

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven ble utført hos Gruppe for Molekylær Cellebiologi ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) på Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB) i Ås.

En stor takk rettes til hovedveileder og professor Tor Lea for hjelp med utforming av oppgaven, konstruktiv kritikk og gode råd under oppgaveskriving.

Takk til Lene Olsen Hult for god veiledning og oppfølging gjennom hele masterarbeidet og hjelp med det praktiske og teoretiske. Og takk til Charlotte Kleiveland for hjelp med praktisk veiledning og gode råd under gjennomføring av oppgaven.

Jeg vil også takke Kjetil Fosnes og Ellen Karlstrøm for opplæring og praktisk hjelp i forbindelse med utførelsen av analysene.

Til venner og familie rettes en takk for støtte, tålmodighet og godt humør.

Til slutt vil jeg takke min bestevenn, kjæreste og livspartner, Øystein. Takk for at du fins i mitt liv. Uten kjærligheten er vi ingenting!

Ås, 13.juni 2012

Rafal Younis

Sammendrag

Fedme er den vanligste årsaken til insulinresistens og en rekke andre metabolske forstyrrelser, som til sammen utgjør det vi kaller metabolsk syndrom. Et kjennetegn ved fedme og utvikling av metabolsk syndrom er en svak, kontinuerlig inflammasjonsprosess. Utviklingen av metabolske forstyrrelser har blitt mye studert i de siste tiårene og fokuset har stort sett vært på epididymalt fett. I denne oppgaven ville vi se nærmere på inflammasjonsendringer i både tarm og epididymalt fettvev ved høyfettdiett. Her tester vi hypotesen om hvorvidt betennelsesprosesser i tarm bidrar til systemisk inflammasjon ved høyfettdiett og fedme.

C57BL/6J hannmus ble føret med en høyfettdiett (HFD) og lavfettdiett (LFD), i en periode på 6 uker. Musestudien er en del av et større prosjekt, «Det Sunne Måltid». RNA fra ileum og epididymalt hvitt fettvev (eWAT) ble isolert og analysert for ekspresjon av inflammatoriske markørgener. Vi fant at inflammasjonsmarkøren (SAA₃) og makrofagmarkøren (F_{4/80}) var oppregulert i eWAT fra mus som har vært på HFD. Ileal mRNA-ekspresjon av inflammatoriske markører viste ingen signifikante forskjeller mellom mus på HFD og mus på LFD. Innenfor varigheten av dette forsøket, tyder resultatene på at inflammatoriske prosesser i tarm ikke bidrar til systemisk inflammasjon ved diettindusert fedme.

Det er dokumentert at makrofager infiltrerer fettvev ved fedme. Med bakgrunn i dette skulle det etableres et «*in vitro*»-system bestående av adipocytter og makrofager. Her skulle det undersøkes ω -3 fettsyre kunne tenkes å påvirke interaksjonen mellom adipocytter og makrofager slik at makrofagdifferensieringen gikk i retning M₂ makrofager (alternativ aktivering). For å etablere en slik modell var det viktig å: (1) differensiere preadipocytter til adipocytter med større og flere fettvakuoler, (2) differensiere makrofager mot M₁ og M₂, og (3) velge markører og en egnet metode for identifisering av M₁- og M₂-makrofager.

Resultatene viste at RAW264.7 celler kan stimuleres med lipopolysakkarider (LPS) mot M₁ og med rekombinant interleukin (IL)-4 mot M₂ makrofager. M₁ og M₂ makrofager kan identifiseres ved hjelp av genekspresjons-analyser av iNOS («inducible nitric oxide synthase») og arginase 1. Det kan se ut til at dokosaheksaensyre (DHA) reduserer produksjonen av IL-6 i differensierte 3T₃-L1, og at kondisjonert medium fra adipocytter inkubert med DHA oppregulerer ekspresjonen av arginase i RAW264.7. Videre undersøkelser bør imidlertid utføres for å bekrefte de sistnevnte resultatene.

Abstract

Obesity is the most common cause of insulin resistance and several other metabolic disorders, which together constitute metabolic syndrome. A characteristic of obesity and the development of metabolic syndrome is a low-grade systemic inflammatory process. The development of metabolic disorders has been widely studied in recent decades, and the focus has mainly been on epididymal adipose tissue. In this paper, we test the hypothesis that inflammatory processes in the intestine contribute to the systemic inflammation observed in diet-induced obesity. We also examine inflammatory changes in the epididymal adipose tissue.

Male C57BL/6J mice were fed high-fat diet (HFD) and low-fat diet (LFD). The mouse study is part of a larger project, "Healthy Meal". After a period of 6 weeks, RNA from ileum and epididymal white adipose tissue (eWAT) was isolated and analysed for inflammatory gene expression. We report here that inflammation-associated and macrophage-specific genes, SAA3 and F4/80 respectively, are up-regulated in the eWAT of mice on HFD. However, the expression of the analysed inflammatory markers were unchanged in ileum from these mice. Within the duration of this experiment, the results indicate that inflammatory processes in the intestine do not contribute to systemic inflammation in diet-induced obesity.

In obesity it is known that macrophages infiltrate the adipose tissue and secrete inflammatory cytokines. Thus, we wanted to establish an *in vitro* system of adipocytes and macrophages to study possible regulatory interactions between these cells. With such a model it would be easy to investigate whether ω -3 fatty acids affect the interaction between adipocytes and macrophages, affecting macrophage differentiation. To establish this *in vitro* system, it was important to: (1) differentiate preadipocytes to adipocytes, (2) differentiate macrophages classically (M₁) and alternatively (M₂), and (3) select suitable markers and method for identification of M₁ and M₂ macrophages.

The results showed that the murine macrophage cell line, RAW264.7, can be differentiated to classically activated macrophages (M₁) and alternatively activated macrophages (M₂) upon stimulation with bacteria lipopolysaccharide (LPS) and recombinant interleukin (IL) -4, respectively. M₁ and M₂ macrophages can be identified by their expression of genes for inducible nitric oxide synthase (iNOS) and arginase 1 (Arg1). It may seem that docosahexaenoic acid (DHA) reduces the production of IL-6 in differentiated 3T3-L1, and that conditioned media from adipocytes incubated with DHA up-regulate the expression of arginase in RAW264.7. Further studies should be performed to confirm the latter results.

Innholdsfortegnelse

A	Metabolsk syndrom	1
A.1	INFLAMMASJON	2
A.1.1	Cytokiner	4
A.2	FETTVEV	5
A.2.1	Epididymalt hvitt fettvev (eWAT)	8
A.2.2	Fettsyrer	8
A.3	MAKROFAGER	9
A.3.1	Klassisk aktiverte makrofager	10
A.3.2	Alternativt aktiverte makrofager	10
A.3.3	Fettvevsmakrofager	11
A.4	ILEUM	12
A.5	CELLELINJER OG CELLEMARKØRER	13
A.5.1	Cellelinjer	13
A.5.2	Cellemarkører	13
A.6	MÅL MED OPPGAVEN	15
B	Materialer, utstyr og metoder	16
B.1	CELLEARBEID	16
B.1.1	Dyrking og subkultivering	16
B.1.2	Nedfrysing og tining	17
B.1.3	Differensiering	17
B.1.4	Farging med Nile Red til fluorescensmikroskopi	18
B.1.5	Inkubering og differensiering	19
B.2	VÆSKESTRØMSCYTOMETRI	20
B.3	ILEUM OG EWAT	21
B.4	«REAL-TIME» POLYMERASE KJEDEREAKSJON (RT-QPCR)	22
B.5	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	24
C	Resultater	25
C.1	INFLAMMATORISKE MARKØRER I ILEUM OG EWAT	25
C.2	DIFFERENSIERING OG INKUBERING AV ADIPOCYTTER	26
C.3	M1/M2-DIFFERENSIERING AV RAW264.7	27
C.3.1	Klassisk aktiverte makrofager	29
C.3.2	Alternativt aktiverte makrofager	29
C.4	STIMULERING AV RAW264.7 MED KONDISJONERT MEDIUM	30
D	Diskusjon	31
D.1	INFLAMMASJON I MUS ETTER DIETTINDUSERT FEDME	31

D.1.1	<i>Ileum</i>	31
D.1.2	<i>eWAT</i>	32
D.2	DIFFERENSIERING OG INKUBERING AV ADIPOCYTTER.....	33
D.3	M1/M2-MAKROFAGER	34
D.4	MAKROFAGER INKUBERT MED KONDISJONERT MEDIUM.....	36
D.5	OPPSUMMERING OG FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	37
E	Referanser	38

Forkortelser

ABTS	«2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)»
APC	Allophycocyanin
Arg1	Arginase 1
ATCC	American Type Culture Collection
BAT	Brunt fettvev
BSA	Bovint serumalbumin
CCR2	CC kjemokinreseptor 2
CD	«Cluster of differentiation»
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
dH₂O	Deionisert vann
DHA	Dokosaheksaensyre
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ELISA	«Enzyme-linked immunosorbent assay»
eWAT	Epididymalt hvitt fettvev
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	Tarmassosiert lymfoid vev
GLUT₄	Glukosetransportør protein 4
HDL	«High-density lipoprotein»
HFD	Høyfettdiett
HRP	Pepperrotperoksidase
IBMX	Metylisobutylxanthine
IDL	«Intermediate-density lipoprotein»
IFNγ	Interferon γ
IL	Interleukin
iNOS	«inducible nitric oxide synthase»
IRS₁	Insulinreseptorsubstrat 1
KMI	Kroppsmasseindeks
LDL	«Low-density lipoprotein»
LFD	Lavfettdiett

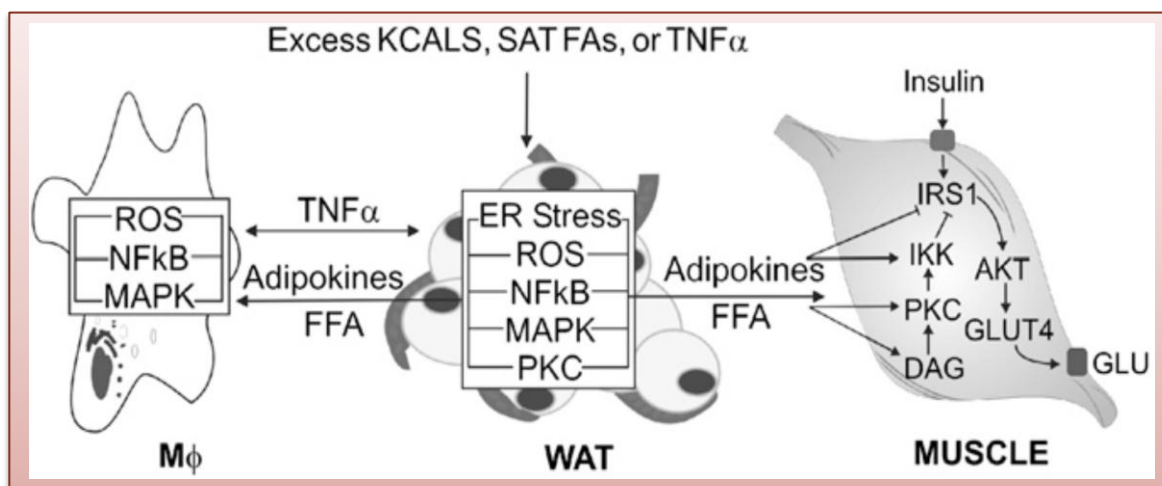
LPS	Lipopolysakkarid
M1	Klassisk aktiverte makrofager
M2	Alternativt aktiverte makrofager
MCP-1	Monocytt kjemoattraktant protein 1
MPO	Myeloperoksidase
mRNA	Budbringer ribonukleinsyre «messenger ribonucleic acid»
NFκB	Nukleær faktor kappa B
ng	Nanogram ($1 \text{ ng} \rightarrow 1 \times 10^{-9} \text{ gram}$)
Nile Red	«9-diethylamino-5H-benzo-α-phenoxazine-5-one»
NO	Nitrogenoksid
ORO	Oil Red O
PBS	Fosfatbufret saltvann
PE	«Phycoerythrin»
PerCP	«Peridinin chlorophyll-complex protein»
pg	Pikogram ($1 \text{ pg} \rightarrow 1 \times 10^{-12} \text{ gram}$)
Rcf	Relativ sentrifugekraft
RIN	«RNA integrity number»
RNA	Ribonukleinsyre
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
RPL32	Ribosomalt protein L32
RPMI	«Roswell Park Memorial Institute»
RT-qPCR	«Real-time» kvantitativ polymerase kjedereaksjon
SAA3	Serum amyloid A3
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TCR	T-cellereseptor
T_{H1}	T-hjelpercelle 1
T_{H2}	T-hjelpercelle 2
TLR	Toll-liknende reseptor
TNFα	Tumor-nekrosefaktor α
VLDL	«Very low-density lipoprotein»
WAT	Hvitt fettvev

A Metabolsk syndrom

I de siste 20 – 30 årene har fedme blitt et større og større problem. I 2008 var det ca. 500 millioner voksne mennesker i verden som var ekstremt overvektige (kroppsmasseindeks, KMI > 30 kg/m²). I tillegg til selve fedmen har en rekke metabolske forstyrrelser oppstått, som igjen har ledet til det vi nå definerer som metabolsk syndrom. Metabolsk syndrom er en samling av minst 3 av disse fedmeassosierte forstyrrelsene:

- Høyt blodtrykk (hypertensjon)
- Høyt blodglukosenivå (hyperglykemi)
- Høye nivåer av blodtriglyserider og -kolesterol (dyslipidemi)
- Lavt nivå av «high density lipoprotein» HDL-kolesterol
- Stort midjemål

Kollektivt vil disse forstyrrelsene øke faren for type 2 diabetes mellitus (T2DM), hypertensjon, aterosklerose, slag og hjerteinfarkt samt noen typer kreft (Chawla et al. 2011; Suganami & Ogawa 2010; Whitney & Rolfes 2008). Insulinresistens, som er blant de fedmeassosierte metabolske forstyrrelsene, er resistensen av metabolske vev (fettvev, muskler og lever) på insulinvirking. Disse metabolske forstyrrelsene ble observert i sammenheng med fedme, og siden har det blitt forsket på hvordan fedme gir opphav til de ulike forstyrrelsene.



Figur 1: Overskuddsenergi, mettede fettsyrer og TNF α påvirker hvitt fettvev til å produsere adipokiner og frie fettsyrer og bli mer inflammert. Adipokiner og frie fettsyrer fremmer utvikling/dannelse av proinflammatoriske makrofager og fremmer insulinresistens i muskelceller (Kennedy et al. 2009).

Det har lenge vært kjent at det er en sammenheng mellom inflammasjon, fedme og insulinresistens (Hotamisligil et al. 1993; Hotamisligil et al. 1996), men det er først nå at fedmeassosiert vevsinflammasjon er anerkjent som en hovedårsak til redusert insulinsensitivitet. Observasjoner av forhøyede tumor-nekrosefaktor α (TNF α)-nivåer, som er et proinflammatorisk cytokin, i fedmeindusert vevsinflammasjon har vært et utgangspunkt for den videre forskningen (se figur 1). I forsøk med TNF α knock-out mus med diettindusert fedme, viste det seg at insulinsensitiviteten ble forbedret (Osborn & Olefsky 2012; Uysal et al. 1997).

