

Effekter av elektrisk stimulering av humane skjelettmuskelceller fra ulike donorgupper: normalvektige, ekstremt overvektige og ekstremt overvektige med type 2-diabetes

Florije Memeti

Masteroppgave for graden Master i Farmasi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

Effekter av elektrisk stimulering av humane skjelettmuskelceller fra ulike donorgupper: normalvektige, ekstremt overvektige og ekstremt overvektige med type 2-diabetes

Florije Memeti

Masteroppgave for graden Master i Farmasi



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

Veiledere

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Stipendiat Nataša Nikolić

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2011 til mai 2012. Deler av prosjektet ble presentert i en poster på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen 26.- 29. januar 2012.

En stor takk rettes til mine veiledere, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan og Nataša Nikolić for god oppfølging, rådgiving, veiledning og støtte gjennom hele masteroppgaven. Stor takk til Nataša Nikolić for å ha besvart små og store spørsmål og opplæring og veiledning i laboratoriearbeid. Jeg vil også takke Siril S. Bakke og Eili Tranheim Kase for å ha vært hjelpelige med å svare på spørsmål. Takk til avdelingsingeniør Camilla Stensrud for hjelp med problemer på laboratoriet, og takk til både Camilla Stensrud og Eili Tranheim Kase for opplæring i Western-metoden. Takk til alle i 4. etasje for et hyggelig arbeidsmiljø.

En stor takk rettes også til alle medlemmene av "Muskelbunten" for kunnskapsrike og interessante ukentlige møter. Jeg vil takke jentene på masterkontoret for hyggelige samtaler gjennom året. En spesiell takk til Viyan Tarin for godt vennskap og en kjempe hyggelig tid sammen.

Takk til familien min for støtte og motivasjon under hele studiet.

Blindern, mai 2012

Florije Memeti

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
Summary in English	6
Sammendrag	8
Forkortelser	10
1 Innledning	13
1.1 Overvekt og fedme	13
1.2 Type 2-diabetes	14
1.2.1 Insulinresistens i skjelettmuskel.....	15
1.3 Trening	16
1.3.1 Elektrisk pulsstimulering som en modell for trening.....	18
1.4 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel.....	18
1.5 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel	20
1.6 Effekter av trening på glukosemetabolismen	21
1.6.1 Mekanismer bak treningsindusert glukoseopptak	22
1.6.2 Pyruvat-dehydrogenasekinase 4 (PDK4)	24
1.7 Effekter av trening på fettsyremetabolismen	25
1.7.1 Muskelfibertyper	26
1.8 Interleukin-6 (IL-6)	28
1.9 Cytokrom C (CytC).....	28
1.10 Formål med oppgaven.....	29
2 Materialer og metoder	30
2.1 Materialer	30
2.2 Donorkarakteristika	31
2.3 Celledyrkning	33
2.3.1 Utsåing av satellittceller	33
2.3.2 Proliferasjon av satellittceller og differensiering til myotuber.....	33
2.4 Elektrisk pulsstimulering (EPS) av muskelceller.....	34
2.5 Substratopptaks- og oksidasjonsforsøk	34
2.5.1 Substrat-oksidasjonsforsøk med oljesyre og glukose.....	34
2.5.2 Deoksyglukoseopptak	36

2.5.3	Proteinmåling	36
2.6	Revers- transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real- time-PCR).....	37
2.6.1	Høsting av celler.....	37
2.6.2	RNA-isolering og kvantifisering.....	37
2.6.3	cDNA syntese.....	38
2.6.4	Real-time-PCR	39
2.7	Live imaging	40
2.8	Immunblotting (Westernblotting)	40
2.8.1	Høsting av celler.....	41
2.8.2	Proteinmåling	42
2.8.3	Gelelektroforese	42
2.8.4	Blotting.....	42
2.8.5	Deteksjon av immunoblott og fremkalling.....	42
2.9	Statistiske analyser	43
3	Resultater	44
3.1	Glukosemetabolismen	44
3.1.1	Glukosemetabolismen og effekt av EPS	44
3.1.2	Opptak av deoksyglukose og effekter av insulin og EPS.....	45
3.1.3	Deteksjon av fosforylert Akt ved bruk av Westernblotting	47
3.2	Oljesyremetabolismen.....	48
3.2.1	Oljesyremetabolismen og effekt av EPS	48
3.2.2	Mitochondrie-innhold og lipiddråper, og effekter av EPS.....	49
3.3	Genuttrykk og effekter av EPS.....	52
3.4	Korrelasjonsanalyse	54
4	Diskusjon.....	56
4.1	Glukosemetabolismen og effekter av EPS	56
4.2	Oljesyremetabolismen og effekter av EPS.....	57
4.3	Genuttrykk og effekter av EPS.....	59
5	Konklusjon.....	61
	Litteraturliste.....	62
	Appendiks	68

