

Betydning av lever-X-reseptor (LXR) i skjelettmuskelceller

Studier av RNA-interferens mot LXR β og effekter av LXR-
modulatoren 22(S)-hydroksykolesterol

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Robert Smith

**Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,
Universitetet i Oslo**

Mai 2010

Betydning av lever-X-reseptor (LXR) i skjelettmuskelceller

Studier av RNA-interferens mot LXR β og effekter av LXR-
modulatoren 22(S)-hydroksykolesterol

Robert Smith

Masteroppgave for graden Master i farmasi



**Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,
Universitetet i Oslo**

Mai 2010

Veiledere

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Stipendiat Nina P. Hessvik

Forord

Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i perioden juni 2009 til juni 2010.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan og Nina P. Hessvik for god oppfølging, rådgiving, veiledning og støtte gjennom hele masteroppgaven. Stor takk til veileder Nina P. Hessvik og postdoktor Eili Kase og for å ha besvart små og store spørsmål og for å ha hjulpet meg med arbeidet på cellelaboratoriet. Jeg vil også takke resten av medlemmene av MUSKELBUNTEN for lærerike og interessante møter. Jeg vil gjerne takke hele 4. etasje og medelever for latter og hygge som har bidratt til et trivelig arbeidsmiljø.

Jeg vil takke min familie som hele tiden har støttet og motivert meg.

Jeg vil takke min kjære Karoline for alltid å ha vært der for meg. Takk for korrekturlesing, støtte og all kjærligheten du har gitt meg.

Blindern, mai 2010

Robert Smith

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
Summary in English.....	6
Sammendrag.....	8
Forkortelser	10
1. Innledning.....	12
1.1 Type 2-diabetes.....	12
1.2 Insulinresistens.....	13
1.3 Glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel.....	13
1.3.1 Glukosemetabolisme	14
1.3.2 Fettsyremetabolisme.....	15
1.4 Metabolsk fleksibilitet.....	16
1.4.1 Oljesyre, palmitinsyre og eikosapentaensyre	18
1.5 Lever-X-reseptorene	19
1.5.1 Endogene og syntetiske ligander til LXR.....	20
1.5.2 Rollen til LXR i kolesterolmetabolismen.....	21
1.5.3 Rollen til LXR i lipogenesen	22
1.5.4 Rollen til LXR i glukosemetabolismen.....	22
1.5.5 LXR α og LXR β i skjelettmuskel	23
1.6 Utslokking av LXRβ i skjelettmuskel med RNA-interferens	24
1.7 Mål for oppgaven.....	26
2. Materialer og metoder.....	27
2.1 Materialer.....	27
2.2 Celledyrking.....	28
2.2.1 Humane skjelettmuskelceller.....	28
2.2.2 Skjelettmuskelceller fra mus.....	29
2.3 RNA-interferens mot LXRβ.....	30
2.4 RNA-isolering og analyse av genekspressjon med revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR).....	31
2.4.1 RNA-isolering og kvantifisering	31

2.4.2	cDNA syntese.....	32
2.4.3	Real-time PCR	32
2.5	Substrat-oksidasjonsmetoden	34
2.5.1	Substratoksidasjonsforsøk med fettsyrer og glukose	35
2.5.2	Proteinmåling	35
2.6	Statistiske analyser.....	36
3.	Resultater.....	37
3.1	Effekter av redusert LXRβ-uttrykk.....	37
3.1.1	Utsåing av celler til LXR β -utslokking	37
3.1.2	Effekter av RNA interferens mot LXR β på mRNA-ekspresjonen til LXR β , FAS, SREBP og ABCA1	39
3.1.3	Effekter av RNAi mot LXR β på mRNA-ekspresjonen av ABCA1 og FAS etter forbehandling med T0901317.....	40
3.1.4	Effekter på fettsyremetabolismen hos LXR β -utslokket humane myotuber ved T0901317-forbehandling.....	41
3.1.5	Glukoseopptak og –oksidasjon i skjelettmuskelceller fra LXR β -KO- og WT-mus	43
3.1.6	Opptak og oksidasjon av glukose etter LXR β -utslokking i humane myotuber.....	44
3.2	Effekter av 22(S)-HC på glukosemetabolismen og metabolsk fleksibilitet.....	46
3.2.1	Effekter av 22(S)-HC på insulinstimulert glukosemetabolisme.....	46
3.2.2	Effekter av forbehandling med 22(S)-HC, EPA og EPA+22(S)-HC på fettsyreoksidasjon og –opptak.....	48
3.2.3	Metabolske parametre etter forbehandling med 22(S)-HC, EPA og 22(S)-HC+EPA... ..	50
4.	Diskusjon	52
4.1	Metodologiske betraktninger ved RNAi.....	52
4.2	Effekter av nedsatt LXRβ-ekspresjon	53
4.3	Metabolsk fleksibilitet og effekter av 22(S)-hydrokyskolesterol.....	55
5.	Konklusjon	57
	Kildeliste	58
	Appendiks.....	63

Summary in English

Liver X receptors (LXRs) are ligand-activated transcription factors that belong to the nuclear receptor super family. LXRs are important regulators for cholesterol, lipid and glucose metabolism. LXR exist in two isoforms, LXR α and LXR β , and the endogenous ligands are oxidized derivatives of cholesterol. LXR β is the dominant LXR subtype in mouse skeletal muscle regulating lipogenesis and cholesterol metabolism. We wanted to examine if this also is the case in humane myotubes. To study this, human myotubes were infected with lentivirus containing shRNA against LXR β (RNA interference; RNAi). The mRNA expression of LXR β was reduced by 50-60 % after treatment with two different shRNA sequences. Silencing of LXR β did not affect the mRNA expressions of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), fatty acid synthase (FAS) and sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c). The LXR agonist T0901317 increased the mRNA expression of ABCA1 and FAS. The T0901317-induced increase in mRNA expression of ABCA1 was not reduced in humane myotubes treated with shRNA against LXR β . On the other hand, the T0901317-induced increase in mRNA expression of FAS tended to be reduced after LXR β silencing. This indicates that LXR β plays a role for lipogenesis in human myotubes. The uptake and oxidation of glucose and fatty acids were not affected by LXR β silencing. The reason for the lack of effect of LXR β silencing could be a spare receptor capacity of LXR β or that LXR α influence the results.

In another set of experiments we measured energy metabolism and metabolic parameters in the presence of a gene selective LXR modulator, 22(S)-hydroxycholesterol (22(S)-HC). Metabolic flexibility is the ability to switch from predominantly lipid oxidation during fasting conditions, to suppression of lipid oxidation and increase glucose oxidation in response to insulin after a meal. Loss of this capacity to switch between glucose and lipid oxidation is called metabolic inflexibility and occur frequently together with insulin resistance, type 2 diabetes and obesity. A correlation between *in vitro* metabolic parameters and *in vivo* metabolic flexibility has been described. A previous study has demonstrated that T0901317 counteracts the effects of the fatty acid eicosapentaenoic acid (EPA) on *in vitro* metabolic parameters. We wanted to study the effect of 22(S)-HC alone and in combination with EPA. 22(S)-HC counteracted the actions of EPA on *in vitro* adaptability in the same way as T0901317, while exerting opposite effects of T0901317 on *in vitro* suppressibility,

increasing the suppressibility with 150 %. This may indicate potential beneficial effects on metabolic flexibility *in vivo*.

Sammendrag

Lever-X-reseptorene (LXR) er ligandaktiverte transkripsjonsfaktorer som tilhører kjernereseptorfamilien. LXR er en viktig regulator i kolesterol-, lipid- og glukose-metabolismen. Det finnes to isoformer av LXR, LXR α og LXR β , hvor oksysteroler er uselektive endogene ligander. Det er vist at LXR β spiller en dominant rolle for kolesterol- og lipidmetabolismen i skjelettmuskel hos mus. Det var ønskelig å sjekke om dette også var tilfelle i humane skjelettmuskelceller. Derfor ble humane myotuber infisert med lentivirus med shRNA-sekvens mot LXR β (RNA-interferens; RNAi). Genuttrykket til LXR β ble vellykket redusert med 50-60 % etter behandling med to ulike shRNA-sekvenser mot LXR β . LXR β -utslokkingen med RNAi påvirket ikke mRNA-ekspresjonen til ATP-bindende-kassett-transporter-A1 (ABCA1), fettsyresyntase (FAS) og sterol-regulatorisk-element-bindende protein 1c (SREBP-1c). LXR-agonisten T0901317 økte genuttrykket til ABCA1 og FAS. Den T0901317-induserte økningen i mRNA-ekspresjonen til ABCA1 ble ikke redusert når uttrykket av LXR β ble utsløkket, derimot var det en tendens til at den T0901317-induserte økningen av mRNA-ekspresjonen til FAS ble redusert. Dette kan tyde på at LXR β -isoformen også i humane myotuber kan spille en rolle i lipogenesen. Opptak og oksidasjon av glukose og fettsyrer ble ikke endret ved behandling med RNAi mot LXR β , noe som tyder på at 50-60 % "knockdown" av LXR β ikke er tilstrekkelig for å observere funksjonelle endringer i glukose- og fettsyremetabolismen. Årsaken til dette kan være at det finnes en form for reseptorreservekapasitet ved LXR β reseptoren eller at LXR α interfererer med resultatene.

Metabolsk fleksibilitet er evnen skjelettmuskelen har til å skifte fra fettsyreoksidasjon ved faste til glukoseoksidasjon, samtidig som fettoksidasjonen undertrykkes ved insulinstimulering etter et måltid (postprandial fase). Redusert metabolsk skifte kalles metabolsk infleksibilitet og forekommer ofte sammen med insulinresistens, type 2-diabetes og fedme. Det er vist en sammenheng mellom metabolske parametre *in vitro* og metabolsk fleksibilitet *in vivo*. Tidligere studier har vist at T0901317 motvirker eikosapentaensyrens (EPA) gunstige effekter på *in vitro* parametre. Det var derfor ønskelig å studere om LXR-modulatoren 22(S)-hydroksykolesterol (22(S)-HC) hadde motsatte effekter av T0901317 på EPA. 22(S)-HC motvirket EPAs effekter på *in vitro* adapterbarhet på samme måte som T0901317, men viste motsatte effekter av T0901317 på *in vitro* suppressibilitet hvor det ble

observert en økning på 150 % med og uten EPA. Resultatene kan tyde på en gunstig effekt av 22(S)-HC på metabolsk fleksibilitet.

Forkortelser

22(R)-HC	22(R)-hydroksykolesterol
22(S)-HC	22(S)-hydroksykolesterol
36B4	”Human acidic ribosomal phosphoprotein PO”
ABCA1	ATP-bindende-kassett-transporter-A1
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert
CD36/FAT	Fettsyretransportør
CE	Kolesterolester
cDNA	Komplementært deoksyribonukleinsyre
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Koenzym A
DAG	Diacylglyserol
DMEM	”Dulbecco’s Modified Eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
ECM	Ekstracellulær matriks
EPA	Eikosapentaensyre
FAS	Fettsyresyntase
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
HDL	Høy-tetthets-lipoproteiner
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinresptorsubstrat
KD	”Knockdown”
KO	”Knockout”
LXR	Lever-X-reseptor
LXRE	Lever-X-reseptor-resonselement
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
Non-targeting	Ikke-måltrettet-ShRNA-kontroll-transduksjonspartikler
O ₂	Oksygen
OA	Oljesyre
PA	Palmitinsyre

PBS	Fosfatbufret saltvann
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK-1	Fosfor-3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1
PFK	Fosfofruktokinase-1
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP ₃	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PL	Fosfolipider
PUFA	Flerumettede fettsyrer
pLKO	pLKO.1-puro kontroll transduksjons partikkel
RKT	Revers kolesteroltransport
RQ	Respiratorisk kvotient
RXR	Retionid-X-reseptor
SCD-1	Stearoyl-CoA desaturase-1
SEM	Standardfeil
shRNA	”short hairpin” ribonukleinsyre
siRNA	”short inteference” ribonukleinsyre
SREBP-1c	Sterol-regulatorisk-element-bindende-protein-1c
T0901317	”Tularik”
TAG	Triglyserider, triacylglycerol
T2D	Type 2-diabetes
TRC14	TRCN0000022214 (The RNAi Consortium clone number 0000022214)
TRC15	TRCN0000022214 (The RNAi Consortium clone number 0000022215)
VLDL	Veldig-lavtetthetlipoproteiner
WAT	Hvitt fettvev
WT	Villtype

1. Innledning

1.1 Type 2-diabetes

Tall fra verdens helseorganisasjon viste at det i år 2000 var 171 millioner tilfeller av diabetes på verdensbasis. Diabetes er en voksende metabolsk sykdom hvor det er beregnet at tilfellene skal mer enn fordoble seg i en 30-års periode [1]. Diabetes deles hovedsakelig inn i to typer, type 1 og type 2, hvor type 2-diabetes (T2D) dominerer og utgjør rundt 90 % av tilfellene [2]. Etiologien bak sykdommen er fortsatt delvis uklar, men det er vist at ulike gener og miljøpåvirkninger påvirker sykdomsforløpet og risikoen for T2D [3-6]. T2D kan debutere i alle aldre og er forbundet med utilstrekkelig insulinproduksjon og insulinresistens. Forhøyede nivåer av fastende blodglukose er karakteristisk. Hyperglykemien oppstår når insulin får reduserte effekter i lever, muskel og fettvev. Dette fører blant annet til lave HDL-, høye VLDL- og triglyseridnivåer i blodet. Andre komorbiditeter som ofte oppstår sammen med T2D er høyt blodtrykk og visceral fedme. Det er forbundet diverse komplikasjoner ved T2D hvor de vanligste er makrovaskulære som hjerte-kar sykdom, perifer vaskulær sykdom og slag. Det er vist en 2-4 ganger økt risiko for kardiovaskulære hendelser hos diabetikere i forhold til ikke-diabetikere [7]. I tillegg fører T2D med seg mikrovaskulære komplikasjoner som mikroangiopati i øyne, nyrer og nerver [8]. Det er vist at gener som uttrykker peroksisom-proliferator-aktivert-reseptor- γ (PPAR γ), glykogen syntase (GS), insulinreseptorsubstrat 1 (IRS-1), glukosetransportør 1 (GLUT 1), transkripsjonsfaktor 7- like 2 (TCFL2) og koaktivator 1 alpha (PGC1 α) er viktige for sykdomsutviklingen av T2D. Studier har antydnet at mutasjoner og polymorfisme i disse genene kan være årsaken til den forhøyede sykdomsrisikoen [3-5]. Det finnes legemidler mot T2D, men viktige faktorer i behandlingen er omlegging av kostholdet, økt fysisk aktivitet, vektreduksjon og røykestopp. Legemidler som brukes mot T2D er perorale antidiabetika, inkretinmimetika og insulin. De perorale antidiabetika virker på ulike mål med hensikt å øke insulinutskillelsen fra pankreas (sulfonureaderivater og glinider), øke insulinfølsomheten i muskel, fettvev og lever (glitazoner) og hemme/forsinke opptak av glukose i tarm (α -glukosidasehemmere). Injeksjonspreparater på markedet mot alvorligere T2D virker ved å øke insulinutskillelse fra pankreas (inkretinmimetikum) og substituere insulin (insulin og insulinanaloger) [9].

1.2 Insulinresistens

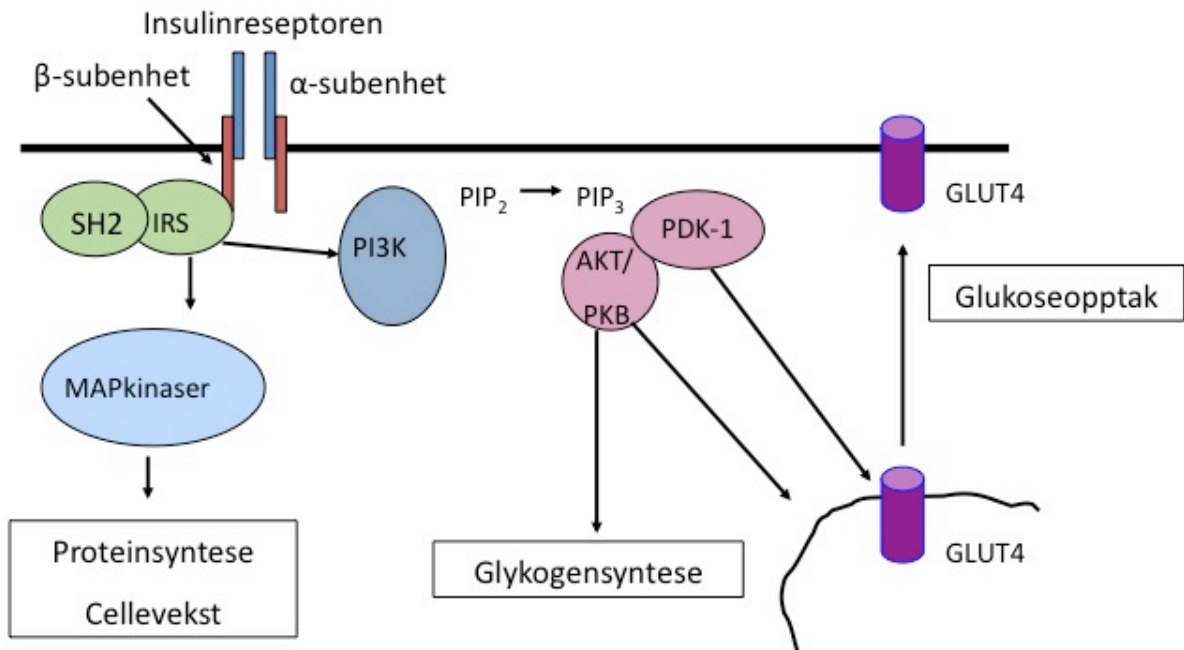
Insulinresistens er når den biologiske responsen på insulin, insulinfølsomheten, i muskel, fett og lever reduseres. β -cellene i pankreas kompenserer for den reduserte insulinresponsen ved å øke insulinproduksjonen og –utskillelsen [10]. Dette medfører til økt insulinkonsentrasjon i plasma, hyperinsulinemi, og kan sees hos pasienter med både normo- og hyperglykemi. I fettvev skjer endringer som økt lipolyse, økt visceral fedme, økt celledørrelse og forandringer i produksjonen av adipokiner [11]. Økte triglyseridnivåer i blodet som et resultat av blant annet økt lipolyse, fører til lipotoksitet av β -cellene i pankreas. β -cellene vil etter hvert destrueres slik at insulinutskillelsen svekkes og T2D oppstår. Hos pasienter med insulinresistens er det ofte observert høyt fettinnholdet i leveren. Browning et al. viste at insulinfølsomheten ble bedret ved å redusere fettinnholdet i leveren [12]. Nedsatt insulinfølsomhet i muskelvev fører til redusert opptak og oksidasjon av glukose, redusert glykogensyntese, redusert lipidoksidasjon, økte lipidnivåer av triglyserider (TAG), diacylglyserol (DAG), acyl-Coenzym A (acyl-CoA) og ceramider [13, 14]. Dette kan føre til insulinresistens. Det er i tillegg observert mitrokondriell dysfunksjon og forandringer i gener involvert i oksidativ fosforylering i muskel ved insulinresistens [15]. Den økte konsentrasjonen av fettsyrer kan redusere fosforyleringen av insulinreseptorsubstrater (IRS) og hemme aktiviteten av fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) som medfører redusert opptak og oksidasjon av glukose [13]. Fortsatt er samspillet mellom de molekylære mekanismen ikke fullt kartlagt og forstått.

1.3 Glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskulaturen utgjør rundt 40 % av den totale kroppsvekten og er i tillegg til lever og fettvev et av de viktigste organene i glukose- og fettsyremetabolismen. Skjelettmuskel står for omtrent 30 % av kroppens totale energiforbruk ved hvile og dette øker ved fysisk aktivitet [16]. Karakteristisk for muskelen er dens evne til å bytte mellom forbrenningen av glukose etter et måltid til lipider ved fastende tilstand, og visa verca. Denne adapterbarheten kalles metabolsk fleksibilitet og er viktig for å opprettholde lipid- og glukosehomeostasen [17, 18].