Insulin er et hormon som produseres av β -cellene i de Langerhanske øyer i bukspyttkjertelen. Insulinutskillelsen stimuleres ved økte blodglukose nivåer, og funksjonen til insulin er å

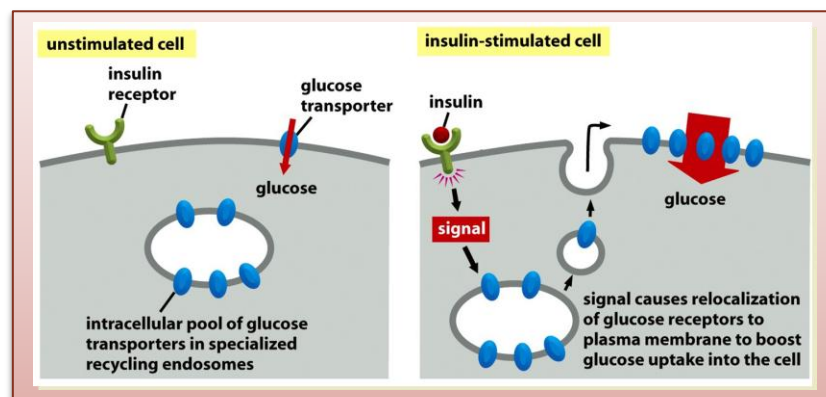
transportere glukose fra blodet og inn i muskel, lever

og fettceller (Lin & Sun 2010). Insulin fungerer blant annet ved at hormonet bindes til insulinreseptoren i cellenes plasmamembran. Bindingen av hormonet til reseptoren stimulerer en signaleringsvei som resulterer i at vesikler med glukosetransportør-protein 4 (GLUT4) fusjonerer med cellemembranen (se figur 2). GLUT4 på cellemembranen transporterer glukose til cellene (Alberts et al. 2008; Lin & Sun 2010). Insulinresistens betyr at cellenes sensitivitet for insulin er redusert, som fører til at lite eller ingen glukose blir transportert inn i cellene. Dette fører til at blodglukosenivået forblir høyt (hyperglykemi).

A.1 Inflammasjon

Inflammasjon er kroppens naturlige forsvarsmekanisme som utløses ved infeksjon, fysisk skade eller en lokal immunrespons. Formålet med denne mekanismen er å fremme et antimikrobielt miljø samt fjerne rester fra og gjenopprette skadet vev. Inflammasjon betegner lokal opphoping av væske, plasmaproteiner og hvite blodlegemer; makrofager og nøytrofile celler.

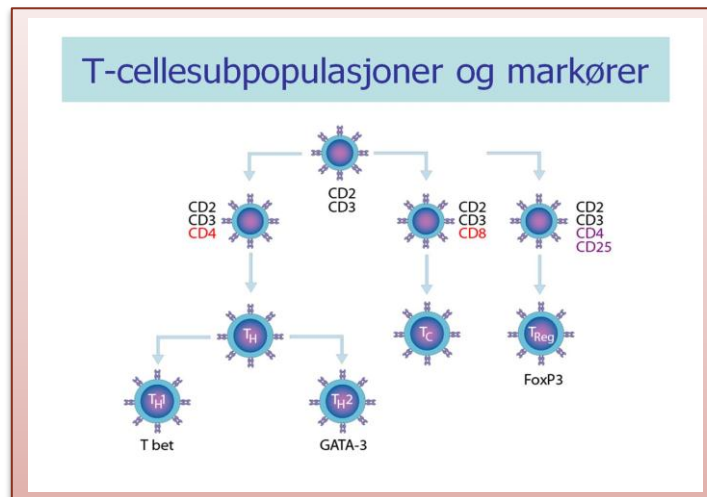
Det skilles mellom akutt og kronisk inflammasjon. Forskjellen mellom akutt og kronisk inflammasjon avhenger av bl.a. skadens varighet og reaksjon på skaden. Dersom årsaken til en akutt inflammasjon ikke kan elimineres går inflammasjonen over til en kronisk tilstand. En



Figur 2: Insulinstimulering av celler for glukoseopptak. Insulinresistens betyr at insulin bindes til insulinreseptoren, men signalet føres ikke videre i cellen (Alberts et al. 2008).

kronisk inflammasjon trenger ikke å være en fortsettelse på en akutt inflammasjon. Ved en kronisk inflammasjon rekrutteres makrofager, lymfocytter og plasmaceller til stedet ved hjelp av kjemokiner. Kjemokiner er cytokiner som produseres og skilles ut av mange ulike celler, f.eks. monocytter, epitel- og endotelceller osv. Kjemokiner tiltrekker immunceller til det inflammerte stedet. Monocytt kjemoattraktant protein 1 (MCP-1) er et eksempel på et kjemokin. MCP-1 produseres av monocytter, makrofager, fibroblaster og keratinocytter, som tiltrekker monocytter, naturlige dreperceller, T-celler, basofile og dendrittiske celler.

T-celler, eller T-lymfocytter, er hvite blodlegemer som stammer fra benmargen. I motsetning til den andre lymfocyttgruppen, B lymfocytter, som utvikles i benmargen, utvikles T lymfocytter fra thymocytter i thymus. T-celler utstyres med T-celleresektorer (TCR) under utvikling i thymus.

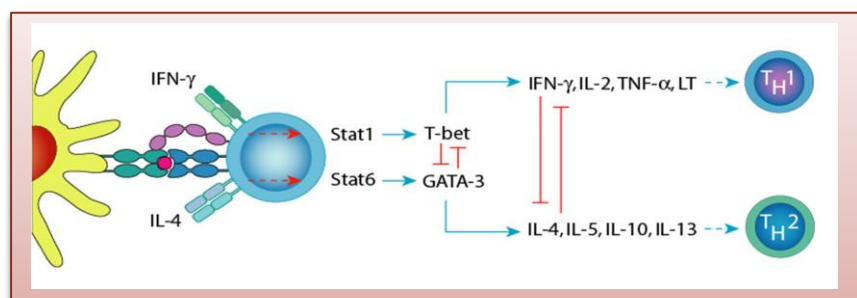


Figur 3: T-cellesubpopulasjoner (Lea 2006)

TCR binder antigener presentert på antigenpresenterende celler for å kunne starte en immunologisk reaksjon. Etter aktivering utvikles T-lymfocytter til effektorceller. Det er 3 hovedgrupper av T-effektorceller: T-hjelperceller (CD4 positive), cytotoksiske T-celler (CD8 positive) og regulatoriske T-celler (CD4 og CD25 positive). Det utvikles i tillegg hukommelsesceller. T-hjelperceller kan deles i to grupper: T_{H1} og T_{H2} (se figur 3).

Undergruppene av T hjelperceller har ulik cytokinproduksjon og funksjon. T_{H1} cellene produserer cytokiner som $IFN\gamma$ og $TNF\alpha$, og inngår stort sett i den cellulære immunresponsen.

Mens T_{H2} celler produserer cytokiner som IL-4, IL-5, IL-10 og IL-13, og deltar stort sett i den humorale (antistoffmedierte)



Figur 4: Figuren viser hvordan stimulering av T-hjelperceller med $IFN\gamma$ og IL-4 aktiverer henholdsvis transkripsjonsfaktorene T-bet og GATA-3. Transkripsjonsfaktorene har en gjensidig hemmende effekt på hverandre, samtidig induserer de produksjonen av cytokiner. T-bet øker produksjonen av $IFN\gamma$, mens GATA-3 øker produksjonen av IL-4 (Lea 2006).

immunresponsen. Det er flere undergrupper av T hjelperceller, men det er

disse to undergruppene som representerer ytterpunktene når det gjelder cytokinprofil og funksjon. IFN γ og IL-4 er viktige cytokiner som ved binding til reseptorer på T celler aktiverer signaler og setter i gang produksjonen av henholdsvis T-bet og GATA-3. T-bet og GATA-3 er transkripsjonsfaktorer som induserer produksjonen av henholdsvis IFN γ og IL-4, samtidig som de har hemmende effekt på ekspresjonen av hverandre. Figur 4 viser stimulatorer, cytokiner og transkripsjonsfaktorene til T_{H1} og T_{H2} (Lea 2006; Murphy 2012).

A.1.1 Cytokiner

Cytokiner er ekstracellulære signalmolekyler i form av små proteiner eller glykoproteiner. Mange av kroppens celler frigjør cytokiner, ofte som en respons på en aktiverende stimulus. Frigjorte cytokiner induserer en respons ved at de binder seg til spesifikke overflatereseptorer. Cytokiner formidler og regulerer immunitet, inflammasjon og hematopoiese som alle er viktige fysiologiske prosesser. Cytokinene kan deles inn etter struktur og funksjon i 4 hovedgrupper:

- Interleukiner (f.eks. IL-6, IL-10)
- Interferoner (f.eks. IFN- γ)
- Tumornekrosefaktorfamilien (f.eks. TNF α)
- Kolonistimulerende faktorer (f.eks. makrofag kolonistimulerende faktor – M-CSF)

Mannoserike oligosakkarider og lipopolisakkarider (LPS) er eksempler på konserverte molekulære strukturer som er funnet på overflaten av bakterier. Slike strukturer har fellesbetegnelsen mikrobeassosierte molekulære mønstre og blir gjenkjent av reseptorer som er uttrykt på overflaten av makrofager, dendrittiske celler og nøytrofile celler. Disse reseptorene kalles for mønstergjenkjennende reseptorer. Toll-lignende reseptor er et eksempel på mønstergjenkjennende reseptor, og aktiveres av blant annet bakterielle lipopolysakkarider (LPS) og dobbeltrådet RNA.

Cytokiner som skilles ut av makrofager, som respons på aktivering av mønstergjenkjennende reseptorer, kan klassifiseres i 5 grupper: IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α og kjemokinet CXCL8 (kjent som IL-8). Cytokiner kan virke på produsentcellen (autokrin), på nabocellen (parakrin) eller systemisk (endokrin). Deres aktivitet varierer ved at: (1) et cytokin kan påvirke ulike celler på ulike måter. Responsen vil da variere fra celle til celle som har interagert med samme cytokin. (2) ulike cytokiner kan framkalle samme respons fra en celle. (3) noen cytokiner kan regulere nivåene av hverandres membranreseptorer og (4) cytokiner kan påvirke produksjonen av andre cytokiner. Variasjonen i cytokinaktivitetene peker på at cytokinene inngår i et funksjonelt nettverk.

Interleukiner

Er en gruppe cytokiner som modulerer inflammasjon og immunitet ved å regulere cellevekst, -differensiering og -migrasjon. Immunsystemets funksjon avhenger i stor grad av interleukiner. Nedenfor nevnes funksjonene til interleukinet som er aktuell i den eksperimentelle delen i denne oppgaven:

IL-6

Er et typisk eksempel på flerfunksjonelt, proinflammatorisk cytokin som blant annet produseres av makrofager. Leverceller stimuleres av IL-6 til økt produksjon og utskillelse av plasmaproteiner som C-reaktivt protein, serum amyloid A og andre akutfasereaktanter. Konsentrasjonen av disse plasmaproteinene øker ved en ikke-spesifikk immunrespons på infeksjon (Gordon & Taylor 2005; Lea 2006; Murphy 2012).

A.2 Fettvev

Fettvev hos pattedyr består av ansamlinger av fettceller (adipocytter) som befinner seg i bindevevet. Adipocytter er bindevevsceller som har differensiert til å bli spesialiserte fettceller som både syntetiserer og lagrer fett. Det finnes to typer fettvev: hvitt fettvev (WAT) og brunt fettvev (BAT). Disse to typene har veldig forskjellige egenskaper. Hvitt fettvev har oppgaver som isolering og fettlagring, mens brunt fettvev har et høyt innhold av mitokondrier som forbruker energien fra fett og produserer varme. Brunt fettvev finnes i store mengder hos spedbarn og minker med alderen.

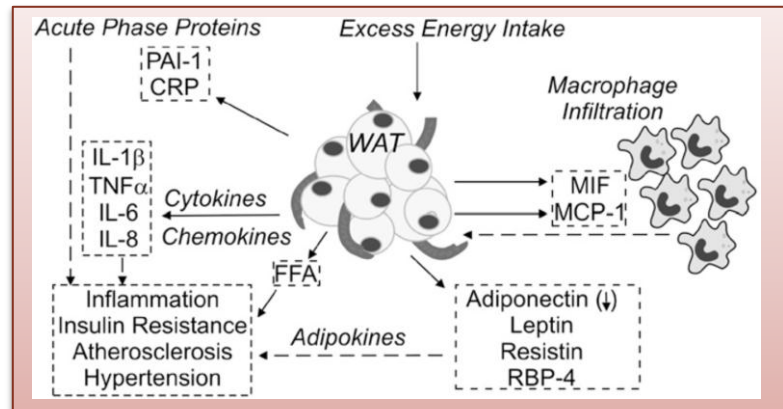
Ved energiinntak som overskrider energiforbruk (overernæring) vil energioverskuddet lagres i fettcellene. Cellene vil dermed øke både i størrelse på grunn av fettakkumulering og i antall. Kroppsfett er fordelt i flere depoter, det finnes blant annet mye underhudsfett og visceralt fett (eller bukfett, fett mellom innvoller). Fordelingen av fett i kroppen er kjønnsavhengig og kan også være genetisk avhengig. Hos kvinner akkumulerer fett rundt hofteområdet, mens hos menn er det rundt midjen (Saladin 2010; Whitney & Rolfes 2008).

Cellene i fettvev produserer en rekke faktorer, som virker auto-, para- eller endokrint, og uttrykker mange overflatereseptorer. Adipokiner er betegnelsen på cytokiner adipocytterne produserer. Blant adipokinene finner vi leptin og adiponektin, cytokiner som TNF α og IL-6, kjemokinet monocytt kjemoattraktant protein 1 (MCP-1) med mer. Adipocytterne uttrykker reseptorer for bl.a. TNF α og IL-6 (Kershaw & Flier 2004). Oppregulering/nedregulering av produksjonen av adipokiner kan være årsaken til eller resultatet av inflammasjon og

makrofaginfiltrering. MCP-1 er en ligand for reseptoren kjemokinreseptor 2 (CCR2). Forsøk med CCR2 og MCP-1 knockout-mus på høyfettdiett har vist at både CCR2 og MCP-1 er viktige for makrofagrekuttering til fettvev. Disse knockout-musene viste mindre akkumulering av makrofager i fettvev og dermed mindre inflammasjon og forbedret insulinsensitivitet (Lumeng et al. 2007b; Suganami &

Ogawa 2010; Weisberg et al. 2006). Studier har også vist at adiponektin nedreguleres ved fedme. Ulike studier foreslår at adiponektin har en anti-inflammatorisk, antidiabetisk og antiaterogen (aterogen – fremmer aterosklerose) effekt (Kershaw & Flier 2004). Figur 5

viser hva som påvirker fettvev til å produsere inflammatoriske cytokiner.



Figur 5: Fedme forårsaker inflammasjon i WAT og fører til metabolsk syndrom (Kennedy et al. 2009)

Kroppens ulike fettdepoter har stedsspesifikke fysiologiske egenskaper, og kan avvike i f.eks. fettsyresammensetning eller utskillelse av adipokiner (Caesar et al. 2010). I forhold til underhudsfett, er genespresjonen og utskillelsen av TNF α og IL-6 større i visceralt fett (Kershaw & Flier 2004).

Om lipidmetabolisme

Triglyserider består av glyserol og 3 fettsyregrupper. Fettet fordøyes i tynntarmen ved hjelp av lipaser fra bukspyttkjertelen. Gallesyre produsert av leveren og skilt ut fra galleblæren er viktig for emulgering av fett slik at det kan brytes ned til mindre dråper og absorberes av de intestinale epitelceller, enterocytter. Enterocytter i tynntarmen absorberer fett i form av miceller som består av monoglyserider, fettsyrer, kolesterol og fettløselige vitaminer omringet med gallesyre. Gallesyre blir ikke absorbert i jejunum. Det er ca. 80 % av gallesyre som blir reabsorbert i ileum og tilbakeført til lever for gjenbruk.

I enterocytter blir triglyserider resyntetisert og pakket sammen med fosfolipider og kolesterol og omringet med proteinkapper, og blir til det som kalles for kylomikroner. Kylomikroner transporteres via lymfe til blodårer. Når triglyseridinnholdet i kylomikronene leveres til ulike vev i kroppen, føres kylomikron-restene (protein, kolesterol og fosfolipider) tilbake til lever der de blir degradert.

