

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



Forord

Denne oppgaven ble utført på laboratoriet for molekylær cellebiologi ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM).

Jeg vil takke hovedveileder Tor Lea for god veiledning i arbeidet med oppgaven.

Jeg vil takke Charlotte Kleiveland og Lene Olsen Hult for veiledning og praktisk hjelp. Jeg vil også takke Ellen Karlstrøm og Kjetil Fosnes for praktisk hjelp på laben underveis i oppgaven.

En stor takk går også til stipendiat Kaia Mobråten for alltid å stille opp med både praktisk og teoretisk hjelp med oppgaven.

Jeg vil til slutt takke venner og familie for støtte underveis.

Ås, 6. juli 2012

Tarjei Haugbro

Innhold

Forord	I
Sammendrag	IV
Abstract	V
Forkortelser	VI
1 Teori.....	1
1.1 Medfødt immunitet.....	1
1.1.1 Monocyttter.....	2
1.2 Signaloverføring	2
1.2.1 G-protein koblede reseptorer	2
1.3 Signalveier	5
1.3.1 ERK1/2-signalveien	6
1.3.2 JNK-signalveien.....	6
1.3.3 p38-signalveien.....	6
1.4 Cytokiner	7
1.4.1 Interleukin-8	7
1.4.2 Interleukin-6	8
1.5 Gallesyrer.....	8
1.6 TGR5	9
1.7 TLR	9
1.8 LPS	11
1.9 NF- κ B	12
2 Materialer	14
2.1 Laboratorieutsyr	14
2.2 Kjemikalier og løsninger	15
2.3 Antistoffer	16
2.4 Oppskrifter	16
3 Metoder.....	19
3.1 Cellaarbeid.....	19
3.1.1 Celledyrking	19
3.1.2 Celletelling	19
3.1.3 Frysing av celler	19
3.1.4 Tining av celler	19
3.1.5 Sulting av celler	20

3.2 RT-PCR (real-time polymerase chain reaction)	20
3.3 Western blotting/Immunoblotting.....	21
3.4 NF- κ B-luciferase assay	22
3.5 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	23
3.6 Løsning av ligander	24
4 Resultater	25
4.1 Introduksjon	25
4.2 Påvisning av mRNA fra TGR5 reseptor ved PCR	25
4.3 Effekt av TGR5-stimulering på fosforylering av ERK1/2	26
4.4 Effekt av TGR5-stimulering på fosforylering av JNK.....	27
4.5 Effekt av TGR5-stimulering på fosforylering av p38.....	28
4.6 Effekt av stimulering med betulinsyre, LPS og kostimulering med disse på NF- κ B-aktivitet.....	29
4.7 Effekt på IL-8 produksjon ved kostimulering med betulinsyre/gallesyrer og LPS.....	30
4.8 Effekt på IL-6 produksjon ved kostimulering med betulinsyre/gallesyrer og LPS.....	33
5 Diskusjon	36
6 Referanser	45

Sammendrag

Det har blitt vist at det vil oppstå en svak inflammatorisk respons etter et måltid. Det har også blitt vist økte nivåer av LPS i plasma etter et måltid og en hypotese går ut på at økte nivåer av LPS kan være med å bidra til denne inflammatoriske responsen. Nivået av gallesyrer i blodet vil også øke etter et måltid, og kan derfor tenkes å påvirke den inflammatoriske responsen i monocytter i plasma. Den humane monocyttcellelinjen U937 ble brukt for å se på virkningen av stimulering med den TGR5 spesifikke agonisten betulinsyre/gallesalter og LPS på monocytter.

Innledende forsøk viste at U937 cellene uttrykker mRNA for gallesyrereseptoren TGR5. Aktivisering av TGR5 med betulinsyre/salter av gallesyrene CDCA og DCA gav økt fosforylering av MAPK signalveiene ERK1/2, JNK og p38.

I oppgaven ble det også sett på hvorvidt stimulering med betulinsyre/gallesalter, LPS og kostimulering med disse hadde en effekt på NF- κ B aktivitet og cytokinproduksjon i U937 cellene. Stimulering kun med betulinsyre ga en svak økning i NF- κ B aktivitet. Stimulering med LPS førte til en kraftigere økning i NF- κ B aktivitet, mens kostimulering førte til en synergistisk effekt. På cytokinproduksjon hadde stimulering med betulinsyre eller gallesalter alene ingen effekt. Stimulering med LPS gav en markant økning i cytokinproduksjon, mens kostimulering med enten betulinsyre eller gallesalter sammen med LPS gav en synergistisk effekt.

Resultatene fra denne oppgaven viser en synergistisk effekt ved kostimulering med gallesyrer og LPS. Dette kan tyde på at gallesyrer er med på å øke til den svake inflammatoriske responsen som har blitt vist å oppstå etter inntak av et måltid.

Abstract

A weak inflammatory response will occur after a meal, and one hypothesis has linked this inflammatory response to increased levels of LPS in postprandially. The levels bile acids in plasma will also increase postprandially, and there is a possibility that this may affect the inflammatory response in peripheral blood monocytes. To investigate this effect in monocytes, the human monocytic cell line U937 was stimulated with the TGR5 specific agonist betulinic acid/bile salts and LPS.

An introductory experiment showed that the U937 cells expressed mRNA for the bile acid receptor TGR5. Activation of TGR5 with betulinic acids/salts of the bile-acids CDCA and DCA increased the phosphorylation of ERK1/2, JNK and p38.

In this thesis, experiments were also performed to see if treatment with betulinic acids/bile-salts, LPS and co-treatment with these agonists had an effect on NF- κ B activation and cytokine production (IL-6 and IL-8). Treatment with betulinic acid alone showed a weak increase in NF- κ B activity. Stimulation with LPS showed a more markedly increase in NF- κ B activity, while co-treatment lead to a synergistic effect. For cytokine production, treatment with betulinic acid or bile-salts alone showed no effect. Treatment with LPS showed a markedly increase in cytokine production, while co-treatment with either betulinic or bile-salts with LPS showed a synergistic effect.

The results in this study show a synergistic effect when performing a co-treatment with bile salts and LPS in monocytes. This may suggest that bile acids contribute to the onset of the inflammatory response that occurs after a meal.

Forkortelser

<u>Forkortelse</u>	<u>Forklaring</u>
BSA	Bovint serumalbumin
cAMP	Syklisk adenosin monofosfat
CDCA	Chenodeoxycholsyre
cDNA	komplementær deoksyribonukleinsyre
DCA	Deoxycholsyre
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Ekstracellulær signal-regulert kinase
FCS	Føtalt kalveserum
FXR	Farnesoid X reseptor
GDP	Guanin difosfat
GEF	Guanin nukleotid utbyttefaktor
GPCR	G-proteinkoplede reseptorer
GPI	Glycosylphosfatidylinositol
GTP	Guanin trifosfat
HCL	Hydrogenklorid
HRP	Horse radish peroxidase
JNK	c-Jun N-(amino) terminal protein kinase
IL	Interleukin
IKK	I κ B kinase
IRAK	1R-associated kinase
LBP	LPS bindende protein
LCA	Lithocholsyre
LPS	Lipopolysakkarid
LRR	Leucinrike repetisjoner
MAMP	Mikrobe-assosiert molekylært mønster
MAPK	Mitogen-aktivert proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivert proteinkinase kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivert proteinkinase kinase kinase
MyD88	Myeloid differensierings primærrespons gen 88
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear localization signal
PBS	Fosfatbufret saltvann
PKA	Protein kinase A

PRR	Mønstergjenkjennende reseptor
PVDF	Polyvinylidene difluorid
RHD	Rel homolog domene
RTK	Reseptor tyrosin kinase
RT-PCR	Sanntids polymerase kjedereaksjon
SDS	Sodium dodecylsulfat (natrium dodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natrium dodecylsulfat polyakrylamidgelelektroforese
SOS	Sons of sevenless
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
TBS	Trisbufret
TEMED	Tetrametyl-etylendiamin
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	Adaptor protein med TIR domene
TNF	Tumor nekrosefaktor
TLCA	Taurinkonjugert lithocholsyre
TLR	Toll-liknende reseptor
TRAF	TNFR-assosiert faktor
TRAM	TRIF-beslektet adaptor molekyl
TRIF	Adaptor-induserende IFN (interferon)- β med TIR domene

1 Teori

1.1 Medfødt immunitet

Den medfødte delen av immunforsvaret betegnes gjerne som det naturlige-, eller ikke-adaptive immunforsvaret. Ikke-adaptiv immunitet har flere viktige funksjoner, både i seg selv og i samarbeid med den adaptive delen av immunforsvaret. Adaptiv immunitet medieres av T- og B-lymfocytter, og kjennetegnes ved at det er spesifikt og har "hukommelse" (Akira et al., 2001). Det medfødte immunforsvaret er kroppens første indre forsvarslinje, og det er celler tilhørende dette som først tar opp kampen med mikroorganismer som har passert kroppens ytre forsvar. Flere av cellene tilhørende det medfødte immunforsvaret er fagocytterende, noe som vil si at de kan "spise" fremmed materiale og kroppens egne skadde og døde celler. Materialet tas opp i cellen og brytes ned bl.a. ved hjelp av fordøyelsesenzymmer. Antigenpresenterende celler, som for eksempel dendrittiske celler, tilhører også det medfødte immunforsvaret, og samarbeider med den adaptive delen av immunforsvaret. Cellene som representerer det medfødte immunforsvaret betegnes gjerne som mer primitive celler. De er påvist hos lavtstående dyrearter, og har blitt beholdt av pattedyrene gjennom evolusjonen. Monocytter, makrofager, granulocytter, dendrittiske celler og NK-celler er eksempler på celler fra det medfødte immunforsvaret.

Det medfødte immunforsvaret diskriminerer mellom kroppens egne strukturer og strukturer fra fremmede mikroorganismer. De fremmede strukturene fra mikroorganismer gjenkjennes ved hjelp av såkalte mønstergjenkjennende reseptorer (PRR) (Akira et al., 2006). Disse reseptorene kan være membranbundne, eller de kan være løselige. De membranbundne reseptorene har to funksjoner; de kan sette igang fagocytose, og de kan aktivere signalveier som setter i gang ulike responser i cellen som er knyttet til ikke-adaptiv immunitet, bl.a. endringer i genekspressjon. Mange av de mønstergjenkjennende reseptorene som er ansvarlig for å aktivere ikke-adaptiv immunitet tilhører en familie av reseptorer kalt Toll-liknende reseptorer (TLR) (Alberts, 2008).

Strukturene som PRR gjenkjenner blir med en fellesbetegnelse kalt MAMPs, som er en forkortelse for mikrobe-assosierte molekulære mønstre. Dette er komponenter som er

nødvendige for den inntrengende organismens overlevelse, og som derfor har en struktur som holdes relativt konstant (Akira et al., 2006).

1.1.1 Monocytt

Monocytterne er en av de "primitive" celletypene som tilhører den medfødte delen av immunforsvaret. Monocytt dannedes fra stamceller i beinmargen (van Furth, 1970). De sirkulerer i blodbanen og supplerer perifert vev med forløpere til dendrittiske celler og makrofager (Serbina et al. 2008). Monocytt som rekrutteres til infisert vev kan også i seg selv bekjempe inntrengende mikroorganismer, og de kan bidra i responsen sammen med den adaptive delen av immunforsvaret (Shi et al., 2011). Monocytt som blir stimulert via PRR responderer blant annet ved å skille ut cytokiner (se pkt. 1.4 om cytokiner) som IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 og TNF- α (Guha & Mackman, 2001; van Furth, 1998; Lea, 2006).

1.2 Signaloverføring

Celler blir nesten kontinuerlig påvirket av stimuli fra omverdenen gjennom ekstracellulære signalmolekyler. Signalmolekylene kan være bundet til den signalerende cellen, såkalt kontaktavhengig signalering, eller de blir skilt ut fra cellen. Kontaktavhengig signalering er bl.a. viktig under immunresponsen. Cellene responderer på signalene ved hjelp av reseptorer som binder signalmolekylene. Som oftest er disse reseptorene transmembrane proteiner på overflaten av cellen, men de kan også være inne i cellen.

Når et signalmolekyl (ligand) binder seg til en overflatereseptor, settes det ofte igang en rekke intracellulære kaskadereaksjoner som fører signalet videre. Signalet vil i siste instans aktivere effektor-proteiner som fører til en forandring i cellens oppførsel.

Det finnes tre hovedtyper av overflatereseptorer. Disse er ionekanal-koblede reseptorer, enzym koblede reseptorer og G-protein koblede reseptorer (Alberts, 2008).

1.2.1 G-protein koblede reseptorer

Hovedoppgaven til G-protein koblede reseptorer (GPCR) og overflatereseptorer generelt er å omforme ekstracellulær stimuli til intracellulære signaler (Kroeze et al., 2003).

GPCR er den største familien av overflatereseptorer og medierer svært mange av cellenes responser på signaler fra omverdenen (Alberts, 2008).

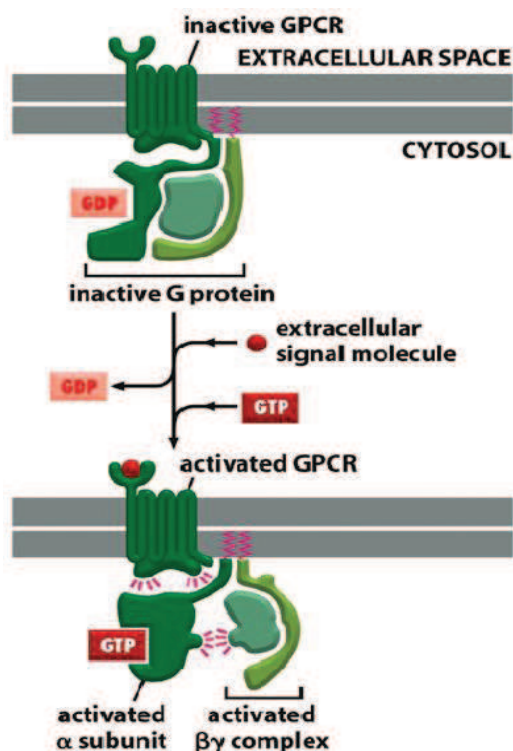
De reagerer på en rekke ulike stimuli som lipider, proteiner, hormoner, nukleotider, kjemokiner, lys og lukter (Kroeze et al. 2003).

Selv om det er kjemiske og funksjonelle forskjeller på signalmolekylene som aktiverer GPCR, har alle reseptorene lik struktur. De består av en enkelt polypeptidkjede som går fram og tilbake gjennom lipid-dobbeltlaget i plasmamembranen sju ganger (se figur 1).

Når et signalmolekyl binder seg til reseptoren, forandrer reseptoren konformasjon, noe som aktiverer et G-protein på plasmamembranens underside. Det finnes flere typer G-proteiner, men de har liknende struktur og virkemåte.

Et G-protein består av tre protein-subenheter; α , β og γ , hvorav α -subenheten har guanosin difosfat (GDP) bundet når proteinet er inaktivt. Når en GPCR aktiveres, vil den fungere som en guanin nukleotid utbyttefaktor, og sørge for at GDP på α -subenheten frigjøres. Dermed kan guanosin trifosfat (GTP) bindes til det tomme nukleotidbindingssetet, noe som fører til en stor konformasjonsendring og en aktivering av G-proteinet. Aktiveringen vil som oftest føre til dissosiering av G-proteinet i en α -subenhet og et $\beta\gamma$ -kompleks (se figur 1).