Summary in English

Background/Aim: Over the past few decades there has been an increase in the number of people with obesity and diabetes. Physical inactivity has contributed to the global rise of obesity, and is also a predictor of type 2-diabetes. Exercise has an important role in both prevention and treatment of obesity and type 2-diabetes. It has previously been developed an *in vitro* model of exercise of cultured human myotubes by applying chronic, low-frequent electrical pulse stimulation (EPS). In the present study, we applied this model to investigate any differences in effects of EPS in cultured myotubes originating from donors of different groups: normal weight donors (NV), extremely obese donors with normal glucose tolerance (EO-NGT) and extremely obese donors with T2D (EO-T2D). We wanted to study whether the characteristics of the donors were reflected in metabolic effects of chronic low-frequent EPS.

Method: Myotubes were grown from satellite cells, established from skeletal muscle biopsy samples of *M. obliquus internus abdominis* of normal weight donors and extreme obese individuals with normal glucose tolerance or type 2-diabetes. Low-frequency (1 Hz, 30 V, 2 ms) EPS was applied continuously to differentiated human myotubes for the last 48 h of the differentiation period. Effects on lipid and glucose metabolism were studied using radiolabeled substrates. Expression level of relevant genes was analysed using RT-real-time-PCR, phosphorylated and total Akt was analysed with Western blotting, and mitochondrial content and lipid droplets were measured by live imaging.

Results: Chronic, low-frequent electrical pulse stimulation (EPS) showed a trend toward an increased glucose oxidation in myotubes from all three donor groups. In cells not exposed to EPS, there was a trend toward a higher increased insulin-induced uptake of glucose in myotubes from both normal weight and extreme overweight donors with normal glucose tolerance compared to myotubes from extreme overweight donors with type 2-diabetes, while EPS did not seem to affect the insulin-induced uptake of glucose. Furthermore, myotubes from all three donor groups exposed to EPS tended to show an increased insulin-stimulated Akt phosphorylation. In the group with normal weight, EPS induced a significant increase in oleic acid oxidation, but this effect was not seen in myotubes from extreme obese donors. Body mass index (BMI) of all three donor groups correlated negatively with oleic acid oxidation after EPS, and BMI of the extreme donor groups correlated positively with the observed increase in mitochondrial content after EPS.

Conclusion: More experiments are necessary to draw clear conclusions about any differences in the effects of chronic, low-frequency electrical pulse stimulation (EPS) in myotubes from the three different donor groups: normal weight, extremely obese with normal glucose tolerance and extremely obese donors with type 2 diabetes.

Sammendrag

Bakgrunn/formål: I løpet av de siste tiårene har det vært en rask økning av fedme og diabetes. Fysisk inaktivitet har bidratt til den globale økningen av fedme, og er også en prediktor for type 2-diabetes. Fysisk aktivitet har en viktig rolle i både forebygging og behandling av fedme og type 2-diabetes. Det er tidligere blitt utviklet en *in vitro*-modell for trening av humane myotuber i kultur ved å anvende kronisk, lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS). Vi ønsket å undersøke eventuelle forskjeller i effekter av EPS på humane skjelettmuskelceller fra ulike donorgrupper: normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D). Det var ønskelig å undersøke om donorkarakteristika ble reflektert i metabolske effekter av kronisk, lavfrekvent EPS.