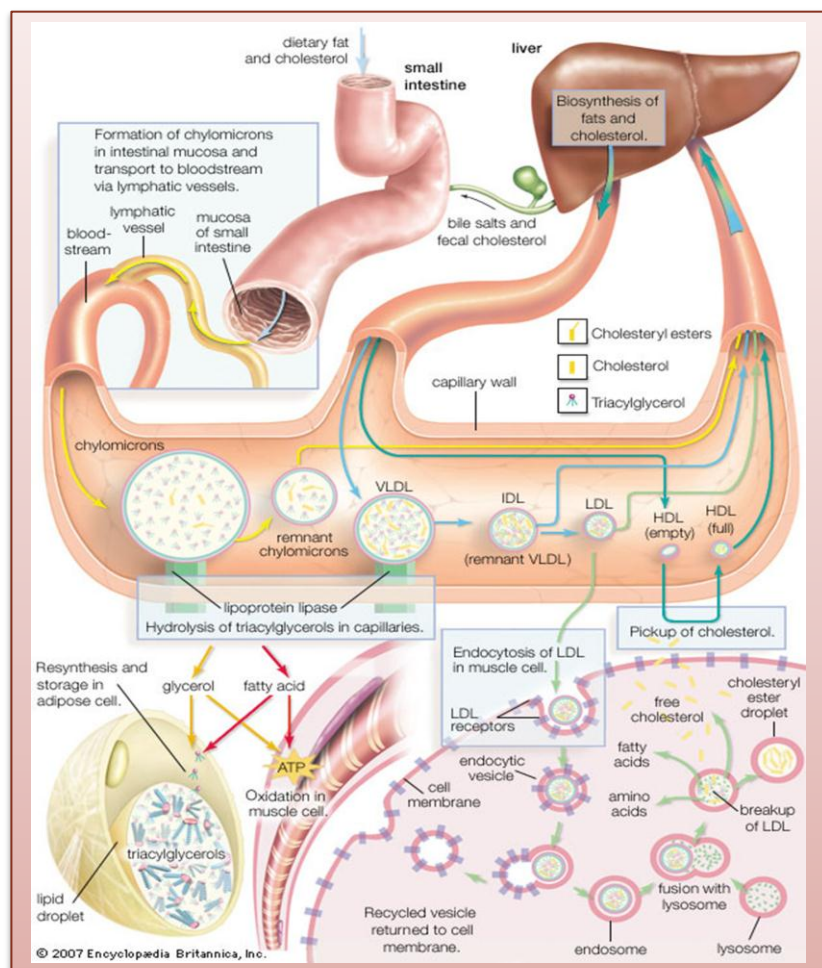
Lipoproteiner er lipid-proteinkomplekser som har som oppgave å transportere lipider til celler i hele kroppen. I tillegg til kylomikroner er det 4 andre lipoproteiner, som har ulik sammensetning av fosfolipider, kolesterol, proteiner og triglyserider. Lipoproteinene HDL («high-density lipoprotein»), LDL («low-density lipoprotein»), IDL («intermediate-density lipoprotein») og VLDL («very-low density lipoprotein»), og kylomikroner, er rangert etter tetthet som gjenspeiler proteininnholdet (høy tetthet = høyt proteininnhold). Kortfattet: HDL og VLDL syntetiseres i lever, mens IDL og LDL avledes av VLDL. VLDLs oppgave er å transportere fett til ulike vev i kroppen, mens HDL transporterer kolesterol fra celler og til leveren der den blir resirkulert eller eliminert, som vist på figur 6 (Saladin 2010; Whitney & Rolfs 2008).

Triglyserider i fettvev spaltes til glyserol og frie fettsyrer (lipolyse) ved hjelp av enzymet hormonsensitiv lipase.

Under normale betingelser skiller fettvevet ut frie fettsyrer (FFA) slik at celler i kroppen oksiderer fettsyrene og bruker energien. Ved insulinresistens vil utskillelsen av FFA stige, dette skyldes økt aktivitet til hormonsensitiv lipase (Champe et al. 2008).

Resultatet av triglyseridnedbryting er forhøyede konsentrasjoner av FFA, kolesterol og glyserol (dyslipidemi). Høye FFA-konsentrasjoner

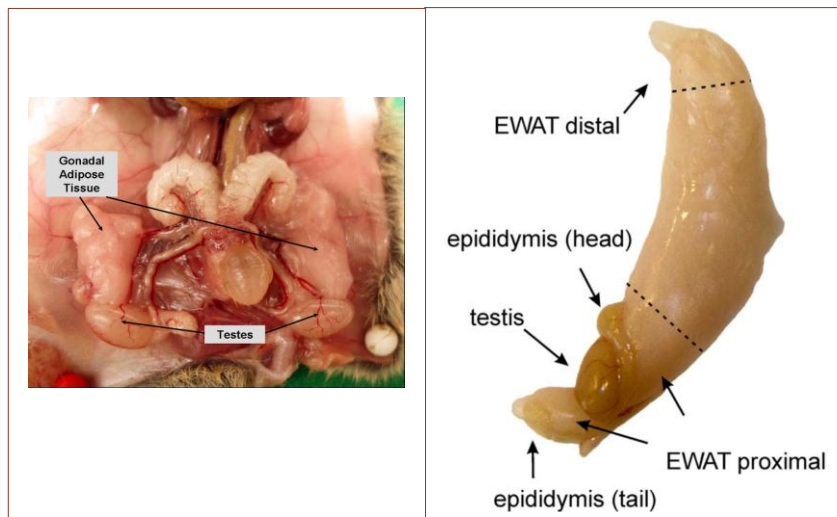
stimulerer reaksjoner som reduserer insulinsensitivitet (Lin & Sun 2010).



Figur 6: Oversikt over lipoproteinenes rute i kroppen (Encyclopædia Britannica Online 2007)

A.2.1 Epididymalt hvitt fettvev (eWAT)

Perigonadalt WAT er et visceralt fettvev som er lokalisert i bukhulen hos mus. Fettvevet omgir livmoren, urinblærene og eggstokkene hos hunnmus og kalles for periovariant fettvev. Hos hannmus omgir dette vevet bitestikkelen og kalles for epididymalt hvitt fettvev.



Figur 7: Epididymalt hvitt fettvev i hannmus (Caesar et al. 2010; WikiDoc 2012)

Vevet er halvmåneformet

(se figur 7). eWAT er spesielt for mus, mennesker har ikke noe tilsvarende (Gesta & Kahn 2012).

A.2.2 Fettsyrer

Fettsyrer består av hydrokarbonkjeder med en karboksylsyregruppe (COOH) i den ene enden, og en metylgruppe (CH₃) i den andre enden (omega-enden). Fettsyrer kan deles i 3 grupper etter metthetsgrad: mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer. Umettede fettsyrer har dobbeltbindinger mellom karbonatomene. Jo flere dobbeltbindinger det er i en fettsyre, desto lavere er smeltepunktet. Når triglyserider nedbrytes til glyserol og frie fettsyrer, vil FFA kobles til proteinet albumin, for å kunne sirkulere i blodet. Dette er på grunn av fettsyrenes hydrofobe egenskaper.

Mettede fettsyrer er sterkt assosiert med høye nivåer av blodkolesterol og økt fare for hjerte- og karsykdommer. Blant fettsyrene som øker blodkolesterol finner man palmesyre (C16:0).

Umettede fettsyrer forbindes derimot med gunstige helseeffekter når det gjelder hjertesykdommer og slag. Blant flerumettede fettsyrer finner man de to essensielle fettsyrene: linolsyre (ω -6) og linolensyre (ω -3). Etter inntak, konverteres linolensyre i kroppen til eikosapentaensyre (EPA) og så dokosaheksaensyre (DHA). Både linol- og linolensyre er viktige for normal vekst og utvikling (Champe et al. 2008; Whitney & Rolfes 2008). Nedenfor beskrives to fettsyrer som er aktuelle for den eksperimentelle delen i denne oppgaven:

1. Palmesyre (16:0)

Palmesyre er en mettet fettsyre som består av 16

karbonatomer og ingen dobbeltbindinger (figur 8).

Palmitat er den betegnelsen på salter eller estere av palmesyre. Animalske matvarer, som f.eks. melkeprodukter og rødt kjøtt, samt palmeolje er rike på palmesyre.



Figur 8: Palmesyrens kjemisk struktur

2. Dokosaheksaensyre (22:6 ω-3)

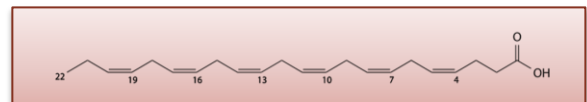
DHA er en flerumettet omega-3 (ω-3) fettsyre

som består av 22 karbonatomer og har 6

dobbeltbindinger (figur 9). DHA er en essensiell

fettsyre og må tilføres kroppen via kosten. Fisk

og marine matvarer, samt vegetabiliske oljer, frø og nøtter, er gode kilder for DHA (Whitney & Rolfes 2008).



Figur 9: Dokosaheksaensyrens (DHA) kjemisk struktur

A.3 Makrofager

Makrofager er den modne formen av monocytter som har sin opprinnelse fra stamcellene i benmargen. De forekommer i nesten alle vev i kroppen, og det er spesielt rikelig med makrofager i lever, lunger, milten og lymfeknuter. Makrofager er viktige fagocytter, de er også antigenpresenterende celler som har en viktig funksjon for T-celleaktivering (cellulær immunitet). Makrofager fagocytterer mikroorganismer og infiserte celler, og i tillegg fjerner de døde celler og rester (Lea 2006; Murphy 2012).

I tillegg til makrofagenes rolle i medfødt immunitet, deltar de i den adaptive immunresponsen. Avhengig av stimulus kan makrofager polariseres i en av to fenotypisk ulike grupper: klassisk aktiverte makrofager (M₁) og alternativt aktiverte makrofager (M₂) (Chawla et al. 2011; He et al. 2011; Osborn & Olefsky 2012). M₁-aktiverte makrofager kan stimuleres til M₂, og omvendt (Benoit et al. 2008).

Makrofager differensieres fra monocytter og er heterogene celler. Makrofagene er lokaliserte i ulike anatomiske steder i kroppen der de utvikler egenskaper som er vevsspesifikke.

Heterogeniteten av makrofagene reflekterer funksjonene disse cellene har i de ulike vevene de er lokalisert i. Ulike egenskaper kan også oppstå etter ulike stimulus (Gordon & Taylor 2005).

Makrofager uttrykker mange ulike membranmolekyler. F4/80 er f.eks. en overflatemarkør som er uttrykt på alle makrofager, mens mannosereseptor 1 (CD206) oppreguleres ved en M₂-

aktivering. Overflatereseptorer for Fc-delen (FcγR) av IgG-antistoffer er uttrykt på makrofager (Chawla et al. 2011; Lawrence & Natoli 2011; Stein et al. 1992).

A.3.1 Klassisk aktiverte makrofager

Ved stimulering av murine makrofager med lipopolysakkarider (LPS) og/eller IFN-γ (et T_{H1}-cytokin), utvikles M₁-aktiverte makrofager. Disse makrofagene skiller ut rikelig med proinflammatoriske cytokiner og beskjedne mengder anti-inflammatoriske cytokiner. De produserer også enzymet «inducible nitric oxide synthase»-iNOS, som produserer nitrogenoksid (NO) og L-citrullin, ved å oksidere substratet L-arginin (Champe et al. 2008; Munder et al. 1998). Dette enzymet blir ofte brukt som en markør for M₁-makrofager (Benoit et al. 2008; He et al. 2011).

M₁-makrofager produserer toksiske produkter (nitrogenoksid) og proinflammatoriske cytokiner (TNFα, IL-6 og IL-12) og viser med dette sterke antimikrobielle egenskaper (Murphy 2012). Blant mekanismene som ble studert i forbindelse med proinflammatoriske cytokiner og insulinresistens, er aktiveringen av nukleær faktor kappa B (NFκB). NFκB er et genregulatorisk protein og er involvert i viktige prosesser som f.eks. immune og inflammatoriske responser. Proteinkomplekset NFκB aktiveres blant annet av TNFα og andre proinflammatoriske faktorer (Alberts et al. 2008; Osborn & Olefsky 2012).

Flere forskningsartikler hevder at dendrittisk cellemarkøren, CD11c, er også uttrykt på fettvevsmakrofager. Forsøk viste at flere fettvevsmakrofager var F4/80⁺CD11c⁺ hos fete mus i forhold til normalvektig mus. Fettvevsmakrofager hos fete mus er makrofager med inflammatoriske egenskaper (Chawla et al. 2011; Lumeng et al. 2007a; Osborn & Olefsky 2012).

A.3.2 Alternativt aktiverte makrofager

Alternativ aktivering av murine makrofager kan induseres ved stimulering med cytokinene IL-4 og/eller IL-13. M₂-makrofager skiller ut anti-inflammatoriske cytokiner (IL-10) og produserer enzymet arginase 1 (Arg1), som omdanner L-arginin til L-ornitin og urea (Champe et al. 2008; Munder et al. 1998). Siden L-arginin er substratet til både iNOS og arginase 1, vil oppregulering av det ene enzymet føre til undertrykking av det andre, avhengig av stimulus.

Alternativt aktiverte makrofager kan deles i 3 undergrupper: M_{2a}, M_{2b} og M_{2c}. Forskjellen mellom disse gruppene er at de induseres med ulike interleukiner eller immunkomplekser, uttrykker noen ulike overflatemarkører og produserer ulike cytokiner. Felles for dem at de uttrykker arginase 1, produserer IL-10 og uttrykker noen like overflatemarkører (Benoit et al. 2008; Van Ginderachter et al. 2006).

I tillegg til at M₂-makrofager undertrykker M₁-makrofagenes proinflammatoriske og antimikrobielle respons, har de andre roller som er viktige i sårhelingsprosess og gjenoppretting av homeostase. Eksempler på slike roller er nedregulering av inflammasjon, eliminering av døde celler og avfallsstoffer, utskilling av faktorer som stimulerer vekst og regenerasjon, og nydanning av blodårer (Murray & Wynn 2011).

Deling av makrofager i M₁ og M₂ skaper debatt i forskningsfeltet. Mange artikler skriver at denne deling er veldig forenklet i forhold til de mer kompliserte og dynamiske prosessene som skjer i kroppen. Det er mange overlappende prosesser som gjør det vanskelig å sette klare skiller på makrofagpolarisering (Benoit et al. 2008; Osborn & Olefsky 2012; Van Ginderachter et al. 2006).

A.3.3 Fettvevsmakrofager

I en studie der fettvevet på magre og fete mus ble undersøkt, viste det seg at det var 10 – 15 % av cellene i magre mus som uttrykte makrofagmarkøren F_{4/80}, i motsetning til 45 – 60 % i fete mus. Det samme har vært observert hos mennesker (Chawla et al. 2011; Osborn & Olefsky 2012; Weisberg et al. 2003)

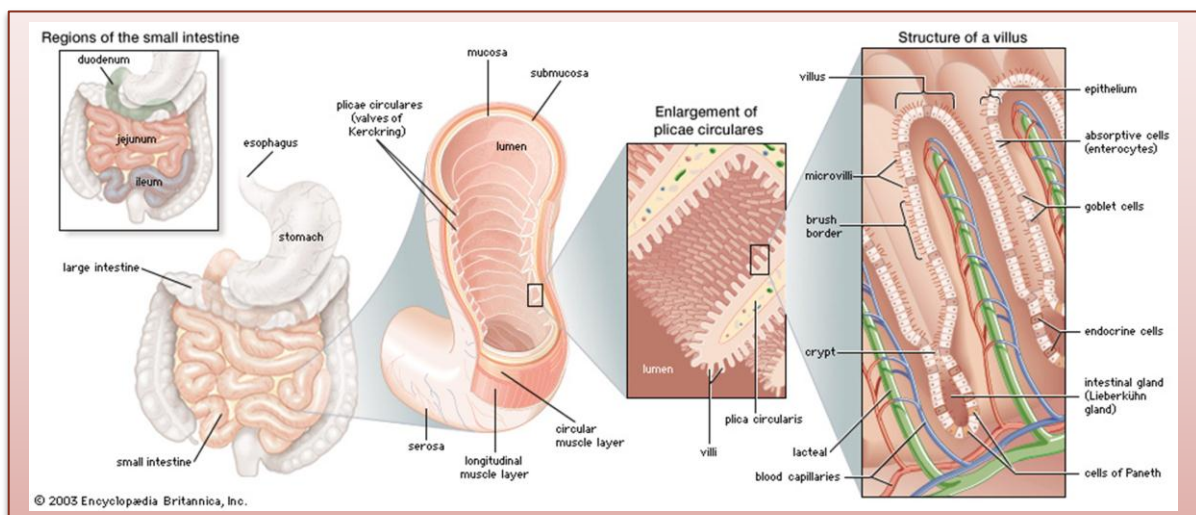
Ved fedme infiltrerer makrofager fettvevet, og kalles for fettvevsmakrofager, der de produserer proinflammatoriske cytokiner som TNF α og IL-6. Både TNF α og/eller forhøyede nivåer av frie fettsyrer som adipocytene blir utsatt for, fremmer systemisk insulinresistens ved at de stimulerer mekanismer som fører til redusert respons på insulin (Lin & Sun 2010).

