1 i 12 brønners kulturplater, 1 mL per brønn. Deretter ble 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) i dimetylsulfoksid (DMSO) tilsatt direkte til hver brønn. Cellene ble så inkubert i 48 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Ved differensiering med PMA festet makrofagene seg til platen. Det har blitt vist at denne differensieringsmetoden av THP-1 celler resulterer i ekspresjon av makrofagspesifikke markører som CD11b og CD36, og at cellene får fagocytose egenskaper (Chanput, et al., 2010).

4.2 Tillaging av β-glukanprøver

β-glukanene fra bygg som ble benyttet var Megazymes β-glukanstandarder for molekylvektbestemmelse med M_w (vektbasert gjennomsnittlig molekylvekt) på 40, 123 og 359 KDa, og bygg β-glukaner med høy og lav viskositet fra Megazyme. Det ble også benyttet en β-glukan fra den norske bygg sorten Olve, opprenset ved Nofima med M_w på ca 600KDa. Fra havre ble det benyttet høy og medium viskositet β- glukaner fra Megazyme. Fra gjær ble det benyttet løselig og uløselig Wellmune.

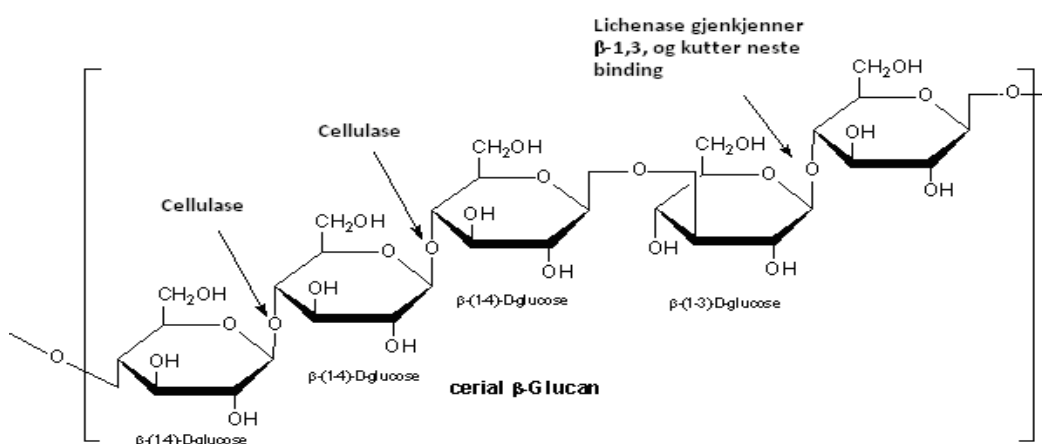
Nøyaktig mengde β -glukan ble løst i milliQ vann til en konsentrasjon på 1 mg/mL til makrofag forsøk og 7,5 mg/mL til forsøk med THP-1. Prøvene ble så plassert på kokende vannbad i 10 - 30 minutter for å løse opp prøvene, med unntak av den uløselig Wellmune prøven, som ikke kunne løses opp men ble suspendert i milliQ vann. Etter at prøvene var fullstendig oppløst ble de alikvotert til rør. Prøvene ble deretter fryst og frysetørket.

Frysetørket β -glukan ble løst opp i forvarmet medium på varmeblokk på 37 °C til en konsentrasjon på 1 mg/mL for makrofager og 7,5 mg/mL for THP-1 og tilsatt cellene til en konsentrasjon på 1mg/mL. Prøvene ble frysetørket for å enkelt lage eksakte konsentrasjoner av β -glukanene, og lage prøver til flere forsøk på en gang. Det er ikke mulig å løse opp β -glukaner direkte i mediet ved koking siden koking av mediet vil føre til denaturering av proteiner i mediet.

4.2.1 Degradering av β -glukanprøver ved bruk av enzymbehandling

β -glukaner ble degradert til oligosakkarider ved bruk av enzymer for å teste om det er hele β -glukan strukturen som gir en respons. Forsøk med enzymbehandlede prøver ble kun utført på makrofager. β -glukanene fra korn (bygg og havre) ble degradert med Cellulase eller Lichenase.

Cellulase gjenkjenner og kutter β -1,4 bindinger mens Lichenase gjenkjenner β -1,3 bindinger og kutter β -1,4 bindinger. Enzymene kutter på disse stedene og på den måten blir β -glukanet degradert (Figur 10).



Figur 10: Kuttsteder for cellulase og lichenase på et β -glukan. Modifisert fra sigmaaldrich (2011)

β -glukanene ble løst opp på vanlig måte i milliQ vann til en konsentrasjon på 1 mg/mL.

5 U Cellulase eller 0,4 U lichenase ble tilsatt per mg β -glukan til hver β -glukanprøve.

Blandingene ble inkubert ved henholdsvis 50 °C i en time (Cellulase) eller ved 40° C i tre timer (Lichenase) på vannbad.

Etter degradering av β -glukanene ble prøvene plassert i kokende vannbad i 5 minutter for å denaturere enzymene. Små alikvoter av enzymbehandlet β -glukan ble oppbevart i eppendorfrør ved -20° C for å kontrollere at degraderingen hadde foregått som forventet.

4.3 Kontroll av enzymdegradering av β -glukanene ved måling av dannede oligosakkarider

Det ble benyttet en selektiv og sensitiv metode for analyse av karbohydrater som separerer anioniske analytter (High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)) til måling av oligosakkaridene.

Oligosakkarider er uladete molekyler, under den høye pHen som ble benyttet under analysen (Eluent A: 200 mM NaOH) blir hydroxylgruppene til suktermolekylene deprotonisert. Det ble dermed dannet ioner av de ellers uladete oligosakkaridene.

Oligosakkaridene ble separert i en ionebytter kolonne. Binding til kolonnen avhenger av ladning, størrelse og konformasjon. Disakkaridet melibiose ble benyttet som internstandard. Ved å sammenligne størrelsen av toppene for melibiose (kjent konsentrasjon av 10 μ g/mL i alle prøver) med toppene for de andre oligosakkaridene kan små forskjeller i injeksjonsvolum og detektorrespons bli kompensert for. Dermed blir de utregnete konsentrasjonene av de forskjellige oligosakkaridene mer korrekte.

Prøvene ble fortynnet med MilliQ vann (1:50), tilsatt intern standard, blandet og deretter sentrifugert i 10 minutter ved 10 000 rpm (IEC centra- M2 centrifuge). Kromatografisystemet ble kjørt med en gradient av tre forskjellige eluenter (Eluent A: 200mM NaOH, Eluent B: 500 mM NaAcetate i 100mM NaOH, Eluent C: Milli Q vann). I begynnelsen av kjøringen blir det bruk mest eluent A for å ionisere oligosakkaridene, slik at de kan interagere med kolonnematerialet. Etter hvert blir det blandet inn mer Eluent B for å gradvis løsne interaksjonen mellom oligosakkaridene og kolonnen.

4.4 Celleforsøk

Til forsøk med makrofager ble cellene sådd ut med en konsentrasjon på 1×10^6 celler/mL med 1 mL pr brønn. Til forsøk med udifferensierte THP-1 celler ble cellene sådd ut med en konsentrasjon på 3×10^5 celler/mL med 1,5 mL pr brønn.

THP-1 cellene ble inkubert i et døgn før testsubstans ble tilsatt cellene. Til makrofagene ble mediet byttet ut og testsubstans ble tilsatt etter 48 timers inkubering med PMA. Alle tilsetninger til begge celletypene ble inkubert i 6 timer ved 37°C og 5 % CO_2 .

4.4.1 Celleforsøk med LPS, polymyxin

LPS finnes på overflaten til gram negative bakterier. LPS er en MAMP og interagerer med PRR, som for eksempel TLR-4. LPS fører til en inflammatorisk reaksjon av cellene og stimulerer til cytokinsekresjon på samme måte som en infeksjon med bakterier.

LPS ble tilsatt cellene i tre forskjellige konsentrasjoner i brønnene, 1000 ng/mL, 100 ng/mL og 10 ng/mL. Den opprinnelige LPS-løsningen på 1 mg/mL ble fortynnet og tilsatt direkte, 15 μL til THP-1 cellene (1,5 mL celler per brønn) og 10 μL til makrofagene (1 mL celler per brønn) til ønsket konsentrasjon.

Polymyxin er et antibiotikum med effekt på gram-negative bakterier. Polymyxin binder seg til lipid A-delen av LPS fra gram negative bakterier og hemmer dermed effekten av LPS på cytokinsekresjonen. LPS finnes overalt og er en vanlig substans i biologiske prøver. Polymyxin ble brukt i celleforsøkene sammen med β -glukanprøvene for å binde eventuell tilstedeværelse av LPS i prøvene. En eventuell nedgang i cytokin sekresjon ville da tyde på en forekomst av LPS i prøven (Tsuzuki, et al., 2001).

Polymyxin ble tilsatt direkte til hver brønn med en resulterende konsentrasjon på 10 $\mu\text{g/mL}$. Det ble benyttet en polymyxin-stockløsning på 0,5 mg/mL.

4.4.2 Tilsetting av TLR- antistoff til cellene.

Antistoff mot TLR-2 og TLR-4 ble tilsatt cellene for å kunne undersøke om eventuelle effekter av β -glukaner på cytokinsekresjon skyldes en forurensing av prøven med bakteriell substanser (for eksempel LPS). TLR er en PRR og TLR-4 og TLR-2 gjenkjenner og reagerer på

henholdsvis LPS fra gram-negative bakterier og peptidoglukan fra gram-positive bakterier. Blokkering av disse reseptorene med antistoff er tenkt å gi en redusert cytokinsekresjon i respons til β -glukanprøvene hvis effekten av prøver skyldes en forurensing med LPS eller peptidoglukan. Dette ble utført kun på makrofager.

0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ og 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ av hvert TLR-antistoff ble tilsatt til hver brønn og inkubert 1 time. Deretter ble 100 ng/mL LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ peptidoglukan eller 1 mg/mL β -glukanprøve tilsatt og cellene ble inkubert videre i 6 timer ved 37 °C og 5 % CO_2 .

4.4.3 CellTiter-Glow® Luminescent Cell Viability Assay og MTT test

Metodene CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay og MTT test ble benyttet for å kunne undersøke om enzymene brukt til degradering av β -glukanprøvene hadde en toksisk effekt på cellene.

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay er en metode for å bestemme antall levende celler ved å kvantifisere mengden ATP tilstede. Mengde ATP vil være en måte å måle tilstedeværelse av metabolske aktive celler. Mengden ATP tilstede ble målt ved bruk av luminiscens (Promega Corporation, 2011).

MTT er kolorimetrisk assay basert på kvantifisering av cellevekst og levedyktighet. Assayet er basert på fargeforandring ved spalting av MTT salt (gult) til formazan krystaller (lilla) av metabolske aktive celler. Denne fargeløsningen blir kvantifisert ved avlesning i spektrofotometer (Roche applied science, 2005).

THP-1 celler ble differensiert til makrofager på vanlig måte. Det ble benyttet hvite 96 brønners plater (100 μL pr brønn) for CellTiter-Glo og i gjennomsiktige 96 brønners plater for MTT. 0,4 U/mL Lichenase og 5 U/mL cellulase ble tilsatt hvert sitt rør med MilliQ-vann og kokt i 5 minutter for å denaturere enzymet. Deretter ble det fryst, frysetørket og tilsatt cellene.

CellTiter-Glo: Etter endt inkubering av enzym ble 100 $\mu\text{L}/\text{brønn}$ CellTiter Glo tilsatt. Platen ble så ristet i 2 minutter på platerister og inkubert i 10 minutter før avlesning i luminometer.

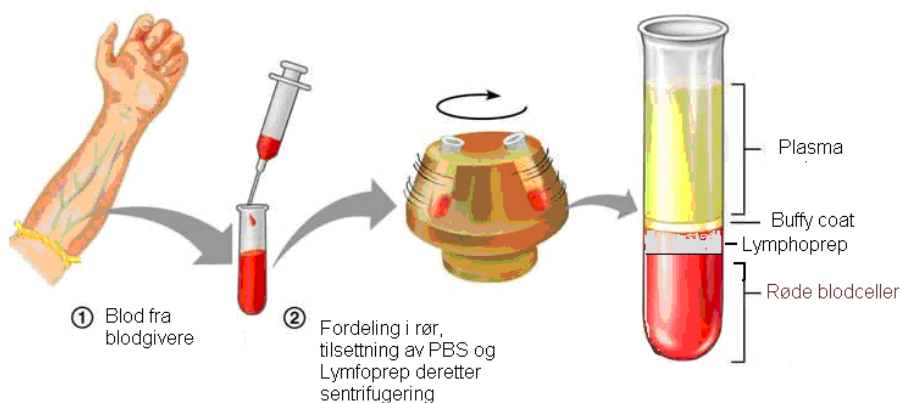
MTT: Etter endt inkubering ble 15 μL MTT tilsatt hver brønn og inkubert i 2 timer ved 37 °C og 5 % CO_2 . Mediet ble sugd av og 100 $\mu\text{L}/\text{brønn}$ 0,04 HCl i isopropanol ble tilsatt til cellene.

Platen ble inkubert noen minutter ved romtemperatur. Deretter ble løsningen pipettert opp og ned til formazankrystallene løste seg fullstendig opp og platen ble lest av ved 562nm på plateleseren.

4.4.5 Isolering av perifere mononukleære blodceller fra buffycoat

For å undersøke om THP-1 cellene er en god modell for immunceller fra blodet vårt ble forsøk med PBMC (Perifere mononukleære blodceller) utført.

Med utgangspunkt fra blod (buffycoat) ble PBMC isolert ved hjelp av gradientsentrifugering. Denne teknikken går ut på å benytte cellenes ulike tetthet og et gradientmedium. Celler med lavere tetthet enn mediet vil legge seg over mediet mens celler med høyere tetthet vil legge seg under. Som vist i Figur 11 vil de mononukleære cellene legge seg mellom plasma /PBS sjiktet og gradientmediet (i dette tilfellet Lymphoprep), mens cellene med større tetthet enn gradientmediet vil legge seg under, som de røde blodcellene (Lea, 2006).



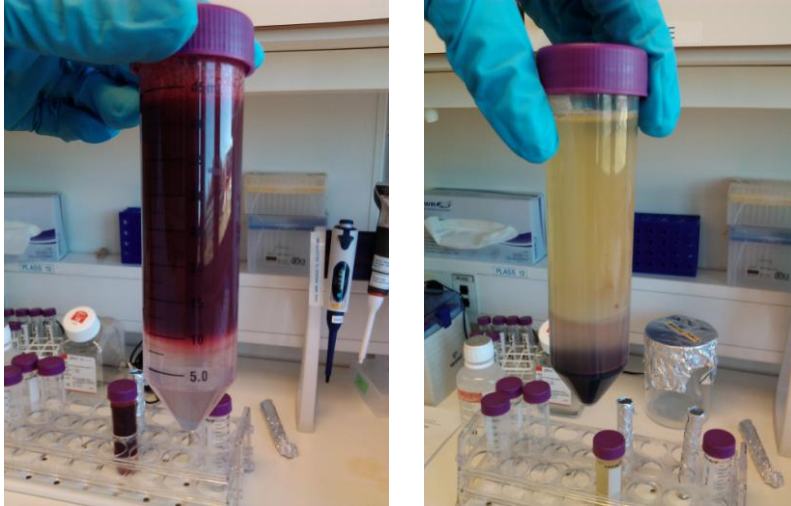
Figur 11: Skjematisk bilde over isolering av humane monocytter fra buffycoat.

Innholdet fra en enhet buffycoat fra Blodbanken (ca 40-60 mL) ble fordelt i 4 rør, ca 10-12 mL. PBS ble deretter tilsatt til et endelig volum på 35 mL, og blandingen ble blandet godt.

10 mL Lymphoprep ble så pipettert forsiktig i bunnen av hvert rør (Figur 12).

Røret med tilsatt Lymphoprep og PBS ble sentrifugert ved 500xg (1100rpm) i 30 minutter ved romtemperatur uten brems (Figur 11 og Figur 12).

Plasma sjiktet (det øverste laget) ble fjernet med en pipette. Det hvitaktige sjiktet (PBMC) mellom plasmasjiktet og Lymphoprepsjiktet ble forsiktig overført til et 50 mL falcon rør, ca 5-10 mL, og røret ble så fylt opp til 50 mL med PBS.



Figur 12: (1)Tilsettelse av Lymphoprep til bunn av røret med blod, (2) resultat av gradientssentrifugering med lag av plasma, buffycoat, Lymphoprep og røde blodceller.

PBMC-celler og PBS ble så sentrifugert ved 500xg (1100rpm) i 10 minutter ved romtemperatur. Løsningen ble helt av og cellene ble resuspendert i 50 mL PBS. Dette ble utført to ganger.

Cellene ble deretter samlet i to 50 mL rør, sentrifugert i 5 minutter ved 300xg (800 rpm), løsningen ble helt av og hver cellepellet resuspendert i 20-25 mL PBS. Cellene ble telt ved å ta 10 mL isotonløsning + 100 μ L celledensitasjonsmiddel. (1:100 fortykning)

Cellene ble igjen sentrifugert og resuspendert i RPMI 1640 medium med 10 % FCS, 2 mmol/l L-Glutamine, 100 U/mL penicillin og 100 g/mL streptomycin til ønsket konsentrasjon. Til fiberforsøk ble en konsentrasjonen på 4×10^6 celler/mL benyttet. Cellene ble sådd ut i 12 brønnersplater, 500 μ L pr brønn. Deretter ble enten 500 μ L oppløst fiber (1 mg/mL) eller LPS (100 ng/mL) i medium (500 μ L) tilsatt og cellene (med en sluttkonsentrasjon på 2×10^6 celler/mL) ble inkubert i 6 timer ved 37 °C og 5 % CO₂.