α -subenheten er en GTPase, hvilket innebærer at den vil hydrolysere GTP til GDP og G-proteinet vil bli inaktivt igjen (Alberts, 2008).



Figur 1 (Alberts, 2008): Figuren viser hvordan et ekstracellulært signalmolekyl aktiverer en GPCR, og hvordan G-proteinet aktiveres når α -subenheten binder GTP.

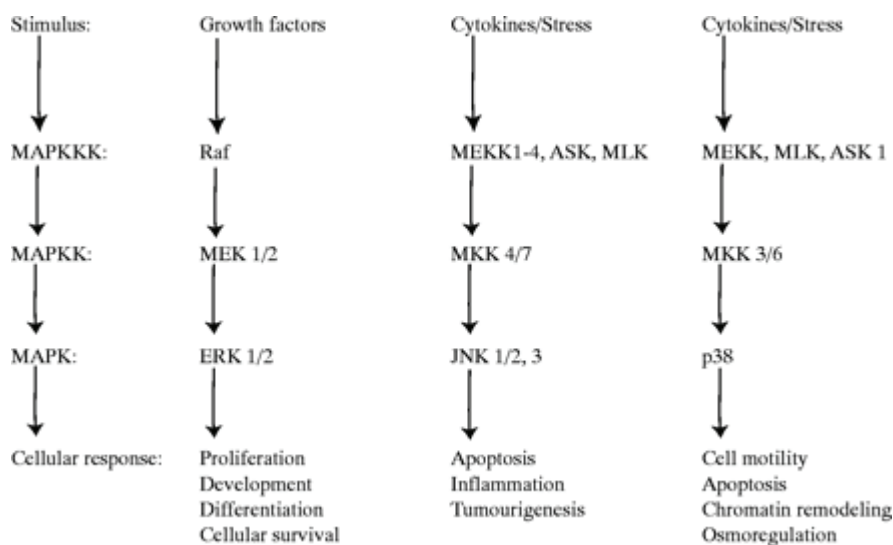
GPCR aktiverer flere ulike intracellulære signalveier. Bl.a. kan GPCR i respons på et ekstracellulært signalmolekyl øke konsentrasjonen av syklisk adenosin monofosfat (cAMP), som deretter kan spre signalet til andre deler av cellen. cAMP er et lite intracellulært signalmolekyl som genereres når en ligand binder til en GPCR som er koblet til et stimulerende G-protein (G_s). α -subenheten ($G_{\alpha s}$) vil dissosiere fra resten av det aktiverte G-proteinkomplekset og stimulere enzymet adenylyl syklase. Det stimulerede enzymet katalyserer en sykliseringsreaksjon hvor to fosfatgrupper fjernes fra ATP, og det dannes cAMP (Alberts, 2008; Serezani et al., 2008). Et ekstracellulært signal kan gi en tjuufolds økning av cAMP konsentrasjonen i cytosol. GPCRs som er koblet til et inhiberende G-protein (G_i) vil gjennom α -subenheten ($G_{\alpha i}$) derimot inhibere adenylyl syklase, og dermed også syntetiseringen av cAMP. $G_{\alpha i}$ sin hovedfunksjon er derimot å regulere ionekanaler (Alberts, 2008). Et annet G-protein, G_q , aktiverer fosfolipase C gjennom α -subenheten ($G_{\alpha q}$), som øker konsentrasjonen av en rekke små intracellulære signalmolekyler, bl.a. Ca^{2+} (Alberts, 2008). GPCR kan også aktivere de tre MAPK-signalveiene ERK1/2, JNK og p38 (se pkt. 1.3) (Naor et al., 2000).

1.3 Signalveier

Mitogen-aktiverte proteinkinaser (MAPK) er blant viktigste signalveier for regulering av eukaryote celler (Kyriakis & Avruch, 2001). De tre best studerte MAPK-signalveiene er; ekstracellulære signal-regulerte kinaser (ERK), c-Jun N-(amino) terminal protein kinase (JNK) og p38 familien av protein kinaser (Roux & Blenis, 2004). Hver av de tre signalveiene har viktige roller i regulering av genekspressjon, intracellulær metabolisme, vekst og utvikling, sykdom, respons på stress og apoptose (se figur 1) (Cowan & Storey, 2003).

MAPK-signalveiene er representert med et sett av tre konserverte protein kinaser; MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) fosforylerer og aktiverer MAP kinase kinase (MAPKK), som deretter fosforylerer og aktiverer MAP kinase (MAPK). MAPKKKs blir ofte aktivert gjennom interaksjon med et lite GTP-bindende protein fra Ras/Rho familien etter ekstracellulært stimuli (Kyriakis & Avruch, 2004).

Når en MAPK blir aktivert, fører den signalet videre ved å fosforylere ulike proteiner i cellen, bl.a. andre protein kinaser og genregulatoriske proteiner (Alberts, 2008).



Figur 2 (Cowan & Storey, 2003): En enkel oversikt over de tre best karakteriserte MAPK signalveiene. Rekken til venstre representerer MAPK generelt. De tre andre representerer hver enkelt av de tre nevnte MAPK signalveiene og hvilke cellulære funksjoner de påvirker.

1.3.1 ERK1/2-signalveien

ERK1/2 stimuleres hovedsaklig av vekstfaktorer og mitogener, og ved aktivering fosforylerer ERK1/2 en rekke proteiner i cellen, bl.a. membranproteiner, kjerneproteiner, cytoskjelettproteiner og en rekke protein kinaser, kalt MAPK-aktiverte protein kinaser (MK) (Cowan & Storey, 2003; Roux & Blenis, 2004). ERK1/2 blir aktivert av overflatereseptorer som reseptor tyrosin kinaser (RTK) og GPCR, gjennom ulike isoformer av det GTP-bindende proteinet Ras. Ras blir på sin side aktivert ved rekruttering av son of sevenless (SOS), som er en guanin nukleotid utbyttefaktor (GEF). Ras frigir GDP og binder GTP ved stimulering fra SOS, og blir dermed aktivert. Aktivert Ras rekrutteres deretter til kinasen Raf som er assosiert med plasmamembranen, slik at Raf blir aktivert. Raf tilsvarer ERK1/2 signalveiens MAPKKK. Aktivert Raf binder og fosforylerer kinasene MEK1 og 2 (MAPKK), som deretter fosforylerer ERK1 og ERK2 (MAPK) på Thr²⁰²-Glu-Tyr²⁰⁴ (Roux & Blenis, 2004).

1.3.2 JNK-signalveien

Det finnes tre ulike JNK. JNK 1 og JNK 2 er uttrykt i en rekke ulike vev, mens JNK 3 er uttrykt kun i hjernevev. JNK aktiveres av ulike stimuli, bl.a. osmotisk stress, varmesjokk og pro-inflammatoriske cytokiner. (Cowan & Storey, 2003)

JNK-signalveien kan aktiveres gjennom flere ulike overflatereseptorer. (Dickens, 1997)

JNKs blir aktivert av MAPKKs, nærmere bestemt MKK4 og MKK7, som fosforylerer JNK på Thr¹⁸³ og Tyr¹⁸⁵. MKK4 og MKK7 blir aktivert ved fosforylering som utføres av en rekke ulike MAPKKK (Rincón & Davis, 2009).

JNK fosforylerer det DNA-bindende proteinet c-Jun og øker dermed proteinets transkripsjonsaktivitet. C-Jun er en del av transkripsjonskomplekset AP-1, som er en viktig regulator av genekspresjon. AP-1 regulerer bl.a. cytokingener. (Johnson & Lapadat, 2002)

1.3.3 p38-signalveien

Det finnes fire medlemmer av p38-familien av protein kinaser; p38 α , p38 β , p38 γ og p38 δ . Av disse er p38 α den mest utbredte og best karakteriserte (Rincón & Davis, 2009).

Ulike stimuli aktiverer p38-signalveien, bl.a. inflammatoriske cytokiner, hormoner, ligander for GPCR, osmotisk stress og varmesjokk (Johnson & Lapadat, 2002).

p38 aktiveres hovedsakelig ved fosforylering mediert av MKK3 og MKK6 på Thr²⁰² og Tyr¹⁸², men kan også fosforyleres av MKK4. Som for MAPKK i JNK-signalveien, blir også MKK3 og MKK6 regulert av en rekke MAPKKK (Roux & Blenis, 2004; Rincón & Davis, 2009) Mye tyder på at aktivering av p38 er viktig for en normal immun- og inflammatorisk respons (Roux & Blenis, 2004).

1.4 Cytokiner

Cytokiner er en gruppe løselige signalmolekyler som er viktige i reguleringen av immunresponsen. De er stort sett glykoproteiner eller lavmolekylære proteiner, og produseres i hovedsak av hvite blodlegemer.

De ligner på hormoner, men skiller seg fra disse ved at de har lokale effekter.

En karakteristisk egenskap hos cytokinene er at ett cytokin kan utløse flere forskjellige biologiske reaksjoner og at flere forskjellige cytokiner kan ha samme eller overlappende effekt (Kishimoto et al., 1995).

Det er også vist at de kan påvirke hverandre ved at noen cytokiner kan påvirke produksjonen av andre, og kan regulere nivåene av hverandres membranreseptorer. Man kan derfor si at inngår i et funksjonelt nettverk.

1.4.1 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) er et cytokin som hører inn under kjemokinfamilien. Kjemokiner er kjemotaktiske cytokiner, hvilket betyr at de rekrutterer leukocytter til vev under en inflammasjon. (Luster, 1998) IL-8 er en potent kjemotaktisk aktivator for bl.a. T-lymfocytter. Monocytter, endotel- og epitelceller er eksempler på celler som skiller ut IL-8, når de blir stimulert av faktorer som LPS, IL-1 eller TNF- α (Ember et al. 1994).

1.4.2 Interleukin-6

Interleukin-6 er et multifunksjonelt cytokin. Det regulerer immunresponser, akutt fase reaksjoner, hematopoiese og benmetabolisme (Nishimoto et al., 2008). IL-6 produseres av mange ulike celler, som for eksempel monocytter, T- og B-lymfocytter, endotelceller og ulike tumorceller (Kishimoto, 1989).

1.5 Gallesyrer

Gallesyrer er endeprodukter av kolesterolmetabolismen som foregår i leveren. Gallesyrrer spiller en viktig rolle i kroppens næringsopptak. De er viktige i opptak av lipider på grunn av sine amfipatiske egenskaper, som innebærer at de har både hydrofile og hydrofobe egenskaper. De emulgerer lipidene slik at de kan tas opp gjennom tynntarmen, og bidrar også til opptak av fettløselige vitaminer. Cirka 95 % av gallsyrene reabsorberes og blir transportert tilbake til leveren i en prosess som kalles den enterohepatiske sirkulasjon (Chen et al., 2011). Under faste lagres gallsyrene i galleblæren, men ved inntak av et måltid vil de gå inn i tynntarmen, før de fraktes tilbake til leveren ved den enterohepatiske sirkulasjon (Fiorucci et al., 2009). Det finnes fire hovedtyper av gallsyrer; de primære gallsyrene cholsyre og chenodeoxycholsyre, og de sekundære gallsyrene lithocholsyre og deoxycholsyre. De sekundære gallsyrene dannes fra primære gallsyrer av bakterier i tynntarmen (Chen et al., 2011). I tillegg til deres rolle i lipidabsorpsjon og kolesterolhomeostase, har det vist seg at gallsyrer også fungerer som signalmolekyler med endokrine funksjoner. De aktiverer MAPK, og er ligander for reseptorer som TGR5 og kjernereseptoren farnesoid X (FXR). Gjennom aktivering av ulike signalveier kan gallsyrer i tillegg til å regulere deres egen enterohepatiske sirkulasjon, også påvirke triglyserid-, kolesterol-, glukose-, og energihomeostasen (Houten et al., 2006). Noen studier har vist at gallsyrer kan påvirke det medfødte immunforsvaret under en inflammasjon ved å inhibere immuncellers cytokinproduksjon og fagocytterende effekt gjennom stimulering av TGR5.(Kawamata et al., 2003; Keitel et al., 2008).

1.6 TGR5

TGR5 er en G-protein koblet reseptor som binder gallesyrer, og har blitt vist å videreføre signaler gjennom G_s -protein (Fiorucci et al., 2009). Reseptoren er også kjent som GP-BAR1, M-BAR og BG37. Et enkelt exon i kromosomposisjon 2q35 koder for TGR5 hos mennesker. Homologer til TGR5 er funnet i vannlevende virveldyr, noe som kan tyde på at reseptoren er konservert gjennom evolusjonen (Chen et al. 2011). Ekspresjon av TGR5 er vist i flere ulike vev, med de høyeste nivåene påvist i galleblære, milt, brunt fettvev, monocytter, makrofager og tarm (Fiorucci et al., 2009; Cipriani et al., 2011).

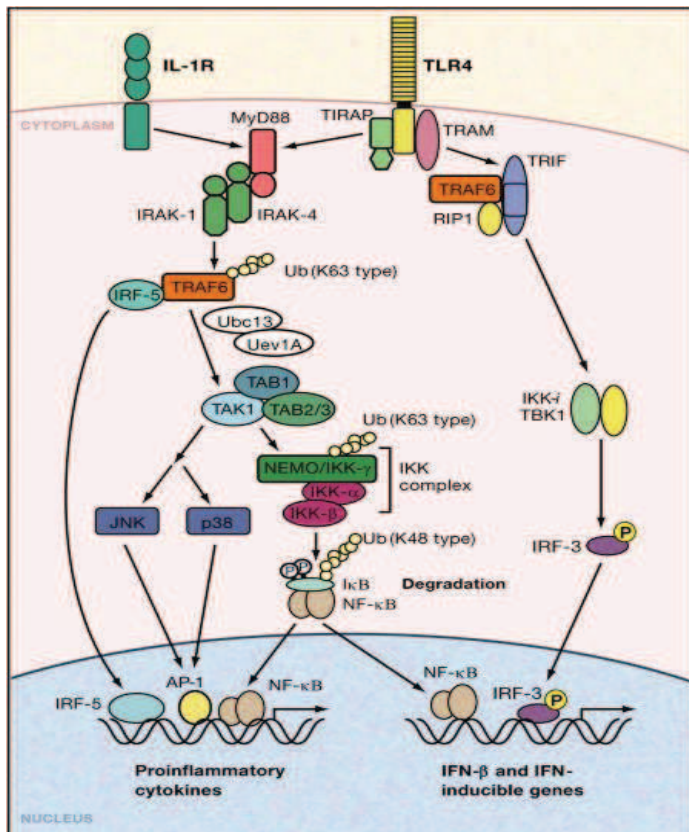
Blant de intracellulære signalveiene som settes i gang når TGR5 binder en ligand (gallesyrer) er stimulering av cAMP-syntese og aktivering av MAPK-signalveier (Fiorucci et al., 2009). Flere ulike gallesyrer fungerer som naturlige ligander for TGR5. Chenodeoxycholsyre (CDCA), deoxycholsyre (DCA), taurinkonjugert lithocholsyre (TLCA) og lithocholsyre (LCA) er eksempler på disse (Tiwari & Maiti, 2009). Triterpenoidene oleanolsyre og betulinsyre har også blitt vist å være ligander for TGR5. I motsetning til gallesyrene, som aktiverer både TGR5 og kjernerreseptoren FXR, er triterpenoidene selektive for TGR5 (Genet et al., 2010).