1.3.1 Glukosemetabolisme

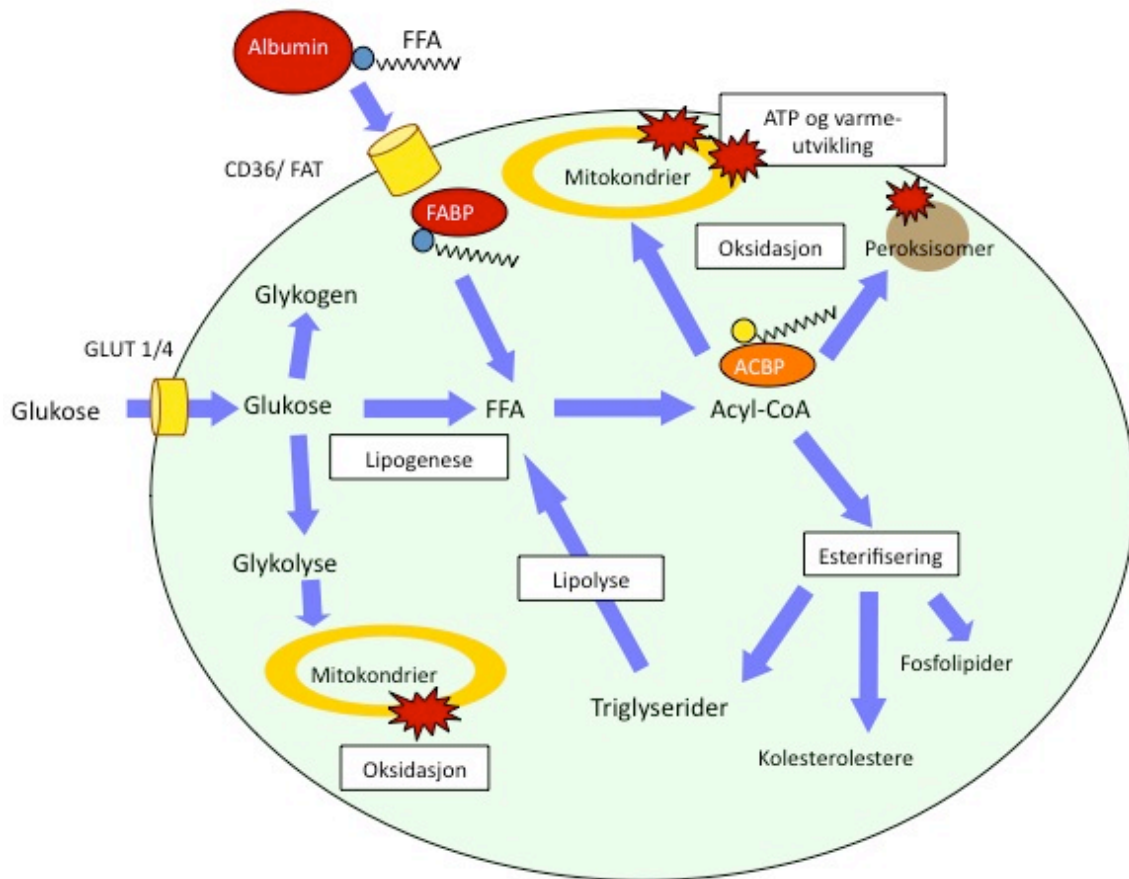
Glukose tas opp i cellene via glukosetransportørene GLUT-1 eller GLUT-4. GLUT-1 står for basalopptaket av glukose og er uavhengig av insulinstimulering. Insulin regulerer derimot GLUT-4 transportøren i insulinfølsomme vev som skjelettmuskel og fettvev [19]. Perifert insulinstimulert glukoseopptak foregår hovedsakelig i skjelettmuskulatur [19-21], hvor insulin stimulerer til økt glukoseopptak, glykolyse og glykogenese i skjelettmuskel (figur 1.1). Insulinreseptoren (IR) tilhører reseptor-tyrosinkinase-familien (RTK) og er et glykoproteinkompleks bestående av to α - og to β -subenheter. α -subenhetene er lokalisert ekstracellulært, mens β -subenhetene med sine tyrosinkinase aktiviteter går igjennom membranen. Aktivisering av reseptoren vil sette i gang en kaskade som blant annet fører til translokasjon av GLUT-4 til cellemembranen (figur 1.1) [19]. Først vil β -subenheten fosforylere insulinreseptorsubstratene (IRS). Fosforylert IRS vil interagere med Src homolog 2 (SH2) domene og videre aktivere PI3K [13]. Aktivert PI3K vil videre aktivere nedstrøms proteiner som fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP₃), fosforylert 3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1 (PDK-1) og proteinkinase B (AKT/PKB) [13, 19]. Dette resulterer i at glukosetransporterene, GLUT-4, translokeres fra Golgiapparatet til cellemembranen. I cytosol blir glukose omdannet av heksokinase til glukose-6-fosfat, som enten kan gå inn i glykolysen eller glykogensyntesen. I glykolysen vil glukose-6-fosfat gjennomgå flere enzymatiske reaksjoner og ende opp som acetyl-CoA [22]. Acetyl-CoA kan deretter oksideres videre i Krebszyklus eller esterifiseres i cytosol til triglyserider, fosfolipider (PL) eller kolesterolistere (CE).



Figur 1.1: En forenklet oversikt over insulinreseptoren og dens nedstrømsproteiner. SH2, Src homologi 2; IRS, Insulinreseptorsubstrat; PI3K, fosfatidylinositol 3'kinase; PIP₂, fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat; PIP₃, fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat; PDK-1, fosfor-3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1; AKT/ PKB, protein-kinase-B; GLUT 4, glukosetransportør. Modifisert fra [13].

1.3.2 Fettsyremetabolisme

FFA blir tatt opp i muskelcellene via fettsyre-transportørene i plasmamembranen (CD36/FAT) eller via diffusjon som for øvrig er avhengig av molekylstørrelsen (figur 1.2). I cytosol blir fettsyrene transportert intracellulært ved hjelp av fettsyrebindende proteiner (FABP) og omdannet til acyl-CoA av acyl-CoA-syntase [22]. Acyl-Coa blir videre transportert via acyl-CoA-bindende-protein (ACBP) til mitokondriene eller peroksisomene hvor de gjennomgår oksidasjon som resulterer i ATP produksjon eller varmeutvikling. Før acyl-CoA kan transporteres inn i mitokondriene må det skje flere enzymatiske reaksjoner [22]. På den cytosoliske siden av mitokondriene blir acyl-CoA omdannet av karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1) til acyl-karnitin som deretter blir transportert inn i mitokondriens matriks via karnitintransportører [22]. I matriks omdannes acyl-karnitin tilbake til acyl-CoA [23]. Acyl-CoA blir her oksidert videre til acetyl-CoA (β -oksidasjon) som deretter oksideres videre i krebssyklus. Acyl-CoA kan også reforestres i endoplasmatisk retikulum til nye lipider som fosfolipider, triglyserider og ulike kolesterolistere.



Figur 1.2: Glukose- og fettsyremetabolisme i humane myotuber. FABP, fettsyrebindende protein; ACBP, acyl-CoA bindende protein; Glut, glukosetransportør; CD36/FAT, fettsyretransportør. Modifisert fra [24].

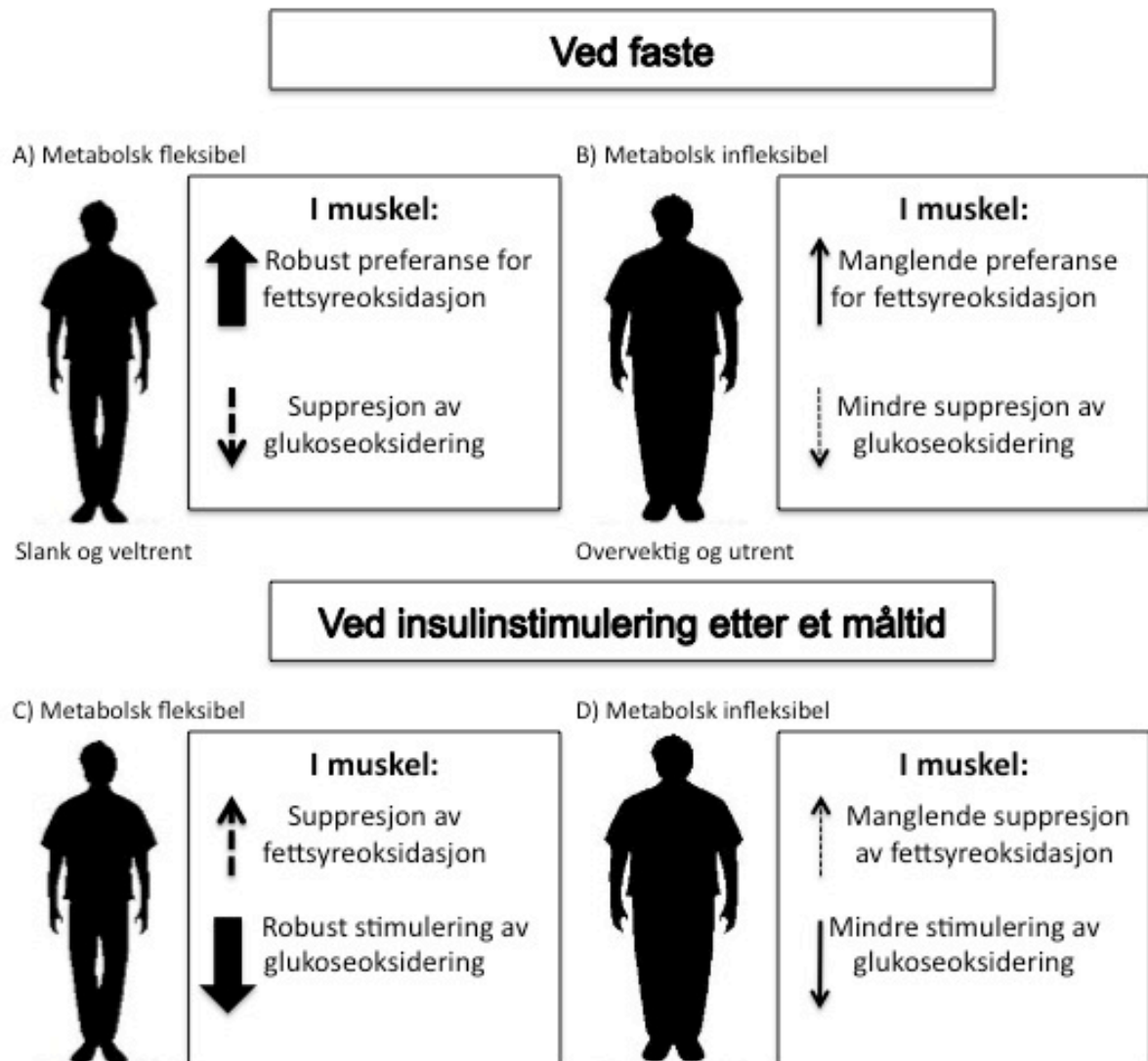
1.4 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet er evnen skjelettmuskelen har til å bytte fra fettsyreoksidasjon ved faste til glukoseoksidasjon, samtidig som fettoksidasjonen undertrykkes ved insulinstimulering etter et måltid (postprandial fase) (figur 1.3). Det er vist i studier at personer med T2D, insulinresistens og fedme ofte har redusert metabolsk fleksibilitet, altså metabolsk infleksible [25-28]. Et viktig verktøy for beregning av metabolsk fleksibilitet *in vivo* er respiratorisk kvotient (RQ). Respiratorisk kvotient reflekterer hvilken energikilde som forbrennes og er forholdet mellom produsert CO_2 på forbrukt O_2 (CO_2/O_2). Forholdet er tilnærmet 1 når kun glukose forbrennes, og lavere når lipider forbrennes. Det er vist at høy RQ og lav fettsyreoksidasjon ved fastende forhold er et forvarsel for vektøkning [29, 30]. Dette kan tyde på en sammenheng mellom tidlige defekter i fettsyreoksidasjonen og utviklingen av T2D og fedme.

Glukose-fettsyre-syklusen har tidligere beskrevet av Randle et al. og beskriver fettsyrenes inhibitoriske effekt på glukosemetabolismen [31]. Økt fettsyrekonsentrasjon vil hemme flere nøkkelenzymer i glukosemetabolismen. Langkjedede fettsyrer blir tatt opp i mitokondriene i cellen, hvor de oksideres til acetyl-CoA. Dette fører til økt mitokondriell ratio av $[\text{acetyl-CoA}]/[\text{CoA}]$ og $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ [32]. Disse økte ratioene har vist å hemme aktiviteten av pyruvatdehydrogenase (PDH), som er et viktig enzym for acetyl-CoA-syntesen i glykolysen. Ratioforandringene fører i tillegg til akkumulering av citrat i cytosol som har inhibitorisk effekt på fosfofruktokinase-1 (PFK-1) og heksokinase [32, 33].

Økte glukosenivåer intracellulært har også en hemmende effekt på fettsyremetabolismen. Oksidasjonen av glukose fører til økte malonyl-CoA konsentrasjoner i cytosol. Dette resulterer i hemming av karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1) som kontrollerer opptaket av fettsyrer i mitokondriene (fettsyremetabolisme 1.3.2.) [32]. Denne hemmingen favoriserer reesterifiseringen av fettsyrer til fosfolipider, kolesterolistere og triglyserider som kan resulterer i lipidakkumulering i cellen [32].

Metabolsk fleksibilitet uttrykkes *in vitro* med begrepene suppressibilitet, adapterbarhet og substratregulert fleksibilitet [27, 34]. Suppressibilitet forteller noe om hvordan glukose undertrykker fettsyreoksidasjonen. I en studie ble det vist at suppressibiliteten var inverst korrelert med insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet *in vivo* og positivt korrelert med kroppsfett og fastende nivåer av FFA [27]. Adapterbarheten er forholdet til fettsyreoksidasjonen ved høye og lave fettsyrekonsentrasjoner og betegner evnen cellene har til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt tilgjengelighet av fettsyrer. Det ble vist at adapterbarhet *in vitro* var positivt korrelert med insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet *in vivo* [27]. Substratregulert fleksibilitet uttrykker muskelcellenes evne til å økt fettsyreoksidasjon ved skifte fra tilstanden etter et måltid (lav fettsyrekonsentrasjon, høy glukosekonsentrasjon) til fastende forhold (høy fettsyrekonsentrasjon, ingen/lite glukose) [34].



Figur 1.3: Skjematisk oversikt over metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel.

I slanke og veltrente individer (metabolsk fleksible) vil det ved faste være en robust preferanse for fettsyreoksidasjon samtidig som glukoseoksidasjonen undertrykkes (A), mens for metabolske infleksible individer er det manglende preferanse for fettsyreoksidasjon og mindre suppresjon av glukoseoksidering (B). Ved insulinstimulering etter et måltid vil metabolske fleksible individer ha en robust stimulering av insulin slik at glukoseoksidasjon fremfor fettsyreoksidasjon (C), mens det hos metabolske infleksible vil være redusert skifte (D). Dette fører til dårligere utnyttelse av energikildene hos metabolske infleksible enn metabolsk fleksible. Modifisert fra [25].

1.4.1 Oljesyre, palmitinsyre og eikosapentaensyre

Økte mengder av fettsyrer og TAG i skjelettmuskel spiller en viktig rolle i utviklingen av insulinresistens og er forbundet med en økning av intramyocellulære lipider [17, 35-37]. Hvilken type og mengde fettsyre har stor betydning for denne utviklingen [37]. Det er vist at

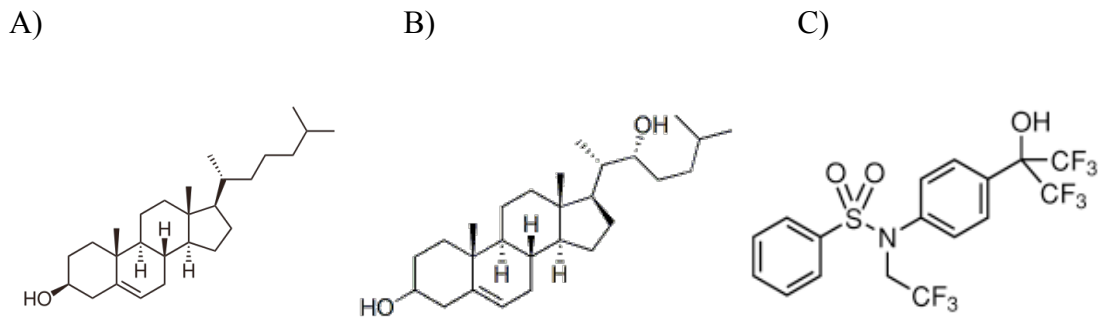
mettede fettsyrer som palmitinsyre (PA) fører til ugunstige endringer i oksidativ forbrenning og insulinfølsomheten i skjelettmuskel [37-39]. Forbehandling med palmitinsyre (16:0) ga ugunstige effekter i humane myotuber ved å øke opptaket og redusere oksidasjonen av oljesyre (OA) [24]. OA (18:1 n-9) er en enumettet fettsyre som også gir økt akkumulering av intracellulære lipider [24]. I motsetning til oljesyre og palmitinsyre har den flerumettede fettsyren eikosapentaensyre (EPA) (20:5 n-3) i dietter med høyt fettinnhold vist å hindre utviklingen av insulinresistens [37, 40, 41]. Dette skjedde selv om EPA øker TAG-akkumuleringen [37, 42]. Hessvik et al. har studert differensierte myotuber og vist at EPA per se akkumulerte mindre intracellulært enn OA og PA [34], men økte også celleassosiert radioaktivitet av OA enn forbehandling med OA og PA. EPA økte *in vitro* parametere adapterbarhet, suppressibilitet og substratregulert fleksibilitet som tyder på gunstige effekter på metabolsk fleksibilitet [34]. Mekanismen bak de gunstige effektene av EPA og flerumettede fettsyrer (PUFA) er fortsatt uklar, men trolig spiller regulering av acyl-CoA, DAG, TAG, lipidlagring, lipidoksidasjon og insulinsignalisering en viktig rolle [37].

1.5 Lever-X-reseptorene

Lever-X-reseptorene (LXR) er en del av kjernereseptorfamilien [43] og er en ligandaktivert transkripsjonsfaktor. Reseptoren ble oppdaget i leveren hvor ekspresjonen er høy og fikk derfor dette navnet. Det finnes to isoformer av LXR, LXR α og LXR β . De to isoformene har høy likhet i aminosyresekvensen. Det er vist 78 % likhet i DNA- og ligandbindende sete [44]. LXR α er mest uttrykt i lever, fettvev, makrofager, nyrer, skjelettmuskel og tynntarm [45-48]. I motsetning til LXR α , er LXR β uttrykt rundt om i hele kroppen. LXR vil ved aktivering forme en heterodimer med retinoid-X-reseptor (RXR). Komplekset LXR-RXR vil binde til lever-X-responselement (LXRE) i promotoren til målgenet. LXRE er karakterisert ved at DNA-sekvensen består av 2 ganger med de samme 6 baseparene, AGG TCA, hvor fire basepar skiller dem [47]. LXR regulerer et antall gener involvert i immunresponsen, kolesterol-, lipid- og glukosemetabolismen. LXR kan aktivere transkripsjon av gener selv uten ligand.

1.5.1 Endogene og syntetiske ligander til LXR

Oksysteroler er endogene ligander til LXR og er oksidert kolesterol som dannes ved høye kolesterolkonsentrasjoner i kroppen. De vanligste oksysterolene som aktiverer LXR er 22(R)-hydroksykolesterol, 20(S)-hydroksykolesterol og 24(S)-epoksykolesterol [43, 49, 50]. 22(R)-hydroksykolesterol og 20(S)-hydroksykolesterol er intermediater i steroidsyntesen og har begge like stor affinitet til LXR. T0901317 er en syntetisk ikke-steroid agonist til LXR [51] (figur 1.4). Agonisten hemmer utviklingen av aterosklerose og øker HDL i plasma på henholdsvis LDL-reseptor-KO- og C57BL/6- mus [51, 52]. I tillegg til gunstige effekter på kolesterolmetabolismen har T0901317 vist å redusere plasmaglukose i diabetiske dyremodeller [53, 54]. Observerte bivirkninger av T0901317 er økt lipogenese, triglyserider i plasma og fettakkumulering i leveren [51]. I humane muskelceller fører T0901317 til oppregulering av gener i lipidmetabolismen som styres av LXR (figur 1.5) [55, 56]. Den syntetiske isomeren 22(S)-hydroksykolesterol er en LXR-modulator som i noen situasjoner oppfører seg som en LXR-antagonist. 22(S)-HC og 22(R)-HC har vist å ha samme affinitet til LXRE [57], men på grunn av sterisk hindring kunne ikke 22(S)-HC forme interaksjon med proteinene H421 og W443 på samme måte som 22(R)-HC. H421- og W443-interaksjoner er viktige for å danne komplekser som kan transkriperer gener [57]. 22(S)-HC har vist å redusere syntesen av lipider som DAG og undertrykke viktige gener involvert i lipogenesen [58].



Figur 1.4: Strukturen til kolesterol (A), 22(S)-HC (B) og T0901317 (C). Kolesterol's kjemiske struktur (A) karakteriseres av steroidkjelettet. *De novo* syntesen av kolesterol foregår i leveren hvor forløperen til kolesterol er acetyl-CoA [22]. β -hydrokxy- β -metylglutaryl-CoA (HMG-CoA) er et mellomprodukt og blir dannet fra acetyl-CoA etter mange enzymatiske trinn. Enzymet, HMG-CoA reduktase som stimuleres av insulin, omdanner HMG-CoA til mevalonat, hvor mevalonat inngår i flere enzymatiske reaksjoner til produktet kolesterol [22]. Fra kolesterol dannes diverse produkter som blant annet kortikosteroider og oksysteroler som 22(R)-HC. Enantiomeren til 22(R)-HC, 22(S)-HC (B), må lages syntetisk og deler flere fellestrekk med kolesterol. LXR-agonisten T0901317 (C) har også noen likheter med kolesterol.

1.5.2 Rollen til LXR i kolesterolmetabolismen

LXR fungerer som en sensor for kolesterolnivåer og er viktig i kolesterolmetabolismen. Oksysterolene vil ved binding til det aktive setet i LXR-reseptoren sette i gang prosesser som fjerner kolesterol fra kroppen. Prosessene som blir regulert er både transport, sekresjon, absorpsjon og biosyntese av kolesterol.

