

Effekter og metabolisme av ulike fettsyrer i humane skjelettmuskelceller i kultur

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Line Lauvhaug

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

Mai 2011

Effekter og metabolisme av ulike fettsyrer i humane skjelettmuskelceller i kultur

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Line Lauvhaug



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Veiledere

Professor Arild Chr. Rustan

Professor G. Hege Thoresen

Stipendiat Siril S. Bakke

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i tidsrommet august 2010 til mai 2011. Noe av arbeidet ble presentert ved Poster på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen januar 2011.

Jeg vil gjerne få takke mine veiledere, professor Arild Chr. Rustan, professor G. Hege Thoresen og stipendiat Siril S. Bakke for god oppfølging, veiledning og støtte gjennom dette året. Tusen takk for at dørene alltid har vært åpne, for all kunnskap og entusiasme, og for hjelp i skriveprosessen.

Stor takk til Eili T. Kase for å ha hjulpet meg med PCR. Takk til Camilla Stensrud for opplæring i western og hjelp i cellelaboratoriet og Åse-Karine Fjeldheim for å ha hjulpet meg med små og store spørsmål i laboratoriet. Jeg vil også takke resten av Muskelbunten for lærerike og fine stunder, og for å ha besvart alle spørsmål. Jeg vil gjerne takke hele 4. etasje og alle på lesesalen for å ha skapt et fint arbeidsmiljø og trivelige dager. Jeg vil rette en spesiell takk til Ingeborg, Lisbeth og Ingveig for alle gode innspill underveis, hjelp, oppmuntring og godt vennskap.

Jeg vil takke Hilde, mamma og pappa for alt dere har gjort for meg gjennom hele studiet.

Jeg vil også takke min kjære Olav for motivasjon og støtte.

Blindern, mai 2011

Line Lauvhaug

Innholdsfortegnelse

FORORD	3
INNHOLDSFORTEGNELSE	4
SAMMENDRAG.....	8
ABSTRACT.....	10
FORKORTELSER	12
1. INNLEDNING	15
1.1 TYPE 2-DIABETES	15
1.2 INSULINRESISTENS	15
1.2.1 <i>Visceral fedme</i>	16
1.2.2 <i>Fettsyrer i dietten</i>	17
1.2.3 <i>Intramyocellulært triacylglyserol</i>	17
1.3 GLUKOSEMETABOLISME I SKJELETTMUSKEL.....	18
1.4 FETTSYREMETABOLISME I SKJELETTMUSKEL	19
1.4.1 <i>Opptak</i>	19
1.4.2 <i>Oksidasjon</i>	19
1.4.3 <i>Lagring</i>	21
1.4.4 <i>Lipolyse</i>	21
1.5 METABOLSK FLEKSIBILITET	23
1.5.1 <i>Fettsyrers hemming av glukoseoksidasjon</i>	23
1.5.2 <i>Glukoses hemming av fettsyreoksidasjon</i>	24
1.5.3 <i>Metabolsk fleksibilitet in vitro</i>	24
1.6 STOFFER TILSATT MYOTUBENE	25
1.6.1 <i>Palmitinsyre</i>	26

1.6.2	<i>Oljesyre</i>	26
1.6.3	<i>Linolsyre</i>	26
1.6.4	<i>Eikosapentaensyre</i>	27
1.6.5	<i>Triacsin C</i>	27
1.6.6	<i>FCCP</i>	27
1.6.7	<i>Forskolin</i>	28
1.7	MÅL FOR OPPGAVEN	29
2.	MATERIALER OG METODER	30
2.1	MATERIALER	30
2.2	DONORKARAKTERISTIKA	31
2.3	CELLEDYR KING	31
2.3.1	<i>Utsåing av humane myoblaster</i>	32
2.3.2	<i>Proliferasjon og differensiering til myotuber</i>	32
2.4	SUBSTRAT-OXIDASJONSMETODEN	32
2.4.1	<i>Radioaktive isotoper</i>	33
2.4.2	<i>Substrat-oksidasjonsforsøk med fettsyrer</i>	33
2.4.3	<i>Celleassosiert radioaktivitet</i>	34
2.4.4	<i>Syreløselig metabolitter</i>	34
2.4.5	<i>Proteinmåling</i>	34
2.5	SCINTILLATION PROXIMITY ASSAY (SPA)	35
2.5.1	<i>Scintillation proximity assay forsøk</i>	35
2.6	LIPOLYSE VED TILSETNING AV ULIKE STOFFER I ULIKE KONSENTRASJONER	36
2.7	RNA-ISOLERING OG ANALYSE AV GENEKSPRESJON MED REVERS-TRANSKRIPTASE-REAL-TIME-POLYMERASE-KJEDEREAKSJON (RT-REAL-TIME-PCR)	36
2.7.1	<i>Isolering og kvantifisering</i>	37

2.7.2	<i>cDNA syntese</i>	37
2.7.3	<i>Real-time PCR</i>	38
2.8	IMMUNBLOTTING	39
2.8.1	<i>Utsåing og høsting av celler</i>	39
2.8.2	<i>Proteinmåling</i>	40
2.8.3	<i>Støping av gel</i>	40
2.8.4	<i>Elektroforese</i>	40
2.8.5	<i>Blotting</i>	41
2.8.6	<i>Deteksjon</i>	41
2.8.7	<i>Stripping</i>	41
2.8.8	<i>Kvantifisering</i>	42
2.9	SEPARERING AV LIPIDER VED TYNNSJIKTKROMATOGRAFI (TLC).....	42
2.9.1	<i>Utsåing av celler</i>	42
2.9.2	<i>Folch ekstraksjon</i>	42
2.9.3	<i>Tynnsjiktromatografi</i>	42
2.10	FOTOGRAFERING AV LIPIDDRÅPER (LD)	43
2.11	STATISTISKE ANALYSER	43
3.	RESULTATER	44
3.1	EFFEKTER AV PALMITINSYRE, OLJESYRE, LINOLSYRE OG EIKOSAPENTAENSYRE PÅ KRONISK AKKUMULERING OG OKSIDASJON AV RADIOAKTIV OLJESYRE OG PALMITINSYRE.....	44
3.2	EFFEKTEN AV FORBEHANDLING MED ULIKE FETTSYRER PÅ AKUTT AKKUMULERING OG OKSIDASJON AV RADIOAKTIV OA, PA OG LA, OG PÅ MYOTUBENES EVNE TIL Å ØKE AKUTT FETTSYREOKSIDASJON VED ØKT FETTSYREKONSENTRASJON.....	46
3.3	EFFEKTER OG FORSKJELLER AV KRONISK OG AKUTT EKSPONERING FOR RADIOAKTIVE FETTSYRER PÅ METABOLISMEN I HUMANE MYOTUBER, OG EVNEN GLUKOSE HAR TIL Å UNDERTRYKKE FETTSYREOKSIDASJONEN	48

3.4	EFFEKTER AV ULIKE FETTSYRER PÅ LIPOLYSE AV OA OG PA	51
3.5	EFFEKTER AV STOFFER SOM KAN PÅVIRKE LIPOLYSEN.....	53
3.6	DISTRIBUSJON AV OA OG PA.....	55
3.7	EFFEKTER AV TRIACSIN C PÅ LIPIDDRÅPER	56
3.8	EFFEKTER AV ULIKE FETTSYRER PÅ REFORESTRING AV OA OG PA.....	56
3.9	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED OA OG PA PÅ MRNA-EKSPRESJONEN TIL STEAROYL-CoA DESATURASE 1 (SCD-1), FETTSYRE DESATURASE 2 (FADS2), PERILIPIN 2 OG PERILIPIN 3	58
3.10	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED OA OG PA PÅ PROTEINNIVÅET TIL PERILIPIN 2 OG PERILIPIN 3 59	
4.	DISKUSJON.....	61
4.1	EFFEKTER AV EPA PÅ METABOLISMEN TIL RADIOAKTIV PA, OA OG LA.....	61
4.2	EFFEKTER AV KRONISK OG AKUTT EKSPONERING FOR FETTSYRER.....	62
4.3	METABOLSKE PARAMETERE.....	64
5.	KONKLUSJON.....	66
	KILDER	67
	APPENDIKS	71

Sammendrag

Innledning: Det er en økt forekomst av type 2-diabetes (T2D) og fedme. Utviklingen ser ut til å være assosiert med mengde og type fett. Hos insulinresistente, T2D og overvektige er det ofte sett en nedgang i evne til å bytte fra lipid- til glukoseoksidasjon etter et måltid, og en dårligere evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt fettsyretilgang. Et slikt redusert metabolsk skifte betegnes som metabolsk infleksibilitet. Det er vist en korrelasjon mellom metabolske parametere *in vitro* og metabolsk fleksibilitet *in vivo*. Det er også sett at ulike fettsyrer har ulike effekter på metabolisme. Vi ville på bakgrunn av dette undersøke hvordan ulike fettsyrer påvirker metabolsk fleksibilitet, se på om forskjellige fettsyrer ville metaboliseres ulikt og hvordan ulike fettsyrer ville påvirke hverandres metabolisme.

Metode: Forsøkene ble utført på differensierte humane skjelettmuskelceller. I de 24 siste timene av differensieringsperioden (dag 6 til 7) ble myotubene forbehandlet med fettsyrer. I forsøk med akutt eksponering for fettsyrer var fettsyre ± glukose tilstede i 4 timer. For å kunne følge metabolismen var noe av fettsyrene radioaktivmerket. Fettsyreopptak og metabolisme ble studert ved hjelp av ”scintillation proximity assay”, substratoksidasjons-assay, måling av syreløselige metabolitter, tynnsjikt-kromatografi, mens fettsyreeffekter på gen- og proteinregulering ble utført ved hjelp av real-time PCR og immunblott.

Resultater / diskusjon: Eikosapentaensyre (EPA) førte til økt opptak, oksidasjon, lipolyse og reforestring av oljesyre (OA) og palmitinsyre (PA) sammenlignet med OA, PA og linolsyre (LA). Ved å se på fettsyrenes inkorporering i komplekse lipider viste det seg at OA ble inkorporert i en høyere grad enn PA. Andre forsøk indikerte at PA ble oksidert mer enn OA. Dette tyder på at OA har en økt tendens til å lagres i myotuber, mens PA har en raskere turnover og er mer tilgjengelig for oksidasjon. Evnen myotubene har til å undertrykke fettoksidasjon i nærvær av glukose (suppressibilitet) var også høyere for PA. Forbehandling med EPA førte til en økt adapterbarhet; en økt fettoksidasjon ved økt tilgjengelighet av fettsyre sammenlignet med etter forbehandling med PA, OA og LA. Forbehandling med OA og PA regulerte gener som påvirker desatureringsprosesser (SCD-1 og FADS2) og regulering av lipolyse (Perilipin 2 og 3), dette betyr at det skjer reguleringer ved tilstedeværelse av fettsyrer for å kompensere mot fettsyretilgjengeligheten.

Konklusjon: EPA-behandling forårsaket høyere akkumulering, oksidering, lipolyse og reforestring av radioaktiv OA og PA enn etter behandling med OA, PA eller LA. OA og PA regulerte gener involvert i desaturering (SCD-1 og FADS2) og i regulering av lipolyse (Perilipin 2 og Perilipin 3). Fettsyrene ble også metabolisert ulikt, PA hadde en høyere turnover og var mer tilgjengelig for oksidasjon enn OA som i en større grad gikk til lagring. Ulike fettsyrer metaboliseres ulikt i humane skjelettmuskelceller, og de påvirket også hverandres metabolisme. Med mer kunnskap om disse interaksjonene kan vi forhåpentligvis si mer om effekter av ulike diettsammensetninger med tanke på energimetabolisme og utvikling av insulinresistens i human skjelettmuskel.

Abstract

Introduction: There is an increasing incidence of type 2 diabetes (T2D), and development of T2D and obesity are associated with amount and type of fat in the diet. In skeletal muscle of patients with insulin resistance and T2D, a decline in the ability to switch from predominantly lipid oxidation during fasting to increased glucose oxidation in response to insulin after a meal, and a lower ability to increase fatty acid oxidation by increased fatty acid-availability has been found. Such a reduced metabolic shift is known as metabolic inflexibility. In lean healthy individuals, skeletal muscle is characterized by metabolic flexibility. Parameters used *in vitro* to describe metabolic flexibility of muscle cells are suppressibility, the effect of acutely added glucose to suppress fatty acid oxidation, and adaptability, the capacity of the cells to increase fatty acid oxidation upon increased fatty acid availability. A correlation between metabolic parameters *in vitro* and metabolic flexibility *in vivo* has previously been demonstrated. We wanted to study whether various fatty acids had different impact on metabolic flexibility, and whether different fatty acids would show different metabolic properties.

Methods: The experiments were carried out with differentiated human skeletal muscle cells. Myotubes were pretreated with fatty acids for the last 24 hours of the differentiation period (day 6 to 7). In experiments with acute treatments, fatty acids with or without glucose were added for 4 hours. To monitor the metabolism, trace amounts of radio labeled fatty acids were added. The fatty acid uptake and metabolism was studied with scintillation proximity assay, measurement of acid soluble metabolites, substrate oxidation assay and by thin layer chromatography. Real-time PCR and immunoblotting were performed to see how treatment with fatty acids affected gene and protein expression.

Results / discussion: Results showed that treatment with EPA increased uptake, oxidation, lipolysis and re-esterification of oleic acid (OA) and palmitic acid (PA) compared to OA, PA and linoleic acid (LA) treatment. OA was incorporated into complex lipids to a greater extent than PA, and PA was oxidized to a greater extent than OA. This suggests that OA has an increased tendency to be stored in the myotubes, whereas PA has a faster turnover and is more accessible to oxidation. The ability of the myotubes to suppress fat oxidation in the presence of glucose (suppressibility) was also higher for PA. Pretreatment with EPA increased the adaptability (the ability to increase fat oxidation by increased fatty acid availability) compared to pretreatment with PA, OA and LA. OA and PA were also shown to

regulate genes that regulate fatty acid desaturation (SCD-1 and FADS2) and lipolysis (perilipin 2 and 3), indicating that in presence of fatty acids there is gene regulation compensating the increased fatty acid availability.

Conclusion: Treatment with EPA increased uptake, oxidation, lipolysis and re-esterification OA and PA compared to OA, PA linoleic acid (LA) treatment EPA affected the metabolism of other fatty acids. OA had a greater tendency to be stored, while PA was oxidized to a higher extent. OA and PA both regulated genes that regulate fatty acid desaturation and lipolysis affecting fatty acid metabolism. Different fatty acids were handled different in human skeletal muscle cells, and they also had different impact on each others metabolism. With more knowledge about these interactions we probably can say more about beneficial dietary fat composition with respect to energy metabolism and development of insulin resistance in human skeletal muscle.

Forkortelser

[1- ¹⁴ C]	Radioaktiv karbonmerket
36 B4	”Human acidic ribosomal phosphoprotein PO”
ACBP	Acyl-CoA-bindende protein
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ADP	Adenosindifosfat
ALA	α -linolensyre
ASM	Syreløselige metabolitter
ATGL	Fettvev triglyseridlipase
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serum albumin
CA	Celleassosiert
cAMP	Syklisk adenosinmonofosfat
CD36/FAT	Fettsyretransportør
cDNA	Komplementær DNA
CE	Kolesterylester
CGI-58	Komparativ gene identifikasjon-58
Ci	Curie
CO ₂	Karbondioksid
Co-A	Coenzym-A
CPT	Karnitin palmitoyltransferase
Ct	Deteksjonsgrense
DAG	Diacylglyserol
DEPC-dH ₂ O	Dietylpyrokarbonat destillert vann
DGAT	Diacylglyserol acyltransferase
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECL	”enhanced chemiluminiscense”
ECM	Ekstracellulær matriks
EPA	Eikosapentaensyre
FA	Fettsyrer
FABP	Fettsyrebindende protein

FADS	Fettsyre desaturase
FCCP	Karboxylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrason
FFA	Frie fettsyrer
GAPDH	Glyseraldehyd-3 fosfatdehydrogenase
GLUT	Glukosetransportør
HRP	Pepperrot peroksidase
HSL	Hormonsensitiv lipase
IMTG	Intramyocellulære triglyserider
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
IκK	Inhibitorisk kappakinase
JNK	C-Jun-N-terminalkinase
KMI	Kroppsmasseindex
LA	Linolsyre
LD	Lipiddråper
LXR	Lever-X-reseptor
MAG	Monoasylglyserol
MGAT	Monoasylglyserol acyltransferase
MGL	Monoglyserid lipase
mRNA	Messenger ribonukleinsyrer
NADH/NAD ⁺	Nikotinamid adenindiukletid
O ₂	Oksygen
OA	Oljesyre
OD	Optisk tetthet
PA	Palmitinsyre
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCA	Perklorsyre
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PDH	Pyruvat dehydrogenase
PDK	Fosfor-3-fosfoinositid-avhengig-kinase
PFK	Fosfofruktokinase
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP ₃	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat
PKA	cAMP-avhengig proteinkinase (Proteinkinase A)

PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Proteinkinase C
PL	Fosfolipider
PPAR	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor
RNA	Ribonukleinsyre
ROS	Reaktive oksygenspesis
RQ	Respiratorisk kvotient
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SDS	Natrium dodecylsulfat
SEM	Standardfeil
SH2	Src homologi 2
SPA	”Scintillation proximity assay”
SRE	Sterol regulatorisk element
SREBP-1c	Sterol-regulatorisk-element-bindende-protein-1c
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triasylglyserol
TLC	Tynnsljiktromatografi
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
t-TBS	Tween trisbufret saltvann

1. Innledning

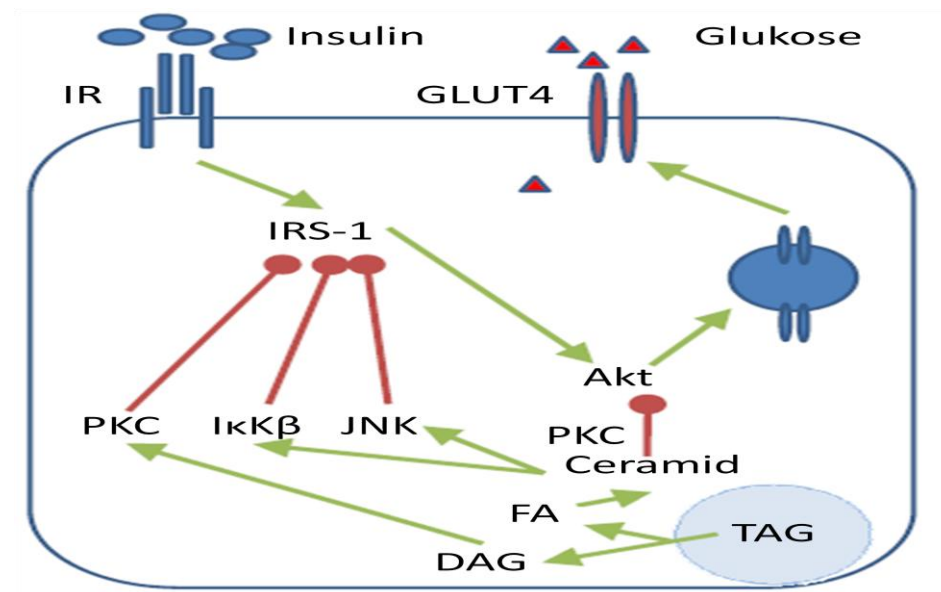
1.1 Type 2-diabetes

Diabetes mellitus er en av vår tids store folkesykdommer, i 2004 hadde 265 000 nordmenn diabetes og forekomsten er økende [1]. Diabetes deles opp i flere typer; hovedsakelig i type 1- og type 2-diabetes (T2D). T2D utgjør om lag 90 % av tilfellene, og blir kalt ikke-insulinavhengig diabetes [2]. Diabetes kan skyldes nedsatt eller manglende insulinsekresjon og / eller redusert insulinsensitivitet, dette fører til forhøyet nivå av plasmaglukose [2]. T2D er en kronisk, progredierende, metabolsk sykdom som ofte ses i sammenheng med høyt blodtrykk, høyt kolesterol, forhøyede triacylglyserol (TAG) verdier i blodet, fedme, lavsystemisk inflammasjon og en protrombotisk tilstand. Ses disse sammen kalles det metabolsk syndrom [3]. Type 2-diabetikere har en tre til fem ganger økt risiko for å dø av hjerte-karsykdom enn jevnaldrede friske [4]. T2D er i tillegg forbundet med mikrovaskulære komplikasjoner [5]. Etiologien til T2D er foreløpig ikke helt klarlagt [1], men det er vist at genetikk og miljøfaktorer som diett og fysisk aktivitet er viktig. Det er trolig også flere faktorer som spiller inn i utviklingen av T2D [6].

1.2 Insulinresistens

Det har oppstått insulinresistens når den biologiske effekten av insulin på muskel, fett og lever er nedsatt. Det vil føre til forhøyet plasmanivå av glukose, økt lipolyse, økt frigjøring av adipokiner, og økt glukoseproduksjon i lever [6]. For å kompensere for den reduserte insulinresponsen vil β -cellene i pankreas øke insulinproduksjonen og insulinutskillelsen [2], og det vil kunne oppstå hyperinsulinemi. Den kompensatoriske mekanismen vil etter hvert føre til β -celledegradering og en nedsatt β -cellefunksjon [6], i tillegg til at det økte nivået av frie fettsyrer og glukose i blodet vil kunne føre til glukolipotoksisitet som vil skade β -cellene ytterligere [7]. Ved hyperglykemi over lang tid vil det kunne dannes reaktive oksigenspesis (ROS) som påvirker inflammasjonsmarkørene inhibitorisk κ -kinase- β (IkK- β) og c-Jun N terminal kinase (JNK) og dermed nedsettes insulinsignaleringsprosessen ved at insulins nedstrøms prosesser hemmes (figur 1.1) [7]. Glukose og insulin øker malonyl-CoA som gir opphopning av langkjedet-CoA som kan gi akkumulering av ceramider og diacylglyserol (DAG). DAG aktiverer proteinkinase C (PKC), PKC fosforylerer insulinreseptorsubstrat-1 (IRS-1) og reduserer fosfatidylinositol 3-kinase- (PI3K) aktivitet, som igjen nedsetter

insulinsignaleren [8-10]. Ceramider har blitt foreslått å være en pådriver for induksjon av insulinresistens ved å inhibere proteinkinase B (PKB/Akt)-fosforylering (figur 1.1) [8, 11]. Opphopning av lipidmediater skjer også ved økte nivåer av frie fettsyrer. Glukolipotoksisitet kan oppsummeres med at glukose vil hindre prosesser som gjør lipidene ufarlige, og promotere lagring av frie fettsyrer til toksiske lipidmediater som vil inducere β -celle dysfunksjon og føre til β -celle apoptose [12]. Det er flere mekanismer som bidrar til insulinresistens [13]:



Figur 1.1: Fettsyremediatorer ved insulinresistens. Mange signalstoffer og fettsyremediatorer er involvert i utviklingen av insulinresistens. Insulinreseptor (IR), insulinreseptorsubstrat (IRS-1), proteinkinase C (PKC), inhibitorisk kappa kinase β ($I\kappa B\beta$), c-Jun N terminal kinase (JNK), fettsyre (FA), triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), proteinkinase B (PKB/Akt), glukosetransporter 4 (GLUT-4). Figur modifisert fra [14].

1.2.1 Visceral fedme

Overvekt og fedme blir sett i mange tilfeller av T2D, men ikke alle overvektige er insulinresistente [15]. Et friskt fettvev vil lagre overskuddsfettet subkuttant, i fettvevet. Et fettvev hos et individ predisponert for insulinresistens vil ha en feil i energifordelingen som fører til at overskuddsfettet lagres visceralt og ektopisk, det vil si lagring av fett rundt indre organer og i muskel, hjertet og lever [15]. Viscerale adipocytter er i en hyperlipolytisk tilstand som følge av resistens mot den antilipolytiske effekten til insulin [15, 16]. Dette gir økt fluks av fettsyrer til lever, lever nedsetter glukosemetabolismen og øker glukoseproduksjonen. Dette bidrar til økt hyperglykemi og hyperinsulinemi [15]. Fettvev er også mer mottakelig for oksidativt stress slik at det dannes mer $I\kappa K$ og JNK [10], og insulinsensitiviteten nedsettes (figur 1.1).