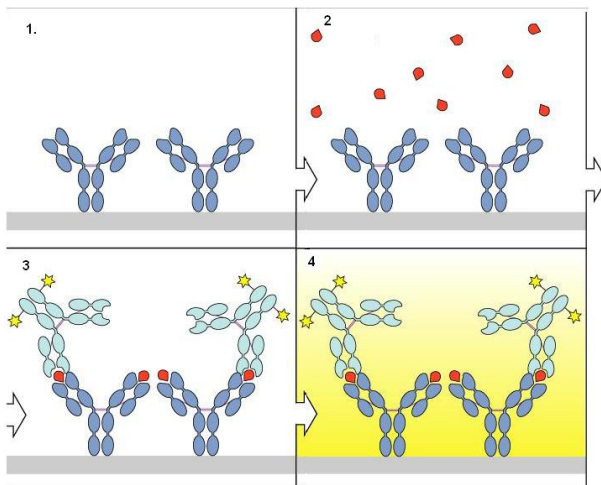
Etter 6 timer ble supernatanten tatt av og sentrifugert, før den ble overført til eppendorfrør og fryst fram til analysing.

4.5. Måling av cytokinsekresjon ved hjelp av ELISA

For å kartlegge cytokinsekresjonen til THP-1 celler og makrofager ble ELISA metoden benyttet.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA er en betegnelse brukt på alle former for enzymimmunoassay med kolorimetrisk. Denne immunologiske teknikken dreier seg om påvisning av antigen-antistoffreaksjonen for å bestemme cellens sekresjon av de ulike cytokinene. Figur 13 viser skjematiske de ulike trinnene for kvantifisering av cytokinene (antigenene).



Figur 13: (1) Festing av capture antistoff, (2) tilsetning av prøve, (3) deteksjonsantistoff med biotin fester seg til prøven(antigen) som har festet seg til capture antistoff, (4) deteksjon (Lea, 2006).

Etter det første koblingstrinnet er det viktig å tilsette et irrelevant protein for blokkering av uspesifikke interaksjoner, i dette oppsettet blir Bovine serum albumin (BSA) benyttet.

Videre i oppsettet er det også viktig med blokkering av uspesifikke interaksjonen, dette gjøres i nærvær av en detergent, i denne prosedyren blir tween 20 tilsatt til vaskebufferen (Lea, 2006).

For å synliggjøre den immunologiske reaksjonen er merking av antistoffene nødvendig. Det blir benyttet biotin merket antistoff og streptavidin konjugert til enzymet (HRP) i denne

Metoder

prosedyren. Streptavidin bindes til biotin og det konjugerte HRP som gir enzymaktivitet for deteksjon ved bruk av et passende substratsystem.

Streptavidin binder seg til biotin med svært høy affinitet, fordi den har 4 bindingssteder for biotin og dette utnyttes for å øke følsomheten i deteksjonstrinnet (Lea, 2006).

Tillaging av buffere til ELISA:

Coatingbuffer: 0,1 M Karbonat/ Bikarbonat buffer pH 9,6

Løsning A: 1,06 g Na_2CO_3 ble veid inn og fortynnet med 100 mL destillert vann.

Løsning B: 1,68 g NaHCO_3 ble veid inn og fortynnet med 200 mL destillert vann.

Løsning A og B ble blandet til pH ble 9,6.

Vaskebuffer: PBS + 0,01 % Tween 20

Tillaging av PBS stockløsning, Tabell 2

Tabell 2: Mengde av ulike kjemikalier til 1L destillert vann for å lage 1L 10x PBS stockløsning

Kjemikalie	Innveid mengde (g)
NaCl	80
KCl	2
Na_2HPO_4	20
KH_2PO_4	4

pH ble justert til 7,2-7,3.

Fortynningsbuffer: Sanquin HPE dilution buffer

Blokkeringsbuffer: PBS med 5 % BSA

Substratbuffer: 0.05 M Fosfat-Citrate Buffer

Det ble veid inn 7.3 g Na_2HPO_4 og 5.1 g citric syre fortynnet i en liter destillert vann, pH ble justert til 5 hvis nødvendig og løsningen ble deretter autoklavert.

1. Coating, antistoff festes til den faste fasen (platen).

Gitt mengde antistoff fra Tabell 3 ble tilsatt 6 mL coatingbuffer per plate.

Tabell 3: Sluttkonsentrasjon, mengde capture antistoff tilsatt 6 mL coatingbuffer per plate for hvert cytokin.

Capture antistoff (0,5 mg/mL)	Slutt konsentrasjon ($\mu\text{g/mL}$)	Tilsatt capture antistoff til 6 mL coatingbuffer pr plate (μL)
Purified rat anti-human IL-6	2	24
Purified mouse anti-human IL-8	2	12
Purified rat anti-human, viral IL-10	1	12
Purified Anti Human TNF	2	24
Purified goat anti-human IL-1 β	4	48

Det ble tilsatt 50 μL capture antistoff i coatingbuffer til hver brønn. Platen ble oppbevart i kjøleskap over natten.

2. Blokkering

Platene ble vasket 3 ganger med PBS Tween (100 μL per brønn).

Deretter ble det tilsatt 70 μL blokkeringsløsning per brønn og platen ble satt på vippebrett, på 30 rpm ved romtemperatur i 1 time.

Til vasketrinnene ble platevasker benyttet.

3. Forberede substrat løsning:

1 tablett 3,3', 5, 5'- Tetramethylbenzidine ble løst i 1 mL DMSO i et 15 mL sentrifugerør.

Røret ble beskyttet fra lys ved bruk av aluminiumsfolie. 1 tablett gir 10 mL substratløsning som er nok til en plate.

4. Tilsetting av prøve

Løsninger til standardkurver ble laget fra standarder i konsentrasjoner gitt i Tabell 4.

Tabell 4: Konsentrasjoner av de ulike standardene til standardkurven.

IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
500	3000	3000	5000	5000
166,7	1000	1500	3000	3000
55,5	333	500	1000	1000
18,5	111	166,7	333	333
6	37	55,5	111	111
2	12	18,5	37	37
0,6	4	6	12	12
0,2	1,4	2	4	4
0	0	0	0	0

Det ble også laget kontroller av stamløsningen, 50 pg/mL.

En oversikt over de ulike fortytningene for hvert cytokin og typer celler er gitt i Tabell 5.

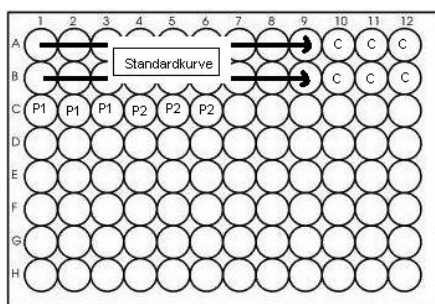
Tabell 5: Ulike fortytninger benyttet for hvert cytokin for hvilke celler.

Cytokin	Makrofag			THP-1			PBMC		
	kontroll	lav stimulering	høy stimulering	kontroll	lav stimulering	høy stimulering	kontroll	lav stimulering	høy stimulering
IL-1- β	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
IL-6	1:1	1:1	1:20	1:1	1:1	1:1			
IL-8	1:200	1:500	1:2000	1:1	1:10	1:20	1:100	1:200	1:500
IL-10	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1			
TNF- α	1:1	1:1	1:100	1:1	1:1	1:10	1:1	1:1	1:10

Løsningene ble satt på is for at alle skal ha samme temperatur.

Platen ble vasket 5 ganger med PBS Tween (100 μ L per brønn).

- 50 μ L av standard ble tilsatt i duplikat.
- 50 μ L av prøvene og kontroller ble tilsatt til hver brønn i triplikat.
- 50 μ L av kontrollprøvene på 50 pg/mL pipettert i triplikat (Figur 15 for plateoppsett).



Figur 14: Mal over plateoppsett, standardkurven i økende konsentrasjon, kontrollprøvene for standardkurven C og prøvene (P1-2).

Platen ble inkubert i 1 ½ time ved romtemperatur på vippebrett.

5. Deteksjons antistoff

Prøvene ble fjernet fra platen ved bruk av multikanal pipette og vasket 5 ganger med 100 µL PBS Tween per brønn. Til 1 plate ble det brukt 6 mL HPE-buffer og en gitt mengde deteksjonsantistoff, se Tabell 6.

Tabell 6: Mengde deteksjonsantistoff (µL) til 6 mL HPE

Deteksjonsantistoff	Deteksjonsantistoff per 6 mL HPE (µL)
Biotin rat anti-human IL-6	12
Biotin mouse anti-human IL-8	12
Biotin anti-human and viral IL-10	3
Biotin mouse anti-human TNF	6
Biotin goat anti-human IL-1-β	24

50 µL deteksjonsantistoff ble tilsatt hver brønn, og platen ble inkubert ved romtemperatur på svingbrett i 1 time.

6. Streptavidin horse-radish-peroxidase (HRP)

Platen ble vasket 5 ganger med PBS Tween (100 µL per brønn). 0,6 µL enzym (horse-radish-peroxidase) ble tilsatt til 6 mL HPE buffer.

50 µL ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 30 min ved romtemperatur på svingbrett.

7. Substrat

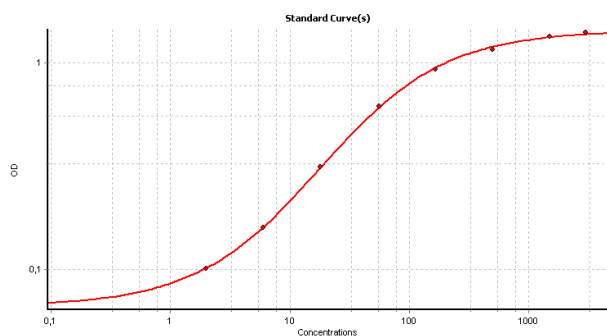
Platen ble vasket 5 ganger med PBS Tween (100 μL per brønn), PBS ble stående i platen ca 30 sekunder mellom hvert vasketrinn for å fjerne resterende enzym.

9 mL phosphate citrat buffer og 2 μL H_2O_2 (30 %) løsning ble tilsatt substrattabletten rett før bruk (Figur 15). 50 μL substratløsning ble tilsatt hver brønn og inkubert i 10 min i mørket på svingbrettet. Etter 10 min ble reaksjonen stoppet ved å tilsette 50 μL 2 N H_2SO_4 til hver brønn (Figur 15).



Figur 15: (1) tilsetting av prøve, (2) fargereaksjon ved tilsetning av substrat, (3) substratreaksjonen stoppet vha H_2SO_4 .

Platen ble avlest vha plateleser ved 450nm innen 30 minutter. For analysering av resultatene ble det valgt å lage en standardkurve med 4 parameter fit, basert på gjennomsnittet, med logaritmisk tilnærming. En av fordelene med dette er at man kan benytte større deler av standardkurven. Se Figur 16 for eksempel på standardkurve.



Figur 16: Et eksempel på en logaritmiskstandardkurve med 4 parameter fit, basert på gjennomsnittet.

5. Resultater

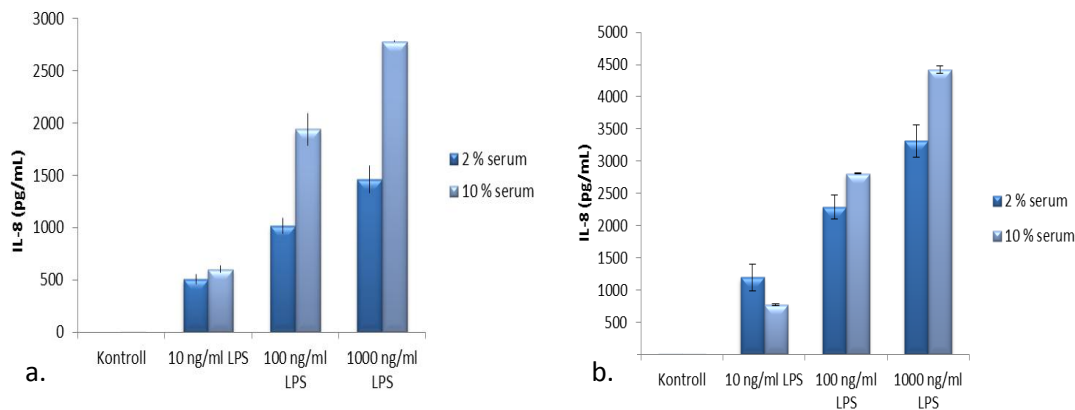
Effekten av de ulike β -glukanene på cytokinsekresjonen fra THP-1 celler og makrofager ble målt ved bruk av ELISA. Hvert celleforsøk ble utført med duplikater av hver prøve, og ved analyse av cytokinsekresjonen ble hver prøve analysert med 3 paralleller som det ble tatt gjennomsnitt av. Tilslutt ble det beregnet gjennomsnitt av de 2 brønnene fra celleforsøket med tilhørende standardavvik.

Siden vi ikke hadde så stor erfaring med THP-1 cellene fra før ble test systemet først optimalisert.

5.1 Optimalisering av test systemet med THP-1 celler

Serum og cellekonsentrasjon:

Effekten av 2 og 10 % serum i cellemediet ved bruk av to ulike cellekonsentrasjoner ($3 \cdot 10^5$ og $5 \cdot 10^5$ celler/ml) på LPS-indusert IL-8 sekresjon ble testet (Figur 17).



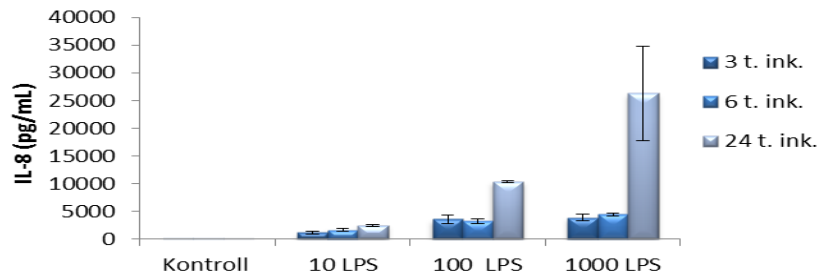
Figur 17: Effekt av 2 og 10 % serum på LPS-indusert IL-8 sekresjon. (a.) $3 \cdot 10^5$ celler/mL og (b.) $5 \cdot 10^5$ celler/mL. Cellene ble inkubert i 6 timer med 3 forskjellige konsentrasjoner av LPS (10, 100 og 1000 ng/mL). Et representativt forsøk.

Bruk av 10 % serum i cellemediet ga høyere cytokinsekresjon enn 2 % serum, derfor ble medium med 10 % serum benyttet for alle videre forsøk. Samme tendens ble også observert med de forskjellige cellekonsentrasjonene og vi valgte å fortsette med $3 \cdot 10^5$ celler/mL som

et kompromiss mellom høy respons i form for cytokinsekresjon og av praktiske hensyn ved mindre forbruk av celler.

Inkubasjonstid:

For å bestemme optimal inkubasjonstid ble cellene inkubert med LPS i 3, 6 og 24 timer (Figur 18).



Figur 18: Effekt av økende inkuberingstid (3,6 og 24 t) på IL-8 sekresjon fra THP-1 celler i respons til 3 forskjellige LPS konsentrasjoner (10, 100 og 1000 ng/mL). Det ble utført 2 forsøk, og figuren viser ett representativt forsøk.

En inkubasjonstid på 24 timer ga mye høyere IL-8 sekresjon enn en inkubasjonstid på 3 eller 6 timer. Denne høye cytokinkonsentrasjonen i cellemediet kan i kombinasjon med den lange kontakttiden på 24 timer har muligens ført til en sekundær effekt på cellene. Det vil si at cytokinene muligens har bundet seg til reseptorer på samme cellene som sekreterte dem og utført en stimulerende effekt (autokrin stimulan). For å måle mest mulig av den primære effekten av prøvene på cellene ble en kortere inkubasjonstid valgt for forsøkene. En inkubasjonstid på 6 timer har den fordelen at en variasjon i inkubasjonstid på grunn av for eksempel pipetteringen mellom de ulike forsøkene eller brønnene ikke spiller en like stor rolle som ved en kortere inkubasjonstid. Derfor ble det valgt en inkubasjonstid av 6 timer for alle videre forsøk.

Differensiering av THP-1 til makrofager:

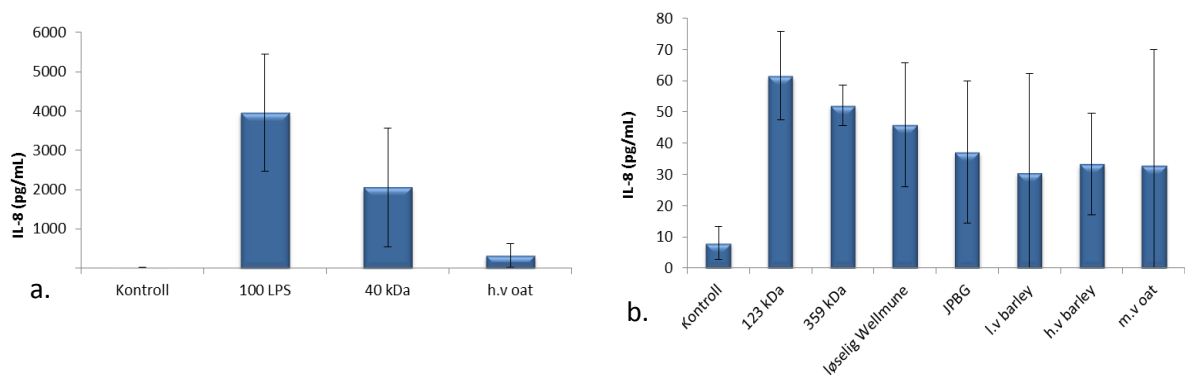
For å differensiere THP-1 cellene til makrofager ble de inkubert med PMA fortynnet i DMSO i 48t. DMSO kan være toksisk for cellene, men DMSO i den konsentrasjonen som ble brukt til differensiering viste ingen toksisk effekt på cellene (resultater ikke vist.)