Metode: Myotuber ble dyrket fra satellittceller isolert fra biopsier fra *M. obliquus internus abdominis* fra normalvektige og ekstremt overvektige pasienter med normal glukosetoleranse eller type 2-diabetes. Kronisk, lavfrekvent EPS (1 Hz, 30 V, 2 ms) ble påført differensierte myotuber i de siste 48 timene av differensieringsperioden. Effekter av EPS på fettsyre- og glukosemetabolismen ble undersøkt ved hjelp av radioaktivt-merkede substrater. Ekspresjon av relevante gener ble undersøkt ved hjelp av RT-real-time-PCR, fosforylert og total Akt ble undersøkt ved hjelp av Westernblotting og mitokondrie-innhold og lipiddråper ble målt ved hjelp av live imaging.

Resultater: Kronisk, lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS) ga tendenser til økt glukoseoksidasjon i myotuber fra alle tre donorgruppene. Ved basalsituasjonen var det tendenser til høyere insulinstimulert glukoseopptak i myotuber fra normalvektige og ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse sammenlignet med myotuber fra ekstremt overvektige donorer med type 2-diabetes, men EPS så ikke ut til å påvirke insulineffekten. Videre så EPS ut til å indusere en økning i insulinstimulert fosforylering av Akt i myotuber fra alle tre donorgruppene. EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjon i myotuber fra normalvektige, men hadde ingen effekt i myotuber fra ekstremt overvektige. Vi fant en korrelasjon mellom kroppsmasseindeks (KMI) og redusert oljesyreoksidasjon når vi så på alle gruppene samlet. Videre fant vi en korrelasjon mellom økning i mitokondrie-innhold og KMI etter EPS når vi kun så på EO-gruppene samlet.

Konklusjon: Flere forsøk er nødvendig for å kunne trekke klare konklusjoner om eventuelle forskjeller i effekt av kronisk, lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS) på myotuber fra de tre ulike donorgruppene: normalvektige, ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse og ekstremt overvektige med type 2-diabetes.

Forkortelser

ACC	Acetyl-CoA karboksylase
Acetyl-CoA	Acetyl-coenzym A
ADP	Adenosindifosfat
Akt/PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosin monofosfat
AMPK	AMP-avhengig kinase
AS160	Akt substrat 160
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert
CACT	Acylkarnitin:karnitin translokase
CaMK	Calmodulin-avhengig proteinkinase
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Koenzym A
CPTI	Karnitin palmitoyltransferase I
CPTII	Acylkarnitin:karnitin
Ct	Cycle Threshold
CytC	Cytokrom C
DEPC-dH ₂ O	dietylpyrokarbonat i destilert vann
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPBS	“Dulbecco’s Phosphate Buffered Salin”
ECL	Enhanced chemiluminescence
EO	Ekstremt overvektige
ECM	Ekstracellulær matriks
EPS	Elektrisk pulsstimulering
ETK	Elektrontransportkjeden
FABP	Fettsyrebindende protein
FAT/CD36	Fettsyretanslokase
FATP	Fettsyretransportprotein

FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GLUT	Glukosetransportør
HRP	Pepperrot-peroksidase
IL	Interleukin
IRS	Insulinreseptorsubstrat
KMI	Kroppsmasseindeks
LD	Lipiddråper
Malonyl-CoA	Malonyl-coenzym A
MCD	Malonyl-CoA dekarboksylase
MHC	”Myosin heavy chain”
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
n	Antall forsøk
NGT	Normal glukosetoleranse
NV	Normalvektige
PBS	Fosfatbufret salin
PCA	Perklorsyre
PDC	Pyruvat dehydrogenase kompleks
PDK-1	3- fosfoinositidavhengig kinase-1
PDK4	Pyruvat dehydrogenase 4
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP2	Fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat
PIP3	Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat
PKC	Proteinkinase C
RT-real-time-PCR	Revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon
SEM	Standardfeil
SDS	Natrium dodekylsulfat
SH2	Src-homology-2
SR	Sarkoplasmatisk reticulum
T2D	Type 2-diabetes
TG-buffer	Tris/Glycine buffer
TGS-buffer	Tris/Glycine SDS buffer

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-TBS	Tween trisbufret saltløsning
WHO	Verdens helseorganisasjon

1 Innledning

1.1 Overvekt og fedme

Verdens helseorganisasjon (WHO) har konstatert at det på verdensbasis var 1,5 milliarder overvektige kvinner og menn over 20 år i 2008, og av disse var tilnærmet 500 millioner klassifisert i fedmekategorien. I 2010 var nesten 43 millioner barn under 5 års alderen overvektige [1]. Det har vært en økende prevalens av fedme på verdensbasis, og siden 1980 har prevalens av fedme mer enn doblet seg [1, 2]. Det er også estimert en økning i prevalens av fedme i fremtiden [2].