1.2.2 Fettsyrer i dietten

Kronisk forhøyede nivåer av frie fettsyrer i sirkulasjonen kan redusere insulinsekresjonen [15, 16], og en diett rik på fett gir akkumulering av lipider både subkutant og ektopisk. Hvilke og hvor mye fettsyrer dietten består av er av betydning for hvor mye lipider som akkumuleres, og hvilke lipidintermediater som dannes [17-19]. Fettsyreindusert insulinresistens kommer i stor grad av økt fettsyretilgjengelighet og påfølgende intramuskulær ceramid- og DAG-akkumulering [8, 9]. Det er vist en bedret insulinsensitivitet ved diett rik på flerumettede fettsyrer (for eksempel eikosapentaensyre (EPA)) eller en tradisjonell middelhavdiett som er rik på den enumettede fettsyren oljesyre (OA), sammenlignet med diett med mye mettet fett som palmitinsyre (PA) [8, 19, 20]. Mens det i andre studier ikke er vist bedret insulinsensitivitet ved bytte av mettet mot umettet fett [21]. Det er mye som ikke er klarlagt med hensyn på de ulike fettsyrenes effekt på insulinsensitivitet, men de fleste studier tyder på at type fettsyre er av betydning. Deler av mekanismen er trolig at ulike fettsyrer har ulike effekter på genekspressjon av gener involvert i fettsyremetabolisme, samt at de danner ulike lipidintermediater [22, 23]. OA inkorporeres i størst grad i TAG, mens PA i større grad inkorporeres i DAG, og danner ceramider [8]. Det er i forsøk på pre-adipocytter sett en økt lipidakkumulering i viscerale pre-adipocytter etter forbehandling med PA sammenlignet med OA som heller ga økt akkumulering i subkutane pre-adipocytter [8]. Forhøyet fettsyrekonsentrasjon kan også føre til frigjøring av proinflammatoriske signaler som for eksempel tumor nekrosefaktor- α (TNF- α) og ROS som er negativt for insulinsensitiviteten [24].

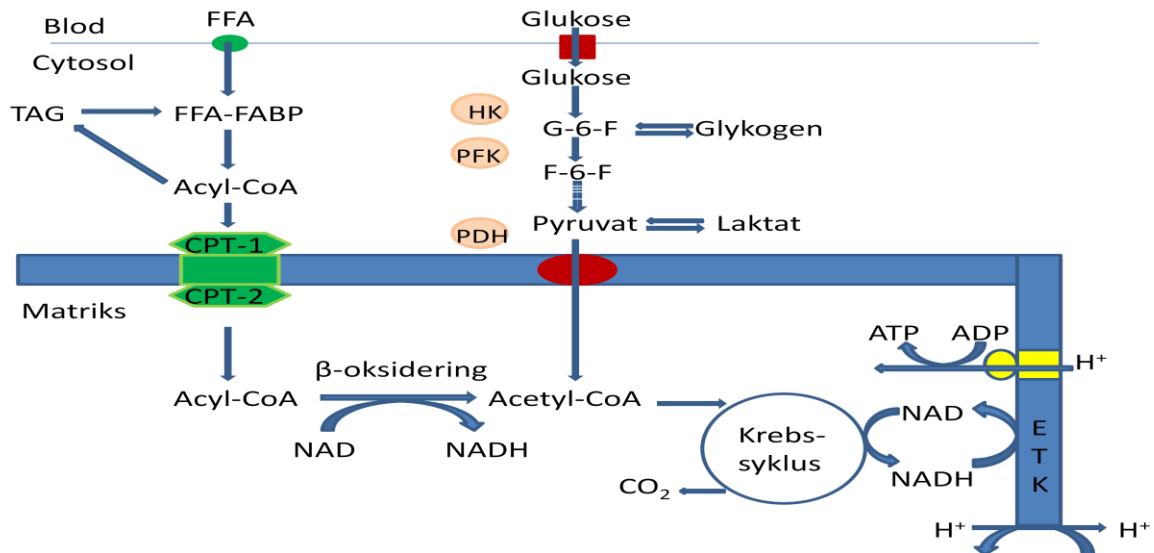
1.2.3 Intramyocellulært triacylglycerol

Insulinresistens er assosiert med forhøyet lipidakkumulering i muskel [25, 26]. Fett lagret som intramyocellulært triacylglycerol (IMTG) kan se ut til å nedsette insulinsensitiviteten [10, 27, 28], men det er et paradoks at utholdenhetstrener individer har mer IMTG enn utrente, insulinsensitive og har normal insulinrespons [27]. En lavere turnover av IMTG vil kunne øke akkumulering av DAG og ceramider [10, 25, 26] og slik kan turnoveren være bestemmende for insulinsensitiviteten. Økt TAG akkumulering i skjelettmuskel kan i større grad komme av dysregulering av fettoksidasjonen heller enn fettsyreopptaket [29]. IMTG-akkumulering er foreslått å være en beskyttelsesmekanisme mot overskudd av frie fettsyrer og deres toksiske lipidintermediater [10].

1.3 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskulaturen utgjør ca. 40 % av kroppsvekten i normalvektige individer. Omtrent 25 % av blodglukosen går etter et måltid til insulin-avhengige vev, og da hovedsakelig til skjelettmuskel [30]. Glukosekonsentrasjonen i plasma er tett regulert, og glukoseopptak til skjelettmuskel er mediert av transmembrane glukosetransportører, GLUT-1 og GLUT-4. GLUT-1 står for basalopptaket, mens opptak via GLUT-4 er insulinavhengig.

Insulinreseptoren (IR) tilhører reseptor-tyrosinkinase-familien. Reseptoren er et transmembran-glykoproteinkompleks som består av to α - og to β -subenheter. β -subenhetene er transmembrane og har tyrosinkinaseaktivitet, mens α -subenheten er ekstracellulær og inhiberer kinaseaktiviteten til β [31]. Når insulin binder α vil det bli en transfosforylering av β og en konformasjonsendring som øker kinaseaktiviteten. Når IR fosforyleres vil det katalysere fosforylering av IRS. Fosforylert IRS vil så interagere med signalmolekyler via deres Src homolog 2 (SH2) domene på proteinet, dette resulterer i aktivering av PI3K og nedstrøms aktivering av fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP3), fosforylert 3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1 (PDK-1) og Akt/PKB [31]. Dette vil føre til GLUT-4-translokasjon til plasmamembranen, og glukoseopptaket vil øke [32]. Glukose tatt opp av GLUT-4 blir fosforylert til glukose-6-fosfat av heksokinase. Glukose-6-fosfat går enten inn i glykolysen eller inkorporeres i glykogen. I glykolysen vil glukose-6-fosfat gjennomgå flere enzymatiske forandringer; først til pyruvat og videre vil det skje en dekarboksylering til acetyl-CoA. Acetyl-CoA vil så gå inn i Krebszyklus (figur 1.2) [33, 34].



Figur 1.2: Skjematisert oversikt over energiproduksjon i skjelettmuskelceller. Glukose blir transportert inn i cellen av transportører og enten lagret som glykogen eller nyttegjort via glykolyse til pyruvat. Opptak av fettsyre skjer ved diffusjon eller ved hjelp av ulike transportører. Ved overskudd inkorporeres fett i lipider. Ved energibehov skjer det lipolyse. Acyl-CoA blir transportert inn i mitokondriene, det skjer en β-oksidasjon, og acetyl-CoA dannes. Acetyl-CoA fra både fett og karbohydrat går inn i Krebs-syklus. Frie fettsyrer (FFA), fettsyrebindende protein (FABP), triacylglycerol (TAG), coenzym A (CoA), carnitinpalmitoyltransferase (CPT), oksidert og redusert nikotinamid adenindinukleotid (NAD og NADH), karbondioksid (CO₂), heksokinase (HK), fosfofruktokinase (PFK), glukose-6-fosfat (G-6-F), fruktose-6-fosfat (F-6-F), pyruvatdehydrogenase (PDH), adenosintrifosfat (ATP), adenosindifosfat (ADP), elektrontransportkjeden (ETK). Modifisert fra [35].

1.4 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

1.4.1 Opptak

Ekstracellulært er frie fettsyrer bundet til albumin. En økt albuminkonsentrasjon vil binde fettsyrene og hindre fettsyreopptak til cellen [36]. Opptak av frie fettsyrer til skjelettmuskel blir mediert via passiv diffusjon [37] eller ved hjelp av bærere i plasmamembranen (CD36/FAT). Intracellulært fraktes fettsyrene bundet til fettsyrebindende-protein (FABP) og omdannes til acyl-CoA av acyl-CoA syntase (figur 1.3) [36]. Langkjedet acyl-CoA kan oksideres, gå til lagring som TAG eller inngå i strukturelle komponenter som fosfolipider (PL) [8].

1.4.2 Oksidasjon

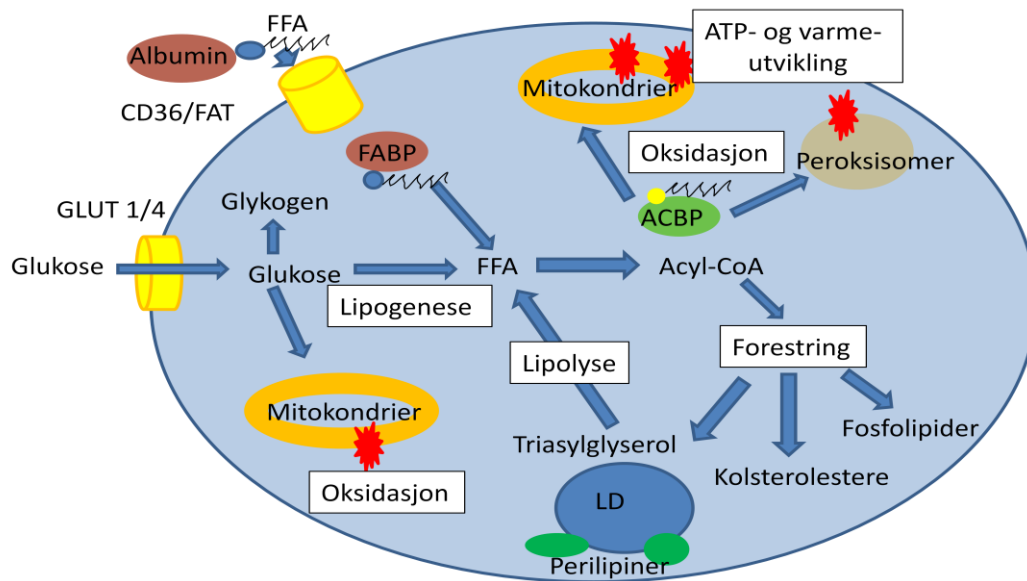
Langkjedet acyl-CoA kan fraktes via acyl-CoA-bindende protein (ACBP) til mitokondrier eller peroksisomer hvor de gjennomgår β-oksidasjon som fører til ATP, varmedannelse og dannelse av acetyl-CoA som kan oksideres videre i Krebs-syklus (figur 1.2 og 1.3).

Regulering av fettsyreoksidasjon skjer via et intermediat; malonyl-CoA [13, 38]. Malonyl-

CoA blir dannet fra acetyl-CoA karboksylase (ACC). Malonyl-CoA inhiberer fettsyreoksidasjon ved å hemme carnitin palmitoyltransferase (CPT-1). CPT-1 forestrer acyl-CoA til karnitin-CoA som kan fraktes inn i mitokondriene. I mitokondriene blir acyl-CoA gjendannet [13, 38].

Desaturering av fettsyrer

Stearoyl-CoA desaturase (SCD) er et enzym i endoplasmatisk retikulum som katalyserer dannelsen av enumettede fettsyrer fra mettede fettsyrer, både *de novo*-produserte og dietære langkjedede fettsyrer. Det finnes to humane isoformer, SCD-1 og SCD-5, SCD-1 er jevnt fordelt, mens SCD-5 hovedsakelig finnes i hjerne og pankreas. SCD-1 fjerner to hydrogenatom, og det dannes en karbon-dobbelbinding i *cis*-posisjon ved $\Delta 9,10$ [13, 39]. Foretrukne substrater for SCD-1 er palmitoyl- og stearoyl-CoA, disse blir omdannet til henholdsvis palmitoleoyl- og oleoyl-CoA i en aerob prosess [39]. Genekspressjonen til SCD-1 er regulert av dietære -, hormonelle - og miljø-faktorer. Induksjon av SCD-1 skjer via insulin-mediert økning i Sterol-regulatorisk-element-bindende-protein-1c (SREBP)-1c med Sterol-regulatorisk element (SRE) i promotoren. SREBP-1c mRNA-uttrykk er høyest i fettvev, men finnes også i lever, hjerte og muskel [39, 40]. Ekspresjonen øker ved diett rik på karbohydrat, mettet og umettet fett. Stoffer som påvirker kjernereseptorene lever-X-reseptor (LXR) og peroksisom proliferator-aktivert reseptor (PPAR) kan også påvirke ekspresjonen. Endogent uttrykk av SCD-1 og syntese av oljesyre er sannsynligvis nødvendig for dannelsen av TAG, fosfolipider og kolesterolistere selv ved en diett rik på OA [39]. Det er vist at lite SCD-1 i mus ga minket TAG, DAG og CE, redusert lipidsyntese, økt β -oksidasjon og bedret insulinsensitivitet i lever, muskel og fettvev [41], samtidig som disse musene med lite SCD-1 var resistente mot diettindusert fedme [41]. En annen fettsyre desaturase er FADS2, også kalt $\Delta 6$ -desaturase. FADS2 er et membranbundet enzym som katalyserer det hastighetsbegrensende trinnet i dannelsen av fettsyrer med flere dobbeltbindinger. FADS2 vil på samme måte som SCD-1 sette inn karbon-dobbelbindinger. α -linolensyre (ALA) og linolsyre (LA) er foretrukne substrater. Inhibering av FADS2 er vist å gi mindre flerumettede fettsyrer, og kan påvirke membranintegritet og celledatering [41].



Figur 1.3: Glukose- og fettsyremetabolisme i humane myotuber. Opptak, oksidasjon, lagring og lipolyse. Frie fettsyrer (FFA), fettsyrebindende protein (FABP), acyl-coenzym bindende protein (ACBP), glukosetransportør (GLUT), fettsyretransportør (CD36/FAT), lipiddråper (LD). Adenosintrifosfat (ATP) Modifisert fra [42].

1.4.3 Lagring

Ved energioverskudd vil acyl-CoA lagres, i fettvev eller andre steder, som for eksempel i skjelettmuskel som IMTG. Først blir det dannet monoacylglyserol (MAG) ved at acyl-CoA forestres med glyserol. MAG blir så forestret videre til DAG av monoacylglyserol acyltransferase (MGAT), før DAG forestres videre til TAG ved hjelp av diasylglyserol acyltransferase (DGAT) [43]. Mye lipider lagres i lipiddråper (LD) bestående av lipider omgitt av en fosfolipidkappe [44]. Lagrede lipider kan blant annet brukes som substrat for syntese av PL til membraner, eikosanoider og til energi [45].

1.4.4 Lipolyse

Ved økt energibehov i muskel vil det settes i gang lipolyse og frigjøring av fettsyrer. Fettsyrene vil blant annet komme fra fettvev og IMTG [24]. TAG blir hovedsaklig hydrolysert av fettvev triglyseridlipase (ATGL) til DAG, mens DAG blir hydrolysert av hormon-sensitiv lipase (HSL) til monoacylglyserol (MAG). Det siste trinnet i dannelsen av frie fettsyrer katalyseres av monoglyseridlipase (MGL) [46]. HSL kan også hydrolysere TAG, men i mindre grad enn DAG siden TAG er et dårligere substrat. Fettsyrene som frigjøres underveis omdannes til acyl-CoA og fraktes videre til Krebscyklus hvor det dannes energi [47], eller acyl-CoA kan bli fraktet til endoplasmatisk retikulum for reforestring [42]

Perilipiner – regulator av lipolyse

Perilipiner er en familie bestående av 5 ulike lipiddråpebindende proteiner (Perilipin 1-5) [44, 48]. De omgir LD og regulerer lipolyse av TAG [10, 46, 48] ved å kontrollere tilgangen av lipaser til lagret TAG [46]. I tillegg til å hemme lipolyse trengs perilipinene for å maksimere lagring av TAG [46, 49]. Hvert av de 5 proteinene har sin bestemte funksjon, felles er at de alle kan binde og stabilisere intracellulære LD, enten som en respons til metabolsk stimuli eller konstitutivt [44, 48]. Perilipin 2 (Plin2 eller ADRP) dekker små LD, er funnet i mange vev som akkumulerer lipider [48], og er sterkt utbredt i skjelettmuskel [50]. Effekter av Perilipin 2 er ikke fullstendig klarlagt, men effekten er mediert via redusert TAG-nedbrytning og dempet lipotoksisk ødeleggelse i skjelettmuskel [48]. I *in vivo*-studier etter intervensjon som er assosiert med bedret insulinsensitivitet er det observert et økt Perilipin 2-uttrykk [50]. Genuttrykket til Perilipin 2 er regulert av kjernereseptoren PPAR, og transkripsjonen av Perilipin 2 mRNA blir aktivert av PPAR-ligander, som lang-kjedede fettsyrer. Eksogene fettsyrer kan øke Perilipin 2-nivå både ved å aktivere transkripsjon av genet og ved å promotere TAG-syntese [48]. I ikke-fettvev vil proteinnivået til Perilipin 2 korrelere med intracellulære nøytrale lipider [48]. Sekvensen til Perilipin 2 og 3 har mye til felles. Suppresjon av Perilipin 3 resulterer i oppregulering av Perilipin 2 [48, 51]. Perilipin 3 (Plin 3 eller TIP 47) er uttrykt i nesten alle vev [48], og lokaliserer til LD i respons til lipolytisk stimuli [45, 48]. Det er etter inkubering med OA sett at Perilipin 3 ble rekruttert til nydannede lipiddråper i løpet av minutter [52]. Det er vist at Perilipin 3 ikke er involvert i fettsyreopptak, og er heller ikke en essensiell faktor for lipolyse, men Perilipin 3 kan være en viktig faktor i tidlig fase av LD-biogenese. Lite Perilipin 3 vil gi en dårligere inkorporering av TAG i LD, og inhibert modning av LD [51]. Perilipin 3 har en lignende effekt som apolipoprotein E som spiller en viktig rolle i dannelsen og stabilitet av lipoproteinpartikler som medierer transport av nøytrale lipider gjennom sirkulasjonen [51].

Lipolyse

Lipolysen starter med aktivering av lipaser. Den mest kjente mekanismen for regulering av lipolyse er via Syklisk adenosinmonofosfat (cAMP). Katekolaminer binder β -adrenerge reseptorer, dette øker cAMP intracellulært, som vil aktivere cAMP-avhengig proteinkinase (PKA) [16]. PKA fører til fosforylering av perilipinene og promoterer lipolyse. Fosforylering av perilipin fører til ”docking” av HSL, og videre fosforylering og translokasjon av lipasen fra cytosol til lipiddråpen [16, 44, 46]. Fosforylering av perilipinene bidrar til lipolyse ved at fosforyleringen hindrer perilipinene i å blokkere HSL translokasjon

til lipiddråpen [16]. HSL aktiveres via PKA-mediert fosforylering, eller kontraksjonsmediert via PKC. HSL-mangel i mus er vist å gi økt DAG i muskel [47]. ATGL sitter på LD i både basal og aktivert tilstand. ATGL aktiveres av CGI-58. CGI-58 er et protein som sitter på LD, ved β -adrenerg stimulering og fosforylering av perilipin vil CGI-58 binde ATGL, og ATGL aktiveres [47]. Mutasjoner i ATGL eller CGI-58 vil kunne føre til økt akkumulering av TAG og i verste fall nøytralt lipidlagringssyndrom [47]. Insulin hemmer lipolyse ved at insulin stimulerer fosfodiesterase som bryter ned cAMP [45].

1.5 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet er evnen skjelettmuskelen har til å bytte energikilde, fra fettsyreoksidasjon under faste til glukoseoksidasjon etter et måltid. En frisk muskel er karakterisert ved å være metabolsk fleksibel. Da vil skiftet fra lipidoksidasjon under faste gå raskt over til glukoseoksidasjon ved insulintilførsel. Det vil skje en suppresjon av lipidoksidasjon i respons til insulin og glukose. Denne evnen er nedsatt hos insulinresistente [17, 28, 53]. Tap av evne til skifte mellom karbohydrat- og fettsyreoksidasjon blir kalt metabolsk infleksibilitet [53]. Den vanligste måten å måle metabolsk fleksibilitet *in vivo* er ved respiratorisk kvotient (RQ), kvotienten mellom CO_2 produksjon og O_2 forbruk (CO_2/O_2). RQ beskriver hvilket næringsstoff som foretrekkes som energikilde, en lav RQ indikerer høy lipidoksidasjon mens en høy RQ indikerer høy glukoseoksidasjon. Hos infleksible vil skiftet i RQ være mindre, og det vil ta lengre tid enn i fleksible [28]. Sammenhengen mellom oksidering av ulike substrater er tidligere beskrevet av Randle et al [54]. Glukose-fettsyresyklusen viser at det er en dynamisk interaksjon mellom substrater, og fettsyrer reduserer glukoseoksidasjon [54]. Interaksjonen er også beskrevet å gå andre veien kalt ”invers Randle”; hvor glukose reduserer oksidasjon av fettsyrer [34, 55].

1.5.1 Fettsyrers hemming av glukoseoksidasjon

Den inhibitoriske effekten fettsyrer har på glukoseoksidasjon er trolig mediert via inhibering av pyruvat dehydrogenase (PDH), fosfofruktokinase (PFK) og heksokinase (figur 1.2). De er alle enzymer som er med på omdannelsen av glukose til acetyl-CoA. Ved fettsyreoksidasjon dannes det acetyl-CoA, dette fører til en økt acetyl-CoA / CoA og NADH / NAD^+ ratio [56]. De økte ratioene vil føre til hemming av PDH. PFK og heksokinase inhiberes indirekte av den økte ratioen ved citrat- og glukose-6-fosfat-akkumulering (figur 1.2) [56, 57]. Inhibering av disse enzymene vil inhibere glykolyse og glukoseopptak, i tillegg til å favorisere

reforesting [34, 56, 57]. Om dette er hele mekanismen er foreløpig uklart siden det finnes motstridende studier [24]. Under normale fysiologiske tilstander er det en invers relasjon mellom tilgjengelighet av fettsyrer og hastighet på glukoseoksidasjon [34].