Makrofagene festet seg til cellekulturplaten og ga en økt cytokinsekresjon som forventet. For å kunne si noe om β -glukaners immunstimulerende effekt, ble det utført en rekke forsøk for å kartlegge cytokinprofilen ved inkubering av LPS og ulike β -glukanprøver på THP-1 og makrofager (delkapittel 5.2-5.3).

5.2 Cytokin sekresjon fra THP-1 celler ved stimulering med ulike β -glukanprøver

Effekten av følgende β -glukaner på cytokinsekresjonen fra THP-1 celler ble testet: β -glukanet opprenset ved Nofima ($M_w \approx 600$) (JPBG), Megazyme low viscosity barley β -glucan (l.v barley), Megazyme high viscosity barley β -glucan (h.v barley), β -glukanstandarder isolert fra bygg for molekylvekts bestemmelse (40, 123 og 359 kDa), Megazyme medium viscosity oat β -glucan (m.v oat), Megazyme high viscosity oat β -glucan (h.v oat) og Wellmune soluble powder (løselig Wellmune). LPS ble brukt som en positiv kontroll.

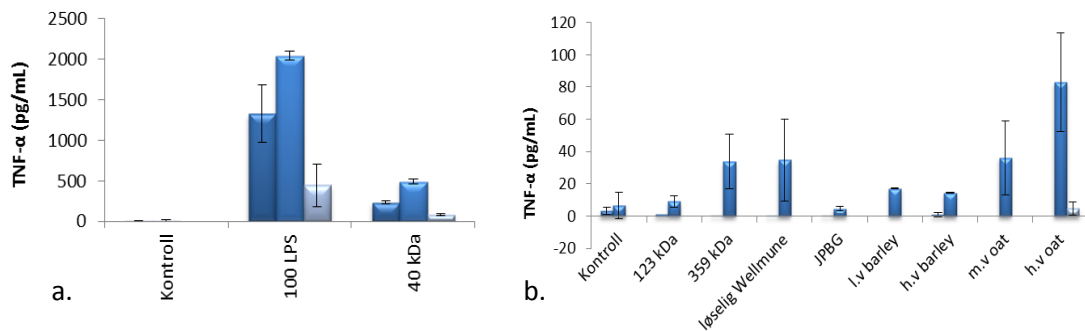
THP-1 cellene ble inkubert med LPS og de ulike β -glukanprøvene i 3 uavhengige celleforsøk med unntak av h.v oat og m.v oat som bare ble brukt i 2 av de 3 forsøkene, og deretter ble sekresjonen av IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6 og IL-10 målt (Figur 19-20).



Figur 19: Effekt av ulike β -glukanprøver på IL-8 sekresjonen fra THP-1. (a.) Sekresjon i respons på LPS, 40 kDa og h.v oat (b.) Sekresjon i respons på β -glukaner bortsett fra 40 kDa og h.v. oat. Resultatene er snitt av 2-3 forsøk med standardavvik.

Figur 19 viser at LPS og 40 kDa gir en kraftig økning i IL-8 sekresjonen i forhold til kontrollen og de andre β -glukanene. På grunn av disse høye verdiene ble det laget 2 Figurer, slik at forskjellen mellom de andre β -glukanene ble synlige i separat Figur. Med de andre β -glukanene ser man en generell økning fra kontrollen men også store standardavvik spesielt på JPBG, l.v barley og m.v barley (Figur 19b) og h.v oat (Figur 19a).

TNF- α sekresjonen fra THP-1 cellene viste store forskjeller mellom de ulike forsøkene (Figur 20). Ingen av prøvene bortsett fra 40 kDa β -glukan og LPS ga en tydelig respons i forhold til kontrollen.



Figur 20: Effekt av ulike β -glukanprøver på TNF- α sekresjonen fra THP-1. (a.) Sekresjon i respons på LPS, 40 kDa og h.v oat (b.) Sekresjon i respons på β -glukaner bortsett fra 40 kDa og h.v. oat. Resultatene er 3 ulike forsøk med standardavvik.

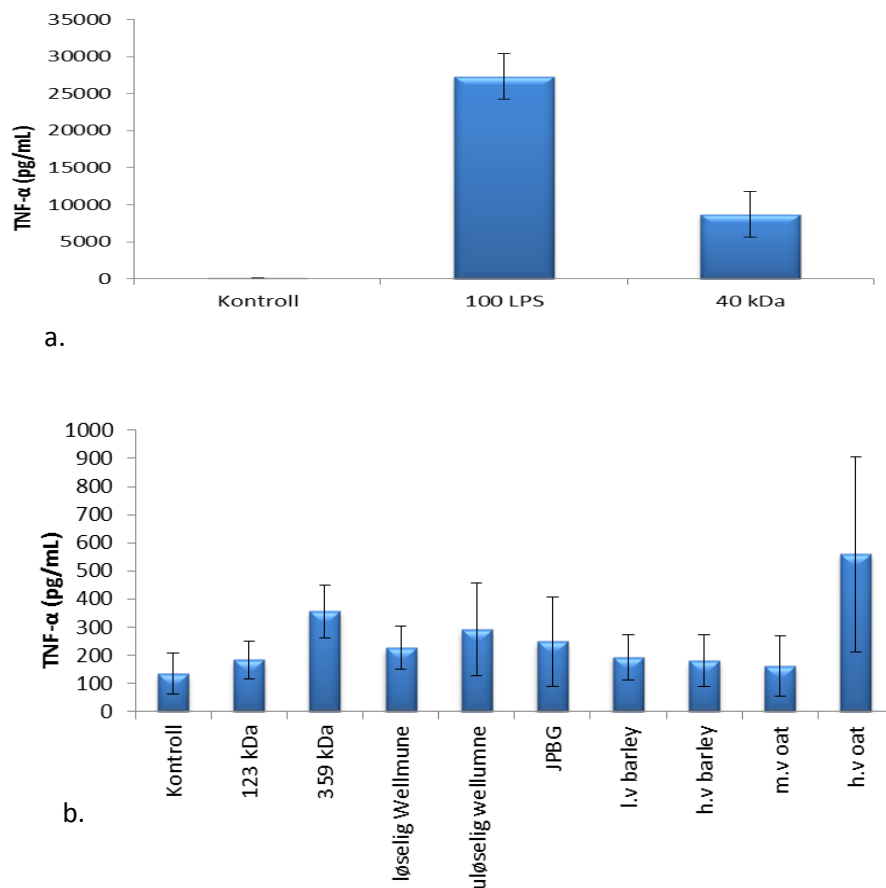
Sekresjon av cytokinene IL-1 β , IL-6 og IL-10 fra THP-1 cellene var for lav (under deteksjonsgrensen) og ble ikke tatt med i videre arbeid.

5.3 Cytokin sekresjon fra makrofager ved stimulans av β -glukanprøver

De samme β -glukanprøvene som ble testet på THP-1 celler ble også testet på makrofager. I tillegg ble Wellmune dispersible powder (uløselig Wellmune) inkludert fordi løselig Wellmune ga effekt.

På grunnlag av 4 ulike celleforsøk ble gjennomsnittlig sekresjon beregnet. LPS og uløselig Wellmune var kun med på to forsøk. LPS ble valgt å ta bort som positiv kontroll fordi 40 kDa kunne benyttes som positiv kontroll isteden. Begge β -glukanene fra havre (mv og h.v oat) var kun med i tre av celleforsøkene.

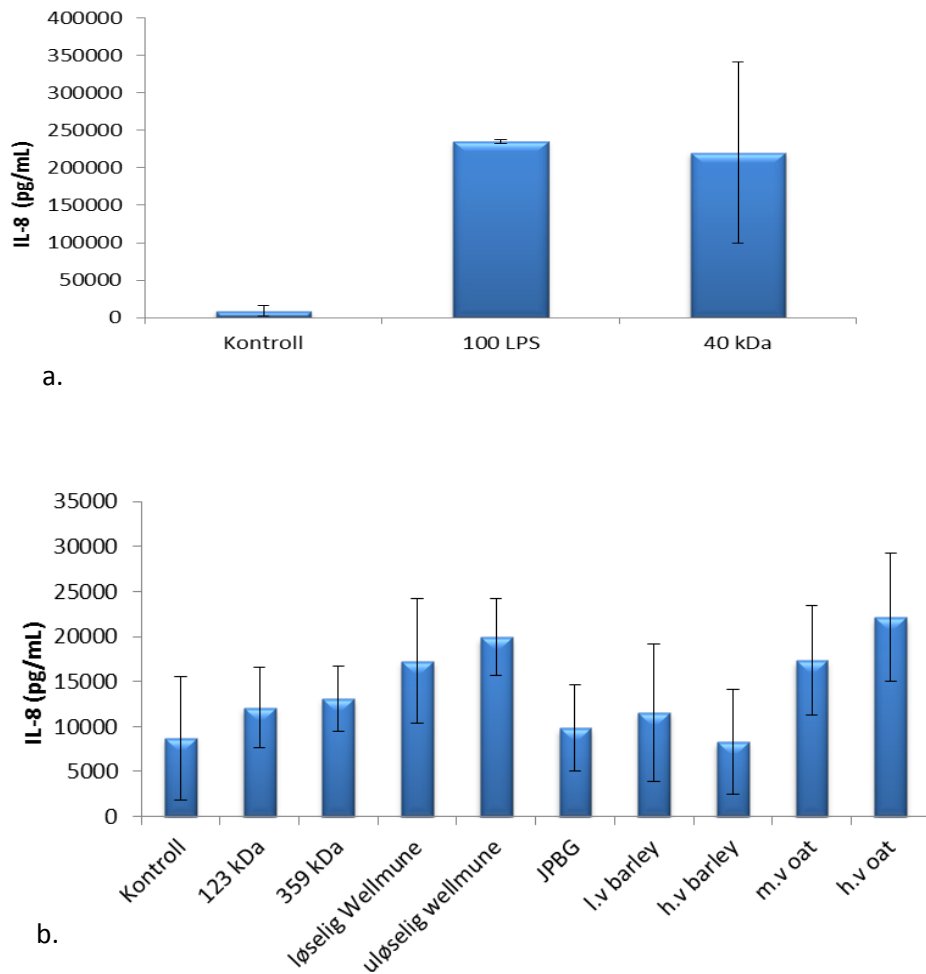
Sekresjon av TNF- α , IL-8 og IL-1 β fra makrofagene er vist i Figur 21-23. Alle cytokinene ble sekretert i større grad ved inkubering med LPS og 40 kDa sammenlignet med inkubering med de andre β -glukanprøvene. Resultatene med LPS og 40 kDa er derfor vist i egen Figur for å kunne synliggjøre forskjellen mellom de andre β -glukanene.



Figur 21: Effekt av ulike β -glukanprøver på TNF- α sekresjonen fra makrofager. (a.) Sekresjon i respons på LPS og 40 kDa (b.) Sekresjon i respons på β -glukaner bortsett fra 40 kDa. Resultatene er gjennomsnitt av 4 forsøk med standardavvik.

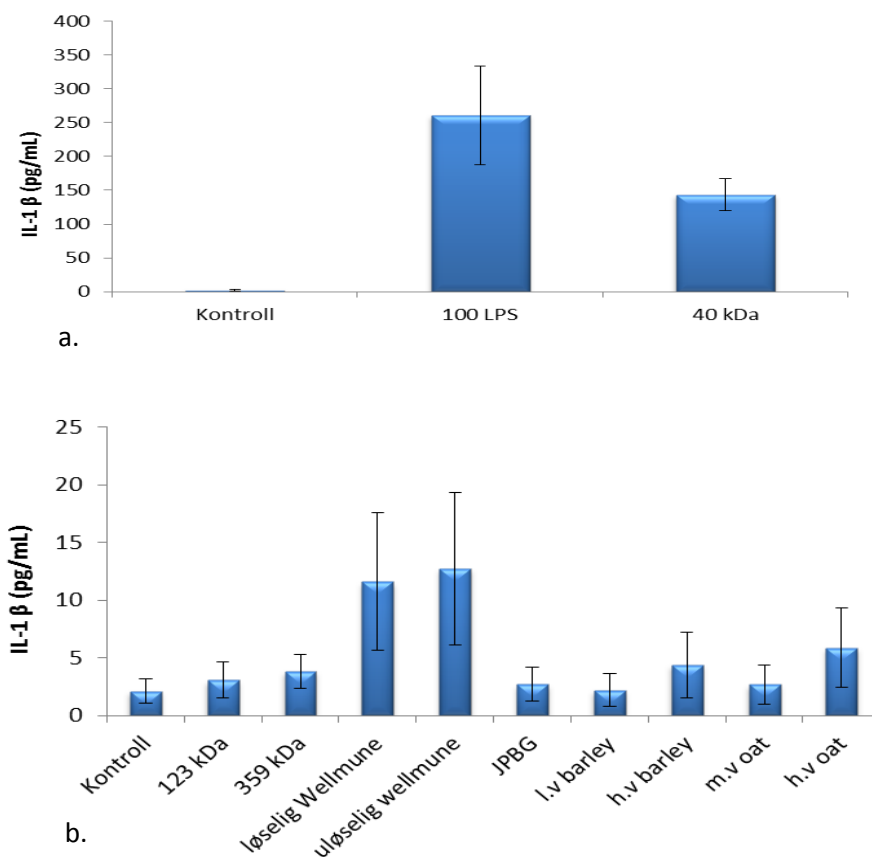
Figur 21 viser at TNF- α sekresjonen fra makrofagene ble økt ved inkubering med 359 kDa (bygg β -glukan), løselig og uløselig Wellmune (fra gjær) og h.v. oat (fra havre).

Gjennomsnittet av resultatet fra forsøk fra ulike dager gir relativt store standardavvik, så det er vanskelig å fastslå om noen av de andre β -glukanene stimulerer til økt TNF- α sekresjon i forhold til kontrollen.



Figur 22: Effekt av ulike β -glukanprøver på IL-8 sekresjonen fra makrofager. (a.) Sekresjon i respons av LPS, 40 kDa (b.) Sekresjon i respons av β -glukaner, bortsett fra 40 kDa. Resultatene er snitt av 4 forsøk med standardavvik.

Figur 22 viser en tydelig økning av IL-8 sekresjonen ved inkubering med løselig og uløselig Wellmune, m.v oat og h.v oat. På grunn av store variasjoner mellom de ulike forsøkene er det store standardavvik. Det kan være at inkubering med 123 kDa, 359 kDa, l.v barley og m.v oat gir en svakere økning i IL-8 sekresjonen i forhold til kontroll, derimot gir ikke JPBG og h.v barley noen synlig økning i IL-8 sekresjonen.



Figur 23: Effekt av ulike β -glukanprøver på IL-1 β sekresjonen fra makrofager. (a.) Sekresjon i respons av LPS, 40 kDa (b.) Sekresjon i respons av β -glukaner bortsett fra 40 kDa. Resultatene er snitt av 4 forsøk med standardavvik.

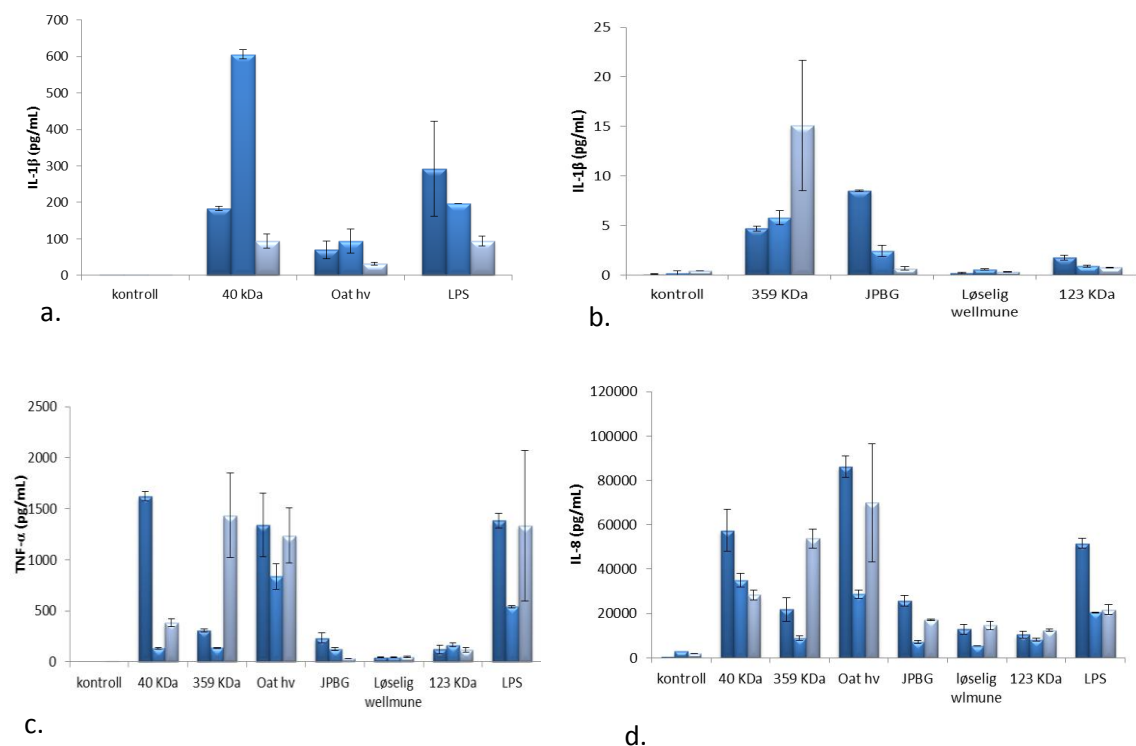
Figur 23 b viser en tydelig økning av IL-1 β sekresjon i respons til inkubering med løselig og uløselig Wellmune og h.v. oat til tross for store standardavvik. Inkubering med 359 kDa og h.v. barley viser også en tendens til økt IL-1 β sekresjon sammenlignet med kontroll. Derimot gir inkubering med 123 kDa, JPBG, l.v. barley og m.v. oat ingen effekt på IL-1 β sekresjonen.