I leveren er produksjon og sekresjon av galle hovedveien for eliminasjon av kolesterol fra kroppen. Leverenzymet cytochrom-P450 kolesterol 7α -hydroxylase (CYP7A1) er det hastighetsbestemmende enzymet i syntesen av gallesyre [59]. I gnagere er det vist at LXR α stimulerer ekspresjonen av CYP7A1 [60, 61]. Det er vist at LXR α -”knockout”-mus (LXR α -KO-mus) fikk akkumulering av kolesterol og kolesterolestere i leveren som førte til hepatisk fettakkumulering [60, 61]. Mens LXR α -KO fikk akkumulering av kolesterol i blodet og lever, fikk ikke LXR β -KO-mus på kolesteroldiett de samme virkningene og viste ikke noen forskjell fra villtype-mus [61]. Det er også vist at LXR regulerer gallesyrekatabolismen. Barbier et al. viste at ligandaktivert LXR α oppregulerte genekspressjon av UGT1A3 gjennom binding til LXRE-lignende sekvenser i UGT1A3-promotoren [62]. Enzymet UGT1A3 er et av de viktigste enzymene i glukuronidering. Basert på disse observasjonene er det tenkt at LXR α øker eliminasjonen av gallesyre og kolesterol

gjennom nyrene [62]. Den reverse kolesteroltransporten (RKT) fører perifert kolesterol tilbake til leveren, hvor det foregår eliminasjon i form av gallsyre. LXR regulerer ekspresjon av en rekke gener involvert i RKT, som ABCA1, ABCG1, CETP, apolipoprotein E (apo E) og PLTP (figur 1.5). ABCA1 er uttrykt i den basolaterale membranen til enterocytter, hepatocytter og makrofager. Funksjonen til ABCA1 er å mediere transporten av fosfolipider og kolesterol til lipidfattige apolipoprotein som for eksempel apo-A1. Apo-A1 stabiliserer HDL og er det første trinnet i den reverse kolesteroltransporten. Det er vist at overuttrykk av ABCA1 i leveren førte til økt HDL-kolesterol nivåer [63, 64]. Det er videre gjort studier med mus som viste at hepatisk ABCA1 er ansvarlig for 80 % nydannelse av HDL [65]. Det er vist i ABCA1-KO-mus at kolesterol akkumulerte i makrofagrike vev som lunger, milt, lymfeknuter, thymus og hud [66, 67]. LXR-aktivering kan redusere akkumuleringen av kolesterol i makrofager og dermed hindre dannelsen av skumceller i arterieveggen og arteriosklerose [68].

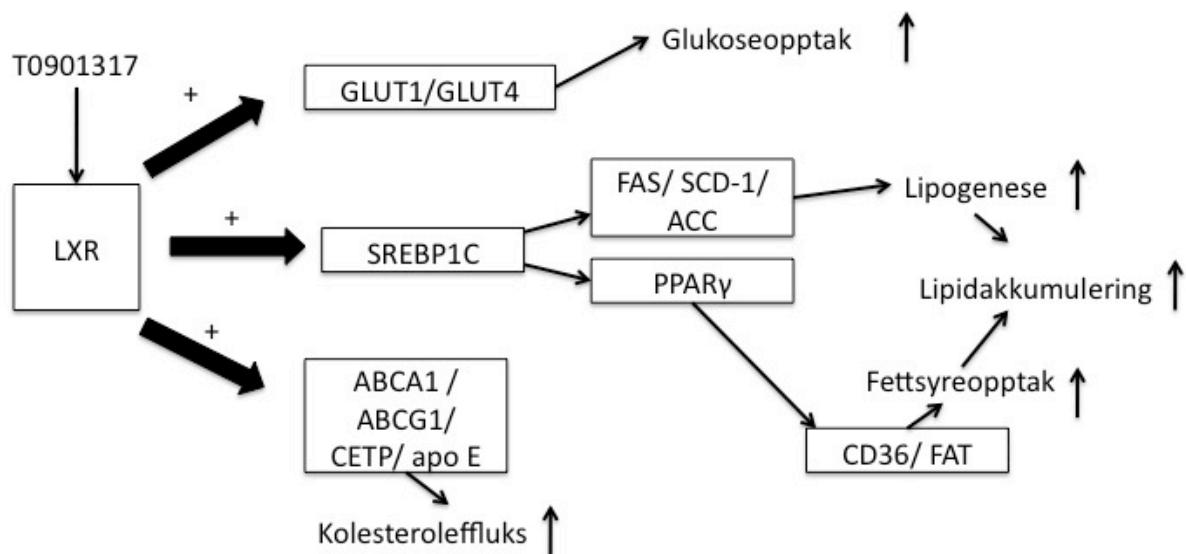
1.5.3 Rollen til LXR i lipogenesisen

LXR spiller en sentral rolle i fettsyremetabolismen og det er vist at reseptorene regulerer hepatisk biosyntese av fettsyrer. Prosessen foregår ved at aktivert LXR induserer genuttrykket til sterol-regulatorisk-element-bindende-protein-1c (SREBP-1c). SREBP-1c regulerer sentrale gener involvert i lipogenesisen som acetyl-CoA karboksylase (ACC), fettsyresyntase (FAS) og steroyl-CoA desaturase (SCD) (figur 1.5). LXR α -KO-mus har nedsatt hepatisk ekspresjon av SREBP-1c, FAS og SCD-1 [60]. I motsetning til LXR α -KO-mus, ble det derimot ikke observert endringer i hepatisk ekspresjon av SREBP-1c, FAS og SCD-1 hos LXR β -KO-mus [61, 69]. Dette tyder på at LXR α regulerer lipogenesisen i leveren. Studier med den uselektive LXR-agonisten T0901317 viste økt lipidakkumulering i lever og skjelettmuskel [51, 60, 70].

1.5.4 Rollen til LXR i glukosemetabolismen

Stulnig et al. viste at flere enzymer i glukoneogenesisen, som fosfenolpyruvate-karboksykinase, fruktose-1,6-bisfosfatase og glukose-6-fosfatase, var nedregulert ved LXR aktivering. Effekten ble observert i leveren i villtypemus, men ikke i LXR α / β -KO-mus [71].

Cao et al. har sett på db/db mus og rotter på høy fett diett ved behandling med T0901317. Det viste seg at hepatisk glukoseutskillelse var redusert i T0901317-behandlede mus og rotter [53]. I primærkulturer med humane myotuber var glukoseopptak og -oksidasjon økt ved behandling med T0901317 [70]. Samtidig viste Kase et al. at mRNA-ekspressjonen av GLUT 1, GLUT 4, UCP 2 og UCP 3 økte med T0901317-behandling i celler fra donorer fra friske kontrollere og type-2-diabetikere (figur 1.5) [70].



Figur 1.5: Sjematisk fremstilling av gener LXR regulerer i kolesterol-, lipid- og glukosemetabolismen hos mennesker. LXR-agonisten T0901317 binder seg til LXR og øker transkripsjonen av gener LXR regulerer som GLUT1/4, SREBP-1c og ABCA1. GLUT1/4, glukosetransportør 1/4; SREBP-1c, sterol-regulerende-element-bindende-protein-1c; PPAR γ , peroksisom-proliferator-aktivert-reseptor- γ ; CD36/ FAT, fetttsyretransportør; FAS, fetttsyresyntase; SCD-1, stearyl-CoA desaturase-1; ABCA1/G1, ATP-bindende-kassett-transporter A1/G1; CETP, kolesterol-ester-transfer-protein; apo E, apolipoprotein E; ACC, acetyl-CoA karboksylase. Modifisert fra [72].

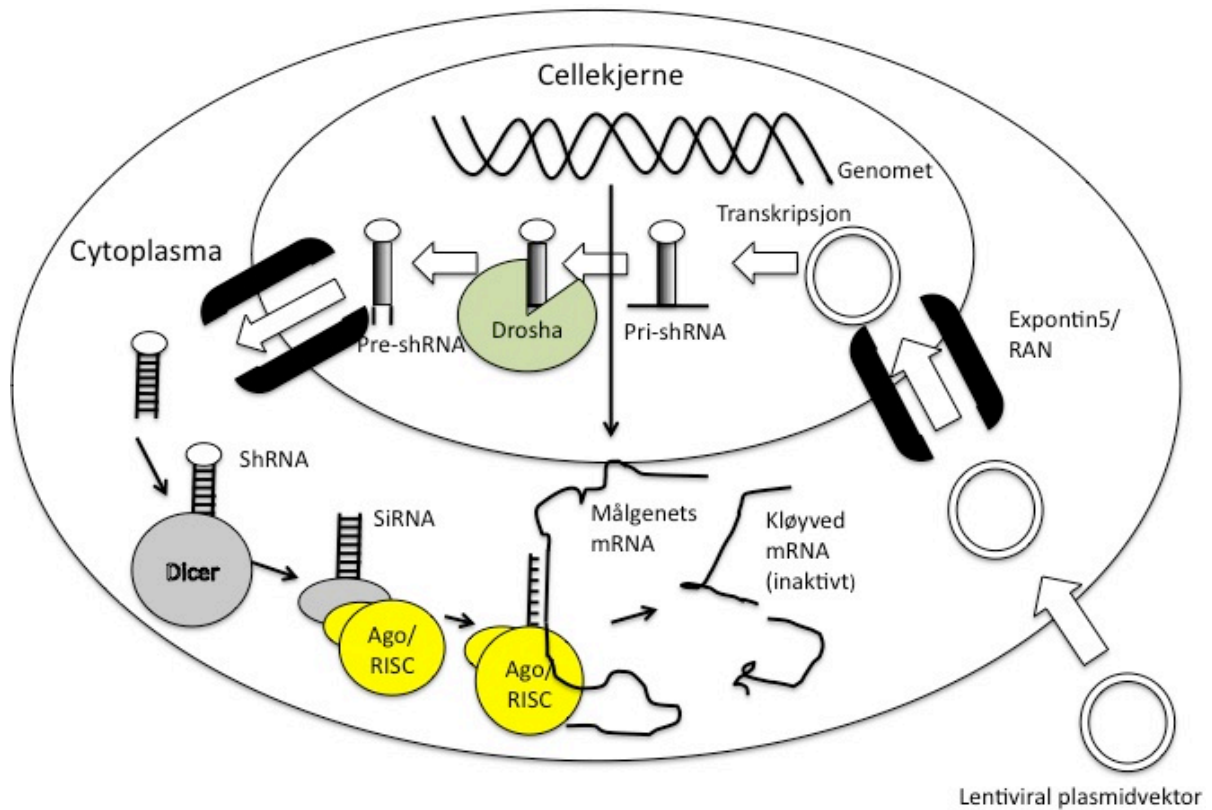
1.5.5 LXR α og LXR β i skjelettmuskel

I skjelettmuskelceller uttrykkes begge isoformene av LXR. Kase et al. viste at LXR var uttrykt tidlig i differensieringsperioden og ekspressjonen av genene økte opptil skjelettmuskelcellene var differensierte myotuber [58]. I tillegg har Hessvik et al. vist at LXR β var den dominante isoformen i regulering av lipogenesen og den reverse kolesteroltransporten i skjelettmuskelceller [73].

1.6 Utslokking av LXR β i skjelettmuskel med RNA-interferens

Biologer har i flere tiår vært kjent med RNA-interferens (RNAi) selv om mekanismen inntil nylig har vært ukjent. Fire et al. viste på slutten av 1990-tallet at dobbeltrådig RNA (dsRNA) utslokket genuttrykk fra rundormen *Caenorhabditis elegans* [74], noe som senere ble bekreftet i andre multicellulære organismer [75-77]. Funksjonen til RNAi i organismer er blant annet å forsvare seg mot virus, transposoner og ikke-funksjonelt mRNA [78]. I denne oppgaven ble humane myotuber infisert med en lentiviral plasmidvektor, som inneholder en "short-hairpin"-RNA-sekvens (shRNA). Plasmidvektoren var innkapslet i G-glykoprotein fra vesikulært stomatitis virus (VSV-G). Innkapslingen gjorde det mulig å infisere et stort antall ulike celler gjennom transduksjon [79, 80]. I plasmidet fantes det en RNA-polymerase-III-promotor. RNA-polymerase III transkriberer effektivt shRNA-sekvensen [80]. shRNA er en enkeltrådig RNA og er formet ved at den ene enden er komplementær med den andre enden. Tråden vil da ligge parallelt med en sløyfe som forbinder trådene. Sløyfen består av 6 basepar med basesekvensene CTC GAG [81]. ShRNAet vil starte en biokjemisk kaskade i cellen (figur 1.6). Først blir shRNA-sekvensen på det lentivirale plasmidet transkribert til pri-shRNA. Pri-shRNAet blir videre modifisert av et RNAase III-enzym, Drosha, til pre-shRNA [82]. Pre-shRNA vil reagere med et cytoplasmisk RNAase III-enzym, Dicer, som vil kutte shRNAet opp til siRNA. siRNA består av 2 komplementære RNA-tråder på ca. 21-23 basepar som binder seg til et annet multiprotein kompleks, "RNA-induced silencing complex" (RISC) [83]. I RISC-komplekset finnes proteinet Ago2, som har endonuklease aktivitet. Denne aktiviteten er viktig for å kløyve og frigi en av RNA-trådene i siRNA [84, 85]. I komplekset vil den RNA-tråden som er igjen være komplementær til sekvenser i målgenets mRNA. Når RISC-komplekset med RNA bindes til målgenets mRNA vil mRNAet kløyves og nedbrytes [86]. Dette fører til at konsentrasjonen av målgenets mRNA blir betraktelig redusert, en såkalt "knockdown" [87]. Fordelen med å bruke shRNA-transduksjon fremfor siRNA-transfeksjon er at det vil oppstå en vedvarende "knockdown"-effekt. Den vedvarende effekten oppstår fordi vertscellen er i stand til å kontinuerlig syntetisere shRNA-molekyler mens det er vist at mindre enn 1 % av siRNA-molekyler er igjen i vertscellen etter 48 timer [88]. *In vivo* er shRNA 250 ganger mer effektiv enn siRNA til å utslukke gener ved ekvivalente doser [89]. Den store utfordringen innen dette feltet er å lage en effektiv transportmekanisme til å infisere shRNA. Det er tidligere utprøvd oncoretrovirale vektorer, men det viste seg at disse vektorene ikke var kapable til å infisere ikke-prolifererende celler [90-92]. Lentivirus har derimot vist å kunne infisere ikke-delende

celler som makrofager og lymfocytter [93]. Opptaket av virusvektoren kan økes ved å ha heksadimetrin-bromid i transduksjonsmediet. Heksadimetrin-bromid er en kationisk polymer og virker ved å nøytralisere ladningen av sialinsyre på celleoverflaten, og dermed hindre frastøtningskrefter mellom cellemembranen og viruspartikkelen [94].



Figur 1.6: RNA interferens med shRNA. Mekanismen ved RNA-interferens med shRNA. Modifisert fra [88].

1.7 Mål for oppgaven

I første del av oppgaven var målet å studere funksjonen til LXR β med hensyn på metabolske effekter av glukose og fettsyrer i humane myotuber. Til å studere LXR β -isoformen ble det brukt RNA-interferens mot LXR β . Det var ønskelig å gjøre funksjonelle og genetiske studier etter påvirkning av agonisten T0901317 ved LXR β -utslokking. Gir RNAi mot LXR β i humane myotuber de samme metabolske effektene som vi finner i myotuber isolert fra LXR β -KO-mus?

Hovedmål med underliggende delmål:

- Studere effektene av redusert LXR β -uttrykk med RNA-interferens på metabolismen av glukose og fettsyrer hos humane myotuber.
 - ✓ Studere RNA-interferensens eventuelle påvirkninger på humane myotuber.
 - ✓ Studere opptaket og oksidasjon av glukose med og uten insulinpåvirkning på myotuber behandlet med RNAi mot LXR β .
 - ✓ Studere opptak og oksidasjon av fettsyrer med og uten T0901317 på myotuber behandlet med RNAi mot LXR β .
 - ✓ Studere mRNA-ekspresjonen til FAS og ABCA1 ved forbehandling med T0901317 på LXR β -utslokkede myotuber.
 - ✓ Studere opptaket og oksidasjon av glukose med og uten insulinpåvirkning på myotuber fra LXR β -KO-mus og sammenligne forskjeller med humane myotuber etter LXR β -utslokking.

I andre del av oppgaven var målet å studere effekter av 22(S)-HC og EPA på metabolsk fleksibilitet i humane myotuber.

- Studere *in vitro* effekter av 22(S)-HC og EPA på metabolsk skifte i humane myotuber.
 - ✓ Studere 22(S)-HC effekter på opptak og oksidasjon av glukose med og uten insulinpåvirkning.
 - ✓ Studere 22(S)-HCs effekter på *in vitro* metabolske parameter som suppressibilitet, adapterbarhet og substratregulert fleksibilitet.

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Ham's F-10 Glutamax nutrient mixture, Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM/GLutamax-I), Fungizone® (250 µg/ml amphotericin), føtalt kalveserum (FCS), føtalt storfeserum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin (10000 IE/10 mg/ml) og Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS m/Ca²⁺ og Mg²⁺) ble kjøpt fra Gibco (Paisley, UK). Ultraser G ble kjøpt fra BioSerpa, Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc (Paris, Frankrike). Ekstracellulær matriks (ECM) gel, dimetylsulfoksid (DMSO), L- karnitin hydroklorid, bovint serum albumin (BSA), β-merkaptoetanol, dietylpyrokarbonat (DEPC), palmitinsyre, HEPES, D-glukose, oljesyre, MISSION® Non-targeting-Target shRNA Control Transduction Particles, MISSION® pLKO.1-puro Control Transduction Particles, TRCN0000022214 og TRCN0000022215 ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Insulin Actrapid® Penfill ble kjøpt fra NovoNordisk (Bangsværd, Danmark). Eikosapentaensyre er fra Laborel AS (Oslo, Norge). Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate ble kjøpt fra Biorad Laboratories Inc. (København, Danmark). [1-¹⁴C]palmitinsyre (60 mCi/mmol), [1-¹⁴C]oljesyre (55 mCi/mmol), D-[¹⁴C(U)]glukose (5 mCi/mmol) kom fra American Radiolabeled Chemicals (St Louis, MO, USA). T0901317 ble kjøpt fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). OptiPhase Supermix, Unifilter®-96 GF/B og TopSeal®-A gjennomsiktig film ble skaffet fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). T0901317 ble kjøpt fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Matrigel var fra BD Bioscience (Bedford, MA, USA). Agilent Total RNA isoleringskit var skaffet fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Hanks Balance Salt Solution (HBSS) var fra PAA Laboratories GmbH (Pasching, Østerrike). 96-brønners brett Corning®CELLbind Surface og 6 brønners brett Corning®6 Well Cell Culture Cluster var kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). 96-brønners Isoplate® var fra Wallac OY (Turku, Finland). SYBR green, Taqman reverse transkripsjonskitreagenser og MicroAmp® Optical Reaction Plate var skaffet fra Applied Biosystem (Warrington, UK). Basic fibroblast growth factor (bFGF) og primere (FAS, ABCA1, SREBP-1c, 36B4, LXRβ) var kjøpt fra Invitrogen (Paisley, Scotland, UK).

2.2 Celledyrking

Det er gjort forsøk med skjelettmuskelceller fra mennesker og mus.

2.2.1 Humane skjelettmuskelceller

Arbeidet med de humane cellene er gjort i henhold til prosedyrene til Gaster et al. [95, 96].

Utsåing av humane myoblaster

Nedfrosne ampuller ble raskt tint på vannbad ved ca. 37°C. Innholdet i ampullene ble overført til 50 ml rør hvor 5 ml utsåingsmedium (appendiks 1.1) ble tilsatt dråpevis. Røret ble deretter sentrifugert ved 5000 rpm i 7 minutter. Supernatanten med toksisk DMSO ble sugd av, og cellepelleten ble resuspendert i 1 ml utsåingsmedium. 40 µl av suspenderte celler ble blandet med 40 µl 0,4 % tryptanblått til telling av celletettheten. Etter telling av cellene ble den riktige mengden utsåingsmedium tilsatt cellesuspensjonen. Cellesuspensjonen ble blandet godt. 100 µl eller 2 ml med cellesuspensjon tilsvarende henholdsvis 6000-8000 celler eller 50 000 - 100 000 celler per brønn, ble tilsatt hver brønn på ferdigcoatede 96-brønnersbrett (Corning®CELLbind Surface) eller ucoatede 6-brønnersbrett (Corning®6 Well Cell Culture Cluster). Ucoatede 6-brønnersbrett ble tildekt med ekstracellulær matriks (ECM). Brettene ble deretter inkubert ved 37°C og 5 % CO₂.

Proliferasjon og differensiering av humane myoblaster til myotuber

24 timer etter utsåing ble utsåingsmedium byttet til proliferasjonsmedium (appendiks 1.2). Proliferasjonsmediet ble tilsatt cellene hver 2.-3. dag. Når cellene var 70–80 % konfluente ble proliferasjonsmedium byttet ut med differensieringsmedium (appendiks 1.3). Cellene ble tilsatt differensieringsmedium annenhver dag til forsøksdagen. Forsøksdagen var som regel 7-8 dager etter differensiering.

Forbehandling med 22(S)-HC og EPA

I fleksibilitetsforsøkene (resultat 3.2) ble de humane myotubene preinkubert med 10 μM 22(S)-HC eller 0,1% DMSO (kontroll) på dag 4 i differensieringsperioden. Forbehandlingen varte i 4 døgn frem til forsøksdagen på differensieringsdag 8. Det ble forbehandlet med 100 μM EPA eller 40 μM BSA (kontroll) som ble tilsatt myotubene på dag 7 i differensieringsperioden til forsøksdagen 24 timer etter.