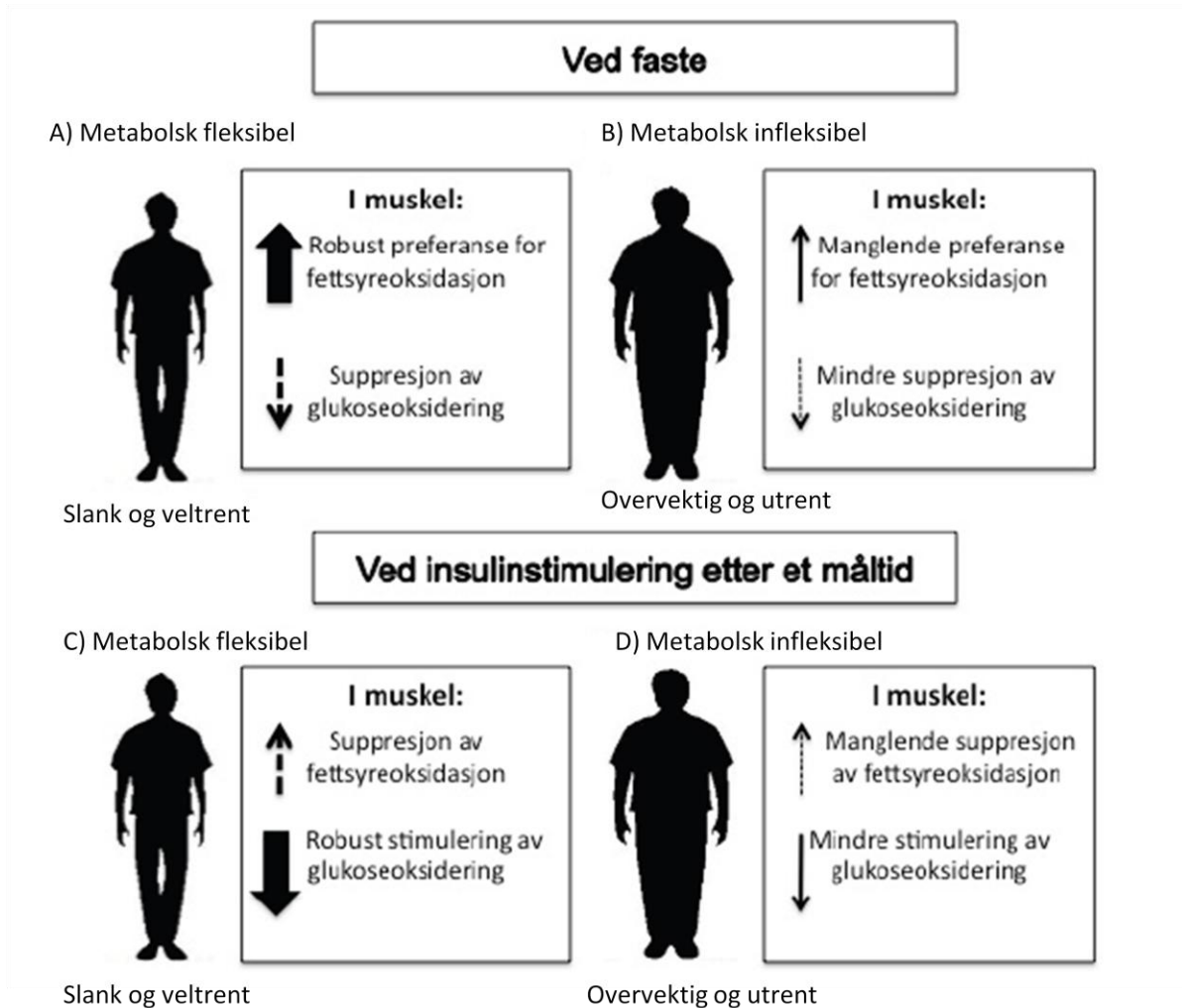
1.5.2 Glukoses hemming av fettsyreoksidasjon

Økt intracellulær glukosemetabolisme som følge av økt glukosetilgjengelighet og insulin fører til økt syntese av malonyl-CoA. Malonyl-CoA inhiberer CPT-1 som kontrollerer opptak av fettsyrer til mitokondriene (se 1.4.2). Dette reduserer fettsyreoksidasjon og favoriserer fettsyre-reforesting [49, 57, 58]. Ved glukoseinfusjon ble oksidasjon av PA inhibert, men ikke oksidasjon av oktansyre [49]. Dette skjer sannsynligvis ved at PA inhiberer ACC som katalyserer dannelsen av malonyl-CoA [59]. Det er *in vivo* vist at økt glukosetilgjengelighet inhiberte lipidoksidasjonen selv om tilgjengeligheten av fettsyre var konstant. Dette tyder på at det er tilgjengelighet av glukose heller enn fettsyrer som er avgjørende for hvilket substrat som foretrekkes [57].

1.5.3 Metabolsk fleksibilitet *in vitro*

Ukropcova et al [17] har beskrevet metabolsk fleksibilitet *in vitro* ved parameterne suppressibilitet og adapterbarhet. Suppressibilitet er beskrevet som myotubenes evne til å undertrykke fettsyreoksidasjonen ved akutt tilsetning av glukose, og adapterbarhet som kapasiteten myotubene har til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt fettsyretilgjengelighet [17]. Hessvik et al [22] har beskrevet en annen parameter for metabolsk fleksibilitet *in vitro*, substratregulert fleksibilitet; den er beskrevet som egenskapen myotubene har til å øke OA oksidasjon når miljøet bytter fra ”fed” (lav FA, høy glukose) til ”fasted” (høy FA, ingen glukose) [22]. Ukropcova et al [17] viste i det samme arbeidet som nevnt over en sammenheng mellom metabolsk fleksibilitet *in vitro* og metabolsk karakteristikk av donoren *in vivo* [17]. Det viste seg at *in vitro* suppressibilitet var inverst assosiert med metabolsk fleksibilitet og insulinsensitivitet, og positivt korrelert med kroppsfett og fastende nivå av frie fettsyrer. Adapterbarheten var positivt korrelert med metabolsk fleksibilitet og insulinsensitivitet, og negativt assosiert med kroppsfett og fastende insulinnivå [17]. Korrelasjonen med *in vivo* viste at metabolsk fleksibilitet, hvertfall til en viss grad, er en iboende egenskap hos skjelettmuskel. Årsaker til fedme-indusert metabolsk infleksibilitet kan finnes i livsstilsfaktorer og deres interaksjon med genetiske og iboende egenskap til skjelettmuskel [26]. Det er også mulig det ikke er en iboende feil i T2D skjelettmuskler, men at infleksibiliteten i stedet kommer av en ekstramuskulær mekanisme, som at muskelcellene

ikke klarer å regulere ekstracellulær fettsyrekonsentrasjon. T2D har for eksempel en høyere RQ (karbohydrat oksidasjon) under faste, og ved insulinresistens vil det være mer sirkulerende fettsyrer etter et måltid [60]. Det er foreløpig ukjent om det er mulig å forandre metabolsk fleksibilitet via endret fettsammensetning i maten [22], men metabolsk fleksibilitet *in vitro* kan forandres ved å forandre det ekstracellulære miljøet [22, 61].



Figur 1.4: Metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel. A) I slanke og veltrente som er metabolsk fleksible vil det ved faste være en klar preferanse for lipider, og glukoseoksidasjon blir undertrykt. B) Hvis individet er overvektig og utrent, sagt å være metabolsk infleksibel vil det ikke være en så sterk preferanse for lipidoksidasjon ved faste, og mindre suppresjon av glukoseoksidasjonen. Ved insulinstimulering etter et måltid vil C) metabolsk fleksible individer ha en høy stimulering av insulin og en robust glukoseoksidering, og en kraftig suppresjon av fettsyreoksidasjonen. D) Metabolsk infleksible vil ha en lavere effekt av insulin og dermed en mindre stimulert glukoseoksidasjon og en dårligere suppresjon av glukose på fettsyreoksidasjon. Modifisert fra [28].

1.6 Stoffer tilsatt myotubene

Lengde på karbonkjeden, grad av metning, plassering av dobbeltbindinger og stereoisomeri påvirker hastigheten til fettsyreoksidasjon. Det er en signifikant relasjon mellom fettsyrens

karbonkjedelengde og oksidasjon. Korte fettsyrer oksideres raskere enn lange, og umettede fettsyrer oksideres raskere enn mettede [62]. Fettsyremetabolismen kan også påvirkes ved tilsetning av stoffer som hemmer / potenserer ulike metabolismeveier.

1.6.1 Palmitinsyre

Palmitinsyre (PA) er en mettet fettsyre (16:0), det er den mest prevalente mettede fettsyren i sirkulasjonen. Palmitinsyre finnes mye i palmetreolje, men også i andre vegetabiliske og animalske kilder [41]. Forbehandling av differensierte myotuber med PA er vist å øke opptaket til OA sammenlignet med forbehandling med BSA, og PA reduserte insulinstimulert glukoseopptak [42]. Forbehandling med PA førte også til en forandret fordeling av OA i humane myotuber, mindre ble oksidert og mer gikk til lagring [42]. Adapterbarheten til myotuber behandlet med PA er også vist å være høyere enn i de behandlet med OA [22]. PA akkumuleres i stor grad i DAG og ceramider. Dette er intermediater som kan påvirker insulinsignaleren [8, 9], PA kan slik være negativt for insulinsensitiviteten.

1.6.2 Oljesyre

Oljesyre (OA) er en enumettet fettsyre (18:1 n-9). Det er den mest prevalente enumettede fettsyren i dietten, og også blant sirkulerende plasmalipider [8, 42]. Lipiddistribusjon av OA i myotuber etter forbehandling med OA viste at mest ble inkorporert i PL og TAG, og deretter som FFA og i DAG [18]. Hessvik et al [22] har vist at ved forbehandling av myotuber med OA og PA, ble OA inkorporert i en større grad i nøytrale lipider enn PA [22]. I myotuber behandlet med OA er det vist at glukose har en suppressiv effekt på OA-oksidasjon [63].

1.6.3 Linolsyre

Linolsyre (LA) er en flerumettet fettsyre (18:2 n-6). LA er en essensiell fettsyre som trengs via kosten [23]. Forbehandling av myotuber med LA påvirket ikke suppressibiliteten i en stor grad, men adapterbarhet var økt sammenlignet med OA [22]. Effektene til LA er ikke fullstendig klarlagt, og noen av resultatene er motstridende. I rotter er det vist at diett med mye LA bedrer insulinsensitiviteten sammenlignet med "chow" (lav-fett) diett [64]. I mus er det observert en økning i ceramider ved behandling med LA sammenlignet med "chow" diett. Dette medførte en nedsatt insulinsensitivitet [65]. Ved å bytte ut LA med n-3 fettsyrer (fiskeoljer) i fettrik diett til rotter ble utviklingen av insulinresistens motvirket [20].

1.6.4 Eikosapentaensyre

Eikosapentaensyre (EPA) er en flerumettet fettsyre (20:5 n-3). Det er mye EPA i fiskeoljer. Det er beskrevet at å bytte ut noe fett med flerumettede fettsyrer bedrer insulinfølsomheten [18, 20]. Mulige mekanismer er forandring i acyl-CoA, DAG, TAG, forandret oksidasjon og mindre fettsyrefluks til muskel [18]. Forbehandling av myotuber med EPA er vist å øke opptaket av fettsyrer sammenlignet med forbehandling med OA eller bovint serumalbumin (BSA) som fettsyrefri kontroll [18, 22, 66], og opptaket ser ut til å være konsentrasjonsavhengig [18]. Hessvik et al [22] viste at EPA selv akkumulerte i mindre grad i myotuber enn PA, OA og LA. Forbehandlingen av myotuber med EPA førte også til en lavere dannelse av ASM og en lavere oksidasjon av radioaktiv OA sammenlignet med forbehandling med BSA [18]. Dannelsen av ASM fra EPA-behandlede myotuber var høyere enn for OA-behandlede myotuber [22]. Forbehandling med EPA ga økt TAG akkumulering og redusert acyl-CoA nivå i cellene sammenlignet med OA [66]. Forbehandling med EPA er vist å øke suppressibiliteten til myotubene sammenlignet med forbehandling med OA og PA, og adapterbarhet økte sammenlignet med OA [22]. Det tyder på at ulike fettsyrer har ulik effekt på lipidmetabolismen og insulinsensitiviteten, hvor EPA spesielt er gunstig [22].

1.6.5 Triacsin C

Triacsin C er en potent kompetitiv inhibitor av acyl-CoA syntetase. Acyl-CoA er substrat for *de novo* syntese av glyserolipider og kolesterolestere, og for fettsyreoksidasjon. Triacsin C vil hemme reforestring av fettsyrer som har gjennomgått lipolyse [67]. Forsøk gjort av Igal et al [67] viste at inkorporering av fettsyrer til TAG og kolesterolestere ble nedsatt med triacsin C tilstede, men inkorporering til fosfolipider ble ikke påvirket. Dette viser at PL syntese opprettholdes selv ved begrenset fettsyretilgjengelighet [67].

1.6.6 FCCP

Mitokondriene spiller en essensiell rolle i cellenes energimetabolisme, og påvirkning av mitokondrieaktiviteten kan være et mulig target for intervensjon. Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrason (FCCP) er en protonofor-frikobler av mitokondriell oksidativ fosforylering [68]. Frikoblere inhiberer koblingen mellom elektrontransport og fosforyleringsreaksjon, og inhiberer slik ATP-syntese uten å påvirke den respiratoriske elektrontransportkjeden. ATP-syntasen blir ikke direkte påvirket, men FCCP vil ødelegge protongradienten som driver ATP-syntasen og slik nedsette ATP-syntesen. Dette vil gi en

økt elektrontransport og en økt oksidativ kapasitet av energisubstrater. Forskjellen i oksygenforbruk mellom basal og frikoblet tilstand kalles reservekapasitet [68, 69]. Det er vist at tilsetning av FCCP til adipocytter førte til økt lipolyse [70].

1.6.7 Forskolin

Forskolin er en potent inhibitor av fosfodiesterase som fører til cAMP-økning. cAMP-økning er som nevnt et viktig signal for lipolyse (stimulerer HSL) (se 1.4.4) [71]. Lipolyse vil øke ved tilsetning av forskolin til cellene.

1.7 Mål for oppgaven

Det er tidligere vist at type fett er av betydning for utvikling av insulinresistens og T2D [17-19]. Det var her ønskelig å gjøre studier med ulike fettsyrer i differensierte, humane myotuber, dette for å kunne se på den enkelte fettsyrens- og fettsyreblandingens effekt på fettsyremetabolismen til myotubene. Vi ville også se på hvordan utvalgte stoffer påvirket fettsyremetabolismen. Stoffene som ble valgt var FCCP, forskolin og triacsin C.

Målet med denne oppgaven var å:

- Studere fettsyremetabolismen i humane skjelettmuskelceller etter forbehandling med ulike fettsyrer (PA, OA, LA, EPA) i de siste 24 timene av cellenes differensieringsperiode.
- Studere fettsyremetabolismen av akutt tilsatt PA, OA og LA både uten- og etter fettsyreforbehandling, og hvordan glukose tilsatt akutt ville påvirke fettsyremetabolismen.
- Se om det var noen forskjell i uttrykket av ulike gener og proteiner etter forbehandling med PA, OA eller BSA (fettsyrefri kontroll).
- Studere hvordan forbehandling med PA og OA ville påvirke lipiddistribusjonen i myotuber.
- Studere hvordan frikobleren FCCP, lipolysestimulatoren forskolin og reforestringshemmeren triacsin C ville påvirke fettsyremetabolismen i myotuber forbehandlet med fettsyrer.
- Se på hvordan ovenfornevnte punkter påvirket metabolsk fleksibilitet ved å bruke parameterne adapterbarhet og suppressibilitet.

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbecco`s Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM/GLutamax-I), Fungizone[®] (250 µg/ml amphotericin), føtalt kalveserum (FCS), penicillin-streptomycin (10000 IE/10 mg/ml) og Dulbecco`s Phosphate Buffered Salin (DPBS m/Ca²⁺ og Mg²⁺) ble kjøpt fra Gibco, Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Ultrosor G ble kjøpt fra BioSerpa, Process division of Ciphergen Biosystems Inc (Paris, Frankrike). Insulin Actrapid[®] ble innkjøpt fra NovoNordisk (Bangsværd, Danmark). Ekstracellulær matriks (ECM) gel, L- karnitin hydroklorid, bovint serum albumin (BSA), β-merkaptoetanol, glukose, dietylpyrokarbonat (DEPC), palmitinsyre, HEPES, karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrason (FCCP), oljesyre, triacsin C ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Eikosapentaensyre og linolsyre er fra Laborel AS (Oslo, Norge). [1-¹⁴C]palmitinsyre (60 mCi/mmol), [1-¹⁴C]oljesyre (58,2 mCi/mmol), [1-¹⁴C]linolsyre (55 mCi/mmol) kom fra American Radiolabeled Chemicals (St Louis, MO, USA). OptiPhase Supermix, Unifilter[®]-96 GF/B, 96-brønners Cytostar-T[™] og TopSeal[®]-A gjennomsiktig film ble skaffet fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). 96-brønners brett Corning[®]CELLbind Surface, 12 brønners brett Corning[®]12 Well Cell Culture Cluster var kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). 96-brønners "ASM" nunc og mikrotiteterplate ble kjøpt fra nunc. Biocoat[™] 25 cm²-celleflaske fra BD Biosciences, (Bedford, USA). 12-brønnersbrett med glassbunn ble kjøpt fra MaTek (Ashland, MA), 96-brønners Isoplate[®] var fra Wallac OY (Turku, Finland). RNA Isolation Kit var skaffet fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). High capacity cDNA Revers Transcription Kit og var fra Applied Biosystems. Quant-iT[™] RNA BR assay var skaffet fra Invitrogen (USA). Tynnsjiktplate fra Merck (Darmstadt, Tyskland). SYBR green, Taqman reverse transkripsjonskitreagenser og MicroAmp[®] Optical Reaction Plate var skaffet fra Applied Biosystem (Warrington, UK). Bodipy 493/503, MitoTracker[®]Red FM, Hoechst 33258 ble kjøpt fra Invitrogen (Carlsbad, CA). Primere (Perilipin 2, perilipin 3, SCD-1, FADS2, 36 B4, GAPDH) var kjøpt fra Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS, (Levanger, Norge). BCA[™] Protein Assay Kit, pierce ble kjøpt fra Boule Nordic AS, (Ski, Norway). 10 x tris / glycin / SDS buffer, 10 x tris / glycinbuffer, Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate, geit anti-kanin IgG pepperrot peroksidase konjugat #170-6515, acrylamid, bromfenolblått, tetrametyletylendiamid (TMED), Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards ble levert fra BioRad

Laboratories, (Hercules, CA, USA). Kanin-anti-geit IgG pepperrot peroksidase konjugat #P0-160 ble kjøpt fra DakoCytomation (Glostrup, Danmark). SCD-1-antistoff (M38) #2438, SCD-1 positiv kontroll og α -tubulin antistoff #2144 var fra Cell Signaling Technology, (Beverly, MA, USA). Perilipin 2 #B361 og Perilipin 3 #SZT-2 antistoff fra Londos lab, National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA). Perilipin 2 antistoff #NB110-40877 var fra Novus Biologicals, (Littleton, CO, USA). "Enhanced chemiluminescence" ECL ble kjøpt fra GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Kodak X-Ray fixer og Kodak X-Ray fremkaller ble kjøpt fra Carestream Health, Inc (NY, USA).

Andre kjemikalier og reagenser som ble brukt var av analytisk kvalitet.

2.2 Donorkarakteristika

Dette arbeidet baserer seg på forsøk gjort på humane skjelettmuskelceller isolert fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel) fra 7 levende, friske og frivillige donorer (tabell 2.1).

Donor	Kjønn	Alder	Fastende glukose	Triglyserider	KMI
LD	(M/K)	(år)	(mmol/L)	(mmol/L)	(kg/m²)
15	Kvinne	55	6,9	1,1	29,1
21	Kvinne	68	5,2	0,9	29,7
22	Mann	40	5	1,5	28,7
23	Kvinne	61	4,8	0,5	21,8
24	Kvinne	70	5	0,6	24,2
27	Kvinne	44	5,2	0,4	21,7
32	Kvinne	34	5,1	0,5	22,3
Gj.snitt ± SEM		53 ± 5	5,3 ± 0,3	0,8 ± 0,2	25,5 ± 1,5

Tabell 2.1: LD: levende donor, KMI: kroppsmasseindeks, SEM: standardfeil

2.3 Celledyrking

Arbeidet med humane skjelettmuskelceller ble gjort i henhold til prosedyrene til Gaster et al [72, 73].

2.3.1 Utsåing av humane myoblaster

Ampuller ble tatt opp fra nitrogen tank og tint raskt på vannbad ved ca. 37 °C. Innholdet ble overført til 50 ml rør hvor ca. 5 ml utsåingsmedium (appendiks 1.1) ble tilsatt dråpevis. Røret ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten med DMSO ble sugd av og pelleten resuspendert i ca. 2 ml utsåingsmedium. For å beregne celletettheten ble 10 µl cellesuspensjon blandet med 10 µl 0,4 % tryptanblått og telt på Countess™ automated cell counter fra Invitrogen. Resten av cellesuspensjonen ble så tilsatt riktig mengde utsåingsmedium for å oppnå ønsket celletetthet og blandet godt. 100 µl, 1 eller 3 ml cellesuspensjon tilsvarende henholdsvis ca 6000, 50 000 – 100 000 og 300 000 celler per brønn / flaske ble tilsatt 96-brønnersbrett (CellBIND® og Cytostar-T™), 12- brønnersbrett (MaTek og Costar®), og 25 cm² Biocoat® celleflasker. 12- og 96-brønnersbrett som ikke var ferdigcoated ble tildekt med ekstracellulær matriks (ECM). Brett og flasker ble så inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.2 Proliferasjon og differensiering til myotuber

Etter 24 timer ble utsåingsmediet byttet til proliferasjonsmedium (appendiks 1.2). Proliferasjonsmediet ble skiftet hver 2.-3. dag inntil 70-80 % konfluens, da ble proliferasjonsmediet byttet ut med differensieringsmedium (appendiks 1.3). Differensieringsmedium ble skiftet hver 2.-3. dag inntil forsøksdagen som enten var dag 7 eller dag 8 etter start av differensiering. De siste 24 timene av differensieringstiden ble ulike fettsyrer, både umerkede ”kalde”, radioaktive ”varme” og kontroll tilsatt cellene løst i differensieringsmediumet.

2.4 Substrat-oksidasjonsmetoden

Substrat-oksidasjonsmetoden er en metode for å måle opptak og oksidasjon av radiomerkede substrater, som for eksempel [1-¹⁴C]PA, [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]LA i humane myotuber (figur 2.1). Metoden er utarbeidet av Wensaas et al [74]. Cellene vil håndtere de kalde og de varme fettsyrene likt. Fettsyrene PA, OA og LA spaltes til acetyl-CoA via β-oksidasjon. [1-¹⁴C]acetyl-CoA går videre til Krebs sykklus hvor det skjer fullstendig oksidasjon, det vil da dannes 2 molekyler [1-¹⁴C]CO₂ (g) som diffunderer til filteret fuktet med NaOH, og det vil bli dannet [1-¹⁴C]HCO₃⁻ (aq). Dette vil foregå kontinuerlig og mengden kan kvantifiseres ved hjelp av tellevesken OptiPhase Supermix® og β-scintillasjonstelleren Microbeta Plus®. Det vil etter endt inkubering være igjen en del [1-¹⁴C]fettsyre (FA) i cellene som vil være et mål

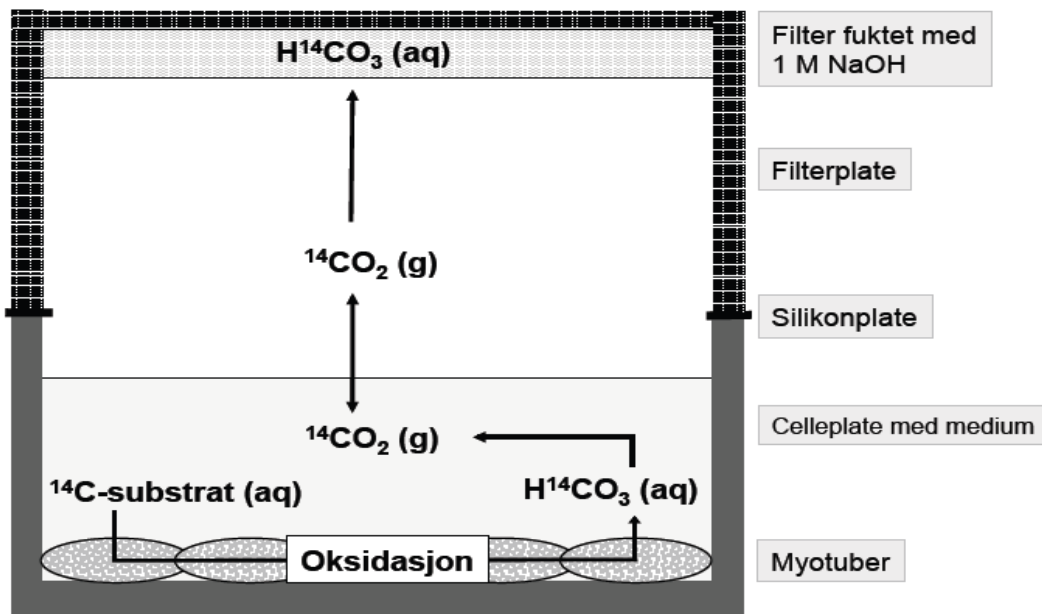
på celleassosiert fettsyre. Noe av fettsyrene blir ikke fullstendig oksidert til CO_2 , men de gjennomgår β -oksidasjon. Disse metabolittene vil gjenfinnes som syreløselige metabolitter (ASM) i mediet.

2.4.1 Radioaktive isotoper

Følgende isotoper ble brukt:

- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ oljesyre ($0,5 \mu\text{Ci/ml}$, $8,59 \mu\text{M}$ eller $0,291 \mu\text{Ci/ml}$, $5 \mu\text{M}$)
- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ palmitinsyre ($0,5 \mu\text{Ci/ml}$, $8,33 \mu\text{M}$ eller $0,3 \mu\text{Ci/ml}$, $5 \mu\text{M}$)
- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ linolsyre ($0,5 \mu\text{Ci/ml}$, $8,93 \mu\text{M}$ eller $0,28 \mu\text{Ci/ml}$, $5 \mu\text{M}$)

Den endelige fettsyrekonsentrasjonen i forsøksmediet var ca. $5 \mu\text{M}$ $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ FA eller $100 \mu\text{M}$ som tilsvarer ca. $8,5 \mu\text{M}$ $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ FA + ca. $91,5 \mu\text{M}$ FA.