1.7 TLR

Toll-liknende reseptorer er en familie av mønstergjenkjennende reseptorer (PRR), og er uttrykt på flere ulike immunceller, som B-celler, spesifikke T-celler, makrofager, monocytter og dendritiske celler. Reseptorene kan også uttrykkes i celletyper som ikke klassifiseres som immunceller, for eksempel fibroblaster og epitelceller. Uttrykk av TLR er ikke statisk, men forandrer seg raskt i respons på patogener, cytokiner og stress (Akira et al., 2006; Sabroe, et al., 2002). Det finnes flere TLR i mennesker, og ulike ligander aktiverer ulike TLR (Kumar et al., 2009). For eksempel gjenkjennes lipopolysakkarider (LPS) (se pkt. 1.8) av TLR-4 (se figur 3). Én TLR kan også gjenkjenne ulike strukturer. TLR-4 kan i tillegg til å gjenkjenne LPS, også gjenkjenne bl.a. fibronectin og varmesjokk-proteiner, som begge er strukturelt forskjellige fra LPS (Akira et al., 2006). Strukturelt består TLR av et ekstracellulært LRR-domene (leucinrike repetisjoner), et transmembran-domene og et cytoplasmisk signaldomene som er homologt til det cytoplasmiske domenet i interleukin-1 reseptor, og kalles derfor et Toll/IL-

1R (TIR) domene (Kumar et al., 2009). Når TLR aktiveres av mikrobielle komponenter, gjennomgår reseptoren endringer i konformasjonen som er nødvendig for rekruttering av adaptormolekyler som inneholder TIR domene. Rekrutteringen av adaptormolekylene skjer gjennom homofil interaksjon mellom TIR domenet på TLR og adaptormolekylets TIR domene. Det finnes 4 ulike adaptormolekyler; MyD88 (myeloid differensiering primærrespons gen 88), TIRAP (adaptor protein med TIR domene), TRIF (adaptor-induserende IFN (interferon)- β med TIR domene) og TRAM (TRIF-beslektet adaptor molekyl). Selektiv bruk av disse adaptormolekylene er noe av forklaringen på at distinkte TLR ligander kan mediere ulike responser i cellen (Akira et al., 2006; Kumar et al., 2009).

MyD88 spiller en viktig rolle i signaleringen fra alle TLR bortsett fra TLR3, som kun bruker TRIF. Ved stimulering rekrutteres MyD88 til TIR domenet på TLR og rekrutterer deretter IL-1R-associated kinase 4 (IRAK-4) og IRAK-1. For TLR2 og TLR4, kreves også adaptorproteinet TIRAP for at MyD88 skal rekrutteres. IRAK-1 fosforyleres deretter av IRAK-4, som fører til rekruttering av TNFR-associated factor 6 (TRAF6). TRAF6 fungerer som en ubiquitin protein ligase (E3) og lager et kompleks med ubiquitination E2 enzym kompleks bestående av UBC13 and UEV1A som katalyserer en K63-linked polyubiquitin kjede på IKK γ /NF- κ B essential modulator (NEMO). Denne ubiquitineringen aktiverer kinasen TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) og de TAK1 bindende proteinene, TAB1, TAB2, og TAB3, som resulterer i forforylering av NEMO og aktivering av IKK kompleks. Dette fører en degradering av I κ B og aktivering av NF- κ B. TAK1 fosforylerer også MKK6, som fører til aktivering av MAPK (se figur 3) (Akira et al., 2006; Kumar et al., 2009).



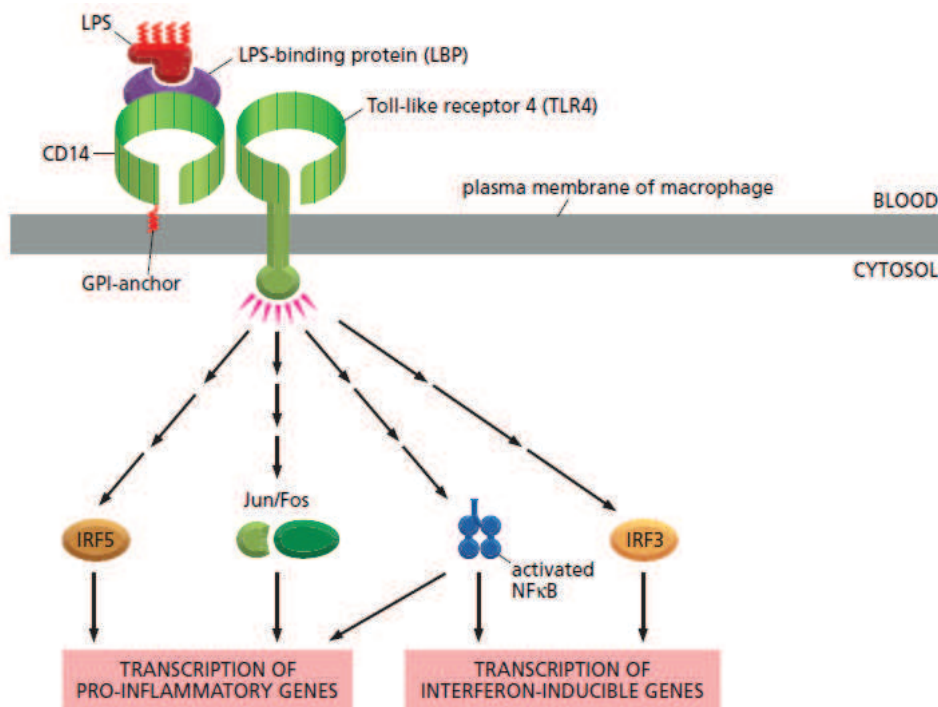
Figur 3 (Akira et al., 2006): Figuren viser signalveien som aktiveres ved stimulering av TLR4. Når TLR4 aktiveres, rekrutteres først TIRAP og deretter MyD88, som igjen rekrutterer IRAK-1 og IRAK-4. IRAK-1 forforyleres av IRAK-4, som fører til rekruttering av TRAF6 som fungerer ubiquitin protein ligase og lager et kompleks med E2, bestående av UBC13 and UEV1A. Dette komplekset polyubiquitinylerer NEMO og TRAF6. Dette fører til aktivering av et kompleks av TAK1 og TAB1, 2 og 3 som deretter fosforylerer IKK- β og MKK6 (ikke vist), som igjen fører til aktivering av NF- κ B og MAPK. Som figuren viser aktiveres denne signalveien også av IL-1R.

1.8 LPS

Lipopolysakkarider (LPS) er komponenter i yttermembranen hos Gram-negative bakterier. LPS er et komplekst glykolipid som består av et hydrofilt polysakkarid og et hydrofobt domene kalt lipid A. Det er lipid A som står for lipopolysakkaridets biologiske aktivitet (Akira et al., 2001). LPS binder seg til et akutt fase protein som er tilstede i blodet, kalt LPS bindende protein (LBP), og binder seg deretter til CD14 som er et protein på celleoverflaten til fagocytter. CD14 er bundet til membranen gjennom GPI (glykosylfosfatidylinositol). LPS overføres til MD-2 (myeloid differentiation protein-2), som binder seg til den ekstracellulære

delen av TLR4, fulgt av en oligomerisering av TLR4 (Akira et al., 2006; Kumar et al., 2009) (se figur 4).

Ved aktivering av TLR4 følger den intracellulære signaleringen som er beskrevet i avsnitt 1.7.



Figur 4 (Alberts, 2008): Figuren viser binding av LPS i kompleks med LBP og CD14 til TLR4 og påfølgende aktivering av ulike signalveier. MD2 er ikke tatt med i figuren.

1.9 NF- κ B

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) er dimeriske, sekvensspesifikke transkripsjonsfaktorer som er tilstede i de aller fleste cellyper. NF- κ B er involvert i aktivering av eksepsjonelt mange gener i respons på infeksjoner, inflammasjon og andre stressituasjoner som krever rask omprogrammering av genekspressjon (Karin & Ben-Neriah, 2000; Karin, 1999). NF- κ B er ikke et enkelt gen, men en familie av nært transkripsjonsfaktorer; NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel og RelB. Disse genene er opphav til 7 proteiner (Dolcet et al., 2005). NF- κ B proteinene er beslektet gjennom Rel homolog domene (RHD), som gjør NF- κ B gjenstand for en bestemt type regulering som går ut på transport mellom kjerne og cytoplasma. RHD har flere ulike funksjoner; det er domenet som sørger for DNA-binding, det inneholder et nuclear localization signal (NLS) og det er stedet for binding av NF- κ B inhibitorene I κ B. I ustimulert form er Nf- κ B i et kompleks med I κ B, og ligger i cytoplasma.

I κ B maskerer NLS på NF- κ B slik at proteinet ikke går inn i kjernen. Noen I κ B, som I κ B α , inneholder en kjerne eksport sekvens, og sørger ved binding til NF- κ B for transport tilbake til cytoplasma. (Hiscott et al., 2001; O'Neill & Kaltschmidt, 1997; Karin, 1999)

Ved stimulering av ulike patogener, virus, cytokiner og stressinduserende agenter, aktiveres I κ B kinase (IKK) kompleks. IKK forforylerer I κ B, noe som sørger for en frigjøring av Nf- κ B fra komplekset med I κ B. Nf- κ B vil dermed translokalisere fra cytoplasma til kjernen og regulere transkripsjon av ulike gener (Hiscott et al., 2001).

Det har også blitt vist at MAPK signalveiene p38 og JNK kan innvirke på NF- κ B aktiviteten gjennom crosstalk med NF- κ B signalveien (Hirano et al., 1996; Craig et al., 2000; Matsuda et al., 2003).

2 Materialer

2.1 Laborarieutsyr

<u>Sentrifuger</u>	<u>Navn</u>	<u>Produsent</u>
Sentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Bordsentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
Kjølesentrifuge	Digicen 20-R	Ortoalresa
<u>Cellarbeid</u>		
Vannbad	Techne TE-8J	Templette® Junior
Mikroskop	Leica DFC 420	Leica
Celleteller	Coulter® Particle Counter	Coulter Electronics
15-, 50 ml sterilrør	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-one
250 ml celleflaske	BD Falcon	BD Biosciences
<u>PCR</u>		
cDNA-maskin	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ research
PCR-maskin	Rotor-Gene™ 600	Corbett Research
Spektrofotometer	Nanodrop 200C	Thermo Scientific
<u>Western blotting/immunoblotting</u>		
Ristemaskin	Reciprocating Shaker, SSL2	Stuart
Blotter	Semi-Dry Transfer unit	Hofer
PVDF-membran	Amersham Hybond	GE Healthcare
Kromatografipapir	Whatman kromatografipapir	Whatman int. ltd
Film	Clear blue X-ray-film	Thermo Scientific
<u>ELISA</u>		
96-brønners ELISA-plate	Costar® 3590	Corning Inc.
ELISA-avleser	Sunrise Absorbance Reader	TECAN

NF- κ B luciferase assay

Mikrotiterplate

Nunc

Thermo Scientific

2.2 Kjemikalier og løsningerKjemikalie/løsningProdusent

2-merkaptoetanol

Sigma

Ammoniumpersulfat

Merck

Bromfenolblått

Merck

Developer

Alpha

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Merck

Gentamicin sulfat

BioWhittaker

Glycerol 98 %

VWR International

Glycin

Sigma

Hydrogenklorid

Merck

Ikke-essensielle aminosyrer

PAA Laboratories

Inaktivert føtalt kalveserum (FCS)

Fischer Scientific

Metanol

VWR International

Monothioglycerol

Sigma

Natriumfluorid

KEBO Lab

Natriumklorid

Merck

Natriumperborat (PBS)

PAA Laboratories

Natriumpyruvat

PAA Laboratories

Protein standard: Precision plus protein, Dual Color

BioRad Laboratories

Rapid Fixer G 354

AGFA

RPMI 1640 m/L-glutamin

PAA Laboratories

Sodium dodecylsulfat

Sigma-Aldrich

Sodium orthovanadat

Sigma-Aldrich

TEMED

BioRad Laboratories

Trizma base (Tris)	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.3 Antistoffer

<u>Antistoff</u>	<u>Produsent</u>
Kanin anti-aktin	Sigma-Aldrich
Mus anti-fosfo p38 MAP kinase (Thr202/Tyr182)	Cell Signaling Technology
Mus anti-fosfo p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology
Anti-fosfo SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling Technology
Anti-human IL-8	Immunotools
Anti-human IL-8 biotinmerket	Immunotools
Geit anti-kanin IgG (H+L) HRP	Southern Biotechnology
Geit anti-mus IgG HRP	Southern Biotechnology
Geit anti-human IL-6 Biotin	R&D
Mus anti-human IL-6	R&D

2.4 Oppskrifter

RPMI 1640 (m/L-glutamin) med 10 % kalveserum:

- 500 ml RPMI 1640
- 50 ml inaktivert føtalt kalveserum
- 5 ml ikke-essensielle aminosyrer
- 5 ml natriumpyruvat
- 250 µl gentamicin sulfat
- 25 µl 1M monotioglyserol

RPMI 1640 (m/L-glutamin) med 1 % kalveserum:

5 ml inaktivert føtalt kalveserum, ellers samme som ovenfor.

Innfrysningsmedium:

100 ml RPMI 1640

20 ml DMSO

20 ml FCS

1,5 M TrisHCl, pH 8,8 (1L):

Tris (FW 121.1)	30,3 g
HCl	til pH 8,8
lonebyttet H ₂ O	til 1000 ml

0,5 M TrisHCl, pH 6,8 (0,5L):

Tris (FW 121.1)	181,6 g
HCl	til pH 6,8
lonebyttet H ₂ O	til 500 ml

10 % SDS-løsning:

Sodium dodecylsulfat	10,0 g
lonebyttet H ₂ O	til 100 ml

10 % APS:

Ammonium persulfat	1,0 g
lonebyttet H ₂ O	til 10 ml

2x Samplebuffer:

0,5 TrisHCl, pH 6,8	25 ml
10 % SDS	40 ml
Glycerol	20 ml
Bromfenolblå	0,2 mg
lonebyttet H ₂ O	15 ml

Bruksløsning: 9 ml 2x samplebuffer tilsettes 1 ml 2-merkaptoetanol

10x Elektroforesebuffer:

Tris (FW 121,1)	30,0 g
192mM Glycin	144,0 g
SDS	10,0 g
lonebyttet H ₂ O	til 1000 m

Bruksløsning: fortykning til 1x med lonebyttet H₂O

10x Overføringsbuffer:

Tris (FW 121,1)	30,0 g
192mM Glycin	144,0 g
lonebyttet H ₂ O	til 1000 ml

10x TBS, pH 7,4 (1L):

Tris (FW 121,1)	31,5 g
NaCl	90,0 g
HCl	til pH 7,4
lonebyttet H ₂ O	til 1000 ml

Blokkeringsbuffer m/5 % tørrmelk:

Bruksløsning TBS	50 ml
Tørrmelk	2,5 g

Separerende gel, 10 % (2 geler):

Akrylamid	3,3 ml
1,5 M TrisHCl, pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
lonebyttet H ₂ O	4,0 ml
10 % APS	50,0 µl
TEMED	3,3 µl

Bruksløsning Overføringsbuffer (1 L):

10x Transferbuffer	100 ml
Metanol	100 ml
lonebyttet H ₂ O	til 1000ml

Bruksløsning TBS:

10x TBS	100 ml
lonebyttet H ₂ O	900 ml
Tween 20	1ml

Konsentrerende gel, 4 % (2 geler):

Akrylamid	0,67 ml
0,5 M TrisHCl, pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	50,0 µl
lonebyttet H ₂ O	3,0 ml
10 % APS	25,0 µl
TEMED	2,5 µ

3 Metoder

3.1 Cellearbeid

Cellene som ble brukt var fra en human cellelinje kalt U937. Dette er en monocytcellerlinje isolert fra en leukemipasient. Cellelinjen er stabilt transfektert med et NF- κ B reporter-genkonstrukt. U937 er en ikke-adherent cellelinje.