IL-6 og IL-10 sekresjonen til makrofagene i respons av β -glukaner ble også analysert. Analysene viste kun sekresjon ved inkubering med LPS og 40 kDa. Det ble derfor valgt å ikke analysere for disse cytokinene da de andre β -glukanene ga så lav respons at de ikke kunne detekteres i ELISA systemet.

5.4 Cytokinsekresjon fra PBMC ved stimulans av β -glukanprøver

For å undersøke om THP-1 cellelinjen er en god tilnærming for immunceller fra kroppen ble tilsvarende celleforsøk som utført på makrofager og THP-1 celler utført på perifere mononukleære blodceller (PBMC). Det ble hentet blod (buffy coat) fra universitetssykehuset i Oslo og PBMC ble isolert ved hjelp av gradientsentrifugering. De isolerte cellene ble tilsatt β -glukanprøver og cytokinsekresjonen ble målt ved ELISA.

β -glukanene som ble brukt til PBMC-forsøk var; 40, 123 og 359 kDa, h.v oat, JPBG og løselig Wellmune. Sekresjonen av IL-1 β , TNF- α og IL-8 ble testet og resultatene er vist i Figur 24. Hver stolpe i diagrammet viser et forsøk utført på forskjellige dager med PBMC fra ulike personer.



Figur 24: Effekt av de ulike β -glukanprøvene på cytokinsekresjonen fra PBMC (a-b.) IL-1 β sekresjon, (c.) TNF- α sekresjon og (d.) IL-8 sekresjon. Resultatene er fra 3 ulike forsøk med standardavvik.

Figur 24 (a-b) viser en tydelig økning av IL-1 β sekresjon ved inkubering med LPS, 40 kDa, 359 kDa og h.v oat, mens inkubering med JPBG gir en mer variabel økning i sekresjonen.

De samme tendensene er synlig med TNF- α (Figur 24 c) og IL-8 sekresjon (Figur 24 d). Inkubering med LPS, 40 kDa, 359 kDa og h.v oat gir høyest sekresjon, mens inkubering med JPBG, løselig Wellmune og 123 kDa gir en lavere sekresjon enn kontrollen.

For enkelt å kunne sammenligne cytokinsekresjonen fra PBMC med sekresjonen fra THP-1 og makrofager ble det laget en tabell over gjennomsnittlig sekresjon fra 3 ulike forsøk for hvert cytokin (Tabell 7).

Tabell 7: Gjennomsnittsverdi av cytokinsekresjon fra PBMC, THP-1 celler og makrofager, fra 3 ulike forsøk.

	TNF- α			IL-8			IL-1 β	
	PBMC	THP-1	makrofag	PBMC	THP-1	makrofag	PBMC	Makrofag
kontroll	1	3	99	1868	8	8444	0,2	2,5
LPS	1088	1061	25040	31273	3958	240013	193,9	278,4
40 kDa	712	224	8944	40259	2053	248345	294,5	136,5
123 kDa	136	3	164	10352	62	13647	1,1	3,6
359 kDa	628	8	337	28142	52	13352	65,1	4,4
JPBG	131	1	194	16669	37	10758	3,9	3,2
Løselig Wellmune	45	9	199	10954	46	18341	0,4	13,7
h.v oat	1139	30	559	61621	315	22147	8,5	5,9

Tabellen viser at det er mange likheter i sekresjonsmønsteret hos PBMC, THP-1 og makrofager.

For TNF- α sekresjon er basalnivået og sekresjonsnivået ved stimulering med LPS hos PBMC relativt likt THP-1. Sekresjonen av TNF- α fra PBMC inkubert med 40 kDa og løselig Wellmune ligger mellom THP-1 og makrofager, mens ved inkubasjon med 123 kDa og JPBG ligger sekresjonen fra PBMC på samme nivå som makrofagene. Ved inkubering med 359 kDa og h.v oat sekreteres det mer TNF- α fra PBMC enn makrofagene og THP-1.

IL-8 sekresjonsnivået til PBMC ligger i gjennomsnitt midt i mellom THP-1 og makrofagene ved stimulering med LPS og 40 kDa. Ved inkubering med 123 kDa, JPBG og løselig Wellmune ligger IL-8 sekresjonen fra PBMC relativt likt som sekresjonen fra makrofager, mens

inkubering med 359 kDa og h.v oat gir en høyere sekresjon av IL-8 fra PBMC enn fra makrofagene.

Sekresjon av IL-1 β er relativ lik for PBMC og makrofager ved inkubering med 123 kDa, JPBG og h.v oat. PBMC gir høyere sekresjon av IL-1 β ved inkubering med 40 kDa og 359 kDa, enn makrofagene og lavere sekresjon enn makrofagene ved inkubering med LPS og løselig Wellmune.

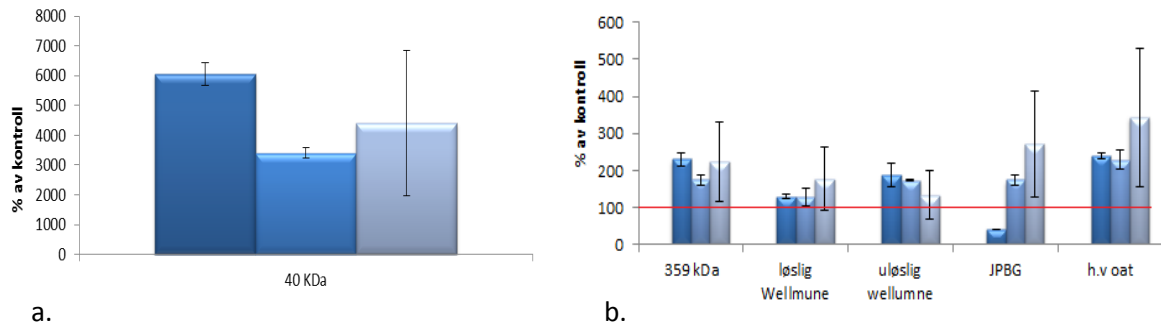
5.5. Utvelgelse av β -glukanprøver

På grunnlag av celleforsøkene beskrevet i delkapittel 5.2 og 5.3 ble det valgt å undersøke enkelte prøver nærmere, 40 kDa, 359 kDa, JPBG, h.v oat, løselig og uløselig Wellmune.

Inkubering med 40 kDa ga en klar økning i sekresjonen av alle cytokinene og kan derfor også brukes som en positiv kontroll. Inkubering med 359 kDa ga en tydelig økning i sekresjonen av TNF- α , og en mulig økning i sekresjon av IL-8 og IL-1 β . Inkubasjon med JPBG ga ingen markant økning i sekresjonen av cytokinene, og ble valgt å ta med videre som en negativ kontroll. Fra havre ble β -glukanet med høy viskositet (oat h.v) tatt med fordi det ga en økning i sekresjonen av alle de målte cytokinene. Begge β -glukanene fra gjær (løselig og uløselig Wellmune) ble også valgt å ta med videre fordi også disse ga en klar økning i cytokinsekresjonen, spesielt ved IL-1 β sekresjon.

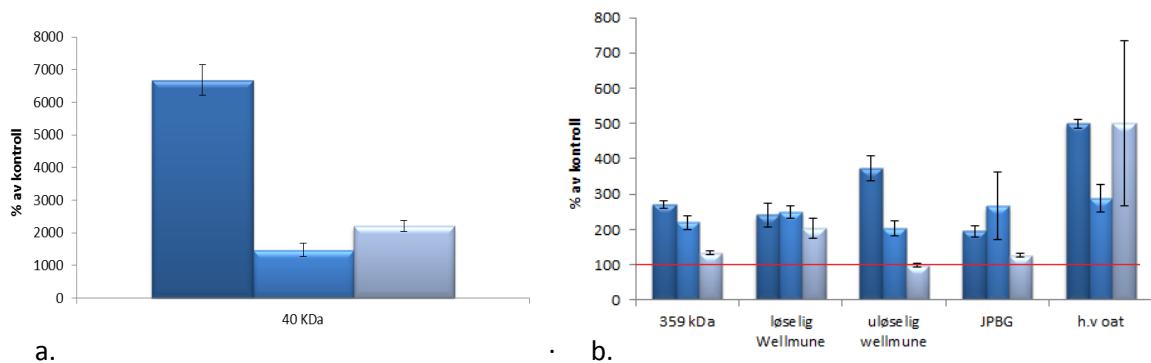
For å prøve å fastslå en effekt av disse β -glukanene ble det utført flere forsøk på effekten på sekresjonen av TNF- α , IL-8 og IL-1 β fra makrofager. Resultatene ble beregnet som prosent av kontroll for å kunne se trendene mer tydelig (Figur 25-27).

Alle Figurene viser en stor økning i cytokinsekresjon ved inkubering med 40 kDa. Dette β -glukanet er derfor valgt å sette i en egen Figur for å kunne tydeligere se forskjeller mellom de andre β -glukanene.



Figur 25: Effekt av de utvalgte β -glukanprøver på TNF- α sekresjonen fra makrofager. (a.) Sekresjon i respons på 40 kDa (b.) Sekresjon i respons på β -glukaner bortsett fra 40 kDa. Resultatene er % av kontroll med standardavvik fra 3 ulike forsøk. Hver stolpe i diagrammet viser et forsøk, og den røde linjen illustrerer 100 %.

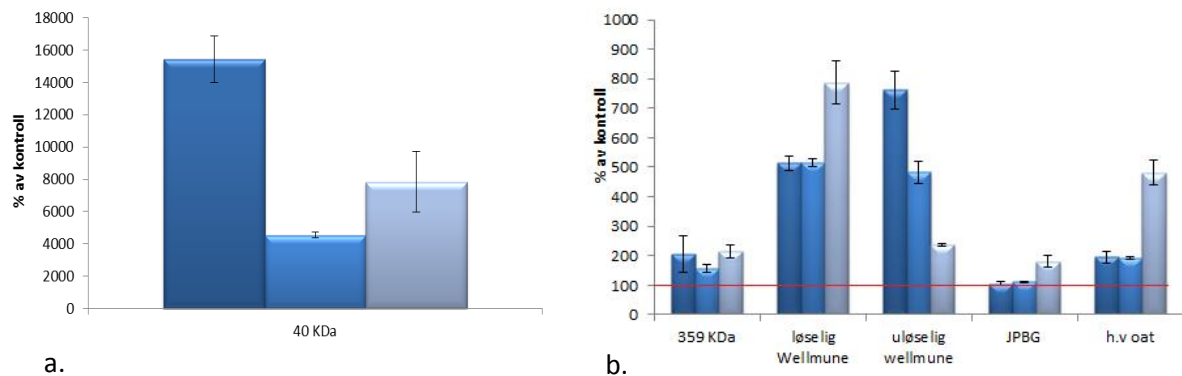
Figur 25 viser at spesielt inkubering med 359 kDa og h.v oat gir en økt sekresjon av TNF- α , sett bort fra 40 kDa. Inkubering med uløselig Wellmune gir en større tendens til sekresjon enn inkubering med løselig Wellmune, men alle forsøkene har relativt store standardavvik så det er vanskelig å fastslå. Ved inkubering med JPBG var det store forskjeller mellom de enkelte forsøkene, hvor et forsøk ga reduksjon i TNF- α sekresjonen mens to forsøk økte TNF- α sekresjonen.



Figur 26: Effekt av de utvalgte β -glukanprøver på IL-8 sekresjonen fra makrofager. (a.) Sekresjon i respons på 40 kDa (b.) Sekresjon i respons på β -glukaner bortsett fra 40 kDa. Resultatene er % av kontroll med standardavvik fra 3 ulike forsøk. Hver stolpe i diagrammet viser et forsøk, og den røde linjen illustrerer 100 %.

Figur 26 viser relativt store forskjeller i sekresjonen av IL-8 som følge av inkubering med de ulike β -glukanene, både mellom de enkelte forsøkene og innad i et forsøk. Det ser ut til at det ene forsøket (mørk blå søyle) sekreterer IL-8 i noen større grad enn de andre forsøkene. Videre viser Figuren at inkubering med h.v oat har den største stimuleringen når vi ser bort

ifra 40 kDa, og at også de resterende β -glukanene gir en økt sekresjon av IL-8 i forhold til kontrollen.



Figur 27: Effekt av de utvalgte β -glukanprøver på IL-1 β sekresjonen fra makrofager. (a.) Sekresjon i respons på 40 kDa (b.) Sekresjon i respons på β -glukaner bortsett fra 40 kDa. Resultatene er % av kontroll med standardavvik fra 3 ulike forsøk. Hver stolpe i diagrammet viser et forsøk, og den røde linjen illustrerer 100 %.

Figur 27 viser at inkubering med løselig og uløselig Wellmune stimulerer mest til økt IL-1 β sekresjon, sett bort fra 40 kDa. Inkubering med h.v Oat og 359 kDa gir også økt sekresjon av IL-1 β i forhold til kontrollen, mens inkubering med JPBG har ingen effekt på sekresjonen.

5.6 Test for karbohydratspesifikk aktivitet

LPS finnes overalt og er en vanlig kontaminant av biologiske prøver. For å undersøke om β -glukanprøvene ga en økt cytokinsekresjon på grunn av LPS kontaminering ble det utført flere ulike tester.

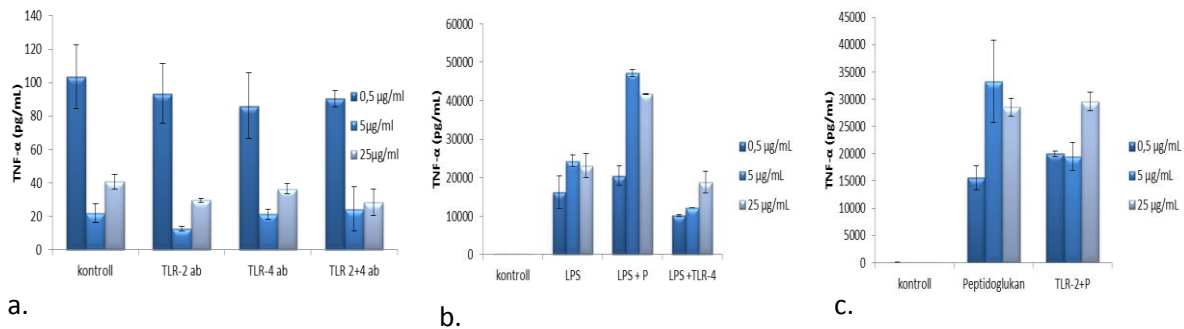
5.6.1 Polymyxin

Polymyxin er et antibiotikum som binder seg til lipid A delen av LPS og dermed inaktiverer LPS. Dette ble benyttet i celforsøk for å binde eventuell tilstedeværende LPS i prøvene. Cellene ble tilsatt polymyxin sammen med LPS (100 ng/mL) og uten LPS. Resultatene viste at polymyxin ikke ga hemming av LPS effekt, men snarere en økning i sekresjonen av cytokiner (resultater ikke vist). Polymyxin kunne derfor ikke benyttes på β -glukanprøvene for å undersøke en eventuell LPS kontaminasjon.

5.6.2. Tilsetning av TLR-antistoff

TLR-2 og TLR-4 er mønstergjenkjennende reseptorer (PRP) som gjenkjenner henholdsvis peptidoglukan (gram positive bakterier) eller LPS (gram negative bakterier). Ved tilsetning av antistoffer mot TLR-2 og TLR-4 (TLR-2 ab og TLR-4 ab) kan eventuelt reseptorene blokkere og cytokinsekresjonen hemmes dersom prøvenes effekt skyldes forurensning med LPS eller peptidoglukan.

For å bestemme hvilken konsentrasjon av TLR-antistoff som skulle benyttes til celleforsøk ble effekten av økende konsentrasjon av TLR-antistoff på LPS og peptidoglukan stimulert TNF- α sekresjon testet (Figur 28.) Antistoffene ble tilsatt 30 minutter før de andre tilsetningene for å blokkere reseptorene før tilsetning av prøve og dermed unngå en eventuell konkurranse mellom LPS eller peptidoglukan og TLR-antistoffene for reseptorbinding.