Figur 2.1: Prinsipp for substrat-oksidasjonsmetoden. Radioaktive fettsyrer vil som andre fettsyrer tas opp i cellene for oksidasjon. CO_2 blir fanget i filteret, og radioaktiviteten kan kvantiteres. Modifisert fra [74].

2.4.2 Substrat-oksidasjonsforsøk med fettsyrer

Førsøkene følger metoden til Wensaas et al [74]. Celler ble sådd ut i 96-brønnerbrett som tidligere beskrevet. På dag 6-7 av differensieringstiden ble det tilsatt $0,5 \mu\text{Ci/ml}$, $100 \mu\text{M}$ $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ FA, eller $100 \mu\text{M}$ kald fettsyre til differensieringsmediet (appendiks 2.1). Etter 24 timers inkubering ble cellene vasket med PBS-buffer pH 7,4 (appendiks 2.6) og tilsatt $50 \mu\text{l}$ akuttmedier; kalde fettsyrer, ca. $0,29 \mu\text{Ci/ml}$ $5 \mu\text{M}$ eller $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ $100 \mu\text{M}$ fettsyrer (appendiks 2.2), med og uten glukose tilstede. En 96-brønners filterplate (Unifilter[®]-96

GF/B[®]) ble fuktet med 20 µl 1 M NaOH til hver brønn. Deretter ble det lagt en sandwich av celleplate, silikonplate og filterplate som ble gjort lufttett ved å bli lagt i en CO₂-trapper (figur 2.1). Sandwichen ble så inkubert i 4 timer ved 37 °C, 5 % CO₂. Etter 4 timer ble sandwichen tatt fra hverandre og filterplaten ble tilsatt 40 µl OptiPhase Supermix[®] tellevæske og forseglet med TopSeal[®]-A. Etter 2-3 døgn ble radioaktiviteten ("desintegrasjoner per minutt") i filterplaten målt ved hjelp av β-scintillasjonstelleren Microbeta Plus[®]. For å kunne si noe om hvor mye som hadde gjennomgått β-oksidasjon ble det etter 4 timer inkubering overført 30 µl fra hver brønn til "ASM-plate" nunc[™], platen ble deretter fryst ned. Celleplaten ble vasket med 2 x 150 µl PBS før cellene ble lysert med 200 µl 0,1 M NaOH og satt i fryseren.

2.4.3 Celleassosiert radioaktivitet

For å måle celleassosiert (CA) radioaktivitet ble lysatet tint, og 50 µl fra hver brønn ble overført til 96-brønners Isoplate[®]. Hver brønn ble så tilsatt 100 µl OptiPhase Supermix[®] og forseglet med TopSeal[®]-A. Etter 2-3 timer ble radioaktiviteten målt ved hjelp av Microbeta Plus[®]. Kontrolltelling av radioaktivitet i mediene ble gjort ved å ta ut 50 µl fra mediene og overføre til 96-brønners Isoplate[®]. Videre ble brettet håndtert som 96-brønners Isoplate[®] med lysat.

2.4.4 Syreløselig metabolitter

Måling av syreløselige metabolitter (ASM) ble gjort etter en metode modifisert fra Skrede et al [75]. ASM-brettet ble tint og hver brønn ble tilsatt 10 µl 6 % BSA og 100 µl perklorsyre (PCA). Brettet ble så sentrifugert ved 2000 rpm i 10 min. Fra hver brønn ble 30 µl supernatant overført til 96-brønners Isoplate[®] og tilsatt 150 µl OptiPhase Supermix[®] og forseglet med TopSeal[®]-A. Etter henstand minst 1 time ble radioaktiviteten målt ved hjelp av Microbeta Plus[®].

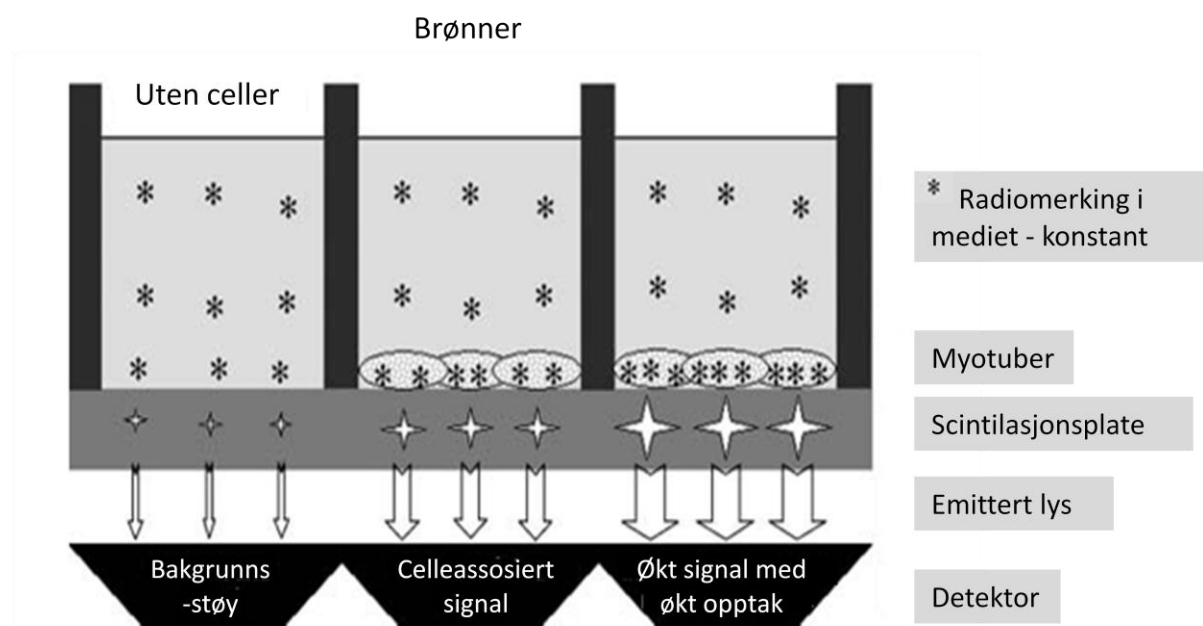
2.4.5 Proteinmåling

Måling av protein er basert på metoden til Bradford [76]. Det er en spektrofotometrisk metode som baserer seg på at Coomassie Brilliant Blå G-250 skifter farge fra rød til blå når stoffet reagerer med basiske og aromatiske aminosyrer i et surt miljø. Binding av fargen til ukjent proteinkonsentrasjon sammenlignes med bindingen av fargen til standardrekken av proteiner. Måling av protein ble gjort på cellehomogenat. 50 µl ble overført til 96-brønners mikrotiterplate sammen med 2 x 50 µl proteinstandarder. Standardene besto av BSA (0, 10,

20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$) løst i 0,1 M NaOH. Hver brønn ble tilsatt 200 μl Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate fortynnet 1:5 i dH_2O . Mikrotiterplaten ble så satt inn i Wallac Victor™ og absorbansen til prøvene ble målt ved 595 nm. Ved hjelp av standardkurven ble de ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene beregnet.

2.5 Scintillation proximity assay (SPA)

Metoden er utarbeidet av Wensaas et al [74]. Hensikten med scintillation proximity assay (SPA) metoden er at man kan måle akkumulering og frigjøring av radioaktivt merkede substrater ved ulike tidspunkter uten at cellene må høstes. Cellebrettet har en scintillator inkorporert i bunnen. $[1-^{14}\text{C}]$ FA vil tas opp i cellen, og siden $[1-^{14}\text{C}]$ FA tatt opp i cellen vil være nærmere scintillatoren enn $[1-^{14}\text{C}]$ FA løst i mediet vil de gi et sterkere signal (figur 2.2). Man kan slik måle på akkumulering i cellene (økt signal) og lipolyse (redusert signal). Mediet som brukes må være fargeløst, det vil si uten fenolrødt som brukes som en pH-indikator i cellemedium (appendiks 1.4).



Figur 2.2: Prinsipper for scintillation proximity assay (SPA). Radioaktivitet som er nærmest detektoren gir et sterkere signal, slik kan man se hvor mye som blir tatt opp i cellen, og hvor mye som forsvinner. Modifisert fra [74].

2.5.1 Scintillation proximity assay forsøk

Celler ble sådd ut i 96-brønners Cytostar-T™ scintiplatebrett med en celletetthet på ca. 6000 celler per brønn. For at cellene skulle feste seg til bunnen av brønnene måtte brønnene tildekkes med ekstracellulær matrix (ECM) gel løsning. På dag 7 etter differensiering ble

differensieringsmediet byttet ut med 100 μl fargeløst differensieringsmedium (appendiks 1.4) med PA, OA, LA eller EPA tilsatt spormengder (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, ca. 8,5 μM) [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA eller [$1\text{-}^{14}\text{C}$]PA til totalt 100 μM fettsyre (appendiks 2.1). Brettet ble deretter satt i Microbeta Plus[®] for første telling. Brettet ble så telt etter 1, 2, 4, 6, 8, 10 og 24 timer. Hver telling tok ca. 10 min. og brettet sto til inkubering ved 37 °C, 5 % CO₂ mellom tellingene. Etter 24 timer ble 30 μl tatt av til måling av ASM, og cellene ble vasket med 2 x 150 μl PBS før de ble tilsatt akuttmedier, 50 μl til hver brønn med 0,5 eller 5 % BSA, og med og uten triacsin C for å se på reforestring av fettsyrene (appendiks 2.3). Brettet ble telt i Microbeta Plus[®] etter 0, 1, 2, 4, 6 timer, og sto til inkubering ved 37 °C, 5 % CO₂ mellom tellingene. Etter 6 timer ble igjen 30 μl tatt av til ASM. Cellene ble vasket med 2 x 150 μl PBS og lysert i 0,1 M NaOH. Lyserte celler og prøver til ASM ble fryst ned. Celleassosiert, protein og ASM ble målt som tidligere beskrevet.

2.6 Lipolyse ved tilsetning av ulike stoffer i ulike konsentrasjoner

Hensikten var å se hvordan ulike konsentrasjoner av frikobleren karbonylcyanide-p-trifluormetolsyfenylhydrazon (FCCP) og lipolysestimulatoren forskolin med reforestringshemmeren triacsin C ville påvirke lipolysen. Celler ble sådd ut som til substratoksideringsforsøk. På dag 6-7 ble cellene tilsatt 100 μl 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ 100 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA eller [$1\text{-}^{14}\text{C}$]PA i differensieringsmediet (appendiks 2.1). Etter 24 timer ble cellebrettet vasket med 2 x 150 μl PBS og tilsatt 60 μl akuttmedier. Disse inneholdt ulike konsentrasjoner av FCCP (0, 0,5, 1 og 5 μM) \pm 5,5 mM glukose, og 10 μM forskolin \pm 10 μM triacsin C (appendiks 2.4 og 2.5). Brettet ble satt til inkubering ved 37 °C, 5 % CO₂. Etter 6 timer ble 30 μl overført til 96-brønners Isoplate[®] for telling, tilsatt 100 μl OptiPhase Supermix[®] og forseglet med TopSeal[®]-A. Etter 2-3 timer ble radioaktiviteten målt ved hjelp av Microbeta Plus[®]. Cellene ble vasket med 2 x 150 μl PBS og lysert i 0,1M NaOH. Celleassosiert og protein ble målt som tidligere beskrevet.

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

Det ble gjort en RT-real-time PCR for å se hvordan genekspresjonen til gen som er knyttet til fettsyremetabolisme ble påvirket av 24 timers forbehandling med fettsyre eller BSA, som i

dette tilfelle var fettsyrefri kontroll. Valg av gener ble gjort ut fra microarray [22]. Det ble sådd ut celler i 25 cm² store Biocoat[®] flasker med ca. 300 000 celler per flaske fordelt i et volum på 3 ml. Cellene ble på differensieringsdag 6-7 tilsatt differensieringsmedium med 100 µM OA eller PA, eller 40 µM BSA (appendiks 2.1) i 24 timer før høsting. Høsting ble gjort ved å vaske cellene to ganger med 2 ml PBS i DEPC-dH₂O, og tilsatt 300 µl lysisbuffer fra Agilent Technologies. Cellene ble skrapet løs fra flaskene og lysatet ble overført til autoklaverte eppendorfrør og fryst ned ved -70 °C.

2.7.1 Isolering og kvantifisering

Isolering av totalt RNA ble gjort i henhold til protokoll fra Agilent Technologies[®]; ”Agilent Total RNA Isolation Protocol Mamalian RNA Isolation”. Alt arbeid med RNA ble utført med hansker og sterilt utstyr for å hindre RNase kontaminering. Prøvene ble tint på vannbad ved 37 °C i 15-20 min. Det ble benyttet et kit med minikolonner, vaskeløsninger og nukleasefritt vann designet til formålet. Alt homogenat fra hver prøve ble overført til hver sin minifiltreringskolonne og sentrifugert i Heraeus Fresco 21 i 3 min. ved 16 000 g for å få bort større cellefraksjoner. Lik mengde 70 % etanol ble tilsatt filtratet. Løsningen ble inkubert i 5 min. før 600 µl av løsningen ble overført til en mini-isolasjonskolonne og sentrifugert i 30 sek. ved 16 000 g. Filtratet ble kastet og filteret ble satt tilbake i samme mini-isolasjonskolonne. 500 µl vaskeløsning (som tidligere er tilsatt etanol) ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i 30 sek. ved 16 000 g, filtratet ble kastet før vaskingen ble gjentatt en gang. Den tomme kolonnen ble så sentrifugert i 2 min. ved 16 000 g før filteret ble satt i et nytt eppendorfrør og RNA ble eluert ut av kolonnen av 20 µl nukleasefritt vann, dette sto i 1 min. før det ble sentrifugert i 1 min. ved 16 000 g. Filteret ble kastet, RNA løst i vann ble fryst ned ved -70 °C. For å kvantifisere mengde RNA i prøvene ble det utført en OD-måling (optisk tetthet) ved hjelp av Qubit[™] fluorometer. Prøvene ble tint, Quant-iT reagent ble fortynnet 1:200 i Quant-iT buffer, 10 µl av standard fra kittet ble tilsatt 190 µl av fortynnet reagent. 2 µl fra hver prøve ble tilsatt 198 µl fortynnet reagent. Eppendorfrør med standarder ble først lest av i Qubit før man leste av prøvene og multipliserte opp med fortynningsfaktoren for å få konsentrasjonen i originalprøven.

2.7.2 cDNA syntese

Det ble overført prøve til mini-eppendorfrør for å oppnå 2 µg RNA. Mini-eppendorfrørene (MicroAmp[®]) med RNA ble tilsatt reaksjonsmiks for komplementær DNA (cDNA) syntese (appendiks 3.1). Prøvene ble satt i synteseapparatet Thermal Cycler 2720 Perkin-Elmer hvor

de først hadde 25 °C i 10 min. (hexamer / templat priming), 37 °C i 80 min. (revers transkriptase) og til slutt 99 °C i 5 min. (revers transkriptase inaktivering).

2.7.3 Real-time PCR

Det ble lagd en standardrekke ved å blande like mengder cDNA fra de ulike prøvene til en cDNA miks. Denne ble fortynnet 1:10 i DEPC-dH₂O for å få standard 1000. Fortynnet standard ble deretter fortynnet 1:2 i DEPC-dH₂O til standard 500, og videre til 250 og 125. Prøvene ble også fortynnet 1:10 i DEPC-dH₂O. Det ble lagd en reaksjonsmiks bestående av 2 x SYBR Green Master mix, forward primer, revers primer og DEPC-dH₂O (appendiks 3.2). 22,5 µl reaksjonsmiks ble tilsatt alle brønnene i MicroAmp[®] Optical Reaction Plate før 2,5 µl av fortynnete standarder og prøver ble tilsatt. Platen ble forseglet med gjennomsiktig plastfilm (Optical Adhesive Covers). Platen ble plassert i ABI PRISM 7000 Applied Biosystems, prøvene gjennomgikk der 40 sykluser, hvor hver syklus besto av en denatureringsfase (95 °C i 15 sekunder), hvor DNA-tråden ble separert og en hybridiseringsfase (60 °C i 60 sekunder), hvor primeren festet seg til den komplementære sekvensen til målgenets DNA. DNAet vil amplifiseres eksponensielt. SYBR Green Master mix binder seg til dobbeltrådet DNA og er fluoriserende. Etter ca. 20-25 sykluser vil mengden DNA ha nådd minste detekterbare grense, Ct, og fluoresensen kan detekteres. Ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®] ble det beregnet en standardkurve ut fra standardrekken. Det ble i slutten av hver syklus målt for fluoresens. Etter hvilken syklus mengden var detekterbar i blir n i ligningen 2ⁿ beregnet. Man kan slik kvantifisere genuttrykket relativt. For å korrigere for tilfeldige ulikheter i prøvene ble det brukt to ulike endogene kontroller.

I de tilfellene hvor man måtte designe en primer ble det gjort ved hjelp av Primer Express fra Applied Biosystems. Man designet primeren ut fra antall hydrogenbindinger og renhet. Man prøvde å unngå G-C bindinger siden de har 3 hydrogenbindinger. Dette er viktig for å hindre dannelsen av en primer dimer. Primer ble bestilt fra Invitrogen, løst i DEPC-dH₂O til 300 µM. Denne stock-løsningen ble fortynnet 1:10 i DEPC-dH₂O til bruksløsning. Primerne ble testet ved å lage en standardrekke (cDNA-mix fortynnet 1:5 til standard 1000, så 1:2 til 500, 250 og 125) man så da på dissosiasjonskurven og standardkurven for å si noe om primeren fungerte slik den skulle.

Gener	Gen bank nr.	Primere
SCD – 1	NM_005063	F: 5'-GAGTACCGCATCAAC-3' R: 5'-AGGCGGCCTTGGAGACT-3'
FADS2	NM_004265.2	F: 5'-CCCGGCCTGGCTTCAC-3' R: 5'-TGTAACAAAGCAGGCCTCTCTATG-3'
Perilipin 2	NM_001122	F: 5'-GGTGATGGCAGGCGCAT-3' R: 5'-TAGAAGTGAGGAGGCTGTCAGACA-3'
Perilipin 3	NM001164189.1	F: 5'-CACTCGCTGGGCAAGCTT-3' R: 5'-CTTGACAGTTTCCATCAGGCTTAG-3'
GAPDH	J04038/M33197	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
36 B4	M17885	F: 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R: 5'-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'

Tabell 2.2: Primere brukt ved RT-real-time PCR. Steaoryl CoA-desaturase 1 (SCD-1), fettsyredesaturase 2 (FADS2), glyseraldehyd 3 fosfatdehydrogenase (GAPDH), "Human acidic ribosomal phosphoprotein PO" (36B4)

2.8 Immunblotting

Immunblotting eller westernblott er en metode brukt til å detektere proteiner på en membran ved hjelp av antistoff. Celleprøver blir satt på en polyakrylamidgel for separasjon. Metoden baserer seg på separasjon av proteiner i et elektrisk felt på bakgrunn av molekylstørrelse.

2.8.1 Utsåing og høsting av celler

Cellene ble sådd ut i 25 cm² store Biocoat[®] flasker med ca. 300 000 celler per flaske fordelt i et volum på 3 ml. Cellene ble på dag 6-7 av differensieringstiden tilsatt differensieringsmedium tilsatt 100 µM OA, PA eller 40 µM BSA i 24 timer før høsting (appendiks 2.1). Høsting ble gjort ved å vaske cellene to ganger med 2 ml PBS, tilsette 200 µl sample buffer (appendiks 4.1) og skrape løs cellene. Cellesuspensjonen ble overført til rør som tåler koking og kokt i 5 minutter. 25 µl fra hver prøve ble overført til eppendorfrør for proteinmåling. Deretter ble det tilsatt 10 % beta-mercaptoetanol (20 µl) for å redusere

disulfidbindingene og 5 % bromfenolblått (10 µl) før prøvene igjen ble kokt i 5 minutter og fryst ned ved -20 °C. Proteinprøvene ble også fryst ned ved -20 °C.

2.8.2 Proteinmåling

Proteinmåling ble gjort ved hjelp av Pierce BCA protein assay reagent, nr. 23225. Prøvene ble fortynnet 1:7 i dH₂O. Standardløsningene ble lagd ut fra BSA 2 mg/ml løst i sample buffer og videre fortynnet 1:7 i dH₂O. Kittet består av A: Bicinchoninic acid, B: 4 % CuSO₄, disse blandes 50 deler A + 1 del B og utgjør reagens. 5 µl prøve ble tilsatt 30 µl dH₂O (1:7 fortynning) og 0,7 ml reagens, 35 µl (1:7 fortynning) standardløsning ble tilsatt 0,7 ml reagens før de ble inkubert 30 minutter ved 60 °C. Prøvene og standardene ble avkjølt før 300 µl x 2 ble overført til en mikrotiterplate, satt i Wallac Victor™ og absorbansen til prøvene ble målt ved 595 nm. Ved hjelp av standardkurven ble de ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene beregnet.

2.8.3 Støping av gel

Det ble støpt en 12 % polyakrylamidgel (appendiks 4.2), separasjonsgel. Prosenten sier noe om hvor store porene er. Det ble tilsatt 200 µl isobutanol på toppen av hver gel for å jevne ut gelen og hindre luft i å bremse polymeriseringsprosessen. Gelen ble polymerisert i ca. 30-45 minutter før isobutanolen ble tømt av, og rester fjernet ved hjelp av filterpapir. Formene ble fylt opp med 4 % stackinggel (appendiks 4.3) og kammen ble satt på plass for å lage brønner. Etter ca. 30 min var gelen polymerisert. Gelplatene ble lagt i fuktet papir pakket inn i plast i kjøleskap til neste dag.

2.8.4 Elektroforese

Hensikten er å separere proteiner med ulik molekylstørrelse ved hjelp av et elektrisk felt. Gelen retarderer store molekyler mer enn små. Under prøveopparbeidelsen er det tilsatt natrium dodecyl sulfat (SDS). Det er gjort for å bli kvitt sekundær og tertiær proteinstruktur, i tillegg vil SDS gjøre proteinet negativt slik at proteinet går mot positiv pol under elektroforesen.

Gelplatene ble skylt i dH₂O, kammen ble fjernet og brønnene ble vasket forsiktig med dH₂O for å fjerne gelrester. Gelplatene ble satt i elektroforeseholder og elektroforesebuffer (appendiks 4.4) tilsatt til merket nivå. Det ble satt på 5 µl standard Bio-Rad Precision Protein™ Standards Dual Color) i ytterste brønn. Denne inneholder protein med kjente

molekylvekter for å kunne si om hvilken molekylvekt vårt protein detekteres ved. Prøvene ble applisert med et mål om lik mengde protein i hver brønn, dette var da regnet ut på forhånd. I noen tilfeller ble det satt på en positiv kontroll i tillegg for å kunne si noe om metoden fungerte for det bestemte antistoffet. Elektroforesen ble drevet av en elektroforese power supply på 120 – 200 V i 45 min – 1 time og 15 min.

2.8.5 Blotting

Proteinene på gelen ble overført til en nitrocellulosemembran, membranen vil sterkt og uspesifikt binde proteinene som finnes på gelen, og proteinene vil bli tilgjengelig for senere antistoffbinding. Geler, membraner og filterpapir ble fuktet i blottebuffer (appendiks 4.5) i minst 30 minutter før det ble lagd en sandwich etter Hoefers metode med halvtørr blotting. Overføringen skjedde ved hjelp av blottingmaskinen TE 70 ECL Semi-Dry Transfer unit 32 mA per gel i en time.

2.8.6 Deteksjon

Membranen ble overført til et sentrifugerør og tilsatt 5 % tørrmelk (appendiks 4.6), dette sto på rulle i 1 time for at proteinene i tørrmelken skulle blokkere for uspesifikke bindinger mellom antistoff og membran. Primært antistoff ble fortynnet i 2,5 % tørrmelk (appendiks 4.8), tilsatt membranen og inkubert på rulle over natt ved 4 °C. Primært antistoff ble tatt vare på, og membranen ble vasket med t-TBS (appendiks 4.7). Sekundært antistoff som er merket med pepperrot peroksidase (HRP) ble fortynnet og inkubert på rulle i romtemperatur i 1 time. Sekundært antistoff må være mot kilden hvor det primære antistoffet er lagd.