3.1.1 Celledyrking

Cellene ble dyrket i RPMI 1640 supplert med 10 % kalveserum (FCS) og kultivert i celleflasker (Falcon T75) i inkubatorskap med 37°C, 5 % CO₂ og 100% luftfuktighet.

3.1.2 Celletelling

Ved telling av cellene ble de først sentrifugert (1300 rcf, 10 minutter) og gammelt medium ble fjernet. Deretter ble cellene resuspendert i 1 ml nytt medium. 20 μ l av suspensjonen ble tilsatt i 10 ml tellevæske (destillert vann med 0,9 % natriumklorid). Celletelleren var innstilt for å telle partikler mellom 4 og 12 μ m.

3.1.3 Frysing av celler

Cellene ble sentrifugert ved 13000 rcf og resuspendert i RPMI 1640 (10 % FCS). Suspensjonen ble deretter overført til nedfrysingsampuller med 2-4 millioner i hver. Disse ble satt på is og tilsatt innfrysingsmedium (RPMI med 20 % FCS og 20 % DMSO) dråpevis, til samme volum som celleløsningen. Ampullene ble satt på is i noen timer og så satt i -80°C i et døgn. Etter et døgn ble de overført til nitrogentank.

3.1.4 Tining av celler

En ampulle med celler ble tatt opp fra nitrogentank og satt i vannbad (37°C) til det var en liten isklump igjen. Cellene ble deretter helt over i et 50ml rør med 20ml RPMI med 10 % kalveserum, stående på is. Cellene ble spunnet ned og mediet ble fjernet. Nye 20ml RPMI

med 10 % kalveserum (kaldt) ble tilsatt, og suspensjonen ble overført til celleflaske og satt i inkubatorskap.

3.1.5 Sulting av celler

Celler som ble brukt til Western Blotting ble sultet i 24 timer før stimulering. Cellene ble spunnet ned, gammelt medium (RPMI 1640 m/ 10 % kalveserum) ble fjernet, og RPMI 1640 m/ 1 % kalveserum ble tilsatt. Cellene ble overført til celleflaske og satt i inkubatorskap.

3.2 RT-PCR (real-time polymerase chain reaction)

RT-PCR er en metode som kan amplifisere en liten mengde DNA-templat (eller RNA/cDNA) og lage tusener til millioner kopier iløpet av et par timer. Metoden baseres på RNA-polymerase sin evne til å syntetisere nye ssDNA som er komplementære med templatet som benyttes i reaksjonen. DNA-polymerase kan bare legge til nye nukleotider til en allerede eksisterende 3'-OH gruppe, og er derfor avhengig av en primer for å syntetisere det første nukleotidet. Dette gjør det mulig å avgrense en spesifikk sekvens av templatet som ønskes amplifisert.

RT-PCR muliggjør måling av amplifiseringen i den eksponentielle fasen, i motsetning til tradisjonell PCR, hvor amplifiseringen blir detektert i platåfasen.

Prosedyre:

mRNA ble isolert fra cellene ved bruk av RNeasy 50 Mini Kit (QIAGEN). Mengden av isolert mRNA ble målt på spektrofotometer. 2000 ng mRNA ble brukt til cDNA-syntesen, som ble utført i en Peltier Thermal Cycler. Kitet TaqMan reverse transcriptase (VWR International) ble brukt i utførelsen av syntesen.

Pr. prøve i en kjøring av RT-PCR ble det brukt 20 ng DNA fra cDNA-syntesen, 10 µl TaqMan MM, 1 µl TaqMan probe og RNase-fritt vann opp til 20 µl. TaqMan prober for RPLPO, GADPH og TGR5 ble brukt. Hver prøve ble kjørt i parallell, i tillegg til en parallell med no-template kontroll (RNase-fritt vann istedenfor cDNA).

RT-PCR ble kjørt med følgende oppsett:

- 50°C i 2 minutter og 95°C i 10 minutter.
- 50 sykler med 60°C i 60 sekunder og 95°C i 15 sekunder

3.3 Western blotting/Immunoblotting

Western blot er en teknikk som brukes for påvisning av proteiner i en bestemt prøve. Metoden går ut på at proteiner som har blitt separert v.h.a. SDS-PAGE (se neste avsnitt) blir overført til en polymermembran. Deretter brukes antistoffer for å detektere spesifikke proteiner på membranen (Immunoblotting).

SDS-PAGE:

SDS-PAGE er en metode for å separere proteiner etter størrelse. SDS (natrium dodecylsulfat) er en detergent som denaturerer proteinene i prøven, og i tillegg gir dem en negativ ladning. Dette gjør at proteinene kan bli separert etter molekylvekt ved hjelp av polyakrylamidgelelektroforese (PAGE), uten å bli påvirket av struktur eller ladning.

Prosedyre:

Cellene ble først sultet i RPMI 1640 med 1 % kalveserum i 24 timer.

Deretter ble det for hver prøve tilsatt 4 millioner celler i 1,5ml eppendorfrør, som så ble fylt opp til 500µl med RPMI 1640 med 1 % FCS. Prøvene ble deretter stimulert avhengig av forsøk. Etter stimulering ble cellene spunnet ned. Mediet ble fjernet og 100 µl lysesbuffer ble tilsatt til hver prøve. Prøvene ble stående på is i 30 minutter, før de ble spunnet ned i kjølesentrifuge ved 15000 rpm i 15 minutter ved 4°C.

Etter sentrifugering ble 80 µl av supernatanten overført til nye rør sammen med 80 µl bruksløsning 2x samplebuffer.

Prøvene ble kokt i 5 minutter ved 100°C.

Gelene ble laget i henhold til geloppskriftene for separerende og konsentrerende gel vist under materialer.

5 µl standard og 20 µl av hver prøve ble tilsatt i hver sin brønn i gelen.

To og to geler ble kjørt på 40 mA i elektroforesebad i ca 45 min.

Etter elektroforese ble den konsentrerende gelen med brønnene skjært av og den separerende gelen lagt i transferbuffer. 8 ark (10x7cm) kromatografipapir (pr. gel) og PVDF-membranen ble også lagt i transferbuffer. PVDF-membranen hadde på forhånd blitt fuktet med metanol i 30 sekunder og skylt i deionisert vann. Etter et noen minutter i

overføringsbuffer, ble alt lagt på blotter i følgende rekkefølge: 4 lag kromatografpapir, membran, gel, 4 lag kromatografpapir.

Blotteren ble satt på 130mA (for to geler) i 1 time.

Etter overføring ble membranen(e) lagt i blokkeringsbuffer på ristemaskin i 1 time.

Blokkeringsbufferen ble deretter fjernet og 10 ml blokkeringsbuffer (pr. membran) ble tilsatt sammen med primærantistoff i riktig konsentrasjon. Dette ble satt til inkubasjon på vipper i kjølerom over natten.

Neste dag ble blokkeringsbuffer med primærantistoff fjernet. Membranen ble deretter vasket i TBS bruksløsning i 6x10 minutter. Membranen ble så tilsatt 10ml blokkeringsbuffer og riktig mengde sekundærantistoff, før en ny vaskerunde.

Før fremkalling i mørkerom ble membranen tilsatt substratløsning.

3.4 NF- κ B-luciferase assay

U937-cellelinjen er som nevnt stabilt transfektert med et NF- κ B-luciferase reporterkonstrukt. Reporterkonstruktet inneholder luciferase reporter-genet som er regulert av en promoter med tre NF- κ B seter (5'-GGGACTTCC-'3) fra Ig κ light chain enhancer regionen 3 κ B-LUC (Austena et al., 2009).

Assayet er en screeningmetode som brukes for å se på hvordan NF- κ B-aktiviteten blir påvirket av ulike faktorer.

Prosedyre:

7,5 millioner celler ble inkubert i 25 ml RPMI 1640 med hygromycin B, i 24 timer i inkubatorskap.

Etter inkubasjon ble cellene spunnet ned og resuspendert i 26 ml forvarmet RPMI med 2 % FCS. Deretter ble suspensjonen overført til en mikrotiterplate; 2 brønner for hver prøve med 100 μ l pr. brønn.

Platen ble satt i inkubatorskap i 30 minutter. Deretter ble riktig mengde prøve tilsatt avhengig av forsøk, og prøvene ble inkubert i 6 timer.

Etter inkubering ble hver brønn tilsatt 100 μ l Bright-Glo luciferase assay, før inkubasjon i romtemperatur i minst 2 minutter før avlesning på luminometer med program Bright-Glo.

3.5 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) er en metode som brukes for å detektere og kvantifisere et spesifikt antigen i en prøve (interleukiner i denne oppgaven). Det finnes flere ulike varianter av ELISA, men alle følger noen grunnprinsipper:

- Direkte eller indirekte immobilisering av antigenet til brønner i en ELISA-plate
- Tilsetting av irrelevant protein for å blokkere alle uspesifikke bindingssteder i brønnene
- Inkubering med spesifikke antistoffer som binder antigenet
- Detektering av signal som genereres av et enzym som er direkte eller indirekte koblet til de spesifikke antistoffene

I denne oppgaven ble det benyttet et sandwich ELISA. Dette innebærer en indirekte mobilisering av antigenet ved at ELISA-platen coats med antistoff mot antigenet. Dette sørger for at kun det spesifikke antigenet fester seg i brønnene. Deretter tilsettes deteksjonsantistoff. I denne oppgaven var deteksjonsantistoffet biotinmerket. Det ble deretter tilsatt HRP (horseradish peroksidase) konjugert med streptavidin som binder spesifikt til biotin. Til slutt ble det tilsatt et substrat som sørger for at enzymet avgir et målbart signal. I andre tilfeller kan også deteksjonsantistoffet være direkte koblet til et enzym.

Prosedyre:

Det ble brukt 1 million celler pr prøve. Disse ble sådd ut i 24-brønners plate med 1 ml RPMI 1640 med 10 % FCS. Cellene ble deretter stimulert avhengig av forsøk.

Etter inkubasjon i 24 timer ble prøvene overført til hvert sitt 1,5 ml eppendorfrør og spunnet ned i 2 minutter ved 8000 rpm i bordsentrifuge. Prøvene ble deretter overført til nye 1,5 ml eppendorfrør, før de ble brukt til forsøk (eventuelt fryst ned ved -20°C for senere bruk).

Fulgte protokoll fra R&D for IL-6 og protokoll fra Immunotools for IL-8.

Unntak fra protokoll R&D: 200 µl/brønn x 4 for vasking. 200 µl/brønn til blokkering.

3.6 Løsning av ligander

Betulinsyren som ble brukt i denne oppgaven ble løst i DMSO (dimetylsulfoksid) og PBS.

Gallesaltene og LPS ble løst i autoklavert dH₂O.

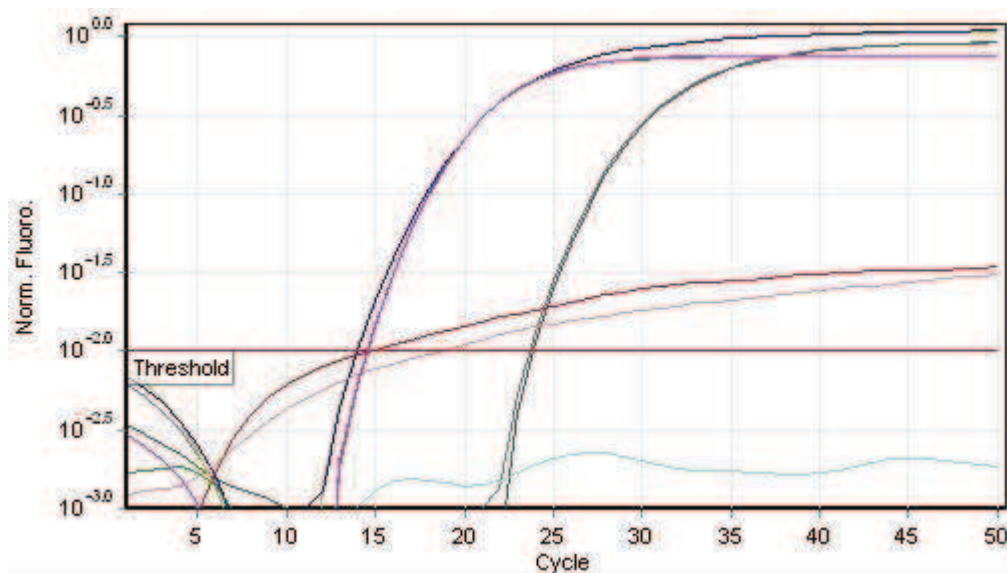
4 Resultater

4.1 Introduksjon

I denne oppgaven ble det undersøkt hvilke intracellulære effekter stimulering med betulinsyre/gallesalter, LPS og kostimulering med betulinsyre/gallesyrer og LPS har på monocytcellerlinjen U937. Cellelinjen er isolert fra en leukemipasient, og er stabilt transfektert med et NF- κ B reportergenkonstrukt (se metodedel). Selv om noen lignende forsøk har blitt gjort tidligere, var det interessant å se hvilke effekter man ville få i dette systemet.

4.2 Påvisning av mRNA fra TGR5 reseptor ved PCR

For å se om TGR5 var uttrykt i U937-cellene, ble det i et innledende forsøk sett på om disse cellene uttrykker mRNA for reseptoren. GAPDH og RPLPO ble brukt som referansegener.