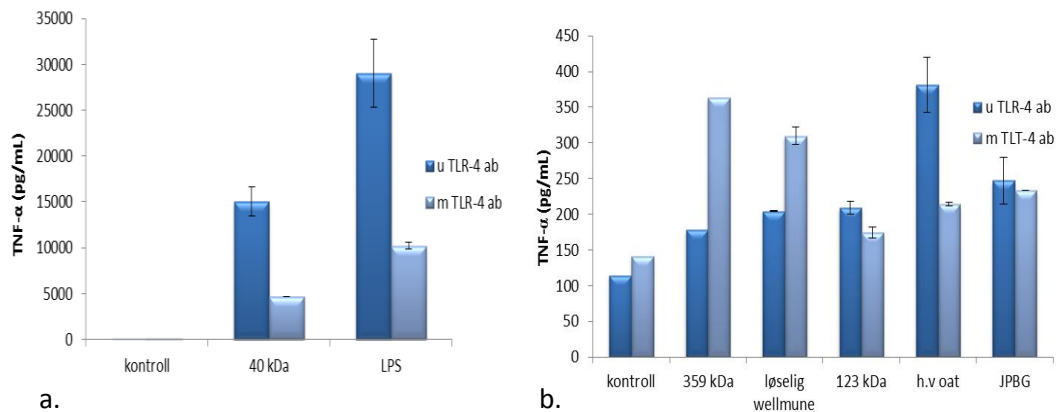
Figur 28: Effekt av tilsetning av LPS, peptidoglukan (p), TLR-2 ab og TLR-4 ab i økende konsentrasjon (0,5, 5 og 25 µg/mL) på TNF- α sekresjonen. (a.) kun antistoffene (b) LPS og LPS sammen med TLR-4 ab. (c) Peptidoglukan og peptidoglukan sammen med TLR-2 ab. Forsøkene ble utført en gang for hvert TLR konsentrasjon.

Figur 28 a viser at TLR-2 ab og TLR-4 ab ikke selv påvirker cellene, det vil si at tilsetning av antistoff i alle 3 konsentrasjonen ikke påvirker TNF- α sekresjonen i forhold til kontrollen i noen stor grad.

TLR-4 ab ga en svak hemming av den LPS-induserte TNF- α sekresjonen (Figur 28 b). Ideelt sett skulle TLR-4 ab hemme LPS-indusert cytokinsekresjon fullstendig. Høyere konsentrasjoner av antistoff (25 µg/mL) ga ikke en sterkere hemmende effekt. En konsentrasjon på 5 µg/mL TLR-4 ab hadde den største hemmende effekt på LPS indusert cytokinsekresjon og ble derfor valgt for videre forsøk.

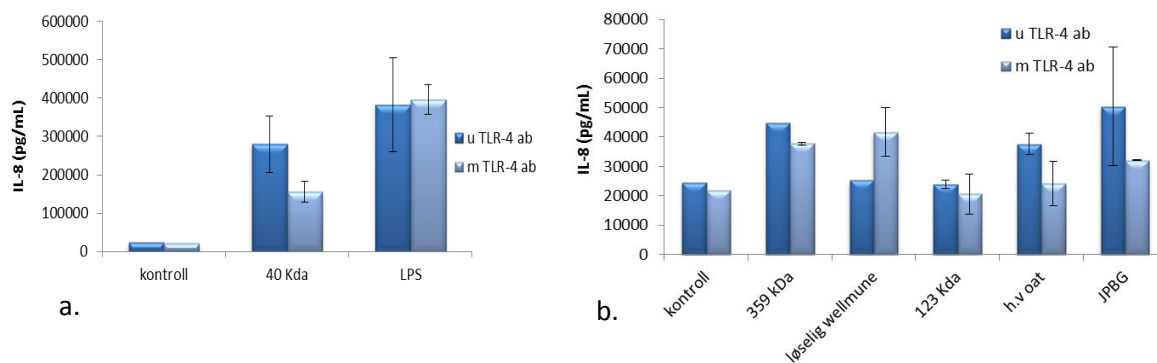
Dataene for peptidoglukan sammenlignet med peptidoglukan og antistoff mot TLR-2 er ikke så tydelige (29c). Preinkubering med 5 µg/mL TLR-2 ab ga en liten hemmende effekt på den peptidoglukan-induserte TNF-α sekresjonen, mens de to andre konsentrasjonene av TLR-2 ab ga en økt cytokinsekresjon. På grunn av disse resultatene ble ikke TLR-2 ab benyttet i videre forsøk.

Sekresjon av TNF-α, IL-8 og IL-1β fra makrofagene tilsatt TLR-4 ab og β-glukan eller LPS ble testet. Denne gangen ble TLR-4 ab tilsatt en time før de andre tilsetningene (Figur 29-31).



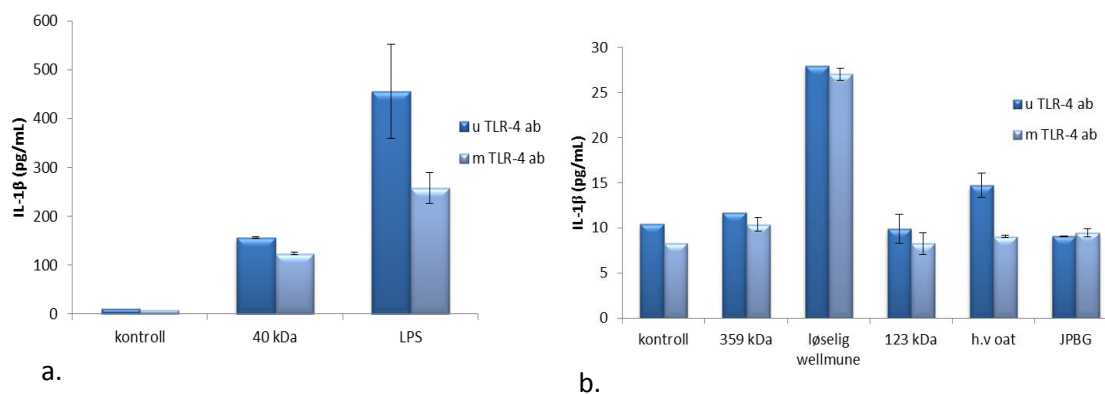
Figur 29: Effekt på TNF-α sekresjon ved tilsetning av TLR-4 ab (5µg/mL) og LPS eller β-glukan. (a.) 40 kDa og LPS, (b.) de resterende β-glukanene. 2 ulike forsøk med disse tilsetningene, begge forsøkene viste samme tendens, men på grunn av store forskjeller i absolutt cytokinsekresjon som resulterte i store standardavvik av gjennomsnittsverdiene ble det valgt å presentere resultatene fra et representativt forsøk per cytokin.

Figur 29 viser at tilsetning av TLR-4 ab hemmer TNF-α sekresjonen induisert av LPS og 40 kDa og h.v oat. Derimot ser det ut som om TLR-4 ab øker TNF-α sekresjonen induisert av 359 kDa og løselig Wellmune, mens den har ingen effekt på de andre prøvene.



Figur 30: Effekt på IL-8 sekresjon ved tilsetning av TLR-4 ab (5µg/mL) og LPS eller β-glukan. (a.) 40 kDa og LPS, (b.) de resterende β-glukanene. 2 ulike forsøk med disse tilsetningene, begge forsøkene viste samme tendens, men på grunn av store forskjeller i absolutt cytokinsekresjon som resulterte i store standardavvik av gjennomsnittsverdiene ble det valgt å presentere resultatene fra et representativt forsøk per cytokin.

Figur 30 a viser at TLR-4 ab gir en nedgang i 40 kDa induert IL-8 sekresjon, men ingen hemming av LPS induert IL-8 sekresjon. Figur 30 b viser heller ingen markant hemming for noen av β-glukanene. TLR-4 ab viser størst tendens til hemming av IL-8 sekresjon induert av h.v oat og JPBG, men standardavvikene er for store til å kunne fastslå en effekt med sikkerhet.



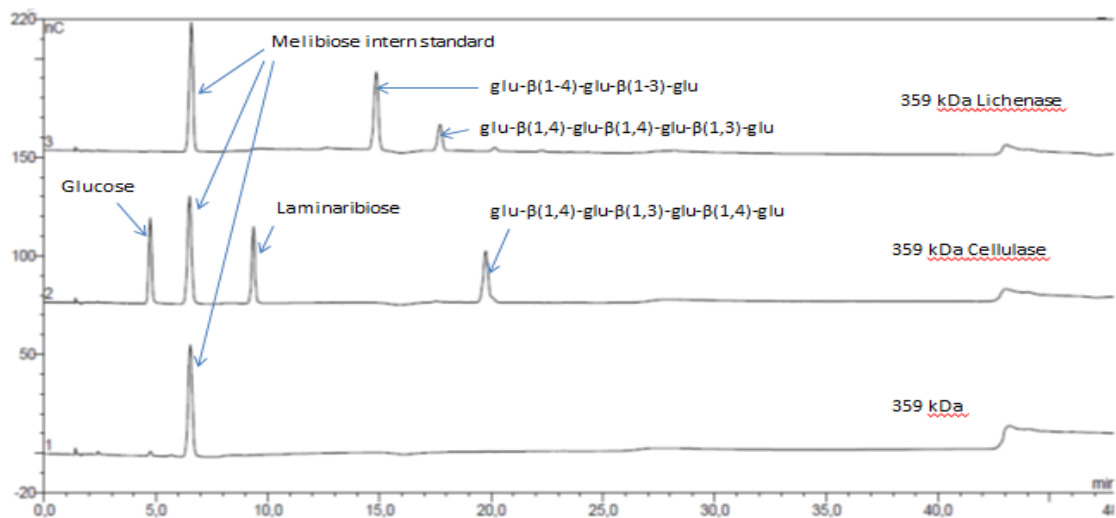
Figur 31: Effekt på IL-1β sekresjon ved tilsetning av TLR-4 ab (5µg/mL) og LPS eller β-glukan. (a.) 40 kDa og LPS, (b.) de resterende β-glukanene.

Figur 31 viser at TLR-4 ab har en svak hemmende effekt på IL-1β sekresjon induert av 40 kDa og en tendens til noe større hemmende effekt på IL-1β sekresjonen induert av LPS og h.v oat. Derimot hadde TLR-4 ab ingen effekt på de andre β-glukanprøvene.

Tilsetning av TLR-4 ab hemmet ikke cytokinsekresjonen fullstendig selv ved en times Preinkubering. Det ble derfor valgt å undersøke karbohydrat spesifisiteten for cytokinresponsen ved hjelp av degradering av β -glukanene.

5.6.3 Effekt av enzymdegradering av β -glukaner

β -glukanene ble degradert til oligosakkarider ved bruk av enzymene cellulase eller lichenase, for å undersøke om β -glukan strukturen var ansvarlig for den observerte responsen. Hvis responsen skyldes LPS kontaminering burde cytokinsekresjonen være det samme når β -glukanene er degradert. Enzymbehandlet β -glukan ble analysert ved bruk av HPAEC-PAD for å undersøke om enzymene degraderte β -glukanet til oligosakkarider (Figur 32). Det kjente disakkaridet melibiose (100 μ g/mL) med kjent retensjonstid ble benyttet som internstandard.



Figur 32: HPAEC-PAD kromatogram fra degradering av 359 kDa med lichenase, cellulase og en kontrollprøve med 359 kDa.

I første del av figuren ser vi 359 kDa tilsatt lichenase og internstandaren (IS). Vi ser en tydelig topp, med retensjonstid på rundt 6. Denne toppen kommer igjen i alle kromatogrammene av de ulike degraderte β -glukanene og er melibiose. β -glukaner degradert med samme enzym viser samme degraderingsmønster av mono, tri og tetrasakkarider for alle β -glukanene.

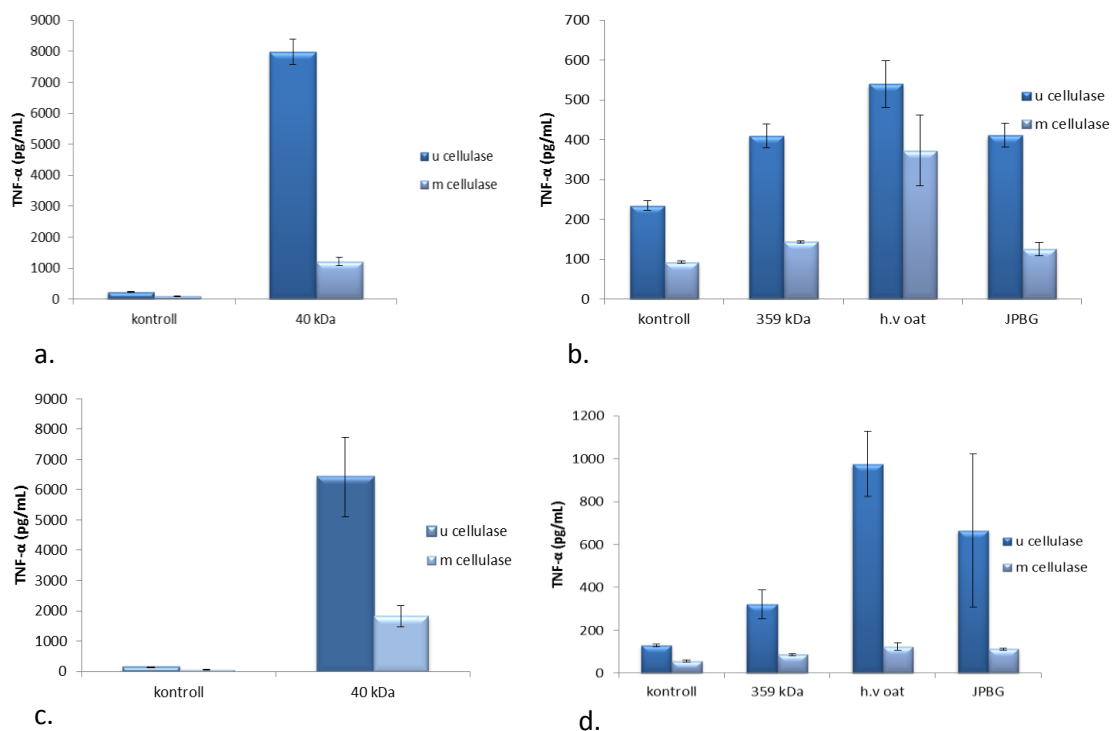
Ved bruk av ulike standarder kunne de forskjellige toppene bli identifisert som glukose, et trisakkarid ($\text{glu-}\beta(1-4)\text{-glu-}\beta(1-3)\text{-glu}$) og to forskjellige tetrasakkarider som henholdsvis oppstår etter lichenase ($\text{glu-}\beta(1-4)\text{-glu-}\beta(1-4)\text{-glu-}\beta(1-3)\text{-glu}$) eller cellulase ($\text{glu-}\beta(1-4)\text{-glu-}$

$\beta(1-3)$ -glu- $\beta(1-4)$ -glu) degradering. Det ble ikke foretatt en nøyaktig kvantifisering av de ulike oligosakkaridene siden formålet med forsøket var kun å undersøke om enzymene degraderte β -glukanene.

Den nederste delen av Figuren viser kromatogrammet fra 359 kDa (ikke tilsatt enzym), på Figuren ser man kun IS toppen fordi selve β -glukanet er for stort til å bli detektert i dette testsystemet. Degraderte β -glukaner ble tilsatt cellene og sekresjon av IL-1 β , IL-8 og TNF- α ble målt ved hjelp av ELISA.

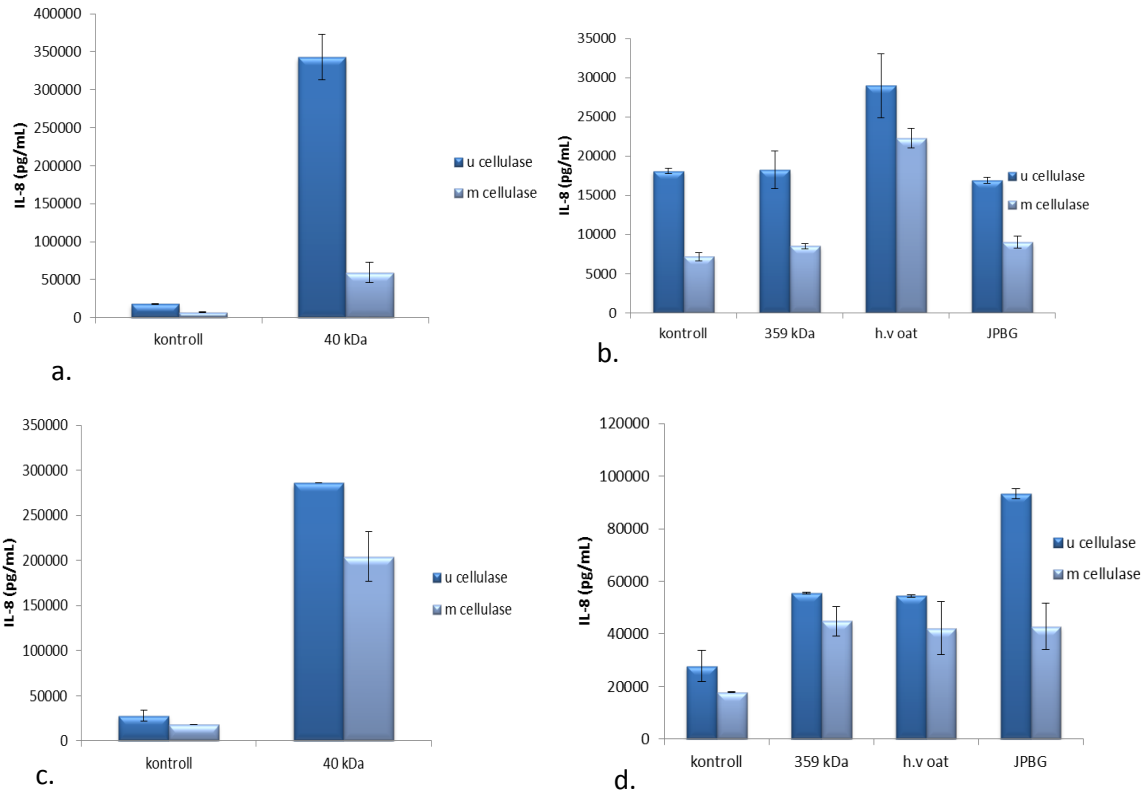
5.6.3.1 Cytokinsekresjon fra makrofager i respons på cellulase behandlede β -glukaner

TNF- α , IL-8 og IL-1 β sekresjonen fra 4 ulike celleforsøk ble målt. 2 ulike celleforsøk ble valgt til å gi et representativt bilde av sekresjonen fordi 2 og 2 forsøk viste samme trender (Figur 33-35). Inkubering med 40 kDa viste høyere sekresjon enn inkubering med de andre β -glukanene og ble derfor valgt å vise i en egen Figur slik at variasjonen mellom de andre β -glukanene kunne komme best fram.



