

Modifisering av energimetabolisme i humane myotuber ved hjelp av galaktose

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Kaja Kamilla Bogen

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-vitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

November 2010

Modifisering av energimetabolisme i humane myotuber ved hjelp av galaktose

Kaja Kamilla Bogen

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-vitenskaplige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO

November 2010

Veiledere

Professor Arild C. Rustan

Professor G. Hege Thoresen

Stipendiat Nina P. Hessvik

Stipendiat Nataša Nikolić

Forord

Denne masteroppgaven ble til ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2009 til november 2010.

Jeg ønsker å rette en stor takk til mine veiledere, professor Arild C. Rustan, professor G. Hege Thoresen, Nina P. Hessvik og Nataša Nikolić for meget god oppfølging, rådgivning og støtte gjennom hele masteroppgaven. Takk for all entusiasme og kunnskap, samt all hjelp og tips under skriveprosessen. Takk til Nataša Nikolić som løste mysteriet med RNA isolering, og takk til Siril S. Bakke for Mitotracker data.

En stor takk til ingeniørene i 4. etasje som har svart på ulike spørsmål angående arbeid i laboratoriet. Takk til Camilla Stensrud for tillaging av galaktosemedier.

Jeg vil dessuten rette en stor takk til alle medlemmene av MUSKELBUNTEN for kunnskapsrike og interessante ukentlige møter. Jeg vil gjerne takke kollegaene på hovedfagskontoret for produktive samtaler, god hjelp med dataproblemer og mye hygge. Takk til alle som jobber i 4.etasje for et fantastisk hyggelig arbeidsmiljø.

Takk til ”reseptar-gjengen” for støtte, oppmuntring og godt vennskap. Takk til dere som har lest korrektur og kommet med små og store tips underveis i skriveprosessen. Takk til familien min for støtte og motivasjon under hele studiet. En ekstra stor takk til lillesøster Thea som har stilt opp med husvære og ”oppbakking” foran alle eksamener

Blindern, november 2010

Kaja Kamilla Bogen

Innholdsfortegnelse

Summary in english.....	7
Sammendrag.....	9
Forkortelser	11
1 Innledning.....	14
1.1 Diabetes	14
1.2 Insulinresistens i skjelettmuskel	15
1.3 Metabolsk fleksibilitet og glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel	17
1.3.1 Metabolsk fleksibilitet.....	17
1.3.2 Glukosemetabolisme	20
1.3.3 Fettsyremetabolisme.....	21
1.4 Mitokondrier	23
1.4.1 Mitokondrienes rolle i type 2-diabetes.....	23
1.4.2 Frikobler-proteiner	24
1.4.3 Warburg-effekt	25
1.4.4 Modifisering av energimetabolismen.....	27
1.5 Muskelfibertype.....	29
1.5.1 Muskelfibertyper og deres karakteristika.....	29
1.5.2 Regulatorer av fibertype.....	30
1.5.3 Fibertype og insulinresistens.....	31
1.6 Substanser benyttet under inkubering av skjelettmuskelceller.....	32
1.6.1 Galaktose	32
1.6.2 Oljesyre	33
1.6.3 GW501516	34
1.6.4 Karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon.....	34
1.7 Formål med oppgaven	36
2 Materialer og metoder	37
2.1 Materialer.....	37
2.2 Donoropplysninger	38
2.3 Celledyrking	38
2.3.1 Dyrking av humane myoblaster	38
2.3.2 Myoblaster prolifererer og differensierer til humane myotuber.....	39

Innholdsfortegnelse

2.3.3	Forbehandling med oljesyre og GW501516	39
2.3.4	Akuttbehandling med FCCP	39
2.4	Substrat-oksidasjonsmetoden	40
2.4.1	Substrat-oksidasjonsforsøk med fettsyrer, glukose og FCCP	41
2.4.2	Overkryssningsforsøk med oljesyre og glukose.....	42
2.4.3	Kvantifisering av mengde protein	43
2.5	Isolering av RNA og analyse av genekspresjon ved hjelp av revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real time PCR).....	43
2.5.1	Isolering og kvantifisering av RNA	43
2.5.2	Syntese av cDNA	44
2.5.3	Real-time PCR.....	45
2.6	Levende bildebehandling.....	46
2.7	Statistiske analyser	47
3	Resultater.....	48
3.1	Utsåing av myotuber dyrket i galaktose og glukose.....	48
3.2	Oksidasjon og akkumulering av oljesyre.....	50
3.2.1	Effekter av forbehandling med oljesyre og GW på fettsyremetabolismen	52
3.2.2	Effekter av akuttbehandling med FCCP på oljesyreoksidasjonen	54
3.3	Akkumulering og oksidasjon av glukose.....	56
3.3.1	Effekter av forbehandling med oljesyre og GW på glukosemetabolismen.....	57
3.3.2	Effekter av akutt behandling med FCCP på glukoseoksidasjonen	59
3.4	Overkryssningsforsøk.....	61
3.5	Effekter av galaktose på mitokondriell masse og lipiddråper	63
3.6	Effekter av galaktose på genekspresjon.....	65
4	Diskusjon.....	67
4.1	Dyrking av myotuber i galaktose.....	67
4.2	Effekter av modifisering av energimetabolisme grunnet tilsetning av galaktose.....	68
4.2.1	Effekter av galaktose på mitokondriene.....	68
4.2.2	Effekter av galaktose på genekspresjon	69
4.2.3	Effekter av galaktose på oljesyre og glukosemetabolismen.....	70
4.2.4	Effekter av forbehandling med oljesyre	71
4.2.5	Effekter av forbehandling med GW501516.....	71
4.2.6	Effekter av akuttbehandling med FCCP.....	72

Innholdsfortegnelse

5	Konklusjon	74
	Litteraturliste	75
	Appendiks.....	80

Summary in english

Cultured human myotubes have a low mitochondrial oxidative potential. Therefore we wanted to remodel energy metabolism in myotubes. Many methods can be used to modify energy metabolism in cells. Replacing the media glucose with galactose is one of these methods and consequently circumventing the Warburg effect. The Warburg effect is a phenomenon, which was first observed in cancer cells, where cells generate energy through aerobic glycolysis instead of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS), even though oxygen is present. Oxidation of galactose to pyruvate through glycolysis yields no net production of adenosine triphosphate (ATP), forcing cells to rely on mitochondrial OXPHOS to generate sufficient ATP for cell survival. In this study we used galactose in the cells growth and differentiation media, and the effect of galactose on energy metabolism in human myotubes was examined.

Live imaging was performed on cells treated with galactose. The results showed that myotubes treated with galactose had a significant increase in mitochondrial mass and lipid droplets content. The number of cell-nuclei was significantly decreased in cells treated with galactose compared to cells treated with glucose.

We also wanted to examine whether galactose-treatment caused any changes at gene level. Fibertype genes, myosin heavy chain I (MHC I) and myosin heavy chain II (MHC II), and acyl-coenzyme A dehydrogenase (MCAD) were down regulated in cells grown in galactose. Carnitin palmitoyltransferase-1 (CPT1) and cytochrome C (CYC1) were up regulated in cells grown in galactose compared to cells grown in glucose.

The effect of galactose on oleic acid (OA) oxidation and glucose oxidation by the cells was examined using labeled substrates. Cells treated with galactose had an increased OA oxidation. This corresponded with an increase in mRNA-level of CPT1 observed in this study. Pretreatment with OA during proliferation and differentiation did not affect fatty acid metabolism in cells treated with galactose. Oxidation of labeled [U-¹⁴C]-glucose increased in galactose-treated myotubes. Pretreatment with OA increased glucose oxidation in cells treated with galactose compared to cells treated with glucose.

Summary in english

Suppressibility was also determined and describes suppression of fatty acid oxidation by acute addition of glucose. Myotubes treated with galactose showed an increased suppressibility compared with cells treated with glucose. Increased suppressibility is probably favorable for metabolic flexibility of the myotubes. Cells treated with galactose seemed to utilize oxidation of glucose to a larger extent than fatty acid oxidation when total oxidation was evaluated.

Pretreatment with the PPAR δ agonist GW501516 (GW) for 2 days, tended to increased OA oxidation in cells treated with glucose, this effect was not observed in cells treated with galactose. Fractional OA oxidation tended to increase in cells treated with glucose. Cells treated with galactose seemed to slightly decrease fractional fatty acid oxidation. Pretreatment with GW tended to decrease glucose oxidation in cells treated with glucose, whereas cells treated with galactose showed no effect.

The maximal oxidative capacity of human myotubes was examined by acutely adding carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) to the cells. FCCP uncouples the respiratory chain in the mitochondria. Calculation of the difference between oxidation in the presence of FCCP and basal oxidation equals the reserve capacity. Acute treatment with FCCP seemed to decrease reserve capacity for fatty acid oxidation in galactose-treated cells. Cells treated with galactose utilized approximately 70 % of maximal OXPHOS capacity, while cells treated with glucose utilized approximately 40 %.

The cells reserve capacity for glucose oxidation was increased in cells treated with galactose, pretreatment with OA and GW also seemed to increase the reserve capacity to oxidize glucose. Myotubes treated with galactose utilized approximately 60 % of maximal OXPHOS capacity, and myotubes treated with glucose utilized approximately 40 %.

In summary we show that cells treated with galactose were more oxidative, had an increased mitochondrial mass, and an increase in mRNA-levels of CYC1 and CPT1.

Sammendrag

Humane myotuber i kultur har et lavt mitokondrielt oksidativt potensial. Derfor var det ønskelig å forsøke å modifisere cellenes energimetabolisme. Det finnes mange måter å påvirke myotubers energimetabolisme på. En metode er å bytte ut myotubenes energi-substrat. Det var derfor ønskelig å bytte ut glukose i myotubenes dyrkningsmedium med et annet monosakkarid, galaktose, og derved omgå Warburg-effekten. Warburg-effekten er et fenomen, som først ble observert i cancerceller, hvor celler benytter seg av aerob glykolyse istedenfor mitokondriell oksidativ fosforylering (OXPHOS), selv om oksygen er til stede. Galaktose metaboliseres til pyruvat i glykolysen, men gir ingen eller lavere produksjon av adenosintrifosfat (ATP). Cellene blir dermed tvunget til å benytte OXPHOS istedenfor glykolysen til å produsere den energien de trenger for å overleve. I denne masteroppgaven ble galaktose benyttet i cellenes vekstmedium, istedenfor glukose, og vi undersøkte hvordan galaktose påvirket myotubenes energimetabolisme.

Levende bildebehandling av celler dyrket i galaktose viste en signifikant økning i mitokondriell masse og mengde lipiddråper sammenlignet med celler dyrket i glukose. Antall cellekjerner var signifikant redusert hos celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose.

Det var også av interesse å undersøke om galaktosebehandling medførte endringer på gen-nivå. Real-time PCR viste en nedregulering av myosin tungkjede I (MHC I), myosin tungkjede II (MHC II) og acyl-koenzym A dehydrogenase (MCAD), samt en oppregulering av genene karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT1) og cytokrom C (CYC1) for celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose.

Oljesyre- og glukosemetabolisme hos celler dyrket i galaktose ble også undersøkt ved hjelp av radiomerkede substrater. OA oksidasjonen økte hos celler dyrket i galaktose. Dette stemte overens med den økningen i mRNA-nivå av CPT1 som ble observert i denne oppgaven. Forbehandling av celler med OA under proliferering og differensiering ga ingen tilleggseffekt på oljesyremetabolismen i galaktosebehandlede celler. Oksidasjonen av [U-¹⁴C]glukose økte hos celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose. Forbehandling med oljesyre hos celler dyrket i galaktose økte også glukoseoksidasjon sammenlignet med celler dyrket i glukose (basal).

Sammendrag

Suppressibilitet er et begrep som benyttes *in vitro* for å beskrive i hvilken grad nærvær av glukose undertrykker fettsyreoksidasjon. Celler dyrket i galaktose så ut til å ha en økt suppressibilitet sammenlignet med celler dyrket i glukose. Dette er trolig positivt ved at cellene er mer metabolsk fleksible. Celler dyrket i galaktose så ut til å benytte seg i større grad av glukoseoksidasjon enn fettsyreoksidasjon når totaloksidasjon ble beregnet.

Forbehandling med GW501516 (GW), en PPAR δ agonist, i 2 dager så ut til å øke OA oksidasjon for celler dyrket i glukose, men denne effekten ble ikke observert i galaktosebehandlede celler. Fraksjonell OA oksidasjon så ut til å øke i glukosebehandlede celler, men det så ut til å være en redusert oljesyreoksidasjonen hos celler dyrket i galaktose. Glukoseoksidasjonen så ut til å være redusert hos celler dyrket i glukose etter forbehandling med GW, men ingen reduksjon i oksidasjon hos celler dyrket i galaktose.

Myotubenes maksimale oksidasjonskapasitet ble undersøkt ved hjelp av karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) som frikobler elektrontransporten fra ATP-syntesen. Beregning av forskjellen mellom oksidasjon med FCCP til stede og basal oksidasjon tilsvarer reservekapasiteten. Celler som ble dyrket i galaktose så ut til å ha en redusert reservekapasitet for oljesyreoksidasjon etter akutt behandling med FCCP. Celler dyrket i galaktose benyttet seg av omtrent 70 % av maksimal OXPHOS, mens celler dyrket i glukose benyttet omtrent 40 %.

Cellenes reservekapasitet for glukoseoksidasjon økte for celler dyrket i galaktose, også der hvor cellene hadde blitt forbehandlet med oljesyre og GW, i forhold til kontroll. Celler dyrket i galaktose benytter seg av omtrent 60 % av reservekapasiteten for glukoseoksidasjon, og celler dyrket i glukose benytter omtrent 40 %.

I denne oppgaven viser vi at celler dyrket i galaktose blir mer oksidative, har økt mitokondriell masse, og har en økning i mRNA-nivåene av CYC1 og CPT1 sammenlignet med celler dyrket i glukose.

Forkortelser

36B4	“Human acididic ribosomal phosphoprotein PO”
ACBP	Acyl-CoA-bindende proteiner
ADP	Adenosindifosfat
AKT	Proteinkinase B
ANT1	Adeninnukleotid-translokase 1
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
Ca ²⁺	Kalsium
CA	Celleassosiert
cAMP	Syklisk adenosinmonofosfat
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
Ci	Curie
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Koenzym A
CPT-1	Karnitin palmitoyltransferase-1
CPT-2	Karnitin palmitoyltransferase-2
CYC 1	Cytokrom C
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
ECM	Ekstracellulær matriks
EPA	Eikosapentensyre
FABP	Fettsyrebindende protein
FADH ₂	Flavin-adenin-dinukleotid (redusert form)
FAT/CD36	Fettsyretransportør
FATP	Fettsyretransportprotein
FCCP	Karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon

Forkortelser

FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GLUT	Glukosetransportør
GW	GW501516
HbA1c	Glykolsylert hemoglobin
HDAC	Histon-deacetylase
HMIT1	Myoinositol transportør
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
LCAC	Langkjededede acyl-koenzym A
MCAD	Acyl-koenzym A-dehydrogenase
MEF2	Myocyt-forsterkende-faktor-2
MHC	Myosin tungkjede
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (redusert form)
NRF-1	Kjerne-respiratorisk faktor-1
O ₂	Oksygen
OA	Oljesyre
OD	Optisk tetthet
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
PA	Palmitinsyre
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK-1	Fosfor 3-fosfoinositid-avhengig kinase-1
PFI	Palmitat, forskolin og ionomycin
PFK	Fosfofruktokinase-1
PGC1	Peroksisom-proliferator-aktivert reseptor- γ koaktivator-1

Forkortelser

PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	Fosfatidylinoditol (4,5)-difosfat
PIP ₃	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKC θ	Proteinkinase C theta
PPAR	Peroksisom-proliferatoraktivert-reseptor
RQ	Respiratorisk kvotient
SEM	Standardfeil
SERCA	Sarkoplasmatisk retikulum kalsium ATPase
SH2	Src-homologi 2
T2D	Type 2-diabetes
TAG	Triacylglyserol
UCP	Frikobler-protein
WHO	Verdens helseorganisasjon

1 Innledning

1.1 Diabetes

Diabetes er en kronisk sykdom som oppstår på bakgrunn av to fysiologiske hendelser. Kun en av dem kan inntreffe, eller begge de fysiologiske hendelsene kan inntreffe samtidig.

En slik hendelse er at pankreas ikke klarer å produsere nok insulin, og den andre er når kroppen ikke lenger klarer å nyttiggjøre seg av insulin som blir produsert. Dette medfører forhøyede blodglukoseverdier (hyperglykemi). I år 2000 hadde, i følge Verdens Helseorganisasjon (WHO), 171 millioner individer på verdensbasis diagnosen diabetes. Det er beregnet at innen år 2030 vil 366 millioner ha diabetes. Det forventes en dobling av antallet individer med denne diagnosen i løpet av 30 år. I Norge var det 130 000 diabetikere i år 2000. Diabetes kan grovt sett deles i to; type 1-diabetes og type 2-diabetes (T2D). Type 1 diabetes kjennetegnes av utstrakt insulinmangel, mens T2D preges av at kroppen ikke klarer å utnytte insulin som blir produsert (insulinresistens). Denne formen oppstår ofte som følge av overvekt og fysisk inaktivitet [1]. Diagnosekriteriene for diagnosen diabetes er fastende plasmaglukose ≥ 7.0 mmol/l eller $\geq 11,1$ mmol/l i venøs plasmaglukose 2 timer etter oral glukosetoleransetest [2].

Flere risikofaktorer er forbundet med utvikling og progresjon av T2D inkludert både genetikk, som medfører endringer på gen-nivå, og post-og prenatale miljøfaktorer [3]. Eksempler på en slik faktor kan være lav vekt ved fødselen noe som er assosiert med utviklingen av T2D senere i livet [4]. En annen viktig komponent som bidrar til insulinresistens, og dermed trolig T2D, er visceral fedme [5]. Man har sett at regelmessig trening minsker risikoen for T2D, derfor vil trolig inaktivitet medføre økt risiko for utvikling av T2D [6]. Insulinresponsen reduseres med økende alder trolig grunnet en redusert insulinbinding. Derfor er trolig økende alder en medvirkende faktor til økt insulinresistens [7]. Mekanismen bak utvikling av insulinresistens er ikke fullstendig klarlagt. Men trolig kan hver og en av disse risikofaktorene medføre insulinresistens i skjelettmuskel, fettvev og lever, samt funksjonsforstyrrelse i β -cellene. Hyperglykemi, både fastende og postprandial, vil til slutt oppstå som et resultat av insulinresistens og utilstrekkelig insulinproduksjon. Flere gener som trolig er involvert i insulinets effekter i muskel, fettvev og lever har nylig blitt identifisert, et slikt eksempel er genet som koder for peroksisom-proliferatoraktivert-reseptor γ (PPAR γ) [8].

Innledning

Det finnes mange komplikasjoner som følger diagnosen T2D blant annet høyere dødsrisiko, hjertekarsykdommer, nyresykdom, blindhet og amputasjon [1].

Målet for behandling av T2D er å oppnå glykosylert hemoglobin (HbA1c) < 7 %.

Før medikamentell behandling initieres bør kriterier som vektreduksjon (ved overvekt), diettrestriksjoner og økt fysisk aktivitet være i gang satt [9]. Medikamenter som kan benyttes ved behandling av T2D omfatter perorale antidiabetika, inkretinmimetika og insulin.

Perorale antidiabetika har ulike angrepspunkter, og virker ved å forsinke absorpsjon av glukose fra tarm (α -glukosidasehemmer), stimulere til insulinproduksjon (sulfonylureaderivater og glinider) samt stimulere til økt insulinfølsomhet i fett-, muskel og leverceller (glitazoner). Inkretinmimetika og insulin foreligger som injeksjonspreparater og skal øke produksjonen av insulin (inkretinmimetika) eller erstatte insulinproduksjonen (insulin og insulinanaloger) [2].

1.2 Insulinresistens i skjelettmuskel

Insulinresistens, minsket insulinproduksjon i β -cellene, uhensiktsmessig frigjøring av glukose fra leveren, samt en negativ påvirkning på insulinets effekt grunnet produksjon av cytokiner fra fettvev er alle karakteristisk for T2D [10]. Det største insulinsensitive organet i kroppen utgjøres av skjelettmuskulaturen, og derfor vil hele kroppens glukosehomeostase påvirkes av insulinresistens i dette organet [3]. Flere mekanismer har blitt foreslått som mulige årsaker til insulinresistens og utvikling av T2D. En svekkelse i den mitokondrielle funksjonen kan bidra til insulinresistens via en mekanisme som omfatter endret metabolisme av fettsyrer [11].

Insulinresistens utvikles ofte i forbindelse med vektøkning, vedvarende fysisk inaktivitet, og/eller systemisk hyperlipidemi. Dermed foreslås det at en underliggende mekanisme til insulinresistens er overskudd av lipider [12].

Akutt økning i plasmakonsentrasjon av frie fettsyrer (FFA) medfører insulinresistens. Kronisk forhøyede plasmakonsentrasjoner av FFA induserer også insulinresistens. Forbindelsen mellom økte nivåer av sirkulerende FFA og insulinresistens kan inkludere akkumulering av triacylglyserol (TAG) og fettsyrederiverte metabolitter som diacylglyserol (DAG), acylkoenzym A (acyl-CoA) og ceramider i muskel og lever [13, 14].

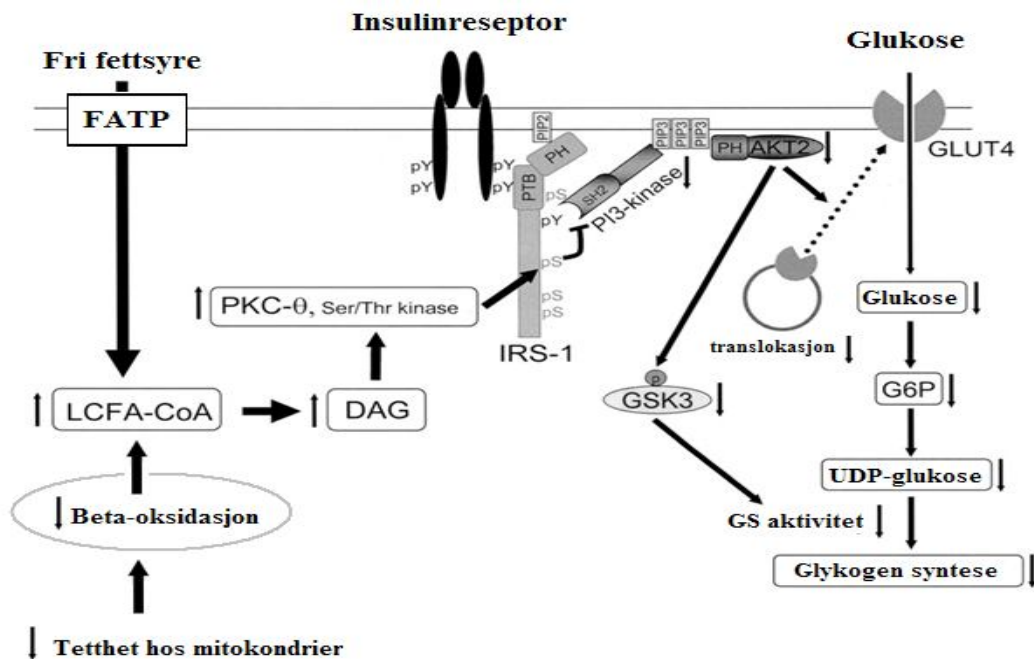
Insulinstimulert insulinreseptorsubstrat 1 (IRS-1)-assosiert fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K)-aktivitet påvirkes av endringer i plasmanivået av FFA.

Innledning

Effekten av intracellulære FFA eller fettsyremetabolitter på PI 3-kinase kan trolig være direkte knyttet til reduksjonen i insulin-stimulert PI 3-kinase, eller forekomme sekundært på grunnlag av endringer i oppstrøms insulinsignaleringsproteiner [15].

Griffin *et al* [16] fant en reduksjon i glykogensyntese og i glukoseoksidasjon i muskel hos rotter etter lipidinfusjon. Disse funnene overensstemmer med en FFA-indusert defekt i glukosetransport/fosforyleringsaktivitet. T2D og fedme er tilstander som assosieres med forhøyede plasmanivåer av FFA [16]. GLUT 4-translokasjon reguleres blant annet av PI 3-kinase [17]. Muskler hentet fra individer med T2D og overvektige individer viser en redusert aktivitet av PI 3-kinase, slike tilstander er som tidligere nevnt assosiert med forhøyede plasmanivåer av FFA [17-19]. Insulinresistens induisert av FFA forbindes med endret aktivitet hos insulinstimulert PI 3-kinase. Man observerte at redusert IRS-1 tyrosin-fosforylering var årsaken til den reduserte PI 3-kinase-aktiviteten [16]. Dette vil til slutt medføre redusert koassosiasjon av PI 3-kinase og IRS-1 og dermed redusert aktivering av IRS-1-assosiert PI 3-kinase-aktivitet [16].

I en annen studie ble det observert, etter lipidinfusjon, en økning i TAG og langkjedede acyl-CoA (LCAC)-innhold i muskel [20]. Økt nivå av LCAC kan forårsake en økning i nivåene av DAG. DAG er en kjent potent aktivator av protein kinase C (PKC). Griffin *et al* [16] fant også at PKC θ (theta) økte signifikant etter lipidinfusjon. Dermed ble en hypotese fremsatt som går ut på at en økning i plasmakonsentrasjon av FFA fører til en økning i DAG nivåene i muskel, noe som medfører aktivering av PKC θ . Økt serin-fosforylering av IRS-1 forårsakes av serinkinasen PKC θ . En slik serin-fosforylering påvirker evnen IRS-1 har til å aktivere PI 3-kinase, og denne vil dermed reduseres. Akutte, og muligens kroniske, endringer i plasmanivå av FFA innebærer endringer hos insulinsignaleringsproteiner. Det vil si en reduksjon i IRS-1-tyrosin-fosforylering og en reduksjon i IRS-1 assosiert PI 3-kinase-aktivitet. PKC θ -aktivering kan trolig medføre slike endringer. Denne mekanismen kan spille en viktig rolle ved insulinresistens [16]. En oversikt over mekanismer bak insulinresistens vises i figur 1.1.