Membranen ble vasket i t-TBS før den ble lagt i ”enhanced chemiluminescence” reagens (ECL) løsning i 1 min. Det vil nå skje en reaksjon mellom HRP og ECL som vil resultere i luminisens relatert til proteinmengden. Lyset ble detektert ved at membranen ble pakket inn i plast og lagt i filmbok med fotografisk film for fremkalling i 5 – 30 min. Etter fremkalling ble filmen først lagt i fremkallingsvæske, så i vann før den til slutt ble lagt i fix og hengt opp til tørk.

2.8.7 Stripping

I noen tilfeller var det ønskelig å kunne si noe om hvor mye protein som faktisk ble satt på i hver brønn. For å gjøre dette ble membranen strippet for primært antistoff ved Restore™ Western Blot Stripping Buffer, membranen ble så vasket i 5 % tørrmelk før den ble tilsatt

nytt primært antistoff, som i dette tilfellet var α -tubulin, etter at antistoffet ble tilsatt ble membranen inkubert på rulle over natt ved 4 °C. Prosedyren videre var som for deteksjon.

2.8.8 Kvantifisering

Båndene ble kvantifisert ved hjelp av dataprogrammet GeneTools fra Syn Geens. Filmen ble skannet inn, og aktuelt område med blott ble valgt ut. Lysintensiteten til båndene ble i programmet gitt en verdi relativ til hverandre.

2.9 Separering av lipider ved tynnsjikt-kromatografi (TLC)

2.9.1 Utsåing av celler

Celler ble sådd ut i 12-brønnersbrett med 75 000 celler per brønn fordelt i 1 ml medium. For at cellene skulle feste seg til brønnene ble brønnene dekket med ECM gel løsning. De siste 24 timene av differerinstiden (dag 6-7) ble differensieringsmediet tilsatt 1 ml 0,5 μ Ci/ml, 100 μ M [1 - 14 C]OA eller [1 - 14 C]PA (appendiks 2.1). Halvparten av brønnene skulle gjennomgå lipolyse, de ble etter 24 timer med fettsyre-behandling vasket med PBS og tilsatt 500 μ l DPBS med eller uten triacsin C for å kunne si noe om reforestring. Brettet ble så inkubert ved 37 °C, 5 % CO₂ i 6 timer. Hver brønn i cellebrettet ble vasket med 2 x 1 ml PBS før cellene ble lysert i 250 μ l dH₂O og fryst ned ved -20 °C. Lysatet ble tint, og cellene skrapet løs fra brønnene og overført til glassrør. For å få med cellerester ble hver brønn skylt med 150 μ l dH₂O og overført til glassrørene. Glassrørene ble satt på ultralydbad i 10 minutter for homogenisering. 10 μ l ble tatt av for å måle protein.

2.9.2 Folch ekstraksjon

Lysatet ble ekstrahert etter Folchs prosedyre [77]. Hvert glassrør ble tilsatt 8 ml kloroform:metanol (2:1) og ble inkubert i romtemperatur i minimum 30 min. 1,6 ml 0,9 % NaCl-buffer (pH 2) ble så tilsatt. Den øvre delen med metanol-vannfase og proteinsjiktet ble forsiktig sugd av før kloroformfasen ble dampet av ved hjelp av nitrogen. Når alt var dampet inn ble prøvene reløst i 150 μ l hexan.

2.9.3 Tynnsjikt-kromatografi

Hver prøve ble applisert i en tynn stripe nederst på tynnsjiktplaten. Det ble så påført standarder fra ulike lipidgrupper; DAG, frie fettsyrer og TAG. Tynnsjiktplaten ble så satt i

et lukket kammer med upolart løpemiddel (heksan: eter: isedikk, 65: 35: 1). Når løpemiddelfronten hadde nådd toppen ble lipidene på kromatogrammet fremkalt ved å sette tynnsjiktplaten i et jod-kammer. Jod binder seg til de umettede bindingene og lipidene farges gule. De ulike lipidkomponentene i prøven blir separert etter hvor godt de adsorberes til tynnsjiktplaten (stasjonærfase) og hvor løselige de er i løpemiddelet (mobilfasen). Jodflekkene ble identifisert ved hjelp av standarden. Båndene til hver lipidgruppe ble klipt i tynne strimler før de ble overført til telleglassene miniature polyethylene vials 6 ml Perkin Elmer®. Telleglassene ble tilsatt 3 ml Ecosint™ A telleveske før de ble satt til telling i Packard 1900 TR liquid scintillation analyzer. 2 x 50 µl av forsøksmediene ble overført til telleglass og tilsatt 3 ml tellevæske og telt for å beregne dpm.

2.10 Fotografering av lipiddråper (LD)

Cellene ble sådd ut i 12-brønnersbrett med glassbunn (MaTek) med ca. 50 000 celler per brønn fordelt i et volum på 1 ml. Brettene måtte dekkes med ECM gelløsning. Cellene ble proliferert og differensiert som nevnt tidligere. På dag 6 etter differensiering ble cellene tilsatt 100 µM OA ± 10 µM triacsin C. Etter 24 timers inkubering med fettsyre ble cellene inkubert med Bodipy 493/503 (2 µg/ml) i 5 min. for å farge lipiddråpene, MitoTracker®Red FM i 15. min for å farge mitokondrier og Hoechst 33258 (2,5 µg/ml) i 15 min. for å farge kjernene. Bildene ble tatt med Olympus Scan^R platform utstyrt med temperatur- og CO₂-kontroll som beskrevet i Hessvik et al [22]. Det ble brukt et 20 X objektiv, og det ble tatt 25 bilder i hver brønn.

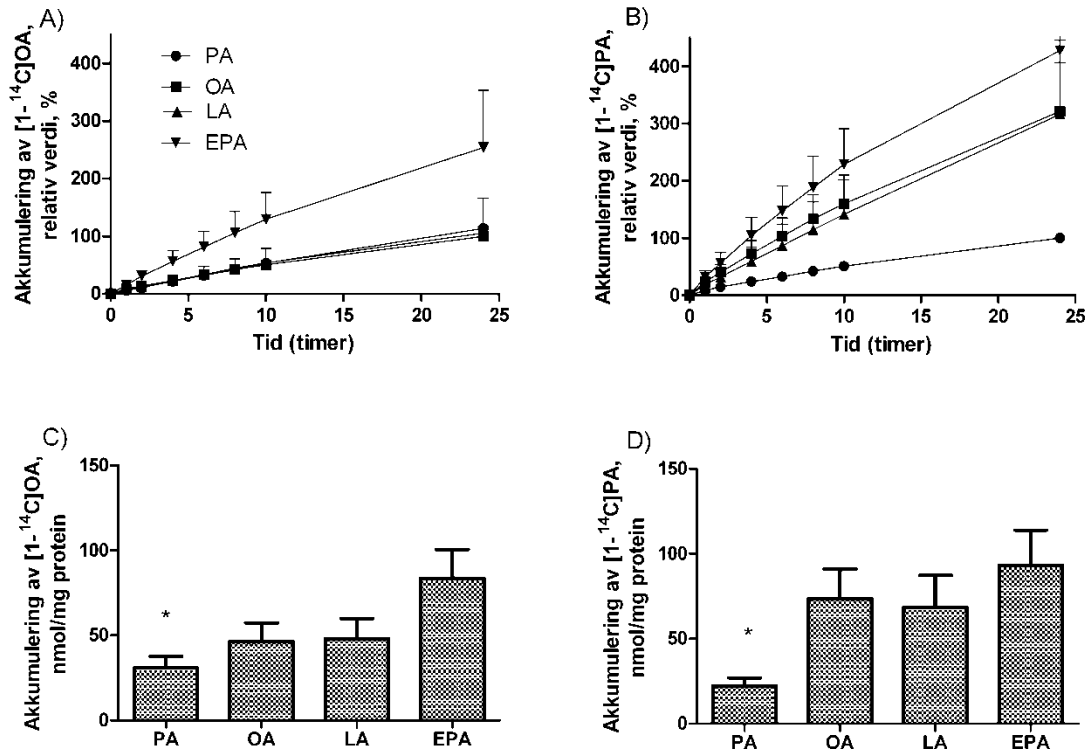
2.11 Statistiske analyser

Alle dataene presenteres som gjennomsnitt ± standardfeil (SEM). Gjennomsnitt per forsøk er regnet ut fra 3-8 paralleller. SEM er regnet ut fra antall forsøk som er utført, antall forsøk angis som n og er fra 1- 6. Det er benyttet en tosidig enutvalg t-test hvor det var tilstrekkelig å sammenligne to ting. Hvor det var behov for mer avansert statistikk ble dataprogrammet SPSS og lineær blandet modell benyttet. $p \leq 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

3. Resultater

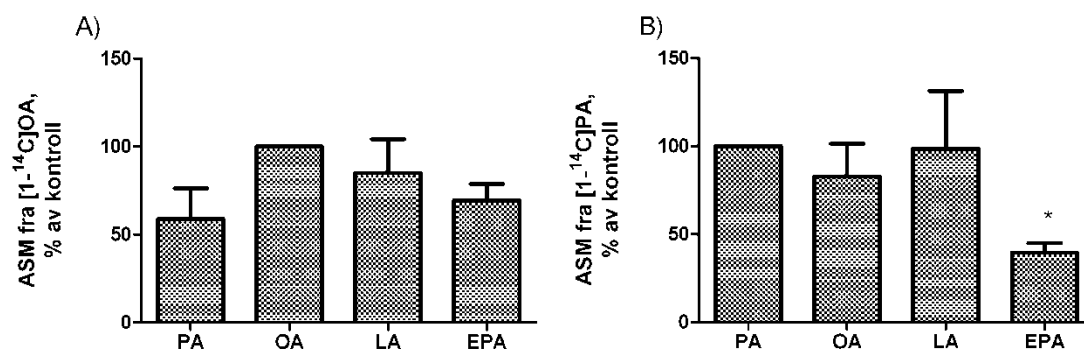
3.1 Effekter av palmitinsyre, oljesyre, linolsyre og eikosapentaensyre på kronisk akkumulering og oksidasjon av radioaktiv oljesyre og palmitinsyre

Vi ønsket å undersøke om fettsyrer med ulik grad av metning og lengde påvirket akkumulering og β -oksidasjon av en mettet fettsyre, palmitinsyre (PA) og en enumettet fettsyre, oljesyre (OA). Myotubene ble inkubert i 24 timer med PA, OA, linolsyre (LA) eller eikoasapentaensyre (EPA) tilsatt spormengder (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, ca. 8,9 μM) av $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ eller $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ til totalt 100 μM fettsyre. Akkumuleringen av $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ og $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ ble målt ved hjelp av "scintillation proximity assay" (SPA). Denne metoden tillater at man ser på akkumulering av radioaktiv fettsyre ved ulike tidspunkter uten å måtte høste cellene. EPA hadde en større relativ effekt på opptaket til $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ (figur 3.1 B) enn $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ (figur 3.1 A). EPA førte til en signifikant høyere akkumulering enn PA for både $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ og $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ (figur 3.1 C og D). Uavhengig av fettsyreblending var akkumuleringen etter 24 timer høyere for $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ enn for $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$.



Figur 3.1: Akkumuleringen av [1-¹⁴C]oljesyre (OA) og [1-¹⁴C]palmitinsyre (PA) etter 24 timers inkubering med PA, OA, linsyre (LA) eller eikosapentaensyre (EPA) tilsatt spormengder (0,5 μ Ci/ml, ca. 8,9 μ M) av [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C]PA til totalt 100 μ M fettsyre. Akkumuleringen av [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA ble målt ved gitte tider indikert på x-aksen. A) Effekt av PA, OA, LA og EPA på akkumuleringen av [1-¹⁴C]OA i myotuber. 24 timers punktene har en absoluttverdi på 30-310 nmol/mg protein. B) Effekt av PA, OA, LA og EPA på akkumuleringen av [1-¹⁴C]PA i myotuber. Absoluttverdi ved 24 timer er 30 – 410 nmol/mg protein. C) Effekt av PA, OA, LA og EPA på akkumuleringen av [1-¹⁴C]OA uavhengig av tid. D) Effekt av PA, OA, LA og EPA på akkumuleringen av [1-¹⁴C]PA uavhengig av tid. Analysene er gjort ved hjelp av LMM i SPSS (C og D). Alle data er illustrert som gjennomsnitt \pm SEM (n=3), *p \leq 0,05 mot EPA.

Etter endt akkumulering (24 timer) ble det målt syreløselige metabolitter (ASM) i forsøksmediet. Dette ble gjort for å se hvordan 24 timer med PA, OA, LA eller EPA tilsatt spormengder (0,5 μ Ci/ml, ca. 8,9 μ M) av [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C]PA til totalt 100 μ M fettsyre påvirket β -oksidasjonen til henholdsvis [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA. PA, LA, og EPA førte alle til lavere ASM-dannelse av [1-¹⁴C]OA enn OA selv (Figur 3.2 A). Det var et lignende mønster for [1-¹⁴C]PA; OA og EPA ga en lavere ASM-dannelse enn PA selv, hvor EPA ga signifikant lavere ASM-verdi enn PA. Det var for stor spredning i forsøkene til å si noe om effekten av LA på ASM-dannelsen av [1-¹⁴C]PA i forhold til PA selv (Figur 3.2 B).

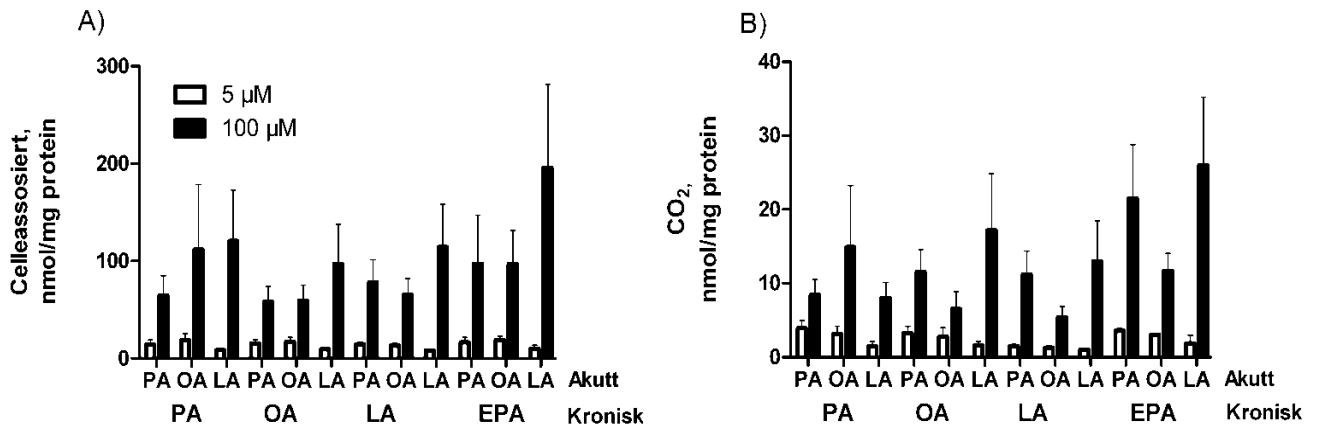


Figur 3.2: Syreløselige metabolitter (ASM) etter 24 timer med palmitinsyre (PA), oljesyre (OA), linolsyre (LA) eller eikosapentaensyre (EPA) tilsatt spormengder (0,5 µCi/ml, ca. 8,9 µM) av [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C]PA til totalt 100 µM fettsyre. A) ASM som prosent av kontroll for [1-¹⁴C]OA. Absolutt verdi 14 - 36 nmol/mg protein. B) ASM som prosent av kontroll for [1-¹⁴C]PA. Absolutt verdi 7 - 37 nmol/mg protein. Data vises som gjennomsnitt ± SEM, n = 3. Analysene ble gjort ved to-sidig t-test, *p ≤ 0,05 mot PA.

3.2 Effekten av forbehandling med ulike fettsyrer på akutt akkumulering og oksidasjon av radioaktiv OA, PA og LA, og på myotubenes evne til å øke akutt fettsyreoksidasjon ved økt fettsyrekonentrasjon

Vi ønsket å se om forbehandling med fettsyrer i to ulike konsentrasjoner med ulik grad av metning og kjedelengde ville påvirke akutt akkumulering og CO₂-produksjon. Myotubene ble forbehandlet 24 timer med 100 µM PA, OA, LA eller EPA før de ble tilsatt ca. 0,29 µCi/ml, 5 µM eller 0,5 µCi/ml, 100 µM [1-¹⁴C]PA, [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C]LA. Myotubene ble inkubert med radioaktive fettsyrer i 4 timer for å samle CO₂. Cellene ble lysert og celleassosiert radioaktivitet kvantitert. For noen av forsøkene ble det også målt ASM akkumulert i mediet i løpet av 4 timers inkubering. Celleassosiert radioaktivitet (figur 3.3 A) og CO₂-produksjon (figur 3.3 B) var tydelig høyere for 100 µM fettsyre enn 5 µM fettsyre. Forbehandling med EPA økte både akkumulering og CO₂-produksjon sammenlignet med etter forbehandling med OA, PA og LA. Akutt tilsatt radioaktiv LA viste også en økning i både akkumulering og CO₂-produksjon sammenlignet med OA og PA (figur 3.3 A og B)

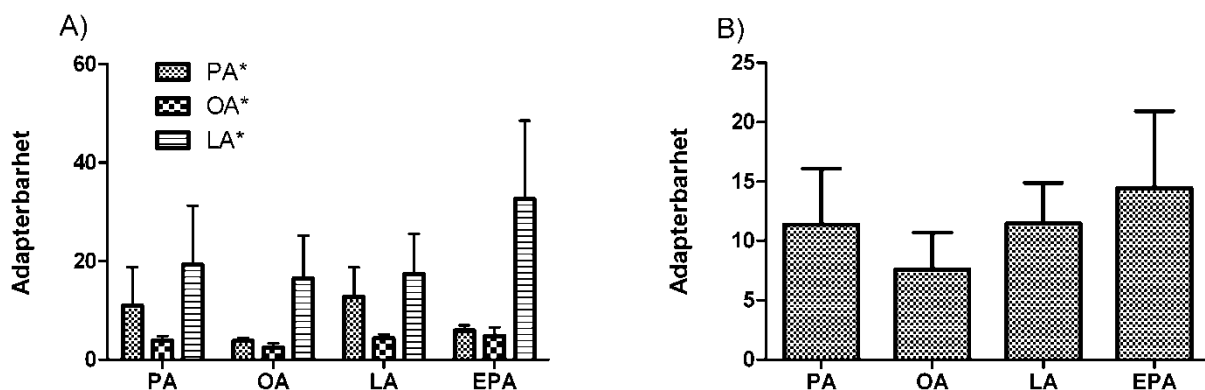
Det ble dannet veldig lite ASM fra myotuber behandlet med 5 µM fettsyre (3-15 nmol/mg protein), mens det for 100 µM var en høyere dannelse (9-160 nmol/mg protein) (data ikke vist). Forskjellen mellom de to konsentrasjonene var større for ASM enn for celleassosiert radioaktivitet og CO₂-produksjon. LA tilsatt akutt ga økt dannelse av ASM sammenlignet med OA og PA.



Figur 3.3: Effekter av ulike fettsyreforbehandlinger på myotuber tilsatt den samme eller en annen fettsyre akutt. Forbehandling av myotubene i 24 timer med 100 μM palmitinsyre (PA), oljesyre (OA), linolsyre (LA) eller eikosapentaensyre (EPA), og deretter 4 timer trapping med 5 eller 100 μM [¹⁴C]PA, [¹⁴C]OA eller [¹⁴C]LA. A) Celleassosiert radioaktivitet. B) Oksidasjon av fettsyrer, målt ved å samle CO₂. Data er angitt som gjennomsnitt ± SEM, n = 3 for forbehandling med EPA, n = 6 for forbehandling med de andre fettsyrene.

En parameter som kan beskrive myotubenes metabolske egenskaper er adapterbarhet.

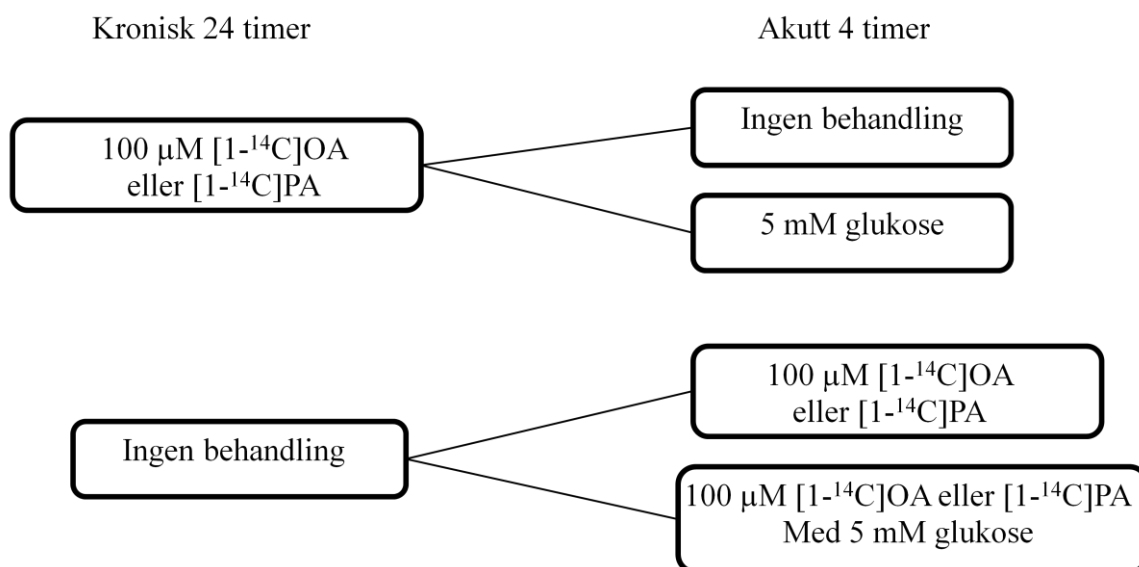
Adapterbarhet sier noe om myotubenes evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt fettsyretilgang [17]. Parameteren kan beregnes etter formelen: [oksidasjon av 100 μM fettsyre / oksidasjon av 5 μM fettsyre]. Akutt tilsatt [¹⁴C]LA viste en betydelig høyere adapterbarhet enn de andre fettsyrene, dette var uavhengig av fettsyreforbehandling (figur 3.4 A). Forbehandling med EPA, uavhengig av akutt fettsyre tilsatt viste en tendens til økt adapterbarhet sammenlignet med forbehandling med de andre fettsyrene (figur 3.4 B).



Figur 3.4: Adapterbarhet av [¹⁴C]palmitinsyre (PA), [¹⁴C]oljesyre (OA) eller [¹⁴C]linolsyre (LA) etter forbehandling med PA, OA, LA eller eikosapentaensyre (EPA). Adapterbarheten ble regnet ut fra formelen: [oksidasjon av 100 μM fettsyre / oksidasjon av 5 μM fettsyre]. A) X-aksen viser forbehandling mens de ulike skraveringene angir akutt tilsatt fettsyre. B) Adapterbarhet basert kun på forbehandling. Analysen er gjort ved hjelp av lineær mikset modell i SPSS. Data er angitt som gjennomsnitt ± SEM, n = 3 for forbehandling med EPA, n = 6 for forbehandling med de andre fettsyrene.

3.3 Effekter og forskjeller av kronisk og akutt eksponering for radioaktive fettsyrer på metabolismen i humane myotuber, og evnen glukose har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen

Forsøkene som vises i figur 3.1 – 3.4 indikerte at myotubene tok opp og oksiderte OA og PA på ulik måte. Vi ville undersøke dette nærmere, og i tillegg ville vi se hvordan fettsyrebehandling i 24 timer (kronisk) eller 4 timer (akutt) påvirket opptak og oksidasjon. Etter kronisk eksponering / forbehandling med radioaktiv fettsyre vil oksidasjonen som detekteres komme fra intracellulære lipider (ICL), mens det etter akutt eksponering for radioaktiv fettsyre vil være oksidasjon fra ekstracellulære lipider (ECL) som måles. Det var også ønskelig å se på hvordan glukose tilsatt akutt påvirket fettsyreoksidasjonen. Halvparten av cellekulturene ble forbehandlet i 24 timer med 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA. Etter 24 timer ble mediet skiftet til fettsyrefritt medium, og den andre halvparten av cellekulturene fikk 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA. Halvparten av cellekulturene i hver gruppe ble også tilsatt 5 mM glukose (Figur 3.5), og alle cellene ble inkubert i 4 timer mens CO_2 ble fanget opp. Etter 4 timer ble mediet tatt av for å måle ASM. Cellene ble så lysert, og den celleassosierte $[1-^{14}\text{C}]$ aktiviteten ble målt ved hjelp av væskescintillasjon.