Fettvevsmakrofager akkumuleres mest i visceralt fett ved fedme og de produserer større mengder proinflammatoriske cytokiner i forhold til fettvevsmakrofager i underhudsfett. Dette antyder at visceralt fettvev er uheldig med tanke på inflammasjon og metabolske forstyrrelser. Det gjenstår allikevel flere studier for å bekrefte at faktorene som fører til insulinresistens faktisk produseres i visceralt fett (Osborn & Olefsky 2012).

A.4 Ileum

Tynntarmen består av tolvfingertarm (duodenum), midtre del (jejunum) og nederste del (ileum). Tynntarmen strekker seg fra magesekken til tykktarmen, og hver del av den har karakteristiske forskjeller. Tarmveggen består av flere lag som kan deles i 4 deler: et indre lag med epitelceller (mukosa), et lag med bindevev, blod- og lymfeårer (submukosa), et muskellag med glatt muskulatur og et bindevevslag (serosa). Mellom epitelcellelaget er det tette kontaktpunkter («tight junctions») som danner en barriere mellom tarminnhold og kroppens indre. Figur 10 viser struktur av tynntarmen og celletyper som befinner seg i tynntarmen.

Tarmveggen i ileum er tynnere sammenlignet med jejunum, blodforsyningen er mindre og dermed blekere rosa farge, mindre muskuløs og dermed tregere peristaltiske bevegelser og det er flere makroskopiske aggregater av immunceller som kalles for Peyerske flekker.



Figur 10: En anatomisk oversikt over tynntarmen (Encyclopædia Britannica Online 2003)

Både maten vi spiser og bakteriefloraen gjør at fordøyelsessystemet er spesielt utsatt for fremmede mikroorganismer og antigener. Immunforsvaret er derfor forsterket i bl.a. tarm.

Intestinale immunceller er lokaliserte i induksjonssteder og effektorsteder. Induksjonsstedene er de organiserte lymfoide vevene som f.eks. Peyerske flekker og mesenteriske lymfeknuter, mens effektorstedene finnes i epitelet og i det tynne bindevevslaget under slimlaget (mukosa) som kalles for lamina propria. De organiserte lymfoide vevene har fellesbetegnelsen tarmassosierte lymfoide vev (GALT). Effektorstedene omfatter lymfocytter og andre immunceller (makrofager, dendrittiske celler osv.). Tarmen er ett av stedene i kroppen som er spesielt rik på makrofager. Disse makrofagene er preget av høye fagocytiske og antimikrobielle aktiviteter, men lav produksjon av proinflammatoriske cytokiner (Gordon & Taylor 2005).

Peyerske flekker er viktige for initiering av immunresponser i tarmen, de inneholder spesielt mye B lymfocytter i såkalte B-cellefollikler med T-celler mellom folliklene. Over de Peyerske flekkene er det et follikelassosiert epitellag som ikke er dekket av slim. Mellom epitelcellene i dette epitellaget ligger såkalte M-celler (mikrofold celler) spredt. M-celler har en viktig rolle i tarmen ved at de danner en forbindelse mellom innsiden av tarmen og GALT. M-celler fungerer ved at de transporterer partikler fra tarmen til immunceller i Peyerske flekker for å kunne sette i gang en immunrespons på antigener (Garrett et al. 2010; Lea 2006; Murphy 2012; Saladin 2010).

A.5 Cellelinjer og cellemarkører

Nedenfor beskrives cellelinjer og cellemarkører som er av betydning for den eksperimentelle delen av denne oppgaven.

A.5.1 Cellelinjer

Cellelinjene 3T3-L1 og RAW264.7 er henholdsvis en preadipocyt- og makrofagcellelinjer.

L1 er en understamme av cellelinjen 3T3 («Swiss albino»). 3T3-L1 er preadipocytter og kan differensieres til adipocytter (LGC Standard 2012a). Når 3T3-L1 injiseres i nakne mus, vil cellene utvikles til fettvev som ikke kan skilles fra normale fettvev (Novakofski 2004). 3T3-L1 er en velkarakterisert cellelinje som stadig brukes til studier av mekanismer bak fedmeutvikling.

RAW264.7 er en makrofagcellelinje som ble etablert fra en svulst induert av Abelson muse leukemivirus (LGC Standard 2012b). Cellelinjen skiller ikke ut påviselige viruspartikler.

Walloschke og medarbeidere (Walloschke et al. 2010) rapporterte at cellelinjen RAW264.7 egner seg bra som en «*in vitro*»-modell for undersøkelse av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og cytokinproduksjon etter stimulering.

A.5.2 Cellemarkører

Markørene nedenfor ble brukt i oppgaven som referansegen (RPL32), inflammatoriske markører (SAA3, Calprotectin og MPO) og makrofagmarkør (F4/80).

Ribosomalt protein L32 (RPL32)

RPL32 er et ribosomalt protein som er en del 60S subenheten av ribosomet, og er lokalisert i cytoplasmaet.

Serum amyloid A₃ (SAA₃)

SAA₃ er en et akutfaseprotein som er medlem av SAA familien. SAA₃ er uttrykt i mus og andre pattedyr men ikke mennesker. Nivåer av SAA₃ er lave, men øker drastisk ved inflammasjon, og egner seg derfor som inflammasjonsmarkør (Scheja et al. 2008).

Calprotectin

Calprotectin er en heterodimer som består av proteinene; S100A8 og S100A9. Disse proteinene er medlemmer av proteinfamilien S100, som er kalsiumbindende proteiner. Calprotectin er proinflammatorisk og den uttrykkes og utskilles av fagocytter. Fagocytter, i forbindelse med inflammasjon, får oppregulert uttrykk av S100A8 og S100A9. Calprotectin har vist seg å være en nyttig markør for påvisning av inflammasjon (Foell et al. 2004; Nacken et al. 2003).

Myeloperoksidase (MPO)

En oksygenavhengig nedbrytningsprosess av fagocytterte komponenter, inkluderer myeloperoksidase. MPO danner oksygenderiverte frie radikaler for å drepe invaderende bakterier og er derfor proinflammatorisk (Champe et al. 2008). Myeloperoksidase er et hemprotein (jerninnholdende protein) som blir utskilt av aktiverte leukocytter. Enzymet er høyt uttrykt i nøytrofile granulocytter og er tenkt å spille en rolle i immunforsvaret (Eiserich et al. 2002).

Anti-F₄/80 antistoff

Anti-F₄/80 antistoff er et monoklonalt antistoff, og blir brukt som markør for monocytter og mange vevsmakrofager i mus. Antistoffet er medlem av familien EGF-TM7 («seven transmembrane») av leukocyttheptahelikale membranmolekyler (Gordon et al. 2011; Hamann et al. 2007).

A.6 Mål med oppgaven

Mål med oppgaven var å undersøke inflammatoriske endringer i tarm og epididymalt fettvev i 20 mus, der halvparten har vært på en høfetttdiett (HFD) mens den andre halvparten på en lavfetttdiett (LFD) i en periode på 6 uker. Inflammatoriske endringer skulle undersøkes ved hjelp av ekspresjonsanalyser på noen utvalgte markører, og resultatene skulle sammenlignes mellom de to gruppene.

Det skulle også etableres et «*in vitro*»-system for å undersøke om ω -3 fettsyrer kunne tenkes å påvirke interaksjonen mellom adipocytter og makrofager slik at makrofagdifferentieringen gikk i retning M2 makrofager. For å etablere en slik modell var det viktig å: (1) differensiere preadipocytter til adipocytter med større og flere fettvakuoler, (2) differensiere makrofager mot M1 og M2, og (3) velge markører og en egnet metode for identifisering av M1/M2-makrofager.

B Materialer, utstyr og metoder

Nedenfor beskrives materialer, utstyr og metoder som ble benyttet i forbindelse med analysene som ble utført i denne oppgaven. Analyser ble utført på tarm og fettvev fra mus, og makrofag og adipocytte cellelinje.

B.1 Cellaarbeid

De to cellelinjene som ble brukt i denne oppgaven var:

- 3T3-L1 mus embryonale fibroblaster (preadipocytter), ATCC® CL-173™ fra American Type Culture Collection (ATCC)
- RAW264.7 mus makrofag, ATCC® TIB-71™ (ATCC)

B.1.1 Dyrking og subkultivering

Cellelinjene 3T3-L1 og RAW264.7 ble dyrket i FALCON flasker eller brønner (Becton, Dickinson and Company) i komplett medium med 10 % FCS (se figur 11), og kultivert ved 37 °C, høy fuktighetsgrad og 5 % CO₂ i inkubatorskap. All cellarbeid ble utført sterilt.

Komplett medium består av:

- 500 ml RPMI 1640 med L-glutamine (PAA Laboratories GmbH)
- 1 mM ikke-essensielle aminosyrer (PAA Laboratories GmbH)
- 1 mM natriumpyruvat (PAA Laboratories GmbH)
- 25 µg/ml gentamicin sulfat (BioWhittaker)
- 50 µM monothioglycerol (SIGMA)
- Med eller uten FCS*

* FCS er inaktivert føtalt kalveserum (PAA Laboratories GmbH)

Figur 11: Komplett mediums innhold.

Både 3T3-L1 og RAW264.7 er adherente celler der veksten avhenger av arealet på beholderens overflate. Cellene ble løsnet fra overflaten ved subkultivering på to ulike måter:

1. Enzymatisk subkultivering

Medium ble fjernet og cellene ble vasket et par ganger med Dulbecco's PBS (1x) (PAA Laboratories GmbH) før tilsetning av 1x trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH), etterfulgt av inkubering ved 37 °C i 4 – 8 minutter. For å inaktivere trypsin, ble det tilsatt dobbelt volum av komplett medium. Denne metoden ble benyttet ved subkultivering av 3T3-L1.

2. Mekanisk subkultivering

Adherente celler som ikke tåler trypsin, kan skrapes med en celleskraper. RAW264.7 er et eksempel på slike celler. Skrapingen ble utført med litt medium i flasken/brønnene slik at cellene ikke skulle bli skadet. Denne metoden ble anvendt ved subkultivering av RAW264.7.

Etter at cellene ble løsnet fra overflaten (enzymatisk eller mekanisk), ble de sentrifugert ved 1300 rcf i 10 minutter før det ble laget en enkeltcellesuspensjon. Telling av cellene ble utført ved hjelp av Coulter Z1 Particle Counter (Coulter Electronics Ltd), der diameteren ble innstilt på 4 – 12 µm for begge typer celler.

B.1.2 Nedfrysing og tining

Cellene ble sentrifugert ved 1300 rcf i 10 minutter, resuspendert i komplett medium med 10 % FCS og fordelt på ampuller (ca. 1 – 2 millioner celler) som tåler flytende nitrogen. Ampullene ble lagt på is og cellene ble tilsatt innfrysningsmedium (ca. 500 µl) dråpevis.

Innfrysningsmedium bestod av: komplett medium med 20 % FCS og 20 % dimetylsulfoksid (DMSO, Merck). Nedfrysningen måtte skje gradvis ved at nylagede frysestokker var 1 – 2 døgn i -80 °C fryser før de ble lagt i nitrogentank.

Ampullen med celler ble tint på is før innholdet ble blandet med kaldt komplett medium med 10 % FCS. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1300 rcf i 10 minutter, cellene ble resuspendert i nytt medium før blandingen ble sentrifugert på nytt. Dette ble gjort for å vaske bort mest mulig DMSO. Cellene ble overført til 1 brønn i en 6-brønners plate og ble tilsatt 3 ml komplett medium med 10 % FCS. Etter opptak fra nitrogentank ble medium skiftet etter de første 24 timene, deretter hver 48 eller 72 timer.

B.1.3 Differensiering

3T3-L1 i passasjennummer 10 – 14 ble differensiert i henhold til differensieringsprotokoll fra ATCC (ATCC 2011). Et visst antall celler ble overført til 6- eller 24-brønners plater. Det tok 48 timer før dyrkingsarealet var fullt (cellene var konfluente), medium ble skiftet og cellene ble inkubert i

Differensieringsmedium består av komplett medium (med 10 % FCS) tilsatt:

- 1.0 µM Dexametason (SIGMA)
- 0.5 mM Metylisobutylxanthine (IBMX) (SIGMA)
- 1.0 µg/ml Insulin (SIGMA)

Adipocyt vedlikeholdsmedium er komplett medium (med 10 % FCS) tilsatt:

- 1.0 µg/ml Insulin

Figur 12: Innholdet av differensieringsmedium og adipocyt vedlikeholdsmedium

ytterligere 48 timer (postkonfluens). Deretter ble cellene tilsatt differensieringsmedium (se figur 12) og inkubert i 48 timer. Etter 48 timer, ble differensieringsmedium skiftet ut med adipocyt vedlikeholdsmedium (se figur 12). Adipocyt vedlikeholdsmedium ble skiftet hver 48 eller 72 timer og cellene var fullstendig differensierte mellom 7 – 15 dager etter induksjon med differensieringsmedium.

For å lage løsninger av dexametason og IBMX, ble stoffene løst i 100 % etanol, mens insulin ble løst i 10 mM HCl. Alle løsninger ble fortynnet i komplett medium med 10 % FCS.

Videre i denne oppgaven vil 3T₃-L₁ omtales som preadipocytter, mens differensiert 3T₃-L₁ som adipocytter. Preadipocytter som ble brukt til forsøk i oppgaven, var på passasjennummer mellom 10 og 14.

B.1.4 Farging med Nile Red til fluorescensmikroskopi

Preadipocytter og adipocytter skulle farges for å vise fettakkumulering i differensierte adipocytter. For dette formål ble fargen Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo- α -phenoxazine-5-one) benyttet.

Preadipocytter ble modnet på 6-brønners plate med et dekkglass på bunnen av brønnene. Dekkglassene måtte overflatebehandles først før dyrking av preadipocytter, slik at cellene kunne feste seg til dem. Overflatebehandlingen av dekkglassene bestod av tilsetning av kollagen (SIGMA) fortynnet i PBS (1:20), fulgt av inkubering i 3 -4 timer ved romtemperatur. Overskuddet av kollagen ble fjernet og dekkglassene ble deretter satt til tørking ved romtemperatur i ca. 1 time før de var klare til bruk.

Preadipocytter og adipocytter ble vasket to ganger med PBS før og etter fiksering med 4 % paraformaldehyd. Fikseringstiden var på 30 minutter ved romtemperatur. Nile red (SIGMA) i aceton (0,1 mg/ml) ble fortynnet i PBS til konsentrasjonen 0,1 μ g/ml, før den ble tilsatt cellene. Celler med fargeblanding ble inkubert mørkt ved romtemperatur i 30 minutter. Cellene ble deretter vasket med PBS og var fuktige til mikroskopering.