Figur 1.1 Molekylær mekanisme for fettsyreindusert insulinresistens. Akt; proteinkinase B, DAG; diacylglycerol, FATP; fettsyre-transport-proteiner, G6P; glukose-6-fosfat, GS; glykogensyntase, GSK3; glykogensyntasekinase 3, IRS-1; insulinreseptorsubstrat-1, LCCA; langkjedede acyl-koenzym A, PH; plekstrin homolog domene, PI3K; fosfatidylinositol 3-kinase, PIP2; fosfatidylinositol(4,5)-difosfat, PIP₃; fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfat, PKC; proteinkinase C, pS; serin-fosforylering, PTB; fosfotyrosinbindende-domene, pY; tyrosin-fosforylering, SH2; Src-homologi 2, UDP; uridindifosfat-glukose. Modifisert fra [21].

1.3 Metabolsk fleksibilitet og glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel

Blodglukosenivået holdes strikt mellom 4 og 7 mM hos normale individer, til tross for perioder både med matinntak og faste. Balansen mellom glukoseabsorpsjon fra tarmen, glukoseproduksjon i lever, samt opptak og metabolisme i perifere vev opprettholder dette strikte nivået. Insulin regulerer glukosekonsentrasjonen i blodet, og denne kontrolleres via økt glukoseopptak i muskler og fettvev, samt hemming av hepatisk glukoseproduksjon [14].

1.3.1 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet har to aspekter: nærvær av insulin undertrykker fettoksidasjon og stimulerer glukoseoksidasjon i postprandialfasen, mens faste stimulerer kroppen til å produsere energi fra fettoksidasjon (figur 1.2). Dette skiftet i energisubstratutnyttelse ser ut til å være redusert ved fedme, T2D og insulinresistens [22-24].

Innledning

Å være metabolske infleksibel svarer til å ha en svekket regulering av oksidasjon av næringsstoff. Metabolsk infleksibilitet defineres som svekket kapasitet til å øke oksidasjon av fett ved økt tilstedeværelse av fett, og et svekket skifte mellom fett og glukose som den primære næringskilden ved overgang fra faste til tilstanden etter et måltid [25]. Randle *et al* [26] har beskrevet glukose-fettsyre-metabolismen, strømmen av næringsstoff mellom organer, samt næringsutvelgelsen hos organene. De viste dessuten at fettsyrer har evnen til å redusere oksidasjon av glukose [26].

Respiratorisk kvotient (RQ) kan brukes som et verktøy for å beregne metabolsk fleksibilitet. RQ sier noe om hvilken energikilde som forbrennes, og er forholdet mellom CO₂ produksjon og O₂ forbruk *in vivo* [27]. Glukose er i hovedsak det substratet som oksideres etter et karbohydratrikt måltid, og RQ vil da nærme seg 1. Etter en periode med faste er fett det substratet som oksideres, og RQ vil da være noe lavere, omtrent 0,8 [28]. Høy RQ, som indikeres av lav fettsyreoksidasjon, har vist seg å være et forvarsel for vektoppgang. Gjentakende vektoppgang etter slanking indikeres også av en høy RQ. En beskyttende metabolsk markør mot overvekt kan representeres av en lav RQ [27]. Disse resultatene kan tolkes som en kobling mellom utvikling av fedme og T2D og svakheter i fettsyreoksidasjonen.

Kortvarig inhibering av flere glykolytiske trinn, som glukosetransport, 6-fosfofrukto-1-kinase (PFK-1) og pyruvatdehydrogenase (PDH), forklarer fettsyrenes inhiberende effekt på glukosemetabolismen. Inhiberingen er størst på PDH, og mindre for glukoseopptak og PFK i den glykolytiske signalveien. Dette oppstår som følge av en økning i det mitokondrielle forholdet mellom [acetyl-CoA]/[CoA] og [NADH]/[NAD⁺], som utløses av økt fettsyreoksidasjon, og dette misforholdet fører til hemmet PDH aktivitet. PDH er et viktig enzym som inngår i glykolysen. Som følge av disse endringene vil det skje en akkumulering av citrat i cytosol. Citratakkumuleringen har en inhibitorisk effekt på PFK-1, noe som medfører en økning i glukose-6-fosfat. Aktiviteten av heksokinase, som er det enzymet som katalyserer fosforyleringen av glukose til glukose-6-fosfat i glykolysen, hemmes av økningen i glukose-6-fosfat [29-31].

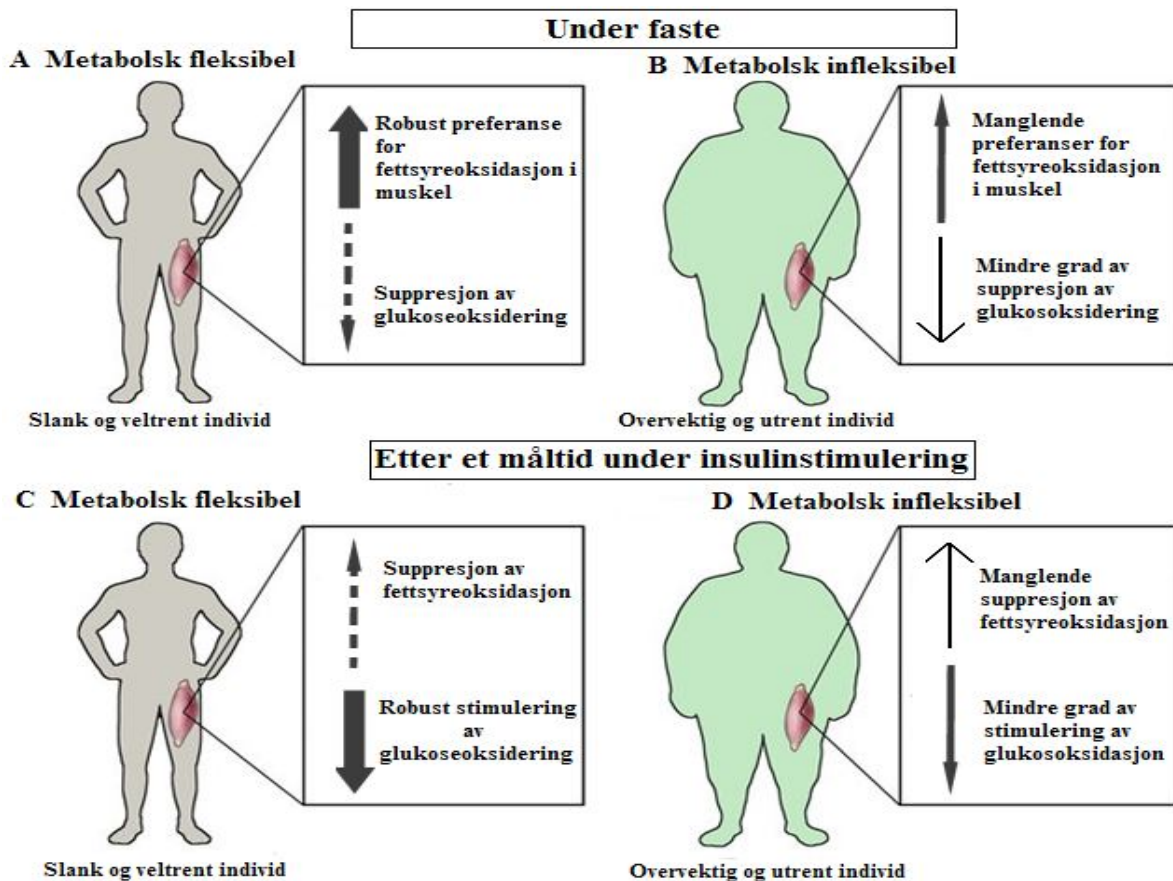
Fettsyremetabolismen kan også inhiberes av økte nivåer av glukose intracellulært. Økte nivåer av glukose fører til økte nivåer av fruktose-1,6-bisfosfat, som stimulerer glykolysen.

Innledning

Dette resulterer i pyruvat-produksjon, pyruvaten som dannes konverteres til acetyl-CoA, som reagerer med oksaloacetat for å danne citrat i sitronsyresyklus. Citrat kan som nevnt tidligere akkumuleres i cytosol hvor den hemmer PFK-1, men kan også regenerere acetyl-CoA.

Acetyl-CoA i cytosol kan karboksyleres til malonyl-CoA, malonyl-CoA inhiberer karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1) som regulerer opptak og oksidasjon av langkjede fettsyrer i mitokondrier [29-31]. En reduksjon i CPT-1 aktivitet kan trolig føre til akkumulering av fettsyrer. Insulinresistens er assosiert med en slik økt akkumulering av fettsyrer [32]. Med insulinresistens følger andre tilstander og dermed kan dette også være en mulig forklaring på nedsatt glukosemetabolisme og metabolsk infleksibilitet. Ved hjelp av denne mekanismen, som baseres på økte intracellulære nivåer av glukose og dermed økte intracellulære nivåer av malonyl-CoA, forhindres oksidasjon av nysyntetiserte fettsyrer og esterifisering av fettsyrer til TAG, kolesterolistere og fosfolipider favoriseres (figur 1.3) [29, 31].

In vitro er det forskjellige parametre som kan uttrykke metabolsk fleksibilitet. Suppressibilitet er en slik parameter og sier noe om hvordan glukose kan undertrykke fettsyreoksidasjon. En studie har vist at eikosapentansyre (EPA) øker suppressibiliteten hos myotuber [33, 34].



Figur 1.2: Oversikt over metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel. Under faste har slanke, veltrente individer (A) stor grad av fetttsyreoksidasjon i skjelettmuskel. Under insulinstimulering etter et måltid vil slanke veltrente individer få undertrykket oksidasjon av fettstoffer grunnet påvirkning fra insulin samt redusert stimulering av glukoseoksidering (C). Overvektige og utrente individer vil ved faste ha mindre grad av fetttsyreoksidasjon og høyere grad av glukoseoksidering (B). Etter et måltid og insulinstimulering vil overvektige og utrente individer ha et lavere skifte mellom oksidasjon av fettstoffer og glukose (D). Modifisert fra [22].

1.3.2 Glukosemetabolisme

Glukosetransportører i GLUT-familien medierer glukosetransport. Denne familien består av 13 medlemmer (GLUT 1-12) samt myoinositoltransportøren (HMIT1). Klasse I glukosetransportører (GLUT 1-4) er de glukosetransportørene som til nå er best beskrevet. GLUT 4 uttrykkes i størst grad i fett- og muskelvev og medierer insulin-stimulert glukoseopptak [35].

Basalt sirkulerer GLUT 4 mellom plasmamembranen og et eller flere intracellulære "kompartments". Insulinreseptoraktivering trigger en stor økning i GLUT 4-vesikkel-eksocytose og en mindre økning i internalisering via endocytose. Hovedtrinnet i GLUT4-translokasjon er trolig den insulinmedierte økningen i eksocytose. Glukoseopptaket økes via en økning i nivå av GLUT 4-proteiner på celleoverflaten.

Innledning

Denne økningen av GLUT 4-proteiner på celleoverflaten er et resultat av det insulinavhengige skiftet i den cellulære dynamikken hos GLUT 4-vesikkelen.

Av vesentlig betydning for insulinstimulering av GLUT 4-translokasjon er aktiveringen av type 1A PI 3-kinase, og en derav følgende økning av fosfatidylinoditol (3,4,5)-trifosfat (PIP₃). Det har blitt demonstrert at en slik aktivering og en slik generering er essensielt for insulinstimulering av GLUT 4-translokasjon [36].

Subenhetene α og β utgjør membranproteinet insulinreseptor (IR). Kinaseaktiviteten i β -subenheten aktiveres når insulin bindes til α -subenheten [35]. Insulinreseptorsubstratene (IRS) vil fosforyleres av β -subenheten. IRS-proteiner inneholder fosforylerte tyrosiner som utgjør bindingssetet for proteiner med Src-homologi 2 (SH2) domene, og dermed aktiveres PI3K [14, 35]. Aktivering av PI3K fosforylerer PIP₃ fra fosfatidylinoditol (4,5)-difosfat (PIP₂), og dermed aktiveres 3-fosfoinositid-avhengig kinase-1 (PDK-1). Proteinkinase B (PKB/Akt) og PKC λ/ζ (aPKC) aktiveres av PDK-1. Aktivering av PI3K og dannelsen av PIP₃ medierer translokasjon av GLUT 4 via aktivering av PKB og PKC, via en ennå ukjent nedstrøms signalvei [35].

Når glukose har blitt tatt opp i cellen via GLUT 4 omdannes den til glukose-6-fosfat av heksokinase, det første enzymet i glykolysen. I glykolysen dannes pyruvat, som under aerobe forhold omsettes til karbondioksid (CO₂) og acetyl-CoA. Acetyl-CoA går videre i sitronsyresyklus [29].

1.3.3 Fettsyremetabolisme

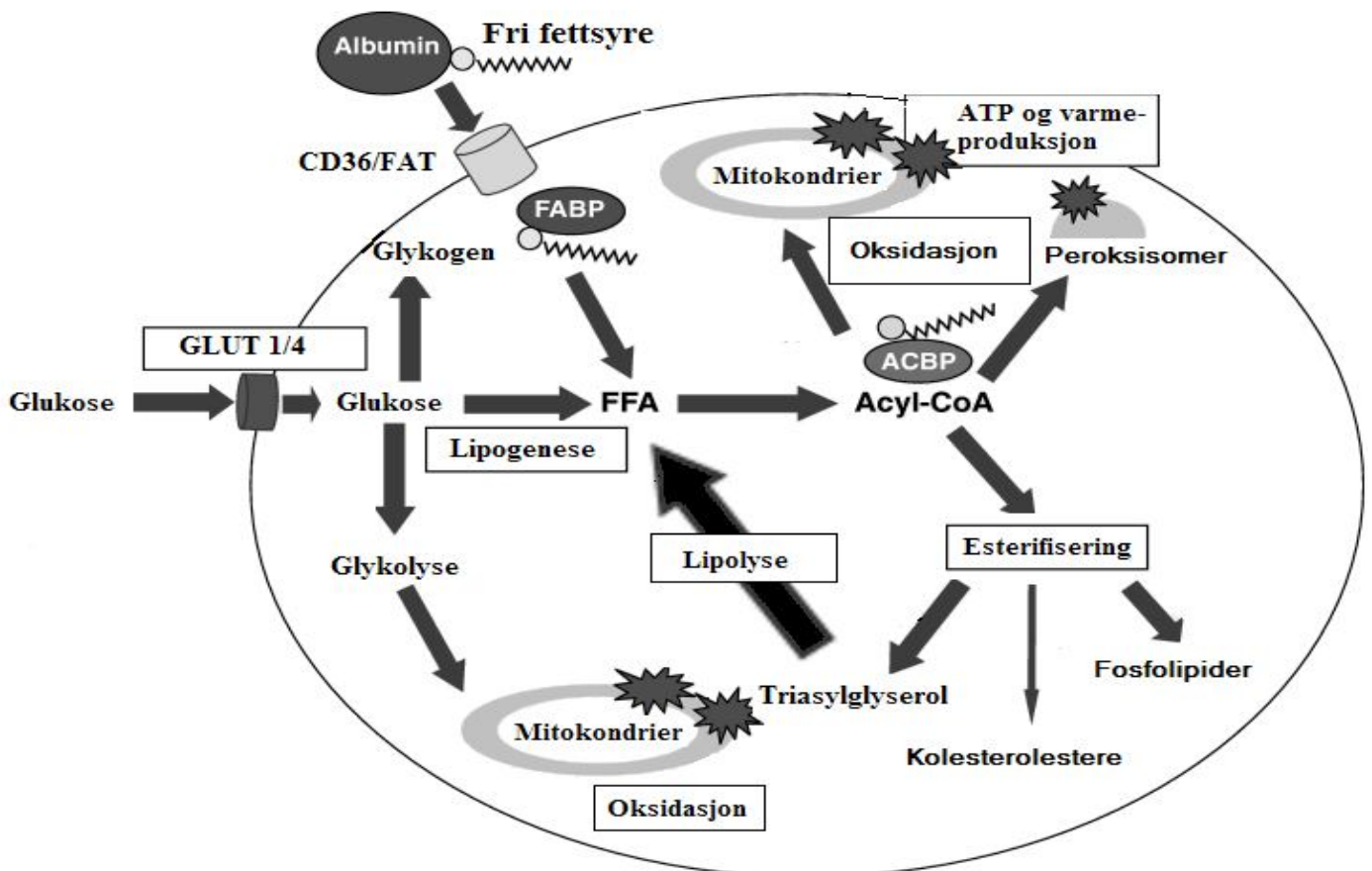
Hormoner regulerer frigjøringen av fettsyrer fra TAG i adipocytene [29]. Det finnes i hovedsak to teorier bak mekanismen for hvordan FFA tas opp i cellen. Dette kan enten skje via passiv diffusjon eller via opptak ved hjelp av membranbundne proteiner. Flere membranproteiner er involvert i fettsyreopptak, og de blir referert til som fettsyretransportører. Et slikt eksempel er FAT/CD36 [37]. FAT/CD36 bidrar til reguleringen av mitokondriell FFA transport og oksidasjon i hvilende skjelettmuskelceller, siden blokkering av FAT/CD36 er vist å hemme FFA oksidasjon i stor grad. Kronisk stimulering, i 7 dager, ved hjelp av innopererte elektroder som sendte signaler i form av pulser i bakre legg hos rotter, viste seg å øke uttrykket av FAT/CD36 [38].

Innledning

Fettsyreoksidasjonen begynner med aktivering av molekylet, noe som gjøres ved at det omdannes til acyl-CoA ved hjelp av enzymet acyl-CoA-syntase.

Acyl-CoA kan ikke krysse den indre membranen i mitokondria og derfor må acyl-gruppen forestres til karnitin ved hjelp av enzymet CPT1. Acyl-karnitin kan nå passere inn til matriks via karnitintransportøren karnitin translokase. Her blir acyl-gruppen omdannet tilbake til Acyl-CoA ved hjelp av karnitin palmitoyltransferase-2 (CPT-2) lokalisert i den indre membranen. I matriks blir acyl-CoA oksidert til acetyl-CoA ved hjelp av β -oksidasjon. Acetyl-CoA blir videreført til sitronsyresyklus hvor resten av oksidasjonen til CO_2 og vann skjer.

Energi, adenosintrifosfat (ATP), kan produseres fra to kilder; den første er reoksidasjon av nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) og redusert form av flavin-adenin-dinukleotid (FADH_2) som blir produsert ved hjelp av β -oksidasjon av FFA til acetyl-CoA. Den andre kilden til ATP-produksjon er bearbeidingen av acetyl-CoA i sitronsyresyklus og oksidativ fosforylering [29]. Cellens fettsyre- og glukosemetabolisme er illustrert i figur 1.3.



Figur 1.3: Oversikt over glukose – og fettsyremetabolisme. ACBP; acyl-CoA bindende protein, CD36/FAT; transportør av fettsyrer, FABP; fettsyrebindende protein, GLUT 1/4; transportør av glukose. Modifisert fra [39].

1.4 Mitokondrier

Mitokondrier er den organellen i cellen som står for mesteparten av energi-produksjonen cellen trenger for å overleve. Antall mitokondrier i cellen kan variere fra celle til celle, og avhenger av cellens energibehov. Mitokondrier består av en ytre og en indre membran, hvor den indre membranen består av mangfoldige folder, noe som skaper en stor overflate som igjen gjør det mulig med ATP-produksjon. Den indre membranen inneholder 3 viktige proteiner; proteiner ansvarlig for oksidasjonsreaksjonene i elektrontransportkjeden, ATPsyntase og transportproteiner som sørger for passasje av metabolitter inn og ut av matriks. Over denne membranen skapes en elektrokjemisk gradient av protoner som driver proteinet ATPsyntase [40].

Mitokondrier benytter både fettsyrer og glukose som brensel. Et molekyl glukose blir til 2 molekyler pyruvat i glykolysen. Pyruvat omdannes til acetyl-CoA, og acetylgruppen oksideres via sitronsyresyklus i mitokondriell matriks. Sitronsyresyklus gir NADH og FADH₂ som avgir sine elektroner til elektrontransportkjeden [40].

Når elektronene passerer i elektrontransportkjeden frigjøres energi, denne energien benyttes til å forflytte protoner over den indre mitokondrielle membranen. Det er denne protongradienten som er drivkraften bak ATP-syntese. Oksidativ fosforylering har fått navnet sitt fra tilføringen av en fosfat gruppe til adenosindinukleotid (ADP), og dermed skapes ATP. Prosessen forbruker også oksygen [40].

1.4.1 Mitokondrienes rolle i type 2-diabetes

Mange studier i den senere tiden har vist funksjonsforstyrrelse i mitokondria. Men det er ennå ikke konstatert om dette har noen sammenheng med utvikling av T2D, da andre studier ikke finner bevis for sammenheng mellom funksjonsvekkelse i mitokondria og T2D.

I skjelettmuskelceller fra overvektige individer har man funnet at mitokondriene er mindre, med dårlig definerte folder i den indre membranen, samt en reduksjon i kompleks I-aktiviteten i elektrontransportkjeden [41].

Patti *et al* [42] viste at mange gener involvert i oksidativ metabolisme, gener som tilhører glykolysen samt sitronsyresyklus, er redusert i muskelceller fra individer med diabetes.

Innledning

Kompleks I og II, samt subenheter hos kompleks III og IV i elektrontransportkjeden, og ATPsyntase var også redusert. Genet ANT1, som bestemmer gjennomstrømningen av ADP/ATP mellom cytosol og mitokondrier, hadde lavere uttrykk hos diabetikere.

Flere kjerne-respiratorisk faktor-1 (NRF-1)-avhengige gener koder for nøkkelenzymer i oksidativ metabolisme og mitokondriell funksjon. Studier har vist at insulinresistens og diabetes kan assosieres med redusert uttrykk av slike faktorer. Ansvarlig for denne reduksjonen i uttrykket av NRF-avhengige gener kan være en reduksjon i uttrykket av peroksisom-proliferator-aktivert reseptor- γ koaktivator-1 (PGC1), noe som også kan føre til metabolske forstyrrelser karakteristiske for insulinresistens og T2D [42].

Sammenligning av myotuber fra diabetikere og kontrollmyotuber viste ingen forskjeller på mRNA-nivå hos PGC1- α og NRF1 eller i mitokondriell masse, i en annen studie. Tidligere har det vært foreslått at en nedregulering av OXPHOS gener relatert til mitokondriell dysfunksjon bidrar til insulinresistens. Siden man ikke fant noen endringer i mRNA-nivå av PGC-1 α og NRF-1 eller endringer i mitokondriell masse foreslås det derfor at insulinresistens i skjelettmuskelceller *in vivo* oppstår på grunnlag av faktorer utenfor cellen som blodtilstrømning og sirkulerende nivåer av næringsstoffer, cytokiner og hormoner [43].

1.4.2 Frikobler-proteiner

Mange forbindelser, ofte svake, hydrofobe syrer, er kjent for å frikoble OXPHOS i mitokondrier. Protonforisk aktivitet blir sett på som viktig for effekten av frikobling. Drivkraften bak protonenes forflytting over membranen består av en differanse i pH og membranpotensial. Dermed kan enhver forbindelse eller fysisk kraft, som for eksempel osmotisk sjokk eller aldring, som medfører en oppheving av pH differansen og membranpotensialdifferansen, virke som frikoblere. Mitokondriell respirasjon vil øke etter tilsetning av en frikobler (figur 2.1) [44]. Det finnes to konkurrerende modeller bak frikobler-protein-transport (UCP)-mekanismer. Felles for dem begge er at fettsyrer er essensiell for avkobling, men modellene har ulike syn på hvilket ion som transporteres [45].

Mekanismer som forhindrer ektopisk lipidakkumulering i vev er nødvendig for å bevare en fysiologi som opprettholder optimal insulinsensitivitet. På en slik måte motvirker man utvikling av kroniske sykdommer som metabolsk syndrom [46].

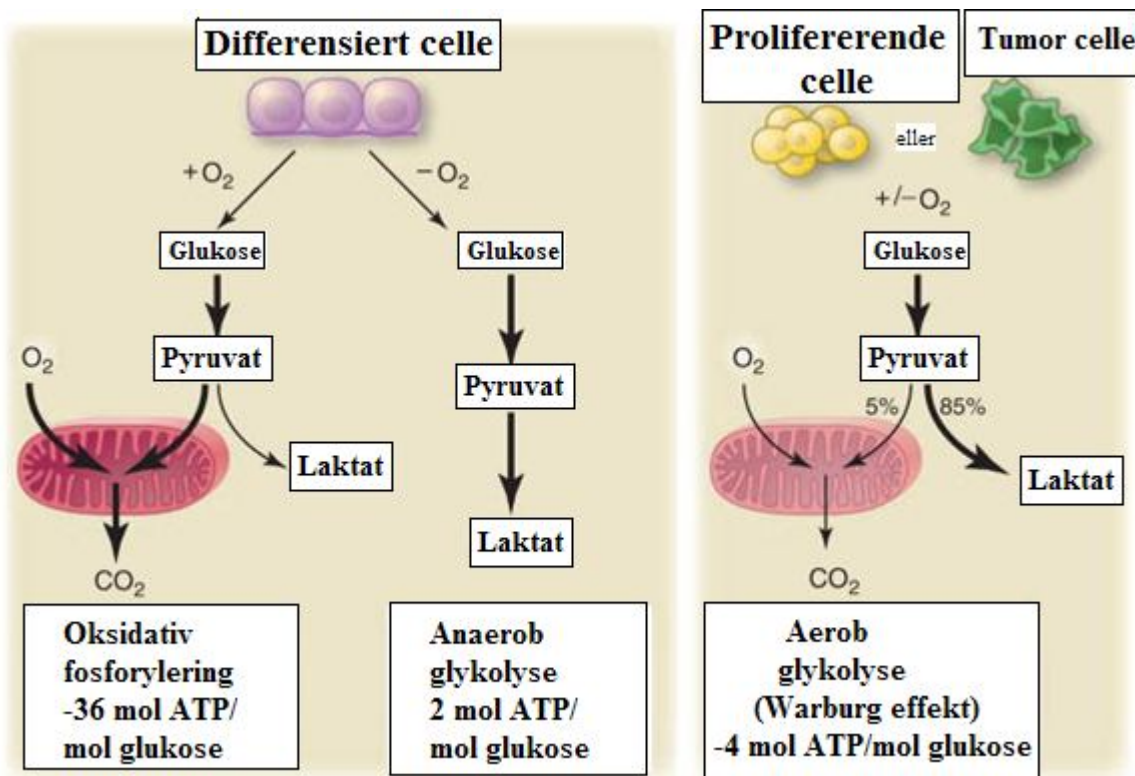
Innledning

Under forskning på termogenese i brunt fettvev på 1970-tallet fikk man ideen at en ideell mekanisme for å regulere kroppsvekt og kroppstemperatur var å utnytte mitokondriell avkobling protein, UCP1 [46]. UCP1 produserer varme ved å frikoble OXPHOS og uttrykkes spesielt i den indre membranen hos mitokondria i adipocytter [45].