Donorkarakteristika

De humane skjelettmuskelcellene er isolert fra *Musculus obliquus internus abdominis* og er fra levende, friske og frivillige donorer (tabell 2.1).

Tabell 2.1. Donorkarakteristika

ID	Alder (år)	Kjønn	Vekt (kg)	Høyde (m)	Fastende glukose (mmol/l)
LD 15	55	Kvinne	85	1,71	6,9
LD 17	56	Kvinne	67	1,70	5,6
LD 22	40	Mann	85	1,72	5,0
LD 24	34	Kvinne	57	1,60	5,1
LD 32	70	Kvinne	70	1,70	5,0
Gj.snitt \pm SEM	51 \pm 6		72,8 \pm 5,4	1,69 \pm 0,02	5,5 \pm 0,4

(Forkortelser: LD: levende donor, SEM: standardfeil)

2.2.2 Skjelettmuskelceller fra mus

Muscellemodell

Forsøkene med mus består av mus med ulike genotyper, henholdsvis LXR β -KO- og LXR β -WT-mus. Musene er generert og musemyoblaste isolert ved Astrazeneca i Sverige. Metoden for LXR β -KO generering er tidligere beskrevet [73]. De primære musemyoblastene er isolert etter tidligere beskrevet protokoll [73]. Cellene ble oppbevart i nitrogentank.

Utsåing, proliferasjon og differensiering av musemyoblaster til myotuber

Nedfrosne ampuller ble raskt tint på vannbad ved ca. 37°C. Cellesuspensjonene ble raskt overført til 50 ml rør hvor det ble tilsatt 5 ml proliferasjonsmedium for museceller (appendiks 1.5) dråpevis. Cellene ble deretter sentrifugert ved 7000 rpm i 5 minutter. Supernatanten med toksisk DMSO-medium ble sugd av, og cellepelleten ble resuspendert i 1 ml proliferasjonsmedium for mus. 40 µl av suspenderte celler ble blandet med 40 µl 0,4 % tryptanblått til telling av celletettheten. Etter telling av cellene ble proliferasjonsmedium for mus tilsatt celledensiteten til 8000-10000 celler/ 100 µl. Cellesuspensjon ble blandet godt. 100 µl med celledensitet ble tilsatt hver brønn på coatede 96-brønnersbrett. Brettene ble coated med Matrigel fortynnet 1:50 i DMEM m/glutamax-I. Cellene ble dyrket ved 37°C og 5 % CO₂ fuktighet. Myoblastene vokste i proliferasjonsmediet til de var 70-80 % konfluente, for deretter å bytte mediet til differensieringsmedium for mus (Se appendiks 1.6). Differensieringsmediet for mus ble byttet hver 2.-3. dag frem til forsøksdagen. Differensieringsperioden varte i 5 døgn.

2.3 RNA-interferens mot LXRβ

Cellene til RNAi forsøkene ble på dag 6 i differensiering tilsatt lentivirale partikler med shRNA-sekvenser. I forsøkene ble det brukt to ulike shRNA-sekvenser mot LXRβ henholdsvis TRC14 og TRC15. Kontrollene var non-targeting og pLKO (tabell 2.2). De lentivirale partiklene med de ulike shRNA-sekvensene ble tilsatt transduksjonsmedium (appendiks 1.4) og overført til cellene. I innledende forsøk ble det sjekket for hvilken viruskonsentrasjonen som ga størst LXRβ-”silencing” (utsløkking). Det ble testet for 1 og 2 MOI (”multiplicity of infection”). Det viste seg at 2 MOI ga best resultat, slik at arbeidet fortsatte med denne virus konsentrasjonen. Det ble tilsatt 2 MOI med lentivirus per celle. Beregningen av 2 MOI er estimert ut fra celletettheten. Det er estimert til å være 23000 og 384000 celler per brønn når cellene er konfluente i henholdsvis 96- og 6-brønnersbrett. Etter 24 timer ble transduksjonsmediet byttet ut med differensieringsmediet med eller uten 1 µM T0901317 og stod ytterligere 24 timer til forsøksdagen.

Tabell 2.2. RNA-interferens karakteristika

shRNA navn	Gen bank nr.	shRNA-sekvens:
TRCN0000022214 (TRC14)	NM_007121.1	5'-CCG GAG AGT GTA TCA CCT TCT TGA ACT CGA GTT CAA GAA GGT GAT ACA CTC TTT TTT-3'
TRCN0000022215 (TRC15)	NM_007121.1	5'-CCG GGA AGG CAT CCA CTA TCG AGA TCT CGA GAT CTC GAT AGT GGA TGC CTT CTT TTT-3'
Non-targeting-Target shRNA Control Transduction Particles (Non-targeting)	SHC002V	ShRNA inneholder 5 basepar som ikke er gjenkjennelig i noen human- og musegener. (Aktiverer RISC-komplekset og RNAi-veien)
pLKO.1-puro kontrol Transduksjonspartikler (pLKO)	SHC001V	Tom vektor som ikke inneholder ShRNA- partikler (Tom vektor) (Aktiverer ikke RISC- komplekset og RNAi-veien).

2.4 RNA-isolering og analyse av genekspressjon med revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR)

Det ble utført RT-real-time-PCR analyse for å undersøke effekter av RNAi mot LXR β . Det ble sådd ut 100.000 celler per brønn på 6-brønnsbrett. Prosedyren for RNAi over (2.3) ble fulgt. Cellene ble isolert og høstet 48 timer etter transduksjonen. På høstedagen ble cellene vasket med 2 ganger PBS i DEPC-H₂O. Deretter ble cellene tilsatt 300 μ l lysisbuffer fra Agilent. Cellene ble deretter skrapet før lysatet ble overført til autoklaverte eppendorfrør. Rørene ble oppbevart i fryseren (-70°C).

2.4.1 RNA-isolering og kvantifisering

Lysatet ble tatt ut fra fryseren og tint. Metoden for RNA-isolering er beskrevet av Agilent Technologies®. Alt arbeid med RNA ble utført med hansker og sterilt utstyr, for å hindre RNase-kontaminasjon. Det ble brukt et kit med nukleasefritt vann, vaskeløsninger og ulike minikolonner. 300 μ l av det homogeniserte lysatet ble først filtrert ved 16000 g i 3 minutter gjennom en miniprefiltreringskolonne for at de større cellefraksjonen skulle bli sittende fast i

kolonnen. Filtratet ble deretter tilsatt et like stort volum med 70 % etanol. Løsningen ble blandet og inkubert i 5 minutter. 600 µl av løsningen ble så sentrifugert i en mikrosentrifuge (Universal 32 R Hettich entrifugen) ved 16000 g i 30 sekunder i en mini-isolasjonskolonne. Filtratet ble filtrert om igjen i samme kolonnen. Dette for å sikre seg at mest mulig RNA fester seg til kolonnen. Kolonnen ble deretter vasket med vaskeløsning to ganger (sentrifugert ved 30 sekunder ved 16000 g). Renset RNA ble eluert ut av kolonnen ved å tilsette 15 µl nukleasefritt vann til kolonnen og sentrifugert i 1 minutt.

For å kvantifisere mengde RNA i prøvene, ble 2,5 µl RNA prøve analysert ved hjelp av picoDrop. PicoDrop er et spektrofotometer som utfører "Optical density"(OD)-målinger. Det ble utført OD målinger ved bølgelengde 200-280 nm.

2.4.2 cDNA syntese

2 µg av total RNA fra de ulike prøvene ble overført til mini-ependorfrør (MicroAmp®). Til prøvene ble det tilsatt DEPC-dH₂O til 10 µl. Det ble deretter tilsatt 10 µl reaksjonsmedium for komplementær cDNA syntese (appendiks 2.1). Prøvene og den negative kontrollen ble satt i synteseapparatet Thermal Cycler 9600 Perkin-Elmer. Her ble prøvene først utsatt for 25°C i 10 minutter (hexamer i templat priming), så 37°C i 80 minutter (revers transkriptase), og deretter 85°C i 5 sekunder (revers transkriptase inaktivering).

2.4.3 Real-time PCR

Fortynnet 2,5 µl cDNA av prøvene og standardene ble overført i hver sin brønn på MicroAmp® Optical Reaction Plate. Prøvene ble fortynnet 1:5 og 1:10 i DEPC-H₂O avhengig av hvilket gen som skulle sjekkes. Reaksjonsblanding (appendiks 2.2) med 2 x SYBR Green Master mix, "forward" primer og revers primer og DEPC-H₂O ble deretter tilsatt brønnene som bestod av prøver, standarder eller negative kontroller. Det ble lagd standarder ved å blande lik mengde av de ulike cDNA-prøvene og fortynne 1:5 i DEPC-H₂O. Fortynnet standard ble deretter fortynnet 1:2 med DEPC-H₂O til fire ulike konsentrasjoner (1000-500-250-125). Ved hjelp av denne fortynningsrekken ble det lagd en standardkurve, hvor denne ble brukt til å beregne amplifisert cDNA i prøvene. Til forsøkene med "knockdown" ble det benyttet primere i tabell 2.3 (tabell 2.3). MicroAmp® Optical

Reaction Platen ble deretter plassert i instrumentet ABI PRISM 7000 Applied Biosystem. Prøvene ble deretter behandlet med 40 sykluser, hvor hver syklus består av først 95°C i 15 sekunder deretter 60°C i 60 sekunder.

Primerne brukt i forsøkene er komplementære til sekvenser på målgenets DNA og DNAet vil amplifiseres eksponesielt (2^n). Dette skjer i syklusene på instrumentet ABI PRISM 7000 Applied Biosystem. Hver syklus består av en denatureringsfase (95°C i 15 sekunder), hvor DNA-tråden separeres. Deretter vil en skje en hybridiseringsfase (60 °C i 60 sekunder), hvor primerne fester seg til den komplementære sekvensen til målgenets DNA. Etter hybridiseringsfasen skjer det en polymeriseringsfase hvor DNAet amplifiseres. Etter ca. 25 sykluser vil cDNA denatureres og resultatene kan sees som en plåtå. Real-time PCR er en nøyaktig metode for å undersøke endringer i mRNA-uttrykk. 2 x SYBR Green Master mix er en fluorescerende middel som bindes til dobbeltrådet DNA. Dette gjør dobbeltrådet DNA og amplifiseringen lett å detektere. Intensiteten på fluorescensen fra 2 x SYBR Green Master mix er proporsjonal med mengde cDNA i prøven.

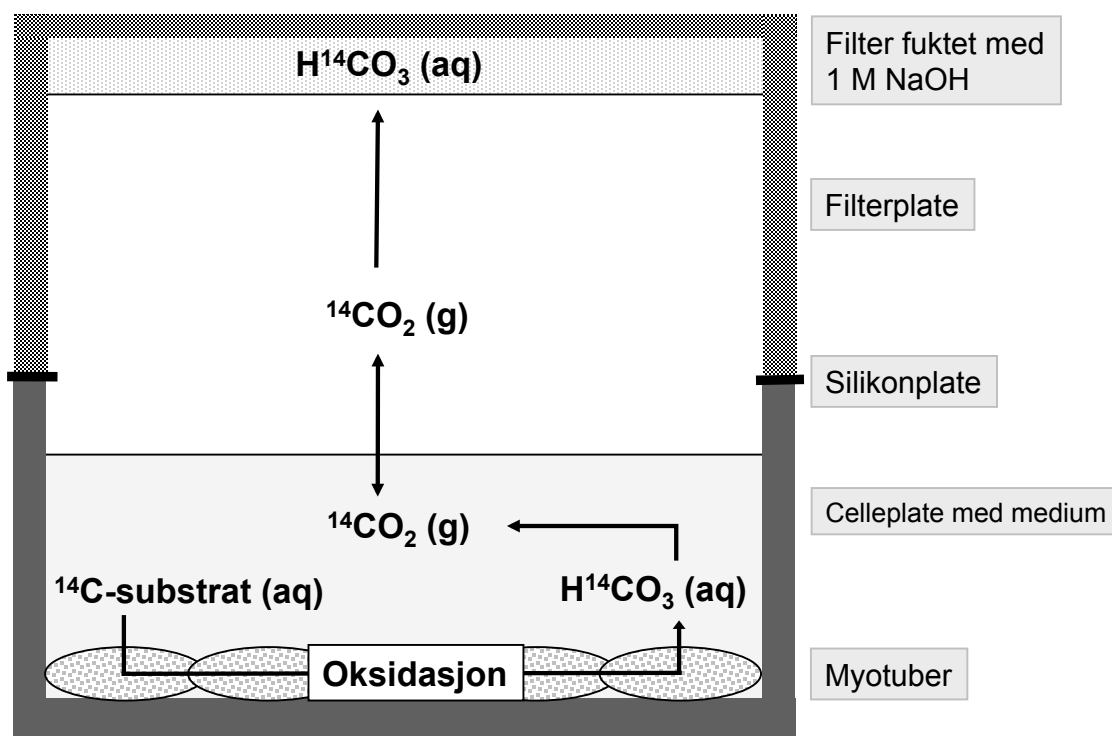
Det ble beregnet en standardkurve ut fra standardene ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software®. Den minste detekterbare grensen, Ct, representerer når fluorescens detekteres. I real-time-PCR analyse blir det målt for fluorescens på slutten av hver syklus. Etter å ha detektert i hvilken syklus fluorescens obstår blir n i den eksponesielle funksjonen 2^n beregnet. Dermed kan man kvantifisere genuttrykk relativt.

Tabell 2.3. Primere brukt ved RT-Real-Time-PCR

Gener	Gen bank nr.	Primere
ABCA1	NM_013454	F: 5'-CAA CCC CTG CTT CCG TTA TC-3' R: 5'-GAC CTT GTG CAT GTC CTT AAT GC-3'
FASN	NM_007988	F: 5'-TCC TGG AAC GAG AAC ACG ATC T-3' R: 5'-AGA GAC GTG TCA CTC CTG GAC TT-3'
LXR β	NM_009473	F: 5'-AAG CAG GTG CCA GGG TTC TT-3' R: 5'-TCA ARG GTG GAC GCC TTC A-3'
SREBP-1c	NM_011480	F: 5'-TCA GGG CCC ATT AGT GAG TAG ACT-3' R: 5'-GCC GAC CAG ATT CCC TAA GG-3'
36B4	NM_007475	F: 5'-ATC TCC AGA GGC ACC ATT GAA-3' R: 5'-TCG CTG GCT CCC ACC TT-3'

2.5 Substrat-oksidasjonsmetoden

Metoden i oppgaven er utarbeidet av Wensaas et al. [97]. Hensikten med metoden er å måle opptak og oksidasjon av radiomerkede substrater som for eksempel $[^{14}\text{C}]$ glukose og $[^{14}\text{C}]$ palmitinsyre i humane myotuber (figur 2.1). Prinsippet for oksidasjon er at de humane myotubene forbrenner det radiomerkede substratet til $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g). Fettsyrene (PA og OA) spaltes til acetyl-CoA gjennom β -oksidasjon. Den radiomerkede $[^{14}\text{C}]$ acetyl-CoA går inn i Krebs sykklus og spaltes av til $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g). Hvert acetyl-CoA molekyl danner 2 CO_2 molekyler. Radiomerket glukose blir tatt opp av cellene og blir spaltet gjennom glykolysen til acetyl-CoA. På samme måte som acetyl-CoA fra fettsyreoksidasjon vil acetyl-CoA fra glukose gå inn i krebssyklus og frigjøre $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g). $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ (g) diffunderer opp til filterplaten og reagerer med NaOH til $[^{14}\text{C}]\text{HCO}_2^-(\text{aq})$. Produksjonen av CO_2 blir dermed kontinuerlig fanget opp av filterplaten slik at oksidasjonen kan kvantifiseres. Innholdet av radiomerkede substrater i de humane myotubene kan også kvantifiseres ved forsøket slutt (celleassosiert radioaktivitet).



Figur 2.1: Prinsipp for substrat-oksidasjonsmetoden. Radiomerkede fettsyrer og glukose blir tatt opp i myotubene, hvor de oksideres. Avfallsproduktet CO_2 (g) som blir produsert fra de radiomerkede substratene fanges av filterplaten. I filterplaten reagerer CO_2 med NaOH og danner HCO_3 i løsning. Modifisert fra [97].

2.5.1 Substratoksidasjonsforsøk med fettsyrer og glukose

Substrat-oksidasjonsforsøkene med fettsyrer og glukose følger en tidligere beskrevet protokoll [97]. Differensieringsmediet i hver brønn på cellebrettet ble på forsøksdagen byttet ut med akuttmedium (appendiks 3.1, 3.2, 3.3). En 96-brønners filterplate (Unifilter®-96 GF/B®) ble fuktet med 20 µl 1 M NaOH per brønn. På celleplaten ble det lagt en silikonplate og en filterplate. Silikonplaten lå imellom celleplaten og filterplaten, slik at platene formet et lufttett system (figur 2.1). Deretter ble det lagt en metallplate på toppen av filterplaten og presset sammen ved hjelp av en presser (også kalt CO₂-trapper). Cellebrettet ble deretter inkubert ved 37°C i 4 timer. Etter 4 timer ble filterplaten og celleplaten separert. Filterplaten ble tilsatt 40 µl Optiphase Supermix® per brønn og forseglet med TopSeal®-A. Filterplaten stod 48 timer før radioaktiviteten ("counts per minute") ble målt ved hjelp av Microbeta® Plus. Cellebrettet ble først vasket 2 ganger med 150 µl PBS-buffer med pH-verdi på 7,4. Etter varsom vasking ble cellene lysert med 200 µl 0,1 M NaOH. Lysatet ble deretter satt inn i fryseren og tatt ut dagen etter. For å måle celleassosiert radioaktivitet ble 50 µl av lysatet overført til 96-brønners Isoplate®. 200 µl Optiphase Supermix® ble tilsatt brønnene med lysatet og deretter forseglet med plastfilm (TopSeal®-A). Etter 2 timer ble brettene satt inn i Microbeta® Plus for å kvantifisere radioaktiviteten.

Radioaktive isotoper

Følgende isotoper ble brukt i oppgaven:

- [1-¹⁴C]oljesyre (1 µCi/ml, 18,3 µM eller 0,273 µCi/ml, 5 µM)
- [1-¹⁴C]palmitinsyre (1 µCi/ml, 17,4 µM)
- D-[¹⁴C(U)]glukose (1 µCi/ml, 100 µM)

2.5.2 Proteinmåling

Metoden for proteinmåling er basert på arbeidet til Bradford [98]. 50 µl homogenisert cellelysat og standardene ble overført til 96-brønners-mikrotiterplate. Standardene består av BSA (konsentrasjoner på 0, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml) løst i 0,1 M NaOH. Til hver brønn tilsettes 200 µl "Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate" som er fortynnet

1:5 i destillert vann. Stoffet ”Coomassie Brilliant Blå G-250” i fargereagenset vil skifte farge fra rødt til blått når stoffet reagerer med basiske og aromatiske aminosyrer i surt miljø. Etter tilsetning av fargereagens stod prøvene 5 minutter i rom temperatur og deretter satt inn i Wallac Victor™ mikroplateleser. Wallac Victor™ mikroplateleser er et spektrofotometrisk instrument, hvor absorbansen til prøvene ved 595 nm ble målt. De ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene ble estimert ved hjelp av en standardkurve basert på de kjente proteinkonsentrasjoner fra standardprøvene.

2.6 Statistiske analyser

Alle dataene presenteres som gjennomsnittsverdi \pm standardfeil (SEM). Gjennomsnittsverdien fra hvert forsøk er regnet fra 4-8 paralleller. Antall forsøk er n som i oppgaven oftest ligger mellom 3-6. I oppgaven er det benyttet en tosidig, enutvalg t-test for populasjoner eller matrisen lineær-mikset modell når disse har passet. Signifikansnivå på 0,05 ($\alpha=0,05$) er brukt. Dataprogrammet SPSS har vært benyttet til utføring av alle de statistiske analysene. Til fleksibilitetsforsøkene (resultat 3.2.2) er det benyttet enveis ANOVA-test etter konsultasjon med Eva Skovlund. I forsøkene er nullhypotesen, $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$. Den alternative hypotesen er $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$. Gjennomsnittet til behandlingsgruppen er μ_1 , mens gjennomsnittet til kontrollgruppen er μ_2 .

3. Resultater

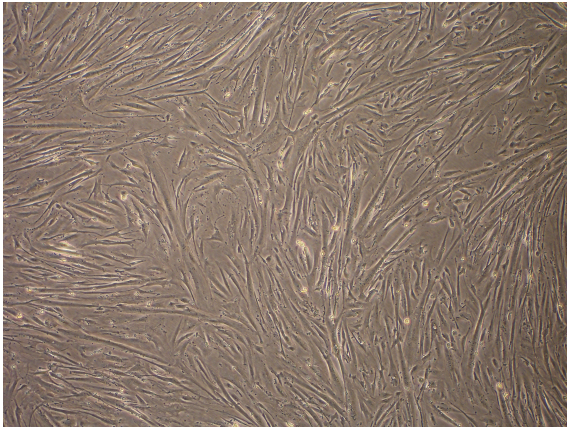
3.1 Effekter av redusert LXR β -uttrykk

Første del av denne masteroppgaven gikk ut på å undersøke metabolske effekter av glukose og fettsyrer i humane myotuber etter LXR β -utslokking med ShRNA. I tillegg ble det undersøkt om LXR β -utslokking påvirket mRNA-ekspresjonen til genene SREBP-1c, FAS og ABCA1. Til forsøkene ble det brukt 2-3 negative kontroller henholdsvis non-targeting, pLKO og transduksjonsmedium.