Figur 3.5: Skjematisk oversikt over for- og akuttbehandling med fettsyrer. Oljesyre (OA), palmitinsyre (PA).

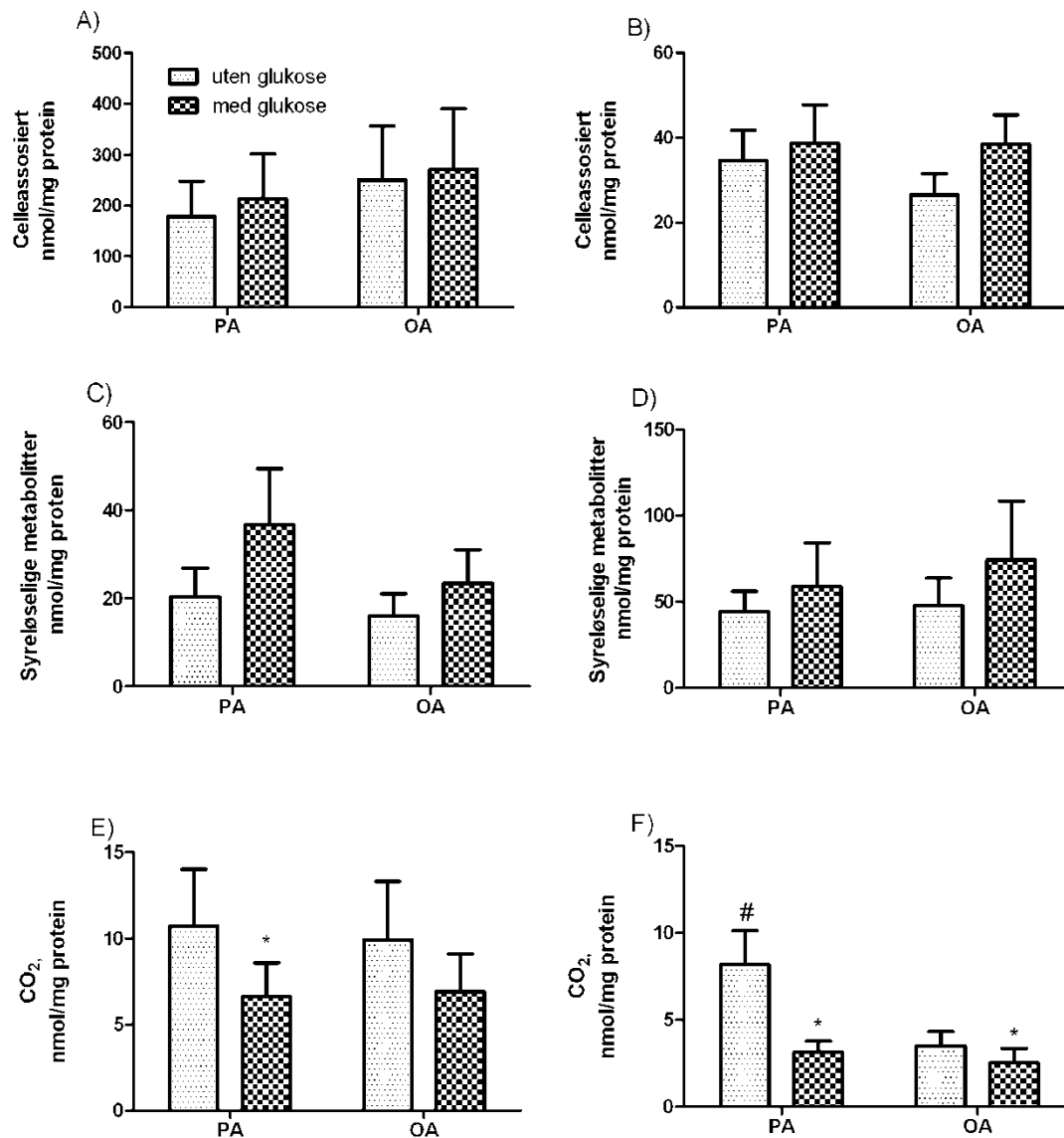
Som forventet ble det tatt opp mer radioaktivitet i cellene eksponert for fettsyre i 24 timer enn i de som kun hadde fettsyre tilgjengelig i 4 timer (Figur 3.6 A og 3.6 B). Etter 24 timers

forbehandling med $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ var det en tendens til økt celleassosiert radioaktivitet (CA) enn etter forbehandling med $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$, $p = 0,1$. Derimot var det etter 4 timer med fettsyre tendens til økt celleassosiert $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ i forhold til $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$, $p = 0,12$. Det var også en svak tendens til at de cellene som fikk glukose akkumulerte mer fettsyre enn de cellene som kun hadde fettsyrer som energikilde.

Det var tydelig en økt ASM-dannelse fra ekstracellulære lipider (figur 3.6 D) i forhold til fra intracellulære lipider (figur 3.6 C). Det var for både ICL og ECL økt ASM-dannelse med glukose tilstede. Forskjellen var størst for ICL, $p = 0,054$ for $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ og $0,074$ for $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$. For ICL hadde glukose en økt effekt på $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ i forhold til $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$, mens det for ECL var motsatt. Det ble også målt ASM-dannelse etter 24 timers forbehandling (data ikke vist), dette viste ingen forskjell mellom $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ og $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$.

CO_2 -produksjonen var høyere fra intracellulære enn fra ekstracellulære lipider (Figur 3.6 E og F). Det var i begge tilfeller en lavere CO_2 -produksjonen med glukose tilstede. Det var en signifikant nedgang i CO_2 -produksjonen fra PA med glukose tilstede både fra ICL og ECL. Glukose nedsatte også CO_2 -produksjonen fra ECL-OA signifikant. Forskjellen i CO_2 -produksjon mellom de to fettsyrene ble mindre når glukose var tilstede. PA førte til en signifikant høyere CO_2 -produksjon enn OA fra ECL (figur 3.6 F).

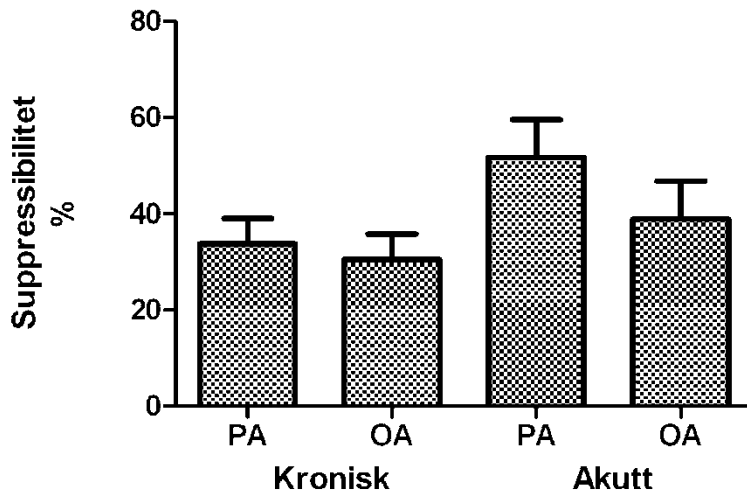
Hvis man så på fettsyre oksidert relatert til fettsyre tatt opp i myotubene (ratio $\text{CO}_2/(\text{CA} + \text{CO}_2)$) var den høyere for PA enn for OA (data ikke vist).



Figur 3.6: Myotubenes omsetning av oljesyre (OA) og palmitinsyre (PA) etter 24 eller 4 timer OA eller PA eksponering. Halvparten av cellene ble forbehandlet 24 timer med 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA, mens den andre halvparten ble behandlet med 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA i 4 timer. I halvparten av cellebrønnene for begge fettsyrer ble det tilsatt 5 mM glukose i 4 timer. Det ble målt på celleassosiert radioaktivitet (CA), syreløselige metabolitter (ASM) og CO₂-produksjon. A) Celleassosiert for celler forbehandlet i 24 timer med radioaktiv fettsyre og 4 timer uten fettsyre. B) Celleassosiert for celler etter 4 timer med radioaktiv fettsyre. C) Syreløselige metabolitter etter 24 timer forbehandling og 4 timer uten fettsyre. D) Syreløselige metabolitter etter 4 timer med fettsyre. E) CO₂ fanget opp i løpet av 4 timer etter 24 timer forbehandling med fettsyre. F) CO₂ fanget opp i løpet av 4 timer med fettsyre tilstede. Data er vist som gjennomsnitt \pm SEM, n = 6 forsøk. Analysene ble gjort ved to-sidig t-test, *p \leq 0,05 mot "uten glukose", #p \leq 0,05 mot OA uten glukose.

Vi ønsket i tillegg å se på hvordan glukose undertrykte fettsyreoksidasjonen, og om denne effekten var forskjellig for ECL og ICL. Denne effekten kan beregnes ut fra en av de metabolske parameterne som er beskrevet. Parameteren kalles suppressibilitet og er et mål på myotubenes evne til å undertrykke fettsyreoksidasjon når glukose er tilstede. Den ble beregnet ut fra formelen: $[(1 - (\text{oksidasjon av } 100 \mu\text{M fettsyre med } 5 \text{ mM glukose}) / \text{oksidasjon$

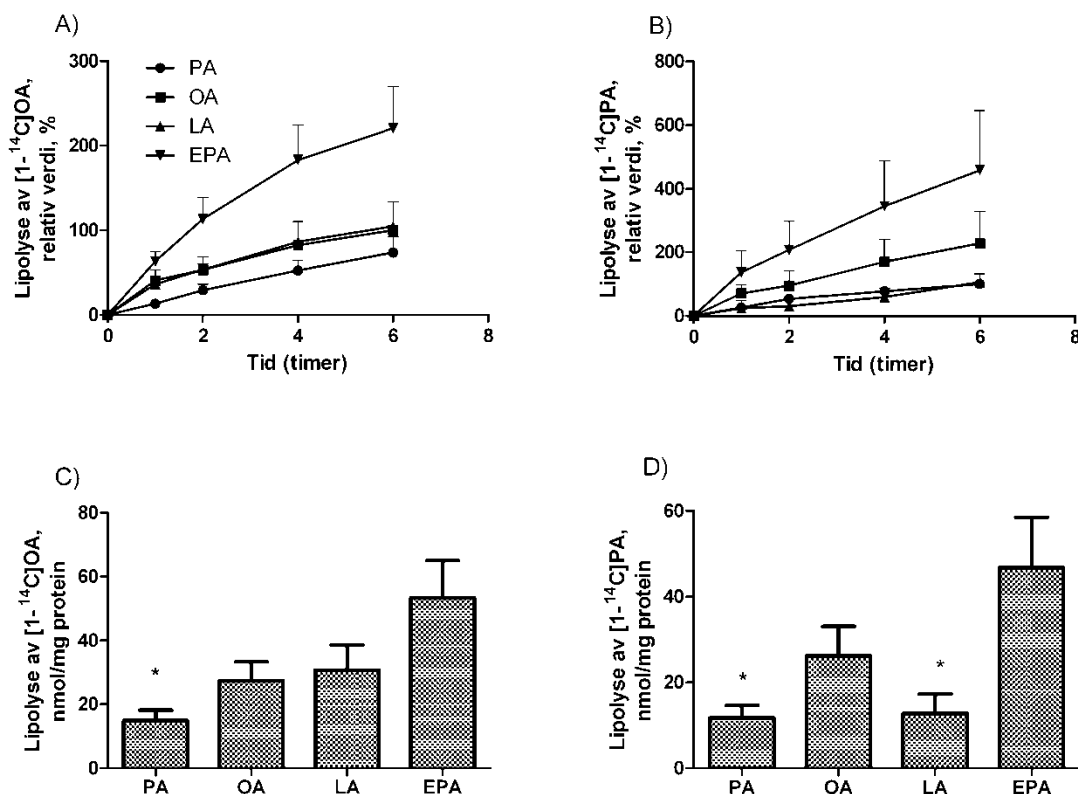
av 100 μM fettsyre uten glukose)) $\times 100 \%$] [17]. Myotubene viste en større evne til å undertrykke fettsyreoksidasjonen for ECL (figur 3.7). For både ICL og ECL viste myotuber behandlet med PA en tendens til høyere suppressibilitet enn celler behandlet med OA.



Figur 3.7: Suppressibilitet av glukose på oksidasjonen av oljesyre (OA) og palmitinsyre (PA). Suppressibiliteten er beregnet ut fra formelen [(1-(oksidasjon av 100 μM fettsyre med 5 mM glukose / oksidasjon av 100 μM fettsyre uten glukose)) $\times 100 \%$] [17]. Suppressibiliteten er beregnet ut fra CO_2 -data. Den kroniske situasjonen er myotubene behandlet i 24 timer med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA, mens de i akutt situasjonen er behandlet i 4 timer med 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA som vist i figur 6. Alle data er angitt som gjennomsnitt \pm SEM, $n = 6$.

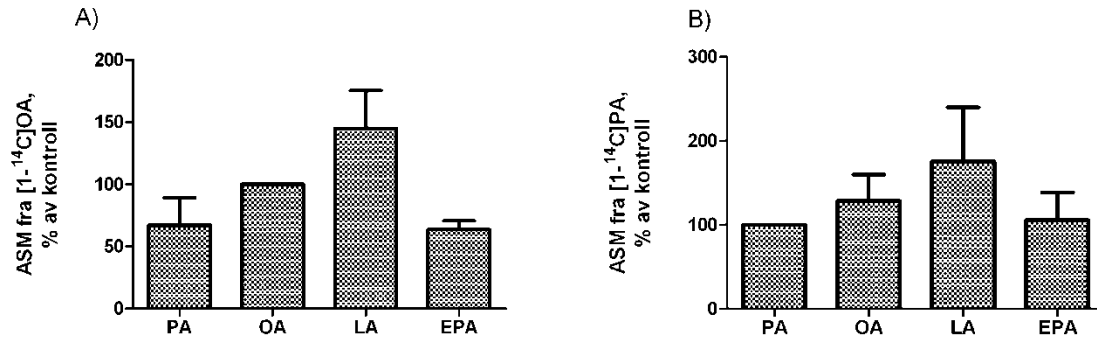
3.4 Effekter av ulike fettsyrer på lipolyse av OA og PA

Siden vi gjorde et forsøk med akkumulering av fettsyrer (figur 3.1), var det også av interesse å se på lipolyse av de samme fettsyrene. Etter 24 timer med PA, OA, LA eller EPA tilsatt spormengder (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, ca. 8,9 μM) av $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA til totalt 100 μM fettsyre ble cellene tilsatt et fettsyrefritt medium med 0,5 % eller 5 % BSA \pm 10 μM triacsin C. Frigjøringen av $[1-^{14}\text{C}]$ OA og $[1-^{14}\text{C}]$ PA ble målt ved hjelp SPA (figur 3.8 A og B). EPA ga en signifikant høyere lipolyse enn PA for både $[1-^{14}\text{C}]$ OA og $[1-^{14}\text{C}]$ PA (figur 3.8 C og D). EPA hadde en større relativ effekt på lipolysen til $[1-^{14}\text{C}]$ PA (figur 3.8 B) enn $[1-^{14}\text{C}]$ OA (figur 3.8 A), og EPA økte lipolysen av $[1-^{14}\text{C}]$ PA signifikant sammenlignet med LA. Forsøket ble gjort med to BSA-konsentrasjoner i lipolysemediet, det er 0,5 % BSA som er benyttet til beregninger. 0,5 % og 5 %, påvirket ikke grad av lipolyse (data ikke vist).



Figur 3.8: Lipolyse av [1-¹⁴C]oljesyre (OA) og [1-¹⁴C]palmitinsyre (PA) etter 24 timers inkubering med PA, OA, linolsyre (LA) eller eikosapentaensyre (EPA) med spormengder (0,5 μ Ci/ml, ca. 8,9 μ M) av [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C]PA til totalt 100 μ M fettysyre. A) Effekt av PA, OA, LA og EPA på lipolyse av [1-¹⁴C]OA i myotuber. 6 timers punktene har en absoluttverdi på 15 - 142 nmol/mg protein. B) Effekt av PA, OA, LA og EPA på lipolyse av [1-¹⁴C]PA i myotuber. Absoluttverdier ved 6 timer var 6 - 154 nmol/mg protein. C) Effekt av PA, OA, LA og EPA på lipolyse av [1-¹⁴C]OA uavhengig av tid. D) Effekt av PA, OA, LA og EPA på lipolysen av [1-¹⁴C]OA uavhengig av tid. Data vist er uten triacsin C. Analysene i C og D er gjort ved hjelp av LMM statistikk (SPSS). Alle data er illustrert som gjennomsnitt \pm SEM (n=3), *p \leq 0,05 mot EPA.

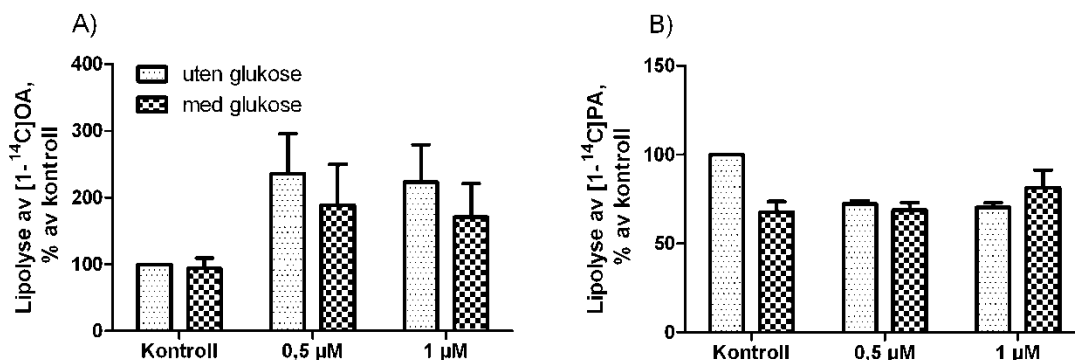
Etter endt lipolyse ble det målt ASM i forsøksmediet for å se hva som skjedde med de frigjorte fettysyrene. Det var for både [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA et lignende mønster hvor LA økte ASM etterfulgt av OA. PA og EPA ga en lavere ASM. Det ble dannet mer ASM fra [1-¹⁴C]PA (4- 27 nmol/mg protein) sammenlignet med [1-¹⁴C]OA (3-16 nmol/mg protein) (figur 3.9).



Figur 3.9: Syreløselige metabolitter (ASM) i løpet av 6 timer lipolyse etter 24 timer forbehandling med palmitinsyre (PA), oljesyre (OA), linolsyre (LA) eller eikosapentaensyre (EPA) tilsatt spormengder (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, ca. 8,9 μM) av [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C]PA til totalt 100 μM fettsyre. A) ASM som prosent av kontroll for [1-¹⁴C]OA. Absoluttverdi 3 - 16 nmol/mg protein. B) ASM som prosent av kontroll for [1-¹⁴C]PA. Absoluttverdi 4 - 27 nmol/mg protein. Data vises som gjennomsnitt \pm SEM, n = 3.

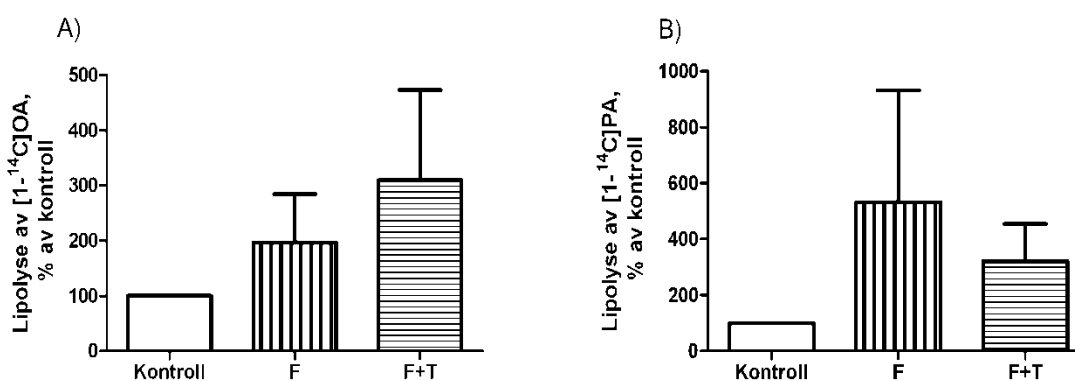
3.5 Effekter av stoffer som kan påvirke lipolysen

Det var av interesse å undersøke noen stoffer som kan påvirke lipolysen. FCCP er en mitokondriell frikobler som er sett å øke lipolyse i adipocytter [70]. Myotubene ble forbehandlet 24 timer med 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA. Etter 24 timer ble myotubene tilsatt FCCP i konsentrasjonene 0, 5, 1 og 5 μM . Halvparten av cellebrønnene ble også tilsatt 5,5 mM glukose. Etter 6 timers inkubering ble det tatt av medium for å måle lipolyse ved å telle radioaktiviteten i mediet. FCCP ga en økt effekt på lipolysen av [1-¹⁴C]OA, men ikke av [1-¹⁴C]PA (figur 3.10). Det så ikke ut til at de ulike konsentrasjonene som ble testet ga ulike effekter, men 5 μM FCCP påvirket cellene negativt ved et lavere proteintall, noe som kan tyde på at cellene døde (data ikke vist). Glukose så ut til å ha en større lipolysehemmende effekt på [1-¹⁴C]OA (figur 3.10 A) enn for [1-¹⁴C]PA hvor FCCP ikke hadde noen effekt på lipolysen (figur 3.10 B).



Figur 3.10: Effekten på lipolyse av karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrason (FCCP) i ulike konsentrasjoner etter 6 timer: Myotubene ble forbehandlet 24 timer med 100 μM [1-¹⁴C]oljesyre (OA) eller [1-¹⁴C]palmitinsyre (PA). Det ble etter 6 timers inkubering med ulike FCCP konsentrasjoner tatt av medium for å kvantitere lipolysen. A) Lipolyse av [1-¹⁴C]OA. B) Lipolyse av [1-¹⁴C]PA. Alle data er angitt som gjennomsnitt ± SEM, n = 3.

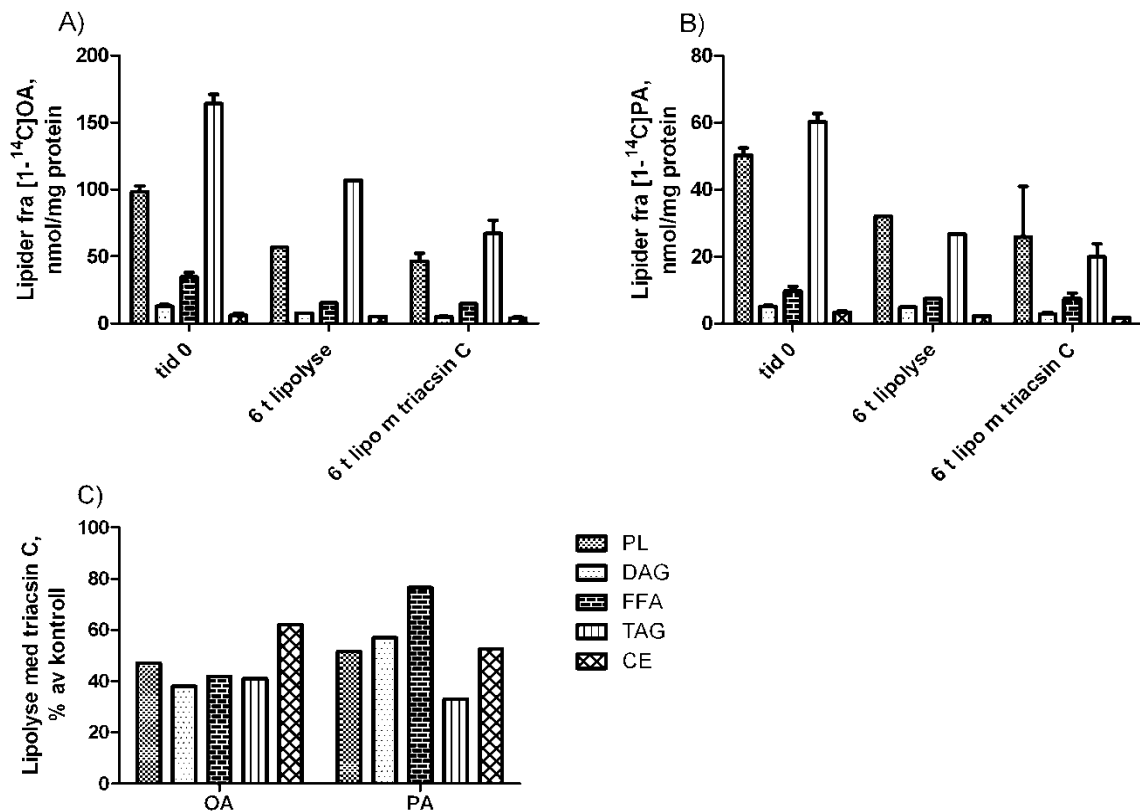
Vi ønsket også å undersøke effekten av forskolin (øker cAMP) [71] på lipolysen i cellene. Myotubene ble forbehandlet 24 timer med 0,5 μCi/ml, 100 μM [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA. Etter 24 timer ble myotubene tilsatt 10 μM forskolin. Halvparten av cellebrønnene ble også tilsatt 10 μM triacsin C. Triacsin C ble tilsatt for å hemme reforestring og slik unngå at fettsyrene reutnyttes. Etter 6 timers inkubering ble det tatt av medium for å se på grad av lipolyse. Forskolin økte lipolysen for både [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA (figur 3.11). Den største effekten var på [1-¹⁴C]PA. Det var en tendens til høyere lipolyse med triacsin C for [1-¹⁴C]OA (figur 3.11 A), mens triacsin C førte til en lavere lipolyse av [1-¹⁴C]PA (figur 3.11 B).