1.4.3 Warburg-effekt

De fleste celler, som er under differensiering, vil ved nærvær av O_2 primært via oksidasjon av glykolytisk pyruvat, metabolisere glukose til CO_2 i den mitokondrielle sitronsyresyklusen. I denne reaksjonen produseres NADH som benyttes som brensel i OXPHOS for å maksimere ATP-produksjon [47].

Under en periode med dårlig tilgang på næring kan celler modifisere energimetabolismen sin slik at den maksimalt kan utnytte den næringskilden som er tilgjengelig for å overleve sulteperioden. Eksempler på prosesser cellen kan benytte seg av for å generere energi er anaerob glykolyse som gir 2 mol ATP per mol glukose, eller oksidativ glykolyse som gir opp til 36 molekyl ATP etter komplett oksidasjon av et glukosemolekyl (figur 1.4) [47].



Figur 1.4: Forskjeller mellom energiutnyttelse hos de ulike mitokondrielle prosesser; oksidativ fosforylering, anaerob glykolyse og aerob glykolyse. Modifisert fra [47].

Innledning

En mulig forklaring på at cellen benytter seg av en mindre effektiv metabolisme, for eksempel ved proliferering, er at ineffektiv produksjon av ATP kun er et problem når tilgangen til næring er dårlig. Dette er ikke tilfellet hos prolifererende mammalske celler.

Disse har kontinuerlig tilgang på O₂ og glukose fra blodet. For celler i kultur er det trolig bare glukose og glutamin som kataboliseres. Altså er det glukose og glutamin som forsyner cellen med karbon som er nødvendig for cellens vekst og utvikling. Hvis cellen dermed skulle omdanne all glukose til CO₂ via OXPHOS kun for å benytte seg av den mest lønnsomme ATP-produksjonen, vil ikke dette sammenfalle med cellens faktiske behov. Noe glukose må konverteres til makromolekylære forløpere som for eksempel acetyl-CoA [47].

Otto Warburg var den første til å observere at kreftceller benyttet glykolyse i stor grad til tross for tilstedeværelse av O₂ [48]. Dette fenomenet kalles Warburg-effekten eller aerob glykolyse. Det er en økt forståelse for at Warburg-effekten kan utnyttes terapeutisk, da det ser ut til at fortsatt aktivering av glykolyse i tumorcellen kan være viktig for utvikling av kreft [49].

Tidligere forklarte man at årsaken til at kreftceller benytter seg av Warburg-effekten, noe som er påvist i flere nyere studier, var at kreftcellene hadde irreversible skader på OXPHOS [48, 49]. Man har observert at celler fra vanlige krefttyper som leverkreft, bryst og gastrisk adenokarsinom, har en nedregulering av uttrykket i β -F1-ATPase som er en del av det katalytiske setet til H⁺ ATPsyntase, som igjen er viktig for OXPHOS enzymene. En slik nedregulering kan utnyttes som en markør på svekket mitokondriefunksjon i slike krefttyper [50, 51].

Det er ennå ikke fullstendig klarlagt om årsaken til at celler benytter seg av Warburg-effekt er skader på mitokondriene. En av grunnene til dette er at fenomenet også ble vist hos ikke-transformerte prolifererende celler, for eksempel prolifererende thymocytter som benytter aerob glykolyse til å supplere det økte energibehovet i S-fase og under celledeling [52]. Det foreslås at Warburg-effekten ikke forekommer grunnet irreversibel skade hos mitokondria, siden normale prolifererende celler også benytter seg av aerob glykolyse [49].

Grunnen til at celler velger å bytte over til den mindre energieffektive prosessen aerob glykolyse er ikke fullt ut forstått. Trolig er aktivering av glykolyse viktig under celleproliferasjon.

I arbeidet til López-Lázaro diskuteres det at hovedmekanismen involvert i aktivering av aerob glykolyse kan være et skifte i O_2 -metabolismen fra den grenen som genererer ATP til den grenen som genererer O_2^- og H_2O_2 , dysoksisk metabolisme. Skiftet i O_2 -metabolisme påvirker andre faktorer. Disse faktorene er viktig for kreftcellens vekst og utvikling [49].

1.4.4 Modifisering av energimetabolismen

Dersom cellene har dårlig tilgang på næring kan cellene tilpasse seg situasjonen og tilrettelegge energimetabolismen sin for å kunne utnytte den næringen som er tilgjengelig [47]. Hos celler i kultur ønsker man å modifisere energimetabolismen for å oppnå en mer fysiologisk celledmodell man kan benytte for å studere energimetabolismen. Det har blitt forsøkt flere metoder for å modifisere cellers energimetabolisme. En slik metode som har blitt forsøkt i humane myotuber er aktivering av cAMP/PKA-og kalsium (Ca^{2+}) signalveier [53].

Slike signalveier er en av regulatorene i mitokondriell biogenese og fettsyreoksidasjonskapasitet *in vivo* [54, 55]. cAMP/PKA-og Ca^{2+} -signalveier er funnet å bli aktivert gjennom tilsetning av palmitat, forskolin og ionomycin (PFI), og man observerte flere endringer i struktur og funksjon hos myotubene. Mitokondriell biogenese og fettsyreoksidasjon økte, lipiddråpenes organisering ble endret og insulinresponsen økte etter PFI-behandling [53].

PGC-1 α er trolig involvert i cAMP/PKA-og Ca^{2+} -signalveien da tilførsel av koffein, som øker konsentrasjonen av Ca^{2+} i cytosol, ga en økning i mRNA-nivå av PGC-1 α [56]. PGC-1 α er trolig en regulator av musklens oksidative kapasitet, samt en stimulator til mitokondriell biogenese [57, 58]. Overuttrykk av PGC-1 α medførte en økning i fettsyreoksidasjon, samt en økning i mRNA uttrykk av gener viktige i fettsyremetabolisme og for mitokondriell utvikling og funksjon, samt en økning i mRNA-nivå hos gener involvert i OXPHOS [58, 59].

Peroksisom proliferatoraktivert reseptor delta (PPAR δ) er også en faktor som kan påvirkes for å modifisere cellens energimetabolisme. Tilsetning av PPAR δ -agonisten GW501516 (GW) økte fettsyreoksidasjon hos myotuber i kultur [60].

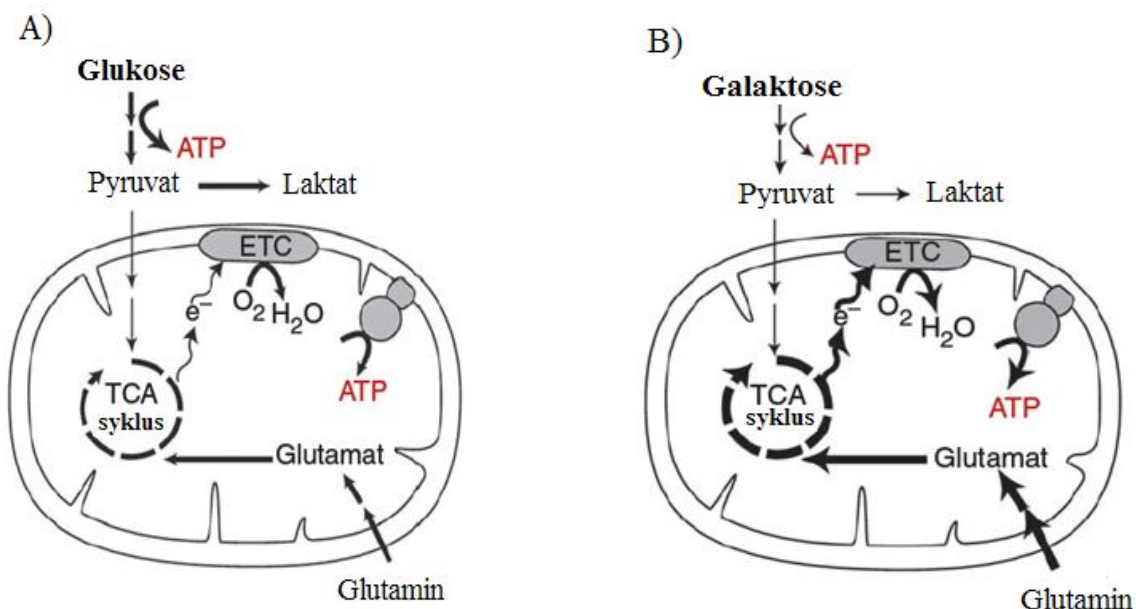
Innledning

Fettsyrer kan likeledes benyttes for å modifisere energimetabolismen. Forbehandling med fettsyrer økte opptaket av palmitinsyre (PA) hos myotuber fra friske individer og individer med T2D. I samme studie viser man at mitokondriell fettsyreoksidasjon trolig forbedres etter inkubering med tetradecyltioeddiksyre (TTA) [61].

Elektrisk stimulering av celler har tidligere blitt utført i laboratoriet vårt. Myotubene blir stimulert med en lavfrekvent elektrisk puls under differensiering.

Både opptak og oksidasjon av glukose økte signifikant hos celler stimulert elektrisk i 48 timer sammenlignet med ustimulerte celler. Man har også sett en tendens til økning i oljesyreoksidasjon. Hos celler stimulert i 48 timer så man også en dobling i mitokondriell masse, samt en oppregulering i mRNA-nivå av genene CPT1b og Cytokorom C (upublisererte data).

I denne oppgaven ble metabolismen modifisert ved å benytte galaktose istedenfor glukose i cellenes dyrkningsmedium. Metabolisme av galaktose i glykolysen gir lavere produksjon av ATP. Siden cellene dermed ikke kan benytte glykolyse for ATP-produksjon tvinges cellene til i større grad å benytte seg av OXPHOS eller glutamindrevet respirasjon [62-64]. Dette illustreres i figur 1.5.



Figur 1.5 Energimetabolisme i celler. A) ATP cellen trenger for å overleve dannes i glykolysen samt fra glutamindrevet respirasjon for celler dyrket i glukosemedium. B) celler dyrket i galaktosemedium benytter i større grad glutamindrevet oksidativ metabolisme. ATP; adenosintrifosfat, ETC; elektrontransportkjeden, TCA; sitronsyresyklus. Modifisert fra [62].

1.5 Muskelfibertype

Skjelettmuskler er involvert i menneskets bevegelighet, men spiller også en viktig rolle i kontrollen av metabolisme i kroppen. Signalveier kontrollerer disse to forskjellige funksjonene, og ved hjelp av disse signalveiene kan muskelfibrene svare på de endrede metabolske og funksjonelle behovene hos organismen [65].

1.5.1 Muskelfibertyper og deres karakteristika

Muskelceller, bindevev, blodårer og nerver bygger opp musklene. Myofibriller ligger tett pakket innerst i muskelfibrene. Hovedsakelig består myofibrillene av to typer myofilamenter, disse er oppbygd av proteinene aktin og myosin. Egenskapene er like for muskelfibre hos en motorisk enhet, mens det kan være store forskjeller fra en motorisk enhet til en annen. Denne variasjonen henspiller på hvor hurtig myosin kan spalte ATP, som igjen påvirker hvor hurtig muskelfiberen kan kontrahere. Myosin har flere ulike isoformer med forskjellige ATPase-aktivitet, noe som er en forutsetning for denne variasjonen [66].

Muskelfibrene kan deles inn to hovedtyper: langsomme (type I) og raske (type II). Kjemiske signaler fra de motoriske nervefibrene og impulsmønsteret i nervefibrene styrer differensieringen av hvilken fibertype som dannes [66].

Muskelfibrene som er spesialisert for å benytte seg av OXPHOS for å danne ATP kalles oksidative fibre. Muskelfibre som kan utnytte glykolysen i korte perioder for å dekke opp sitt energibehov kalles glykolytiske fibre. Type II-fibre deles dermed hovedsakelig inn i to undergrupper: type IIa (raske oksidative fibrer) og type IIb (raske glykolytiske fibrer). Det finnes også en type IIX-fiber som er glykolytisk. Opprettholdelse av kroppstillingen krever langsomme oksidative fibre, mens bevegelser som involverer hurtighet og styrke krever raske glykolytiske fibre. Det finnes også forskjeller mellom fibertypene ikke bare ved myosin tungkjede (MHC), men også i uttrykket av andre muskelproteiner. Eksempler på slike er tropomyosin, myosin lett kjede, parvalbumin, fosfolambin og sarkoplasmatiske retikulum kalsium ATPase (SERCA) [65, 66]. Egenskapene til de ulike muskelfibertypene er oppsummert i tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over karakteristika hos de ulike muskelfibertypene hos mennesker

Egenskap	Langsomme oksidative fibrer (type I)	Raske oksidative fibrer (type IIa)	Raske glykolytiske fibrer (type IIb)
Størrelse på motorisk enhet	Liten	Middels	Stor
Hastighet på kontraksjon	Lav	Høy	Høy
Aktivitet av myosin-ATPase	Lav	Høy	Høy
Dominerende ATP-produksjon	Oksidativ fosforylering aerob	Oksidativ fosforylering aerob	Glykolyse anaerob
Glykolytisk enzyminnhold	Lavt	Middels	Høyt
Trettbarhet	Svært utholdende	Middels utholdende	Lite utholdende
Antall mitokondrier	Mange	Mange	Få
Antall kapillærer	Mange	Mange	Få
Fiberdiameter	Minst	Litt større	Størst
Glykogeninnhold	Minst	Litt større	Størst
Myoglobininnhold	Størst	Litt mindre	Minst

Modifisert fra [66].

1.5.2 Regulatorer av fibertype

Som respons på trening vil skjelettmuskel omforme myofiberne biokjemisk, morfologisk og fysisk. En slik omforming resulterer i endringer hos muskelmassen, kontraktile egenskaper og metabolsk tilstand som følge av aktivering av intracellulære signalveier og genetisk omprogrammering. Muskeldannelse involverer myocytt-forsterkende-faktor-2 (MEF2) transkripsjonsfaktor i et samspill med flere myogene regulatoriske faktorer som aktiverer muskelspesifikke gener. Myofibre omdannes ved hjelp av MEF2/histon-deacetylase (HDAC) som respons på svingninger i det intracellulære kalsiumnivået [65].

Det foreslås at PPAR δ overuttrykk påvirker utvikling og metabolisme hos skjelettmuskler. Et slikt overuttrykk av PPAR δ hos gnager viste en netto økning i oksidative fibre [67, 68]. Det er også vist at protein-nivået av PPAR δ er høyere i muskler som inneholder oksidative fibre sammenlignet med muskler med glykolytiske fibre [68].

Innledning

Elektrisk stimulering av motoriske nerver kan etterligne effektene av trening over tid, og trening er vist å øke andelen fibertype I [57]. Elektrisk stimulering over 24 timer av leggmuskel hos rotte tredoblet mRNA-nivå av PPAR δ , og denne elektriske aktiviteten relateres til konvertering til en mer oksidativ fibertype. I denne studien ble kun en liten del av muskelen stimulert, og det er derfor vanskelig å trekke noen konklusjoner rundt effekter av systemisk trening [68]. Proteiner involvert i fettsyremetabolisme og generell oksidativ enzymatisk aktivitet kan påvirkes etter modifisering av muskelen ved hjelp av PPAR δ -overuttrykk. Man har observert en reduksjon i kroppsfett grunnet redusert størrelse hos adipocytter etter PPAR δ overuttrykk [67].

Behandling med PPAR δ -agonisten GW viste en oppregulering av genene for kontraktile proteiner i langsomme fibre, mitokondriell biologi og β -oksidasjon. GW ga en vedvarende induksjon av gener for fibertype I, som igjen delvis kan forklare at musene som fikk denne dietten bare gikk opp 30 % i kroppsvekt sammenlignet med kontrollgruppen. En dramatisk reduksjon i akkumulering av fettmasse og forbedret glukosetoleranse ble også observert etter behandling med GW. Det foreslås dermed at inntak av en PPAR δ -agonist, som stimulerer til muskelfibertype konvertering, kan beskytte mot fedme [69]. Overuttrykk av PPAR δ i skjelettmuskel hos mus kan muligens også ha en beskyttende effekt mot fedme, da transgene mus på fettrik diett la på seg 50 % mindre enn villtype mus [65].

Man har foreslått at PGC-1 α er en fysiologisk regulator, en omveksler, for type I-fiber. PGC-1 α uttrykkes først og fremst i muskler som har mye type I-fibre [57]. Økes uttrykket av PGC-1 α i muskler rike på type II-fibre oppstår endringer i morfologi, gen-uttrykk og funksjon hos musklene *in vivo*. Transgene mus med PGC-1 α -overuttrykk viste økt antall mitokondrier og økning i funksjon av mitokondrier forbundet med en høyere andel type IIa og type I-oksidative muskler [57, 70].

1.5.3 Fibertype og insulinresistens

Det er vist en sammenheng mellom fibersammensetning og insulineffekter i human skjelettmuskel [71]. I signaltransduksjonsveien hos insulin har man funnet spesifikke forskjeller i fibertype [65]. Man fant også en tiltagende reduksjon i prosentandel fibertype I mellom kontrollgruppe, overvektige og overvektige T2D. Denne reduksjonen i prosentandel fibertype I kan sees på som en parallell til utvikling av insulinresistens, som klassisk forløper fra slank til overvektig og videre til overvektig T2D [71].

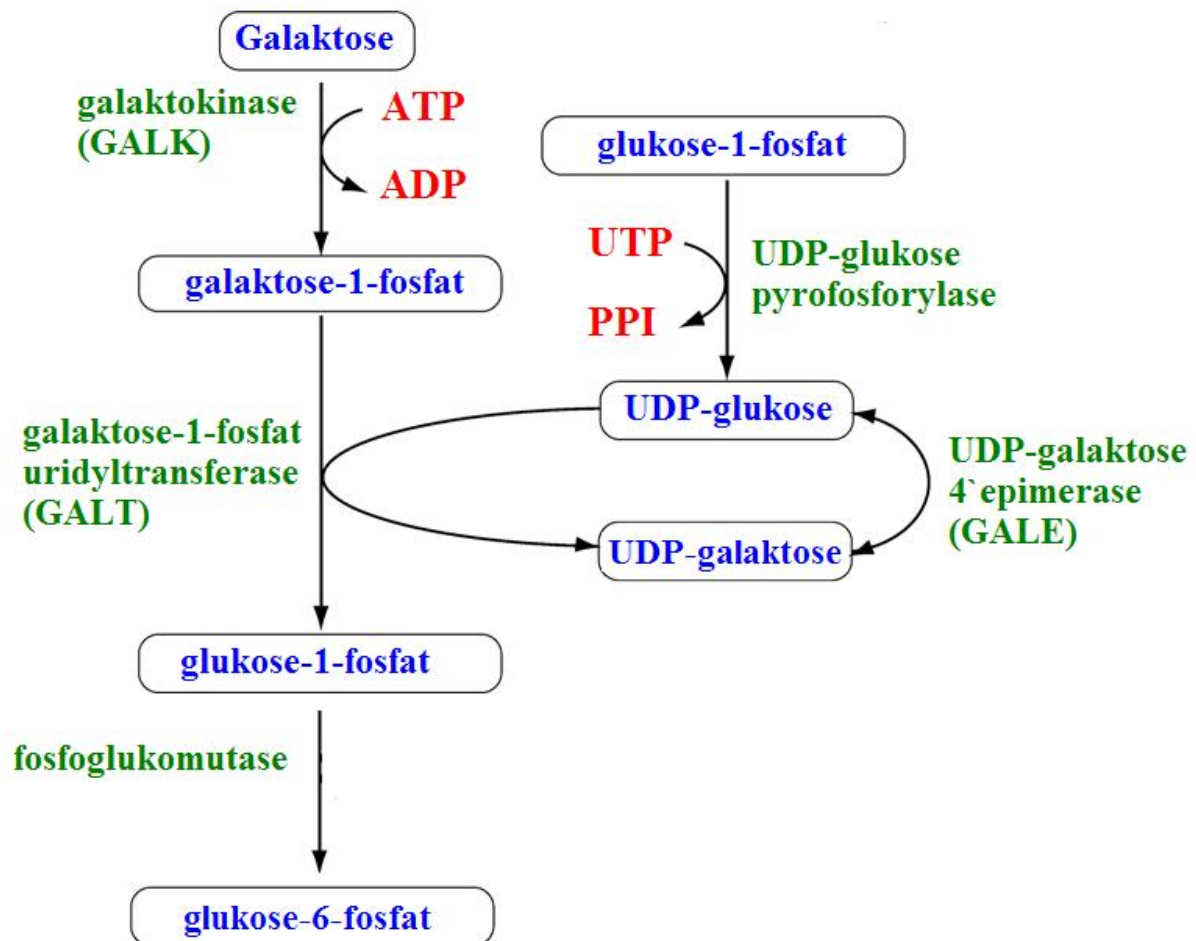
Fibertype-spesifikke forskjeller hos skjelettmuskelceller i reguleringen av insulin signalerings transduksjon har blitt observert. Oksidative fibre hadde en større insulineffekt med hensyn på IRS-1-tyrosinfosorylering og PI 3-kinase-aktivitet sammenlignet med glykolytiske fibrer fra skjelettmuskel. Dette kommer trolig av økt uttrykk av proteiner i signalkaskaden, samt økt funksjonalitet hos signalerende intermediater [72]. GLUT-4 innholdet viser seg å være høyere i skjelettmuskelceller som har høy prosentandel oksidative fibre [73]. Dette kan trolig medføre økt opptak av glukose til cellene, og dermed vil blodglukosnivået senkes, noe som har en positiv effekt på insulinresistens.

1.6 Substanser benyttet under inkubering av skjelettmuskelceller

Følgende substanser ble benyttet i oppgaven, både som forbehandling og som akuttbehandling under inkubering i CO₂-trapper i inkubator.

1.6.1 Galaktose

Glukose ble byttet ut med galaktose i mediet som cellene ble dyrket i. Galaktose, i likhet med glukose, er et monosakkarid. Metabolisme av galaktose (figur 1.6) danner glukose-6-fosfat. Metabolisme av galaktose til pyruvat i glykolysen gir lavere eller ingen ATP-produksjon. Dermed tvinges cellene til å benytte seg av OXPHOS isteden for å produsere ATP via glykolysen [63, 64].



Figur 1.6: Metabolisme av galaktose. Modifisert fra [74].

I en studie med humane cancerceller, som ble dyrket i et medium bestående av galaktose og glutamin, ble det vist at cellene byttet fra glykolyse til OXPHOS når glukose ikke var til stede. Cellene som vokste i nærvær av galaktose viste også en stimulering av mitokondriell respirasjon, samt en økning i tettheten til matriks i mitokondriene [64].

1.6.2 Oljesyre

Oljesyre er en umettet fettsyre bestående av 18 karbonatomer (18:1, n-9). Overskudd av lipider kan endre oksidasjon av intramyocellulære lipider, en økning i OA ekstracellulært medførte en redusert oksidasjon av intracellulære lipider [75]. Oljesyre er vist å påvirke fettsyremetabolismen på en slik måte at den medførte en økt akkumulering av lipider i humane myotuber, etter forbehandling med oljesyre [39].

1.6.3 GW501516

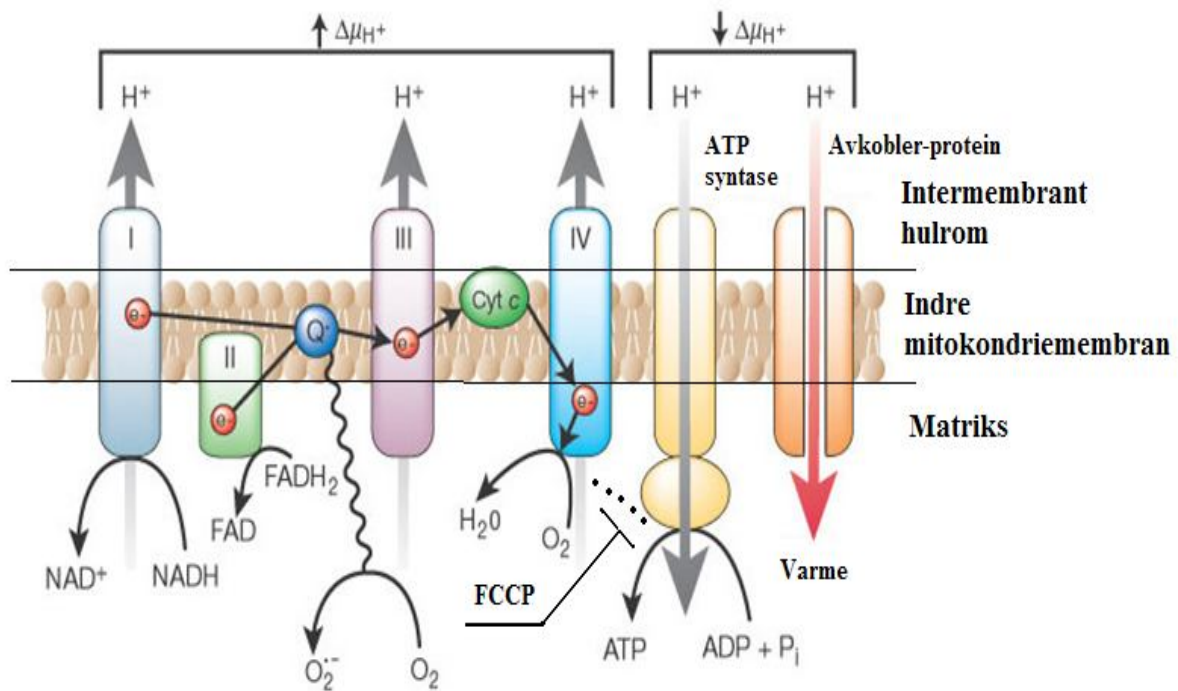
GW501516 (GW) er en selektiv PPAR δ agonist. Dimopoulos *et al* [76] viste at GW øker både fetttsyreoksidasjon og gen-uttrykket av CPT-1 og PGC1- α hos L6 myotuber. Opptak og oksidasjon av glukose og syntese av glykogen ble ikke signifikant påvirket av GW.