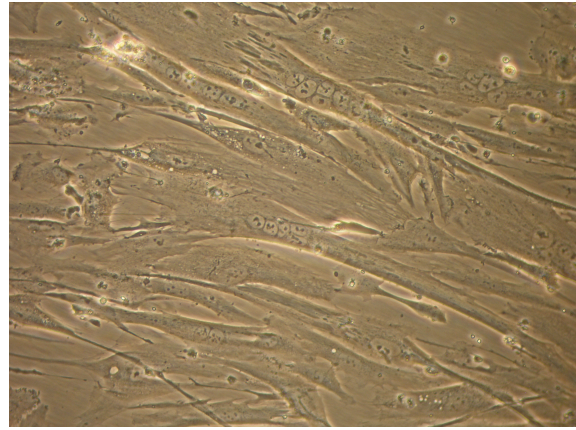
3.1.1 Utsåing av celler til LXR β -utslokking

Det første som ble undersøkt var om transduksjonsmediet og shRNA påvirket morfologien og tettheten til humane myotuber. For å dokumentere endringer ble det tatt bilder før og etter shRNA-behandling. Det ble tatt bilder av cellene på dag 6 og 7 etter differensiering. Cellene er sådd ut på 6-brønners brett dekket med ekstracellulær matriks (ECM). Bilde 3.1 viser ubehandlede myotuber (bilde 3.1). Bildene 3.2 og 3.3 illustrerer humane myotuber behandlet med henholdsvis shRNA-sekvensene non-targeting og TRC14 (bilde 3.2 og 3.3). Non-targeting og TRC14 ble tilsatt myotubene på differensieringsdag 6 og fjernet etter 24 timer. Visuell analyse av cellene i mikroskopet viste tydelig at mange celler var løsnet etter behandlingen. Løsnede celler er synlige som hvite flekker på bilde 3.2 C, D og 3.3 C, D. Myotubene var vesentligere mindre konfluente etter behandlingen. Det ble også observert mulige morfologiske endringer etter RNAi-behandling mot LXR β (bilde 3.3 B og D for sammenligning). Resultatene fra 96-brønners brettene viste samme tendens.

A)

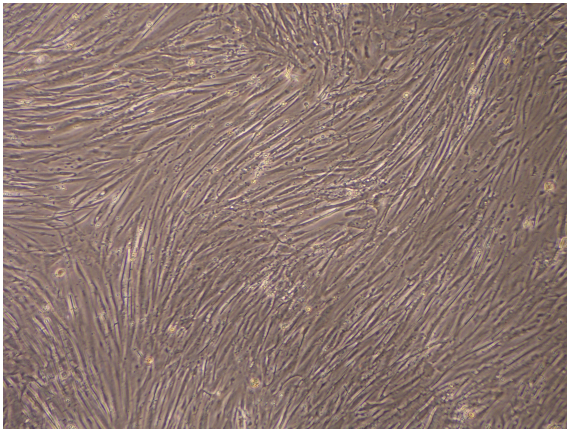


B)

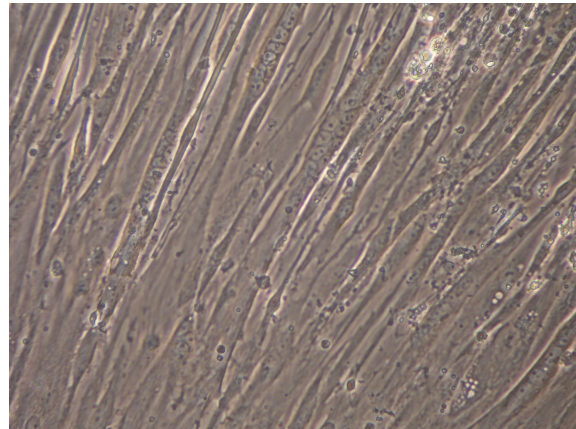


Bilde 3.1: Bilde av ubehandlede myotuber. Bildene viser 4 x (A) og 20 x (B) av ubehandlet humane myotuber på differensieringsdag 7.

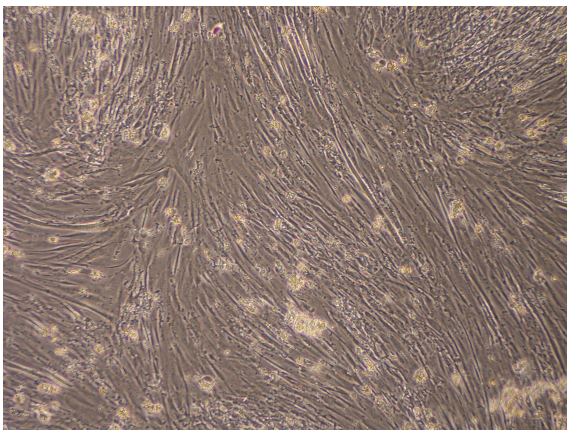
A)



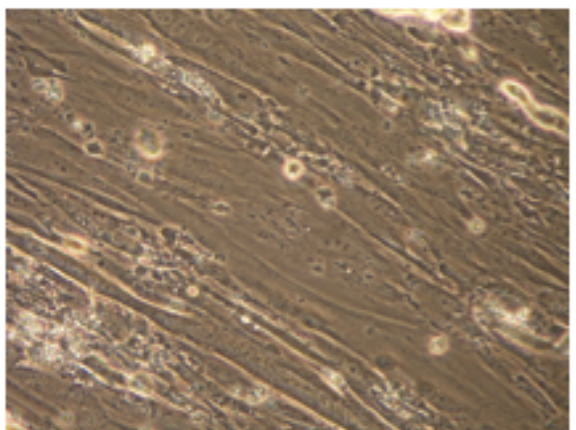
B)



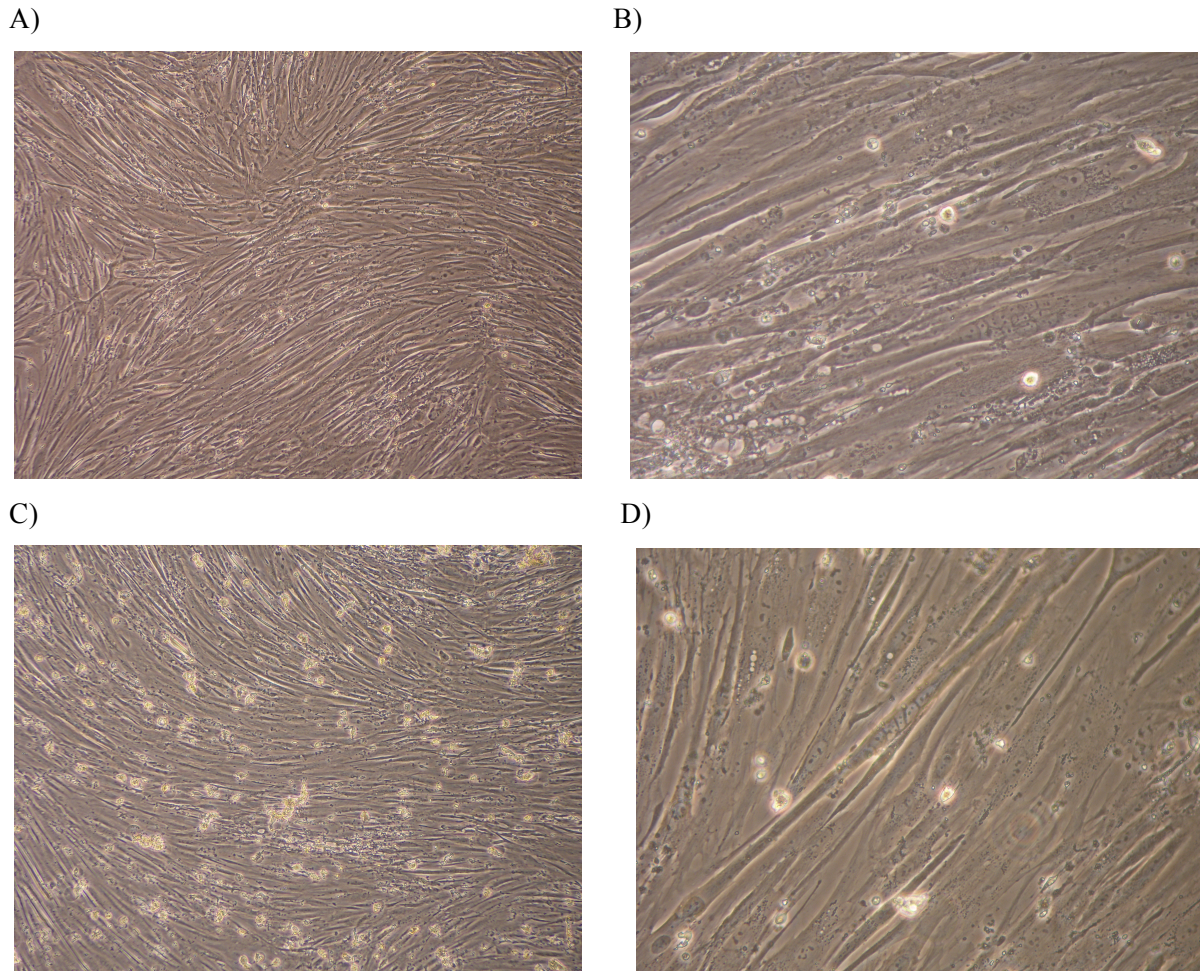
C)



D)



Bilde 3.2: Bilder av humane myotuber behandlet med non-targeting shRNA. Bilde A) og B) viser humane myotuber på differensieringsdag 6 direkte før tilsetning av shRNA ved forstørrelsene 4 x (A) og 20 x B). Bilde C) og D) viser de samme myotubene 24 timer etter shRNA tilsetning ved de samme forstørrelsene.

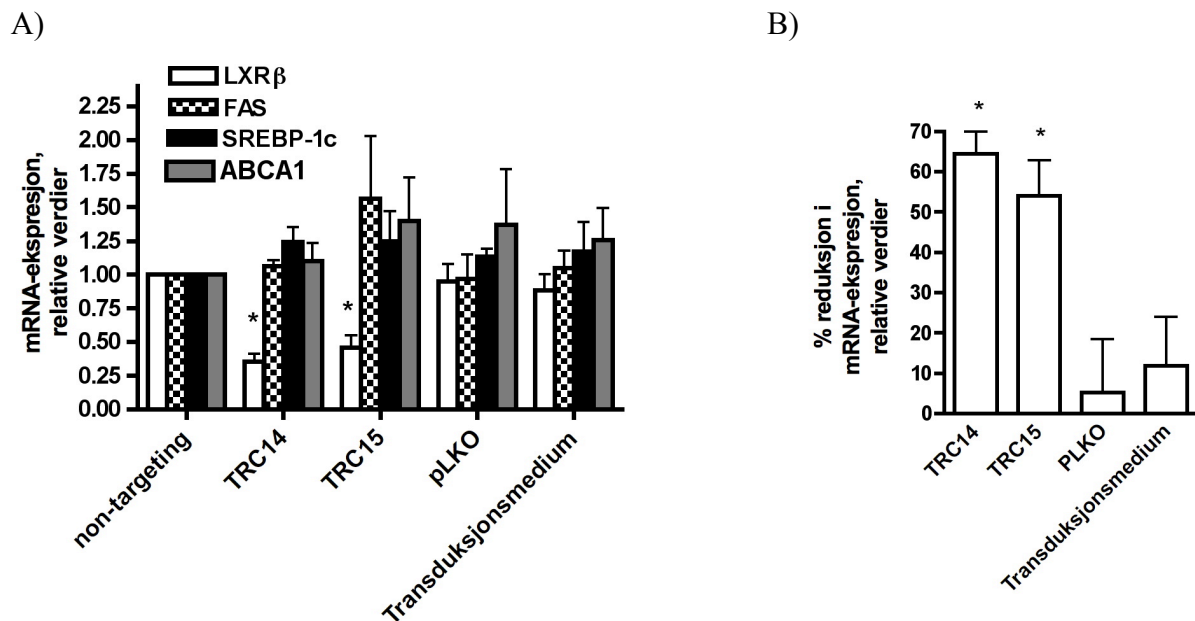


Bilde 3.3: Bilder av humane myotuber behandlet med shRNA mot LXR β . Bildene viser humane myotuber behandlet med TRC14 (shRNA mot LXR β). Bilde A) og B) viser humane myotuber rett før tilsetning av shRNA mot LXR β (TRC14) på differensieringsdag 5 ved forstørrelsene 4 x (A) og 20 x (B). Bilde C) og D) viser de samme myotubene et døgn etter behandling med TRC14 ved forstørrelsene 4 x (C) og 20 x (D).

3.1.2 Effekter av RNA interferens mot LXR β på mRNA-ekspresjonen til LXR β , FAS, SREBP-1c og ABCA1

I dette forsøket var hensikten å undersøke om mRNA-nivået til LXR β ble redusert av LXR β -utslokking med RNAi. Det var også ønskelig å måle ekspresjonen av gener som LXR regulerer. Derfor ble genene SREBP-1c, FAS og ABCA1 også undersøkt etter behandling av RNAi mot LXR β . Resultatene på mRNA-ekspresjonen etter 24 timers behandling med RNAi mot LXR β viste signifikant reduksjon i mRNA-ekspresjonene for genet LXR β (figur 3.4). Behandling med de to shRNA-sekvensen mot LXR β , TRC 14 og TRC 15, viste å redusere mRNA-ekspresjonen til LXR β med henholdsvis $64\pm 5\%$ og $54\pm 9\%$ (figur 3.4 B). Ekspresjonen av genene ABCA1, FAS og SREBP-1c var ikke endret i forhold til

kontrollene. Til forsøket ble det brukt 3 negative kontroller henholdsvis non-targeting , pLKO og transduksjonsmedium.

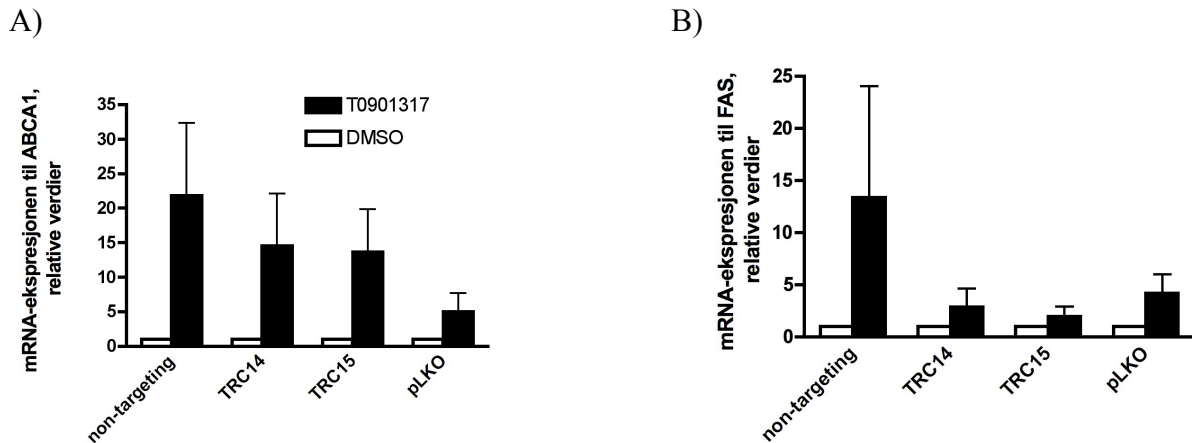


Figur 3.4: mRNA-ekspressjonen i humane myotuber etter behandling med RNAi mot LXRβ. Figuren viser mRNA-ekspressjonen (a) fra 3 ulike gener etter behandling med RNAi mot LXRβ. Figuren viser relative verdier korrigert for "housekeeping"-genet 36B4. RNA ble isolert og cDNA syntetisert. cDNA ble målt ved RT-real-time-PCR. Data vises som gjennomsnittet av 6 forsøk (n=6), bortsett fra ABCA1, FAS og SREBP-1c hvor resultatet er fra henholdsvis 3, 4 og 3 forsøk. B) viser prosentvis knockdown av LXRβ etter RNAi i forhold til non-targeting. *P ≤ 0,05 mot non-targeting.

3.1.3 Effekter av RNAi mot LXRβ på mRNA-ekspressjonen av ABCA1 og FAS etter forbehandling med T0901317

Det var av interesse å studere effekter av LXR-agonisten T0901317 på ekspressjonen av sentrale gener i kolesterolmetabolismen og lipogenesen etter LXRβ-utslokking i humane myotuber. Hos differensierte humane myotuber viste Kase et al. signifikant økning av mRNA-ekspressjon av ABCA1 og FAS ved kronisk (4 dager) forbehandling med T0901317 [58]. I tillegg viste Hessvik et al. at LXRβ var den dominante LXR-isoformen i musemyotuber ved regulering av lipogenesen og kolesteroleffluksen, og det ble vist en statistisk signifikant redusert T0901317-effekt på mRNA-ekspressjonen av ABCA1 og FAS hos LXRβ-KO-mus i forhold til LXRβ-WT-mus [73]. Det var derfor interessant å undersøke om nedsatt LXRβ-uttrykk med RNAi i humane myotuber endret mRNA-ekspressjonen på samme måte som i mus. Behandling med T0901317 i 24 timer viste ingen signifikant

endring av mRNA-ekspresjonen til ABCA1, men det var tydelig en tendens til økt mRNA-ekspresjon med T0901317 for samtlige behandlinger (figur 3.5 A). Den T0901317-induserte økningen i mRNA-ekspresjonen til FAS var ikke signifikant endret (figur 3.5 B). Det så imidlertid ut som den T0901317-induserte økningen var noe mindre i LXR β -utslokkede myotuber (TRC14 og TRC15).



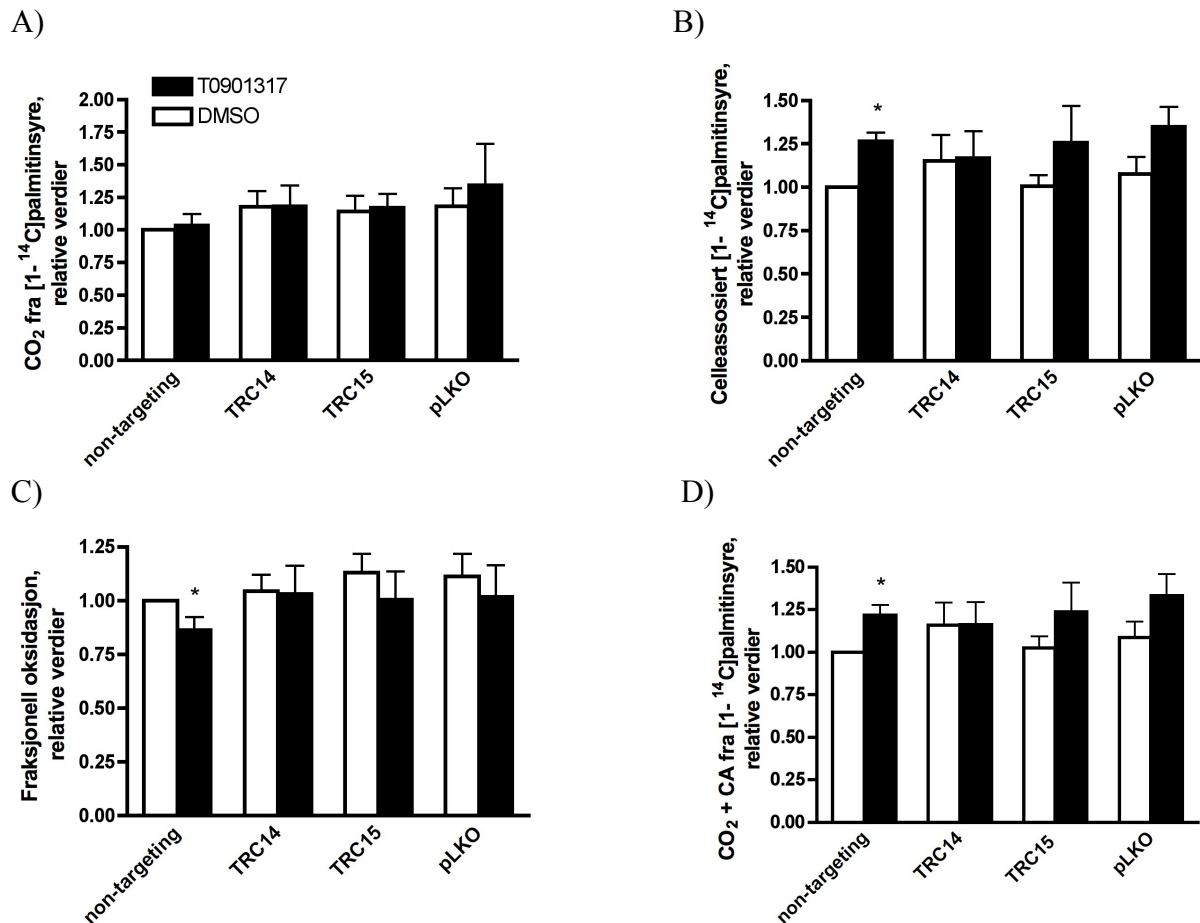
Figur 3.5: T0901317-indusert økning på mRNA-ekspresjonen til ABCA1 (A) og FAS (B). De humane myotubene ble behandlet 24 timer med shRNA mot LXR β i transduksjonsmedium. Transduksjonsmediet ble byttet til differensieringsmediet med 1 μ M T0901317 eller 0,1 % DMSO (kontroll). Forbehandlingen varte i 24 timer før myotubene ble høstet. RNA ble isolert fra lysatet, og deretter ble RNAet revers transkriptert til cDNA. cDNA ble kvantifisert og analysert ved hjelp av real-time-PCR. Resultatene ble behandlet i programvaren ABI Prism 700 SDS software®. Verdiene er relatert til "housekeeping"-genet 36B4 og normalisert i forhold til DMSO. Det ble gjort 3 forsøk (n=3).