Dekkglassene med celler ble fjernet forsiktig fra 6-brønners plate, lot overflødig væske dryppe ned i noen sekunder og ble tilsatt olje, før de ble lagt på et objektivglass. Cellene ble visualisert med et konfokalt laserskanning-mikroskop (SP5 Leica Microsystems). Det ble benyttet en argonlaser ved 488 nm som eksitasjonskilde, og en detektor samlet emisjonen mellom 530 – 650 nm.

B.1.5 Inkubering og differensiering

Nedenfor beskrives stimulering av adipocytter med fettsyrer og differensiering av RAW264.7 mot M₁ og M₂, og med kondisjonert medium fra adipocytter.

Inkubering av adipocytter med fettsyrer

Adipocytter ble først sultet i komplett medium med 0,25 % FCS i 12 timer før de ble inkubert med fettsyrer. Kontroll-celler ble tilsatt komplett medium med 10 % FCS etter sulting. DHA var løst i dH₂O, mens natriumpalmitat var løst i metanol.

Fettsyrekonsentrasjoner etter at de ble løst i 10 % fettfri BSA-løsning* (SIGMA):

- Dokosahexaensyre (SIGMA) – 250 µM
- Natriumpalmitat (SIGMA) – 250 µM
 - o Metanol (Merck) – løsningsmiddelkontroll**

*fettfri BSA ble løst i komplett medium uten kalveserum

**metanol ble tilsatt for å se om den påvirket cellenes genuttrykk og cytokinproduksjon

Figur 13: Fettsyre konsentrasjoner for stimulering av adipocytter

Protokollen for inkubering av adipocytter med fettsyrer var modifisert fra en metode beskrevet av Ajuwon og medarbeidere (Ajuwon & Spurlock 2005). Fettsyrene ble løst i fettfri BSA-løsning til et totalt volum på 100 µl (figur 13). BSA-fettsyre-blandingen ble varmet opp ved 50 °C i 5 minutter. Deretter ble 900 µl komplett medium med 10 % FCS tilsatt, og blandingen (som nå er på 1000 µl) ble tilsatt adipocytene (13 – 14 dager etter differensiering). Som positiv kontroll ble lipopolysakkarider (LPS) fra *Escherichia coli* O127:B8 (SIGMA) brukt i konsentrasjonen 100 ng/ml.

Etter endt inkubering av adipocytter med fettsyrer ble en del av supernatantene brukt som kondisjonert medium for inkubering av RAW264.7 (se nedenfor), mens resten ble samlet og lagret ved -20 °C til cytokinanalyse.

Differensiering av RAW264.7

Det ble forsøkt å differensiere RAW264.7 mot M₁ og M₂, samt benytte en metode for å kunne identifisere de to ulike fenotypene. Etter å ha funnet en egnet metode for identifisering av M₁ og M₂, skulle RAW264.7 inkuberes med kondisjonert medium fra adipocytter.

Klassisk aktiverte makrofager (M₁)

RAW264.7 ble «sultet» i komplett medium uten kalveserum i 12 timer før de ble stimulert med LPS fra *E.coli* fortynnet i komplett medium med 10 % FCS. Kontroll-celler ble sultet i 12 timer og tilsatt komplett medium med 10 % FCS uten LPS.

Alternativt aktiverte makrofager (M₂)

RAW264.7 ble også sultet i komplett medium uten kalveserum i 12 timer før stimulering med rekombinant IL-4 (Immunotools) fortynnet i komplett medium med 10 % FCS. Kontroll-celler ble sultet i 12 timer og tilsatt komplett medium med 10 % FCS uten rekombinant IL-4.

RAW264.7 inkubert med kondisjonert medium

RAW264.7 ble sultet (se ovenfor) i 12 timer før kondisjonert medium fra adipocytter ble overført til cellene. Inkuberingstiden var på 12 timer.

Etter endt inkuberingstid, ble supernatantene samlet og lagret ved -20 °C, mens cellene ble høstet og lysert før total RNA ekstraksjon (Qiagen RNeasy Mini Kit) for genuttryksanalyse vha. RT-qPCR.

B.2 Væskestrømscytometri

Det ble forsøkt å identifisere M₁/M₂-makrofager ved hjelp av væskestrømscytometri. Cellene ble høstet, vasket med PBS (2x) før de ble farget med følgende antistoffer:

- **CD206** – Phycoerythrin (PE)-konjugert polyklonalt geit anti-muse MMR/CD206 (R&D systems)
- **CD11c** – APC-konjugert monoklonale CD11c antistoffer fra mus (Miltenyi Biotec)
- **CD11c** – PerCP-Cy™5.5 hamster anti-muse CD11c (BD Pharmingen™)
- **F4/80** – FITC-konjugerte rotte monoklonale antistoffer mot muse makrofagmarkøren F4/80 (Abcam)

Ufargede celler ble tilsatt PBS. Etter tilsetning av antistoffene/PBS ble cellene inkubert mørkt ved romtemperatur i over 1 time. Deretter ble cellene vasket med PBS (2x) og resuspendert i 100 µl PBS før avlesing i væskestrømscytometer (MACS Quant Analyzer fra Miltenyi Biotec). Det ble også forsøkt å blokkere cellene med muse IgG (1 µg/ml) i 1 time før tilsetning av antistoffene/PBS.

B.3 Ileum og eWAT

Ileum og eWAT kommer fra 20 hannmus (C57BL/6J BomTac), der halvparten av musene har blitt føret med en høyfettdiett mens den andre halvparten har fått en lavfettdiett. Tabellen nedenfor viser energiprosentfordelingen mellom karbohydrater, protein og fett for de to ulike diettene. Varigheten av museforsøket var på 6 uker. Musestudien er en del av et større prosjekt, «Det Sunne Måltid».

Tabell 1: Energiprosent fra karbohydrater, proteiner og fett som høyfettdiett (HFD) og lavfettdiett (LFD) mus har blitt føret med

Energiprosent av	Høyfettdiett	Lavfettdiett
	Karbohydrater	20
Protein	20	20
Fett	60	10

RNeasy Mini Kit (Qiagen) ble brukt for RNA-ekstraksjon fra ileum, mens RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) ble brukt for RNA-ekstraksjon fra eWAT. Gentle MACS M tubes (Miltenyi Biotec) ble anvendt for å dissosiere og homogenisere vevsprøvene. Isolert RNA ble lagret ved -80 °C. Mengden isolert RNA ble målt med NanoDrop (Thermo Scientific).

NanoDrop er et spektrofotometer som ble brukt for å måle mengden RNA (i nanogram) som var i 1 µl prøve. Forholdet mellom den optiske tettheten 280/260 nm større enn 1.8 blir vanligvis ansett som en indikator på god RNA-kvalitet. Bare RNA av god kvalitet ble brukt til videre analyser.

Det ble utført kvalitetsanalyser på isolert RNA ved hjelp av Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Man får en RIN-verdi («RNA integrity number») mellom 1 og 10 der mRNA av høy kvalitet har en høy RIN-verdi (Fleige & Pfaffl 2006). Gjennomsnittet av RIN-verdien fra ileum var 7,3, og for eWAT var 7,6.

B.4 «Real-time» polymerase kjedereaksjon (RT-qPCR)

Polymerase kjedereaksjon er en teknikk som brukes for å lage flere kopier av et spesifikt DNA-segment. Real-time påvisning av PCR-produkter innbefatter fluorescerende molekyler i prøven. Disse molekylene rapporterer økning i DNA-mengden med en proporsjonal økning i fluorescenssignal.

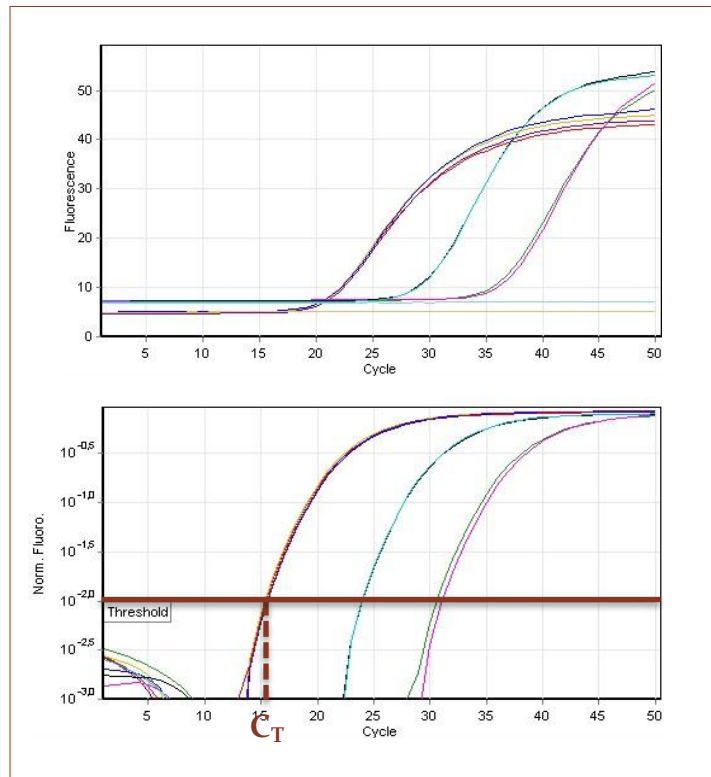
RT-qPCR benytter en spesialisert termosyklus som er utstyrt med enhet for fluorescenspåvisning, samtidig som den utfører temperaturendringer.

Termosykleren er koblet til et dataprogram som registrerer PCR syklusnummer mot påvist fluorescens i en graf (se figur 14).

I begynnelsen (syklus 1 – 18) vil fluorescensen forbli i bakgrunnen og dermed detekteres ikke økninger i prøvene (se figur 14, øverste bilde).

Etter hvert vil amplifiserte prøver øke til påviselige fluorescenssignaler, og syklusnummeret til disse signalene kalles for terskelsyklus, C_T (se figur 14, nederste bilde).

cDNA (komplementært DNA) syntetiseres fra RNA ved at en ny tråd DNA blir kopiert fra RNA katalysert av enzymet revers transkriptase. Til dette ble SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems) brukt. Se figur 15 for temperaturer og tid som ble brukt for cDNA-syntesen. cDNA ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figur 14: Fluorescenspåvisning i amplifiserte prøver (øverste figur). Terskelsyklus, C_T , som settes manuelt, er syklusnummeret på påviselige fluorescenssignaler til prøven (nederste figur).

Innstillingene for PTC-200 Peltier Thermal cyclers (MJ research) som ble brukt:

- $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 10 minutter
- $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 2 timer
- $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 2 minutter
- $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ for ever

Figur 15: Oversikt over temperaturer og tid som ble brukt for cDNA-syntese.

For RT-qPCR ble det brukt 20 ng cDNA som templat, 10 µl TaqMan® Gene Expression master mix (Applied Biosystems), 1 µl probe (Applied Biosystems) og RNase-fritt vann til et totalt volum på 20 µl. Figur 16 viser temperaturer og tid brukt for PCR-reaksjonen.

Innstillingene for RT-qPCR maskinen som ble brukt:

- 50 °C i 2 minutter
- 95 °C i 10 minutter
- 50 sykluser der stegene under blir utført i hver syklus:
 - o 95 °C i 15 sekunder
 - o 60 °C i 60 sekunder

Figur 16: Oversikt over temperaturer og tid som ble brukt for PCR reaksjoner

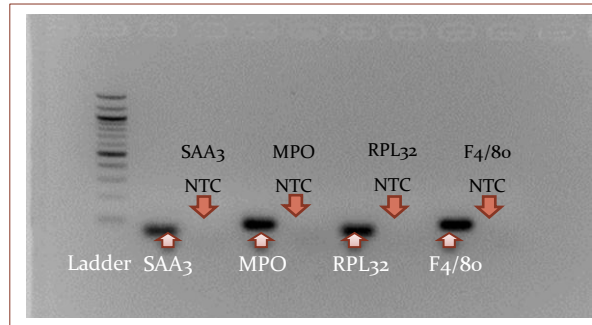
Det ble brukt følgende TaqMan® prober:

- Mm00441203_m1 Saa3
- Mm00656925_m1 S100a9 (calprotectin)
- Mm00447886_m1 MPO
- Mm02528467_g1 Rpl32
- Mm00802529_m1 Emr1 (F4/8o)
- Mm00440502_m1 Nos2
- Mm00475988_m1 Arg1

Etter endt PCR reaksjon, ble resultatene bearbeidet manuelt ved at det ble satt opp en terskellinje og C_T -verdiene ble brukt for utregning. Gjennomsnittet av parallellene ble utregnet, deretter ble C_T -verdien til referansegnet trukket fra C_T -verdien til prøvene. Forskjellen, ΔC_T , fra de ulike prøvene ble brukt for å sammenligne resultatene. Ved hjelp av $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -metoden ble fold-forskjellen utregnet og resultatene ble satt i diagrammer (Schmittgen & Livak 2008).

RPL32 ble brukt som referansegnet i denne oppgaven, da dette genet har blitt vist ved tidligere forsøk å være stabilt i både ileum og eWAT fra mus på ulike dietter (personlig meddelelse Lene Olsen Hult). Det ble brukt 20 ng cDNA som templat i alle PCR reaksjoner med unntak av MPO, der det ble brukt 50 ng cDNA som templat. MPO var relativt lavt uttrykt i vevet og en økning i templatmengde var nødvendig for å få tilfredsstillende ekspresjonsdata. Ekspresjonen av markørene ble normalisert mot referansegnet, RPL32.

Noen av de probene som ble brukt i RT-qPCR ble visualisert på en agarosegel for å være sikker på at probene ikke amplifiserte flere bånd og dermed ikke kunne betegnes som gensspesifikke. NTC «none template control» var en negativ kontroll og

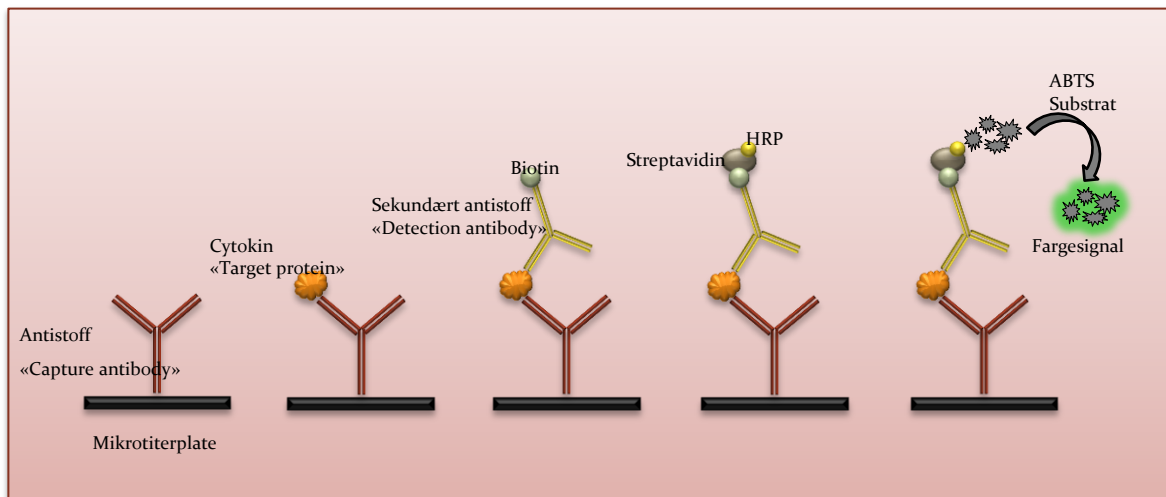


inneholdte ikke templat. Ikke bånd i negativ kontroll betyr at probene ikke var kontaminerte (figur 17).

Figur 17: Visualisering av noen av de probene som ble brukt i RT-qPCR på agarosegel. Probene er gensspesifikke siden de ikke amplifiserte flere bånd. NTC «none template control» viser ikke bånd som betyr at probene ikke er kontaminerte.

B.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA er en sensitiv immunologisk analyse som kan påvise og kvantifisere konsentrasjoner av et spesifikt protein, i dette tilfellet løselige cytokiner. Cytokinsandwich ELISA bygger på at cytokiner i prøven fanges av et antistoff bundet på en fast fase i en mikrotiterplate, og bindes til et enzymkoblet sekundært antistoff på toppen som avgir et fargesignal (se figur 18).