Myotubene ble heller ikke mer insulinsensitive, og GW ga ikke beskyttelse mot utvikling av insulinresistens induisert av PA [76]. En randomisert dobbeltblindet studie på overvektige menn viste at GW reverserte flere tilstander assosiert med metabolsk syndrom uten å øke oksidativt stress. Denne effekten skyldtes trolig økt fetttsyreoksidasjon hos skjelettmuskel [77].

1.6.4 Karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon

Karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) er et eksempel på en frikobler av OXPHOS i mitokondrier (figur 1.7). FCCP hemmer koblingen mellom elektrontransport og fosforyleringsreaksjoner og hemmer dermed ATP-syntesen uten å påvirke den respiratoriske kjeden og ATPsyntase [44]. Normalt vil ATP dannes etter elektrontransport av NADH eller FADH₂ til oksygen. Med en frikobler til stede produseres ikke ATP lenger, til tross for at oksygen reduseres til H₂O [29].

FCCP frikobler elektrontransporten fra ATP-syntesen, man oppnår mer elektrontransport, men hemmer samtidig syntesen av ATP. Bruk av FCCP gjør at man kan oppnå den maksimale OXPHOS kapasiteten hos myotubene (figur 2.1).



Figur 1.7 Frikobling av elektrontransportkjeden ved hjelp av FCCP. ADP; adenosindifosfat, ATP; adenosintrifosfat, Cyt C; cytokrom C, FAD; flavin adenindinukleotid, FADH₂; redusert form av FAD, FCCP; karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon, H⁺; hydrogen, H₂O; vann, NAD⁺; nikotinamid adenin dinukleotid, NADH; redusert form av NAD, O₂; oksygen, O₂⁻; superoksid, P_i; fosfat, Koenzym Q; ubiquinon, Δμ_{H⁺}; mitokondrielt membranpotensial. Modifisert fra [78].

1.7 Formål med oppgaven

Differensierte humane myotuber i kultur har lavt mitokondrielt oksidativt potensial [24]. Det var derfor ønskelig å utvikle en cellemodell hvor myotubene er mer oksidative, og er mer metabolsk fleksible. Det var derfor ønskelig å modifisere energimetabolismen hos differensierende celler, dette ble forsøkt gjort ved å bytte ut glukose i cellenes dyrkningsmedium med galaktose.

Grunnleggende spørsmål:

- Hvilke endringer i energimetabolisme vil man observere hos celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose?
- Vil celler dyrket i galaktose forskyve sin energiproduksjon fra aerob glykolyse til mitokondriell OXPHOS?
- Vil celler dyrket i galaktose inneholde flere mitokondrier, og vil det forekomme noen endringer med hensyn på fibertypegener hos celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose?

Andre deler av oppgaven gikk ut på å:

- Undersøke fettsyreoksidasjon- og opptak hos galaktosebehandlede celler
- Undersøke glukoseoksidasjon- og opptak hos galaktosebehandlede celler
- Undersøke myotubenes maksimale OXPHOS-kapasitet ved å benytte frikobleren FCCP
- Undersøke endringer i oksidativ metabolisme og fibertypemarkører ved hjelp av real-time PCR

Gjennom hele oppgaven vil celler dyrket i galaktose bli sammenlignet med celler dyrket i glukose (kontroll) når resultatene blir diskutert.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I), Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax uten glukose (DMEM/Glutamax-I, No Glucose), føtalt kalveserum, penicillin-streptomycin, fungizone (amfotericin B) og Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS med Ca^{2+} og Mg^{2+}) ble innkjøpt fra Gibco, Paisley UK. Ultrosor G ble innkjøpt fra BioSerpa, Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc, Paris Frankrike. Insulin Actrapid® ble innkjøpt fra NovoNordisk, Bangsværd Danmark. Glukose, galaktose, ekstracellulær matriks (ECM) gel, dimetylsulfoksid (DMSO), L-karnitin hydroklorid, bovint serum albumin (BSA), β -merkaptoetanol, oljesyre, HEPES, D-glukose og Karbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon ble innkjøpt fra Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA. GW501516 ble fremstilt av Calin C. Ciocoiu, Universitetet i Oslo. Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate ble innkjøpt fra Biorad Laboratories Inc, København Danmark. [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (55 mCi/mmol), [$\text{U-}^{14}\text{C}$]glukose (5 mCi/mmol), D- [$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose (5 mCi/mmol) ble innkjøpt fra American Radiolabeled Chemicals med tilholdssted i St. Louis, MO, USA. Unifilter®-96 GF/B, TopSeal®-A film og OptiPhase Supermix ble anskaffet fra PerkinElmer, Shelton, Scotland, USA. 96- brønners Brett Corning®CELL bind Surface, 12 brønners Brett med glassbunn og 25cm² cellekultur flasker kom fra Corning Inc, Corning, NY, USA. Agilent Total RNA isoleringskit ble kjøpt inn fra Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA. SYBR green, Taqman reverse transkripsjonskitreagenser og MicroAmp® Optical Reaction Plate kom fra Applied Biosystem, Warrington, UK. Primere (COXIV, CPT-1b, CYT C, GADPH, MCAD, MHC I, MHC II) ble kjøpt inn fra Invitrogen, Paisley, Scotland, UK. Bodipy 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene), MitoTracker Red FM, og Hoechst 33258 ble kjøpt inn fra Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA.

Alle andre reagenser benyttet i denne oppgaven var av analytisk kvalitet.

2.2 Donoropplysninger

I denne oppgaven ble det gjort forsøk med skjelettmuskelceller fra friske frivillige donorer. Skjelettmuskelcellene som ble benyttet var isolert fra *Musculus obliquus internus abdominis*.

Tabell 2.1 Oversikt over donorkarakteristika

ID	Alder (år)	Kjønn	BMI (kg/m ²)	Fastende glukose (mmol/l)
LD 15	55	Kvinne	29,1	6,9
LD 17	56	Kvinne	23,2	5,6
LD 19	65	Kvinne	23,7	6,4
LD 21	68	Kvinne	29,7	5,2
LD 22	40	Mann	28,7	5,0
LD 32	70	Kvinne	24,2	5,0
Gj.snitt ± SEM	59 ± 4,6		26,4 ± 1,2	5,7 ± 0,3

(Forkortelser: LD = levende donor, BMI = Body mass index, SEM= standardfeil)

2.3 Celledyrking

Metoden benyttet til celledyrking i denne oppgaven følger prosedyrene til Gaster *et al* [79, 80].

2.3.1 Dyrking av humane myoblaster

Ampuller med humane myotuber ble hentet ut fra en nitrogentank, og tint raskt ved 37 °C i et vannbad. Cellesuspensjonen ble flyttet over til et sentrifugeringsrør på 50 ml, og dråpevis ble 5 ml dyrkningsmedium applisert. Blandingen ble sentrifugert i 7 minutter ved 1800 rpm.

Toksisk DMSO ble fjernet ved å suge av supernatanten. 1 ml utsåingsmedium ble tilsatt for å resuspendere cellepelletten. For å beregne hvilket volum utsåingsmedium (appendiks I) man trengte ble celletettheten talt, ved at det ble tatt ut 40 µl fra cellesuspensjonen som ble farget med 40 µl 0,4 % tryptanblått. Passende volum av utsåingsmedium ble så tilsatt cellesuspensjonen, og blandet godt.

Cellene ble sådd ut på coatede 96 brønners brett (Corning® CELLbind surface) eller flasker (Corning® flask 25 cm²) tilsvarende 6000-8000 celler per brønn eller ca 100 000 celler per ml per flaske. Flaskene ble coatet med ekstracellulær matriks (ECM). Brettene ble så inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.2 Myoblaster prolifererer og differensierer til humane myotuber

Etter inkubering i 24 timer ble utsåingsmediet byttet ut med proliferasjonsmedium (appendiks I). Primært var det to varianter av behandling hos skjelettmuskelcellene, glukose eller galaktose. Bytte av proliferasjonsmedium ble gjort hver 2.-3. dag. Cellene ble dyrket til de var 70-80 % konfluente, noe som tok omtrent 7 dager. Når cellene var 70-80 % konfluente ble proliferasjonsmediet byttet til differensieringsmedium (appendiks I). Bytte av differensieringsmedium ble gjort hver 2. dag frem til forsøksdagen. Dette var dag 7 etter første bytte til differensieringsmedium. Brønnene ble tilsatt ulike substanser fra dag 2 etter utsåing, og ved bytte til differensieringsmedium, samt dag 5 etter differensiering. Cellene ble undersøkt i mikroskop ved hvert mediebytte, og cellene ble også fotografert for å dokumentere utseende og vekst.

2.3.3 Forbehandling med oljesyre og GW501516

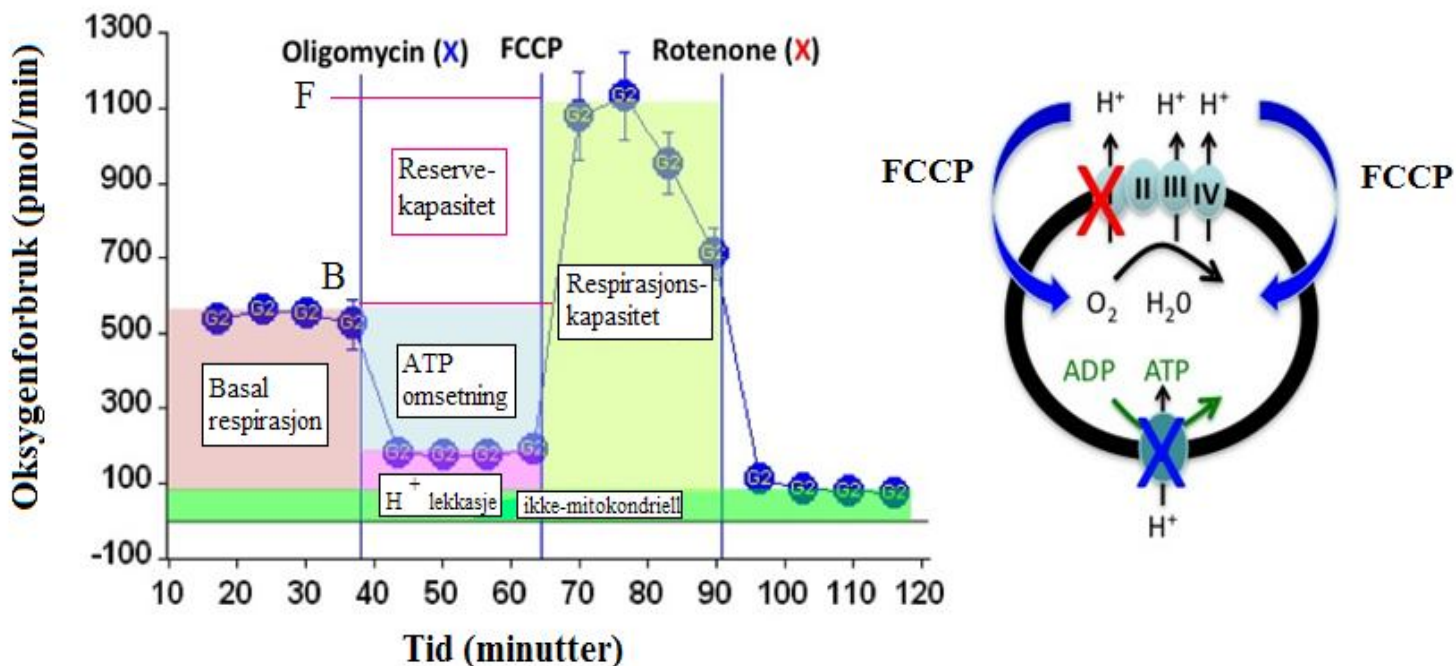
De humane skjelettmuskelcellene ble forbehandlet med oljesyre og GW. Oljesyre ble benyttet under både proliferering og differensiering, mens GW ble tilsatt dag 5 og 6 etter differensiering.

2.3.4 Akuttbehandling med FCCP

FCCP er en substans som kan benyttes til å frikoble elektrontransporten fra ATP-syntesen. Elektrontransporten vil fortsette, men syntesen av ATP vil hemmes (figur 1.7 og figur 2.1). Bruk av FCCP vil dermed gjøre at man kan oppnå maksimale OXPHOS-kapasiteten hos myotubene. I den sammenheng ble mitokondriefunksjon beregnet ved hjelp av de to parametrene B (basal respirasjon, uten FCCP) og F (med FCCP) [81].

Materialer og metoder

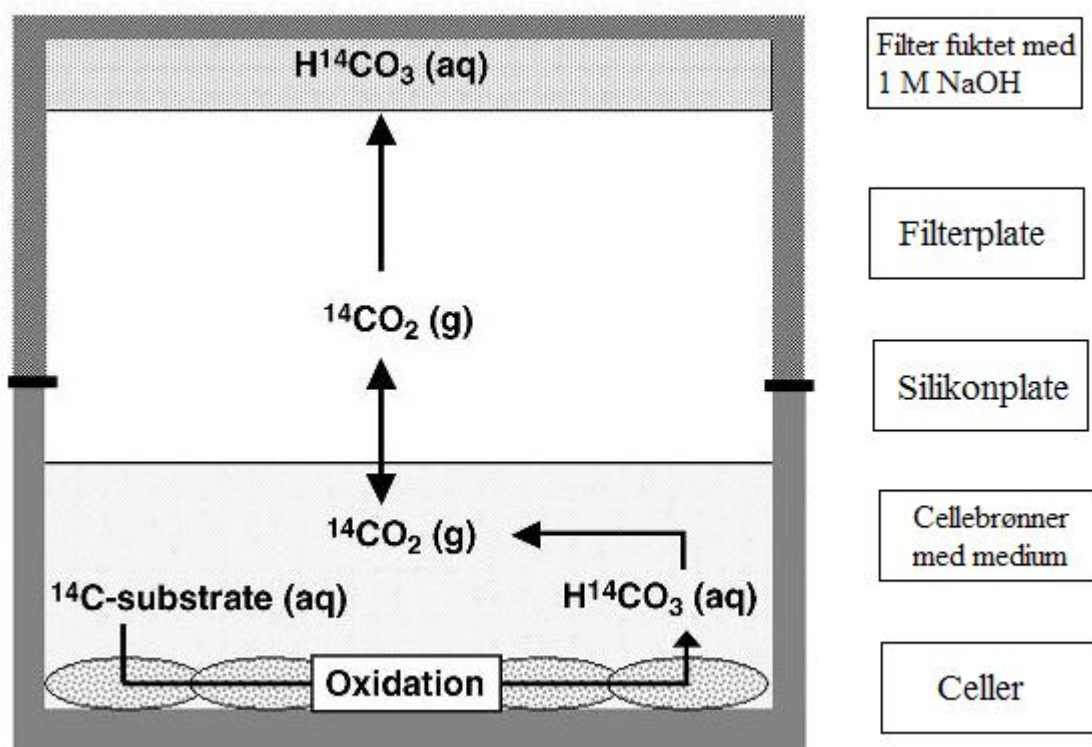
B er basal, det vil si oksidasjon uten frikobling, og F vil si noe om frikobling. En slik frikobling gjør at man oppnår maksimal OXPHOS-kapasitet hos mitokondriene. Dette forteller noe om mitokondriefunksjonen. Beregning av F-B vil dermed få fram forskjellen mellom basal og FCCP, altså selve effekten av tilsetningen av FCCP, det vil si reservekapasiteten cellene har til å oksidere (figur 2.1). I tillegg ble brøken B/F beregnet. Denne brøken forteller noe om hvor mye av den maksimale oksidative fosforyleringskapasiteten cellen benytter seg av.



Figur 2.1 Oksygenforbruk og mitokondrielle modulatorer. Tilsetning av FCCP vil øke cellens respirasjonskapasitet. Reservekapasiteten kan sees i figuren som differansen mellom F (med FCCP) og B (basal). Til høyre i figuren viser de blå pilene effekten av FCCP. Modifisert fra [82].

2.4 Substrat-oksidasjonsmetoden

Fremgangsmåten benyttet i denne oppgaven er beskrevet av Wensaas *et al* [83]. Denne metodens formål er å kvantifisere oksidasjon og opptak av [¹⁴C]glukose og andre radiomerkede substanser. Dette gjøres ved at mengden CO₂ produsert fra den radiomerkede glukosen via cellulær respirasjon fanges opp i den alkaliske væsken som ble tilsatt i filteret. Fettsyrer, i dette tilfellet OA, spaltes til acetyl-CoA gjennom β-oksidasjon. Acetyl-CoA vil entre sitronsyresyklus og frigjøre [¹⁴C]CO₂ (g) som også fanges opp i filteret. På denne måten kan oksidasjon kvantifiseres.



Figur 2.2 Prinsipp bak substrat-oksidasjonsmetoden. Radiomerkede substanser, glukose og fettsyrer, oksideres i cellene. Det dannes CO_2 (g) som fanges opp i filteret, her reagerer CO_2 med den basiske løsningen og det dannes HCO_3 i løsning. Modifisert fra [83].

2.4.1 Substrat-oksidasjonsforsøk med fettsyrer, glukose og FCCP

På forsøksdagen ble differensieringsmediet byttet ut med akuttmedium (appendiks II).

En 96-brønners filterplate (Unifilter®-96 GF/B®) ble fuktet med 1 M NaOH, tilsvarende 20 μl per brønn. Overflødig NaOH ble fjernet, og 50 μl akuttmedium med radioaktiv fettsyre (100 μM) eller radioaktiv glukose (100 μM) ble tilsatt i hver brønn. Celleplaten ble delt i to horisontalt, hvor cellene på den øvre halvdel fikk akuttmedium uten FCCP, og den nederste halvdel fikk akuttmedium med FCCP. Platen med akuttmediet ble dekket med en silikonplate og en filterplate, slik at det ble dannet et lufttett system (figur 2.2).

En metallplate ble lagt ned over filterplaten, og en platepresser (også kjent som CO_2 trapper) presset alle delene sammen. Brettsandwichen ble inkubert i 4 timer ved 37 °C.

Etter inkuberingen ble brettene separert. Det ble tilsatt 40 μl Optiphase Supermix® per brønn til filterplaten, og denne ble så forseglet med TopSeal®-A.

Materialer og metoder

Filterplaten ble hensatt i 48 timer før radioaktiviteten ("counts per minute") kunne måles ved hjelp av Microbeta® Plus. Akuttmediet ble fjernet fra cellebrettet, og cellebrettet ble deretter vasket 2 ganger med 150 µl PBS-buffer hvor pH-verdien var justert til 7,4. Cellene ble så lysert med 200 µl 0,1 M NaOH.

Lysatet ble så fryst ned (- 20 °C), og tatt opp igjen dagen etter. 50 µl av lysatet ble overført til en 96-brønners Isoplate® slik at celleassosiert (CA) radioaktivitet kunne måles ved hjelp av Microbeta® Plus. Det ble tilsatt 200 µl Optiphase Supermix® til hver brønn som inneholdt lysat, og brettet ble hensatt i 2 timer før kvantifisering ved hjelp av Microbeta® Plus.

Radioaktive isotoper

Disse isotopene ble benyttet i denne oppgaven:

- [1-¹⁴C]oljesyre (1 µCi/ml, 18,3 µM)
- [U-¹⁴C]glukose (1 µCi/ml, 100 µM)

Den endelige konsentrasjonen av oljesyre i akuttmediet var på 100 µM.

2.4.2 Overkryssningsforsøk med oljesyre og glukose

Cellene fikk 1 av 3 forbehandlinger: glukose i proliferasjons – og differensieringsmediet, galaktose i proliferasjons – og differensieringsmediet, eller glukose i proliferasjonsmediet og galaktose i differensieringsmediet. Før substratoksidasjonsforsøk ble det satt opp 4 betingelser akutt på en slik måte at betingelsene krysset over hverandre. Cellebrettet ble delt inn i 4 hvor en fjerdedel fikk radioaktiv oljesyre (appendiks III A), en fjerdedel fikk radioaktiv oljesyre og ikke-radioaktiv glukose (appendiks III B), en fjerdedel fikk radioaktiv glukose (appendiks III C) og den siste fjerdedelen fikk radioaktiv glukose og ikke-radioaktiv oljesyre (appendiks III D).

2.4.3 Kvantifisering av mengde protein

Prosedyren bak proteinmåling bygger på metoden utarbeidet av Bradford [84]. Standarder bestående av BSA (konsentrasjoner på 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml) oppløst i 0,1M NaOH ble tilsatt i de 2 første radene på en 96-brønners-mikrotiterplate.

Deretter ble det tilsatt 50 µl homogenisert cellelysat til platen.

Hver brønn ble tilsatt 200 µl "Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate" som på forhånd ble fortynnet i forholdet 1:5 i destillert vann.

Metoden for proteinmåling baseres på at stoffet "Coomassie Brilliant Blå G-250" i fargereagenset reagerer med basiske og aromatiske aminosyrer i surt miljø, og dermed skifter farge fra rødt til blått. Mikrotiterplaten ble hensatt i 5 minutter, og deretter plassert i Wallac Victor™ mikroplateleser. Dette er et spektrofotometrisk instrument som måler absorbansen til prøvene ved 595 nm. Proteinkonsentrasjonene i brønnene ble beregnet ved hjelp av en standardkurv basert på kjente konsentrasjoner av protein.

2.5 Isolering av RNA og analyse av genekspressjon ved hjelp av revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real time PCR)

Real-time PCR er en metode som benyttes for å nøyaktig kunne undersøke endringer i mRNA-uttrykk. RT-Real time PCR ble derfor utført for å se på effekten av galaktose på gen-nivå. Det ble sådd ut ca 100.000 celler per ml på 25cm² flasker. Cellene fikk glukose, galaktose eller en kombinasjon av begge under proliferering og differensiering. På forsøksdagen ble cellene vasket 2 ganger med PBS i DEPC-H₂O. Deretter ble det tilsatt 500 µl lysisbuffer fra Agilent. Flaskene ble så skrapet slik at cellene ble løsrevet fra bunnen, før lysatet ble overført til autoklaverte eppendorf rør. Prøvene ble oppbevart i fryser ved - 70 °C.

2.5.1 Isolering og kvantifisering av RNA

Agilent Technologies® har beskrevet metoden for RNA-isolering. Lysatet ble tatt ut fra fryseren og tint på varmeblokk. For å forhindre RNase-kontaminasjon av prøvene ble alle prosedyrene gjennomført med hansker og sterilt utstyr. Agilent Technologies® leverer et kit bestående av nukleasefritt vann, vaskeløsninger og et utvalg minikolonner.

Materialer og metoder

Dette kittet ble benyttet til isolering og kvantifisering av RNA. En mini-prefiltreringskolonne ble benyttet til den første filtreringen. 300 µl lysat ble sentrifugert, ved hjelp av Thermo Scientific® Heraeus Fresco 21 sentrifuge, i mini-prefiltreringskolonnen ved 16000 g i 3 minutter. Dette ble gjort for at de større cellefraksjonene skulle bli værende igjen i kolonnen.

En like stor mengde 70 % etanol ble tilsatt i filtratet etter sentrifugeringen. Filtratet ble blandet godt med etanol og hensatt på arbeidsbenken i 5 minutter. 600 µl av filtratet ble tilsatt i en mini-isolasjonskolonne og kolonnen ble sentrifugert ved 16000 g i 30 sekunder.

Den samme kolonnen ble benyttet til å gjenta filtreringen i forrige trinn for å sikre at mesteparten av RNA ble sittende fast i kolonnen. Vaskeløsning ble tilsatt i kolonnen, og kolonnen ble sentrifugert ved 16000 g i 30 sekunder. Dette trinnet ble gjentatt en gang. For å kunne eluere RNA fra kolonnen ble det tilsatt 15 µl nukleasefritt vann, og kolonnen ble sentrifugert i et minutt ved 16000 g.

Mengden RNA i prøvene ble kvantifisert ved hjelp av spektrofotometeret picoDrop. 2,5 µl ble tatt ut fra prøvene og analysert ved hjelp av "Optical density" (OD) målinger. OD-målingene ble utført ved bølgelengden 200-280 nm.

2.5.2 Syntese av cDNA

RNA tilsvarende 2 µg ble tatt ut fra de ulike prøvene og overført til mini-ependorfrør (MicroAmp®). DEPC-H₂O ble tilsatt prøvene tilsvarende et volum på 10 µl.

Reaksjonsmedium for komplementær cDNA syntese (appendiks IV) ble tilsatt (10 µl).

Prøvene, samt den negative kontrollen ble plassert i Thermal Cycler 9600 Perkin-Elmer, for cDNA syntese. Prosessen i synteseapparater er som følger: prøvene ble eksponert for 25 °C i 10 minutter, hexamer i template priming, deretter ble prøvene utsatt for 37 °C i 80 minutter, noe som utgjorde reverse transkriptase, og tilslutt ble prøvene utsatt for 85 °C i 5 sekunder, dette tilsvarte inaktivering av reverse transkriptase.

2.5.3 Real-time PCR

Det ble benyttet en MicroAmp® Optical Reaction Plate, hvor 2,5 µl fortynnet cDNA fra prøvene samt standardene ble overført til sine respektive brønner. Prøvene var på forhånd fortynnet 1:5 eller 1:10 i DEPC-H₂O utfra hvilket gen som skulle undersøkes (tabell 2.2). Deretter ble reaksjonsblandingen (appendiks IV), bestående av 2 x SYBR Green Master mix, ”forward” primer, revers primer, samt DEPC-H₂O tilsatt til brønnene. Standarder, prøver og negative kontroller var allerede applisert på platen. Det ble tatt ut lik mengde av de ulike cDNA-prøvene, og disse ble blandet med hverandre og fortynnet 1:5 i DEPC-H₂O. Dette utgjorde standardene.