3.1.4 Effekter på fettsyremetabolismen hos LXR β -utslokket humane myotuber ved T0901317-forbehandling

Det ble gjort funksjonelle studier på fettsyremetabolismen hos LXR β -utslokkede humane myotuber ved forbehandling med T0901317. Det ble besluttet å forbehandle med T0901317 i 24 og 48 timer etter retningslinjer fra produsenten [81]. Kase et al. har tidligere vist at behandling med T0901317 i 4 dager økte celleassosiert palmitinsyreopptak i differensierte myotuber både fra friske donorer og donorer med fedme og T2D [55].

Resultatet av CO₂-data ved 24 timer forbehandlingstid viste en tendens til økt oksidasjon av palmitinsyre hos celler behandlet med TRC14, TRC15 og pLKO i forhold til non-targeting (figur 3.6 A). T0901317 påvirket ikke palmitinsyreoksidasjonen (CO₂) i noen

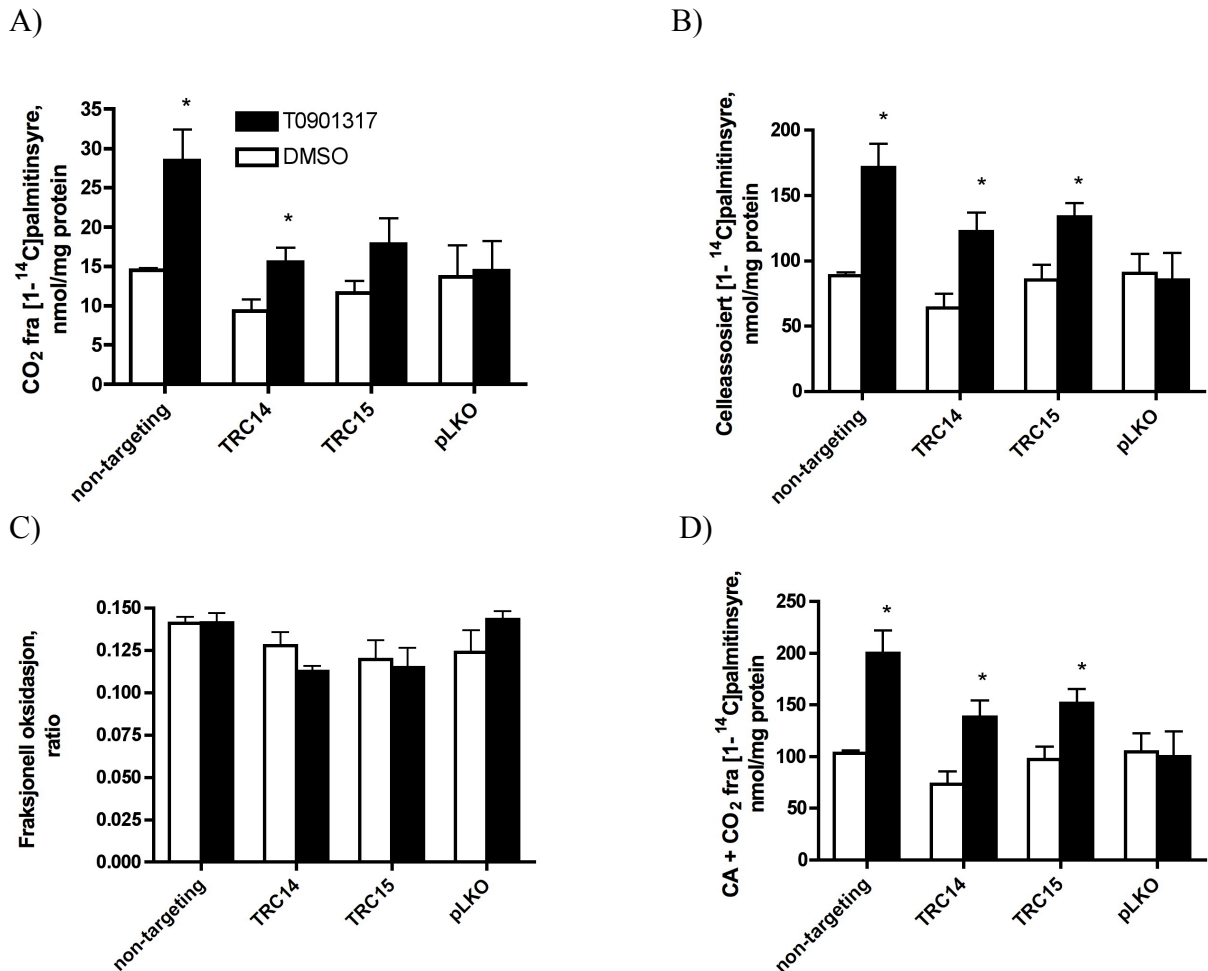
av behandlingene. Celleassosiert radioaktivitet og totalopptaket ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) av palmitinsyre viste statistisk signifikant økning av T0901317 i myotuber behandlet med non-targeting, men ikke i noen av de andre behandlingene (figur 3.6 B, D). T0901317 reduserte den fraksjonelle oksidasjonen av non-targeting i forhold til DMSO. Det var ingen signifikant endring av fraksjonell oksidasjon av myotuber behandlet med shRNA mot LXR β (figur 3.6 C).



Figur 3.6: Effekt av forbehandling med T0901317 og DMSO i 24 timer etter behandling med RNAi mot LXR β . Figuren viser effekten på fettsyremetabolismen med og uten T0901317-forbehandling etter LXR β -utslokking. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i 4 timer med [$1-^{14}\text{C}$]palmitinsyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM) i akuttmedium. Det er gjort 4 uavhengige forsøk ($n=4$). Resultatet viser de relative verdiene til CO_2 (A), CA (B), $\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$ (C) og CO_2+CA (D). * $P \leq 0,05$ mot DMSO. Gjennomsnittsverdien for CO_2 og CA etter behandling med non-targeting er $6,9 \pm 1,1$ og $31,9 \pm 9,6$ nmol/mg protein, henholdsvis.

Resultatene etter 48 timers forbehandling med T0901317 viste signifikant økning i radioaktivt CO_2 med T0901317 i non-targeting og TRC14 (figur 3.7 A). Celleassosiert palmitinsyre og totalopptaket reflekterer CO_2 -resultatene og viste en signifikant T0901317-indusert økning hos samtlige behandlinger bortsett fra pLKO-behandlede myotuber (figur

3.7 B, D). Den fraksjonelle oksidasjonen ($\text{CO}_2/(\text{CA} + \text{CO}_2)$) viste ingen signifikant endring i de ulike behandlingene med DMSO, men det var en tendens til at T0901317 reduserte den fraksjonelle oksidasjonen i myotuber behandlet med RNAi mot LXR β (figur 3.7 C).

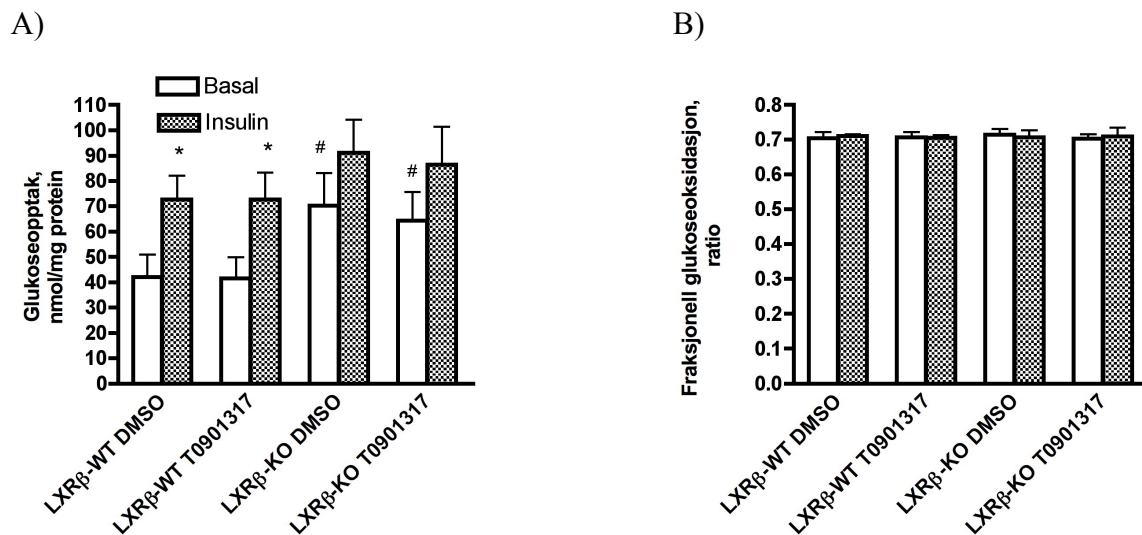


Figur 3.7: Effekten av forbehandling av 1 μM T0901317 og 0,1 % DMSO i 48 timer etter RNAi-behandling. Figuren viser dataene (nmol/mg protein) fra henholdsvis CO₂ (A), CA (B) og ulike kombinasjoner av disse (C, D). De humane myotubene ble satt under CO₂-trapperen i 4 timer med [1-¹⁴C]palmitinsyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM) i akuttmedium. Det er gjort 1 forsøk med 4 paralleller (n = 1). Verdiene er representert som gjennomsnittet av parallellene \pm SEM, *P \leq 0,05 mot DMSO.

3.1.5 Glukoseopptak og –oksidasjon i skjelettmuskelceller fra LXR β -KO- og WT-mus

LXR β -KO-mus har tidligere vist å utvikle hyperglykemi og insulinresistens på diett med høyt fettinnhold [99]. Derfor var det ønskelig å studere nærmere oksidasjon og opptak av glukose i myotuber fra LXR β -KO- og LXR β -WT-mus. Forsøkene med LXR β -KO- og WT-

musceller er gjort i samarbeid med Nina P. Hessvik, og er også beskrevet i en artikkel [73] (figur 3.8). Etter forbehandling i 48 timer med T0901317 eller DMSO, ble cellene inkubert med D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose under CO_2 -trapperen i 4 timer. Glukoseopptaket (CO_2+CA) i LXR β -WT-musemyotuber med forbehandling T0901317 og DMSO, viste signifikant økning i glukoseopptaket ved tilsetning av akutt insulin med henholdsvis $43,4\pm 5,0\%$ og $44,1\pm 4,9\%$. Det insulinstimulerte glukoseopptaket for LXR β -KO-musemyotuber var økt men ikke signifikant. Basalnivået for glukoseopptaket i myotubene var signifikant økt i LXR β -KO i forhold til LXR β -WT med en økning på henholdsvis $30,4\pm 16\%$ og $29,4\pm 13,4\%$ for DMSO- og T0901317-behandlede myotuber (figur 3.8 A). Forbehandling med T0901317 hadde ingen effekt på glukoseopptaket. Fraksjonell glukoseoksidasjon ($\text{CO}_2/\text{CO}_2+\text{CA}$) viste ingen forskjell for noen av behandlingene (figur 3.8 B).

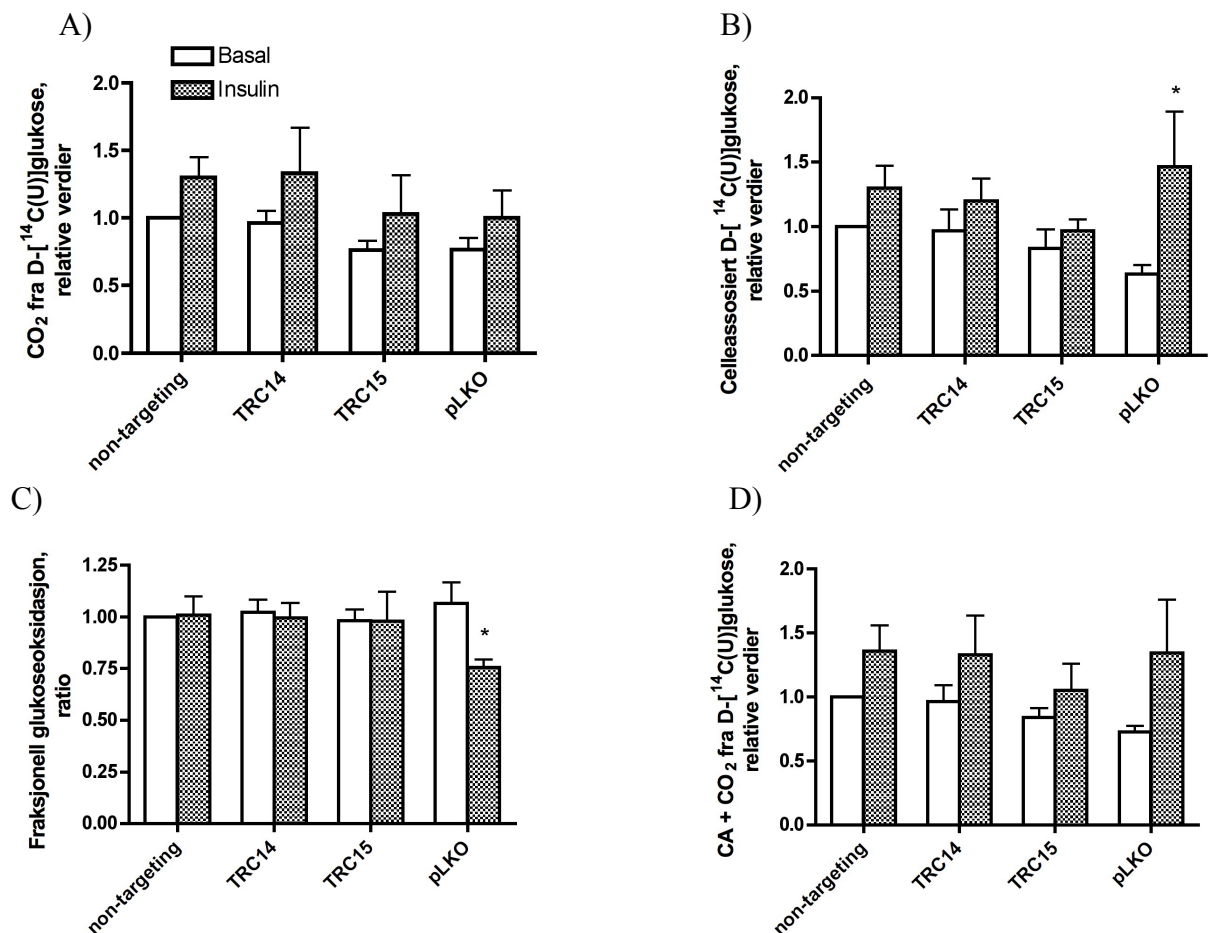


Figur 3.8: Glukoseopptak og -oksidasjon i myotuber fra LXR β -WT- og -KO-mus. Figuren viser glukoseopptaket (A) og fraksjonell oksidasjon av glukose (B). Myotubene fra mus ble dyrket og differensiert som beskrevet i 2.2.2. Det ble forbehandling i to dager med 0,1 % DMSO eller 1 μM T0901317, før myotubene ble inkubert med D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 100 μM) i trapperen i 4 timer med og uten 1 μM insulin (se substrat-oksidasjonsmetoden 2.5). * $P\leq 0,05$ mot basal, # $P\leq 0,05$ mot WT basal.

3.1.6 Opptak og oksidasjon av glukose etter LXR β -utslokking i humane myotuber

I figur 3.8 ble det vist at det basale glukoseopptaket var økt og den relative insulinresponsen redusert i skjelettmuskelceller fra LXR β -KO-mus. Det var også gjort studier hvor det var vist at LXR-agonist T0901317 påvirker mRNA-ekspresjonen til GLUT-1 og GLUT-4 [70]. Det var derfor interessant å se om LXR β -utslokking med RNAi nedsetter insulinresponsen

og øker basaloopptaket av glukose på samme måte som i LXR β -KO-mus. Myotubene ble behandlet i 24 timer med RNAi mot LXR β i transduksjonsmedium. Etter 24 timer ble transduksjonsmedium skiftet til differensieringsmedium. Differensieringsmediet stod i ytterligere 24 timer til forsøksdagen som beskrevet i materialer og metoder (2.3). Myotubene ble på forsøksdagen tilsatt akuttmedium med D-[¹⁴C(U)]glukose og substratoksidasjonsmetoden utført. Resultatene viste ingen signifikant forskjell på oksidasjonen (CO₂) mellom myotuber behandlet med RNAi mot LXR β og kontrollene (non-targeting og pLKO) verken med eller uten insulin (figur 3.9 A). Det totale glukoseopptaket viste ingen signifikant endring etter LXR β -utslokking (figur 3.9 D). Det var en tendens til effekt av insulin ved samtlige behandlinger på opptak og oksidasjon av glukose (figur 3.9 A, B). pLKO-behandlede myotuber viste signifikant økt celleassosiert radioaktivitet ved insulinstimulering (figur 3.9 B). I tillegg var det redusert fraksjonell oksidasjon ved insulinstimulering hos pLKO-behandlede myotuber (figur 3.9 D).



Figur 3.9 : Glukoseopptak og -oksidasjon etter behandling med RNAi mot LXR β . Figuren viser CO₂ (A), CA (B), CO₂+CA (D) og fraksjonell glukoseoksidasjon (C). På forsøksdagen ble myotubene tilsatt D-[¹⁴C(U)]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M) i akuttmediet og inkubert i 4 timer under CO₂-trapperen. Resultatet viser relative verdier fra 3 uavhengige forsøk (n=3) med donor 17 (LD 17). *P \leq 0,05 mot basal. Gjennomsnittet av basalverdien for non-targeting på CO₂ og CA er henholdsvis 3,7 \pm 1,8 (SEM) og 5,2 \pm 2,7 (SEM) nmol/mg protein.

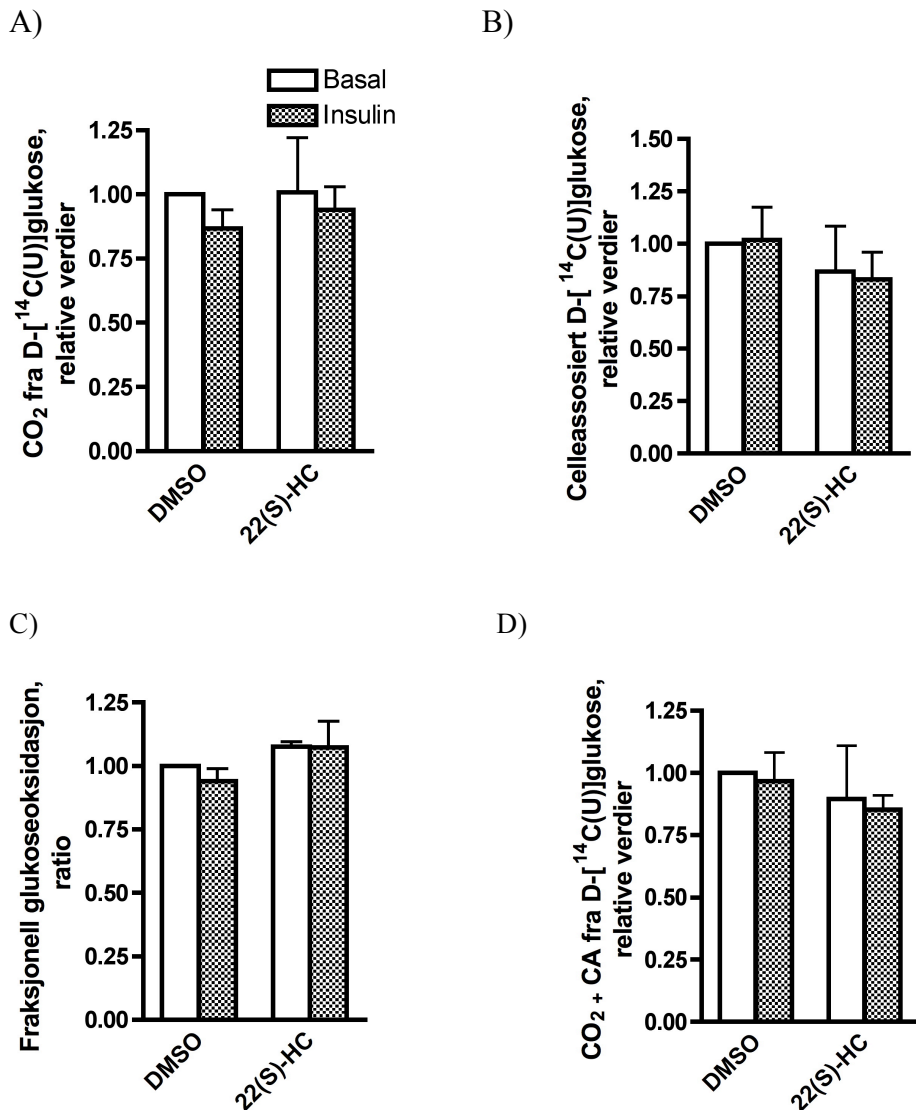
3.2 Effekter av 22(S)-HC på glukosemetabolismen og metabolsk fleksibilitet

3.2.1 Effekter av 22(S)-HC på insulinstimulert glukosemetabolisme

I oppgaven ble det vist at blant annet LXR β -KO-mus endret basalnivået av glukoseopptak og fikk redusert insulinstimulert glukoseopptak i forhold til WT-mus. Det var derfor interessant å studere om LXR-modulatoren 22(S)-HC som i noen tilfeller oppfører seg som en LXR-

antagonist, ga de samme effektene på insulinstimulert glukoseopptak i humane myotuber sett hos LXR β -KO-mus.