Figur 18: Oversikt over cytokinsandwich ELISA. Figuren er modifisert fra (Epitomics 2012)

Deretter måles den optiske tettheten av fargesignalene som da gir informasjon om cytokinene er til stedet i prøven og om konsentrasjonsmengde. Konsentrasjonsmengden beregnes ut ifra en standardkurve med kjente konsentrasjoner.

For påvisning og konsentrasjonsbestemmelse av cytokiner i medium (supernatanter), ble ELISA-kit (PeproTech) for murine interleukiner (IL-6) brukt.

C Resultater

C.1 Inflammatoriske markører i ileum og eWAT

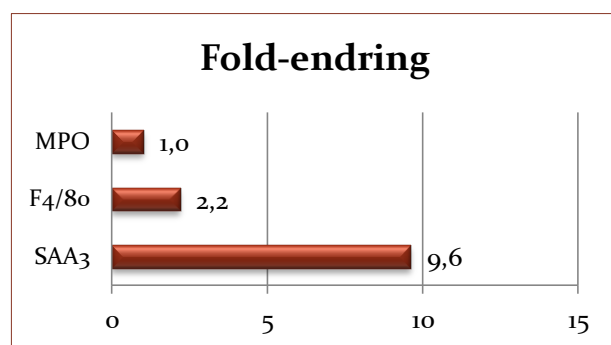
En svak, kontinuerlig inflammasjonsprosess er et kjennetegn ved sykkelig overvekt og ved utvikling av metabolsk syndrom. Det er dokumentert at de metabolske funksjonene i fettvev endres ved fedme. Selv om det har blitt forsket på hvordan fedmen endrer metabolske funksjoner og inflammatoriske prosesser i dyr og mennesker, har fokuset stort sett vært på fettvev og fettvevsmakrofager. Det er veldig få forskningsarbeid som har rettet oppmerksomheten mot tarmen ved fedme og metabolsk syndrom. Tarmen er spesielt interessant å undersøke, fordi det er både mesenteriske lymfeknuter, visceralt fett og tarmflora som er assosiert med den, og det kan tenkes at disse blir påvirket ved HFD og dermed bidrar til mer inflammasjon i tarmen ved fedme. Hypotesen som vi tester er om hvorvidt betennelsesprosesser i tarm bidrar til systemisk inflammasjon ved høfett diett og fedme.

For å teste denne hypotesen ville vi i denne oppgaven undersøke inflammasjon i både fettvev og tarm. Analysene ble utført på 20 C57BL/6J hannmus, der halvparten har vært på en høfett diett (HFD) mens den andre halvparten på en lavfett diett (LFD) i en periode på 6 uker. Det ble valgt å se på genekspressjonen av noen inflammatoriske markører i ileum og epididymalt hvitt fettvev (eWAT). Totalt RNA ble isolert fra vevsbiopsiene, deretter ble cDNA syntetisert fra RNA som senere ble analysert for ekspresjon av utvalgte inflammatoriske markører ved bruk av RT-qPCR.

eWAT ble undersøkt for ekspresjon av: SAA₃, MPO og F_{4/80}. Figur 19 viser fold-endring i ekspresjon av disse markørene i mus på HFD i forhold til mus på LFD. Fold-endring lik 1 betyr at det ikke er forskjell.

Mus som har vært på HFD uttrykket høyere nivå av F_{4/80} og betydelig høyere nivå av SAA₃ i eWAT i forhold til mus på LFD. Det betyr at eWAT i mus på HFD viste større innhold av makrofager og var mer inflammert.

Ileum ble undersøkt for uttrykk av følgende inflammatoriske markører: Serum amyloid A₃ (SAA₃), myeloperoksidase (MPO) og calprotectin. Ileal mRNA-ekspresjon av disse markørene viste ingen signifikante forskjeller mellom mus på HFD og mus på LFD.

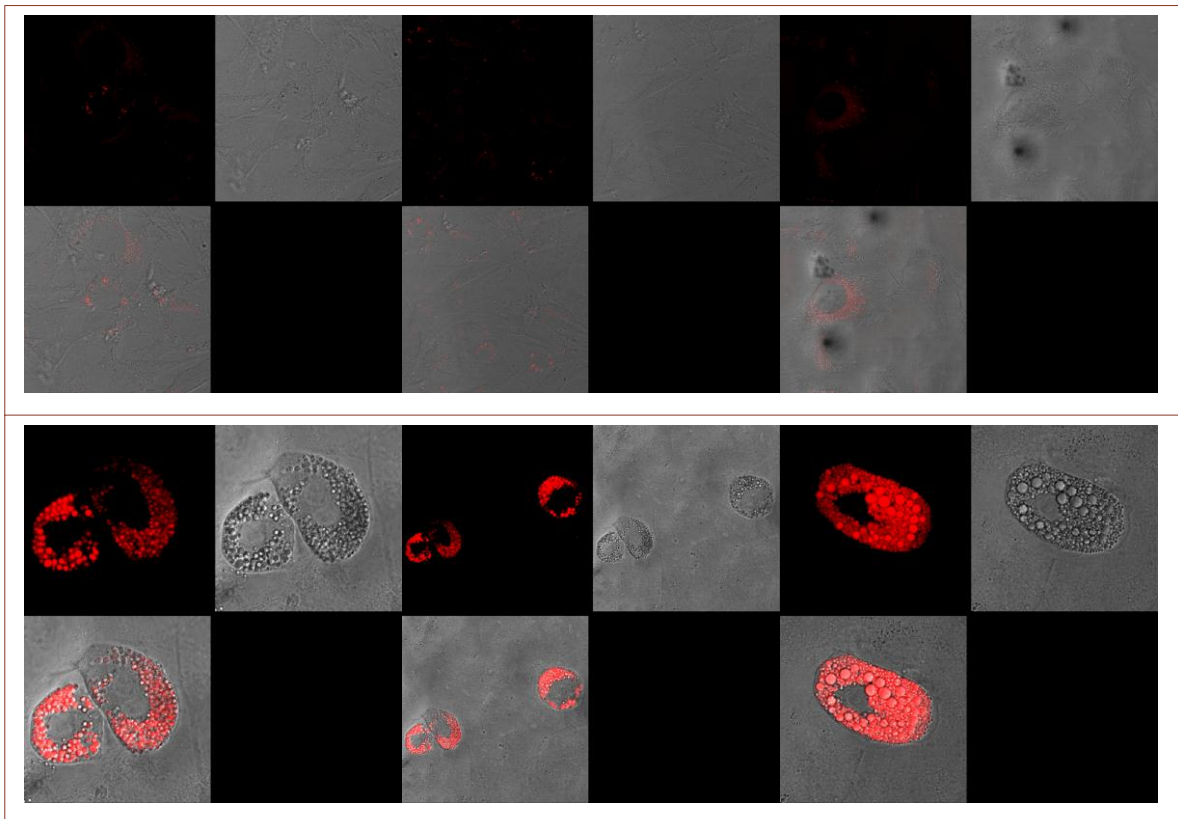


Figur 19: Fold-endring i ekspresjonen av inflammatoriske markører i eWAT fra mus som har vært føret med høfett diett i forhold til lavfett diett. Til RT-qPCR ble det brukt 20 ng cDNA som templat (50 ng for MPO) og RPL₃₂ som referanseggen.

C.2 Differensiering og inkubering av adipocytter

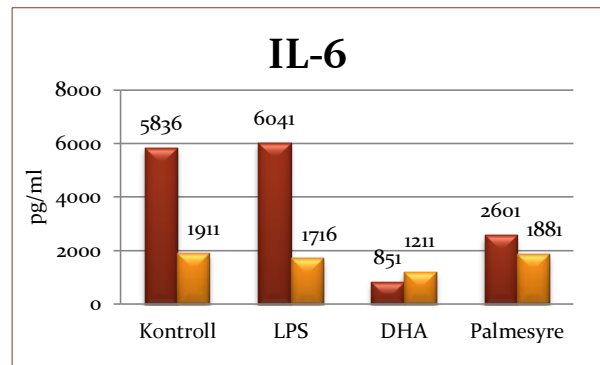
Med cellelinjene 3T3-L1 og RAW264.7 skulle det etableres en «*in vitro*»-modell. Modellen skulle undersøke om ω -3 fettsyrer kan påvirke samspillet mellom adipocytter og makrofager slik at makrofagdifferensieringen gikk i retning M2 makrofager. For å utføre dette forsøket var det viktig å differensiere preadipocytter til adipocytter, og inkubere differensierte adipocytter med fettsyrer. Fettsyrene som ble valgt var palmesyre (mettet fettsyre) og DHA (flerumettet ω -3 fettsyre).

For påvisning av fettakkumulering i differensierte adipocytter ble både preadipocytter og adipocytter farget med Nile Red. Etter farging med Nile Red, ble det tatt bilder med et konfokalt laserskanning-mikroskop. Figur 20 viser tydelig at 3T3-L1 har differensiert til adipocytter med betydelig større fettvakuoler. Ettersom det ikke var noe tvil om at adipocyttene har differensiert, ble de inkubert med fettsyrer på dette tidspunktet.



Figur 20: Bilder tatt med et konfokalt laserskanning-mikroskop av Nile Red fargede preadipocytter og adipocytter. Preadipocytter (de 3 øverste bildene) og adipocytter (de 3 nederste bildene).

Etter endt inkubering med fettsyrer ble supernatantene samlet for undersøkelse av cytokinproduksjon. IL-6 er et proinflammatorisk cytokin som er assosiert med fedme og insulinresistens, og utskilles blant annet av adipocytter. Det var derfor aktuelt å undersøke endringer i produksjonen av dette cytokinet etter inkubering med fettsyrer.



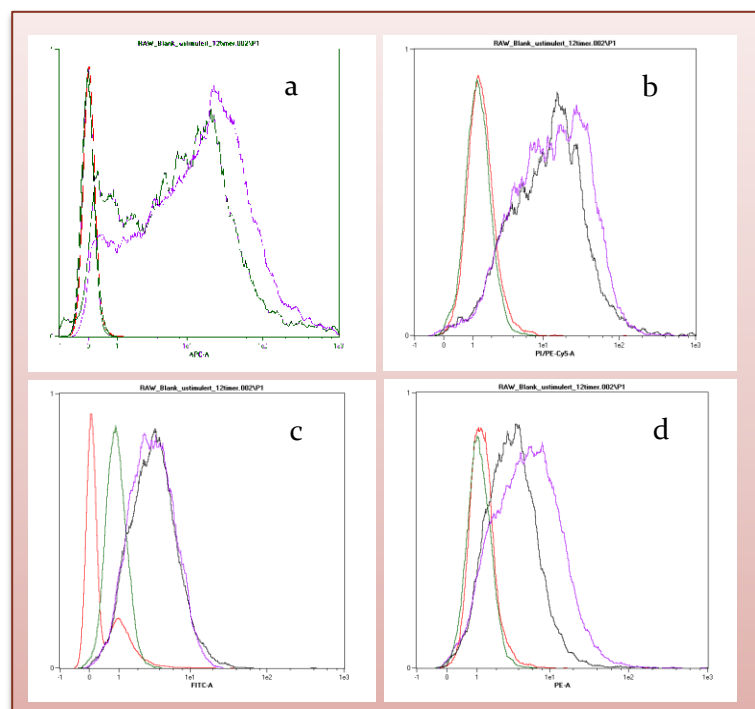
Figur 21: IL-6 konsentrasjonen (pg/ml) i medium fra adipocytter inkubert med LPS (100 ng/ml), og 250 µM DHA og palmesyre. Brune og oransje stolper presenterer to ulike oppsett.

Figur 21 viser at kontroll-cellene produserer IL-6 med ca. like konsentrasjoner som adipocytter inkubert med LPS. DHA førte til mindre produksjon av IL-6. Det kan se ut til at produksjonen av IL-6 har blitt mindre ved inkubering med palmesyre, men på grunn av utslag i løsningsmiddelkontrollen kan ikke resultatet brukes.

C.3 M₁/M₂-differensiering av RAW264.7

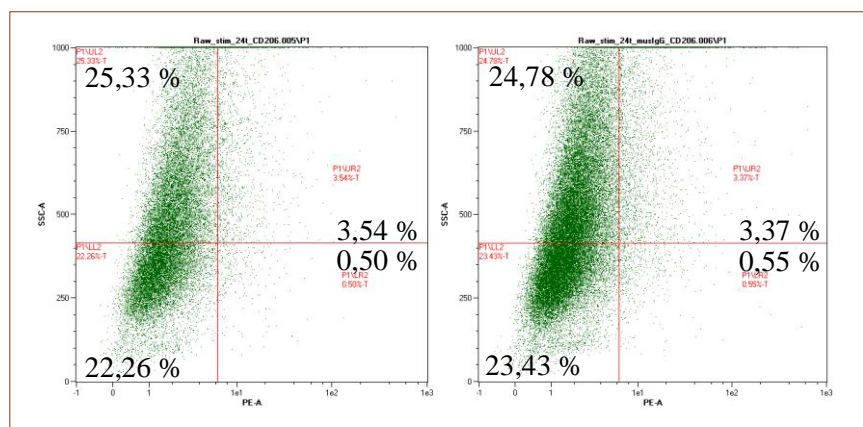
Det ble forsøkt å differensiere RAW264.7 mot M₁ og M₂ med ulike stimuli, samt benytte en egnet metode for å identifisere de to aktiveringstilstandene. Dette var av betydning for utvikling av «*in vitro*»-modellen. Modellen skulle undersøke om samspillet mellom adipocytter og makrofager påvirkes av DHA slik at makrofagene differensieres mot M₂.

Figur 22: Væskestrømscytometri-analyse fra IL-4 stimulerede RAW264.7 i 12 timer. RAW264.7 ble sultet i komplett medium uten kalveserum i 12 timer før de ble stimulert med IL-4 (40 ng/ml) i 12 timer. Cellene ble så analysert ved hjelp av væskestrømscytometri direkte etter endt stimuleringstid. Figurene viser resultatet etter antistofftilsetning: (a) CD11c-APC, (b) CD11c-PerCP, (c) F4/80-FITC og (d) CD206-PE. Grafene presenterer: Ustimulert og ufarget (grønn), stimulert og ufarget (rød), ustimulert og tilsatt antistoff (svart) og stimulert og tilsatt antistoff (lilla).



For stimulering mot M₁ og M₂ ble det valgt å benytte henholdsvis LPS fra *E.coli* og rekombinant IL-4. Både konsentrasjonsmengde og stimuleringstid var basert på forsøket til He og medarbeidere (He et al. 2011). For identifisering av M₁/M₂-aktivering ble det valgt å benytte væskestrømscytometri og antistoffene rettet mot markørene: CD11c – M₁-markør (Lumeng et al. 2007a), CD206 – M₂-markør (Stein et al. 1992) og anti-F₄/80 – makrofagmarkør.

Væskestrømscytometri-analysen etter stimulering av RAW264.7 med IL-4 i 12 timer (se figur 22) viste oppregulering av både CD206 og CD11c. Både ustimulerte og stimulerede celler uttrykte makrofagmarkøren F₄/80. Etter 24 timers LPS-stimulering (resultatene er ikke vist), var CD206 nedregulert i stimulerede celler, mens CD11c viste hverken opp- eller nedregulering.



Figur 23: Figuren viser IL-4 (40 ng/ml) stimulert RAW264.7 i 24 timer som er farget med PE-konjugert CD206. Figuren til venstre viser cellene kun farget med PE-konjugert CD206 uten blokkering, mens figuren til høyre viser celler som ble blokkert med muse-IgG før farging med PE-konjugert CD206.