Standardene ble fortynnet på nytt med DEPC-H₂O i forholdet 1:2 til 4 ulike konsentrasjoner; 1000, 500, 250, 125. På grunnlag av denne fortynningsrekken ble det utarbeidet en standardkurve. Standardkurven ble benyttet til å beregne amplifisert cDNA i de ulike prøvene. Reaksjonsplaten ble satt inn i instrumentet ABI PRISM 7000 Applied Biosystem. Prøvene gjennomgikk deretter 40 sykluser, der hver syklus består av to deler. Prøvene ble utsatt for 95 °C i 15 sekunder (denatureringsfase), og deretter ble de utsatt for 60 °C i 60 sekunder (hybridiseringsfase).

Sekvenser på målgenets DNA er komplementære til primere benyttet i forsøkene. Dermed vil de amplifiseres eksponentielt med en faktor på 2ⁿ. I denatureringsfasen, som oppnås ved 95 °C, vil DNA trådene separeres, og i hybridiseringsfasen, ved 60 °C, vil primerne binde seg til den komplementære sekvensen i DNAet til målgenet. Etter denne fasen amplifiseres DNAet i en polymeriseringsfase. For å kunne detektere dobbeltrådet DNA og amplifiseringen av DNA ble det benyttet 2 x SYBR Green Master mix. Dette er et fluoriserende middel som kun bindes til dobbeltrådet DNA. 2 x SYBR Green Master mix fluoriserende intensitet er proporsjonal med mengden cDNA i prøvene. Det relative genuttrykket ble kvantifisert ved hjelp av standardkurve, Ct (den minste detekterbare grensen) og n. Etter deteksjon av i hvilken syklus fluorescens oppstår, ble n i den eksponentielle ligningen 2ⁿ beregnet.

Tabell 2.2 Primere benyttet i denne masteroppgaven

Gener	Genbank nummer	Primere
CPT1	NM_004377	F: 5'-GAG GCC TCA ATG ACC AGA ATGT -3' R: 5'-GTG GAC TCG CTG GTA CAG GAA -3'
CYC 1	NM_001916	F: 5'-CTG CCA ACA AGG GAG CATT-3' R: 5'-CGT GAG CAG GGA GAA GAC GTA-3'
COX IV	NM_001861.2	F: 5'-GGA TTC GCA GCT CTG GTG AT-3' R: 5'-TTC CGC TCG TCC GTC AA-3'
GAPDH	NM_002046	F: 5'TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3' R: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'
MCAD	NM_000016.4	F: 5'-AGG CCG TGA CCC GTG TATT-3' R: 5'-AAC CCC GCT GCC ATG TT-3'
MHC I	NM_005963	F: 5'-CCA GAC TGT GTC TGC TCT CTT CA-3' R: 5'-ATG GAG CAT GAG CTT GTC CTG-3'
MHC II	NM_017534	F: 5'-AGG TCG GCA ATG AGT ATG TCA-3' R: 5'-GAA GAT GTT CCT GTG-3'
36B4	NM_007475	F: 5'-ATC TCC AGA GGC ACC ATT GAA-3' R: 5'-TCG CTG GCT CCC ACC TT-3'

2.6 Levende bildebehandling

Myotubene ble sådd ut på 12 brønners Brett med glassbunn. Cellene ble behandlet med glukose under proliferering og differensiering eller galaktose under proliferering og differensiering. På forsøksdagen, dag 7 etter differensiering, ble levende bildebehandling utført. For å farge lipiddråper ble myotubene farget med Bodipy 493/503 (2 µg/ml) i 5 minutter. Fargeløsningen vaskes så vekk med PBS. Mitokondriene ble så farget med MitoTracker Red FM (100 nM) i 15 minutter, og kjernene ble farget med Hoechst (2,5 µg/ml) i 15 minutter. Mellom de to siste inkuberingene med farge ble cellene vasket med PBS. Etter farging ble en Olympus Scan^R platform (Olympus IX81 inverted fluorescence mikroskop) benyttet til levende bildebehandling. Bildene ble tatt med 20X objektiv og det ble benyttet standard filtersett med eksitasjonsvindu for Hoechst (350 nm), Bodipy 493/503 (488 nm), MitoTracker Red FM (594 nm) og et trippelt filter for emisjon.

I hver brønn ble det fotografert fra 25 ulike posisjoner. Hvert bilde består av 12 rammer tatt i z-retning 1 μm fra hverandre. Softwaren (Scan^R software) ble benyttet for automatisk analyse slik at man kunne kvantifisere antall kjerner, tetthet, diameter og antall lipiddråper og total mitokondriell masse, som tilsvarer total intensitet av MitoTracker Red [33, 85].

2.7 Statistiske analyser

Samtlige data i denne oppgaven presenteres som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM).

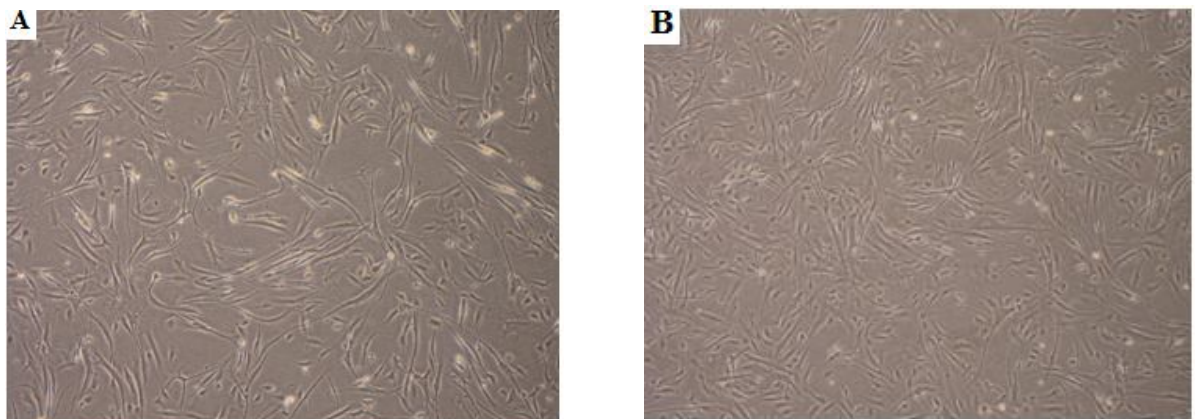
Gjennomsnittsverdien er beregnet fra 4-6 paralleller for hvert forsøk. For de statistiske analysene ble dataprogrammet SPSS med modellen "linear mixed modell" benyttet.

Signifikansnivået $\alpha=0,05$ har vært benyttet i denne oppgaven. For forsøkene Real-time PCR er en dobbel økning i forhold til kontroll ansett som statistisk signifikant, da det ikke var nok paralleller til å beregne tosidig t-test i GraphPad Prism 4.

3 Resultater

3.1 Utsåing av myotuber dyrket i galaktose og glukose

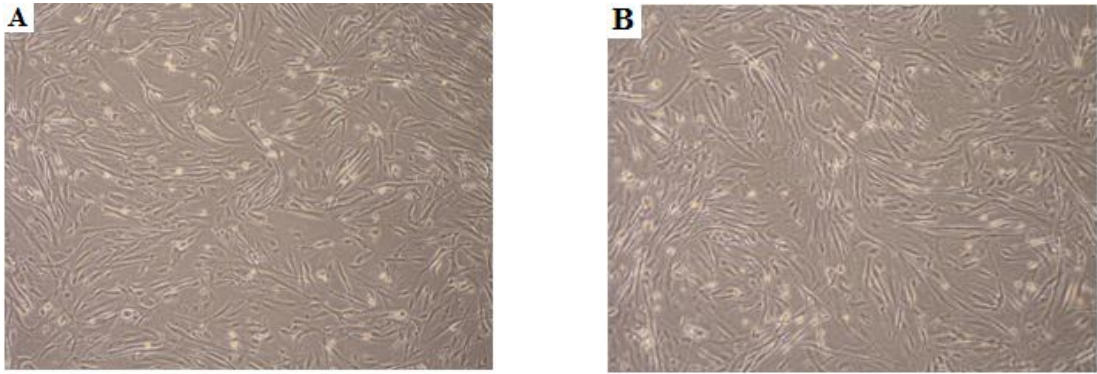
Hensikten med denne masteroppgaven var å forsøke å modifisere energimetabolismen i cellene. Dette ble gjort ved at cellene ble dyrket i galaktose istedenfor glukose. Bilder tatt under cellenes vekstperiode, for å dokumentere cellenes vekst, viste at celler dyrket i galaktose vokste saktere enn celler dyrket i glukose. Myotubene ble differensiert etter at de hadde nådd 70-80 % konfluens. Celler dyrket i galaktose trengte 1-2 døgn ekstra for å oppnå 70-80 % konfluens i forhold til celler dyrket i glukose. Dermed ble disse cellene klare for forsøk 1-2 døgn etter cellene som ble dyrket i glukose. Galaktosebehandlede celler hadde lavere mengde protein per brønn sammenlignet med glukose (data ikke vist). Det ble ikke observert noen forskjeller i celledød eller cellemorfologi mellom galaktosebehandlede og glukosebehandlede celler. Bilde 3.1 viser cellene på dag 4 under prolifereringen. Det vistes tydelig at myotubene dyrket i glukose (bilde 3.1 B) var tettere enn myotubene dyrket i galaktose (bilde 3.1 A).



Bilde 3.1: Myoblaster dyrket i glukose respektive galaktose. Bilde A) viser myoblaster dyrket i galaktose med 4 x forstørring. Bilde B) viser myoblaster dyrket i glukose med 4 x forstørring. Bildene er tatt 4 dager etter utsåing, på samme dato samt fra samme donor.

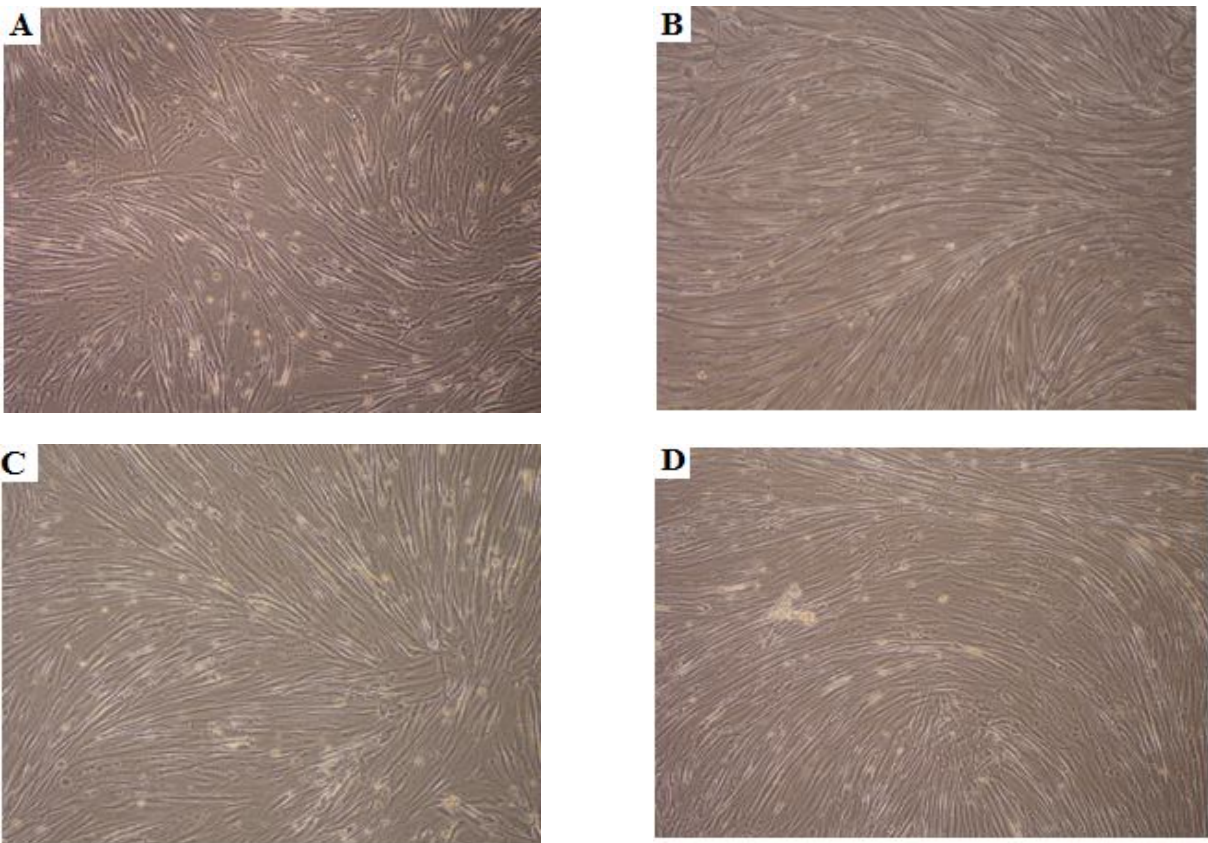
Bilde 3.2 viser celler dyrket i glukose respektive galaktose på dagen hvor cellene ble differensiert, det vil si med 2 dagers mellomrom.

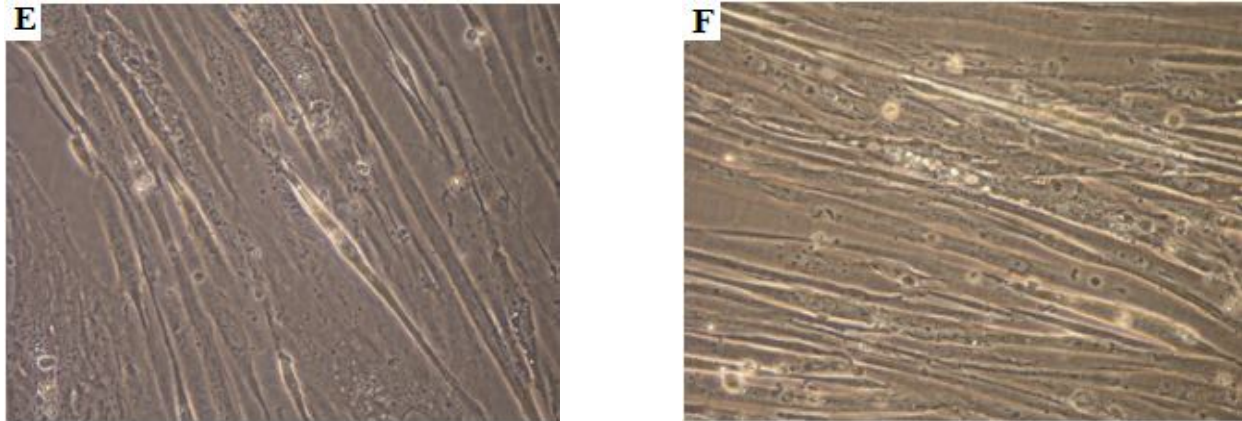
Resultater



Bilde 3.2: **Bilder av myoblaster dyrket i galaktose respektive glukose ved start av differensiering.** Bilde A) viser celler dyrket i galaktose, og bilde B) viser celler dyrket i glukose. Bildene er tatt med 4 x forstørring og med 2 dagers mellomrom, samt med samme donor.

Myotubene ble også fotografert 4 dager etter differensiering og på forsøksdagen (bilde 3.3). Bildene av galaktosebehandlede celler (bilde 3.3 A og C) viste at cellene så noe tynnere ut sammenlignet med glukosebehandlede celler (bilde 3.3 B og D). Bildene ble tatt på samme dag under differensieringen, men med 2 dagers mellomrom.



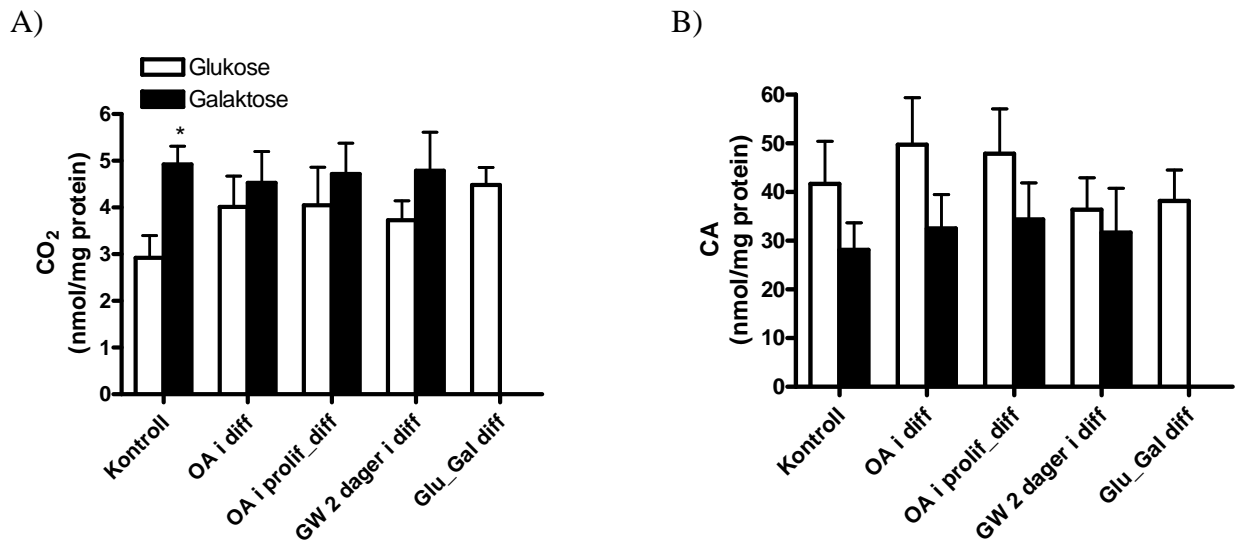


Bilde 3.3 Bilder av myotuber dyrket i galaktose respektive glukose 4 dager etter differensiering og på forsøksdagen. Bilde A) viser myotuber dyrket i galaktose 4 dager etter differensiering. Bilde B) viser myotuber dyrket i glukose 4 dager etter differensiering. Bilde A) og bilde B) er tatt med 2 dagers mellomrom. Bilde C) viser galaktosebehandlede myotuber på forsøksdagen, og bilde D) viser glukosebehandlede myotuber på forsøksdagen. Disse bildene er også tatt med 2 dagers mellomrom. Bilde E) og F) er galaktosebehandlede celler respektive glukosebehandlede celler på forsøksdagen tatt med 20 x forstørring.

3.2 Oksidasjon og akkumulering av oljesyre

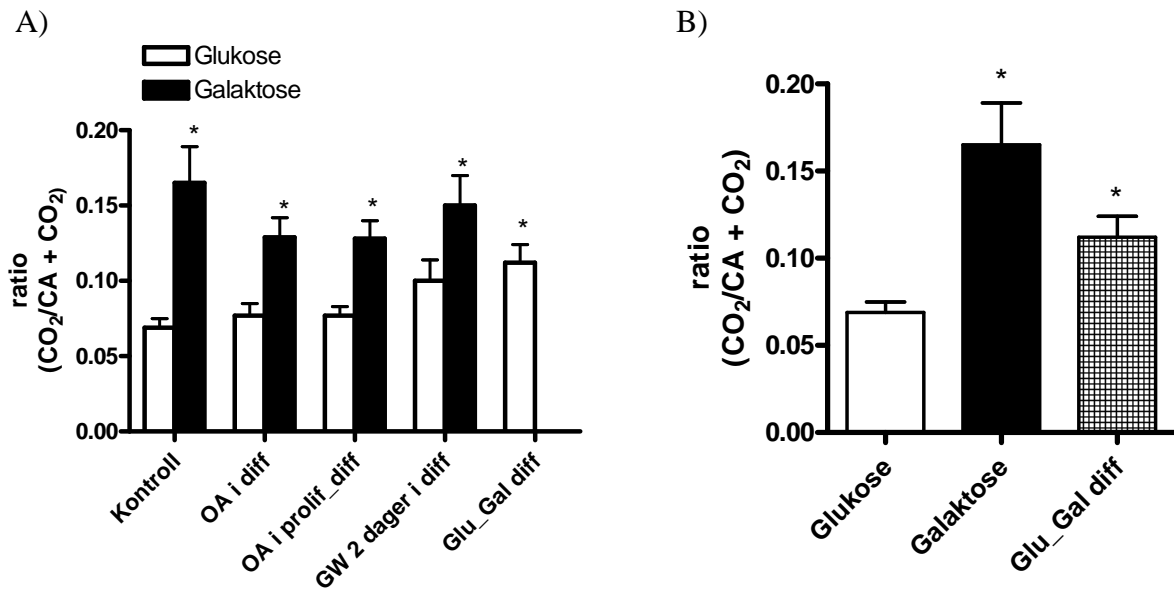
I dette forsøket var hensikten å undersøke oksidasjon og akkumulering av oljesyre hos myotuber dyrket i henholdsvis glukose og galaktose. Cellene ble forbehandlet med glukose eller galaktose under proliferering og differensiering. På forsøksdagen ble cellene inkubert med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre ($1\ \mu\text{Ci/ml}$, $100\ \mu\text{M}$) i CO_2 trapperen i 4 timer. Resultatene viste en tendens til økning av oksidasjonen hos myotubene for alle behandlinger (figur 3.4 A) sammenlignet med celler dyrket i glukose. Behandling med galaktose ga en 1,7 foldig økning i oksidasjon hos myotubene i forhold til behandling med glukose. Celler som ble dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering ga en 1,5 ganger økning i oljesyreoksidasjon sammenlignet med celler dyrket i glukose. Resultatene for akkumulering av oljesyre i myotubene viste en nedgang i akkumulering av oljesyre hos celler dyrket i galaktose sammenlignet med glukosebehandlede celler (figur 3.4 B). Akkumulering av oljesyre ble redusert for alle behandlinger i forhold til glukose med unntak av forbehandling med oljesyre hos glukosebehandlede celler.

Resultater



Figur 3.4 Effekten av kronisk forbehandling med galaktose på fettsyremetabolismen. Figuren viser oksidasjon av oljesyre (A) og akkumulering (CA) av oljesyre (B). Oljesyre (100 μ M) ble tilsatt under proliferasjonsfasen og under differensieringsfasen, samt under begge fasene. GW (100nM) ble tilsatt under differensieringsfasen hos både glukosebehandlede og galaktosebehandlede celler. Myotubene ble inkubert i 4 timer på forsøksdagen med [1-¹⁴C]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M). *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler. Data er vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=6). CA; celleassosiert akkumulering, diff; differensieringsmedium, glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA, oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

Celler som ble behandlet med galaktose både under proliferering og differensiering viste signifikant økt fraksjonell oksidasjon av oljesyre i forhold til glukosebehandlede celler. Celler som fikk en kombinasjon av glukose og galaktose viste økt fraksjonell oksidasjon. Økningen var signifikant høyere for alle varianter av galaktose behandling. Økningen i fraksjonell oksidasjon er 2,4 ganger så høy for celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose. For celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering var økningen i fraksjonell oksidasjon 1,6 ganger så høy som for celler dyrket i galaktose (figur 3.5).



Figur 3.5: Effekten av kronisk forbehandling med galaktose på fettsyremetabolismen. Figur A) viser fraksjonell oljesyreoksidasjon etter kronisk forbehandling med galaktose. Figur B) viser 3 av behandlingene. Oljesyre (100 μ M) ble tilsatt under proliferasjonsfasen og under differensieringsfasen, samt under begge fasene. GW (100nM) ble tilsatt under differensieringsfasen hos både glukosebehandlede og galaktosebehandlede celler. Fraksjonell oksidasjon ble målt etter 4 timer inkubering med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M) i celleinkubator. *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler. Data illustrert som gjennomsnitt \pm SEM (n=6). CA; celleassosiert akkumulering, diff; differensieringsmedium, glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA, oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

3.2.1 Effekter av forbehandling med oljesyre og GW på fettsyremetabolismen

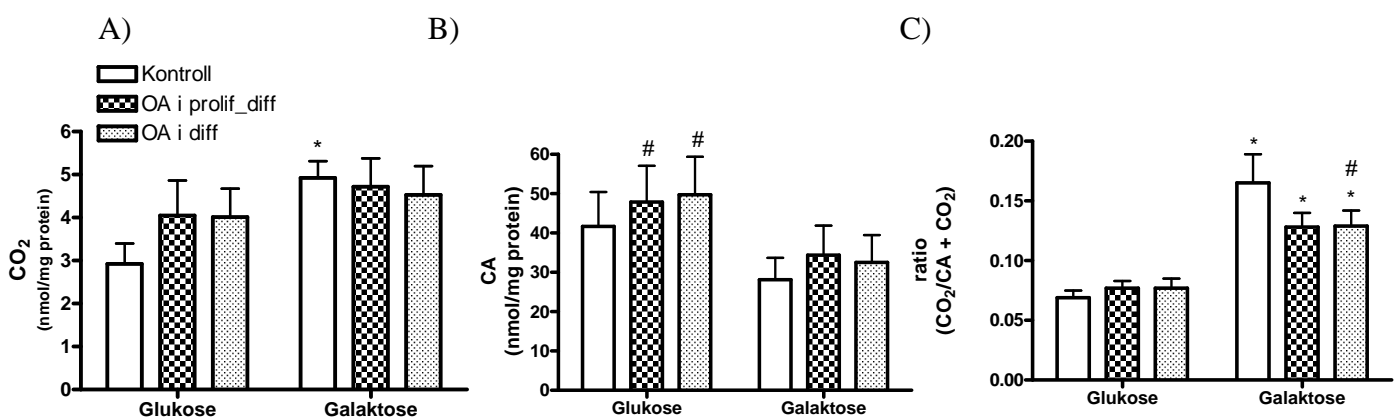
Vi ønsket å se om kronisk forbehandling med OA og GW ga noen tilleggseffekt på oksidasjon og akkumulering av akutt tilsatt OA. Kronisk forbehandling med OA ga signifikant økt oljesyreoksidasjon hos de cellene som fikk galaktose mot glukose som kontroll (figur 3.6). Hos galaktosebehandlede celler ga ikke kronisk forbehandling med OA noen tilleggseffekt på akutt oljesyreoksidasjon. Man så en tendens til økt oljesyreoksidasjon etter forbehandling med OA i proliferasjonsmediet og i differensieringsmediet hos glukosecellene. Akkumulering av OA akutt tenderte til å øke etter forbehandling med OA hos celler dyrket i glukose i forhold til glukosebehandlede celler som ikke ble forbehandlet med oljesyre (basal). Man så en tendens til økning i akutt akkumulering av OA etter oljesyreforbehandling hos celler dyrket i glukose sammenlignet med celler dyrket i galaktose.