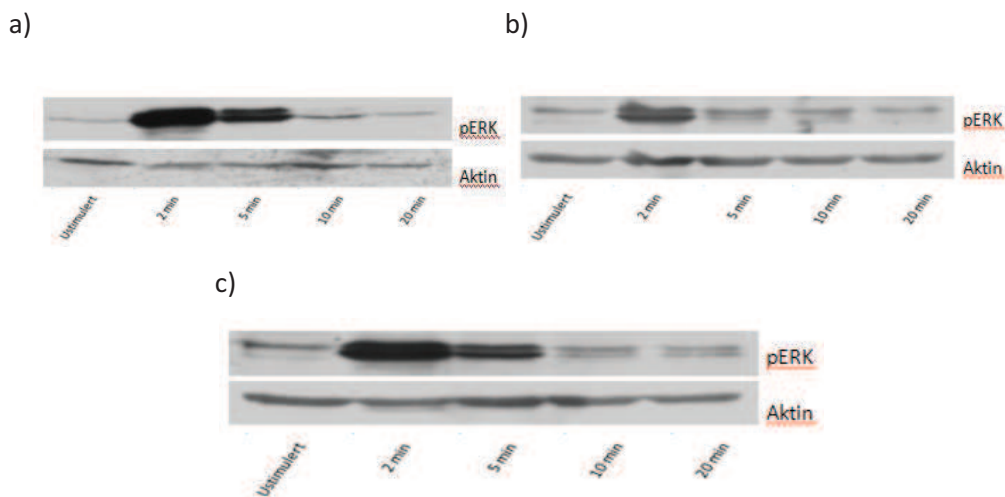


Figur 4: Den lysegrå og den mørkegrå grafen viser paralleller for TGR5 mRNA, som kommer opp ved syklus 23. De to andre grafene som kommer opp mellom syklus 10 og 15 viser mRNA for referansegenene GAPDH og RPLPO.

Resultatet fra RT-PCR viser at mRNA for TGR5 er uttrykt i U937 cellene.

4.3 Effekt av TGR5-stimulering på fosforylering av ERK1/2

Selv om det ble påvist mRNA for TGR5 reseptoren ved RT-PCR i innledende forsøk, er det ikke dermed gitt at reseptoren er uttrykt på proteinnivå. Aktivering av MAPK signalveien ERK1/2 har vist seg å være et egnet mål på aktiveringen av en rekke ulike GPCR (Osmond et al., 2005). Det ble derfor undersøkt om stimulering av cellene med den TGR5-spesifikke agonisten betulinsyre førte til aktivering av MAPK-signalveien ERK1/2. Det ble deretter sett på hvorvidt gallesyrer har den samme effekten. Det ble brukt salter av gallesyrene CDCA og DCA. CDCA er en primær og DCA er en sekundær gallesyre. Begge har vist seg å være naturlige ligander for TGR5 (Tiwari & Maiti, 2009).



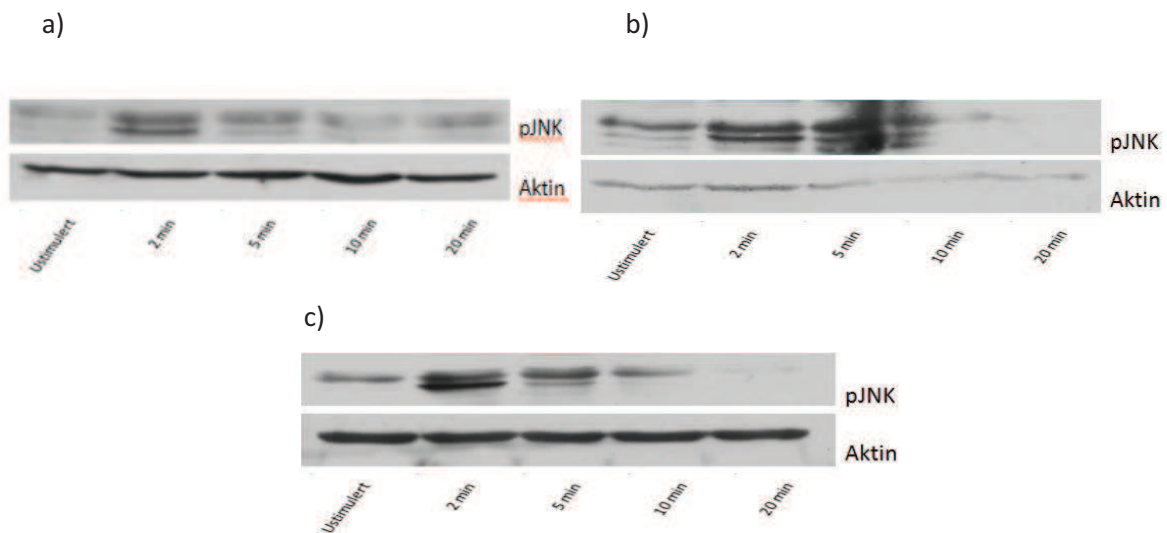
Figur 5: Figuren viser fosforylert ERK1/2 etter stimulering med betulinsyre (a), salter av CDCA (b) og salter av DCA (c). I alle forsøkene ble det benyttet 5 prøver med 4 millioner U937-celler pr. prøve. Cellene ble på forhånd sultet i 24 timer. Den første prøven er ustimulert. De fire neste ble stimulert med 10 μ M betulinsyre (a), 100 μ M salter av CDCA (b) og 100 μ M salter av DCA (c) i henholdsvis 2, 5, 10 og 20 minutter. Prøvene ble deretter lysert. Prøvene ble separert ved SDS-PAGE og deretter overført til membran ved Western blotting. Membranen ble inkubert med antistoff mot fosforylert ERK1/2, og deretter med antistoff mot aktin ved immunoblotting. Aktinblottene viser at det er tilnærmet like mye protein i hver prøve. Figuren er representativ for tre forsøk (a), to forsøk (b), to forsøk (c).

Resultatene viser omtrent samme kinetikk ved stimulering med hver av de tre agonistene. Fosforyleringen av ERK1/2 øker etter 2 minutter, for deretter å avta gradvis. Fosforyleringen avtok noe raskere for stimulering med saltene av CDCA i forhold til de to andre agonistene.

4.4 Effekt av TGR5-stimulering på fosforylering av JNK

Ettersom ERK1/2 ble aktivert, ble det også undersøkt om TGR5-stimulering i U937-cellene kunne aktivere de to andre best studerte MAPK-signalveiene JNK og p38. Her ble det også først sett på stimulering med betulinsyre og deretter gallesyrer.

Stimulering av TGR5 har vist seg å aktivere JNK i humane tumorceller fra lever (Yang et al., 2007).



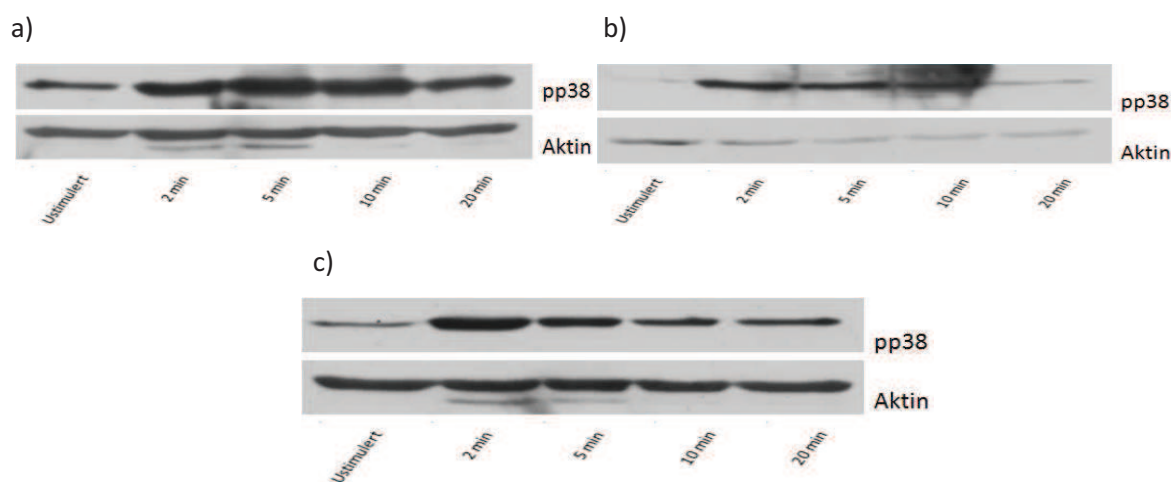
Figur 6: Figuren viser fosforylert JNK etter stimulering med betulinsyre (a), salter av CDCA (b) og salter av DCA (c). I alle forsøkene ble det benyttet 5 prøver med 4 millioner U937-celler pr. prøve. Cellene ble på forhånd sultet i 24 timer. Den første prøven er ustimulert. De fire neste ble stimulert med 10 μ M betulinsyre (a), 50 μ M salter av CDCA (b) og 100 μ M salter av DCA (c) i henholdsvis 2, 5, 10 og 20 minutter. Prøvene ble deretter lysert. Prøvene ble separert ved SDS-PAGE og deretter overført til membran ved Western Blotting. Membranen ble inkubert med antistoff mot fosforylert JNK, og deretter med antistoff mot aktin ved immunoblotting. Aktinblottene viser at det er tilnærmet like mye protein i hver prøve. Figuren er representativ for to forsøk (a).

Resultatene viser en økning i fosforylering av JNK etter 2 minutter for hver av de tre agonistene. Fosforyleringen avtar deretter gradvis.

4.5 Effekt av TGR5-stimulering på fosforylering av p38

Det ble undersøkt om stimulering av TGR5 fører til aktivering av MAPK-signalveien p38.

Det ble først sett effekt av stimulering med betulinsyre, og deretter gallesyrer.



Figur 7: Figuren viser fosforylert p38 etter stimulering med betulinsyre (a), salter av CDCA (b) og salter av DCA (c). I alle forsøkene ble det benyttet 5 prøver med 4 millioner U937-celler pr. prøve. Cellene ble på forhånd sultet i 24 timer. Den første prøven er ustimulert. De fire neste ble stimulert med 10 μM betulinsyre (a), 50 μM salter av CDCA (b) og 100 μM salter av DCA (c) i henholdsvis 2, 5, 10 og 20 minutter. Prøvene ble deretter lysert. Prøvene ble separert ved SDS-PAGE og deretter overført til membran ved Western Blotting. Membranen ble inkubert med antistoff mot fosforylert p38, og deretter med antistoff mot aktin ved immunoblotting. Aktinblottene viser at det er tilnærmet like mye protein i hver prøve. Figuren er representativ for to forsøk (a).

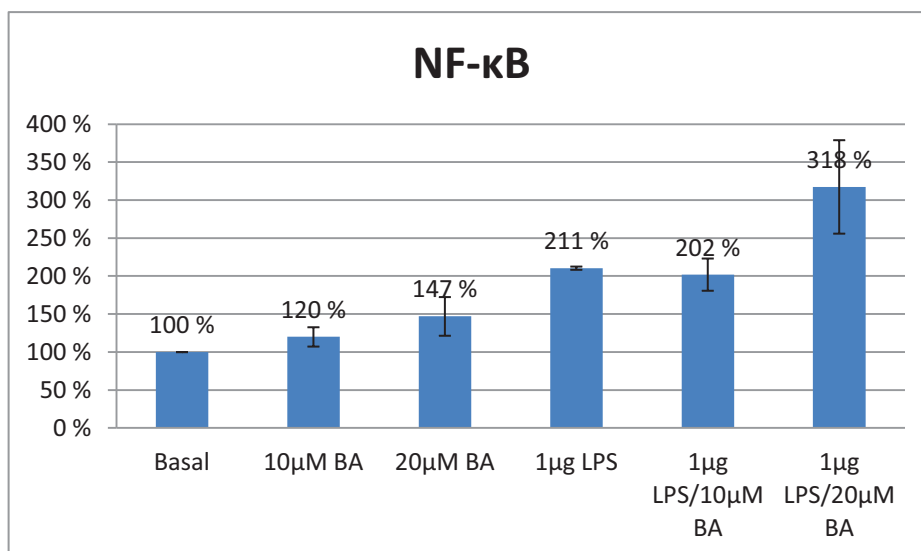
Resultatene viser en økning i fosforylering av p38 etter to minutter ved stimulering av alle de tre agonistene. Fosforyleringen går gradvis ned ved 5 minutter og utover for forsøkene med CDCA og DCA, mens det blir en ytterligere økning etter 5 minutters stimulering i forsøket med betulinsyre. Deretter avtar fosforyleringen gradvis også her.

Forsøkene på JNK og p38 stimulering ble kjørt med både 50 og 100 μM av både salter av CDCA og salter av DCA. Det ble ikke store forskjeller mellom stimulering med 50 μM og 100

μM . Det ble derfor valgt å vise de peneste blottene, uavhengig om dette var med 50 eller $100 \mu\text{M}$ av gallesyrene.

4.6 Effekt av stimulering med betulinsyre, LPS og kostimulering med disse på NF- κB -aktivitet

NF- κB er transkripsjonsfaktorer som spiller en viktig rolle i regulering av inflammasjon og immunrespons (Karin & Ben-Neriah, 2000). U937-cellene er stabilt transfektert med et NF- κB reporterengenkonstrukt. Det ble derfor kjørt NF- κB luciferase assay for å se hvilken effekt stimulering med betulinsyre, LPS og kostimulering med de to ligandene har på NF- κB -aktiviteten.



Figur13: Figuren viser effekten av stimulering med betulinsyre, LPS og kostimulering med disse på NF- κB -aktiviteten i U937 cellene. En prøve er ustimulert (basalaktivitet). Basalaktiviteten er satt til 100 %. Resten er stimulert med henholdsvis 10 μM betulinsyre, 20 μM betulinsyre, 1 μg LPS, 10 μM betulinsyre/1 μg LPS og 20 μM betulinsyre/1 μg LPS. Figuren viser gjennomsnittet av 2 forsøk. Prøvene ble inkubert i 6 timer.

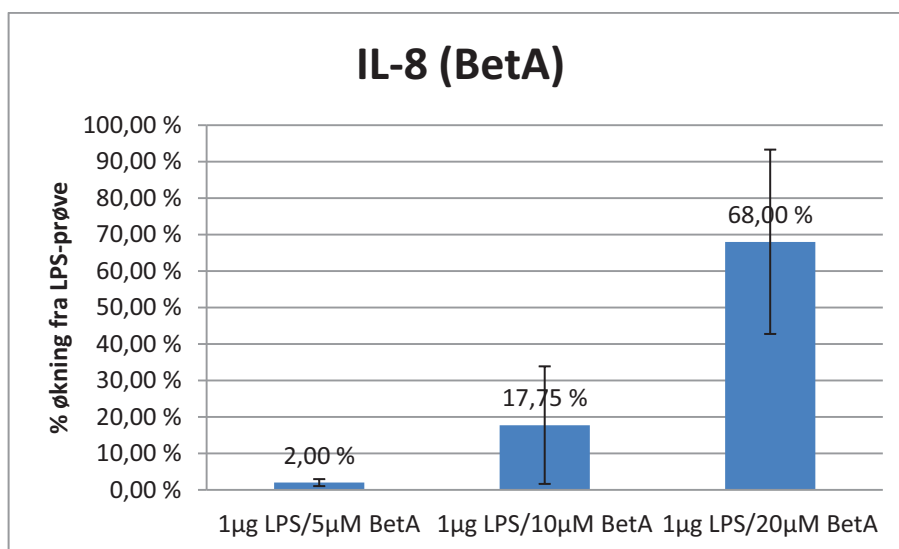
I prøvene stimulert med 10 μM og 20 μM betulinsyre ble det en liten økning i NF- κB aktivitet i forhold til basalaktiviteten. I prøvene som er stimulert med LPS økes NF- κB aktiviteten ytterligere. I prøvene som ble kostimulert med 10 μM betulinsyre og LPS, er nivået omtrent

som ved kun LPS stimulering, mens det i prøvene som er kostimulert med 20 μ M betulinsyre og LPS vises en synergistisk effekt.