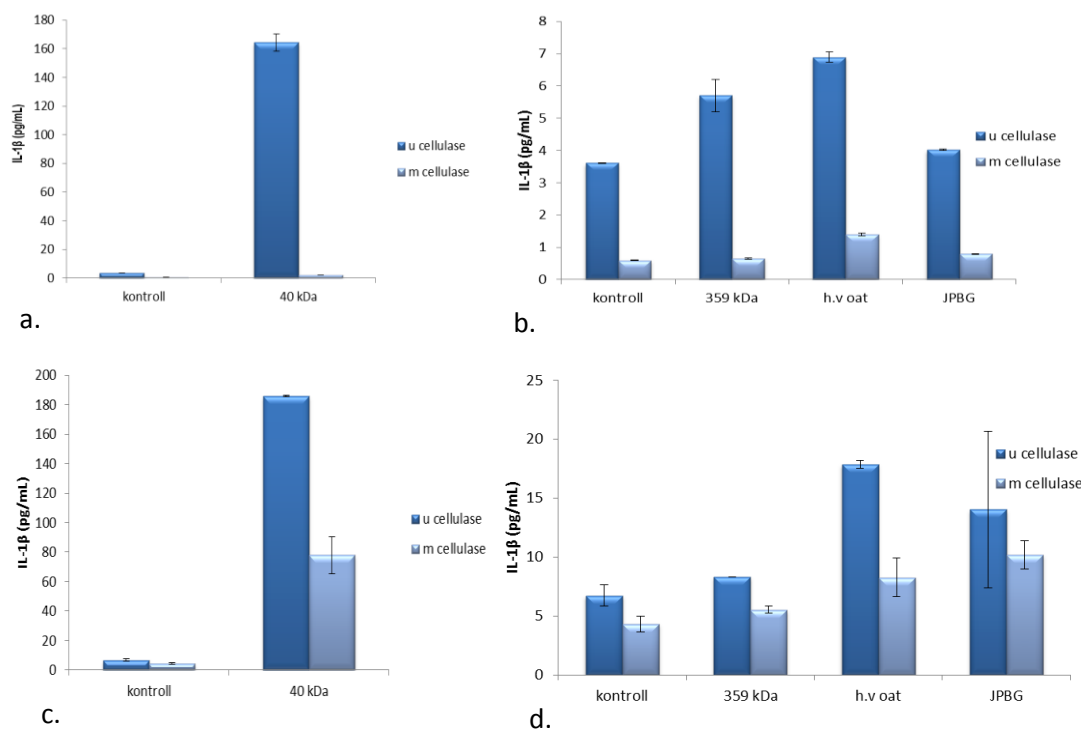
Figur 33: 2 ulike forsøk av TNF- α sekresjon stimulert av β -glukaner og cellulase degraderte β -glukaner med tilhørende standardavvik (a-b) er et representativt forsøk for 2 forsøk med og uten 40 kDa, (c-d) er et representativt forsøk for 2 andre forsøk med og uten 40 kDa.

Figur 33 viser en nedgang i TNF- α sekresjonen ved inkubering med alle de degraderte β -glukanene i forhold til inkubering med ikke degraderte β -glukaner. Forsøket gjengitt i Figur 33 (a-b) gir en mindre nedgang enn forsøket gjengitt i Figur 33 (c-d).



Figur 34: 2 ulike forsøk av IL-8 sekresjon stimulert av β -glukaner og cellulase degraderte β -glukaner med tilhørende standardavvik (a-b) er et representativt forsøk for 2 forsøk med og uten 40 kDa, (c-d) er et representativt forsøk for 2 andre forsøk med og uten 40 kDa

Figur 34 viser en nedgang i IL-8 sekresjonen ved inkubering med alle de degraderte β -glukanene i forhold til inkubering med ikke degraderte β -glukaner. Forsøket gjengitt i Figur 34 (a-b) gir generelt en større nedgang enn forsøket gitt i Figur 34 (c-d), spesielt for 40 kDa.



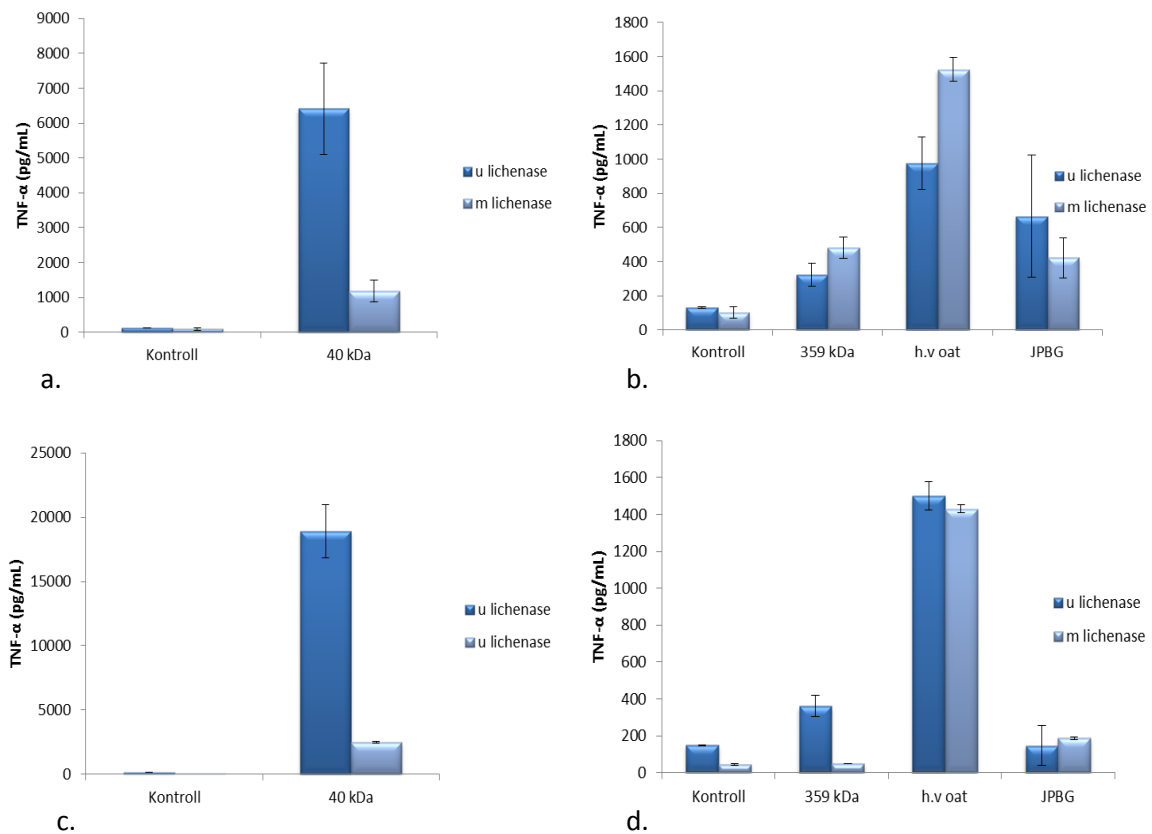
Figur 35: 2 ulike forsøk av IL-1 β sekresjon stimulert av β -glukaner og cellulase degraderte β -glukaner med tilhørende standardavvik (a-b) er et representativt forsøk for 2 forsøk med og uten 40 kDa, (c-d) er et representativt forsøk for 2 andre forsøk med og uten 40 kDa.

Figur 35 viser en nedgang i IL-1 β sekresjonen ved inkubering med alle de degraderte β -glukanene i forhold til inkubering med ikke degraderte β -glukaner. Forsøket gjengitt i Figur 35 (a-b) gir generelt en større nedgang enn forsøket gitt i Figur 35 (c-d).

Alle celleforsøkene ga også en nedgang av cytokinsekresjonen for kontrollceller tilsatt cellulase i forhold til kontrollceller uten tilsatt cellulase. På grunn av nedgang i kontrollen gir ikke forsøkene et akseptabelt resultat. Det ble derfor valgt å benytte enzymet lichenase som ikke har vist en hemmende effekt på kontrollen i et annet celledsystem (HT-29).

5.6.3.2 Cytokinsekresjon fra makrofager ved inkubering med lichenasebehandlede β -glukaner

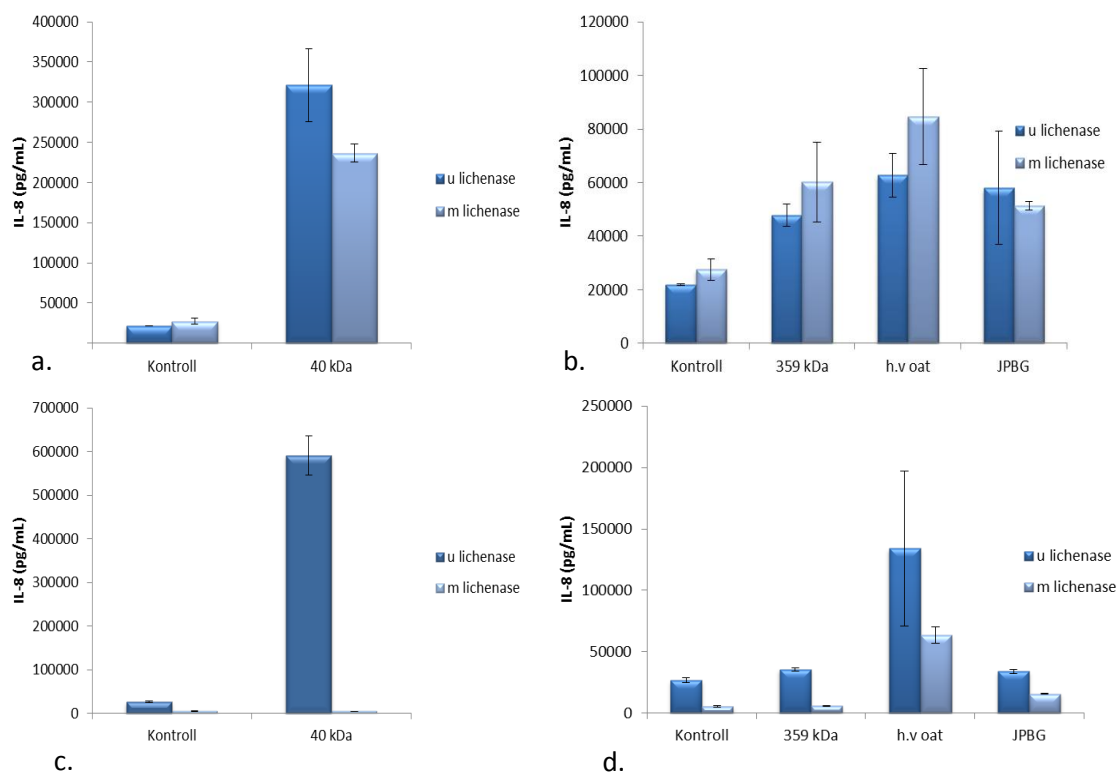
Sekresjonen av de ulike cytokinene sekretert ved inkubering av β -glukaner og lichenase degraderte β -glukaner ble målt. Ut i fra 4 ulike forsøk med de ulike cytokinene, ble 2 representative forsøk valgt ut for hvert cytokin (Figur 36-38). Fra hvert forsøk er det 2 Figurer, en kun med kontroll og 40 kDa og en med kontrollen og de resterende β -glukanene. Grunnen til dette er at 40 kDa stimulerer til så høy sekresjon i forhold til de andre β -glukanprøvene.



Figur 36: 2 ulike forsøk av TNF- α sekresjon stimulert av β -glukaner og lichenase degraderte β -glukaner med tilhørende standardavvik (a-b) er et representativt forsøk for 2 forsøk med og uten 40 kDa, (c-d) er et representativt forsøk for 2 andre forsøk med og uten 40 kDa.

Figur 36 (a-b) viser at lichenasedegradering gir en nedgang i TNF- α sekresjonen induisert av 40 kDa. Derimot gir lichenasedegraderingen en økning i TNF- α sekresjon induisert av 359 kDa og h.v oat.

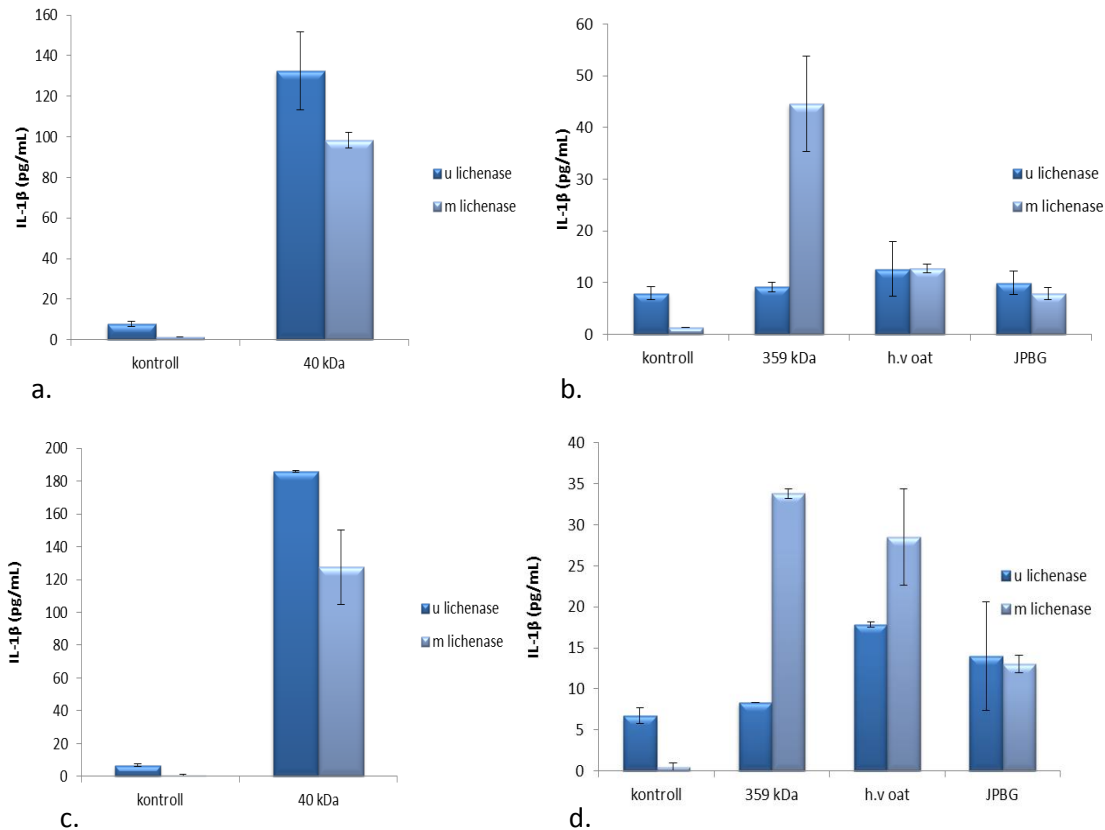
Figur 36 (c-d) viser også en nedgang av 40 kDa induisert TNF- α sekresjon etter enzymbehandling. Men denne gangen er også TNF- α sekresjonen i kontrollceller og sekresjonen induisert av 359 kDa redusert. Lichenase degraderingen har ingen effekt på responsen til de 2 andre β -glukanprøvene.



Figur 37: 2 ulike forsøk av IL-8 sekresjon stimulert av β -glukaner og lichenase degraderte β -glukaner med tilhørende standardavvik (a-b) er et representativt forsøk for 2 forsøk med og uten 40 kDa, (c-d) er et representativt forsøk for 2 andre forsøk med og uten 40 kDa.

De ulike forsøkene gjengitt i Figur 37 viser store forskjeller. 37 (a-b) viser at lichenasebehandlingen gir en tendens til økning i IL-8 sekresjonen i kontrollceller og celler inkubert med 359 kDa og h.v oat (men store standardavvik). Lichenasebehandlingen av 40 kDa og JPBG gir en reduksjon i IL-8 sekresjonen. 37 (c-d) viser at lichenasebehandlingen gir en relativ stor reduksjon i IL-8 sekresjonen for alle prøvene, spesielt 40 kDa.

Av de 4 ulike forsøkene gjort med IL-1 β var det kun 2 forsøk som kunne benyttes, fordi de andre ga verdier utenfor deteksjonsområdet, forsøkene er vist i Figur 38.



Figur 38: 2 ulike forsøk av IL-1 β sekresjon stimulert av β -glukaner og lichenase degraderte β -glukaner med tilhørende standardavvik (a-b) forsøk en med og uten 40 kDa, (c-d) forsøk to med og uten 40 kDa.

Figur 38 viser relativ lik sekresjon ved de ulike tilsetningene på begge forsøkene. Vi ser at lichenasebehandlingen gir nedgang i IL-1 β til 40 kDa prøven og kontrollceller. Lichenase degradert 359 kDa gir derimot en økning i IL-1 β sekresjonen i begge forsøkene. H.v oat gir ingen forandring i 38 (a-b) men en økning i IL-1 β i 38 (c-d). Responsen til JPBG er ikke påvirket av enzymbehandlingen i noen av forsøkene.

Ved bruk av cellulase så vi tydelige nedgang i cytokinsekresjonen ved degradering av de ulike β -glukanene. Disse tendensene ser vi ikke ved degradering ved hjelp av lichenase.

Det er fortsatt en nedgang i kontrollen som tyder på at enzymene har en toksisk effekt på cellene.