Resultatene viste en nedgang i akkumulering hos galaktosebehandlede celler kontra celler behandlet med glukose.

Resultater

Galaktosebehandling ga en reduksjon i akkumulering av OA sammenlignet med celler dyrket i glukose.

Forbehandling med OA reduserte fraksjonell oljesyreoksidasjon hos galaktosebehandlede celler. Det var dermed ingen tilleggseffekter av kronisk forbehandling med OA på fraksjonell oljesyreoksidasjon hos galaktosebehandlede celler. Celler dyrket i galaktose som ble forbehandlet med oljesyre ga en signifikant økning i fraksjonell oljesyreoksidasjon i forhold til glukosebehandlede celler (basal). Celler dyrket i glukose viste ingen tilleggseffekter av kronisk forbehandling med OA på fraksjonell oljesyreoksidasjon (figur 3.6).

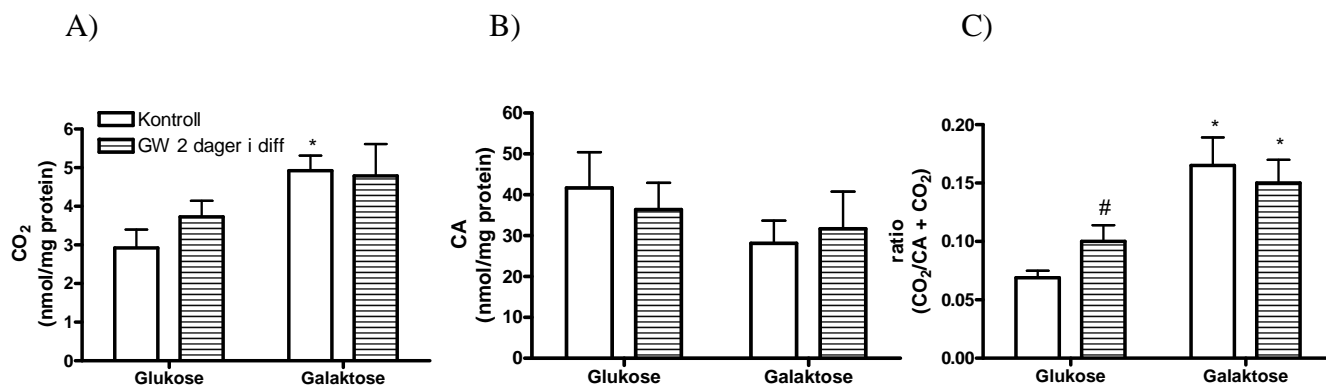


Figur 3.6: Effekten av kronisk forbehandling med galaktose og oljesyre på fettsyremetabolismen.

Figuren viser oksidasjon av oljesyre (A), akkumulering av oljesyre (B) og fraksjonell oksidasjon av oljesyre (C). Cellene ble behandlet med henholdsvis glukose og galaktose, og forbehandlet med oljesyre (100 μ M) under prolifereringsfase og differensieringsfase. På forsøksdagen ble cellene inkubert i 4 timer med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M). *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler og #: $p \leq 0,05$ mot galaktosebehandlede celler. Data er hentet fra figur 3.4 og 3.5, og er vist som gjennomsnitt \pm SEM, (n=6). CA; celleassosiert akkumulering, diff; differensieringsmedium, OA; oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

Myotuber som ble dyrket i glukose viste en tendens til økning i oljesyreoksidasjon etter behandling med GW. Myotuber dyrket i galaktose viste ingen endring i oljesyreoksidasjon etter tilsetning av GW. Akkumuleringen av oljesyre viste en tendens til reduksjon hos glukosebehandlede celler, mens resultatene viste en tendens til økning i akkumulering for galaktosebehandlede celler etter behandling med GW. Fraksjonell oljesyreoksidasjon økte for celler behandlet med glukose, og så ut til å være redusert for celler behandlet med galaktose. Fraksjonell oljesyreoksidasjon for celler dyrket i galaktose og forbehandlet med GW var signifikant økt i forhold til celler dyrket i glukose (figur 3.7).

Resultater

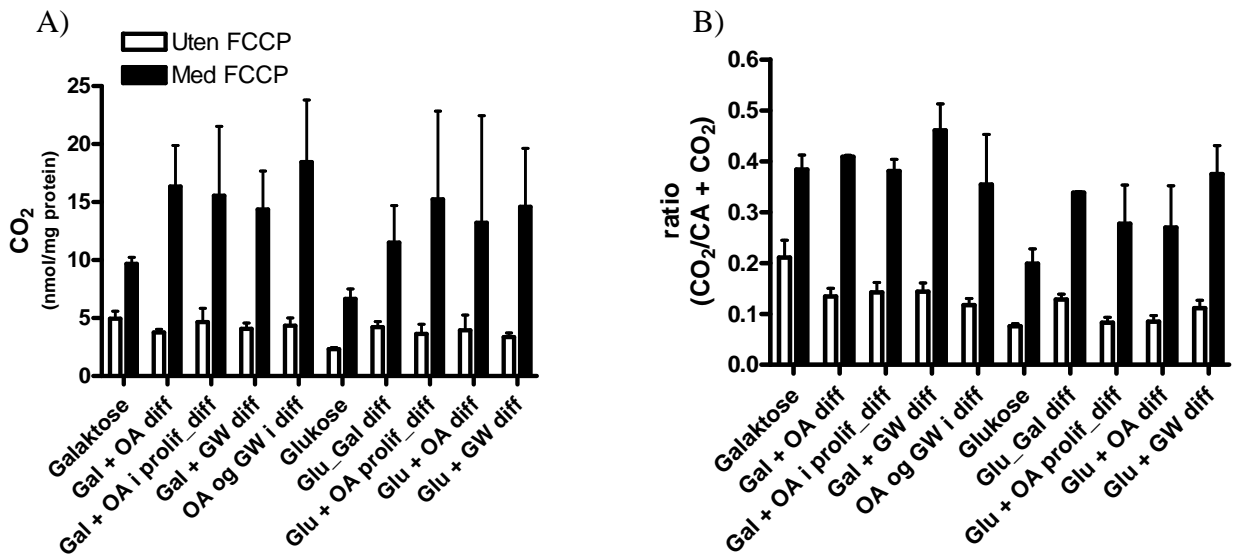


Figur 3.7: Effekten av galaktose og forbehandling med GW på fettsyremetabolismen. Figur A) viser oksidasjon, B) er akkumulering av oljesyre, og C) er fraksjonell oksidasjon av oljesyre. Cellene ble dyrket i glukose eller galaktose, og GW (100 nM) ble tilsatt de 2 siste dagene før forsøksdagen. På forsøksdagen ble cellene inkubert i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre (1 μCi/ml, 100 μM) i trapper i varmeskap. *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler og #: $p \leq 0,05$ mot galaktosebehandlede celler. Data er hentet fra figur 3.4 og 3.5, og er vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=6). CA; celleassosiert akkumulering, GW; GW501516.

3.2.2 Effekter av akuttbehandling med FCCP på oljesyreoksidasjonen

FCCP fungerer som en frikobler av cellenes OXPHOS i mitokondriene. Dette forsøket ble utført med den hensikt å finne ut hvor stor avkoblingseffekt FCCP hadde på cellene, og dermed hvor stor maksimal oksidasjonskapasitet cellene hadde. Tilsetning av FCCP økte fettsyreoksidasjon og fraksjonell oljesyreoksidasjon ved alle behandlinger av cellene (figur 3.8).

Resultater



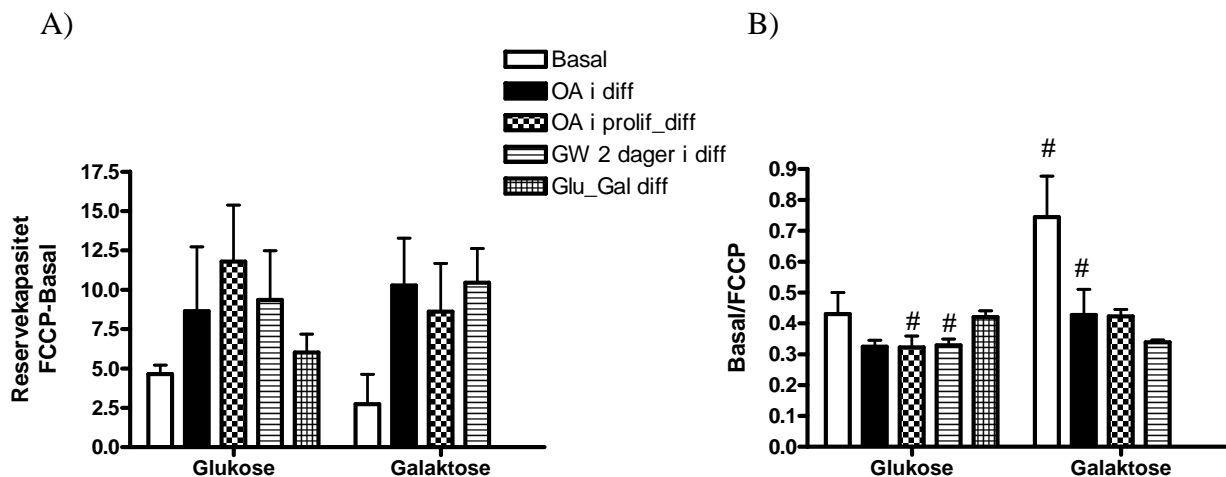
Figur 3.8 Effekten av kronisk forbehandling med galaktose og akuttbehandling med FCCP (1 μ M) på fettsyreoksidasjon. Figuren viser oljesyreoksidasjon (A) og fraksjonell oksidasjon (B) av oljesyre etter akutt tilsetning av FCCP. Cellene ble dyrket i galaktose eller glukose, og forbehandlet med oljesyre (100 μ M) under proliferering og/eller differensiering. GW (100 nM) ble tilsatt 2 dager før forsøksdagen. Cellene ble så tilsatt et akuttmedium hvorav halvparten av brettet fikk akuttmediet med FCCP og resten fikk uten FCCP (basal) på dag 7 etter differensiering. På forsøksdagen ble brettene inkubert i 4 timer i varmeskap med [¹⁴C]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M) og 1 μ M FCCP. Data er vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=3). Diff; differensieringsmedium, gal; galaktose, glu; glukose, glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA, oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

Det var ønskelig å beregne mitokondriefunksjon etter akutt tilsetning av FCCP. Derfor ble to parametre beregnet, B er uten FCCP (basal) og F (med FCCP) sier noe om maksimal frikobling av mitokondriene etter akuttbehandling med FCCP. Dette forteller noe om mitokondriefunksjonen. Beregning av F-B vil få fram cellenes maksimale OXPHOS-kapasitet. Brøken B/F ble også beregnet. Denne brøken forteller noe om i hvor stor grad FCCP frikobler, hvor mye av reservekapasiteten (maksimal OXPHOS-kapasitet) cellen benytter seg av. Figur 3.9 viser cellenes maksimale OXPHOS-kapasitet.

Den maksimale OXPHOS-kapasiteten for OA så ut til å være redusert for celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose. Celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering så ut til å ha en tendens til økt OXPHOS-kapasitet for oljesyre sammenlignet med celler dyrket i glukose. Kronisk forbehandling med OA og GW ga en tendens til økt OXPHOS-kapasitet sammenlignet med celler som ikke ble forbehandlet. Denne tendensen gjaldt for både celler dyrket i galaktose og for celler dyrket i glukose.

Resultater

Hos celler som ble dyrket i galaktose ga kronisk forbehandling med OA under differensiering, samt forbehandling med GW en tendens til økt maksimal OXPHOS-kapasitet sammenlignet med tilsvarende forbehandling hos celler dyrket i glukose. Celler dyrket i glukose brukte omtrent 40 % av den maksimale OXPHOS-kapasiteten, mens celler dyrket i galaktose brukte omtrent 70 % av den maksimale OXPHOS-kapasiteten.



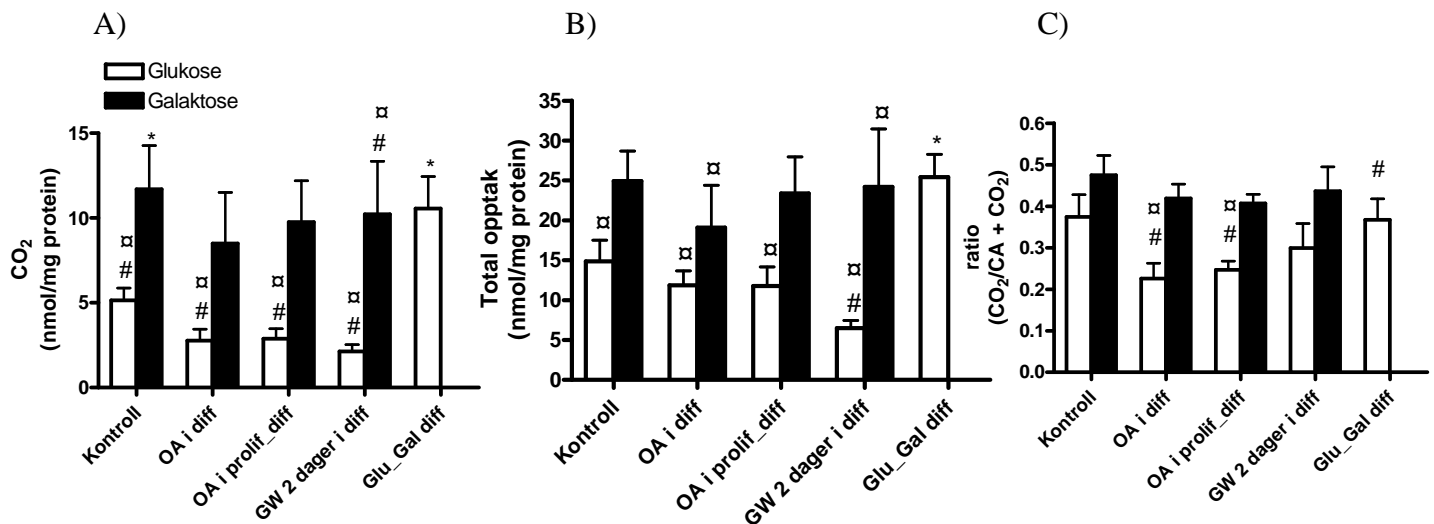
Figur 3.9 Effekten av akuttbehandling med FCCP. Figuren viser cellenes reservekapasitet for oljesyreoksidasjon (A) og hvor stor andel av denne reservekapasiteten cellene benyttet seg av (B). Cellene ble dyrket i galaktose eller glukose, eller en kombinasjon av glukose og galaktose. Myotubene ble forbehandlet med oljesyre (100 μ M) under proliferering og/eller differensiering. GW (100 nM) ble tilsatt 2 dager før forsøksdagen. På forsøksdagen ble halve cellebrettet tilsatt et akuttmedium med FCCP, mens resten av brettet var basal. Brettene ble så inkubert i 4 timer i varmeskap med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M) og 1 μ M FCCP. #: $p \leq 0,05$ mot galaktosebehandlede celler. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$). Diff; differensieringsmedium, glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA, oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

3.3 Akkumulering og oksidasjon av glukose

Hensikten med dette forsøket var å se på oksidasjon og opptak av glukose hos myotubene. Isotopen [$U\text{-}^{14}\text{C}$]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M) ble tilsatt i akuttmediet før inkubering. Forbehandling med galaktose økte oksidasjon av glukose 2 foldig sammenlignet med celler dyrket i glukose. Myotuber som ble dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering ga også en 2 foldig økning av glukoseoksidasjon sammenlignet med celler dyrket i glukose.

Resultater

Galaktosebehandlede celler viste en tendens til økt totalt glukoseopptak sammenlignet med glukosebehandlede celler. Celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering viste en signifikant økning i totalt glukoseopptak sammenlignet med celler dyrket i glukose. Galaktosebehandlede celler så ut til å ha en økt fraksjonell glukoseoksidasjon sammenlignet med glukosebehandlede celler (figur 3.10).



Figur 3.10: Effekten av kronisk forbehandling med galaktose på glukoseoksidasjon – og akkumulering.

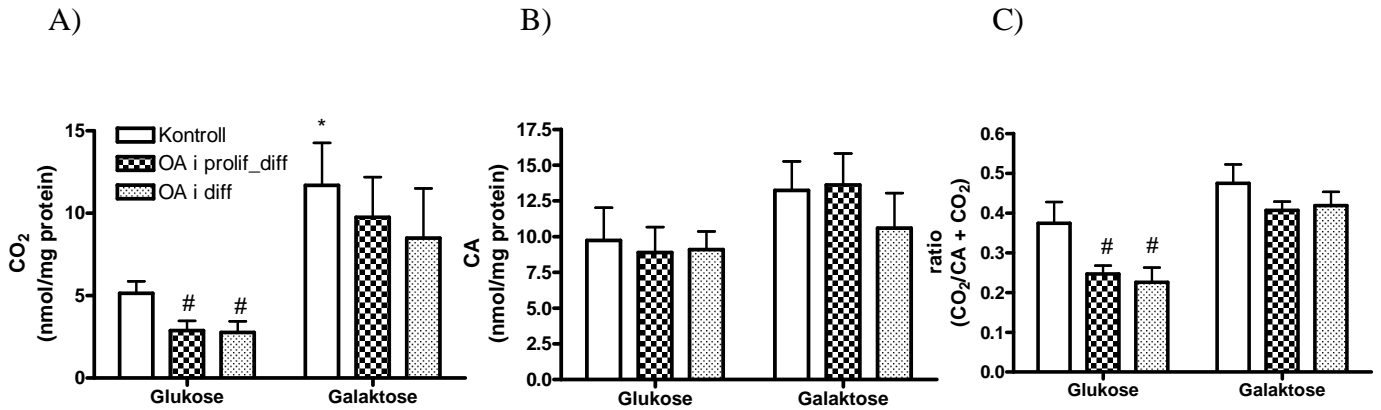
Figuren viser oksidasjon av glukose (A), totalt opptak (CO₂ + CA) av glukose til myotubene (B) og fraksjonell glukoseoksidasjon (C). Cellene ble dyrket i galaktose eller glukose. Cellene ble forbehandlet med OA (100 μM) under proliferering og/eller differensiering. GW (100 nM) ble tilsatt i 2 dager før forsøksdagen. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i 4 timer med [U-¹⁴C]glukose (1 μCi/ml, 100 μM). *: p ≤ 0,05 mot glukosebehandlede celler, #: p ≤ 0,05 mot galaktosebehandlede celler og α: p ≤ 0,05 mot glu_gal diff. Data vist som gjennomsnitt ± SEM (n=6). CA; celleassosiert akkumulering, diff; differensieringsmedium, glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA, oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

3.3.1 Effekter av forbehandling med oljesyre og GW på glukosemetabolismen

Hensikten med dette forsøket var å se på om forbehandling med OA ga noen effekter på glukosemetabolismen. Celler dyrket i galaktose viste signifikant økning i glukoseoksidasjon sammenlignet med celler dyrket i glukose. Kronisk forbehandling med OA ga ingen tilleggseffekter på glukoseoksidasjon i verken galaktosebehandlede celler eller glukosebehandlede celler. Isteden så man en tendens til redusert glukoseoksidasjon etter forbehandling med OA for celler dyrket i galaktose og for celler dyrket i glukose. Forbehandling med OA ga ingen økning i akkumulering verken for celler dyrket i glukose eller galaktose.

Resultater

Fraksjonell oksidasjon viste en tendens til økning for celler dyrket i galaktose sammenlignet med glukosebehandlede celler. Det ble ikke vist noen økning i fraksjonell glukoseoksidasjon etter forbehandling med OA for verken celler dyrket i galaktose eller celler dyrket i glukose (figur 3.11).

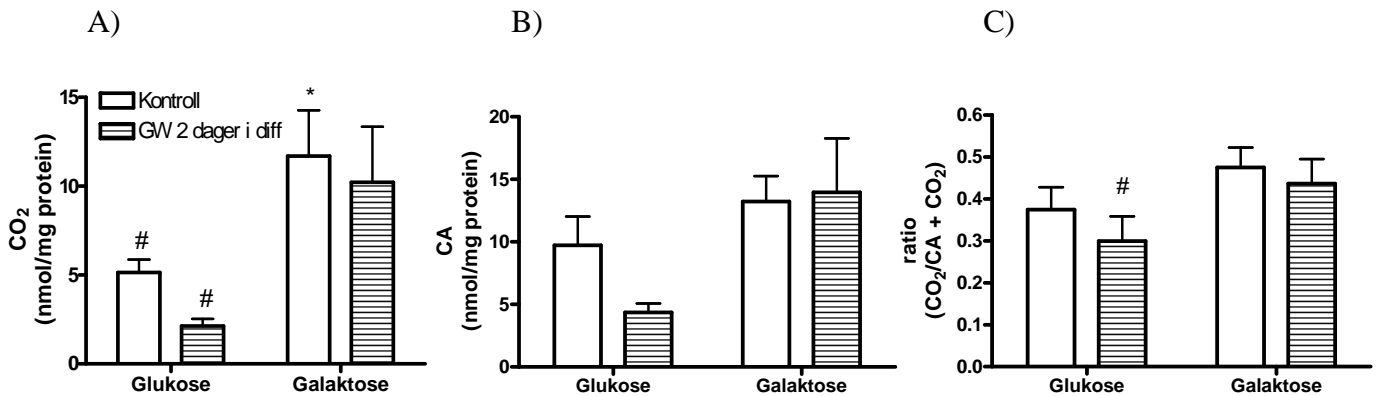


Figur 3.11: Effekten av forbehandling med oljesyre på glukoseoksidasjon – og akkumulering. Figuren viser glukoseoksidasjon (A), akkumulering av glukose (B) og fraksjonell glukoseoksidasjon (C) etter kronisk forbehandling med oljesyre. Cellene ble dyrket i galaktose eller glukose. Deretter ble de forbehandlet med oljesyre (100 μ M) i vekselvis proliferasjonsmediet og differensieringsmediet, samt kun i differensieringsmediet. GW (100 nM) ble tilsatt i differensieringsmediet de 2 siste dagene før forsøksdagen. På forsøksdagen ble cellene inkubert i 4 timer med [U - 14 C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M).*: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler, #: $p \leq 0,05$ mot galaktosebehandlede celler. Data er hentet fra figur 3.10 og er vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=6). CA; celleassosiert akkumulering, diff; differensieringsmedium, OA; oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

Forsøket ble også utført med den hensikt å se på effekten av forbehandling med GW.

Glukoseoksidasjonen viste en tendens til å bli redusert etter forbehandling med GW, både for celler dyrket i glukose og for celler dyrket i galaktose. Celler dyrket i glukose hadde en tendens til å ha redusert glukoseakkumulering etter behandling med GW. Celler dyrket i galaktose hadde en tendens til økt glukoseakkumulering etter forbehandling med GW.

Fraksjonell oksidasjon hadde en tendens til å være redusert i celler dyrket i glukose. Celler dyrket i galaktose hadde ingen endring i glukoseoksidasjon etter forbehandling med GW (figur 3.12).

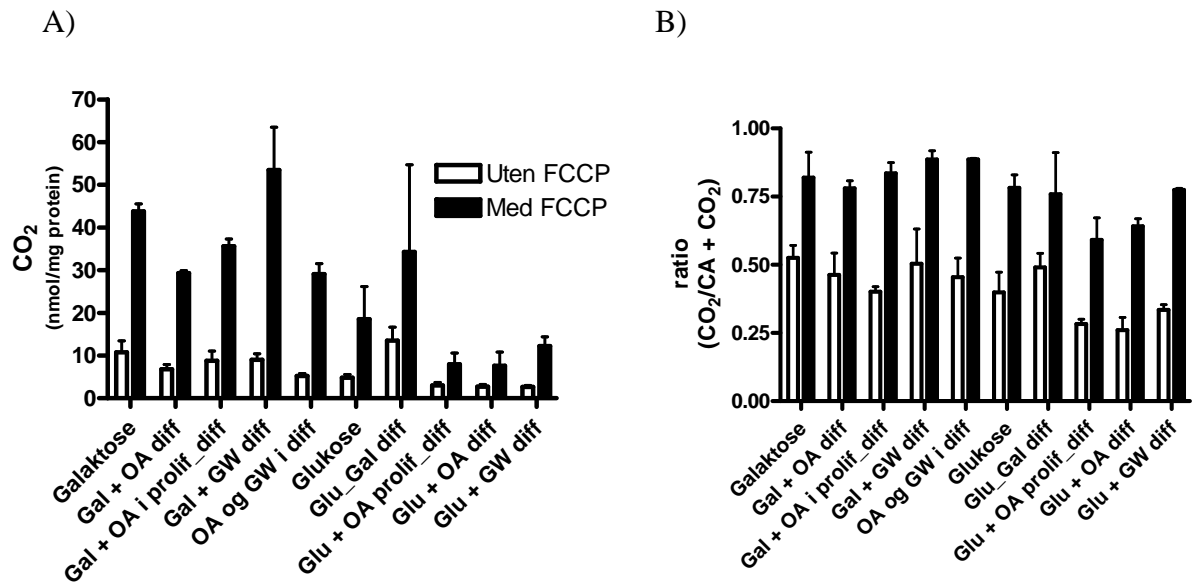


Figur 3.12: Effekten av forbehandling med galaktose og GW på glukoseoksidasjon. Figuren viser glukoseoksidasjon (A), glukoseopptak (B) og fraksjonell glukoseoksidasjon (C). Cellene ble dyrket i galaktose eller glukose. GW (100 nM) ble tilsatt i differensieringsmediet de 2 siste dagene før forsøksdagen. På forsøksdagen ble oksidasjon og opptak ble målt etter 4 timer inkubering med [U-¹⁴C]glukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M). *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler, #: $p \leq 0,05$ mot galaktosebehandlede celler. Data er hentet fra figur 3.10 og er vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=6). Diff; differensieringsmedium, GW; GW501516.