WHO definerer overvekt og fedme ved bruk av kroppsmasseindeks (KMI). KMI defineres som en persons vekt i kilogram over kvadratet av høyden i meter (kg/m^2) og WHO benytter dette til å klassifisere overvekt og fedme hos voksne (tabell 1.1). Overvekt er definert som KMI høyere eller lik 25 kg/m^2 , mens fedme defineres som KMI høyere eller lik 30 kg/m^2 [1].

Tabell 1.1: WHO's KMI-klassifisering av overvekt og fedme.
Modifisert fra [3].

Klassifisering	KMI (kg/m^2)
Undervekt	$< 18,5$
Normalvekt	18,5 - 24,9
Overvekt	≥ 25
Fedme	≥ 30
<i>Fedme klasse I</i>	30,0 - 34,9
<i>Fedme klasse II</i>	35,0 - 39,9
<i>Fedme klasse III</i> <i>(ekstrem overvekt)</i>	≥ 40

En energiubalanse mellom inntaket og forbruket av kalorier anses som hovedårsaken til utvikling av fedme, hvor inntaket av kalorier er høyere enn forbruket. Dette sees i sammenheng med redusert fysisk aktivitet og økt kaloriinntak [1, 4]. I tillegg til miljøfaktorer

antas også genetiske faktorer å bidra til den raske økningen i forekomst av fedme [5]. Fedme er assosiert med utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes [6]. Et anslag på 80 % av type 2-diabetikere er klassifisert som overvektige [7]. I tillegg til økt risiko for type 2-diabetes, gir økt KMI økt risiko for kardiovaskulær sykdom, noen krefttyper, gastrointestinal sykdom og leddgikt [1, 7].

Fedme, særlig visceral fedme, er involvert i utviklingen av insulinresistens og type 2-diabetes [8]. Individuer med abdominal fedme har et økt volum av visceralt fettvev [9]. Adipocytter fra visceralt fettvev er store og resistente mot den anti-lipolytiske effekten av insulin, noe som gir økt lipolyse og dermed økte mengder av frie fettsyrer (FFA) [10, 11]. Både ved fedme og hos type 2-diabetikere er det observert forhøyede nivåer av FFA, og er assosiert med insulinresistensen observert i begge gruppene [6]. Fettvev er et endokrint organ som frigjør proinflammatoriske cytokiner som tumornekrose-faktor- α (TNF- α) og interleukin-6 (IL-6), og hormoner som leptin og adiponektin [6, 12]. Overproduksjon av TNF- α , IL-6 og resistin, og redusert produksjon av adiponektin er assosiert med insulinresistens [13]. Pasienter med abdominal fedme og overskudd av visceralt fettvev har vist å ha forhøyede nivåer av proinflammatoriske cytokiner og reduserte nivåer av adiponektin [12]. Adiponektin stimulerer glukoseforbruket og fettsyreoksidasjonen i muskel, øker insulinsensitiviteten i lever og reduserer hepatisk glukoseproduksjon [11].

1.2 Type 2-diabetes

I løpet av de siste tiårene har det vært en rask økning av diabetes [14], og WHO anslår at det på verdensbasis er 346 millioner mennesker med diabetes [15]. Type 2-diabetikere har to til fire ganger høyere risiko for koronar hjertesykdom enn resten av befolkningen, og tilnærmet 75-80 % av diabetikere dør av kardiovaskulære sykdommer [16]. De viktigste gruppene av diabetes er type 1-diabetes og type 2-diabetes [17], hvorav type 2-diabetes står for 90 % av all diabetes [15]. Type 2 diabetes debuterer vanligvis etter 30 års alderen, men kan debutere i alle aldre [17]. Type 1-diabetes oppstår på grunn av insulinmangel, vanligvis som følge av autoimmun destruksjon av β -cellene i de langerhanske øyer i bukspyttkjertelen [17]. Type 2-diabetes skyldes utilstrekkelig insulinproduksjon og insulinresistens [17]. Patofysiologien for type 2-diabetes er karakterisert med perifer insulinresistens, nedsatt regulering av hepatisk glukoseproduksjon og nedsatt funksjon av β -cellene [18]. Ved normal glukosetoleranse vil økt insulinsekresjon kompensere for økt insulinresistens, men ved nedsatt β -cellefunksjon vil