4.7 Effekt på IL-8 produksjon ved kostimulering med betulinsyre/gallesyrer og LPS

Immunceller vil ved en inflammatorisk respons typisk skille ut cytokiner.

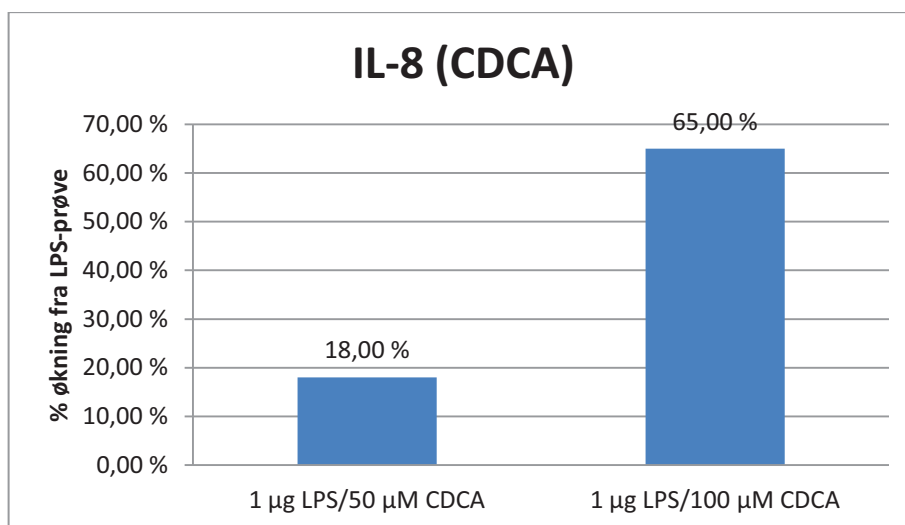
Det ble derfor sett på om stimulering av TGR5, stimulering med LPS og disse to i samspill har noen innvirkning på cytokinproduksjonen i U937 cellene. Dette ble gjort ved å se på produksjon av proinflammatoriske cytokiner ved hjelp av ELISA. Cytokinene det ble testet for var IL-8 og IL-6, som begge er cytokiner som skilles ut ved aktivering av monocytter (Dentener et al., 1993).



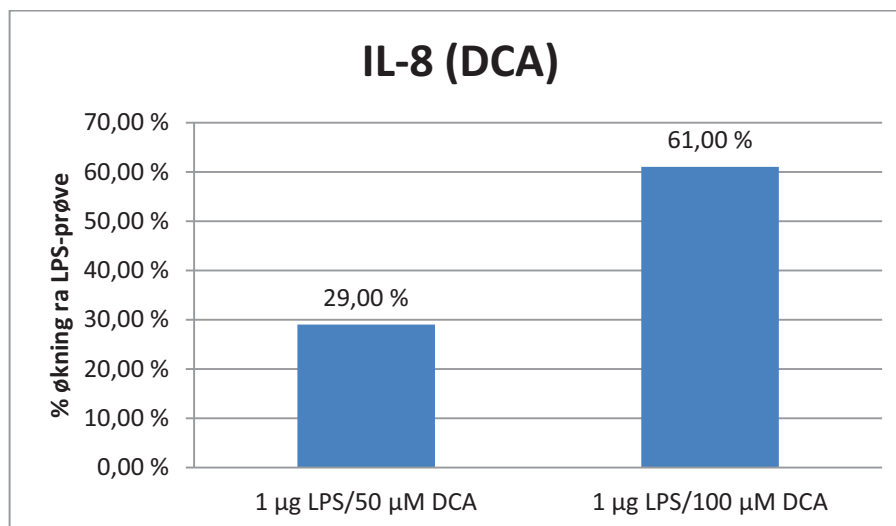
Figur 8: Figuren viser prosentvis økning i IL-8 produksjon i forhold til prøve som ble stimulert med 1 μ g LPS. Figuren viser gjennomsnitt for fire forsøk. For hvert forsøk ble fire prøver stimulert med 1 μ g LPS. Tre av disse ble kostimulert med henholdsvis 5, 10 og 20 μ M betulinsyre (betulinsyre tilsatt først). Etter stimulering ble prøvene inkubert i 24 timer før cytokininnholdet i kultursupernatanten ble målt ved ELISA metodikk. For hver prøve ble det brukt 1 million U937 celler.

Prøver som ble tilsatt kun betulinsyre viste ingen effekt på cytokinproduksjon, og er derfor utelatt fra figuren. Alle forsøkene viste en vesentlig økning i IL-8 produksjon fra ustimulert prøve til prøven som ble tilsatt 1 μ g LPS, men blir ikke vist på grunn av store variasjoner mellom forsøkene.

Resultatet viser at prøvene som ble kostimulert med 5 μM betulinsyre og 1 μg LPS holder seg omtrent på nivå med LPS prøven. Prøvene som ble kostimulert med 10 μM betulinsyre og 1 μg LPS viser en økning i forhold til LPS prøven, og man kan ane en synergistisk effekt. Standardavviket er imidlertid veldig stort. Prøvene som ble kostimulert med 20 μM betulinsyre og 1 μg LPS viser en mye større økning i cytokinproduksjonen, og en tydelig synergistisk effekt.



Figur 9: Figuren viser prosentvis økning i IL-8 produksjon i forhold til prøve stimulert med 1 μg LPS. En prøve ble kostimulert med 1 μg LPS og 50 μM salter av CDCA og en prøve ble kostimulert med 1 μg LPS og 100 μM salter av CDCA (gallesalter ble tilsatt først). Etter stimulering ble prøvene inkubert i 24 timer før cytokininnholdet i kultursupernatanten ble målt ved ELISA metodikk. For hver prøve ble det brukt 1 million U937 celler.



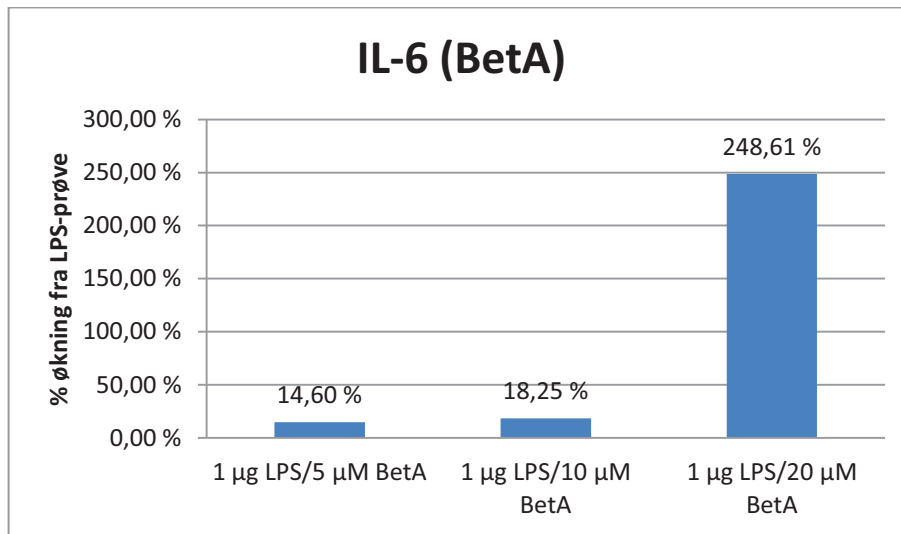
Figur 10: Figuren viser prosentvis økning i IL-8 produksjon i forhold til prøve stimulert med 1 µg LPS. En prøve ble kostimulert med 1 µg LPS og 50 µM salter av DCA og en prøve ble kostimulert med 1 µg LPS og 100 µM salter av DCA (gallesalter ble tilsatt først). Etter stimulering ble prøvene inkubert i 24 timer før cytokininnholdet i kultursupernatanten ble målt ved ELISA metodikk. For hver prøve ble det brukt 1 million U937 celler.

Prøver som kun ble tilsatt gallesalter viste ingen cytokinproduksjon og er derfor utelatt fra figuren.

Resultatene viser en økning i IL-8 produksjonen i forhold til prøve som ble tilsatt 1 µg både for prøven som ble kostimulert med 1 µg LPS og 50 µM CDCA og for prøven som ble kostimulert med 1 µg LPS og 100 µM CDCA. Økningen for prøven med 100 µM CDCA er imidlertid vesentlig større.

Resultatene for DCA viser den samme tendensen som resultatene for CDCA, nemlig at man får en synergistisk effekt på IL-8 produksjon ved kostimulering med gallesaltene og LPS.

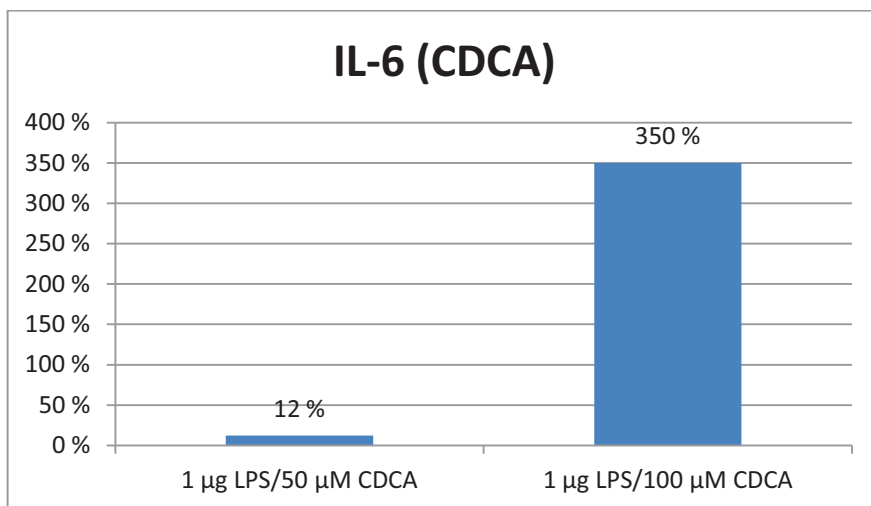
4.8 Effekt på IL-6 produksjon ved kostimulering med betulinsyre/gallesyrer og LPS



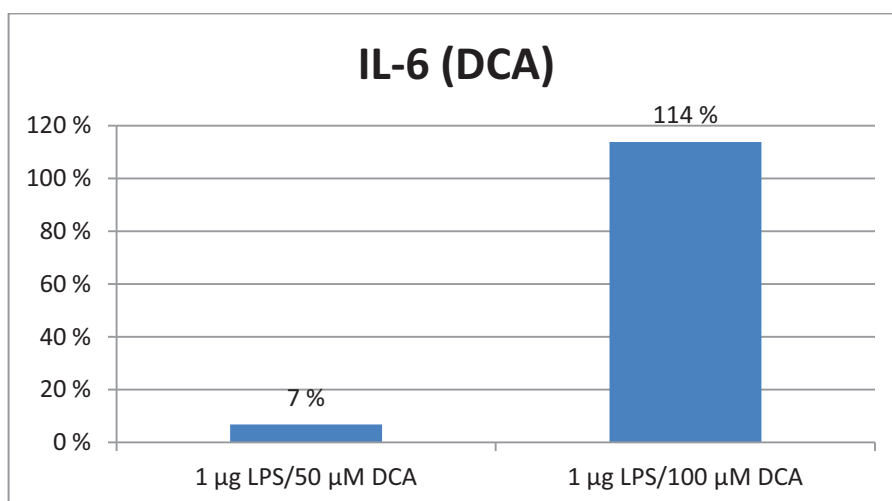
Figur 11: Figuren viser prosentvis økning i IL-6 produksjon i forhold til prøve som ble stimulert med 1 µg LPS. Figuren viser et gjennomsnitt av to forsøk. For hvert forsøk ble fire prøver stimulert med 1 µg LPS. Tre av disse ble kostimulert med henholdsvis 5, 10 og 20 µM betulinsyre (betulinsyre tilsatt først). Prøvene ble etter stimulering inkubert i 24 timer før cytokininnholdet i kultursupernatanten ble målt ved ELISA metodikk. For hver prøve ble det brukt 1 million U937 celler.

Prøver som ble tilsatt kun betulinsyre viste ingen effekt på cytokinproduksjon, og er derfor utelatt fra figuren.

Resultatet viser at prøvene som ble kostimulert med 5 µM betulinsyre og 1 µg LPS og prøvene som ble kostimulert med 10 µM betulinsyre og 1 µg LPS gir en svak økning i IL-6 produksjon i forhold til prøven som ble stimulert med 1 µg LPS. Prøvene som ble kostimulert med 20 µM betulinsyre og 1 µg LPS gir derimot en mye kraftigere økning og man ser en tydelig synergistisk effekt.



Figur 12: Figuren viser prosentvis økning i IL-6 produksjon i forhold til prøve stimulert med 1 µg LPS. En prøve ble kostimulert med 1 µg LPS og 50 µM DCA og en prøve ble kostimulert med 1 µg LPS og 100 µM DCA (gallesalter ble tilsatt først). Etter stimulering ble prøvene inkubert i 24 timer før cytokininnholdet i kultursupernatanten ble målt ved ELISA metodikk. For hver prøve ble det brukt 1 million U937 celler.



Figur 13: Figuren viser prosentvis økning i IL-6 produksjon i forhold til prøve stimulert med 1 µg LPS. En prøve ble kostimulert med 1 µg LPS og 50 µM salter av DCA og en prøve ble kostimulert med 1 µg LPS og 100 µM salter av DCA (gallesalter ble tilsatt først). Etter stimulering ble prøvene inkubert i 24 timer før kjøring av ELISA. For hver prøve ble det brukt 1 million U937 celler.

Prøver som kun ble tilsatt gallesalter viste ingen cytokinproduksjon og er derfor utelatt fra figuren.

Resultatene viser en veldig svak økning i IL-6 produksjonen i forhold til LPS-prøven både for prøven som ble kostimulert med 1 µg LPS og 50 µM salter av CDCA og prøven som ble

kostimulert med 1 μg LPS og 50 μM salter av DCA. Prøvene som ble kostimulert med 1 μg LPS og henholdsvis 100 μM salter av CDCA og DCA viser begge en kraftig økning i IL-6 produksjonen i forhold til LPS-prøven og en tydelig synergistisk effekt. CDCA gir en mye kraftigere produksjon enn DCA.

5 Diskusjon

I denne oppgaven ble det sett på hvorvidt gallesyrer i samspill med LPS kan tenkes å påvirke en inflammatorisk respons i humane monocytter. Etter et måltid vil det være økte nivåer av både LPS og gallesyrer i sirkulasjon. Det har blitt vist en svak systemisk inflammatorisk respons etter et måltid, og at det økte nivået av LPS i blod kan være ansvarlig for dette ved å binde seg til TLR4 på celler tilhørende medfødt immunitet og dermed øke NF- κ B aktivitet og cytokinproduksjon. Ettersom nivået av gallesyrer i blod vil øke sammen med LPS nivået etter et måltid, vil derfor være interessant å se om det økte nivået av gallesyrer kan være med å påvirke denne inflammatoriske responsen.

Forsøkene ble utført i U937 celler, en monocyttcellelinje som er isolert fra en leukemipasient. Monocytter er immunceller som sirkulerer i blodet og som gjennom tidligere studier har vist å uttrykke både TLR4 og gallesyrereseptoren TGR5 (Kawamata et al., 2003; Ichikawa et al., 2012; Sabroe et al., 2002). Monocytter var derfor egnet for å se på effekt av TGR5 stimulering, LPS stimulering og kostimulering.