3.3.2 Effekter av akutt behandling med FCCP på glukoseoksidasjonen

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om FCCP hadde ytterligere effekter på cellenes glukosemetabolisme. FCCP ble tilsatt i akuttmediet i halve cellebrettet, mens den andre halvdelen fungerte som basal. Tilsetning av FCCP akutt økte glukoseoksidasjon og fraksjonell oksidasjon for alle behandlinger (figur 3.13).

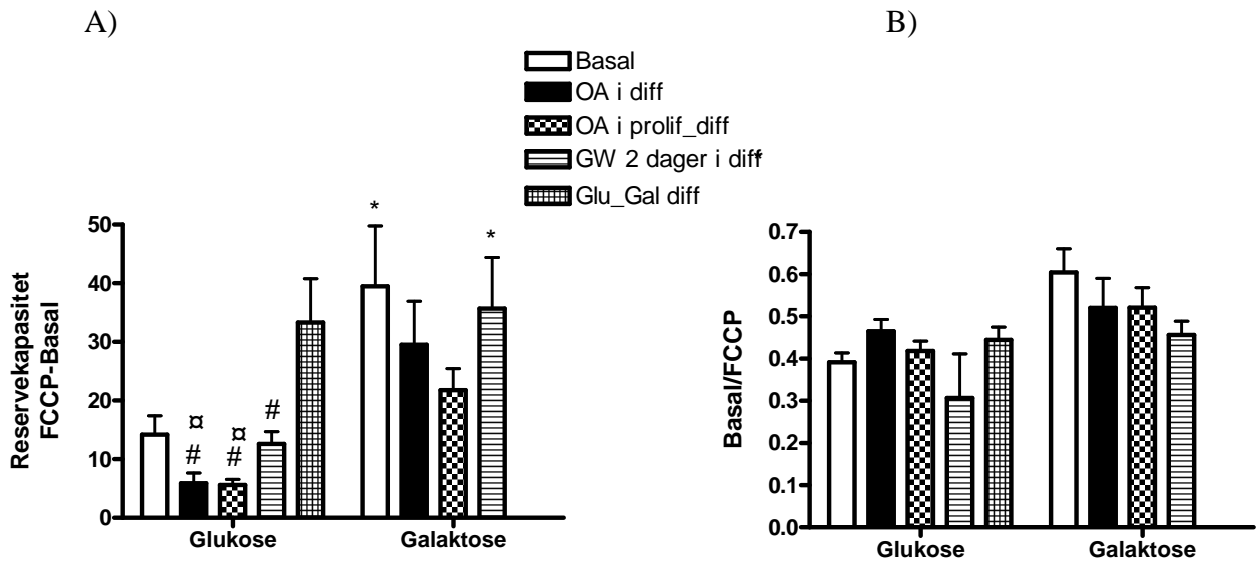
Resultater



Figur 3.13: Effekten av kronisk forbehandling med galaktose og akuttbehandling med FCCP (1 μ M) på glukoseoksidasjon. Figuren viser glukoseoksidasjon (A) og fraksjonell oksidasjon av glukose (B) etter akutt tilsetning av FCCP (1 μ M). Cellene ble dyrket i galaktose eller glukose, og forbehandlet med oljesyre (100 μ M) under proliferering og/eller differensiering. GW (100 nM) ble tilsatt 2 dager før forsøksdagen. På forsøksdagen ble brettene inkubert i 4 timer i varmeskap med [¹⁴C]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M) og 1 μ M FCCP. Data vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=3). Diff; differensieringsmedium, Gal; galaktose, glu; glukose glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA; oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

FCCP-Basal og Basal/FCCP ble også beregnet her. Celler dyrket i galaktose hadde en signifikant større reservekapasitet for glukoseoksidasjon sammenlignet med celler dyrket i glukose. Reservekapasiteten for glukoseoksidasjon var omtrent 3 ganger så stor hos celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose. Myotuber som ble dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering hadde en 2 foldig økning i maksimal OXPHOS-kapasitet sammenlignet med celler dyrket i glukose. Celler dyrket i galaktose hadde dermed en større OXPHOS-kapasitet sammenlignet med celler dyrket i glukose. Kronisk forbehandling med oljesyre økte ikke maksimal OXPHOS-kapasitet hos verken celler dyrket i galaktose eller celler dyrket i glukose. Celler dyrket i galaktose benyttet omtrent 60 % av den maksimale OXPHOS-kapasiteten, og celler dyrket i glukose benyttet omtrent 40 %.

Den absolutte OXPHOS-kapasiteten økte etter behandling med galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose, men det var ikke en større andel av total oksidasjon som ble benyttet (figur 3.14).



Figur 3.14 Effekter av akuttbehandling med FCCP på glukoseoksidasjonen. Figuren viser cellenes reservekapasitet for glukoseoksidasjon (A) og hvor stor andel av denne reservekapasiteten cellene benyttet seg av (B). Myotubene ble dyrket i galaktose eller glukose, og forbehandlet med oljesyre (100 μ M) under proliferering og/eller differensiering. GW (100 nM) ble tilsatt 2 dager før forsøksdagen. På forsøksdagen ble halve cellebrettet tilsatt et akuttmedium med FCCP, mens resten av brettet var basal. Brettene ble så inkubert i 4 timer i varmeskap med [14 C]oljesyre (1 μ Ci/ml, 100 μ M) og 1 μ M FCCP. Data er vist som gjennomsnitt \pm SEM (n=3). *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler, #: $p \leq 0,05$ mot galaktosebehandlede celler, α : $p \leq 0,05$ mot glu_gal diff. Diff; differensieringsmedium, glu_gal diff; glukose under proliferering og galaktose under differensiering, GW; GW501516, OA, oljesyre, prolif; prolifereringsmedium.

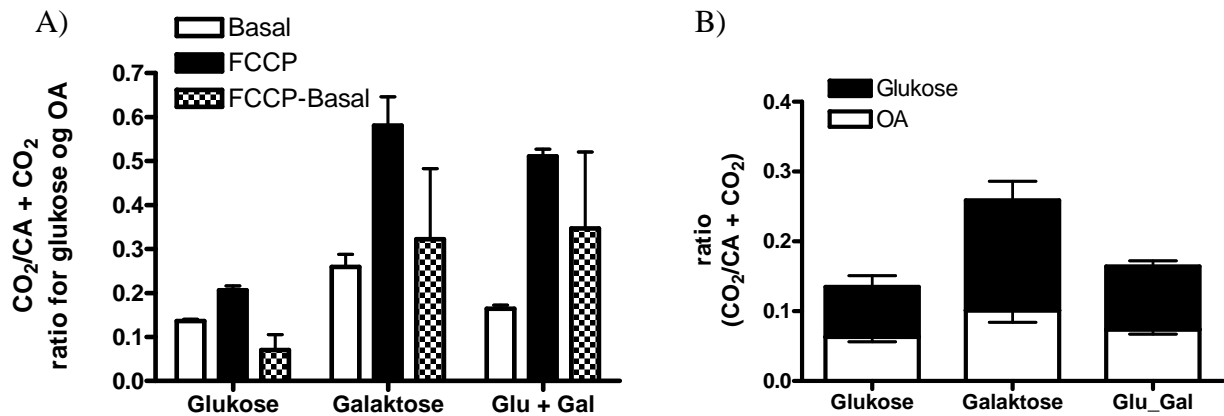
3.4 Overkryssningsforsøk

Dette forsøket ble utført med både fettsyre og glukose som akuttbehandling. Akuttmediene som ble benyttet i dette forsøket inneholdt radioaktiv oljesyre samt ikke-radioaktiv glukose eller radioaktiv glukose samt ikke radioaktiv oljesyre (appendiks III). Hensikten var å se hvilket substrat cellene ville foretrekke, når de fikk tilført begge substratene.

Total fraksjonell oksidasjon lagt sammen for oljesyre og glukose (figur 3.15 A) var økt hos celler dyrket i galaktose og hos celler som ble dyrket i en kombinasjon av glukose og galaktose. Akuttbehandling med FCCP økte reservekapasiteten (FCCP-Basal), en omtrent dobling, når cellene ble dyrket i galaktose i forhold til celler dyrket i glukose.

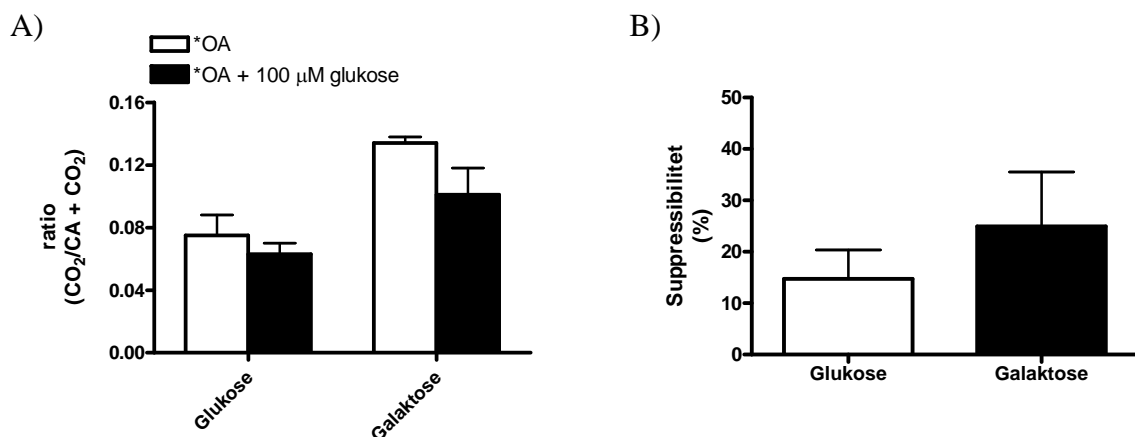
Celler dyrket i glukose så ut til å oksidere oljesyre og glukose i omtrentlig like stor grad (figur 3.15 B). Celler dyrket i galaktose så ut til å benytte seg i større grad av glukoseoksidasjon enn oljesyreoksidasjon sett utfra totaloksidasjonen. Celler som ble dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering så også ut til å benytte seg i større grad av glukoseoksidasjon, men ikke i like stor grad som celler dyrket kun i galaktose (figur 3.15 B).

Resultater



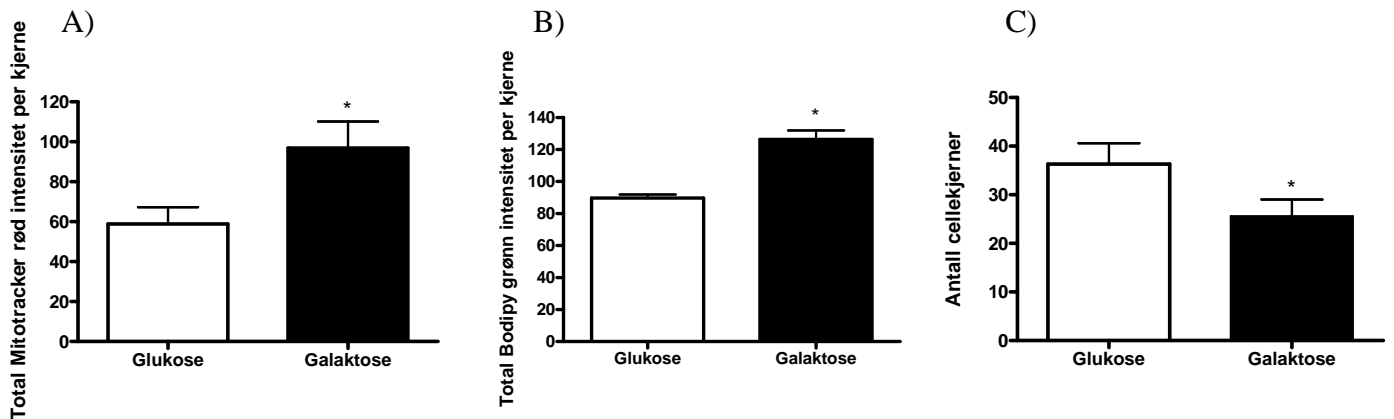
Figur 3.15: Total fraksjonell oksidasjon fra overkryssningsforsøk. Figur A) viser fraksjonell oksidasjon for både oljesyre og glukose lagt sammen. Figur B) viser hvor stor andel av hvilket substrat (glukose eller oljesyre) cellene oksiderte relatert til totaloksidasjon. Myotubene ble dyrket i glukose, galaktose eller glukose under prolifereringsfasen og galaktose under differensieringsfasen. På forsøksdagen ble cellene tilsatt et akuttmedium bestående av oljesyre (100µM) eller glukose (100µM), samt en kombinasjon av begge substrater (100 µM OA + 100 µM glukose). Data er vist som gjennomsnitt ± SEM (n=2).

Suppressibilitet er et begrep som benyttes *in vitro* for å beskrive i hvilken grad nærvær av glukose undertrykker fettsyreoksidasjon. Formelen som ble benyttet for å beregne dette er som følger $(1 - ((CO_2/CA + CO_2) \text{ ved } 100 \mu\text{M OA} + 100 \mu\text{M glukose} / (CO_2/CA + CO_2) \text{ ved } 100 \mu\text{M OA} + 0 \mu\text{M glukose})) * 100 \%$. Celler dyrket i galaktose så ut til å ha en økt suppressibilitet sammenlignet med celler dyrket i glukose. Det vil si at celler som ble dyrket i galaktose så ut til å kunne undertrykke fettsyreoksidasjon i nærvær av akutt glukose, i større grad enn celler dyrket i glukose (figur 3.16)



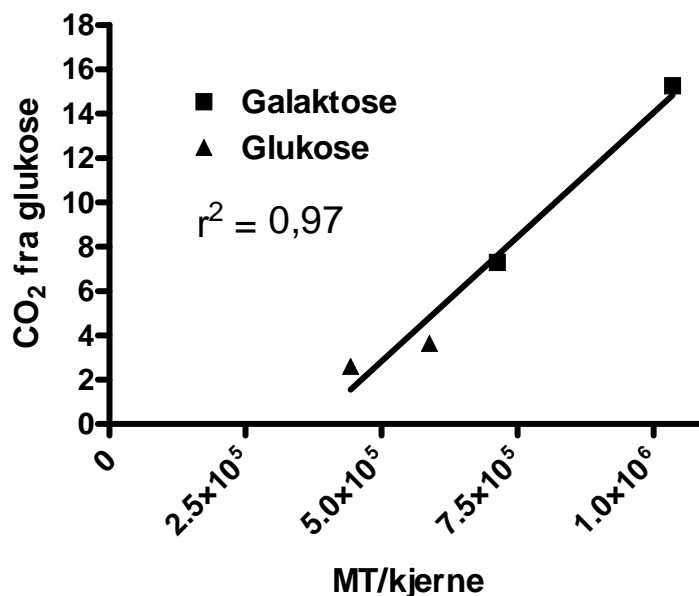
Figur 3.16 Suppressibilitet i glukosebehandlede og galaktosebehandlede celler. Figur A) viser fraksjonell oksidasjon etter akutt tilsetning av oljesyre (100 µM) og akutt tilsetning av oljesyre (100 µM) og glukose (100 µM). Figur B) viser suppressibiliteten hos celler dyrket i galaktose respektive celler dyrket i glukose. Myotubene ble dyrket i glukose respektive galaktose. På forsøksdagen ble cellene inkubert i 4 timer i inkubator etter tilsetning av et akuttmedium bestående av oljesyre (100 µM) eller glukose (100 µM) eller en kombinasjon av både oljesyre (100 µM) og glukose (100 µM). Data vist som gjennomsnitt ± SEM (n=2). CA; celleassosiert akkumulering, *OA; radioaktiv oljesyre.

Resultater



Figur 3.18: Effekten av galaktose på mitokondriell masse, lipiddråper og cellekjerner. Figuren viser mitokondriell masse (A), mengde lipiddråper (B) og antall cellekjerner (C). Cellene ble sådd ut på 12 brønners brett med glassbunn, og dyrket i galaktose eller glukose. Fargestoffer ble tilsatt i ulike konsentrasjoner og bilder ble tatt via mikroskop. Et softwareprogram (Scan[^]R analysis software) beregnet mitokondriell masse, lipiddråper og antall kjerne. *: $p \leq 0,05$ mot glukosebehandlede celler. Data er vist som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$).

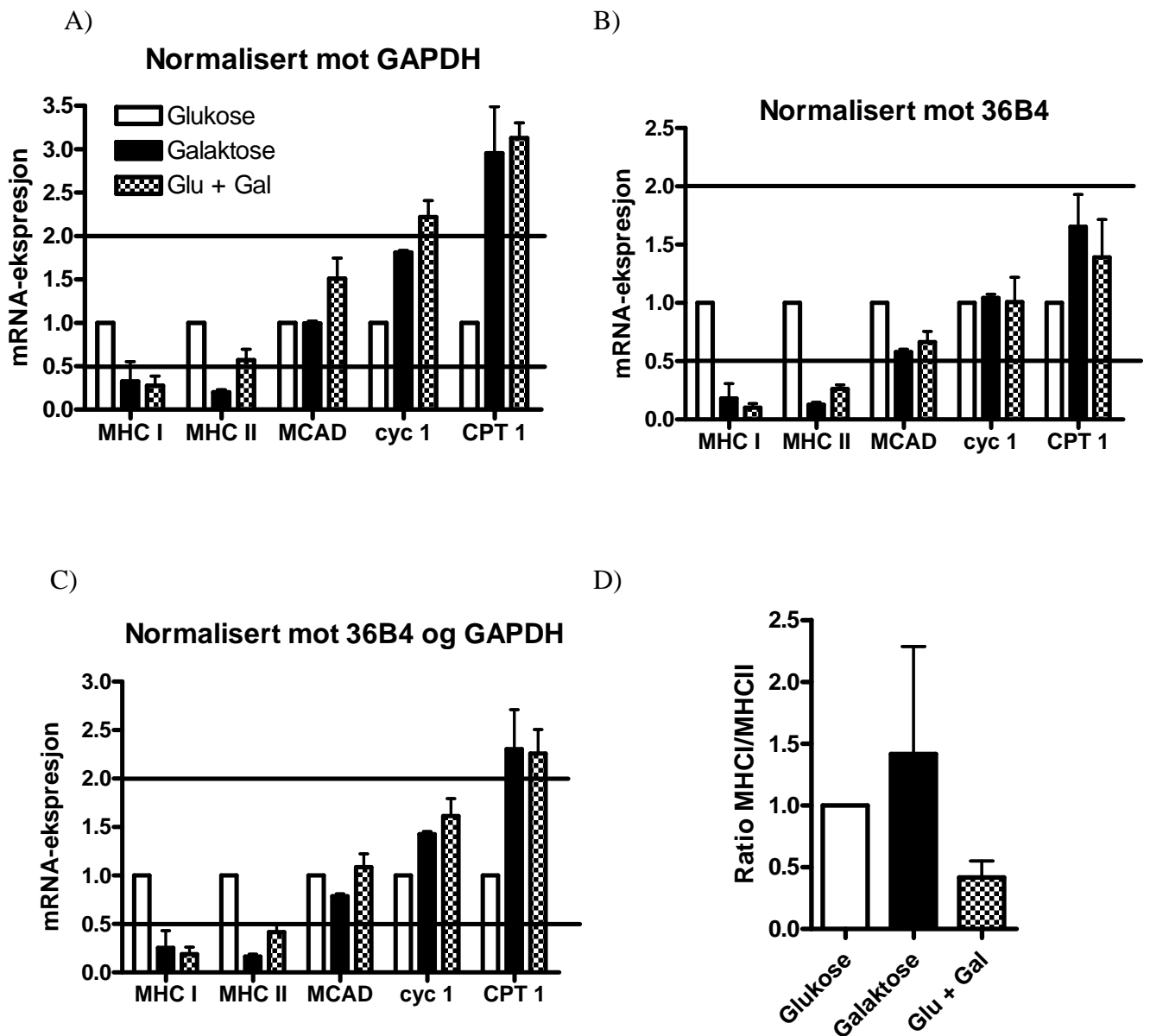
Glukoseoksidasjon ble relatert til mitokondriell masse per kjerne for hver donor. Grafen (figur 3.19) viste at høyere oksidasjon korrelerer med mitokondriell masse. Av grafen kan man se punktene for glukose ga mindre oksidasjon i forhold til galaktose, og også hadde mindre mitokondriell masse i forhold til galaktose.



Figur 3.19: Glukoseoksidasjon relatert til mitokondriell masse per kjerne. Cellene ble sådd ut på henholdsvis 96 – og 12 brønners brett og ble dyrket i glukose respektive galaktose. Oksidasjonsdata ble hentet fra inkubering i trapper i 4 timer og relatert mot total mitotracker-intensitet (MT) per kjerne. Dataene ble relatert til hver enkelt donor, det var 2 donorer.

3.6 Effekter av galaktose på genekspresjon

Med dette forsøket var hensikten å se om forbehandling med galaktose ga endringer på gen-nivå. Derfor ble mRNA for myosin tungkjede (MHC I og MHC II), acyl-koenzym A dehydrogenase (MCAD), cytokrom C (CYC 1) og karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT 1) testet etter behandling med galaktose. Galaktosebehandling ga et nedregulert nivå av MHC I, MHC II og MCAD i forhold til kontroll når data ble normalisert mot "housekeeping"-genet GAPDH og mot "housekeeping"-genet 36B4. Resultatene viste også en økning i nivået av mRNA for CYC1 og CPT1 (figur 3.20). Celler dyrket i galaktose viste en tendens til økning i ratio MHC I/MHC II sammenlignet med celler dyrket i glukose. Celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering viste en tendens til reduksjon i ratio MHC I/MHC II sammenlignet med celler dyrket i glukose (figur 3.20 B).



Figur 3.20: Effekter av galaktose på mRNA-ekspressjon. Figuren viser mRNA-ekspressjon hos 5 ulike gener. Data er korrigert mot "housekeeping" genet GAPDH (figur A) mot 36B4 (figur B), og begge "housekeeping" genene (figur C). Figur D) viser forholdet mellom MHC I og MHC II. Cellene ble sådd ut på 25 cm² flasker, og ble behandlet med glukose, galaktose eller glukose under proliferering og galaktose under differensiering. På forsøksdagen ble RNA isolert og cDNA syntetisert. cDNA ble så målt ved RT real-time PCR. Data er korrigert mot 36B4 og GAPDH, og normalisert mot glukose. For glukose og galaktose er n=2, og for Glu+Gal er n=3. En tofoldig økning, og en 50 % reduksjon i forhold til glukose ble ansett som signifikant.

4 Diskusjon

Å behandle myotuber med galaktose har ikke tidligere vært utført i laboratoriet vårt. Målet med denne oppgaven var å se hvordan cellene ble påvirket av å dyrkes i galaktose istedenfor det normale dyrkningsmediet med glukose. Tanken bak dette var å få cellene til å bytte over fra energiproduksjon via glykolyse til å produsere energien de trenger for å overleve via mitokondriell OXPHOS.

4.1 Dyrking av myotuber i galaktose

Celler må ofte svare på endringer i det eksterne miljøet, særlig med tanke på substrater de trenger til energimetabolisme. Når myotubene fikk galaktose istedenfor glukose ble de tvunget til å benytte seg av mitokondriell OXPHOS istedenfor glykolyse. I denne oppgaven ble det vist at myotubene kan vokse og overleve når de må benytte OXPHOS istedenfor glykolyse. Myotuber som ble dyrket i galaktose (5,5 mM) vokste saktere enn celler dyrket i glukose (5,5 mM). Celler dyrket i galaktosemedium lå omtrent 2 døgn etter celler dyrket i glukosemedium når det kom til det tidspunkt hvor myotubene skulle differensieres. Dette kommer trolig av at celler dyrket i galaktose bruker litt tid på å omstille seg, og dermed bruker lengre tid på å få produsert energi fra de substratene som var tilstede, og dermed ble de hengende litt etter celler dyrket i glukosemedium under prolifereringsfasen. Det kan derfor være hensiktsmessig å så ut myotuber som skal få glukose respektive galaktose på hver sin celleplate, slik at galaktosebrettet kan stå lenger under prolifereringsfasen sammenlignet med celler dyrket i glukose. Trolig er det størst forskjeller mellom celler dyrket i glukose og celler dyrket i galaktose under prolifereringsfasen. Muligens kan det også være forskjeller under differensieringsfasen. Det er mulig at det også kan være en fordel å la celler dyrket i galaktose differensiere over en lengre periode, det vil si at de står i for eksempel 10 dager etter differensiering istedenfor 7 dager slik det ble gjort i disse forsøkene. Dette ble ikke undersøkt i denne oppgaven.

Det er verdt å merke seg at både glukose- og galaktosemediet også inneholdt aminosyren L-glutamin. Det er vist at hos HeLa celler dyrket i galaktose var det glutamin som, via aerob oksidasjon fra sitronsyresyklus, stod for 98 % av den energien cellen trengte [86].

Dermed er det sannsynlig at myotuber dyrket i galaktose benyttet seg av glutamin som energikilde i tillegg til galaktose, for å generere den energien cellen trengte til overlevelse. Siden myotubene sannsynligvis genererer mye ATP fra glutamin er det også en mulighet for at myotubene kunne ha overlevd uten tilsetning av verken glukose eller galaktose.

4.2 Effekter av modifisering av energimetabolisme grunnet tilsetning av galaktose

Differensierte myotuber i kultur har et lavt oksidativt potensial [24, 87]. Derfor var det ønskelig å modifisere cellenes energimetabolisme blant annet ved å benytte galaktose i cellenes dyrkningsmedium.

Det er tidligere forsøkt flere strategier for å oppnå mer oksidative myotuber i kultur. Tilførsel av ulike substrater til celler samt overuttrykk av PPAR δ og PGC-1 α medførte økt oljesyreoksidasjon, økt fettsyreoksidasjon og økt antall mitokondrier [53, 57, 59, 60].