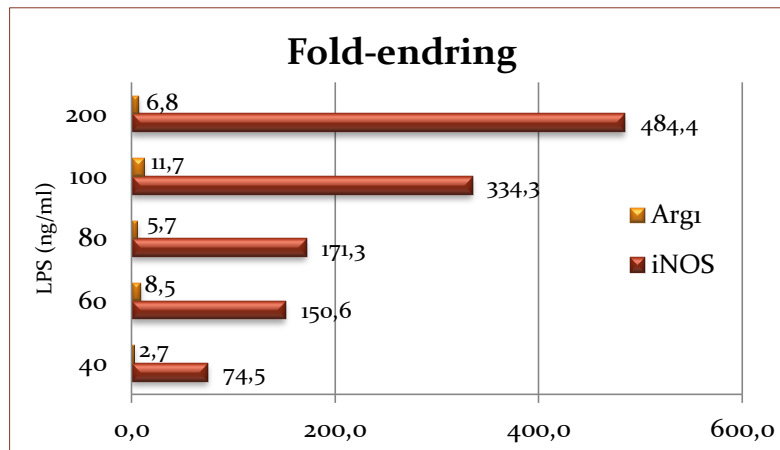
Det ble også forsøkt å blokkere med muse-IgG før farging med antistoffer, for å unngå uspesifikke bindinger. Forskjellene var marginale og blokkeringen hadde ingen signifikant betydning (se figur 23).

I motsetning til CD11c antistoffet, fungerte antistoffene CD206 og anti-F₄/80 tilfredsstillende. Med dette hadde vi ikke en markør som var spesifikk for M₁-makrofager. Da karakterisering av M₁/M₂-aktiveringen ved hjelp av væskestrømscytometri ikke fungerte optimalt, ble det valgt å se på genekspressjonen av iNOS og Arg1 vha. RT-qPCR.

Totalt RNA ble isolert etter endt stimuleringstid til RT-qPCR og supernatantene ble analysert for cytokinproduksjon.

C.3.1 Klassisk aktiverte makrofager

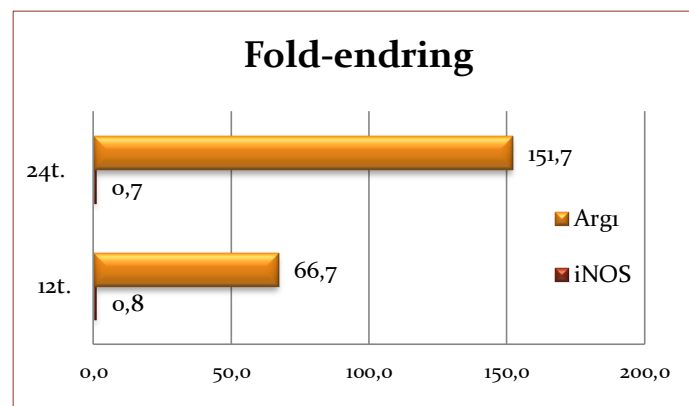
36 og 48 timers stimulering av RAW264.7 med LPS viste ingen forskjell på mRNA-ekspressjonen av iNOS eller Arg1 (resultatet er ikke vist). Senere ble det forsøkt med kortere stimuleringstid (12 timer) som viste forskjeller på genekspressjonen av iNOS og Arg1. Med den stimuleringstiden ble forsøket gjentatt, men denne gangen med en titrering av ulike LPS-konsentrasjoner (40, 60, 80, 100 og 200 ng/ml). Figur 24 viser at LPS-stimulering resulterer i kraftig økning av iNOS mRNA-ekspressjon. Arg1 ekspressjon blir også oppregulert, men i betydelig mindre grad.



Figur 24: Fold-ending i ekspressjonen av iNOS og Arg1 i LPS-stimulerte RAW264.7 etter 12 timers stimulering med ulike konsentrasjoner. Resultatet er representativt for fire oppsett.

C.3.2 Alternativt aktiverte makrofager

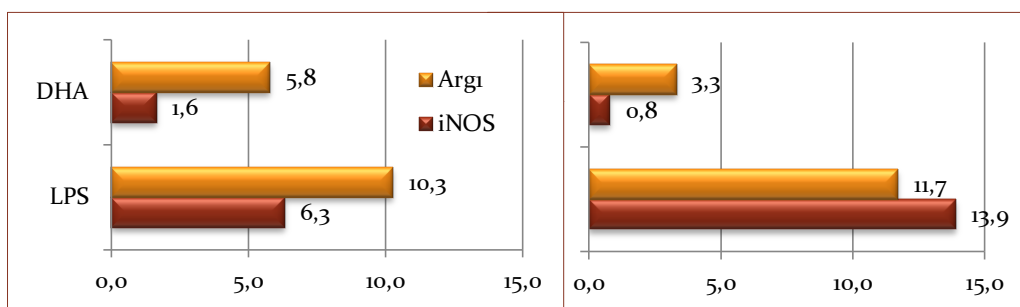
12 og 24 timers stimulering av RAW264.7 med IL-4 (40 ng/ml) førte til en kraftig økning i mRNA-ekspressjon av arginase (se figur 25). mRNA-ekspressjonen av iNOS ble ikke endret etter stimuleringen (fold-ending under 1).



Figur 25: Fold-ending i mRNA-ekspressjonen av iNOS og Arg1 i IL-4 stimulerte RAW264.7 etter 12 og 24 timers stimulering.

C.4 Stimulering av RAW264.7 med kondisjonert medium

Makrofager som infiltrerer fettvev ved fedme er proinflammatoriske og uttrykker sterke M₁-egenskaper. Ved hjelp av «*in vitro*»-modellen skulle det undersøkes om mettede/umettede fettsyrer kan påvirke interaksjonen mellom adipocytter og makrofager slik at makrofagdifferensieringen gikk i retning anti-inflammatoriske M₂-makrofager. For å undersøke dette ble medium fra adipocytter inkubert med fettsyrer overført til RAW264.7, som var sultet i 12 timer med komplett medium uten kalveserum. Etter 12 timers inkubering ble cellene høstet og lysert for total RNA ekstraksjon. Videre ble mRNA-ekspresjonen av iNOS og Arg1 undersøkt ved hjelp av RT-qPCR. Figur 26 viser fold-ending i ekspresjonen av iNOS og Arg1 i RAW264.7 inkubert med kondisjonert medium med DHA og LPS, fra to ulike oppsett.



Figur 26: Fold-ending i mRNA-ekspresjon av iNOS og Arg1 i RAW264.7 inkubert med kondisjonert medium. Kondisjonert medium er medium fra inkuberte adipocytter med LPS og DHA. Konsentrasjonen av DHA var 250 μ M og LPS var 100 ng/ml. Resultatene er fra to oppsett.

Siden løsningsmiddelkontroll (metanol) ga et positivt utslag i forsøket kan ikke resultatene fra palmesyrestimulering brukes. I de to oppsettene har ikke LPS gitt samme resultat. DHA har derimot ført i begge oppsettene i oppregulering av mRNA-ekspresjon av Arg1.

D Diskusjon

D.1 Inflammasjon i mus etter diettindusert fedme

Analysen utført på ileum og eWAT var kun ekspresjonsanalyser på noen utvalgte markører, og resultatene ble sammenlignet mellom mus på HFD og mus på LFD. Og selv om det viser seg å være endringer på mRNA-ekspresjonen, er det ikke sikkert at resultatene er gjeldende for proteinnivå.

D.1.1 Ileum

Calprotectin er et proinflammatorisk protein som uttrykkes og utskilles av fagocytter. MPO er et hem-protein som utskilles av aktiverte leukocytter og er høyt uttrykt i nøytrofile granulocytter. SAA₃ er et akutfaseprotein der nivåene er lave i normalt tilstand, men øker drastisk ved inflammasjon. På bakgrunn av at ekspresjonen og sekresjonen av disse markørene øker ved inflammasjon, ble de valgt for å undersøke inflammatoriske endringer i ileum. mRNA-ekspresjon av inflammatoriske markører (SAA₃, MPO og calprotectin) i ileum viste ingen signifikante endringer mellom mus på HFD og LFD.

Det er ingen som har utført analyser med disse markørene på ileum tidligere. En analyse utført av Ding og medarbeidere (Ding et al. 2010), der de undersøkte ileum fra mus som har vært på HFD og LFD i 6 og 16 uker, viste signifikant høyere ekspresjon av TNF α i mus på HFD i forhold til referansediett (2 uker på LFD). I denne oppgaven ble ikke ekspresjonen av TNF α undersøkt, og det blir dermed vanskelig å sammenligne resultatene. Likevel antyder resultatene i denne oppgaven at det ikke er tegn til inflammatoriske endringer i den ileale delen av tynntarmen mellom mus på HFD og LFD. Dette kan blant annet skyldes at varigheten av museforsøket var kort. Det er også viktig å huske at musestudier utført på ulike laboratorier kan avvike fra laboratorium til et annet. Avvik kan være forårsaket av sammensetningen av diettene, energiprosent fra fett mellom HFD og LFD eller stressnivået hos dyrene. Musestammen brukt av Ding og medarbeidere i deres studie og i denne oppgaven var lik, men det er andre viktige faktorer, som f.eks. sammensetningen av tarmflora i mus fra ulike leverandører og alderen på dyrene, som kan være av betydning for analyseresultater.

I tarmen vil det alltid være en lav grad av inflammasjon i forbindelse med den normale mikroflora i tarmen. Ding og medarbeidere (Ding et al. 2010) viste med sitt arbeid at HFD øker ekspresjonen av TNF α og aktiveringen av NF κ B, og at tilstedeværelsen av tarmbakterier er en forutsetning for tarminflammasjon. Det drives for tiden intens forskning på hvordan bakteriene i tarmen påvirkes av diettsammensetningen ved fedme (høyfettdiett), og hvordan

denne påvirkningen gjenspeiles på tarmens egenskaper og funksjoner (Kau et al. 2011). de Wit og medarbeidere (de Wit et al. 2008) rapporterte at det var forskjeller i ekspresjon av gener mellom mus på HFD og LFD i tyntarmen vha. en genekspresjons-profileringsanalyse (microarray-analyse). Det er ikke overraskende at ekspresjonen av gener som har med fettmetabolisme å gjøre, er oppregulert hos mus på HFD, men oppreguleringen gjelder også ekspresjonen av inflammatoriske/immunrespons-molekyler (de Wit et al. 2008).

D.1.2 eWAT

mRNA-ekspresjon av de undersøkte inflammatoriske markører i eWAT viste at uttrykket av både F4/80 og SAA₃ var signifikant oppregulert i mus på HFD. Ekspresjonen av MPO var ikke endret i eWAT mellom mus på HFD og LFD. Uendret mRNA-ekspresjon av MPO tyder på at ulike diett ikke har betydning for uttrykket av denne markøren i eWAT. F4/80 er en makrofagmarkør og oppreguleringen av denne markøren tyder på at det er flere makrofager i eWAT fra mus på HFD enn mus på LFD. Mens oppreguleringen av SAA₃, inflammasjonsmarkøren, betyr at eWAT fra mus på HFD var mer inflammet. Inflammasjon i fettvev fra mus på HFD har blitt rapportert tidligere (Weisberg et al. 2003; Xu et al. 2003) og resultatene i denne oppgaven er i samsvar med det.

Mer inflammasjon i eWAT kommer av at det er forhøyede nivåer av TNF α ved HFD og fedme (Weisberg et al. 2003). Forhøyede nivåer av TNF α som adipocytene blir utsatt for, fremmer systemisk insulinresistens ved at TNF α stimulerer mekanismer som fører til redusert respons på insulin (Lin & Sun 2010). Forsøk med TNF α knock-out mus ved diettindusert fedme viste at insulinsensitiviteten ble forbedret (Uysal et al. 1997). I denne oppgaven ble ikke ekspresjonen av TNF α i eWAT undersøkt.

Makrofager er kjent å infiltrere fettvev ved fedme og der viser de inflammatoriske egenskaper. I denne oppgaven har ikke kilden til inflammasjon i det epididymale fettvevet blitt undersøkt. Hva som forårsaker denne makrofaginfiltreringen er ikke kjent, men det er ulike teorier på hvorfor infiltrering av makrofager i inflammet fettvev oppstår.

D.2 Differensiering og inkubering av adipocytter

Differensieringen av 3T3-L1 fører til at fettvakuolene øker i størrelse og antall. Det var ønskelig å vise denne differensieringen ved å farge cellene og synliggjøre fettvakuolene. Oil Red O (ORO) er vanlig å bruke for dette formål. Det ble forsøkt å farge preadipocytter og adipocytter med Oil Red O i henhold til flere protokoller (Protocol Online 2007; Thermo Scientific 2009). Fargingen mislyktes da cellene lett løsnet fra overflaten før fargetrinnet, selv etter fiksering med 4 % paraformaldehyd eller 10 % formalin i ulike tider. Fargingen ble utført 3 – 4 dager etter stimulering med insulin, IBMX og dexametason. I følge differensieringsprotokollen (ATCC 2011) hadde cellene på dette tidspunktet lett for å løsne fra overflaten, og fargingen burde muligens utføres 7 – 15 dager etter differensiering i stede. Da visualisering med ORO mislyktes, ble det forsøkt å farge cellene med Nile Red, som er en fluorescerende farge. Visualisering med denne fargen viste meget tydelige forskjeller på fettdråpene i 3T3-L1 før og etter differensieringen (figur 20).

Suganami og medarbeidere (Suganami et al. 2007) viste at adipocytter uttrykker Toll-lignende reseptor 4 (TLR4). TLR4 kan blant annet aktiveres av LPS for produksjon av proinflammatoriske cytokiner (Lu et al. 2008). LPS ble derfor brukt som positiv kontroll i adipocytter i denne oppgaven.

IL-6 er et proinflammatorisk cytokin som er assosiert med fedme og insulinresistens, og ca. en tredjedel av sirkulerende IL-6 i blod utskilles fra fettvev (Kershaw & Flier 2004). Det var derfor viktig å undersøke produksjonen av dette cytokinet etter inkubering med fettsyrer. Resultater fra to oppsett viste at det var høye IL-6 konsentrasjoner i medium fra kontroll-adipocytter og tilsvarende like konsentrasjoner fra positiv kontroll. Resultatene er ikke i samsvar med at inkubering av adipocytter med LPS fører til økt IL-6 produksjon i forhold til kontroll-celler, men er i samsvar med at kontroll-celler utskiller IL-6 (Ajuwon & Spurlock 2005). Felles for begge oppsettene var at IL-6 konsentrasjonen var minst i adipocytter inkubert med DHA. Forsøket med inkubering av adipocytter med fettsyrer har ikke blitt utført tilstrekkelig antall ganger for å gi grunnlag for sammenligning med andres forsøk. Det er likevel ikke noe tvil om at kontroll-adipocytter og adipocytter inkubert med LPS eller fettsyrer produserer store mengder IL-6.

Selv om resultatene fra inkubering av adipocytter med palmesyre viser at palmesyre fører til mindre produksjon av IL-6, er resultatene usikre på grunn av positivt utslag i løsningsmiddelkontroll. Det er imidlertid mange forskningsartikler som viser at denne fettsyren fører til økt produksjon og ekspresjon av inflammatoriske cytokiner, som f.eks. TNF α

og IL-6 (Han et al. 2010; Kennedy et al. 2009; Shi et al. 2006). Høye nivåer av palmitat har blitt funnet å øke inflammasjon i fettvev ved at den aktiverer Toll-liknende reseptor (TLR)-signaliseringsvei i murine adipocytter og makrofager. Aktivering av TLR fører til aktivering av nukleær faktor kappa B (NF κ B), som er involvert i proinflammatoriske responser. Palmitat er også funnet å hemme aktivering av insulinreseptoren insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1) som resulterer i redusert insulinsensitivitet (Kennedy et al. 2009).

D.3 M₁/M₂-makrofager

Klassisk aktiverte makrofager (M₁)

Klassisk aktiverte makrofager er makrofager med proinflammatoriske egenskaper. For å stimulere cellelinjen RAW264.7 mot M₁, ble LPS brukt. Identifisering av disse makrofagene ved hjelp av antistoffet CD11c, fungerte ikke tilfredsstillende. CD11c var oppregulert etter stimulering med IL-4 og ikke etter LPS-stimulering, mens mannosereseptor 1 (CD206) var nedregulert etter LPS-stimulering i 24 timer.