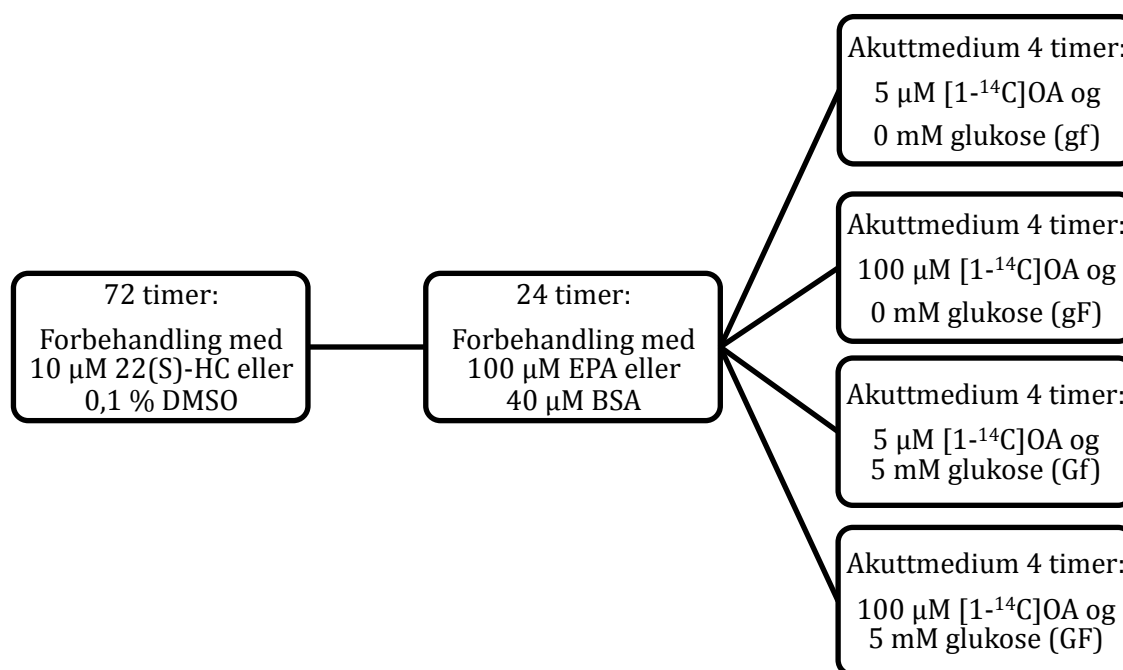
Resultatene fra Kase et al. [55] ble her reproduisert ved at basalnivået ikke endret seg statistisk signifikant mot DMSO hos friske donorer. Det var ingen endring i insulinstimulert glukoseopptak og –oksidasjon mellom DMSO og 22(S)-HC (figur 3.10 A, B, C, D). Det ble ikke observert noen insulineffekt i DMSO og 22(S)-HC behandlede myotuber.



Figur 3.10: Effekter av 22(S)-HC på insulinstimulert glukoseopptak og -oksidasjon. Figuren viser relative verdier fra 4 uavhengige forsøk (n = 4). Humane myotuber ble forbehandlet i 4 dager med 10 μ M 22(S)-HC eller 0,1 % DMSO for deretter å bli inkubert i trapperen med D-[¹⁴C(U)]glukose i 4 timer. Verdiene er normalisert med DMSO basal, hvor gjennomsnittet av basalverdier for DMSO på CO₂ og CA er henholdsvis $9,2 \pm 2,1$ (SEM) og $11,1 \pm 4,6$ (SEM) nmol/mg protein.

3.2.2 Effekter av forbehandling med 22(S)-HC, EPA og EPA+22(S)-HC på fettsyreoksidasjon og –opptak.

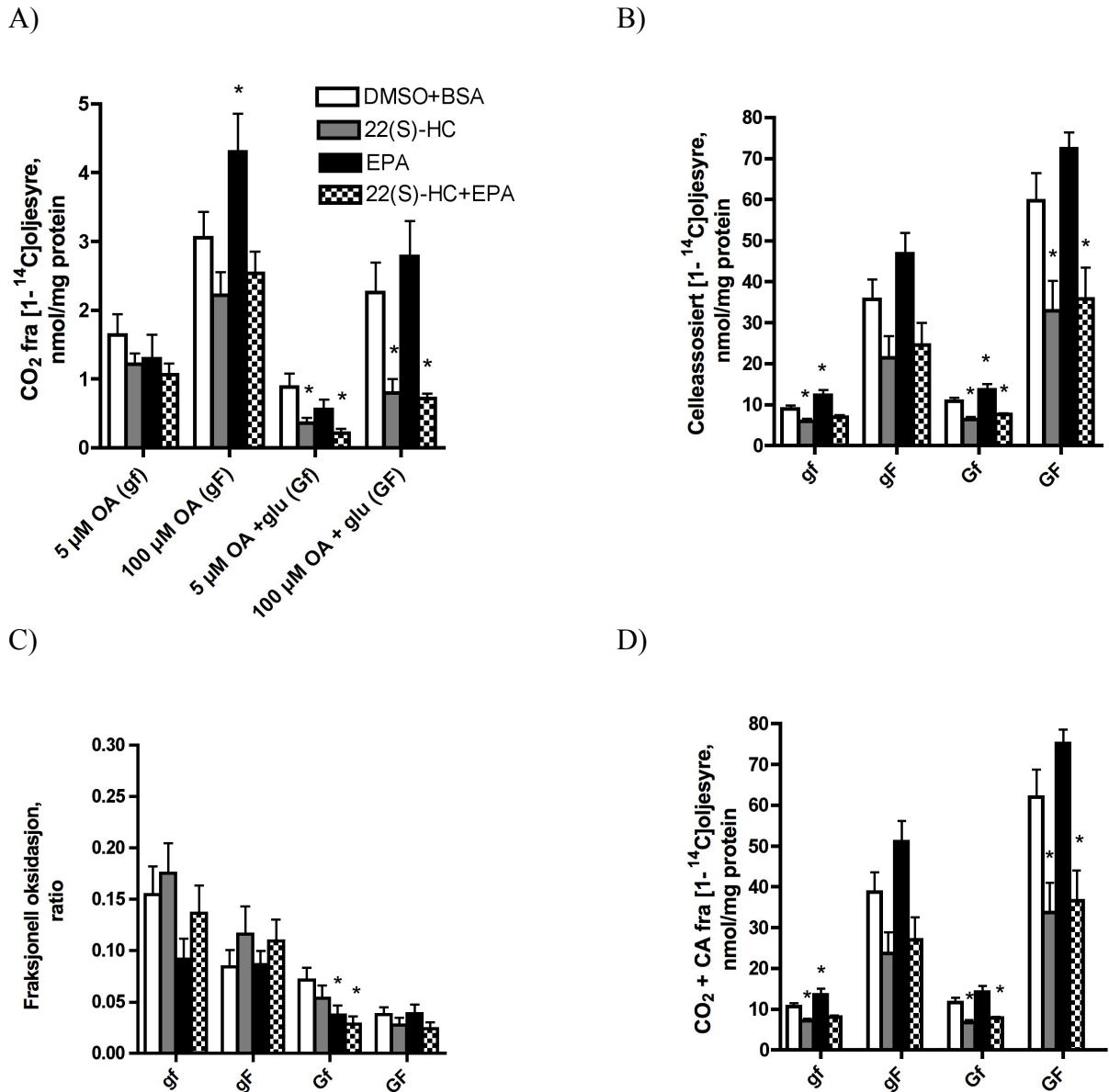
I andre del av oppgaven var ønskelig å studere opptak og oksidasjon av ulike konsentrasjoner av oljesyre i humane skjelettmuskelceller ved forbehandling med 22(S)-HC i fravær og nærvær av EPA. Dette ble gjort ved å inkubere myotuber på forsøksdag i 4 timer under CO₂-trapperen med ulike glukose- og oljesyrekonsentrasjoner. Resultatene ble senere brukt til å beregne *in vitro* parametre omtalt i avsnitt 3.2.3. For- og akuttbehandlingen ble tilsatt myotubene som vist i figur 3.11 (figur 3.11).



Figur 3.11: Skjematisk oversikt av for- og akuttbehandling. Myotubene ble forbehandlet i 72 timer med 22(S)-HC og 24 timer med EPA. Kontrollene for 22(S)-HC og EPA var henholdsvis 0,1 % DMSO og 40 µM BSA. Akuttmediet er representert som gf, gF, Gf og GF og ble tilsatt myotubene på forsøksdagene og inkubert i 4 timer i CO₂-trapperen som beskrevet i materialer og metoder (substratoksidasjonsmetoden 2.5.1).

Det er tidligere vist at EPA-forbehandling øker oljesyreopptaket i humane skjelettmuskelceller [37], og dette ble reproduert her ved signifikant økt celleassosiert radioaktivitet av 5 µM oljesyrekonsentrasjon med og uten glukose (figur 3.12 B). Totalopptaket (CO₂ + CA) av akuttbehandling med 5 µM oljesyre (gf) ga signifikant økning av forbehandling med EPA (figur 3.12 D). Resultatene fra oljesyreoksidasjonen (CO₂) viste statistisk signifikant redusert oljesyreforbrenning ved 22(S)-HC og 22(S)-HC + EPA i

nærvær av 5 mM glukose (GF, Gf) (figur 3.12 A). Den fraksjonelle oksidasjonen var signifikant redusert av EPA og 22(S)-HC + EPA ved 5 μ M OA og 5 mM glukose (Gf) (figur 3.12 C).



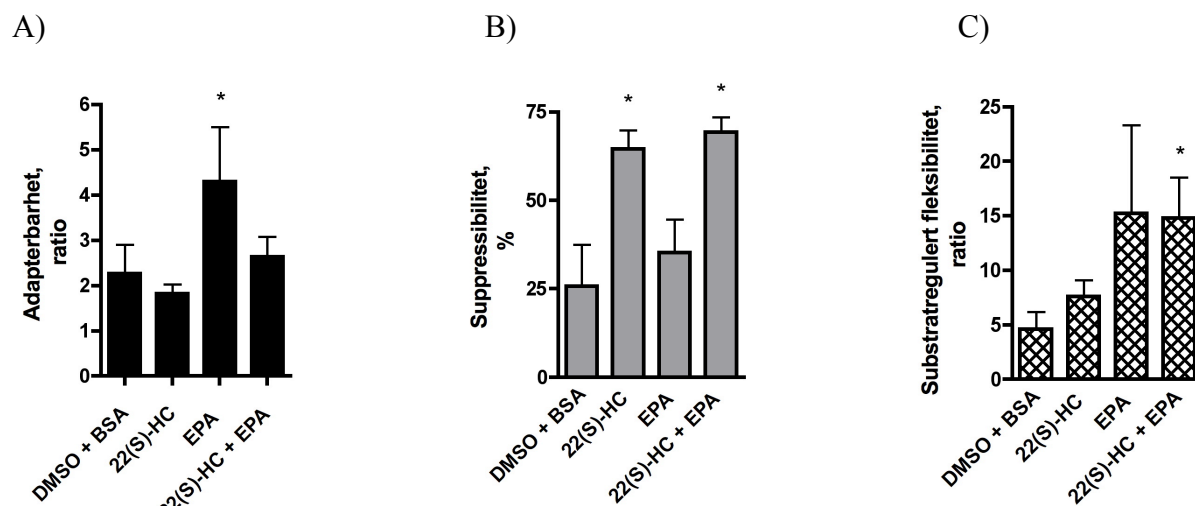
Figur 3.12: Effekter av forbehandling med 22(S)-HC, EPA og EPA + 22(S)-HC på fettsyreopptak og – oksidasjon ved ulike konsentrasjoner av [1-¹⁴C]OA med og uten glukose. Myotubene ble på forsøksdagen inkubert i CO₂-trapperen med [1-¹⁴C]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M eller 0,273 μ Ci/ml, 5 μ M) med eller uten 5 mM glukose. A) og C) reflekterer henholdsvis oksidasjon og oksidasjon i forhold til totalopptaket av oljesyre. B) og D) representerer celleassosiert radioaktivitet og totalopptaket av oljesyre. *P \leq 0,05 mot kontroll (40 μ M BSA og 0,1 % DMSO), n=5.

3.2.3 Metabolske parametre etter forbehandling med 22(S)-HC, EPA og 22(S)-HC+EPA

In vitro metabolske parametre som suppressibilitet, adapterbarhet og substratregulert fleksibilitet er tidligere beskrevet i oppgaven, Ukropcova et al. og Hessvik et al. [27, 34]. Myotubenes evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt konsentrasjon av fettsyre kalles adapterbarhet. Adapterbarheten beregnes ut fra [^{14}C] CO_2 som ratio mellom høy og lav fettsyrekonsentrasjon [CO_2 ved 100 μM OA/ CO_2 ved 5 μM OA]. Det var signifikant økt adapterbarhet ved forbehandling med EPA (figur 3.13 A) i samsvar med tidligere funn [34].

Suppressibiliteten betegner evnen glukose har til å undertrykke fettsyrenes oksidasjon. Formelen for suppressibilitet er $[(1 - (\text{CO}_2 \text{ ved } 100 \mu\text{M OA} + 5 \text{ mM glukose} / \text{CO}_2 \text{ ved } 100 \mu\text{M OA})) * 100 (\%)]$. Forbehandling med 22(S)-HC og 22(S)-HC + EPA ga signifikant økning mot DMSO + BSA (kontroll) og økte suppressibiliteten med 150 % (henholdsvis $P=0,04$ og $P=0,03$). EPA viste ingen signifikant forskjell fra DMSO + BSA (figur 3.13 B).

Substratregulert fleksibilitet beskriver evnen myotubene har til å øke fettsyreoksidasjonen i et skifte fra en situasjon med lavt fettinnhold og høyt glukoseinnhold etter et måltid til høyt fettinnhold og lavt glukoseinnhold ved faste. Parameteren blir beregnet ut fra ratioen $[(\text{CO}_2 \text{ ved } 5 \mu\text{M OA} + 5 \text{ mM glukose}) / \text{CO}_2 \text{ ved } 100 \mu\text{M OA}]$. Resultatene fra forsøkene viste signifikant økt substratregulert fleksibilitet i kombinasjonsbehandlingen 22(S)-HC + EPA mot DMSO + BSA, og det var i tillegg en tendens til økning ved forbehandling behandling med EPA mot DMSO + BSA (figur 3.13 C).



Figur 3.13: Metabolske parametre ved forbehandling av 22(S)-HC, EPA og EPA + 22(S)-HC. Cellene ble forbehandlet i henholdsvis 24 og 72 timer med EPA og 22(S)-HC eller i kombinasjon. Kontrollene bestod av 0,1% DMSO og 40 μ M BSA. Etter forbehandling ble cellene tilsatt akuttmedium og CO₂ ble trappet i 4 timer med [1-¹⁴C]OA (5 μ M eller 100 μ M) med eller uten glukose. Cellene ble høstet i 0,1 M NaOH og radioaktivitet og totalprotein ble målt som beskrevet i materialer og metoder. Data er fra 5 forsøk med 5 ulike donorer. (*P \leq 0,05 mot kontroll , en utvalgs t-test)

4. Diskusjon

4.1 Metodologiske betraktninger ved RNAi

RNAi-behandling har ikke tidligere vært utført på humane myotuber i laboratoriet vårt. Det var derfor av interesse å se om myotubene oppførte seg annerledes ved tilsetning av shRNA og transduksjonsmedium. RNAi-behandlingen ga effekter på tetthet og til tider morfologi til myotubene (se figur 3.2 og 3.3). Det kan være flere årsaker til dette. Det ser ut i fra cellebildene til at shRNA-sekvensen på virusvektoren ikke hadde noen betydning, da non-targeting-, TRC14- og TRC15-behandlede myotuber hadde omtrent lik tetthet som pLKO-behandlede myotuber. Cellebildene av de ulike shRNA-sekvensene non-targeting, TRC14, TRC15 viste som regel lik tetthet av myotuber i både 6- og 96-brønners brett på forsøksdagen.

Initialt ble det testet med ulike partikkelkonsentrasjoner av lentivirus (1 og 2 MOI), uten at dette så ut til å påvirke myotubene. Det er verdt å merke seg at transduksjonsmediet ikke inneholdt føtalt kalveserum (FCS). Føtalt kalveserum inneholder en blanding av vekstfaktorer, hormoner, albumin, transferrin, proteasehemmere etc. og brukes for å etterligne *in vivo* forhold. Fravær av FCS i 24 timer så ikke ut til å ha noen betydning i ett forsøk som ble utført (bilde ikke vist). Forsøket viste ingen forskjell i tetthet av myotuber i transduksjonsmedium med og uten FCS. Et forsøk alene er dog ikke nok til å stadfeste dette.

En annen forskjell på transduksjonsmediet og differensieringsmediet er at transduksjonsmediet inneholdt 8 µg/ml heksadimetrin-bromid. I protokollen for virustransduksjon [81] står det at noen celletyper kan være sensitive for heksadimetrin-bromid og det er derfor mulig at dette kan ha virket cytotoxisk på myotubene. En annen faktor av betydning kan være myotubenes eksponeringstid med heksadimetrin-bromid. Det ble ikke studert hvilken sammenheng det var mellom eksponeringstiden av RNAi, tetthet og effekter. Forsøk med ulike konsentrasjoner av heksadimetrin-bromid samt ulike eksponeringstider med transduksjonsmediet mangler, og kunne være interessant å gjennomføre. Transduksjonsmediet er også uten antibiotika. Dette øker sannsynligheten for både bakterie- og soppinfeksjoner. Visuell inspeksjon av cellene i mikroskop på forsøksdagen bekreftet likevel ikke infeksjon. Den cytotoxiske effekten hadde betydning for proteinverdiene i de funksjonelle forsøkene (figurene 3.6, 3.7 og 3.9). Proteinverdiene

varierte både mellom og innen forsøkene. I tillegg varierte den cytotoksiske reaksjonen fra forsøk til forsøk.

4.2 Effekter av nedsatt LXR β -ekspresjon

Det har tidligere kun vært brukt musemodeller for å studere de ulike LXR-isoformene i skjelettmuskulatur. Det var derfor interessant å studere om det som er funnet i mus også gjelder humane myotuber. Hessvik et al. har vist at LXR β er den dominante isoformen i musemyotuber med tanke på regulering av kolesterol- og lipidmetabolisme [73]. Det er fortsatt uklart hvilken rolle LXR β spiller i kolesterol-, lipid- og glukosemetabolismen i skjelettmuskulatur hos mennesker. Rollen til LXR β ble studert ved å bruke RNAi mot LXR β i humane myotuber. Denne modellen gjør det mulig å studere den ene LXR-isoformens betydning og om de samme effektene er tilstede i humane myotuber som i LXR β -KO myotuber fra mus. Modellen ga ikke en fullstendig LXR β -KO, men reduserte mRNA-ekspresjonen til LXR β med 50-60 %.

Konsentrasjonene av shRNA mot LXR β som ble studert, var henholdsvis 1 og 2 MOI (data ikke vist). 2 MOI ga best reduksjon av mRNA til LXR β og ble derfor brukt i resten av forsøkene. Genetiske studier med RT-real-time-PCR viste at nedsatt LXR β etter behandling med RNAi ikke påvirket basalnivåer av FAS, SREBP-1c og ABCA1 i humane myotuber (figur 3.4). Kase et al. viste at kronisk behandling med T0901317 førte til 4 og 15 gangers økning i mRNA-ekspresjonen av henholdsvis FAS og ABCA1 i humane myotuber [58]. T0901317-effekten på FAS og ABCA1 ble reprodusert i våre forsøk og viste en tendens til mRNA-økning uavhengig av RNAi-behandlingen mot LXR β (figur 3.5). Denne økningen var i motsetning til hva Kase et al. viste, ikke statistisk signifikant. Grunnen til de store variasjonene i forsøkene kan skyldes forbehandlingstiden med T0901317. I våre forsøk forbeholdt vi humane myotuber med 1 μ M T0901317 i 1 døgn mens Kase et al. behandlet i 4 døgn med samme konsentrasjon. Ett døgn med T0901317-eksponeringen kan være for kort tid til å oppnå en tilstrekkelig effekt. Det så imidlertid ut som om den T0901317-induserte økningen i FAS genet var noe redusert i LXR β -utslokkede myotuber (figur 3.5 B). Dette kan tyde på at LXR β spiller en rolle i lipogenesisen i human skjelettmuskulatur, men resultatene i disse forsøkene varierte noe og antall forsøk var få (n=3). Derfor må det flere forsøk til for å bekrefte dette funnet. Det kan være flere grunner til at RNAi mot LXR β ikke

hadde effekt på glukose- og fettsyremetabolismen i humane myotuber. En av grunnene kan være at ”knockdown” med RNAi bare ga 50-60 % reduksjon av mRNA-ekspresjonen til LXR β . Det kan tenkes at det finnes en form for reservereseptorkapasitet hos LXR β . En reseptorreservekapasitet vil si at den biologiske responsen ikke er direkte proporsjonal med reseptortettheten. LXR α kan også være med å utligne effektene sett i forsøkene. LXR α blir på lik linje med LXR β også aktivert av LXR-agonisten T0901317.