5.6.6 Måling av toksisitet ved behandling av enzym

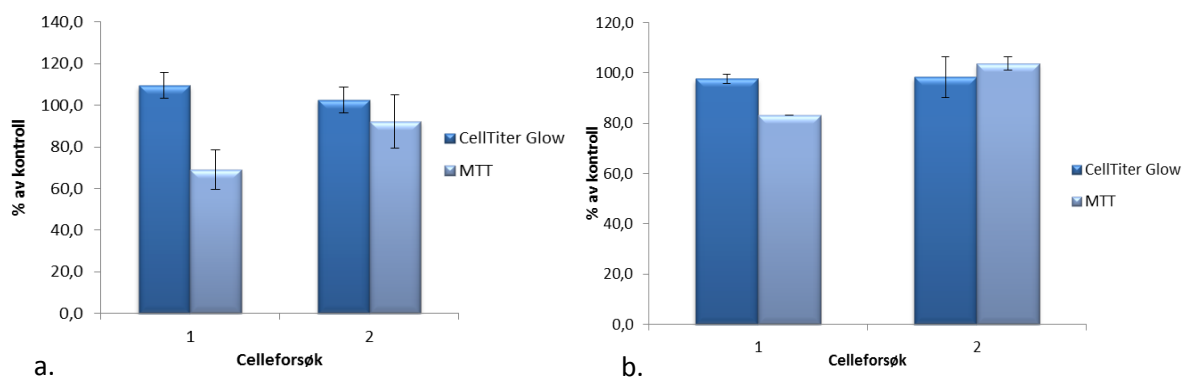
Ved cytokinmåling av enzymdegraderte β -glukaner viste mange av kontrollene nedgang i cytokinsekresjonen inkubert med enzym. På grunn av dette var det av interesse å undersøke

om enzymet hadde en toksisk effekt på cellene. To ulike tester ble benyttet for å måle toksisk effekt; CellTiter-Glow® Luminescent Cell Viability Assay og MTT.

Celler behandlet med enzym med cellekonsentrasjon på 1×10^6 celler/mL ble først undersøkt med CellTiter-Glo. Analysen viste store forskjeller på to ulike celleforsøk, et ga nedgang og et ga ingen effekt ved bruk av cellulase og lichenase.

Analysen har en cellegrense på 5×10^5 celler/mL, og siden analysen ble kjørt med for høyt antall celler ble forsøket valgt å gjøres på nytt med en lavere cellekonsentrasjon. Det ble også valgt å analysere cellene ved bruk av MTT-test som ikke har en begrensning i cellemengde for å kunne sammenligne.

Forsøk med de to cellekonsentrasjonene viste små forskjeller mellom de ulike konsentrasjonene. Forsøk med CellTiter Glow og MTT ble utført og resultatet er vist som % av kontroll gjengitt i Figur 39.



Figur 39: Sammenligning av cellelevedyktighet for cellene ved tilsetning av enzym målt med CellTiter-Glow og MTT fra 2 ulike celleforsøk. (a.) Cellulase, (b.) Lichenase

Fra celleforsøk 1 ser man en nedgang ved bruk av cellulase i MTT-testen. Mens ved de andre forsøkene kan vi ikke fastslå en nedgang.

Ingen av enzymbehandlingene hadde noen effekt på levedyktigheten til cellene ved CellTiter Glow testen.

6. Diskusjon

Formålet med oppgaven var å se på cytokinsekresjonen fra THP-1 celler, makrofager og immunceller fra humant blod (PBMC) i respons på ulike β -glukanprøver. Det ble brukt både β -glukaner fra korn (bygg og havre) og fra gjær for å undersøke om en mulig immunstimulerende effekt av β -glukaner i mat kan være basert på en interaksjon av β -glukaner med immunceller, og se nærmere på et mulig forhold mellom struktur og funksjonalitet.

6.1 Cytokinsekresjon fra THP-1 og makrofager etter stimulering med ulike β -glukanpreparater

Cytokinresponsen fra cellene (THP-1 og makrofager) ved inkubering med ulike β -glukaner ble målt. Resultatene viste en økt IL-8 sekresjon fra THP-1 celler ved inkubering med alle β -glukanene i forhold til kontrollen, men med store standardavvik for JPBG, l.v barley og m.v oat. THP-1 cellene viste også en økt TNF- α sekresjon ved inkubering med LPS og 40 kDa. ELISA resultatene for TNF- α viste store variasjoner mellom forsøkene, og dette gjør det vanskelig å tyde resultatene nøyaktig.

Sekresjonen av cytokinene IL-1 β , IL-6 og IL-10 fra THP-1 ble også målt, men disse ga for lav sekresjon, dvs for nært deteksjonsgrensen til ELISAen til å være kvantifiserbare.

Et tidligere forsøk med THP-1 og THP-1 differensierte makrofager har vist at genekspresjonen av inflammasjons cytokinene IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 og TNF- α er høyere i makrofager enn THP-1. IL-8, IL-1 β og TNF- α viste høyest ekspresjon i ustimulerte celler (Chanput, et al., 2010). Dette stemmer godt overens med våre observasjoner med THP-1 og makrofager. Forsøket beskrevet av Chanput, et al., 2010 viste også en kraftig økning av genekspresjonsnivåene ved inkubering med LPS, og at økning av genekspresjonsnivåene var størst for IL-8 både i THP-1 og makrofagene. Våre resultater viser samme tendens, og det tyder på at celledsystemet er optimalisert og differensieringen av THP-1 med PMA har fungert på samme måte som observert og beskrevet i Chanput, et al., 2010.

Forsøk utført med LPS og LPS + β -glukan fra bygg viste at β -glukanet hadde en ytterligere effekt på økning av genekspresjonsnivåene av IL-1 β og IL-8 i makrofager enn kun LPS (Chanput, et al., 2010). Det ble vist at β -glukanet fra bygg hadde en effekt på cellene.

Våre forsøk (utført uten LPS stimulering) viser også en tendens til økt cytokinsekresjon fra makrofager ved inkubering med β -glukaner fra bygg, havre og gjær. Makrofager inkubert med 40 kDa viste en relativ stor økning i cytokinsekresjonen av TNF- α , IL-8 og IL-1 β , inkubering med 359 kDa, h.v oat, løselig og uløselig Wellmune ga en økt TNF- α sekresjon, mens inkubering med h.v oat, m.v oat og løselig og uløselig Wellmune ga en økt IL-8 sekresjon. Makrofagene hadde et lavt sekresjonsnivå av IL-1 β , men den nøyaktige og følsomme ELISAen for IL-1 β gjorde det likevel mulig å studere IL-1 β responsen av makrofagene til de ulike β -glukaner (Figur 23). Begge β -glukanene fra gjær (Løselig og uløselig Wellmune) og h.v oat stimulerte til økning av IL-1 β sekresjonen i forhold til kontrollen.

Fra forsøkene utført på THP-1 ser vi at spesielt inkubering med 40 kDa, h.v oat, 359 kDa og løselig wellmune øker cytokinsekresjonen av IL-8 og TNF- α . De samme trendene er også observert i forsøkene med makrofager. Det er de samme prøvene som ser ut til å ha størst effekt på begge celletypene.

De fleste resultatene viste relativt store standardavvik. Dette kan skyldes brønnforskjeller under celleforsøk og at samme celler kan reagere forskjellig på samme behandling. ELISA metoden er heller ikke veldig nøyaktig, og fortynning av prøvene kan ha hatt en påvirkning på de store standardavvikene. Ved cytokinbestemmelse av IL-8 sekresjonen fra makrofager måtte prøver etter inkubering med 40 kDa og LPS fortynnes så mye som 1:2000. Det er små volum som fortynnes, så små feil her kan føre til relativt store forskjeller. Tabell 5 viser en grov oversikt over fortynningene som ble benyttet til de ulike ELISAene. En annen grunn til de store forskjellene mellom forsøkene kan skyldes ulik cellekonsentrasjon når celleforsøket ble startet eller når differensieringen ble startet. For å gjøre denne faktoren minst mulig ble THP-1 celleforsøkene inkubert over natten etter utsåing før celleforsøket ble startet, dette ble gjort på grunn av variasjon i tidspunktet for utsåing. Mens for differensieringen ble PMA tilsatt direkte etter utsåing. THP-1 cellene skal helst ikke har en cellekonsentrasjon over 1×10^6 celler/mL under dyrking. Det er derfor viktig å starte differensieringen av THP-1 cellene så fort etter utsåing som mulig, siden den høye cellekonsentrasjonen av 1×10^6 celler/mL. Høyere konsentrasjoner har en mulig negativ effekt på cellene. Alt strevet for å standardisere celledsystemene så mye som mulig var i midlertid ikke nok til å redusere de tydelige forskjellene mellom forsøkene.

6.2 Cytokinsekresjon fra PBMC ved stimulans av ulike β -glukanpreparater

Resultatene for sekresjon av TNF- α , IL-8 og IL-1 β fra PBMC (Tabell 7) viser mange likheter til sekresjonsmønsteret fra THP-1 og makrofager. Dette antyder at celledsystemet vårt reagerer ganske likt som immuncellene i blodet. PBMC består dessuten av flere typer celler; monocytter (som THP-1) og immunceller i flere stadier av utviklingsstadiet som for eksempel makrofager.

Cytokinsekresjonen fra PBMC (Figur 24) viser en del forskjeller mellom de ulike forsøkene, noe som er å forvente siden de ulike forsøkene er basert på PBMC hentet fra forskjellige mennesker med ulik sammensetning av immunceller i blodet.

I likhet med THP-1 og makrofager gir inkubering av PBMC med LPS, 40 kDa, h.v oat og 359 kDa høyere sekresjon av cytokinene IL-1 β , IL-8 og TNF- α i forhold til inkubering med 123 kDa og JPBG. Inkubering med h.v oat og 359 kDa stimulerer til høyere cytokinsekresjon av IL-1 β , IL-8 og TNF- α fra PBMC enn fra THP-1 og makrofager. Inkubering med løselig Wellmune ga en tydelig økt sekresjon av IL-1 β fra makrofager i forhold til inkubering med de andre β -glukanene, men denne økningen ble ikke observert hos PBMC.

6.3 Utvelgelse av β -glukanprøver

Det ble gjort et utvalg for å kunne se nærmere på TNF- α , IL-8 og IL-1 β cytokinsekresjonen fra makrofager inkubert med de β -glukanene som tydeligst ga effekt. Dette ble gjort fordi resultatene viste relativt store forskjeller fra de ulike forsøkene og flere data var nødvendig for å kunne gi et pålitelig resultat.

Inkubering med 40 kDa ga en høy økning i sekresjonen av alle cytokinene og ble derfor benyttet som en positiv kontroll. Inkubering med 359 kDa ga en tydelig økning i sekresjonen av TNF- α , og en mulig økning i sekresjon av IL-8 og IL-1 β . Inkubering med JPBG ga ingen markant økning i sekresjonen av cytokinene, og ble valgt å ta med som en negativ kontroll. β -glukan med høy viskositet fra havre (oat h.v) ble tatt med fordi det ga en økning av sekresjon av alle tre målte cytokinene. Løselig og uløselig Wellmune ga en tydelig økning i IL-1 β sekresjon og en mulig økning i både TNF- α og IL-8 sekresjon. De første forsøkene var imidlertid ikke nok til å fastslå om det var noe forskjell mellom de to fysiske formene (løselig

vs. Uløselig). I tillegg til det var det av interesse å sammenligne effekten av β -glukaner fra korn med den mer undersøkte effekten av β -glukaner fra gjær.

Det ble prøvd å representere resultatene som gjennomsnitt av 3 forsøk, men på grunn av forskjeller fra forsøk til forsøk ble det veldig store standardavvik. Prøvene ble derfor valgt å presenteres som % av kontroll for å kunne se trendene mellom forsøkene bedre og korrigere for basalnivået (kontrollcellene) som varierer fra forsøk til forsøk. Dette ga et bedre bilde av resultatene (Fugur 25-27).

Resultatene viser tendenser til en stimulerende effekt ved inkubering med 40 kDa, 359 kDa, h.v oat på TNF- α , IL-8 og IL-1 β sekresjonen fra makrofager. Inkubering med løselig og uløselig Wellmune viser økt sekresjon av IL-1 β og tendenser til økt IL-8 sekresjon.

Tidligere forsøk med 40 kDa, 359 kDa og 123 kDa på cellelinjene Caco-2 og HT-29 (som begge er human coloncancer cellelinjer) viste ulik stimulering ved forskjellig molekylvekt. Caco-2 viste ingen respons på inkubering med β -glukanene i forhold til IL-8 sekresjon. Mens HT-29 viste økt IL-8 sekresjon ved inkubering med 40 kDa og 359 kDa, men ingen effekt ved inkubering med 123 kDa (Rieder, et al., 2011). Våre resultater viser samme trender i stimuleringen, inkubering med 40 kDa og 359 kDa gir en økt IL-8 sekresjon, mens inkubering med 123 kDa viser ingen merkant stimulering av makrofager.

6.4 Karbohydrat spesifikk aktivitet

Resultatene viser en antydning til en stimulering av immunsystemet ved inkubering med utvalgte β -glukaner, og dette kan være positivt med tanke på immunovervåking og skjerping av immunsystemet. Men for å kunne fastslå β -glukanenes immunstimulerende effekt må det bevises at cytokinsekresjonen skyldes β -glukanene. Siden β -glukanprøvene er ekstrahert fra bygg, havre eller gjær kan det ha oppstått LPS kontaminasjon under rensprosessen. LPS er kjent som en immunstimulator og kontaminasjon med LPS kan føre til falske positive resultater. LPS er en kjent stimulator av IL-8 sekresjon i cellelinjen HT-29 (Schuerermary, et al., 1994). Resultatene har vist at LPS også er en immunstimulator i vårt celledsystem. Sekresjonen av TNF- α , IL-8 og IL-1 β fra både makrofager og THP-1 ble stimulert av LPS. For å sjekke om den observerte effekten på cytokinsekresjonen skyldtes selve β -

glukanene eller LPS-kontaminering ble det utført forsøk med polymyxin, tilsetning av TLR-4 antistoff og degradering av β -glukanene ved bruk av enzymene cellulase og lichenase.

6.4.1 Polymyxin

Polymyxin hadde ingen hemmende effekt på den LPS induerte cytokinsekresjonen fra makrofager. Derimot hadde den en ytterligere stimulerende effekt i seg selv. I motsetning til våre resultater med polymyxin har Song & Phelps, 2000, beskrevet en tydelig nedgang i nivåer av TNF- α , IL-1 β og IL-8 m-RNA i THP-1 celler, inkubert med LPS og polymyxin sammenlignet med LPS alene. Polymyxinkonsentrasjonen var med 10 μ g/mL akkurat likt som den brukt i våre forsøk. Song & Phelps brukte i midlertid en inkubasjonstid av bare 2 timer. Det ble ikke rapportert data på hvordan polymyxin tilsetning i seg selv påvirket genekspresjon av de proinflammatoriske cytokinene. Det er mulig at den kortere inkubasjonstiden i forbindelse med måling av genekspresjon istedenfor måling på proteinnivå er årsaken til de ulike resultatene. Det har blitt vist at produksjon og sekresjon av ulike cytokiner fra THP-1 celler varierer mye (Kremlev, et al., 1997) hvilket tyder på at målinger av genekspresjon og målinger på proteinnivået kan være vanskelig å sammenligne. I tillegg er det mulig at differensierte THP-1 celler (makrofager) reagerer annerledes på polymyxin en THP-1 cellene. En annen forskjell mellom våre forsøk og forsøkene fra Song & Phelps er konsentrasjonen av tilsatt LPS. Vi brukte en konsentrasjon av 100 ng/mL mens Song & Phelps jobbet med en konsentrasjon av 0.1 ng/mL LPS. Det er mulig at en LPS konsentrasjonen av 100 ng/mL er for høy til at den brukte polymyxin konsentrasjonen kan binde all tilstedeværende LPS. Den effekten polymyxin i seg selv viste på makrofagene gjorde det imidlertid umulig å bruke polymyxin i vårt makrofag-cellesystem.

6.4.2 Tilsetninger av TLR-4 antistoff

Det finnes ulike mønstergjenkjennende reseptorer (pattern recognizing receptort, PRR) som gjenkjenner MAMPs som LPS. TLR-4 er en PRR som spesifikt reagerer med LPS (Madigan, et al., 2009). Det ble tilsatt et antistoff mot denne reseptoren for å hindre LPS å binde seg til cellene og stimulere til økt cytokinsekresjon. Yonekawa, et al., 2011, beskriver blokkering av TLR-4 for å detektere mulige kontaminasjoner av endotoksiner. Blokkeringen ved bruk av antistoff viste en redusert mengde produsert TNF- α som bevis på at blokkeringen hadde funnet sted.

TLR-4 antistoffet ble først tilsatt 30 minutter før de andre tilsetningene for at TLR-4 antistoffet skulle feste seg til reseptoren. Dette viste en hemming, men ikke en fullstendig hemming av LPS induert cytokinsekresjon fra makrofager. Det ble derfor valgt å utføre forsøket med β -glukanprøver men med en økt inkubasjonstid med TLR-4 ab på en time før tilsetning av β -glukanene.

En times preinkubering med TLR-4 antistoff ga en bedre hemming av LPS-indusert cytokinsekresjon enn 30 minutter preinkubering, men hemmingen var fortsatt ikke fullstendig. Dette kan skyldes at LPS mest sannsynlig også binder seg til andre reseptorer enn TLR-4.