En hypotese presentert av Gregor og Hotamisligil (2011) kobler inntak av næringsmidler til inflammasjon. Tarmens permeabilitet øker etter inntak av et måltid. Dette skjer muligens for å få et best mulig opptak av næringsmidlene. Gregor og Hotamisligil nevner studier som har vist økte nivåer av LPS i serum etter inntak av et måltid, noe som tyder på at tarmens økte permeabilitet fører til et opptak i blodsirkulasjonen av inflammatoriske molekyler fra tarmens mikroflora sammen med næringsmidlene, og dermed kan koble næringsinntak til inflammasjon. Kelly et al. (2012) viser også i en oversikts-artikkel til kliniske studier gjort på mennesker hvor man har funnet økte nivåer av sirkulerende LPS etter inntak av et energirik måltid. Ved inntak av et måltid vil også konsentrasjonen av gallesyrer øke. Gallesyrene slippes ut i tarmen for å hjelpe til med opptak av lipider. Gallesyrene vil deretter fraktes tilbake til leveren gjennom blodbanen i det som blir betegnet som den enterohepatiske sirkulasjon. Etter et måltid vil dermed konsentrasjonen av både LPS og gallesyrer i plasma øke. Det er derfor ikke utenkelig at gallesyrer kan spille en rolle sammen med LPS i inflammasjonen som oppstår, blant annet ved å aktivere monocytter i blodet. En slik svak inflammasjon vil sannsynligvis ikke være skadelig, ettersom den vil opphøre ved faste. Ved

overspising kan derimot en mer konstant stimulus fra næringsmidler føre til en mer varig inflammasjon og utvikling av metabolsk syndrom (Gregor og Hotamisligil, 2011).

Gregor og Hotamisligil viser blant annet til Aljada et al. (2004) som har utført et forsøk for å se på proinflammatorisk effekt i forhold til inntak av måltid. I forsøket ble 9 normalvektige personer gitt et måltid på 900 kcal, mens 8 personer ble gitt 300 ml vann etter faste over natt. Deretter ble det tatt blodprøver av forsøkspersonene etter 0, 1, 2 og 3 timer. Dataene fra forsøket viser en signifikant forandring i inflammatoriske markører, blant annet ved en nedgang i I κ B α og en økning i NF- κ B binding hos personene som inntok måltidet.

Cani et al., (2008) har vist at et fettrikt måltid kan føre til endringer tarmens i mikrobiota. I forsøk gjort på mus ble det vist at forholdet mellom Gram negative og Gram positive bakterier i tarmen ble forandret i mus som ble gitt fettrik kost, hvor antall Gram positive bakterier økte i forhold til Gram negative bakterier. Etersom LPS er en komponent i yttermembranen hos Gram negative bakterier, kan det tenkes at økningen av Gram negative bakterier i tarmen kan spille en rolle for det økte nivået av LPS i plasma, ved at større konsentrasjoner av LPS dermed tas opp gjennom tarmen i forbindelse med inntak måltid.

Det ble innledningsvis i oppgaven kjørt RT-PCR på U937-cellelinjen for å se om de uttrykte mRNA for gallesyrereseptoren TGR5. Resultatene viste at U937-cellelinjen uttrykker mRNA for TGR5 (se figur 4). Ut ifra søk i litteraturen har ikke uttrykk av TGR5-mRNA blitt undersøkt tidligere. Det har derimot blitt gjort kvantitative analyser ved hjelp av revers transkripsjons-PCR for uttrykk av mRNA for TGR5 i primære monocytter og makrofager i både mennesker og rotter, hvor det ble vist at det er rikelig uttrykt (Kawamata et al., 2003). Ichikawa et al. (2012) har også funnet at TGR5 var uttrykt på monocytter.

Selv om RT-PCR viste at U937-cellelinjen uttrykker mRNA for TGR5, er det ikke nødvendigvis gitt at TGR5 er uttrykt på proteinnivå. ERK1/2-signalveien har vist seg å bli aktivert av mange ulike GPCR, og aktivering av GPCR kan føre til ERK1/2 fosforylering i mange ulike celler. ERK1/2-signalveien kan derfor være egnet som et mål på GPCR aktivering (Sugden and Clerk, 1997; Thogo et al., 2002; Osmond, et al., 2005). Det ble derfor kjørt SDS-PAGE, Western blotting og immunoblotting på cellelysat fra U937-celler med antistoffer mot fosforylert ERK1/2. Cellene ble på forhånd stimulert med 10 μ M betulinsyre, en spesifikk ligand for

TGR5. Hvis det kun hadde blitt stimulert med gallesyrer kunne man ikke vært sikker på at resultatene skyldtes stimulering av TGR5, ettersom gallesyrer også er agonister for andre reseptorer, blant annet kjernereseptoren FXR. Resultatet viste en kraftig økning i fosforyleringen av ERK1/2 etter stimulering med betulinsyre i 2 minutter sammenlignet med ustimulerte celler. Fosforyleringen avtar deretter gradvis etter 5 og 10 minutter, og er omtrent på nivå med de ustimulerte cellene etter 20 minutter (se fig 5 a). Denne økningen i fosforylert ERK1/2 viser at TGR5 også er uttrykt på proteinnivå i U937-cellene og at den har en funksjonell rolle i cellene.

En annen studie har også vist aktivering av ERK1/2 gjennom TGR5, men dette ble gjort i CHO (chinese hamster ovary) celler. I forsøket ble CHO celler med uttrykk av TGR5 og CHO kontrollceller stimulert med 2 μ M av gallesyren TLCA. Stimuleringen gav en rask økning i ERK-aktivitet i CHO-TGR5 cellene, men ikke i kontrollcellene (Kawamata et al., 2003).

Det ble også undersøkt om TGR5 stimulering aktiverte de to andre av de mest studerte MAPK signalveiene, JNK og p38. Det ble kjørt SDS-PAGE, Western blotting og immunoblotting med samme oppsett som for ERK1/2, men med antistoffer mot henholdsvis fosforylert JNK og fosforylert p38. Resultatene viser at begge signalveiene aktiveres. Aktiveringen av JNK følger den samme kinetikken som for ERK1/2, men med et mindre kraftig signal. Prøven som er stimulert i 2 minutter viser en vesentlig økning i JNK-aktivering i forhold til den ustimulerte prøven. Signalet går deretter gradvis ned etter 5, 10 og 20 minutter (se figur 6 a). For aktiveringen av p38 er kinetikken relativt lik den for ERK1/2 og JNK, men det er en kraftigere stimulering etter fem minutter, med en liten nedgang igjen etter 10 minutter. Etter 20 minutter begynner nivået å nærme seg det samme som for den ustimulerte prøven (se figur 7 a).

Yang et al. (2007) har i et forsøk ved bruk av immunoblotting også vist at stimulering av TGR5 aktiverer JNK. Gruppen har i sitt forsøk brukt Huh-BAT celler, som er humane tumorceller fra lever (Fiorucci et al., 2009). Her ble cellene først inkubert med MDL12330A (en adenylyl sykklase inhibitor) eller TGR5 siRNA. siRNA er en kort RNA-sekvens som inhiberer ekspresjon av gener med en komplementær nukleotidsekvens. Deretter ble både kontrollceller og de behandlede cellene stimulert med 200 μ M DCA. Både cellene som ble inkubert med MDL12330A og de som ble transfektert med TGR5 siRNA, viste en kraftig reduksjon i aktiveringen av JNK sammenlignet med kontrollcellene.

Når det gjelder p38 har en studie av Quiao et al. (2001) vist at p38 aktiveres ved stimulering med gallesyren DCA, men sier ingenting om hvilken reseptor som har blitt stimulert. En annen studie viser aktivering av p38 med GPCR-agonistene endothelin-1 og phenylephrine i hjertemuskelceller fra rotte (Clerk et al., 1998). Det har derimot ikke blitt vist aktivering av p38 via TGR5 tidligere.

Resultatene for Western blotting/immunoblotting-eksperimentene i U937-cellelinjen viser altså en aktivering av alle de tre mest studerte MAPK-signalveiene ved stimulering med den selektive TGR5-agonisten betulinsyre.

Det samme eksperimentet ble senere utført med gallesalter for å forsikre at aktiveringen av MAPK signalveiene ikke bare var en effekt av betulinsyre, men at stimulering med gallesyrer ville gi samme effekt. Resultatene viser aktivering av ERK1/2-signalveien både ved stimulering med salter av CDCA og DCA (se figur 5 b og c), og samsvarer dermed med effekten av betulinsyre. Kinetikken er den samme som for stimulering med betulinsyre, med kraftigst aktivering etter 2 minutter. Også JNK og p38 blir aktivert av begge gallesaltene, og den samme kinetikken går igjen her, med kraftigst aktivering etter 2 minutter (se figur 6 b og c, figur 7 b og c). Betulinsyre viser seg å være en kraftigere agonist enn de to gallesyrene. Konsentrasjonen av tilsatt betulinsyre er mye lavere enn for gallesyrene, men aktiveringen av signalveiene blir omtrent like kraftig, eller noe sterkere med betulinsyre.

For å se nærmere på hvorvidt stimulering av TGR5 påvirker LPS-indusert inflammasjon, ble det i oppgaven sett på om TGR5-stimulering hadde en påvirkning på NF- κ B aktiviteten i U937-cellene. NF- κ B er genregulatoriske proteiner som er tilstede i de fleste dyreceller, og spiller en viktig rolle i inflammasjon og immunrespons. Det ble sett på NF- κ B aktivitet ved stimulering med betulinsyre og LPS hver for seg, og ved kostimulering med de to agonistene. U937 cellene er stabilt transfektert med et NF- κ B reporterkonstrukt, og det ble kjørt NF- κ B-luciferase assay. I forsøket ser man en vesentlig økning i NF- κ B-aktiviteten i prøven som ble tilsatt LPS sammenliknet med basalaktiviteten (ustimulert prøve) (se figur 13). Dette stemmer altså godt med litteraturen. LPS aktiverer som kjent Toll-liknende reseptor 4. Gjennom signalveien som blir aktivert ved LPS binding til TLR-4, degraderes I κ B, som igjen fører til en translokering av NF- κ B til cellekjernen hvor den kan indusere genekspressjon.

(Akira et al., 2006) For prøvene som ble tilsatt 10 μ M og 20 μ M betulinsyre er det også en økning i NF- κ B aktiviteten i forhold til basalaktiviteten, men den er vesentlig mindre enn for prøvene med LPS. For prøvene med kostimulering med LPS og betulinsyre ser man en synergistisk effekt ved bruk av 20 μ M betulinsyre.

Ved en inflammatorisk respons vil immunceller typisk skille ut proinflammatoriske cytokiner. Det ble i oppgaven derfor sett på hvilken effekt TGR5-stimulering, LPS-stimulering og kostimulering med disse har på produksjon av inflammatoriske cytokiner i U937-cellen. Det ble kjørt ELISA for å se på dette. Cytokinene som det ble testet for var de to proinflammatoriske cytokinene IL-8 og IL-6. Som med immunoblottingen, ble dette først testet med betulinsyre. Ustimulerte U937-celler gir ingen produksjon av verken IL-8 eller IL-6. Celler som ble stimulert med kun betulinsyre ga heller ingen produksjon av de to cytokinene. Ved stimulering med LPS, ble det derimot en tydelig produksjon av både IL-8 og IL-6. Det er kjent at LPS induserer produksjon av proinflammatoriske cytokiner (Schumann et al., 1994; Gutschmann et al., 2001), så dette var ikke uventet. Prøvene som ble tilsatt 1 μ g LPS er ikke tatt med i noen av figurene i resultatdelen. Cytokinproduksjonen varierte mye mellom de ulike LPS prøvene, noe som kan skyldes at det jobbes i biologiske systemer. Alle LPS-prøvene viste imidlertid en vesentlig økning i cytokinproduksjon i forhold til ustimulert prøve. Når cellene blir kostimulert med betulinsyre og LPS, ser man at dette gir en synergistisk effekt både ved IL-8 (se figur 8) og IL-6 produksjon (se figur 11). Betulinsyre gir ingen effekt i seg selv, men ved kostimulering med LPS, er altså betulinsyre med på å gi en økning i cytokinproduksjonen i forhold til prøven som kun er tilsatt LPS.

ELISA for IL-8 og IL-6 ble også kjørt med salter av gallesyrene DCA og CDCA. Resultatene fra disse kjøringene viser samme tendens som resultatene fra kjøringene med betulinsyre. Cellene som ble stimulert kun med salter av gallesyrer gav ingen cytokinproduksjon, mens LPS gir en vesentlig økning. Kostimulering med LPS og gallesaltene viser en synergistisk effekt (se figur 9, 10, 12 og 13). Det har også blitt vist en synergistisk effekt på cytokinproduksjon ved kostimulering med salter av gallesyrer og LPS i primære monocytter (Kaia Mobråten, personlig meddelelse). Dette viser at effekten ikke var spesifikk for U937-cellelinjen.

Litteraturen beskriver flere forsøk hvor TGR5-stimulering med gallesyrer eller andre TGR5-agonister viser en anti-inflammatorisk effekt. De fleste av disse er derimot gjort i andre celletyper enn monocytter og ofte i celler fra gnagere. Kawamata et al. (2003) har gjort et forsøk i lungemakrofager fra kanin. I dette forsøket ble cellene først inkubert med gallesyre i én time, før de ble tilsatt 1 ng LPS. Cellene ble deretter inkubert i 12 timer. TLCA gav en økning av cAMP-konsentrasjon i makrofagene og en signifikant inhibering av deres fagocytterende effekt. Induksjonen av cytokin mRNA ble kraftig redusert og LPS-indusert TNF α -sekresjon ble redusert. Keitel et al. (2008) har også utført forsøk på gallesyrers effekt på cytokinproduksjon gjennom stimulering av TGR5. Her har man også kommet fram til at stimulering av TGR5 med gallesyrer fører til en nedregulering av LPS-indusert cytokinproduksjon. Forsøket ble gjort i rotter på såkalte Kupffer-celler, som er makrofager i lever. Cellene ble stimulert i én time med 50 μ M av gallesyren TLC, før tilsetning av 1 ng/ml LPS. Dette reduserte den LPS-induserte oppreguleringen av IL-6 med 42 %. Fylogenetiske analyser har vist at TGR5 er ganske ulik i mennesker og gnagere (Thomas et al., 2008). Man kan derfor ikke utelukke at det er forskjeller på hvilke effekter stimulering av TGR5 gir i celler fra gnagere kontra humane celler. Ettersom de to ovennevnte studiene er gjort på makrofager, er også dette med på å gjøre studiene mindre sammenlignbare med resultatene i denne oppgaven. Monocytter, som er brukt i denne oppgaven, er en annen celletype enn makrofager og kan derfor tenkes å respondere annerledes på ekstracellulære signaler. Det ser ut til at kun én studie tidligere har sett på stimulering av TGR5 i humane monocytter. Her har man funnet at stimulering av TGR5 med gallesyrer nedregulerer cytokinproduksjon. THP-1 cellene som ble brukt i denne studien uttrykte imidlertid ikke TGR5 naturlig, men var transfektert med TGR5 cDNA. (Kawamata et al., 2003) Dette gjør at resultatet fra denne studien heller ikke er helt sammenlignbart med resultatene i denne oppgaven, ettersom U937 cellene uttrykker TGR5 naturlig. Fordi TGR5 er transfektert inn i THP-1 cellene kan det tenkes at reseptoren ikke er koblet til de samme intracellulære signalveiene som om den var uttrykt naturlig.