I de funksjonelle forsøkene med palmitinsyre (PA) ble det innledningsvis testet forbehandling med T0901317 med ulike forbehandlingstider, henholdsvis 24 og 48 timer. Kase et al. viste at behandling med T0901317 i 4 døgn økte celleassosiert radioaktivitet fra palmitinsyre i humane myotuber, og det var derfor interessant å undersøke hvordan T0901317 påvirket humane myotuber behandlet med RNAi mot LXR β . I disse forsøkene var T0901317-effektene størst ved forbehandlingstid på 48 timer, men det ble ikke sett noen forskjell mellom de ulike RNAi-behandlingene (figur 3.6 sammenlignet med figur 3.7). Det ble fortsatt med 24 timers forbehandlingstid fordi det er mulig at shRNA-effekten svekkes desto lengre forbehandlingen varer. Fettsyreopptaket og oksidasjon ble ikke påvirket av verken 1 μ M T0901317 eller av nedsatt LXR β -ekspresjon med RNAi (figur 3.6).

Studier med T0901317 har vist at LXR er viktig i glukosemetabolismen [70]. Det er i denne oppgaven vist at LXR β i myotuber fra mus påvirker både basalt og insulinstimulert glukoseopptak (figur 3.8). Dette ble vist ved hjelp av myotuber fra LXR β -KO-mus. Nedsatt uttrykk av LXR β i humane myotuber kunne ikke reprodusere disse effektene (figur 3.9). Det var problematisk å få insulineffekt i alle behandlingene, og dette kan trolig reflektere lave GLUT-4-nivåer i humane myotuber. Det er en tydeligere effekt av insulin på glukoseopptak i myotuber fra mus enn fra mennesker. Årsaken til dette er uklar. Det kan også være vanskelig å få frem små forskjeller med substrat-oksidasjonsmetoden. Substrat-oksidasjonsmetoden er en relativt grov metode til å måle opptak og oksidasjon av ulike radiomerkede substrater på, og det kan derfor være vanskelig å detektere små forskjeller. Artsesifikke forskjeller mellom mus og menneske kan forårsake ulike effekter på fettsyre- og glukosemetabolismen.

I forsøkene er det hovedsakelig brukt to negative kontroller, henholdsvis non-targeting og pLKO. Forskjellen på disse kontrollene er at non-targeting har shRNA-sekvenser som vil aktivere RISC-komplekset og RNAi-veien, mens pLKO ikke har dette. I noen forsøk skiller pLKO seg ut (se figur 3.5 A, 3.7 A og B, 3.9) i forhold til non-targeting. Dette kan tyde på at aktivering av RISC-komplekset og RNAi-veien kan påvirke resultatene.

4.3 Metabolsk fleksibilitet og effekter av 22(S)-hydroksykolesterol

Metabolsk fleksibilitet er karakterisert ved muskelcellens evne til å bytte fra lipid- til glukoseoksidasjon etter et måltid. Redusert fleksibilitet forekommer ofte sammen med insulinresistens, T2D og fedme [25-27]. Det ble i oppgaven tilsatt ulike konsentrasjoner av oljesyre og glukose for å simulere fastende og postprandial tilstand for beregning av *in vitro* metabolske parametre. *In vitro* parametre som adapterbarhet, suppressibilitet og substratregulert fleksibilitet, er hjelpemidler til å reflektere graden av metabolsk fleksibilitet *in vivo*.

Hessvik et al. viste at EPA økte *in vitro* adapterbarhet, suppressibilitet og substratregulert fleksibilitet i humane myotuber [34]. I tillegg ble det vist at behandling med LXR-agonisten T0901317 ikke ga effekter på *in vitro* parametrene alene, men motvirket EPAs effekter på adapterbarhet og suppressibilitet [34]. Det var derfor interessant å se hvordan LXR-modulatoren 22(S)-HC påvirket *in vitro* parametre for metabolsk fleksibilitet. Rationale for å studere 22(S)-HC-effekter var at LXR-ligander kanskje kan påvirke metabolsk fleksibilitet siden LXR regulerer viktige gener i lipid- og glukosemetabolismen. Resultatene til Hessvik et al. med EPA ble i oppgaven reproduisert (figur 3.13). Forbehandling med 22(S)-HC alene og i kombinasjon med EPA nedsatte CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet av OA (Se figur. 3.12). Effekten ble ytterligere forsterket i nærvær av 5 mM glukose. Grunnen til nedsatt opptak av OA ved forbehandling med 22(S)-HC er trolig en hemming av CD36-uttrykk, i tråd med de tidligere funnene til Kase et al. [58]. 22(S)-HC motvirket EPAs gunstige effekter på OA-oksidasjonen ved å redusere dens virkning på samtlige behandlinger (figur 3.12 B). På opptak og oksidasjon av glukose viste 22(S)-HC ingen forskjeller i forhold til kontroll, noe som samsvarer med resultatene til Kase et al. [55].

In vitro adapterbarhet er vist å være positivt korrelert med insulinsensitivitet *in vivo* [27], men parameteren ble ikke påvirket av 22(S)-HC. Adapterbarheten var signifikant økt ved forbehandling med EPA. Det ser ut til at det er et samspill mellom EPA og 22(S)-HC hvor EPAs effekter på *in vitro* adapterbarhet reduseres når disse substansene kombineres.

In vitro suppressibilitet sier noe om hvordan akutt tilført glukose undertrykker fettsyreoksidasjon. Behandling med 22(S)-HC alene økte suppressibiliteten med 150 %. EPA påvirket ikke suppressibiliteten signifikant slik Hessvik et al. viste [34], men 22(S)-HC sammen med EPA økte suppressibiliteten på samme måte som 22(S)-HC gitt alene.

22(S)-HCs effekter på suppressibilitet kan tyde på gunstige effekter siden myotubene blir mer følsomme for glukosesuppresjon av fettsyreoksidasjonen ved forbehandling med 22(S)-HC. Ukropcova et al. har i midlertidig vist en annen sammenheng mellom *in vitro* suppressibilitet og *in vivo* metabolske karakteristika. En invers korrelasjon mellom *in vitro* suppressibilitet og *in vivo* insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet og en positivt korrelasjon med kroppsfett og fastende nivåer av FFA ble vist [27]. Det er verdt å merke seg at sammenligningen er gjort under ulike forhold. *In vivo* forsøkene blir gjort i et komplekst samspill mellom organer og hormoner mens dette ikke lar seg reproducere i *in vitro* forhold. Tidligere er det vist at EPA motvirker utviklingen av insulinresistens ved fettrik diett [40, 41], men øker *in vitro* suppressibiliteten [34]. Det er fortsatt uklart om økt suppressibilitet er positiv eller negativt for metabolsk fleksibilitet og det trengs flere studier for å kartlegge sammenhengen.

I *in vitro* substratregulert fleksibilitet ser det dog ikke ut til at 22(S)-HC påvirker EPAs effekter i samme grad, fordi både ratioen er høyere etter behandling med EPA og EPA + 22(S)-HC enn etter behandling med 22(S)-HC alene.

5. Konklusjon

I denne oppgaven ble det etablert en metode for LXR β -utslokking med RNAi i humane myotuber. LXR β -ekspresjonen ble med shRNA-sekvensene TRC14 og TRC15 redusert med 50-60 %. Reduksjonen av LXR β -uttrykket påvirket ikke mRNA-ekspresjonen til målgene ABCA1, FAS og SREBP-1c som er viktige regulatoriske proteiner i henholdsvis kolesterol-, lipid- og glukosemetabolismen. Forsøkene har vist en tendens til reduksjon av T0901317-indusert økning i mRNA-ekspresjonene til FAS ved RNAi-behandling mot LXR β . Dette tyder på at LXR β spiller en rolle i lipogenesisen i humane myotuber. For å bekrefte dette trengs det flere forsøk. I de funksjonelle studier med hensikt å studere opptak og oksidasjon av fettsyrer og glukose ble ikke humane myotuber påvirket av LXR β -utslokking med RNAi. Manglende effekt kan tyde på en reseptorreservekapasitet hos LXR β eller at LXR α interfererer. En annen faktor for mangel på effekt kan være at substratoksidasjonsmetoden er for grov, noe som gjør det vanskelig å detektere små endringer. Det ble observert en cytotoxisk reaksjon hos myotubene behandlet med transduksjonsmediet, uavhengig av shRNA-sekvens. Det mistenkes at høye konsentrasjonen av heksadimetrin-bromid var årsaken til den observerte cytotoxiske reaksjonen.

Tidligere studier med LXR-agonisten T0901317 viste ingen effekter på *in vitro* parametre på metabolsk fleksibilitet alene, men motvirket EPAs gunstige effekter [34]. Det var interessant å studere om LXR-modulatoren 22(S)-HC hadde motsatt effekt av T0901317 og eventuelt virket synergistisk sammen med EPA. Behandlingen med 22(S)-HC ga motsatt effekt av T0901317 på *in vitro* parameteren suppressibilitet og økte denne med 150 % med og uten EPA. Dette kan tyde på en gunstig effekt på metabolsk fleksibilitet *in vivo*.

Kildeliste

1. WHO, *World Health Organization: Diabetes Programme*. <http://www.who.int/diabetes/facts/en/index.html>, 2006.
2. Patti, M.E. and S. Corvera, *The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes*. *Endocr Rev*, 2010.
3. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet*, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
4. Barroso, I., et al., *Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension*. *Nature*, 1999. **402**(6764): p. 880-3.
5. Grant, S.F., et al., *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2006. **38**(3): p. 320-3.
6. Horikawa, Y., et al., *Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*. *Nat Genet*, 2000. **26**(2): p. 163-75.
7. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *DIABETES AND CARDIOVASCULAR-DISEASE - FRAMINGHAM-STUDY*. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 1979. **241**(19): p. 2035-2038.
8. Younis, N., H. Soran, and S. Farook, *The prevention of type 2 diabetes mellitus: recent advances*. *QJM*, 2004. **97**(7): p. 451-5.
9. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*. 2007.
10. Rang, H.P., *Pharmacology*. 2003, Edinburgh: Churchill Livingstone. XII, 797 s.
11. Gastaldelli, A., et al., *Insulin resistance, adipose depots and gut: Interactions and pathological implications*. *Dig Liver Dis*, 2010.
12. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(2): p. 147-52.
13. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
14. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. *Curr Diab Rep*, 2006. **6**(3): p. 177-81.
15. Chow, L., A. From, and E. Seaquist, *Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction*. *Metabolism*, 2010. **59**(1): p. 70-85.
16. Zurlo, F., et al., *Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(5): p. 1423-7.
17. Kelley, D.E., B.H. Goodpaster, and L. Storlien, *Muscle triglyceride and insulin resistance*. *Annu Rev Nutr*, 2002. **22**: p. 325-46.
18. Dulloo, A.G., et al., *Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. **28 Suppl 4**: p. S29-37.
19. Tremblay, F., M.J. Dubois, and A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. *Frontiers in Bioscience*, 2003. **8**: p. D1072-D1084.
20. Shulman, G.I., et al., *Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *N Engl J Med*, 1990. **322**(4): p. 223-8.
21. DeFronzo, R.A., et al., *The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization*. *Diabetes*, 1981. **30**(12): p. 1000-7.

22. Nelson, D.L., A.L. Lehninger, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 2005, New York: Freeman. 1119, [91] s.
23. Steiber, A., J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective*. *Mol Aspects Med*, 2004. **25**(5-6): p. 455-73.
24. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2005. **183**(1): p. 31-41.
25. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
26. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): p. 677-83.
27. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1934-41.
28. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1130-41.
29. Zurlo, F., et al., *Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(5 Pt 1): p. E650-7.
30. Marra, M., et al., *Fasting respiratory quotient as a predictor of weight changes in non-obese women*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998. **22**(6): p. 601-3.
31. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. *Lancet*, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
32. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(3): p. E578-91.
33. Garland, P.B., P.J. Randle, and E.A. Newsholme, *Citrate as an Intermediary in the Inhibition of Phosphofructokinase in Rat Heart Muscle by Fatty Acids, Ketone Bodies, Pyruvate, Diabetes, and Starvation*. *Nature*, 1963. **200**: p. 169-70.
34. Hessvik, N.P., et al., *Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids*. *J Lipid Res*, 2010.
35. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. *Diabetes*, 1997. **46**(6): p. 983-8.
36. Kelley, D.E., *Skeletal muscle triglycerides: an aspect of regional adiposity and insulin resistance*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 135-45.
37. Aas, V., et al., *Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(2): p. 366-74.
38. Storlien, L.H., et al., *Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats*. *Am J Physiol*, 1986. **251**(5 Pt 1): p. E576-83.
39. Holness, M.J., et al., *Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): p. 775-81.
40. Rustan, A.C., B.E. Hustvedt, and C.A. Drevon, *Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat*. *J Lipid Res*, 1993. **34**(8): p. 1299-309.
41. Storlien, L.H., et al., *Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats*. *Science*, 1987. **237**(4817): p. 885-8.
42. Wensaas, A.J., et al., *Fatty acid incubation of myotubes from humans with type 2 diabetes leads to enhanced release of beta-oxidation products because of impaired*

- fatty acid oxidation: effects of tetradecylthioacetic acid and eicosapentaenoic acid.* Diabetes, 2009. **58**(3): p. 527-35.
43. Janowski, B.A., et al., *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.* Nature, 1996. **383**(6602): p. 728-31.
 44. Alberti, S., K.R. Steffensen, and J.A. Gustafsson, *Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta.* Gene, 2000. **243**(1-2): p. 93-103.
 45. Apfel, R., et al., *A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 7025-35.
 46. Song, C., et al., *Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10809-13.
 47. Willy, P.J., et al., *LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway.* Genes Dev, 1995. **9**(9): p. 1033-45.
 48. Repa, J.J. and D.J. Mangelsdorf, *The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 459-81.
 49. Lehmann, J.M., et al., *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway.* J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3137-40.
 50. Forman, B.M., et al., *The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10588-93.
 51. Schultz, J.R., et al., *Role of LXRs in control of lipogenesis.* Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2831-8.
 52. Terasaka, N., et al., *T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice.* FEBS Lett, 2003. **536**(1-3): p. 6-11.
 53. Cao, G., et al., *Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis.* J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 1131-6.
 54. Grefhorst, A., et al., *Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(5): p. E829-38.
 55. Kase, E.T., et al., *Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals.* Diabetologia, 2007. **50**(10): p. 2171-80.
 56. Cozzone, D., et al., *Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells.* Diabetologia, 2006. **49**(5): p. 990-9.
 57. Svensson, S., et al., *Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation.* EMBO J, 2003. **22**(18): p. 4625-33.
 58. Kase, E.T., et al., *22-Hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes.* Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(12): p. 1515-22.
 59. Russell, D.W. and K.D. Setchell, *Bile acid biosynthesis.* Biochemistry, 1992. **31**(20): p. 4737-49.
 60. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha.* Cell, 1998. **93**(5): p. 693-704.
 61. Alberti, S., et al., *Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice.* J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 565-73.

62. Barbier, O., et al., *Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation*. Mol Cell Biochem, 2009. **326**(1-2): p. 3-8.
63. Basso, F., et al., *Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations*. J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 296-302.
64. Wellington, C.L., et al., *Alterations of plasma lipids in mice via adenoviral-mediated hepatic overexpression of human ABCA1*. J Lipid Res, 2003. **44**(8): p. 1470-80.
65. Timmins, J.M., et al., *Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1333-42.
66. Christiansen-Weber, T.A., et al., *Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency*. Am J Pathol, 2000. **157**(3): p. 1017-29.
67. McNeish, J., et al., *High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4245-50.
68. Geyeregger, R., M. Zeyda, and T.M. Stulnig, *Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(5): p. 524-39.
69. Repa, J.J., et al., *Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2819-30.
70. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1108-15.
71. Stulnig, T.M., et al., *Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(6): p. 1299-305.
72. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1452-61.
73. Hessvik, N.P., et al., *LXR{beta} is the dominant LXR subtype in skeletal muscle regulating lipogenesis and cholesterol efflux*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(3): p. E602-13.
74. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
75. Tuschl, T., *RNA interference and small interfering RNAs*. ChemBiochem, 2001. **2**(4): p. 239-45.
76. Misquitta, L. and B.M. Paterson, *Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1451-6.
77. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.
78. Tijsterman, M., R.F. Ketting, and R.H. Plasterk, *The genetics of RNA silencing*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 489-519.
79. Burns, J.C., et al., *Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
80. An, D.S., et al., *Efficient lentiviral vectors for short hairpin RNA delivery into human cells*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(12): p. 1207-12.
81. Sigma-aldrich, *Product information MISSION® shRNA Control Transduction Particles*. sigma-aldrich.com (cited: 25.01.2010), 2009.

82. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
83. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 343-9.
84. Matranga, C., et al., *Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes*. Cell, 2005. **123**(4): p. 607-20.
85. Rand, T.A., et al., *Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation*. Cell, 2005. **123**(4): p. 621-9.
86. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
87. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
88. Rao, D.D., et al., *siRNA vs. shRNA: similarities and differences*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(9): p. 746-59.
89. McAnuff, M.A., G.R. Rettig, and K.G. Rice, *Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo*. J Pharm Sci, 2007. **96**(11): p. 2922-30.
90. Devroe, E. and P.A. Silver, *Retrovirus-delivered siRNA*. BMC Biotechnol, 2002. **2**: p. 15.
91. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
92. Xia, H., et al., *siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(10): p. 1006-10.
93. Naldini, L., *Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(5): p. 457-63.
94. Davis, H.E., et al., *Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation*. Biophys J, 2004. **86**(2): p. 1234-42.
95. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 735-44.
96. Gaster, M., H. Beck-Nielsen, and H.D. Schroder, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 726-34.
97. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
98. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
99. Korach-Andre, M., et al., *Separate and overlapping metabolic functions of LXR{alpha} and LXR{beta} in C57Bl/6 female mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009.

Appendiks

1. Celledyrking

1.1

Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
50 ml FCS (Foetal Calf serum)
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone

1.2

Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
10 FCS (Foetal Calf serum)
10 ml Ultrosor G
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone

1.3

Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
10 FCS (Foetal Calf serum)
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone
25 pmol insulin

1.4

Transduksjonsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
25 pmol insulin
4 ml 1 µg/ml hexadimethrine bromide

1.5

Proliferasjonsmedium til mus

500 ml Ham's F-10 Glutamax nutrient mixture
20 % (v/v) føtalt storfeserum
5 ng/ml bFGF (βbasic fibroblast growth factor)

1.6

Differensieringsmedium til mus

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I
2 % (v/v) hesteserum

2. cDNA-syntese og real-time PCR

2.1

Reaksjonsmedium til cDNA syntese

10 µl RNA (prøve)
3,2 µl DEPC-dH₂O
2 µl 10xRTbuffer
0,8 µl 25X dNTP mix (100mM)
2 µl 10X Random Primers
1 µl RNase inhibitor
1 µl Multiscribe Reverse Transcriptase

2.2

Medium til PCR-reaksjon

2,5 µl fortynnet cDNA prøve
12,5 µl 2 x SYBR Green Master Mix
0,25 µl 30 µM Primer F (forward)
0,25 µl 30 µM Primer R (reverse)
9,5 µl DEPC-dH₂O

3. Akuttmedier til substratoksidasjonsmetoden (per brønn)

3.1

Palmitinsyre

48,6 µl DPBS-buffer pH 7,2
0,5 µl 100 µCi/ml *PA
0,7 µl 6 mM PA
0,15 µl BSA
0,05 µl karnitin

3.2

D-glukose

50 µl DPBS-buffer pH 7,2
0,05 µl 1 mCi/ml *U-glukose
0,45 µl 10 mM D-glukose
0,21 µl BSA
0,085 µl 600 µM insulin

3.3.1**gf (5 μ M OA, 0 mM glukose)**49,74 μ l DPBS-buffer pH 7,20,15 μ l 100 μ Ci/ml *OA0,06 μ l BSA0,05 μ l karnitin**3.3.2****Gf (5 μ M OA, 5 mM glukose)**49,49 μ l DPBS-buffer pH 7,20,15 μ l 100 μ Ci/ml *OA0,25 μ l 1 M glukose0,06 μ l BSA0,05 μ l karnitin**3.3.3****gF (100 μ M OA, 0 mM glukose)**48,57 μ l DPBS-buffer pH 7,20,5 μ l 100 μ Ci/ml *OA0,68 μ l 6 mM OA0,2 μ l BSA0,05 μ l karnitin**3.3.4****GF (100 μ M OA, 5 mM glukose)**48,07 μ l DPBS-buffer pH 7,20,5 μ l 100 μ Ci/ml *OA0,68 μ l 6 mM OA10 μ l 1 M glukose0,2 μ l BSA0,05 μ l karnitin