4.2.1 Effekter av galaktose på mitokondriene

Fargestoffet MitoTracker Red FM ble benyttet til å farge mitokondriene. Fargestoffet vil bli bundet til mitokondriene og vil lyse rødt i mikroskopet. Dermed er det trolig at jo flere mitokondrier som er til stede i cellen vil medføre sterkere rød intensitet, som har man valgt å kalle mitokondriell masse. Celler som fikk vokse i galaktose viste signifikant økt Mitotracker total intensitet sammenlignet med celler dyrket i glukose. Og dette kan være en indikasjon for økt mitokondriell kapasitet grunnet flere mitokondrier.

Rossignol *et al* [64] fant at en type humane kreftceller (HeLa) som ble dyrket i galaktose hadde en økning i omfang av folder i den mitokondrielle membranen (cristae), men ingen økning i mitokondriell masse. De benyttet en annen metode enn det som har blitt gjort i denne oppgaven, og det ble sett på en annen type celler, noe som kan forklare at disse resultatene ikke stemmer overens.

4.2.2 Effekter av galaktose på genekspressjon

Det var av interesse å undersøke om bytte av glukose mot galaktose i proliferasjons- og differeringsmediet førte til endringer på gen-nivå. Myotuber som ble dyrket i galaktose og myotuber som ble dyrket i en kombinasjon av galaktose og glukose viste økt uttrykk av Cytokrom C (cyc 1) og karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1).

Bruce *et al* [32] viste via overuttrykk av CPT 1 i skjelettmuskel, som er det hastighetsbestemmende enzymet i transport av FFA inn i mitokondriene, økte fetttsyreoksidasjon, i dette tilfellet av palmitinsyre. En økning i fetttsyreoksidasjon fører til en reduksjon i lagringen av TAG. Dette kan innebære en ny terapi av insulinresistens, da insulinresistens er sterkt assosiert med akkumulering av lipider i muskel [32]. I denne oppgaven blir det vist at myotuber som vokser i galaktose har økt fetttsyreoksidasjon i forhold til celler dyrket i glukose. Dette trolig grunnet en oppregulering av CPT 1, noe som stemmer overens med tidligere funn [32].

Myotuber som fikk vokse i galaktose eller en kombinasjon av galaktose og glukose viste også en økning i uttrykket av Cyt C. Cyt C er et protein involvert i elektrontransportkjeden hvor det overfører elektroner fra kompleks III til kompleks IV. Reaksjonene langs elektrontransportkjeden forflytter protoner ut av matriks og dermed skapes en pH-gradient over membranen. Enzymet ATPsyntase kobler elektrontransporten til oksidativ fosforylering via en konformasjonsendring. Ved at protoner flyter tilbake til matriks via ATPsyntase skjer fosforyleringen av ADP til ATP [29]. En signifikant økning i nivået av Cyt C kan dermed tyde på en mer effektiv elektrontransportkjede, grunnet flere Cyt C proteiner. Det er tidligere vist at celler dyrket i galaktose fikk en økning i respirasjon [64]. Dette kan stemme overens med resultatene i denne oppgaven.

Galaktosebehandlede celler hadde redusert mRNA-uttrykk av fibertypegenene MHC I og MHCII. Det er tidligere sett at nivået av MHC ikke begynner å stige før dag 3 under differensiering hos myotubene, og flater ut 6 dager etter differensiering [88].

I denne masteroppgaven ble det observert at myotuber dyrket i galaktose prolifererer saktere enn myotuber dyrket i glukose. Siden disse cellene ligger omtrent 2 døgn etter myotuber dyrket i glukose, er det en mulighet for at nivået av MHC ikke begynner å stige før på dag 5-6 etter differensiering.

Diskusjon

Dermed er en mulig forklaring på at det ble observert lavt uttrykk i mRNA-nivå av MHC I og MHC II at forsøkene ble utført for tidlig slik at MHC ikke nådde opp til normalt nivå i cellene. Dersom det er slik at nivået av MHC, i galaktosebehandlede celler, begynner å stige 5-6 dager etter differensiering, og selve forsøket ble utført på dag 7, vil man gå glipp av en eventuell oppregulering av nivået av MHC. En mulig løsning på dette er at forsøket isteden blir utført på dag 10 etter differensiering.

4.2.3 Effekter av galaktose på oljesyre og glukosemetabolismen

I denne masteroppgaven ble det videre undersøkt om galaktose endret musklens oksidative egenskaper ved økt fettsyreoksidasjon og/eller økt glukoseoksidasjon. Celler dyrket i galaktose viste seg å være mer oksidative sammenlignet med celler dyrket i glukose. Dette gjelder både oljesyreoksidasjon og glukoseoksidasjon.

I denne oppgaven blir det vist en signifikant økning av oksidasjon av både fettsyrer og karbohydrater for celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose. Dermed kan man se at modifisering av cellenes energimetabolisme ved hjelp av galaktose gir mer oksidative humane myotuber i kultur.

Et overkryssningsforsøk ble utført for å undersøke hvilket substrat (fettsyre eller glukose) cellene preferensielt oksiderer, og om totaloksidasjon var økt hos galaktosebehandlede celler. Celler dyrket i glukose så ut til å benytte fettsyre- og glukoseoksidasjon i like stor grad, mens celler dyrket i galaktose så ut til å foretrekke glukose som substrat. Celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering så også ut til å benytte seg mest av glukoseoksidasjon, men ikke i like stor grad som celler dyrket i galaktose under hele vekstperioden.

Dette tyder på at å benytte galaktose i cellenes dyrkningsmedium øker glukoseoksidasjon mer enn fettsyreoksidasjon. Celler dyrket i galaktose er mer effektive til å oksidere glukose sammenlignet med oksidasjon av fettsyre. Totaloksidasjon for celler dyrket i galaktose viste at galaktose benytter seg i større grad av glukoseoksidasjon enn av oljesyreoksidasjon. Denne tendensen kunne også sees for celler dyrket i en kombinasjon av glukose og galaktose, men ikke i like stor grad som celler dyrket i kun galaktose.

Dette var resultatene fra kun to forsøk, og forsøkene bør repeteres flere ganger før man kan trekke noen endelige konklusjoner ut fra disse resultatene.

Suppressibilitet er et begrep som benyttes *in vitro* for å beskrive i hvilken grad nærvær av glukose undertrykker fettsyreoksidasjon [33, 34]. Celler dyrket i galaktose så ut til å ha en økt suppressibilitet sammenlignet med celler dyrket i glukose. Dette kan være gunstig siden behandling med galaktose gjør at cellene blir mer mottakelig for glukosesuppresjon av fettsyreoksidasjon. Resultatene er noe usikre da det bare ble utført to forsøk. For å kunne konkludere omkring dette, bør man utføre flere forsøk.

Det har tidligere blitt vist at glukosesuppresjon er omvendt korrelert med *in vivo* metabolsk fleksibilitet og insulinsensitivitet, og positivt korrelert med kroppsfett og fastende nivå av FFA [24]. Disse forsøkene ble utført under forskjellige forhold. *In vivo* utføres forsøkene i et komplekst samspill mellom organer samt påvirkning fra endokrine stoffer og andre signalsubstanser. Dette lar seg ikke reprodusere *in vitro*. Sammenhengen mellom suppressibilitet og metabolsk fleksibilitet er ennå uklar, og flere studier trengs for å undersøke denne sammenhengen.

4.2.4 Effekter av forbehandling med oljesyre

Det er tidligere vist i laboratoriet at akutt oljesyreopptak økte signifikant etter forbehandling med fettsyre (EPA) sammenlignet med fettsyrefri kontroll. Oljesyreopptaket økte også etter forbehandling med oljesyre [89]. Akutt akkumulering av oljesyre økte hos celler forbehandlet med oljesyre og dyrket i glukose, dette er i samsvar med resultatene til Aas *et al* [89]. Hos celler dyrket i galaktose var det en tendens til redusert akkumulering av oljesyre i forhold til celler dyrket i glukose.

4.2.5 Effekter av forbehandling med GW501516

PPAR δ agonisten GW er vist å stimulere fettsyreoksidasjon i skjelettmuskelceller fra rotte, men bedrer ikke opptak og lagring av glukose [76]. Akuttbehandling med [1-¹⁴C]oljesyre ga en tendens til økning i fettsyreoksidasjon etter forbehandling med GW i 2 døgn hos celler dyrket i glukose. Dette er i samsvar med resultatene til Dimopoulos *et al* [76], samt resultatene til Wensaas *et al* [83].

Diskusjon

Resultatene til Wensaas *et al* [83] viste riktignok en større økning i oksidasjon, men det kan være grunnet eksponering av GW over 4 døgn i stedet for 2 døgn slik det ble gjort i denne oppgaven. Celler dyrket i galaktose viste ingen ytterligere økning i fettsyreoksidasjon etter forbehandling med GW.

Ved å benytte galaktose som næringskilde i cellens vekstmedium oppnås trolig en maksimal fettsyreoksidasjon. Det kan forklare at forbehandling med GW hos celler dyrket i galaktose ikke gir noe tilleggseffekt på fettsyreoksidasjonen. Forbehandling med GW i 24 timer ga en signifikant økning i mRNA-nivå av PGC-1 α og CPT-1 i skjelettmuskelceller fra rotter [76]. CPT-1 regulerer opptak og oksidasjon av langkjedede fettsyrer i mitokondrier. En økning i CPT-1 vil medføre økt fettsyreoksidasjon, noe som stemmer overens med resultatene for celler dyrket i galaktose i denne oppgaven. Vi fant at celler dyrket i galaktose hadde et økt nivå av CPT-1-mRNA. Forbehandling med GW hos celler dyrket i galaktose ga ingen additiv effekt på fettsyreoksidasjon.

Akuttbehandling med [U-¹⁴C]glukose og forbehandling med GW viste en tendens til reduksjon i glukoseoksidasjon både hos celler dyrket i glukose og celler dyrket i galaktose. Opptak av glukose tenderte til å være redusert etter forbehandling med GW i glukosebehandlede celler. Dette er i samsvar med studien til Dimopoulos *et al* [76] som viste at glukoseopptak ikke ble bedret etter behandling med GW. Det har også blitt rapportert at GW øker glukoseopptaket hos humane skjelettmuskelceller uavhengig av insulinstimulering [90]. Hos celler dyrket i galaktose var det ingen endring i glukoseopptak etter forbehandling med GW. Lengre forbehandling med GW enn 2 døgn ville kanskje medført større forskjeller.

4.2.6 Effekter av akuttbehandling med FCCP

FCCP er en substans som frikobler elektrontransporten fra ATP-syntesen. Elektrontransporten vil fortsette, men syntesen av ATP vil hemmes. Tilsetning av FCCP medfører at man kan oppnå maksimal oksidasjonskapasitet hos myotubene.

Akutt tilsetning av FCCP øker både fettsyre- og glukoseoksidasjon hos celler dyrket i galaktose og hos celler dyrket i glukose. Dette er tidligere vist i laboratoriet for oksidasjon av intracellulære lipider både for celler fra friske donorer og fra T2D-individer.

Diskusjon

Myotuber fra donorer med T2D hadde en lavere frikoblingseffekt etter tilsetning av FCCP sammenlignet med friske donorer. Dette kan trolig komme av en redusert kapasitet hos mitokondriene, til tross for lik mitokondriell masse hos myotubene fra T2D donorene [75].

Cellenes maksimale kapasitet til å oksidere oljesyre er større for celler dyrket i glukose sammenlignet med celler dyrket i galaktose. Celler dyrket i galaktose bruker mer av denne reservekapasiteten til å oksidere oljesyre sammenlignet med celler dyrket i glukose.

Reservekapasiteten for glukoseoksidasjon var signifikant høyere for celler dyrket i galaktose sammenlignet med celler dyrket i glukose, og galaktosebehandlede celler benytter seg i større grad av denne reservekapasiteten. Forbehandling med oljesyre ga ingen tilleggseffekter på glukoseoksidasjon, noe som muligens kommer av at det oppnås en maksimal oksidasjon hos celler dyrket i galaktose. FCCP ble også benyttet under overkryssningsforsøket. Celler dyrket i galaktose hadde en større reservekapasitet, eller en større kapasitet til maksimal OXPHOS, sammenlignet med celler dyrket i glukose. I denne oppgaven er disse dataene vist for fraksjonell oksidasjon og totaloksidasjon av glukose og oljesyre. Resultatene fra overkryssningsforsøket stemmer overens med resultatene for reservekapasitet til å oksidere glukose, da galaktosebehandlede celler hadde større kapasitet til maksimal OXPHOS enn celler dyrket i glukose. For maksimal kapasitet til å oksidere oljesyre hadde glukosebehandlede celler en høyere reservekapasitet sammenlignet med celler dyrket i galaktose. Det var ingen forskjeller i reservekapasiteten mellom celler dyrket i galaktose og celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering. Dermed er det sannsynlig at det kan være nok å behandle celler med galaktose kun under differensiering for å få frem slike effekter.

Celler som ble dyrket i galaktose var generelt mer oksidative enn celler som ble dyrket i glukose. En mulig forklaring kan være en generell stimulering av mitokondrielle prosesser.

5 Konklusjon

Galaktose kan benyttes for å modifisere energimetabolismen i humane myotuber. Siden metabolisme av galaktose til pyruvat i glykolysen gir lavere eller ingen ATP-produksjon, vil cellene tvinges til å benytte seg av OXPHOS isteden for å produsere ATP via glykolysen. Det er også tidligere vist at myotuber i kultur har lavt oksidativt potensial. I denne studien viser vi at ved å behandle humane myotuber med galaktose blir myotubene mer oksidative.

Galaktosebehandlede celler viste en økning i både fettsyre- og glukoseoksidasjonen sammenlignet med celler dyrket i glukose. Kronisk forbehandling med oljesyre ga en tendens til økning i fettsyreoksidasjonen sammenlignet med celler dyrket i glukose, men ga ingen tilleggseffekter på fettsyreoksidasjonen hos galaktosebehandlede celler. Dette skyldes trolig at man oppnår et maksimalt nivå for fettsyreoksidasjon hos galaktosebehandlede celler. Det samme tendensen gjaldt for glukoseoksidasjon. Da totaloksidasjon ble beregnet viste resultatene at celler dyrket i galaktose benyttet seg i større grad av glukoseoksidasjon enn fettsyreoksidasjon, sammenlignet med celler dyrket i glukose og celler dyrket i glukose under proliferering og galaktose under differensiering.

Myotuber dyrket i galaktose viste også en signifikant økning i mitokondriell masse sammenlignet med myotuber dyrket i glukose. Galaktosebehandlede celler hadde en økning av mRNA-nivå av CPT1 og CYC1, dette stemte overens med galaktosebehandlede myotubers økning i fettsyreoksidasjon. Galaktosebehandlede celler viste også en tendens til reduksjon i nivå av MHC I og MHCII, dette kan komme av at disse faktorene ikke uttrykkes godt nok i myotubene da galaktosebehandlede celler prolifererer langsommere enn glukosebehandlede celler, og trolig også trenger lengre tid til å differensiere. Videre fremover kan det være av interesse å se på galaktosebehandlede cellers differensieringstid, om denne må forlenges, samt insulinrespons i celler behandlet med galaktose sammenlignet med insulinrespons i celler dyrket i glukose.

Litteraturliste

1. WHO, *Diabetes*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, 2009.
2. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*.
3. Jin, W.Z., et al., *Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes*. *Clinical Science*, 2009. **116**(1-2): p. 99-111.
4. Rich-Edwards, J.W., et al., *Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women*. *Ann Intern Med*, 1999. **130**(4 Pt 1): p. 278-84.
5. Despres, J.P., *Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome*. *Nutrition*, 1993. **9**(5): p. 452-9.
6. Manson, J.E., et al., *Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women*. *Lancet*, 1991. **338**(8770): p. 774-8.
7. Lonnroth, P., et al., *Aging enhances the insulin resistance in obesity through both receptor and postreceptor alterations*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. **62**(2): p. 433-7.
8. Jin, W., et al., *Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **116**(2): p. 99-111.
9. Sundal, E., *Behandling av diabetes type 2 i allmennpraksis*. http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage_82515.aspx?filterBy=CopyToMedecs, 2010.
10. Korc, M., *Update on diabetes mellitus*. *Disease Markers*, 2004. **20**(3): p. 161-165.
11. Patti, M.E., et al., *The Role of Mitochondria in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes*. *Endocrine Reviews*, 2010. **31**(3): p. 364-395.
12. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance*. *Cell Metabolism*, 2008. **7**(1): p. 45-56.
13. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. *Curr Diab Rep*, 2006. **6**(3): p. 177-81.
14. Saltiel, A.R., et al., *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
15. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(2): p. 171-6.
16. Griffin, M.E., et al., *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade*. *Diabetes*, 1999. **48**(6): p. 1270-4.
17. Okada, T., et al., *Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(5): p. 3568-73.
18. Bjornholm, M., et al., *Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation*. *Diabetes*, 1997. **46**(3): p. 524-7.
19. Goodyear, L.J., et al., *Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(5): p. 2195-204.
20. Chalkley, S.M., et al., *Five-hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glycogen synthesis in the rat*. *Metabolism*, 1998. **47**(9): p. 1121-6.
21. Morino, K., et al., *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. *Diabetes*, 2006. **55** Suppl 2: p. S9-S15.
22. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
23. Storlien, L., et al., *Metabolic flexibility*. *Proc Nutr Soc*, 2004. **63**(2): p. 363-8.

24. 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.
25. Corpeleijn, E., et al., *Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle*. Obes Rev, 2009. **10**(2): p. 178-93.
26. 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.
27. Marra, M., et al., *Fasting respiratory quotient as a predictor of long-term weight changes in non-obese women*. Ann Nutr Metab, 2004. **48**(3): p. 189-92.
28. 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.
29. Campbell, M.K., et al., *Biochemistry*. 2003, London: Thomson. XXIII, 725 s.
30. Garland, P.B., et al., *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.
31. Hue, L., et al., *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(3): p. E578-91.
32. Bruce, C.R., et al., *Overexpression of carnitine palmitoyltransferase I in skeletal muscle in vivo increases fatty acid oxidation and reduces triacylglycerol esterification*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(4): p. E1231-7.
33. Hessvik, N.P., et al., *Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2090-104.
34. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(7): p. 1934-1941.
35. Khan, A.H., et al., *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
36. Watson, R.T., et al., *Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 175-93.
37. Schwenk, R.W., et al., *Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 149-54.
38. Campbell, S.E., et al., *A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36235-41.
39. 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.
40. Alberts, B., *Essential cell biology*. 2004, New York: Garland Science. XXI, 740, [102] s.
41. Wang, C.H., et al., *Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1201**: p. 157-65.
42. Patti, M.E., et al., *Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8466-71.
43. Frederiksen, C.M., et al., *Transcriptional profiling of myotubes from patients with type 2 diabetes: no evidence for a primary defect in oxidative phosphorylation genes*. Diabetologia, 2008. **51**(11): p. 2068-77.
44. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environ Health Perspect, 1990. **87**: p. 213-8.
45. Garlid, K.D., et al., *Mechanism of uncoupling protein action*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 803-6.

46. Kozak, L.P., et al., *UCPI: its involvement and utility in obesity*. Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 7**: p. S32-8.
47. Heiden, M.G.V., et al., *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
48. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
49. Lopez-Lazaro, M., *The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?* Anticancer Agents Med Chem, 2008. **8**(3): p. 305-12.
50. Cuezva, J.M., et al., *The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6674-81.
51. Isidoro, A., et al., *Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer*. Biochem J, 2004. **378**(Pt 1): p. 17-20.
52. Brand, K.A., et al., *Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 388-95.
53. Sparks, L.M., et al., *Remodeling lipid metabolism and improving insulin responsiveness in human primary myotubes*. Submitted, 2010.
54. Hood, D.A., *Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2001. **90**(3): p. 1137-57.
55. Baar, K., et al., *Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1*. FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1879-86.
56. Wright, D.C., et al., *Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 18793-9.
57. Lin, J., et al., *Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 797-801.
58. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell, 1999. **98**(1): p. 115-24.
59. Nikolic, N., et al., *Overexpression of PGC-1alpha increases oxidative capacity of human skeletal muscle cells*. Submitted, 2010.
60. Ciocoiu, C.C., et al., *Synthesis and dual PPARalpha/delta agonist effects of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole analogues of GW 501516*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(7): p. 3047-55.
61. 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.
62. Gohil, V.M., et al., *Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(3): p. 249-55.
63. Marroquin, L.D., et al., *Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants*. Toxicol Sci, 2007. **97**(2): p. 539-47.
64. Rossignol, R., et al., *Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 985-93.
65. Bassel-Duby, R., et al., *Signaling pathways in skeletal muscle remodeling*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 19-37.
66. Haug, E., et al., *Menneskets fysiologi*. 2006, [København]: Gad. 526 s.

67. Grimaldi, P.A., *Roles of PPARdelta in the control of muscle development and metabolism*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 6): p. 1130-2.
68. Lunde, I.G., et al., *PPARdelta expression is influenced by muscle activity and induces slow muscle properties in adult rat muscles after somatic gene transfer*. *J Physiol*, 2007. **582**(Pt 3): p. 1277-87.
69. Wang, Y.X., et al., *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta*. *PLoS Biol*, 2004. **2**(10): p. e294.
70. Handschin, C., et al., *Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(41): p. 30014-21.
71. Hickey, M.S., et al., *Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(3 Pt 1): p. E453-7.
72. Song, X.M., et al., *Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(6 Pt 2): p. R1690-6.
73. Henriksen, E.J., et al., *Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(4 Pt 1): p. E593-8.
74. Cuthbert, C., et al., *Diagnosis of inherited disorders of galactose metabolism*. *Curr Protoc Hum Genet*, 2008. **Chapter 17**: p. Unit 17 5.
75. Corpeleijn, E., et al., *Oxidation of intramyocellular lipids is dependent on mitochondrial function and the availability of extracellular fatty acids*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **299**(1): p. E14-22.
76. Dimopoulos, N., et al., *The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(24): p. 4743-8.
77. Riserus, U., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 332-9.
78. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
79. Gaster, M., et al., *Proliferation conditions for human satellite cells - The fractional content of satellite cells*. *Apmis*, 2001. **109**(11): p. 726-734.
80. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *Apmis*, 2001. **109**(11): p. 735-744.
81. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes*. *Biochim Biophys Acta*, 2010.
82. Vikstrom, S., Buurman D., www.seahorsebio.com 2010.
83. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *Journal of Lipid Research*, 2007. **48**(4): p. 961-967.
84. Bradford, M.M., *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
85. Hessvik, N.P., et al., *The liver X receptor modulator 22(S)-hydroxycholesterol exerts celltype specific effects on lipid and glucose metabolism* Submitted, 2010.
86. Reitzer, L.J., et al., *Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(8): p. 2669-76.
87. Sarabia, V., et al., *Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(4): p. 1386-95.
88. Dellavalle, A., et al., *Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(3): p. 255-67.

Litteraturliste

89. 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.
90. Kramer, D.K., et al., *Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta*. *Diabetes*, 2005. **54**(4): p. 1157-63.

Appendiks

I. Medier til celledyrking:

Utsåingsmedium:

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I

50 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Pen/Strep 10.000 units/ml

2,5 ml Fungizone

Proliferasjonsmedium:

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I No glucose

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

10 ml Ultrosor G

2,5 ml Pen/Strep 10.000 units/ml

2,5 ml Fungizone

Glukose/galaktose tilsvarende en konsentrasjon på 5,5 mM

Natrium pyruvat tilsvarende en konsentrasjon på 5,5 mM

Differensieringsmedium:

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I No glucose

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Pen/Strep 10.000 units/ml

2,5 ml Fungizone

25 pmol insulin

Glukose/galaktose tilsvarende en konsentrasjon på 5,5mM

Natrium pyruvat tilsvarende en konsentrasjon på 5,5 mM

Appendiks

II. Medier til substratoksidasjonsmetoden: (beregnet per brønn)

Oljesyre:

0,82 µl 6 mM OA

0,6 µl 100 µCi/ml * OA

0,18 µl BSA

0,06 µl karnitin

58,4 µl DPBS buffer pH 7,2

± 0,06 µl 1 mM FCCP

U-glukose:

1,08 µl 1 M glukose

0,012 µl 1 µCi/ml * U-glukose

0,5 µl BSA

120 µl DPBS buffer pH 7,2

± 0,12 µl 1mM FCCP

III. Medier til overkryssningsforsøk (per brønn):

Medium A:

0,82 µl 6 mM OA

0,6 µl 100 µCi/ml *OA

0,18 µl BSA

0,06 µl karnitin

58,4 µl DPBS buffer pH 7,2

± 0,06 µl 1 mM FCCP

Appendiks

Medium B:

0,82 μ l 6 mM OA

0,6 μ l 100 μ Ci/ml *OA

0,06 μ l 1 M glukose

0,18 μ l BSA

0,06 μ l karnitin

58,4 μ l DPBS buffer pH 7,2

\pm 0,06 μ l 1 mM FCCP

Medium C:

0,03 μ l 1 μ Ci/ml * U-glukose

0,5 μ l BSA

0,06 μ l karnitin

58,4 μ l DPBS buffer pH 7,2

\pm 0,06 μ l 1 mM FCCP

Medium D:

0,82 μ l 6 mM OA

0,03 μ l 1 μ Ci/ml * U-glukose

0,5 μ l BSA

0,06 μ l karnitin

58,4 μ l DPBS buffer pH 7,2

\pm 0,06 μ l 1 mM FCCP

Appendiks

IV. Reaksjonsløsninger til cDNA-syntese og real time PCR:

Løsning til cDNA-syntese:

3,2 µl DEPC-dH₂O

2 µl 10xRTbuffer

0,8 µl 25x dNTP mix (konsentrasjon: 100mM)

2 µl 10X Random Primers

1 µl RNase inhibitor

1 µl Multiscribe Reverse Transcriptase

10 µl RNA (fra prøve)

Løsning til PCR-reaksjon:

2,5 µl fortynnet cDNA prøve (fortynnet 1:5)

12,5 µl 2 x SYBR Green PCR-Mix

0,25 µl 30 µM Forward Primer

0,25 µl 30 µM Reverse Primer

9,5 µl DEPC-dH₂O