Aktivering av TGR5 og undersøkelser av intracellulære effekter i samspill med LPS har ikke blitt gjort tidligere i dette systemet. Det er derfor vanskelig å si noe sikkert om hvilke mekanismer som resulterer i den synergistiske effekten som påvises i denne oppgaven ved

kostimulering av betulinisyre/gallesyrer og LPS. Det finnes imidlertid flere observasjoner i andre systemer som kan være med på å forklare denne effekten.

Hirano et al. (1996) har vist at MEK kinase, som er en av flere MAPKKK som aktiverer JNK, også kan degradere I κ B og dermed bidra til aktivering av NF- κ B. Dette ble vist i forhold til TNF α -mediert NF- κ B aktivering. Det er ikke utenkelig at aktiveringen av JNK ved TGR5-stimulering også kan bidra til å øke NF- κ B aktiviteten i U937-cellene.

Flere studier har vist at p38 signalveien spiller en rolle i forhold til NF- κ B, og at det ser ut til å være en crosstalk mellom de to signalveiene. Det er imidlertid uenighet når det kommer til mekanismene som er involvert og på hvilket nivå p38 innvirker på NF- κ B. Craig et al. (2000) har i sin studie på hjertemuskelceller fra neonatale rotter vist at aktivering av p38 signalveien kan føre til translokering av NF- κ B til cellekjernen og dermed aktivering av NF- κ B sensitive gener. Resultatene i studien indikerer at MKK6, som er en MAPK i p38 signalveien, kan binde til I κ B kinase IKK β og stimulere den til å fosforylere I κ B og dermed aktivere NF- κ B. I forhold til indusering av IL-6 transkripsjon, viser de at dette er avhengig av NF- κ B transkripsjon, og at aktivering av p38 øker denne transkripsjonen gjennom IKK β . En annen studie i rottehjerter viser også at aktivering av p38 translokerer og aktiverer NF- κ B (Maulik et al., 1998).

Carter et al. (1999) har derimot gjort en studie hvor inhibering av p38 ikke hadde innvirkning på verken NF- κ B binding til DNA eller degradering av I κ B- β . Inhiberingen reduserte imidlertid DNA binding av TFIID (transkripsjonsfaktor II D) til TATA box, som er nødvendig for igangsetting av transkripsjon. Dette tyder på at p38 er med på å regulere NF- κ B-avhengig transkripsjon via denne mekanismen.

Matsuda et al. (2003) viser i sin artikkel til flere studier som har vist at inhibering av p38 nedregulerer NF- κ B avhengig transkripsjon, men at translokering av NF- κ B ikke blir påvirket av p38 inhiberingen.

Selv om mekanismene bak ikke er fullt ut forstått, er det mye som tyder på at p38 signalveien er med på å øke cytokinproduksjon, og muligens også aktivering og translokering av NF- κ B. Dette kan være med på å forklare den synergistiske effekten i NF- κ B aktivitet og cytokinproduksjon som resultatene i denne oppgaven viser.

Kawamata et al. (2003) har gjennomført studier som har vist at TGR5 formidler signaler gjennom G α s, og dermed øker konsentrasjonen av intracellulært cAMP, noe som fører til nedregulering av LPS-indusert cytokinproduksjon i lungemakrofager fra kanin og THP-1 celler transfektert med TGR5.

Gerlo et al. (2011) omtaler i sin artikkel at cAMP har anti-inflammatoriske egenskaper, dels på grunn av cAMP-induserte signalers evne til å forstyrre funksjonen til NF- κ B. Videre i artikkelen viser de derimot til nyere artikler som indikerer at cAMP, via cAMP-avhengig protein kinase A (PKA), faktisk promoterer NF- κ B aktivitet. Deretter nevnes det at dette viser at funksjonen til cAMP i høyeste grad er avhengig av celletype og kontekst. Selv om det skulle vise seg at cAMP konsentrasjonen øker ved TGR5-stimulering i U937-cellene, er det ikke dermed sagt at dette fører til nedregulering av NF- κ B aktivitet, men at det muligens kan øke aktiviteten. Dette kan være med på å forklare den synergistiske effekten som observeres i NF- κ B luciferase-assayet.

Resultatene fra denne oppgaven viser at stimulering av monocytter med gallesyrer i seg selv ikke har noen merkbar proinflammatorisk effekt, men at det forekommer en synergistisk effekt ved kostimulering med LPS og gallesyrer. De molekylærbiologiske mekanismene bak dette funnet er ikke kjent. Men som nevnt innledningsvis vil det etter et måltid være økte nivåer av både gallesyrer og LPS i plasma. Resultatene kan derfor tyde på at gallesyrer er med og bidrar i inflammasjonsresponsen som oppstår etter inntak av et måltid. Et fettrikt og energirikt måltid vil føre til en større utskillelse av gallesyrer enn et mindre energitett måltid. Det er derfor ikke utenkelig at gallesyrer da er med på å bidra, sammen med LPS, til den økte inflammasjonen man ser etter et energirikt måltid kontra et "sunnere" måltid.

Videre arbeid:

For videre arbeid kunne det vært interessant å se nærmere på de tre aktiverte signalveiene, bl.a. ved å stimulere med ulike hemmere, og ved å se på effekten av cAMP-konsentrasjonen etter stimulering av TGR5. Med bedre tid ville det også vært ønskelig å kjøre flere analyser på cytokinproduksjon og NF- κ B aktivitet for å få et bedre statistisk grunnlag. Med tilstrekkelig tid kunne det også blitt kjørt luciferaseassay med stimulering med gallesyrer. På grunn av tidsmangel ble det ikke kjørt NF- κ B-luciferase assay med gallesyrer. Det er ikke usannsynlig at man ville fått en lignende effekt som med betulinsyre, da stimulering

betulinsyre og gallesyrer gir tilnærmet samme effekt både på MAPK signalveiene og på cytokinproduksjon.

6 Referanser

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5. Utg. New York, Garland Sciences. 1601 s.

Aljada, A., Mohanty, P., ghanim, H., Abdo, T., Tripathy, D., Chaudhuri, A. & dandona, P. (2004). Increase in intranuclear nuclear factor κ B and decrease in inhibitor κ B in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for proinflammatory effect. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (4): 682-690.

Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124 (4): 781-801.

Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature*, 2 (8): 675-680

Austena, L. M., Carlsen H., Hollung, K., Blomhoff, H. K. & Blomhoff, R. (2009) Retinoic acid dampens LPS-induced NF- κ B activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF- κ B reporter mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 (9): 726-734.

Carter, A. B., Knudtson, K. L., Monick, M. M. & Hunninghake, G. W. (1999). The p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is Required for NF- κ B-dependent Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 30858-30863.

Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. & Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *American Diabetes Association*, 57 (6): 1470-1481.

Chen, X., Lou, G., Meng, Z. & Huang, W. (2011). TGR5: A Novel Target for Weight Maintenance and Glucose Metabolism. *Experimental Diabetes Research*, 2011: 1-5.
Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M. G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A. & Fiorucci, S. (2011). The Bile Acid Receptor GPBAR-1 (TGR5) Modulates Integrity of Intestinal Barrier and Immune Response to Experimental Colitis. *PLoS ONE*, 6 (10): 1-11.

Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M. G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A. & Fiorucci, S. (2011). The Bile Acid Receptor GPBAR-1 (TGR5) Modulates Integrity of Intestinal Barrier and Immune Response to Experimental Colitis. *PLoS ONE*, 6 (10): e25637.

Clerk, A., Michael, A. & Sugden, P. H. (1998). Stimulation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Neonatal Rat Ventricular Myocytes by the G Protein-coupled Receptor Agonists, Endothelin-1 and Phenylephrine: A Role in Cardiac Myocyte Hypertrophy?. *The Journal of Cell Biology*, 142 (2): 523-535.

- Cowan, K. J. & Storey, K. B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *The Journal of Experimental Biology*, 206 (7): 1107-1115
- Craig, R., Larkin, A., Mingo, A. M., Thuerauf, D. J., Andrews, C., McDonough, P. M. & Glembotski, C. C. (2000). p38 MAPK and NF- κ B Collaborate to Induce Interleukin-6 Gene Expression and Release. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 23814-23824.
- Dentener, M. A., Bazil, V., Von Asmuth, E. J., Ceska M. & Buurman W. A. (1993). Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, 150 (7): 2885-2891.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J. & Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*, 446: 475-482.
- Dickens, M., Rodgers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L. & Davis, R. J. (1997). A Cytoplasmic Inhibitor of the JNK Signal Transduction Pathway. *Science*, 277 (5326): 693-696.
- Ember, J. A., Sanderson, S. D., Hugli, T. E. & Morgan, E. L. (1994). Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. *The American Journal of Pathology*, 144 (2): 393-403.
- Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palladino, G. & Ciriani, S. (2009) Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* , 30 (11): 570-580.
- Genet, C., Strehle, A., Schmidt, C., Boudjelal, G., Lobstein, A., Scoonjans, K., Souchet, M., Auwerx, J., Saladin, R. & Wagner, A. (2010). Structure–Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(1): 178-190.
- Gerlo, S., Kooijman, R., Beck, I. L., Kolmus, K., Spooren, A. & Haegeman, G. (2011). Cyclic AMP: a selective modulator of NF- κ B action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (23): 3823-3841.
- Gregor, M, F. & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *The Annual Review of Immunology*, 29: 415-445.
- Guha, M & Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling*, 13 (2): 85-94.
- Gutsmann, T., Müller, M., Carroll, S. F., MacKenzie, R. C., Wiese, A. & Seydel, U. (2001). Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infection and Immunity*, 69 (11): 6942-6950.

- Hirano, M., Osada, S., Aoki, T., Hirai, S., Hosaka, M., Inoue, J. & Ohno, S. (1996). MEK kinase is involved in tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation and degradation of I κ B- α . *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (22): 13234-13238.
- Hiscott, J., Kwon, H., & Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway, *The Journal of Clinical Investigation*, 107(2): 143-151.
- Houten, S. M., Watanabe, W. & Auwerx, J. (2006). Endocrine functions of bile acids. *The EMBO Journal*, 25: 1419-1425.
- Ichikawa, R., Takayama, T., Yoneno, K., Kamada, N., Kitazume, M. T., Higuchi, H., Matsuoka, K., Watanabe, M., Itoh, H., Kanai, T., Hisamatsu, T. & Hibi, T. (2012). Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology*, 136 (2): 152-162.
- Johnson, G. L. & Lapadat, R. (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science*, 298 (5600): 1911-1912.
- Karin, M. (1999). How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18 (49): 6867-6874.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annual review of Immunology*, 18: 621-663.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y. & Fujino, M. (2003). A G-protein coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 9435-9440.
- Keitel, V., Donner, M., Winandy, S., Kubitz, R. & Häussinger, D. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochemical and Biophysical research Communications*, 372 (1): 78-84.
- Kelly, C. J., Colgan, S. P. & Frank, D. N. (2012). Of Microbes and Meals : The Health Consequences of Dietary Endotoxemia. *Nutrition in Clinical Practice*, 27 (2): 215-225.
- Kishimoto, T. (1989) The Biology of Interleukin-6. *The Journal of The American Society of Hematology*, 74 (1): 1-10.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T. (1995) Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130. *The Journal of The American Society of Hematology*, 86 (4): 1243-1254
- Kroeze, W. K., Sheffler, D. J. & Roth, B. L. (2003). G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of Cell Science*, 116 (24): 4867-4869.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochemical Journal*, 420: 1-16.

Kyriakis, J. M. & Avruch, J. (2001). Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*, 81 (2): 807-869.

Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3. utg. Bergen, Fagbokforlaget. 400 s.

Luster, A. D. (1998). Chemokines – Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 338: 436-445.

Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H & Sugano, S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Oncogene*, 22: 3307-3318

Maulik, N., Sato, M., Price, B. D. & Das, D. K. (1998). An essential role of NF κ B in tyrosine kinase signaling of p38 MAP kinase regulation of myocardial adaptation to ischemia. *FEBS Letters*, 429 (3): 365-369.

Naor, Z., Benard, O. & Seger, R. (2000). Activation of MAPK Cascades by G-protein-coupled Receptors: The Case of Gonadotropin-releasing Hormone Receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11 (3): 91-99.

Nishimoto, N., Terao, K., Mima, T., Nakahara, H., Takagi, N. & Kakehi, T. (2008) Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *The Journal of The American Society of Hematology*, 112 (10): 3959-3964.

O'Neill, L. A. J. & Kaltschmidt, C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20 (6): 252-258.

Osmond, R. I. W., Sheenan, A., Borowicz, R., Barnett, E., Harvey, G., Turner, C., Brown, A., Chrouh, M. F. & Dyer, A. R. (2005) GPCR Screening via ERK 1/2: A Novel Platform. *Journal of Biomolecular Screening*, 10 (7): 730-737.

Quiao, D., Stratagouleas, E. D. & Martinez, J. D. (2001). Activation and role of mitogen-activated protein kinases in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Carcinogenesis*, 22 (1): 35-41.

Rincón, M. & Davis, R. J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunological Reviews*, 228 (1): 212-224.

Roux, P. P & Blenis, J (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2): 320-344.

Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K. B. & Dower, S. K. (2002). Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses. *The Journal of Immunology*, 168 (9): 4701-4710.

Serezani, C. H., Ballinger, M. N., Aronoff, D. M., Peters-Golden, M. (2008). Cyclic AMP: Master Regulator of Innate Immune Cell Function. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 39 (2): 127-132.

Serbina, N. V., Jia, T., Hohl, T. M. & Pamer, E. G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, 26: 421-452.

Schumann, R. R., Rietschel, E. T. & Loppnow, H. (1994). The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Medical Microbiology and Immunology*, 183: 279-297.

Shi, C. & Pamer E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature*, 11: 762-774.

Thogo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J. & Luttrell, L. M. (2002) β -Arrestin Scaffolding of the ERK Cascade Enhances Cytosolic ERK Activity but Inhibits ERK-mediated Transcription following Angiotensin AT1a Receptor Stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 9429-9436.

Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J. & Schoonjans, K. (2008). *Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases*, 7: 678-693.

Tiwari, A. & Maiti, P. (2009). TGR5: an emerging bile acid G-protein-coupled receptor target for the potential treatment of metabolic disorders. *Drug Discovery Today*, 14 (9-10): 523-530.

van Furth, R. (1998). Human monocytes and cytokines. *Research in Immunology*, 149 (7-8): 719-720.

van Furth, R. & Diesselhoff-den Dulk, M. M. C. (1970). The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*, 134 (4): 813-828.

Yang, J. I., Yoon, J., Myung, S. J., Gwak, G., Kim, W., Chung, G. E., Lee, S. H., Lee, S., Kim, C. Y. & Lee, H. (2007). Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361 (1): 156-161.

Yasuda, H., Hirata, S., Inoue, K., Mashima, H., Ohnishi, H. & Yoshida, K. (2007). Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354 (1): 154-159.