Figur 3.11: Effekten av inkubering med forskolin på lipolysen til [1-¹⁴C]oljesyre (OA) og [1-¹⁴C]palmitinsyre (PA). Myotubene ble forbehandlet i 24 timer med 100 μM [1-¹⁴C]OA og [1-¹⁴C]PA. Forskolin (F), Triacsin C (T). Det ble etter 6 timers inkubering med 10 μM forskolin ± 10 μM triacsin C tatt av medium for å kvantitere lipolysen. A) Lipolyse av [1-¹⁴C]OA. B) Lipolyse av [1-¹⁴C]PA. Alle data er angitt som gjennomsnitt ± SEM, n = 3.

3.6 Distribusjon av OA og PA

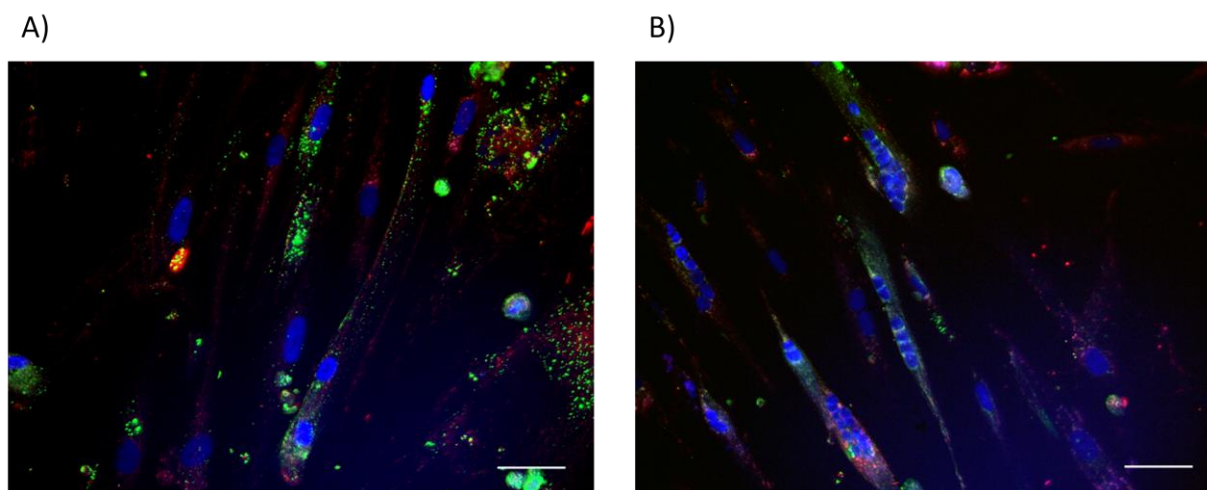
Vi ønsket å se på lipidfordelingen i myotubene etter 24 timers inkubering med 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ eller $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ og etter 6 timers lipolyse med og uten 10 μM triacsin C for å se hvordan lipiddistribusjonen forandret seg under lipolyse. Lipidene i cellene ble separert ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi og radioaktiviteten kvantitert ved hjelp av væskescintillasjon. Akkumuleringen av $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ i lipider var ca. dobbelt så stor som akkumuleringen av $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ i lipider (Figur 3.12). Det var for $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ (Figur 3.12 A) og $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ (Figur 3.12 B) det samme mønsteret ved tid 0; det meste av radioaktiviteten ble gjenfunnet i TAG-fraksjonen. Det var etter 6 timer lipolyse med triacsin C en større nedgang i inkorporert $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ sammenlignet med $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ (figur 3.12 C). Ser man på hvilke lipider som i høyest grad har unngått lipolyse er det fra $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$ DAG, mens det fra $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$ er CE (figur 3.12 C). Det var for begge fettsyrene nedgang i radioaktive lipider når reforestringen ble hemmet.



Figur 3.12: Distribusjon av lipider i humane myotuber etter 24 timers inkubering med radioaktiv oljesyre (OA) og palmitinsyre (PA) etter 6 timer lipolyse \pm 10 μM triacsin C. Figuren viser lipiddistribusjon: A) Etter inkubering med $[1-^{14}\text{C}]\text{OA}$. B) Etter inkubering med $[1-^{14}\text{C}]\text{PA}$. C) 6 timer lipolyse med triacsin C som prosent av tid 0. Lipidene ble separert ved tynnsjikt-kromatografi og kvantitert ved å telle radioaktiviteten. Data er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=1$, paralleller innad i forsøket fra 1-3. Resultat sammenfaller med 3 forsøk gjort før.

3.7 Effekter av triacsin C på lipiddråper

Vi ønsket å se hvordan forbehandling i 24 timer med 100 μM OA \pm 10 μM triacsin C ville påvirke lipiddråper. Triacsin C hemmer som nevnt tidligere reforestring [67], og man vil forvente en nedgang i LD. Etter forbehandling ble myotubene farget for å se kjerner (blå), mitokondrier (rød) og LD (grønne). Man så tydelig en nedgang i LD etter behandling med triacsin C.

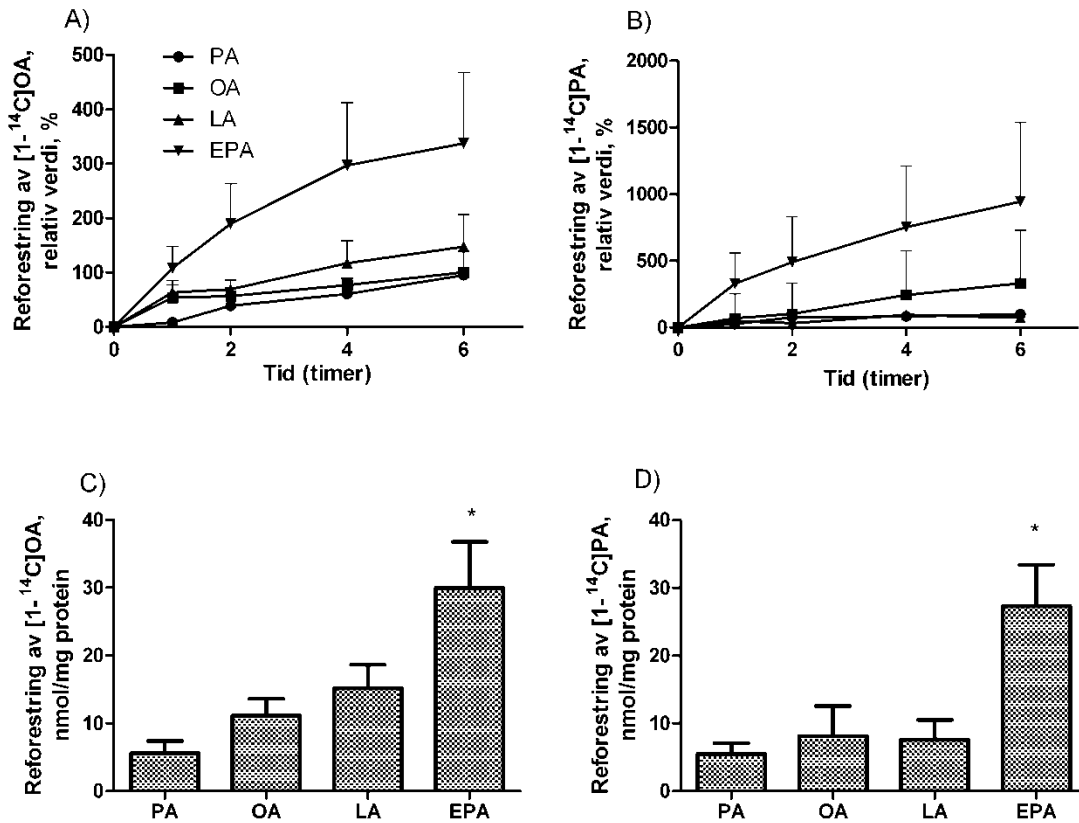


Figur 3.13: Effekt av triacsin C på lipiddråpedistribusjon målt ved live cell imaging. Cellene ble farget for å se kjerner (blå), mitokondrier (rød) og lipiddråper (LD) (grønne) etter 24 timer forbehandling med 100 μM oljesyre (OA) \pm 10 μM triacsin C. A) Uten triacsin C. B) Med triacsin C. Målestokk er 50 μm .

3.8 Effekter av ulike fettsyrer på reforestring av OA og PA

Data vist i avsnitt 3.4 viser lipolyse, det var i den forbindelse også interessant å se på reforestring, og hvilken rolle de ulike fettsyrene hadde på denne prosessen. Som nevnt ble cellene etter 24 timer med PA, OA, LA eller EPA tilsatt spormengder (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, ca. 8,9 μM) av $[1-^{14}\text{C}]$ OA eller $[1-^{14}\text{C}]$ PA til totalt 100 μM fettsyre tilsatt et fettsyrefritt medium med eller uten 10 μM triacsin C. Triacsin C ble tilsatt for å hemme reforestring av fettsyrene og slik få et tydelig skille på hva som egentlig går ut av cellen og ikke tas opp og reutnyttes. Frigjøringen av $[1-^{14}\text{C}]$ OA og $[1-^{14}\text{C}]$ PA ble målt ved hjelp SPA, og reforestringen (figur 3.14 A og B) ble regnet ut ved differansen mellom de cellene som fikk triacsin C, og de som ikke fikk. EPA førte til en signifikant høyere reforestring av $[1-^{14}\text{C}]$ OA og $[1-^{14}\text{C}]$ PA enn PA, OA og LA (figur 3.14 C og D) ($[1-^{14}\text{C}]$ OA i blanding med LA, $p = 0,08$ sammenlignet med EPA). EPA hadde en større relativ effekt på reforestring av $[1-^{14}\text{C}]$ PA enn av

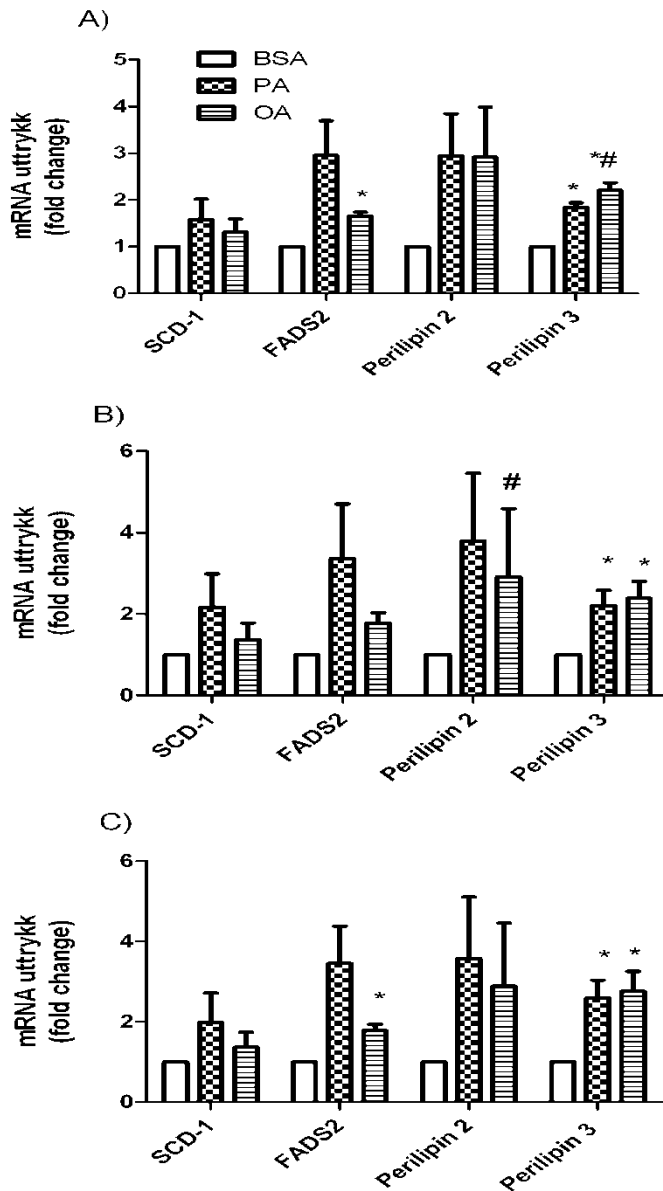
[1-¹⁴C]OA. Forsøket ble gjort med to konsentrasjoner for BSA, 0,5 % og 5 %, men dette påvirket ikke graden av reforestring noe særlig (data ikke vist). Beregninger er gjort ut fra 0,5 % BSA.



Figur 3.14: Reformation av [1-¹⁴C]oljesyre (OA) og [1-¹⁴C]palmitinsyre (PA) etter 24 timers inkubering med PA, OA, linolsyre (LA) eller eikosapentaensyre (EPA) med spormengder (0,5 μ Ci/ml, ca. 8,9 μ M) av [1-¹⁴C]OA eller [1-¹⁴C] PA til totalt 100 μ M fettsyre. Halvparten av cellene ble behandlet med 10 μ M triacsin C. Reformation er differansen mellom cellene som fikk triacsin C, og de som ikke fikk. A) Effekt av PA, OA, LA og EPA på reformation av [1-¹⁴C]OA i myotuber. 6 timers punktet har en absoluttverdi på 9 - 86 nmol/mg protein. B) Effekt av PA, OA, LA og EPA på reformation av [1-¹⁴C]PA i myotuber. Absoluttverdi ved 6 timer 2 - 74 nmol/mg protein. C) Effekt av PA, OA, LA og EPA på reformation av [1-¹⁴C]OA uavhengig av tid. D) Effekt av PA, OA, LA og EPA på reformation av [1-¹⁴C]OA uavhengig av tid. Analysene i C og D er gjort ved hjelp av LMM statistikk (SPSS). Alle data er illustrert som gjennomsnitt \pm SEM n = 3, n = 2 for [1-¹⁴C]PA i blanding med LA. *p \leq 0,05 mot EPA. p = 0,08 for [1-¹⁴C]OA, LA mot EPA.

3.9 Effekter av forbehandling med OA og PA på mRNA-ekspressjonen til stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1), fettsyre desaturase 2 (FADS2), Perilipin 2 og Perilipin 3

Det var tydelig at myotubene ble påvirket ulikt når de ble behandlet med ulike fettsyrer, vi ønsket derfor å undersøke hvordan forbehandling med OA, PA og BSA (som fettsyrefri kontroll) påvirket ekspressjonen av gener involvert i fettsyremetabolismen. Valg av gener ble gjort ut fra microarray-data [22]. Det ble brukt to ulike endogene kontroller, 36B4 og GAPDH. Forbehandling med PA ga en tendens til økt mRNA uttrykk for SCD-1 sammenlignet med OA-forbehandling og for begge fettsyreforbehandlingene sammenlignet med BSA. Det var også en tydelig tendens til økt mRNA uttrykk for Perilipin 2 etter både OA- og PA-forbehandling sammenlignet med BSA, med 36B4 som endogen kontroll var Perilipin 2 signifikant økt etter forbehandling med PA sammenlignet med OA-forbehandling. FADS2 var signifikant økt etter OA-forbehandling, mens det etter PA-forbehandling var en tendens til økning sammenlignet med BSA. For Perilipin 3 var det en signifikant økning i mRNA uttrykket etter både OA- og PA-forbehandling sammenlignet med kontroll.

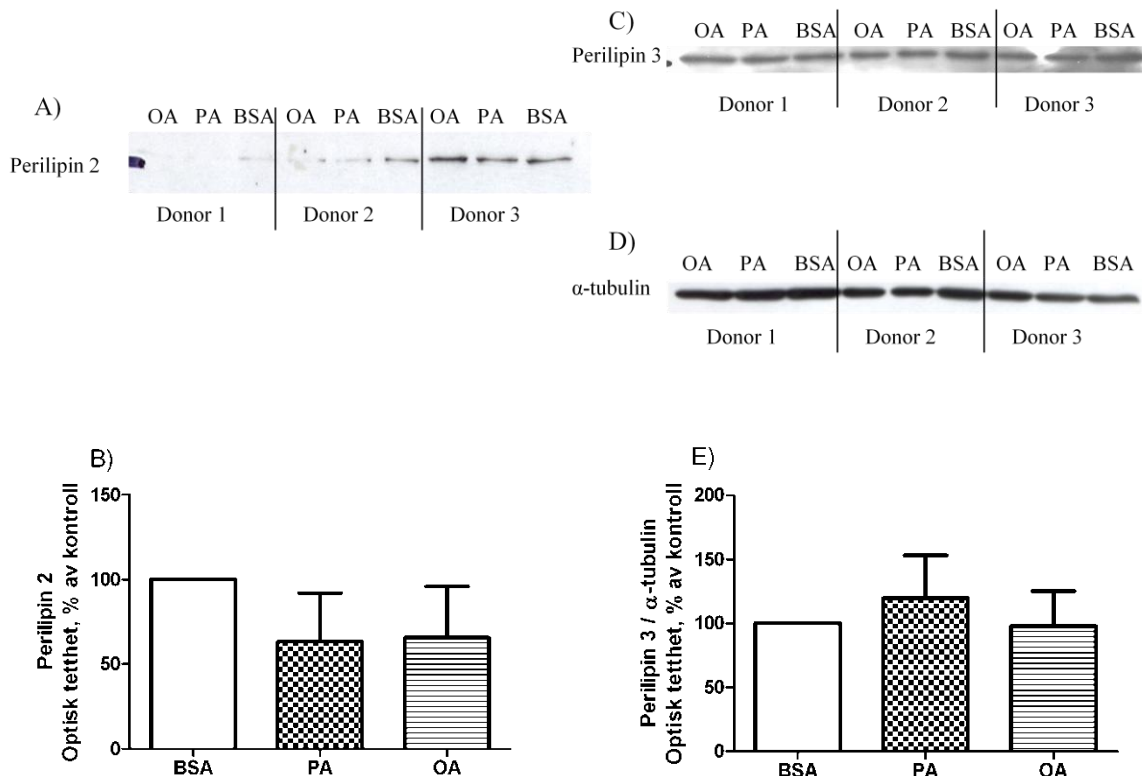


Figur 3.15: mRNA-ekspressjon i humane myotuber etter forbehandling med kontroll (BSA), palmitinsyre (PA) eller oljesyre (OA). Myotuber ble behandlet i 24 timer med 40 μ M BSA, 100 μ M PA eller 100 μ M OA, RNA ble høstet og cDNA syntetisert. cDNA ble målt ved RT real-time-PCR. Figurene viser verdier i forhold til BSA, verdier er korrigeret for endogen kontroll. A) Glyseraldehyd-3 fosfat dehydrogenase (GAPDH) som endogen kontroll. B) "Human acidic ribosomal phosphoprotein PO" (36B4) som endogen kontroll. C) Gjennomsnitt av GAPDH og 36B4 som korrigerende endogene kontroll. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), fettsyredesaturase 2 (FADS2). Analysene er gjort ved to-sidig t-test. Data er angitt som gjennomsnitt \pm SEM, n = 4. * $p \leq 0,05$ mot BSA, # $p \leq 0,05$ mot PA

3.10 Effekter av forbehandling med OA og PA på proteinnivået til Perilipin 2 og Perilipin 3

Siden det i figur 3.15 var ulik ekspressjon av gener etter behandling med BSA, OA og PA, var det av interesse å se om dette gjenspeilte seg i proteinnivå. Valg av proteiner ble tatt på

bakgrunn av genespresjon målt med PCR. Myotubene ble behandlet i 24 timer med 40 μM BSA, 100 μM OA eller 100 μM PA, og spesifikke proteiner ble detektert ved immunblotting (westernblot). For å korrigere for mengde protein satt på gelen ble α -tubulin benyttet som kontroll. Vi fant ingen signifikante forskjeller, med det var for Perilipin 2 en tendens til nedgang i proteinuttrykk etter både OA- og PA-forbehandling sammenlignet med BSA. Perilipin 3 korrigert for α -tubulin viste en svak økning etter PA-forbehandling sammenlignet med BSA, mens det etter OA-forbehandling ikke var noen forskjell fra BSA.



Figur 3.16: Effekter av forbehandling med BSA (kontroll), palmitinsyre (PA) og oljesyre (OA) på proteinmengden av Perilipin 2 og Perilipin 3. Myotubene ble behandlet i 24 timer med 40 μM BSA, 100 μM OA eller 100 μM PA. Immunblott ble utført med antistoff mot Perilipin 2 og Perilipin 3. A) Immunblott perilipin 2, 5 minutter eksponering. B) Kvantifisering av immunblott til Perilipin 2, n = 2 PA, n = 3 for resten. C) immunblott Perilipin 3, 5 minutter eksponering D) Immunblott α -tubulin, 30 sekunder eksponering. Membran brukt til Perilipin 3 ble strippet og tilsatt antistoff mot α -tubulin. E) Kvantifisering av Perilipin 3 korrigert for proteinmengde (α -tubulin), n = 3. Data er angitt som gjennomsnitt \pm SEM.

Membranen med perilipin 2 ble ikke prioriter strippet og behandlet med α -tubulin. Det ble også prøvd antistoff mot SCD-1 uten at det ble bånd på membranen, det ble heller ikke deteksjon av SCD-1 positiv kontroll.

4. Diskusjon

Det er en stadig økende forekomst av fedme og type 2-diabetes (T2D), og mengde og type fett i kosten kan være av betydning for utviklingen av disse tilstandene [8, 17-20]. Det eksisterer retningslinjer for hvilke og hvor mye fett dietten bør bestå av, men det mangler fortsatt en del forskning på årsakene til dette, og bedre dokumentasjon på positive og negative effekter av ulike fettsyrer. En økt forståelse vil kunne gi tydeligere retningslinjer, og en diett forandret med tanke på fettsammensetning vil kunne fremstå som en intervensjon ved fedme og T2D. Dette er bakgrunnen for at ulike fettsyrer ble benyttet til forbehandling av skjelettmuskelceller for å undersøke om fettsyrene påvirket energimetabolismen. Det å se på myotuber i kultur (*in vitro*) gir en mulighet til å se på effekter over tid i et konstant miljø uten endokrin påvirkning og andre faktorer som spiller inn *in vivo*. Det er i dette arbeidet gjort forsøk hvor det er inkubert med en eller to fettsyrer samtidig, dette medfører en begrensning i forhold til at dietten er mye mer kompleks. Samtidig gir det muligheten til å se på fettsyrene og deres effekter isolert, og slik bedre kunne forstå mekanismer.

4.1 Effekter av EPA på metabolismen til radioaktiv PA, OA og LA

Behandling av cellene med eikosapentaensyre (EPA) i blanding med radioaktiv oljesyre (OA) eller palmitinsyre (PA) førte til økt akkumulering, økt lipolyse og økt reforestring av både radioaktiv OA og PA sammenlignet med PA, OA eller linolsyre (LA) i blanding med radioaktiv OA eller PA. Forbehandling med EPA økte oksidasjonen til radioaktiv PA, OA og LA sammenlignet med forbehandling med PA, OA eller LA. Dette tyder på at EPA i stor grad påvirker andre fettsyrrers metabolisme.