Identifisering av M₁ makrofager ved hjelp av overflatemarkører kan være vanskelig med tanke på at det er flere markører som oppreguleres/nedreguleres etter ulike stimuleringer. Og dermed burde flere enn én markør inkluderes for å kunne undersøke balansen mellom ulike markører som er uttrykt på overflaten. Siden M₁ og M₂ makrofager er et relativt nytt emne i forskningsverdenen, har ikke alle likheter og forskjeller mellom disse to gruppene blitt oppdaget ennå.

Genekspresjons-analyser av M₁-makrofager viste seg å være en bedre metode. I oppgaven ble det analysert for både mRNA-ekspresjon av iNOS og Arg1 for å undersøke ekspresjonsforholdet mellom disse genene etter stimulering mot M₁. Resultatene viste at ved 12 timers stimulering med LPS var det forskjeller i mRNA-ekspresjonen av iNOS og Arg1. mRNA-ekspresjon av iNOS var signifikant oppregulert ved alle LPS-konsentrasjoner som ble brukt. Oppreguleringen av iNOS-ekspresjon var stigende med økte LPS-konsentrasjoner. Oppregulering av iNOS eller produktene av dette enzymet etter stimulering med LPS har blitt rapportert tidligere (Munder et al. 1998). I andre laboratorier har iNOS-aktivitet blitt målt i form av NO-innholdet i supernatantene vha. Griess analyse, mens arginase-aktivitet har blitt målt i form av omsatt urea fra arginin i henhold til Corraliza og medarbeidere (Corraliza et al. 1994).

Ved LPS-stimulering var mRNA-ekspresjonen av iNOS kraftig oppregulert, samtidig kunne man også se at ekspresjonen av arginase var litt oppregulert. Geldhof og medarbeidere (Geldhof et al. 2002) viste lignende resultater der de får en økt produksjon av NO etter

stimulering av RAW264.7 mot M₁ med IFN γ , samt noe arginase. LPS-stimulering i 36 og 48 timer viste ingen endringer i mRNA-ekspressjon av hverken iNOS eller arginase. Produksjonen av NO (vha. Griess analyse) fra LPS-stimulerte RAW264.7 var høy etter 36 timer og høyest etter 48 timer i følge He og medarbeidere (He et al. 2011). Dette understreker at med ulike analysemetoder kan man trekke forskjellige konklusjoner stimuleringstider og mengder. Renheten av LPS spiller en rolle, og det kan være både type og batch variasjoner fra produsent til produsent. Dette rapporterer Rutledge og medarbeidere (Rutledge et al. 2012), der de observerer endret genekspressjon og cytokinproduksjon etter renheten av brukt LPS.

Alternativt aktiverte makrofager (M₂)

Alternativt aktiverte makrofager er makrofager med anti-inflammatoriske egenskaper. CD206 har blitt påvist i IL-4 stimulerte, men ikke i LPS og IFN γ stimulerte RAW264.7, i rapporten til Zhang og medarbeidere (Zhang et al. 2009). CD206 har vist seg å være en pålitelig M₂ markør som oppreguleres ved IL-4 stimulering og nedreguleres ved LPS-stimulering. Resultatene fra væskestrømscytometri viste at CD206 ble oppregulert etter stimulering av RAW264.7 med IL-4 i 12 timer, men oppreguleringen var mindre etter 24 timers stimulering (resultat ikke vist). Det var ønskelig å undersøke sammenhengen mellom ekspressjonen av arginase 1 og CD206. Ekspressjonsanalyser av IL-4 stimulerte makrofager viste en kraftig oppregulering av Arg1 etter 12 timer, og enda kraftigere oppregulering (ca. dobbelt så høy fold-endring) etter 24 timer. Sammenhengen mellom ekspressjonen av arginase (vha. RT-qPCR) og CD206 (vha. væskestrømscytometri) har vist at begge oppreguleres ved stimulering av makrofager med IL-4.

M₂-aktivering var fullstendig i våre forsøk siden ekspressjonen av arginase 1 var sterkt oppregulert, mens ekspressjonen av iNOS ikke var endret etter 12 og 24 timers stimulering med IL-4. Resultatet er i samsvar med det Geldhof og medarbeidere (Geldhof et al. 2002) rapporterte; en sterkt oppregulert arginaseproduksjon og veldig liten produksjon av NO.

D.4 Makrofager inkubert med kondisjonert medium

Hensikten var å undersøke om makrofagenes mRNA-ekspressjon av iNOS/Arg1 endres ved inkubering med ulike fettsyrer i kondisjonert medium.

«*In vitro*»-modellen i oppgaven hadde svakheter. Inkubering av adipocytter med fettsyrer som ble utført to ganger viste at IL-6 produksjon varierte stort mellom de to oppsettene.

Løsningsmiddelkontroll ga et positivt utslag og resultatene fra inkubering med palmesyre måtte forkastes. På grunn av tidsbegrensning ble forsøket utført før cytokinanalyser, og det var dermed umulig å oppdage usikkerheter rundt resultatene før senere. Det kan likevel nevnes at i det andre oppsettet var mye av resultatene i samsvar med det som tidligere ble rapportert.

Selv om forsøket ikke har blitt utført nok antall ganger som gir grunnlag for konklusjon og diskusjon, kan det påpekes at inkubering med DHA viste samme tendens i de to oppsettene. Kondisjonert medium fra adipocytter inkubert med DHA oppregulerer ekspressjonen av arginase i RAW264.7, og fører til lite/ingen oppregulering av iNOS.

D.5 Oppsummering og forslag til videre arbeid

Musestudien var en forundersøkelse som er en del av prosjektet, «Det Sunne Måltid». Analyseresultatene fra forundersøkelsen (de som er vist under resultatdelen og de som ikke er vist, og som var utført av Gruppe for molekylær cellebiologi) antydte at varigheten av museforsøket ikke var tilstrekkelig for at musene utviklet inflammasjon og metabolske forstyrrelser i andre vev enn eWAT. På grunnlag av disse resultatene ble det bestemt at hovedforsøket i prosjektet skal ha en varighet på 16 uker for lettere påvisning av inflammatoriske ulikheter.

For utvikling av «*in vitro*»-modellen var det viktig å differensiere preadipocytter til adipocytter, differensiere makrofager mot M1 og M2, og velge markører og en egnet metode for identifisering av disse makrofagfenotypene. Disse punktene ble oppfylt der resultatene ble utført flere ganger med like resultater.

Ettersom det ikke var nok tid til å optimalisere makrofagdyrkingen i kondisjonert medium fra adipocytter, bør forsøket utføres flere ganger. Palmesyre kan f.eks. løses i etanol som er mindre toksisk enn metanol. Etter å ha undersøkt effekter fra mettet vs. umettet fettsyrer på makrofager, kan man forsøke med ulike konsentrasjoner av fettsyrer; høyfettkonsentrasjon vs. lavfettkonsentrasjon. Resultatet etter stimulering av RAW264.7 med kondisjonert medium fra adipocytter med DHA, viste oppregulering av arginase 1. Dette kan være et utgangspunkt for videre undersøkelser av hva som forårsaker denne oppreguleringen.

Det hadde også vært interessant å undersøke hvordan ulike fettsyrer påvirker differensieringen av 3T3-L1.

E Referanser

- Ajuwon, K. M. & Spurlock, M. E. (2005). Palmitate Activates the NF- κ B Transcription Factor and Induces IL-6 and TNF α Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal of Nutrition*, 135 (8): 1841-1846.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell*. 5. utg. New York: Garland Science, Taylor & Francis.
- ATCC. (2011). *Chemically-Induced Differentiation of ATCC® CL-173™ (3T3-L1) using Single-component Commercially-available Reagents*. Tilgjengelig fra: <http://www.atcc.org/attachments/22129.pdf> (lest 29.10.2011).
- Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, 181 (6): 3733-3739.
- Caesar, R., Manieri, M., Kelder, T., Boekschoten, M., Evelo, C., Müller, M., Kooistra, T., Cinti, S., Kleemann, R. & Drevon, C. A. (2010). A Combined Transcriptomics and Lipidomics Analysis of Subcutaneous, Epididymal and Mesenteric Adipose Tissue Reveals Marked Functional Differences. *PLoS ONE*, 5 (7): e11525.
- Champe, P. C., Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2008). *Lippincott's illustrated reviews: Biochemistry*. 4. utg. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 520 s.
- Chawla, A., Nguyen, K. D. & Goh, Y. P. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11 (11): 738-49.
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. & Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*, 174 (1-2): 231-235.
- de Wit, N. J., Bosch-Vermeulen, H., de Groot, P. J., Hooiveld, G. J., Bromhaar, M. M., Jansen, J., Muller, M. & van der Meer, R. (2008). The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics*, 1: 14.
- Ding, S., Chi, M. M., Scull, B. P., Rigby, R., Schwerbrock, N. M. J., Magness, S., Jobin, C. & Lund, P. K. (2010). High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. *PLoS ONE*, 5 (8): e12191.
- Eiserich, J. P., Baldus, S., Brennan, M.-L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., Castro, L., Lusic, A. J., Nauseef, W. M., White, C. R., et al. (2002). Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase. *Science*, 296 (5577): 2391-2394.
- Encyclopædia Britannica Online. (2003). *small intestine: regions and structures*. Tilgjengelig fra: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/68637/Structures-of-the-small-intestine-The-inner-wall-of-the> (lest 24.04.2012).
- Encyclopædia Britannica Online. (2007). *high-density lipoprotein: synthesis of lipoprotein complexes*. Tilgjengelig fra: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/92255/Synthesis-of-lipoprotein-complexes-in-the-small-intestine-liver-and> (lest 30.04.2012).
- Epitomics. (2012). *c-Jun Sandwich ELISA Kit USER MANUAL*, 24.04.2012.
- Fleige, S. & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3): 126-39.
- Foell, D., Frosch, M., Sorg, C. & Roth, J. (2004). Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clinica Chimica Acta*, 344 (1-2): 37-51.
- Garrett, W. S., Gordon, J. I. & Glimcher, L. H. (2010). Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Cell*, 140 (6): 859-870.
- Geldhof, A. B., Van Ginderachter, J. A., Liu, Y., Noel, W., Raes, G. & De Baetselier, P. (2002). Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. *Blood*, 100 (12): 4049-58.

Gesta, S. & Kahn, C. R. (2012). White Adipose Tissue

Adipose Tissue Biology. I: Symonds, M. E. E. (red.), s. 71-121: Springer New York.

Gordon, S. & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5 (12): 953-964.

Gordon, S., Hamann, J., Lin, H.-H. & Stacey, M. (2011). F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *European Journal of Immunology*, 41 (9): 2472-2476.

Hamann, J., Koning, N., Pouwels, W., Ulfman, L. H., van Eijk, M., Stacey, M., Lin, H.-H., Gordon, S. & Kwakkenbos, M. J. (2007). EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *European Journal of Immunology*, 37 (10): 2797-2802.

Han, C. Y., Kargi, A. Y., Omer, M., Chan, C. K., Wabitsch, M., O'Brien, K. D., Wight, T. N. & Chait, A. (2010). Differential Effect of Saturated and Unsaturated Free Fatty Acids on the Generation of Monocyte Adhesion and Chemotactic Factors by Adipocytes. *Diabetes*, 59 (2): 386-396.

He, Z., Zhang, H., Yang, C., Zhou, Y., Zhou, Y., Han, G., Xia, L., Ouyang, W., Zhou, F., Zhou, Y., et al. (2011). The interaction between different types of activated RAW 264.7 cells and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Radiat Oncol*, 6: 86.

Hotamisligil, G., Shargill, N. & Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259 (5091): 87-91.

Hotamisligil, G. S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M. F. & Spiegelman, B. M. (1996). IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α - and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Science*, 271 (5249): 665-670.

Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L. & Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474 (7351): 327-336.

Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C. C., LaPoint, K. & McIntosh, M. (2009). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr*, 139 (1): 1-4.

Kershaw, E. E. & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89 (6): 2548-56.

Lawrence, T. & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol*, 11 (11): 750-61.

Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologisk teknikker*. 3. utg. Bergen: Fagbokforlaget.

LGC Standard. (2012a). ATCC[®] Number: CL-173[™]. Tilgjengelig fra: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CL-173&Template=cellBiology> (lest 03.05.2012).

LGC Standard. (2012b). ATCC[®] Number: TIB-71[™]. Tilgjengelig fra: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=TIB-71&Template=cellBiology> (lest 02.05.2012).

Lin, Y. & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 204 (1): 1-11.

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42 (2): 145-151.

Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. (2007a). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117 (1): 175-84.

Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. (2007b). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*, 56 (1): 16-23.

Munder, M., Eichmann, K. & Modolell, M. (1998). Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4⁺ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. *The Journal of Immunology*, 160 (11): 5347-5354.

Murphy, K. (2012). *Janeway's immunobiology*. 8. utg. USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

- Murray, P. J. & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 11 (11): 723-37.
- Nacken, W., Roth, J., Sorg, C. & Kerkhoff, C. (2003). S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microscopy Research and Technique*, 60 (6): 569-580.
- Novakofski, J. (2004). Adipogenesis: Usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *Journal of Animal Science*, 82 (3): 905-915.
- Osborn, O. & Olefsky, J. M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*, 18 (3): 363-74.
- Protocol Online. (2007). *In-vitro adipocytes differentiation*. Tilgjengelig fra: <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/In-Vitro-Adipocytes-Differentiation-4789.html> (lest 12.11.2011).
- Rutledge, H. R., Jiang, W., Yang, J., Warg, L. A., Schwartz, D. A., Pisetsky, D. S. & Yang, I. V. (2012). Gene expression profiles of RAW264.7 macrophages stimulated with preparations of LPS differing in isolation and purity. *Innate Immunity*, 18 (1): 80-88.
- Saladin, K. S. (2010). *Anatomy & physiology: The unity of form and function*. 5. utg. New York: McGraw-Hill.
- Scheja, L., Heese, B., Zitzer, H., Michael, M. D., Siesky, A. M., Pospisil, H., Beisiegel, U. & Seedorf, K. (2008). Acute-Phase Serum Amyloid A as a Marker of Insulin Resistance in Mice. *Experimental Diabetes Research*, 2008.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols*, 3 (6): 1101-1108.
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H. & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 116 (11): 3015-3025.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 176 (1): 287-292.
- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., et al. (2007). Role of the Toll-like Receptor 4/NF-κB Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (1): 84-91.
- Suganami, T. & Ogawa, Y. (2010). Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*, 88 (1): 33-39.
- Thermo Scientific. (2009). *Human Mesenchymal Stem Cell Protocol: Oil Red O Staining of Adipogenic Cultures*. Tilgjengelig fra: <https://static.thermoscientific.com/images/D10167~.pdf> (lest 04.11.2011).
- Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W. & Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-[alpha] function. *Nature*, 389 (6651): 610-614.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G. & De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211 (6-8): 487-501.
- Walloschke, B., Fuhrmann, H. & Schumann, J. (2010). Macrophage cell line RAW264.7 but not P-388D1 is an appropriate in vitro-model for studying oxidative burst as well as cytokine production in context of fatty acid enrichment. *Cellular Immunology*, 262 (1): 58-61.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112 (12): 1796-1808.

- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*, 116 (5): 1457-1457.
- Whitney, E. & Rolfes, S. R. (2008). *Understanding nutrition*. 11 utg. USA: Thomson Learning, Inc.
- WikiDoc. (2012). *Gonadal adipose tissue in a male mouse*. Tilgjengelig fra: http://www.wikidoc.org/index.php/File:Male_gonadal.jpg#filelinks (lest 02.05.2012).
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112 (12): 1821-1830.
- Zhang, B., Wang, J., Gao, J., Guo, Y., Chen, X., Wang, B., Gao, J., Rao, Z. & Chen, Z. (2009). Alternatively activated RAW264.7 macrophages enhance tumor lymphangiogenesis in mouse lung adenocarcinoma. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107 (1): 134-143.