Resultatene viste også en forskjellig grad av hemming av LPS-indusert sekresjon av de ulike cytokinene ved bruk av TLR-4 ab. Mens TLR-4 ab reduserte den LPS-induserte sekresjonen av TNF- α og IL-1 β til en vis grad, ble den LPS-induserte IL-8 sekresjonen bare minimalt påvirket av TLR-4 ab. 40 kDa og h.v. oat induert TNF- α sekresjon ble også hemmet i en vis grad ved tilsetning av TLR-4 ab. På IL-8 sekresjonen var det den 40 kDa og JPBG induerte sekresjonen som ble hemmet til en vis grad av TLR-4 ab tilsetning. Ingen effekt av TLR-4 ab tilsetning på 40 kDa induert IL-1 β sekresjon kunne blitt vist, men den h.v. oat induerte IL-1 β sekresjonen ble hemmet til en vis grad ved TLR-4 ab tilsetning. Dette kan tyde på at LPS virker på flere reseptorer og at TLR-4 ab tilsetning har ulik effekt på de ulike cytokinene. TLR-4 ab tilsetning var ingen god måte for å si noe om effekt av en eventuell LPS kontaminasjon på IL-1 β og IL-8 sekresjonen. Men metoden kunne kanskje vært benyttet for TNF- α , med en lengere inkuberingstid for fullstendig blokkering av LPS. Som nevnet før var den LPS konsentrasjonen brukt i denne oppgaven med 100 ng/mL ganske høy. Det er mulig at effekten av lavere LPS konsentrasjoner på TNF- α sekresjon av differenserte THP-1 celler (makrofager) kan bli mer fullstendig hemmet med TLR-4 ab. Om dette kan være en mulig metode til å utelukke effekt av LPS i biologiske prøver er også avhengig av konsentrasjonen av LPS kontaminasjon i prøvene.

6.4.3 Enzymdegradering ved bruk av cellulase

På grunn av dårlige resultater med polymyxin og TLR-4 antistoff, ble β -glukanene degradert med forskjellige β -glukan spesifikke enzymer for å teste om de observerte effektene skyldes den makromolekylære karbohydratstrukturen. Degradering av β -glukanet skal i prinsippet gi

en lavere cytokinsekresjon hvis det kun er β -glukanet som stimulerer til sekresjonen. Det var derfor forventet at enzymbehandlingen skulle ha en negativ effekt på cytokin sekresjonen. Konseptet med bruk av spesifikke enzymer til å degradere den del av prøven som er forventet til å ha en aktivitet har ikke blitt brukt på β -glukaner fra korn før, og resultatene har derfor ingen litteratur å sammenligne med.

Enzymet cellulase ble benyttet for å degradere β -glukanene. Det ble observert relativt store forskjeller mellom de ulike resultatene fra de enzymbehandlede prøvene, resultatene ble derfor gjengitt i to representative forsøk for TNF- α , IL-8 og IL-1 β sekresjonen fra makrofager (Figur 33-35). Alle forsøkene viste en nedgang av cytokinsekresjonen ved inkubering med degraderte β -glukaner. Størrelsen av nedgangen varierte i de ulike forsøkene. Generelt viste de to første forsøkene en større nedgang i IL-8 og IL-1 β sekresjon med bruk av cellulase en de to neste forsøk. Det var omvendt for TNF- α sekresjonen.

En tydelig nedgang i kontrollcellene tilsatt cellulase ble observert i forhold til kontrollcellene uten cellulase. Dette kan tyde på at enzymet er toksisk for cellene. Enzymet ble kokt i 5 minutter for å bli denaturert før det ble tilsatt cellene. Det er mulig at det denaturerte enzymet har hatt en effekt på cellene. En annen mulighet er at det kan ha vært andre substanser i enzymløsningen som for eksempel har blitt tilsatt for å stabilisere enzymet som har en negativ effekt på cellene.

Andre forsøk (upublisert ved Nofima) har vist en lignende effekt av denaturert cellulase på HT-29 celler (en human tarmkreftcellelinje). En opprensing av enzymet bestående av flere vasketrinn med MilliQ vann har vært nødvendig for å fjerne den negative effekten av enzympreparatet på HT-29 celler. Det ble observert at samme celler reagerer forskjellig på samme type behandling bare utført med to ukers mellomrom.

Celleforsøkene som representerer i samme Figur ble utført nærme hverandre med tanke på tid. Variasjonen mellom de ulike forsøkene kan skyldes at cellene forandrer egenskaper over tid, og dermed har ulik sensitivitet overfor de degraderte β -glukanene og enzymet. En annen mulighet er at det kan ha forekommet en kontaminasjon av f.eks. LPS, enten under selve celleforsøket eller ved tillaging av β -glukanprøver, siden β -glukanprøvene ble laget samtidig for 2 nærliggende forsøk. β -glukanprøvene som er laget samtidig vil også ha en

konsentrasjon og degraderingsgrad som er helt lik i motsetning til β -glukanprøvene laget på forskjellige dager, hvilket kan ha hatt en effekt på cellene. Selv om degraderingen ble overvåket ved bruk av HPAEC-PAD kan det ha vært småforskjeller mellom de ulike forsøkene.

Siden cellulase ga nedgang i kontrollcellene ble det valgt å prøve enzymet lichenase isteden.

6.4.4 Enzymdegradering ved bruk av enzymet lichenase

Ved tilsetning av lichenase ble det også observert en nedgang i cytokinsekresjon fra kontrollcellene i forhold til kontrollcellene uten tilsatt lichenase. De første to forsøkene viste imidlertid bare en liten eller ingen nedgang i sekresjon av IL-8 eller TNF- α fra kontrollcellene med lichenase, mens IL-1 β sekresjonen alltid ble mindre ved inkubasjon av kontrollcellene med lichenase. Alle forsøk viste en nedgang i 40 kDa industert cytokinsekresjon med bruk av lichenase.

Generelt viste de to første forsøk en mindre nedgang i cytokinsekresjon med lichenase enn de to andre forsøkene. For 359 kDa og h.v. oat viste de to første forsøkene en merkbar økning i industert TNF- α sekresjon og en liten økning i IL-8 sekresjon for prøvene behandlet med lichenase sammenlignet med de udegraderte prøvene.

De to andre forsøkene viste en hemmende effekt av lichenasebehandling på industert cytokinsekresjon (TNF- α og IL-8) for 359 kDa eller ingen effekt av lichenasebehandling for h.v. oat eller JPBG etter lichenasebehandling. 359 kDa, h.v. oat og JPBG industerte IL-1 β sekresjonen ble enten økt (359 kDa, h.v. oat) eller ikke påvirket (JPBG) av lichenasedegradering av β -glukanprøvene i begge forsøkene. Denne økningen med lichenasebehandlede prøver kan muligens skyldes LPS (som mistenkes å være i flere av β -glukanprøvene) som er bundet til β -glukanet. Ved nedbryting av β -glukanene med lichenase kan LPS bli frigjort slik at det kan reagere med cellene. Dette kan være en mulig årsak til hvorfor lichenase resultatene er veldig varierende og har gitt motsatt effekt enn forventet i halvparten av forsøkene.

I prinsippet burde inkubering med cellulase- og lichenasebehandlede prøver ha samme effekt, men cellene kan ha reagert forskjellig på enzymene.

Det ble benyttet to ulike metoder for å måle enzymenes toksiske effekt, Cell-Titer-Glow og MTT. MTT testen viste en nedgang etter inkubasjon med cellulase, men bare i et av de to forsøkene og med en av de to cellebatchene, mens Cell-Titer-Glow viste ingen effekt av enzymbehandling på levedyktigheten til cellene. Dette kan muligens forklares med at det ble benyttet en for høy cellekonsentrasjon (5×10^5 celler/mL) ved bruk av Cell-Titer-Glow. Siden cellekonsentrasjonen var på grensen til deteksjonsgrensen til testen. Videre er MTT en test for celler under cellevekst, og dette kan ha hatt en betydning på resultatet siden cellene benyttet ikke var under vekst.

Forsøk på HT-29 celler (utført ved Nofima, upublisert) viser at cellulase er mer skadelig for cellene en lichenase. Det har vært behov for opprensing av cellulase før bruk og tilsetning av denaturert enzym til cellene. Sammenligning med forsøk utført på HT-29 celler (ved Nofima, upublisert) har også vist at THP-1 cellene er mer sensitive til LPS enn HT-29 cellene.

Med dette i bakhodet kan en mulighet være at cellulase hadde en mer toksisk effekt på cellene og derfor hemmet cytokinsekresjonen, mens lichenase hadde en mindre toksisk effekt på cellene og dermed ikke hemmet cytokinsekresjonen på samme måte som cellulase. I tillegg til det har enzymbehandling muligens ført til at LPS i β -glukanprøvene har blitt mer tilgjengelig for interaksjon med cellene hvilket kan muligens forklare en del av den økte sekresjonen av cytokiner i respons til lichenase behandlede β -glukanprøver.

Degraderingene av β -glukanene ble kun utført på β -glukaner fra korn. Det var ønskelig å utføre degradering av Wellmune prøvene også, men på grunn av komplikasjoner med enzymet for degradering av Wellmune og begrenset tid ble dette ikke gjennomført. Forsøk av degradert Wellmune-prøver utført på HT-29 (utført ved Nofima, upublisert) viste at cellene døde av enzympreparatet og det måtte utføres opprensing av enzymet før det kunne tilsettes cellene.

På grunn av nedgangen i cytokinsekresjonen fra kontrollcellene tilsatt enzym i forhold til kontrollcellene uten enzym er det vanskelig å gi en klar konklusjon på om det er β -glukaner eller LPS kontaminasjon som gir den immunstimulerende effekten.

6.6 Bestemmelse av LPS i β -glukanprøvene

De samme β -glukanene benyttet i denne oppgaven ble også benyttet i andre forsøk ved Nofima. Det ble brukt et Kit for endotoxin bestemmelse basert på limulus amoebocyte lysate test (ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin assay kit) for å bestemme LPS innholdet i β -glukanprøvene. Kitten er designet for kvantitativ bestemmelse av LPS i prøver som inneholder β -glukan, ved bruk av en kolorimetrisk metode.

LPS mengden i β -glukanprøvene 40 kDa, 123 kDa, 359 kDa, h.v oat og JPBG ble testet. Limulus amoebocyte lysate (LAL) testen viste at alle prøvene med unntak av 123 kDa inneholdt LPS.

Det viste seg at 40 kDa inneholdt mest LPS, 9,3 ng LPS/mg β -glukan, h.v oat inneholdt 1 ng LPS/mg β -glukan, mens 359 kDa og JPBG inneholdt 0,5 ng LPS/mg β -glukan. Derimot inneholdt 123 kDa mindre enn 0,2 ng LPS/mg β -glukan. Løselig og uløselig Wellmune er ifølge leverandør frie for LPS og ble derfor ikke testet.

7. Konklusjon og videre arbeid

Denne oppgaven viser hvor viktig det er å teste om en observert effekt er spesifikk for den komponenten i testpreparatet som er mistenkt for å ha en effekt. Fra de ulike testede metodene for å fastslå karbohydratsspesifikk enzymdegradering det største potensiale. Men det må da tas høyde for en eventuell negativ effekt av enzympreparatet, og eventuelt rense enzymet før bruk.

THP-1 og differensierte THP-1 celler (makrofager) er et godt modellsystem for immunceller på blod, og kan være en erstatte for en del PBMC forsøk. For å få signifikante resultater må imidlertid celledsystemet og analysemetodene blir ytterligere optimalisert, siden det var store spredninger i responsen fra de ulike celledforsøkene. En mulighet er å se på genuttrykk istedenfor cytokinsekresjon, og bruke en korte inkubasjonstid på for eksempel 2 timer for å virkelig utelukke sekundær effekt av sekreterte cytokiner.

På grunn av mistanken om LPS kontaminasjon av prøvene var det ikke mulig å fastslå avsluttende hvilke β -glukanprøver som hadde en effekt på cytokinsekresjonen utover LPS effekten. Måling av effekten av småmengder LPS som representerer kontaminasjonen i prøvene kan være et første skritt videre i evaluering av karbohydratsspesifikk effekt. Ulike metoder for å fjerne LPS fra prøvene kan også benyttes i tillegg til enzymdegradering med opprenset enzym som ikke har noen effekt på cytokinsekresjonen til kontrollcellene.

8. Referanser

Alberts, B. et al., 2008. *Molecular biology of the cell Fifth edition*. 5 red. s.l.:Garland Science, Taylor & Francis group.

Aune, D. et al., 2011. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. I: *BMJ* 2011 343.

Beer, M., Wood, P. & Weisz, J., 1997. Molecular weight distribution and (3->)(1->4)-beta-D-glucan content of consecutive extracts of various oat and barley cultivars. I: *Cereal Chemistry* 74: 476-480.

Brown, G., 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. I: *Nature Reviews Immunology* 6: 33-43.

Brown, G. & Gordon, S., 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. I: *Nature* 2001: 36-37.

Burton, R. A., Gidley, M. J. & Fincher, G. B., 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. I: *Nature Chemical Biology* 6. *Nature Chemical Biology* red: 724-732.

Chanput, W. et al., 2010. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. I: *Food and function*. the royal society of chemistry: 254-261.

Chi-Fung Chan, G., Chan, W. & Man-Yuen Sze, D., 2009. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. I: *BioMed Central*.

Czop, J. & Austen, K., 1985. Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor. I: *Journal of Immunology* 135: 3388-3393.

Engstad, C., Engstad, R., Olsen, J. & Østerur, B., 2002. The effect of soluble beta-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. I: *International Immunopharmacology* 2: 1585-1597.

Erlinger, T., Platz, E., Rifai, N. & Helzlsouer, K., 2004. C-reactive protein and risk of incident colorectal cancer. I: *JAMA* vol. 291, No 5.

Estrada, A. et al., 1997. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. I: *Microbiol. Immunol.* 41: 991-998.

Grivennikov, S., Greten, F. & Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation and cancer. I: *Cell* 2010, 140: 883-899.

Helsedirektoratet, 2000. *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer, Metodologi og vitenskaplig kunnskapsgrunnlag, nasjonalt råd for ernæring*, Oslo: Helsedirektoratet.

Holtekjølen, A., Uhlen, A., Bråten, E. & Sahlstrøm, S., 2006. Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. I: *Food Chemistry* 94: 348-358.

- King, D. et al., 2007. Effect of a high-fiber diet vs a fiber-supplemented diet on C-reactive protein level. I: *Arch intern med/vol 167*. American medical association.
- Kremlev, S., Umstead, T. & Phelps, D., 1997. Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. I: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 272*: L996–L1004.
- Lazaridou, A. & Biliaderis, C., 2007. Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. I: *Journal of cereal science Volume 46*: 101-118.
- Lea, T., 2006. *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3 red. fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke as.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. & Clark, D., 2009. *Brock biology of microorganisms twelfth edition*. 11 red. Pearson Benjamin Cummings.
- Ma, Y. et al., 2008. Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women's Health Initiative Observational Study.. I: *Nutrition 2008*: 941-949.
- Murphy, K., Travers, P. & Walport, M., 2008. *Janeway's immunobiology seventh edition*. Garland Science.
- Othman, R., Moghadasian, M. & Jones, P., 2011. Cholesterol-lowering effects of oat beta-glucan. I: *Nutrition reviews vol. 69*: 299-309.
- Promega Corporation, 2011. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, instructions for use of products: 1-13.
- Rieder, A. et al., 2011. Cereal β -glucan preparations of different weight average molecular weights induce variable cytokine secretion in human intestinal epithelial cell lines. I: *Food Chemistry: 1037-1043*.
- Roche applied science, 2005. Cell Proliferation kit I (MTT) colorimetric assay (MTT based) for non-radioactive quantification of cell proliferation and viability: 1-4.
- Roubroeks, J., Skjåk-Bræk, G., Ryan, L. & Christensen, B., 2000. Molecular weight dependency on the production of the TNF stimulated by fractions of rye (1- \rightarrow 3), (1- \rightarrow 4)- β -D-glucan. I: *Scand .J. Immunol. 52*: 584-587.
- Saladin, K. S., 2010. *Anatomy and physiology the unity of form and function fifth edition*. McGraw-Hill .
- Samuelsen, A. et al., 2011. Immunomodulatory activity of dietary fiber: arabinoxylan and mixed-linked β -glucan isolated from barley show modest activities in vitro. I: *International Journal of Molecular Science 12*: 570-587.
- Schuerermary, C. et al., 1994. Colonic epithelial-cell lines as a source of interleukin-8 - Stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. I: *Immunology, 81*: 85-91.

- sigmaaldrich, 2011. *sigmaaldrich.com*. [Internett]
Available at: [http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html#Beta Glucans](http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html#Beta%20Glucans)
- Song, M. & Phelps, D., 2000. Comparison of SP-A and LPS effects on the THP-1 monocytic cell line. I: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L110-L117.
- Thornton, B. P. et al., 1996. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor Type 3 (CD11b/CD18). I: *The Journal of immunology*: 1235-1246.
- Tsuzuki, H., Tani, T., Ueyama, H. & Kodama, M., 2001. Lipopolysaccharide: Neutralization by Polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor κ B in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. I: *Journal of Surgical Research* 100: 127-134.
- University of Cambridge, 2004-2012. *dotipoms.ac.uk*. [Internett]
Available at: http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/structure_wood_pt1.php
- Volman, J., Ramakers, J. & Plat, J., 2008. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. I: *Physiology and behavior* 94: 276-284.
- Wood, P., Weisz, J. & Blackwell, B., 1994. Structural studies of (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-glucans by 13 C-NMR and by rapid analysis of cellulose-like regions using high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides released by lichenase. I: *Cereal Chemistry*: 301-307.
- Yonekawa, K. et al., 2011. Myeloid related proteins activate Toll-like receptor 4 in human acute coronary syndromes. I: *Atherosclerosis* 218: 486-492.