EPA økte real-time akkumulering av radioaktiv OA og PA. EPA-forbehandling økte også opptaket ($CA + CO_2$) av radioaktiv OA, LA og PA. Effekten av EPA-forbehandling viste seg å være større på opptaket av radioaktiv PA enn på opptak av radioaktiv OA. Det at EPA førte til økt fettsyreopptak sammenfaller med resultatene til Aas et al [18] som viste at opptak av radioaktiv OA var økt etter EPA-forbehandling sammenlignet med OA-forbehandling.

I løpet av 24 timer i nærvær av fettsyre vil det foregå en betydelig metabolisme i myotubene med dannelse av syreløselige metabolitter (ASM) i ufullstendig oksidasjon, fullstendig oksidasjon til CO_2 og lagring. Med EPA i fettsyreblandingen ble det en redusert dannelse av

ASM fra radioaktiv OA og PA i forhold til om radioaktiv OA eller PA var i blanding med OA, PA eller LA, både etter endt akkumulering (24 timer) og etter 6 timer påfølgende lipolyse (figur 3.2 og 3.9). CO₂-produksjonen fra akutt tilsatt radioaktiv OA, PA og LA var generelt høyere i myotuber forbehandlet med EPA sammenlignet med myotuber forbehandlet med OA, PA eller LA. På bakgrunn av de lave ASM-verdiene kunne man tenke seg at EPA førte til nedsatt oksidasjon og økt lagring av andre fettsyrer, men siden CO₂-produksjonen var økt er det mer sannsynlig at EPA vil øke omsetningen av andre fettsyrer. Hessvik et al [22] viste økt oksidasjon av radioaktiv OA etter EPA-forbehandling sammenlignet med etter OA-, PA- eller LA-forbehandling [22]. Begge funnene kan tyde på at EPA fører til en raskere, og mer fullstendig oksidasjon av andre fettsyrer enn OA, PA eller LA. Hessvik et al [22] har også vist at EPA selv akkumuleres mindre i myotuber på bakgrunn av at fettsyren β -oksideres raskere [22]. Hvis dette er tilfelle kunne man forvente at EPAs effekt på andre fettsyrer ville bli borte ettersom EPA oksideres, men i strid med dette fant vi også økt lipolyse og reforestring av radioaktiv OA og PA med EPA tilstede. En mulig forklaring kan være at fettsyrene er tilstede i et så stort overskudd at EPA ikke er oksidert bort, eller at EPA påvirker metabolismen til de andre fettsyrene for eksempel ved å påvirke genekspressjon. Dannelsen av ASM etter akkumulering var høyere i de myotubene som kun hadde en fettsyre tilstede i forhold til de som hadde en blanding av to fettsyrer, og CO₂-produksjonen var nedsatt. Det vil sannsynligvis komme av at det lettere skjer en metning av oksideringsprosessen med bare en fettsyre.

EPA i blanding med radioaktiv OA og PA førte til økt lipolyse og reforestring av radioaktiv OA og PA sammenlignet med OA eller PA i blanding med radioaktiv OA og PA. Dette kan tyde på at EPA fører OA og PA inn i en energisløsende syklus hvor det brukes energi uten en netto omdanning av substrat til produkt [78]. Det kan også tyde på at EPA fører OA og PA mer til lagring, men som nevnt tidligere er dette lite trolig siden CO₂-produksjonen etter EPA-forbehandling er økt. Aas et al [18] viste at forbehandling med EPA i forhold til forbehandling med OA førte til at radioaktiv OA i en høyere grad ble inkorporert i komplekse lipider i muskelcellen og lagret [18].

4.2 Effekter av kronisk og akutt eksponering for fettsyrer

Inkubering med fettsyrer i 24 eller 4 timer kan reflektere en henholdsvis kronisk eller akutt eksponering for fettsyrer. Fettsyrene som metaboliseres vil enten komme fra intracellulære lipider (ICL) etter 24 timer eller fra ekstracellulære lipider (ECL) i løpet av 4 timer.

Det var som forventet en betydelig økning i celleassosiert radioaktivitet etter 24 timers eksponering for fettsyrer sammenlignet med 4 timers fettsyreeksponeering. Det var etter 24 timer OA som førte til høyest celleassosiert radioaktivitet, mens det etter 4 timer var PA (figur 3.6 A og B). Dette kan bety at PA tas raskere opp, men at OA tas mer fullstendig opp. En mulig årsak er forskjeller i fettsyretransportørraffinitet. Det er i myotuber behandlet med OA og PA vist en oppregulering av fettsyretransportøren CD36 i de cellene som var forbehandlet med PA [22]. Fettsyreopptaket økte med glukose tilstede, dette er som forventet med tanke på at noe av glukosen vil omdannes til glyserol som er en bestanddel i dannelsen av TAG. Glukose vil derved føre til en økt forestring av fettsyrer og dermed et økt fettsyreopptak i cellen.

Dannelsen av ASM under akutforsøket (4 timer) var høyere fra ECL sammenlignet med ICL. Dessuten var CO₂-produksjonen høyere fra ICL enn fra ECL, det tyder på at fettsyrer fra ICL blir mer fullstendig oksidert enn fettsyrer fra ECL hvor økningen i ASM muligens skjer på bakgrunn av at cellene ikke klarer å ta unna acetyl-CoA fra β -oksidasjonen til fullstendig oksidasjon. Andelen av fettsyre som ble oksidert i forhold til fettsyre som ble tatt opp var høyere for PA enn for OA for både ICL og ECL, dette kan tyde på at PA oksideres raskere, og at OA går mer til lagring i cellen. Antagelsen styrkes ved at OA akkumulerte til en høyere grad i komplekse lipider enn PA, selv om lipiddistribusjonen var relativt lik (figur 3.12). Det stemmer godt overens med resultatene vist av Hessvik et al [22]. PA ble akkumulert i mindre grad i TAG enn OA, dette kan være bakgrunnen for at PA fører til en akkumulering av palmitoyl-CoA, DAG og / eller ceramider [8].

Ved tilsetning av forskolin ble det vist en økt lipolyse, dette var som forventet siden forskolin i likhet med β -adrenerg stimulering fører til økt cAMP, som igjen aktiverer PKA som fosforylerer lipaser og perilipiner involvert i lipolysen [71]. Det var i dette forsøket (figur 3.11) for stor spredning til å kunne si noe om påvirkningen av triacsin C på lipolyse.

Det var som forventet et økt uttrykk av desaturaser (SCD-1 og FADS2) og perilipiner (Perilipin 2 og 3) i myotuber behandlet med fettsyrer sammenlignet med kontroll. Det viser at ved økt tilgjengelighet av fettsyrer vil det skje reguleringer for å ta hånd om det økte fettsyrenivået i cellene. Det var en økning i SCD-1 mRNA-uttrykk for PA sammenlignet med OA, dette var som forventet siden PA er substrat for dette enzymet [39]. Det var også en økning i FADS2 mRNA-uttrykk for PA sammenlignet med OA, selv om FADS2 skal omdanne enumettede fettsyrer til flerumettede fettsyrer [41], tyder det på at FADS2 har i oppgave å desaturere alle fettsyrer, og at FADS2 ikke er særlig spesifikk. Det ble for begge

perilipinene sett et økt mRNA-uttrykk etter behandling med fettsyrer sammenlignet med kontroll. Dette tyder på at det skjer en oppregulering for å regulere lipolyse fra lipidråpene som dannes etter fettsyreeksponering. Siden man så et økt perilipin-genuttrykk i celler forbehandlet med fettsyrer sammenlignet med kontroll, kunne man forvente å se det samme på proteinnivå, med dette var ikke tilfelle. En oppregulering på proteinnivå kan ta lengre tid, 24 timer med fettsyrer kan være for kort tid til at det blir en økt proteinsyntese. Ved senere studier kan det være aktuelt å la cellene til immunblotting inkuberes lengre etter fettsyreeksponering, da ville protein- og genoppregulering fryses på forskjellige punkter. Immunblott er i tillegg en krevende metode med tanke på at det er mange trinn som kan gå galt. Antistoffene var av varierende kvalitet, noe som kan forklare noen av problemene. Et lavere proteinnivå av Perilipin 2 for fettsyrene sammenlignet med kontroll var ikke forventet. Med antistoff mot Perilipin 2 ble det bånd ved en annen molekylvekt også, noe som kan tyde på at antistoffet var for uspesifikt. Membranen med Perilipin 2 ble ikke prioritert strippet og behandlet med α -tubulin for å korrigere for mengde protein satt på gelen.

4.3 Metabolske parametere

Metabolsk fleksibilitet betegner muskelcellens evne til å skifte fra lipid- til glukoseoksidasjon etter et måltid i nærvær av insulin. Infleksibilitet forekommer ofte sammen med insulinresistens, T2D og fedme [17, 28, 53]. Siden det er vist *in vitro* – *in vivo* korrelasjon med hensyn på metabolsk fleksibilitet [17], vil suppressibilitet og adapterbarhet vist *in vitro* etter forbehandling med ulike fettsyrer kunne si noe om hvordan fettsyrene påvirker metabolismen *in vivo*, og dermed få et bilde av hvordan fettsyrene sannsynligvis kan påvirke den metabolske tilstanden til individet.

Suppressibilitet *in vitro* er evnen myotubene har til å undertrykke fettsyreoksidasjon ved akutt tilsetning av glukose. Ved metabolisme av glukose vil det dannes malonyl-CoA, dette vil hemme CPT-1 og fettsyreopptaket til mitokondriene [57]. Det var en tendens til at glukose førte til høyere suppressiv effekt på PA oksidasjonen sammenlignet med OA, dette gjaldt både for ICL- og ECL-oksidasjon (fig 3.7). Det kan komme av at PA er et bedre substrat for CPT-1 [24] og slik vil påvirkes i større grad. Det er ikke tidligere gjort studier på suppressibilitet etter forbehandling med fettsyrer i 24 timer (ICL). Siden suppressibiliteten var høyere beregnet med CO₂ fra ekstracellulært tilsatte fettsyrer (ECL) enn ved ICL tyder dette på at myotubene har en dårligere evne til å undertrykke fettsyreoksidasjon når

fettsyrene mobiliseres fra lipidene lagret i cellen sammenlignet med at fettsyrene tas opp fra mediet. Suppressibilitet er vist ved *in vitro* – *in vivo* korrelasjon å være negativt assosiert med insulinsensitivitet [17]. Men det er flere studier som har vist økt suppressibilitet når myotubene er behandlet med fettsyrer som er sett på som gunstige for insulinsensitiviteten [19, 22, 61]. Med denne usikkerheten rundt korrelasjonen mellom *in vitro* og *in vivo* trengs flere studier for å si noe sikkert om hvordan suppressibilitet *in vitro* er korrelert til insulinsensitivitet *in vivo*. En høy glukosesuppressibilitet etter et måltid, det vil si et raskt skifte i energikilde fra fett til karbohydrat, er høyst sannsynlig gunstig [10, 12, 25].

Adapterbarhet er myotubenes evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt tilgjengelighet av fettsyre, *in vitro* adapterbarhet er positivt korrelert med insulinsensitivitet *in vivo* [17]. Hvis man ser på forbehandling med ulike fettsyrer, ga EPA en økt adapterbarhet i myotubene sammenlignet med de andre fettsyrene. Dette vil kunne bety at EPA har en gunstig påvirkning på metabolismen av andre fettsyrer. Av fettsyrene tilsatt akutt viste LA en økt adapterbarhet sammenlignet med OA og PA, noe som kan indikere fordelaktige effekter av flerumettede fettsyrer på energiomsetningen i skjelettmuskel.

5. Konklusjon

Muskelcellene behandlet ulike fettsyrer på ulik måte. EPA-behandling forårsaket høyere akkumulering, oksidering, lipolyse og reforestring av radioaktiv OA og PA enn etter behandling med OA, PA eller LA. EPA-forbehandling førte til en høyere adapterbarhet enn med forbehandling med OA, PA eller LA. Dette indikerer at EPA har en gunstig effekt på metabolismen til andre fettsyrer både med tanke på fleksibilitet og evnen til å øke turnover av andre fettsyrer.

OA og PA regulerte gener involvert i desaturering av fettsyrer (SCD-1 og FADS2), og gener involvert i regulering av lipolyse (Perilipin 2 og Perilipin 3). Fettsyrene ble også metabolisert ulikt, PA hadde en høyere turnover og var mer tilgjengelig for oksidasjon enn OA som i en større grad gikk til lagring.

Ulike fettsyrer metaboliseres ulikt i humane skjelettmuskelceller, og de påvirket også hverandres metabolisme. Med mer kunnskap om disse interaksjonene kan vi forhåpentligvis si mer om effekter av ulike diettsammensetninger med tanke på energimetabolisme og utvikling av insulinresistens i human skjelettmuskel.

Kilder

1. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglige retningslinjer, Diabetes, Forebygging, Diagnostikk og Behandling*. IS-1674, 2009: p. 22-23.
2. Rang, H.P., ed. *Pharmacology*. 2003, Churchill Livingstone: Edinburgh. XII s 797.
3. International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome* http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf 2006.
4. Stirban, A.O. and D. Tschoepe, *Cardiovascular complications in diabetes: targets and interventions*. *Diabetes Care*, 2008. **31 Suppl 2**: p. S215-21.
5. Younis, N., H. Soran, and S. Farook, *The prevention of type 2 diabetes mellitus: recent advances*. *QJM*, 2004. **97**(7): p. 451-5.
6. Kahn, S.E., R.L. Hull, and K.M. Utzschneider, *Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 840-6.
7. Prentki, M., et al., *Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 3**: p. S405-13.
8. Bergouignan, A., et al., *Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: the Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms*. *Prog Lipid Res*, 2009. **48**(3-4): p. 128-47.
9. Montell, E., et al., *DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **280**(2): p. E229-37.
10. Moro, C., S. Bajpeyi, and S.R. Smith, *Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294**(2): p. E203-13.
11. Schmitz-Peiffer, C., D.L. Craig, and T.J. Biden, *Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 24202-10.
12. Chang-Chen, K.J., R. Mullur, and E. Bernal-Mizrachi, *Beta-cell failure as a complication of diabetes*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2008. **9**(4): p. 329-43.
13. Kusunoki, J., A. Kanatani, and D.E. Moller, *Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome*. *Endocrine*, 2006. **29**(1): p. 91-100.
14. Watt, M.J., *Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance?* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009. **36**(1): p. 5-11.
15. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
16. Carmen, G.Y. and S.M. Victor, *Signalling mechanisms regulating lipolysis*. *Cell Signal*, 2006. **18**(4): p. 401-8.
17. 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.
18. 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.
19. Summers, L.K., et al., *Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity*. *Diabetologia*, 2002. **45**(3): p. 369-77.

20. Storlien, L.H., et al., *Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats*. Science, 1987. **237**(4817): p. 885-8.
21. van Hees, A.M., et al., *Effects of dietary fat modification on skeletal muscle fatty acid handling in the metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(5): p. 859-70.
22. 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.
23. Anderson, B.M. and D.W. Ma, *Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?* Lipids Health Dis, 2009. **8**: p. 33.
24. Silveira, L.R., et al., *Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle*. J Cell Physiol, 2008. **217**(1): p. 1-12.
25. Galgani, J.E., C. Moro, and E. Ravussin, *Metabolic flexibility and insulin resistance*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(5): p. E1009-17.
26. Corpeleijn, E., W.H. Saris, and E.E. Blaak, *Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle*. Obes Rev, 2009. **10**(2): p. 178-93.
27. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5755-61.
28. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
29. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. E1130-41.
30. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Med Clin North Am, 2004. **88**(4): p. 787-835, ix.
31. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
32. Tremblay, F., M.J. Dubois, and A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. Front Biosci, 2003. **8**: p. d1072-84.
33. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 507-20.
34. Sidossis, L.S. and R.R. Wolfe, *Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: The glucose fatty acid cycle reversed*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 1996. **33**(4): p. E733-E738.
35. Spriet, L.L., *Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(9): p. 1477-84.
36. Hajri, T. and N.A. Abumrad, *Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 383-415.
37. Hamilton, J.A. and F. Kamp, *How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?* Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2255-69.
38. Steiber, A., J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(5-6): p. 455-73.
39. Paton, C.M. and J.M. Ntambi, *Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E28-37.
40. Eberle, D., et al., *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis*. Biochimie, 2004. **86**(11): p. 839-48.
41. Merino, D.M., D.W. Ma, and D.M. Mutch, *Genetic variation in lipid desaturases and its impact on the development of human disease*. Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 63.

42. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiol Scand, 2005. **183**(1): p. 31-41.
43. Shi, Y. and D. Cheng, *Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E10-8.
44. Brasaemle, D.L., *Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2547-59.
45. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 942-9.
46. Brasaemle, D.L., *Lipolysis control: the plot thickens*. Cell Metab, 2010. **11**(3): p. 173-4.
47. Zechner, R., et al., *Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 3-21.
48. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, *PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 419-40.
49. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(3): p. E578-91.
50. Phillips, S.A., et al., *Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity*. Obes Res, 2005. **13**(8): p. 1321-9.
51. Bulankina, A.V., et al., *TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 641-55.
52. Wolins, N.E., D.L. Brasaemle, and P.E. Bickel, *A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5484-91.
53. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-83.
54. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. The Lancet, 1963. **281**(7285): p. 785-789.
55. Sidossis, L.S., et al., *Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2244-50.
56. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.
57. Wolfe, R.R., *Metabolic interactions between glucose and fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(3 Suppl): p. 519S-526S.
58. Jensen, M.D., *Fatty acid oxidation in human skeletal muscle*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1607-9.
59. Ruderman, N.B., et al., *Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. E1-E18.
60. Gaster, M., *Metabolic flexibility is conserved in diabetic myotubes*. J Lipid Res, 2007. **48**(1): p. 207-17.
61. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(1): p. 94-105.
62. DeLany, J.P., et al., *Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(4): p. 905-11.
63. Gaster, M., A.C. Rustan, and H. Beck-Nielsen, *Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes*. Diabetes, 2005. **54**(3): p. 648-56.

64. Lee, J.S., et al., *Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites*. J Appl Physiol, 2006. **100**(5): p. 1467-74.
65. Frangioudakis, G., et al., *Saturated- and n-6 polyunsaturated-fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4187-96.
66. 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.
67. Igal, R.A., P. Wang, and R.A. Coleman, *Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA*. Biochem J, 1997. **324** (Pt 2): p. 529-34.
68. Park, K.S., et al., *FCCP depolarizes plasma membrane potential by activating proton and Na⁺ currents in bovine aortic endothelial cells*. Pflugers Arch, 2002. **443**(3): p. 344-52.
69. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environ Health Perspect, 1990. **87**: p. 213-8.
70. Tejerina, S., et al., *Mild mitochondrial uncoupling induces 3T3-L1 adipocyte de-differentiation by a PPARgamma-independent mechanism, whereas TNFalpha-induced de-differentiation is PPARgamma dependent*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): p. 145-55.
71. Djouder, N., et al., *PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis*. EMBO J, 2010. **29**(2): p. 469-81.
72. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 735-44.
73. Gaster, M., H. Beck-Nielsen, and H.D. Schroder, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 726-34.
74. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
75. Skrede, S., et al., *Stimulation of fatty acid oxidation by a 3-thia fatty acid reduces triacylglycerol secretion in cultured rat hepatocytes*. J Lipid Res, 1994. **35**(8): p. 1395-404.
76. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
77. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
78. Wolfe, R.R., et al., *Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise*. Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 1): p. E382-9.

Appendiks

1. Celledyrking

1.1 Utsåingsmedium

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

1.2 Proliferasjonsmedium

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

1.3 Differensieringsmedium

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

1.4 Fargeløst differensieringsmedium

8,3 g DMEM base pulver
3,7 g NaHCO₃
20 ml FCS (Føtalt kalveserum)
20 ml L-glutamin
5 ml Fungizone
5 ml Pen/Strep
50 pmol insulin (42 µl av 1000 x fortynnet insulin Actrapid[®] Penfill)
110 mg Natrium pyruvat
950 ml dH₂O tilsettes
pH justeres til 7,2-7,3 og sterilfilteres

2. Forsøksmedier

2.1 Forbehandling

0,5 µCi/ml OA* / PA*
100 µM FA*+ OA, PA, LA eller EPA
i 1.3 eller 1.4

100 µM PA, OA, LA, eller EPA
i 1.3

40 µM BSA
i 1.3

2.2 Substratoksidasjonsmetoden

DPBS hepes med:

0,1 mM glukose

1 mM carnitin

1: 2,5 BSA: FA

0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ OA* / PA*

100 μM FA* + FA

\pm 5 mM glukose

DPBS hepes med:

0,1 mM glukose

1 mM carnitin

1: 2,5 BSA: FA

0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ OA* / PA* / LA*

5 eller 100 μM FA* + FA

Kontroll

DPBS hepes med:

0,1 mM glukose

1 mM carnitin

40 μM BSA

2.3 Lipolyse SPA

DPBS hepes med:

0,1 mM glukose

1 mM carnitin

0,5 eller 5 % BSA

\pm 10 μM triacsin C

2.4 Forsøk med FCCP

DPBS hepes med:

0,1 mM glukose

1 mM carnitin

0,5 % BSA

0,5, 1, 5 μM FCCP

Halvparten tilsettes 5,5 mM glukose

2.5 Forsøk med forskolin

DPBS hepes med:

0,1 mM glukose

1 mM carnitin

0,5 % BSA

10 μM forskolin

Halvparten tilsettes 10 μM triacsin

2.6 Høstebuffer (PBS)

8 g NaCl

0,2 g KH_2PO_4

2,9 g Na_2HPO_4

0,2 g KCl

1000 ml dH₂O tilsettes
pH justeres til 7,2-7,4 med HCl.

3. cDNA-syntese og real-time PCR

3.1 Reaksjonsmedium til cDNA syntese

13,2 µl RNA (prøve)
2 µl 10 x TaqMan RT buffer
0,8 µl 25 x dNTP mix (100mM)
2 µl 10 x RT Random hexamer
1 µl RNase inhibitor
1 µl Multiscribe Reverse Transcriptase

3.2 Medium til PCR-reaksjon

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

4. Immunblotting

4.1 2x Sample buffer

12,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
10 ml Glycerol
20 ml 10 % SDS
Justeres med dH₂O opptil 50 ml

4.2 12 % Polyakrylamid gel (2 stk)

4,36 ml dH₂O
3,25 ml gelbuffer (1,5 M Tris-Cl pH 8,8)
5,20 ml Monomer løsning (akrylamid)
130 µl SDS løsning (10 %)
65 µl Ammonium persulfat (10 %)
6,5 µl TEMED

4.3 4 % Stack-gel

6,10 ml dH₂O
2,50 ml stackgelbuffer (0,5 M Tris-Cl pH 6,8)
1,30 ml Monomer løsning (akrylamid)
100 µl SDS løsning (10 %)
50 µl Ammonium persulfat (10 %)
10 µl TEMED

4.4 Elektroforesebuffer

100 ml 10 x Tris / glycin / SDS buffer
900 ml dH₂O

4.5 Blottebuffer

100 ml 10 x Tris / glycin buffer

200 ml metanol

700 ml dH₂O

4.6 Blotto / tørrmelk

T-TBS tilsettes 50 g/L tørrmelk (fettfri)

4.7 T-TBS (Tween –Trisbufret saltløsning) (2 L)

10mM Tris base (2,42 g)

100mM NaCl (11,68 g)

Løses i ca 1,8 L dH₂O

pH justeres til 7,5 med konsentrert HCl

Justeres med dH₂O opptil 2 L

0,05 % Tween 20 (1 ml)

4.8 Antistoff benyttet til immunblott

Antistoff	Produsent	Nummer	Kilde	Fortynning	Fungerte
Perilipin 2	Londos	B361	Geit	1:2000	Nei
Perilipin 3	Londos	SZT-2	Kanin	1:2000	Ja
Perilipin 2	Novus 3	NB110-40877	Kanin	1:400	Ja
SCD-1	Cell signaling	24385	Kanin	1:1000	Nei
α -tubulin	Cell signaling	2144	Kanin	1:1000	Ja
Sekundære antistoff					
Anti-kanin	Bio-Rad	170-6515	Geit	1:3000	
Anti-geit	Dako	P0 160	Kanin	1:5000	