ikke nok insulin kunne sekreseres for å kompensere for insulinbehovet. Dette resulterer i hyperglykemi, og det vil utvikles nedsatt glukosetoleranse og videre type 2-diabetes [19]. Denne β -celledysfunksjonen starter før manifestasjon av type 2-diabetes og forverres progressivt over tid [6, 19]. Studier viser at forhøyede nivåer av FFA er assosiert med fedme og type 2-diabetes [20]. Sammen med hyperglykemi kan forhøyede nivåer av FFA i blodet utøve en glukolipolytisk effekt på β -cellene og påføre mer skade på β -cellene [20].

Risikofaktorer for type 2-diabetes deles inn i modifiserbare og ikke-modifiserbare faktorer. Fedme og fysisk inaktivitet er eksempler på modifiserbare risikofaktorer. Fedme er en viktig risikofaktor for type 2-diabetes og er vist å være en sterk prediktor for utviklingen av type 2-diabetes. Alder og genetiske faktorer er eksempler på ikke-modifiserbare risikofaktorer. Type 2-diabetes er assosiert med en genetisk predisposisjon og prevalensen øker med alderen [16]. Økningen i type 2-diabetes skyldes en aldrende befolkning, populasjonsvekst, kosthold, fedme og en stillesittende livsstil [7, 21].

1.2.1 Insulinresistens i skjelettmuskel

Insulinresistens defineres som en redusert respons på insulin i perifert vev, og forekommer ved fedme og under utviklingen av type 2-diabetes [22]. Ved insulinresistens er det redusert insulinmediert glukoseopptak i fettvev, skjelettmuskel og lever og redusert hemming av hepatisk glukoseproduksjon [23, 24]. Skjelettmuskel står for 85 % av insulinstimulert glukoseopptak i kroppen og er derfor en kritisk komponent ved insulinresistens [22, 23]. Insulinresistens i skjelettmuskel vil påvirke glukosehomeostasen i hele kroppen [25].

Forhøyede konsentrasjoner av FFA i plasma er assosiert med insulinresistente tilstander som type 2-diabetes og fedme [26]. Sammenhengen mellom forhøyede nivåer av FFA og insulinresistens kan involvere akkumuleringen av triglyserider og fettsyremetabolitter som diacylglyserol, acyl-CoA og ceramider i muskel og lever [27, 28]. Økte konsentrasjoner av intramyocellulære fettsyreintermediater som acyl-CoA, ceramider og diacylglyserol er vist å være korrelert med insulinresistens [29]. Det er blitt foreslått at intramyocellulære fettsyreintermediater påvirker insulinsignalerings i skjelettmuskel ved å aktivere fosforylering av serin/treonin-kinaseseter på insulinreseptorsubstrater (IRS-1 og IRS-2), muligens ved å aktivere protein kinase C θ (PKC θ). Serinfosforyleringen medfører at insulinreseptorsubstratene får en redusert evne til å aktivere fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K), og resulterer i reduksjon i aktivering av glukosetransport og nedstrøms signalering

[26, 29]. Dette vil kunne føre til redusert insulinstimulert glukoseopptak i muskel [22]. I en studie av Griffin et al. [30] ble det observert en signifikant økning i membranbundet, eller aktiv, PKC θ i rotter som fikk infusjoner med lipid/heparin i 5 timer. Det ble dessuten observert en omtrent 50 % reduksjon i insulinstimulert IRS-1-assosiert PI3-kinaseaktivitet, og en redusert insulinstimulert IRS-1 tyrosinfosforylering ved lipidinfusjon [30].

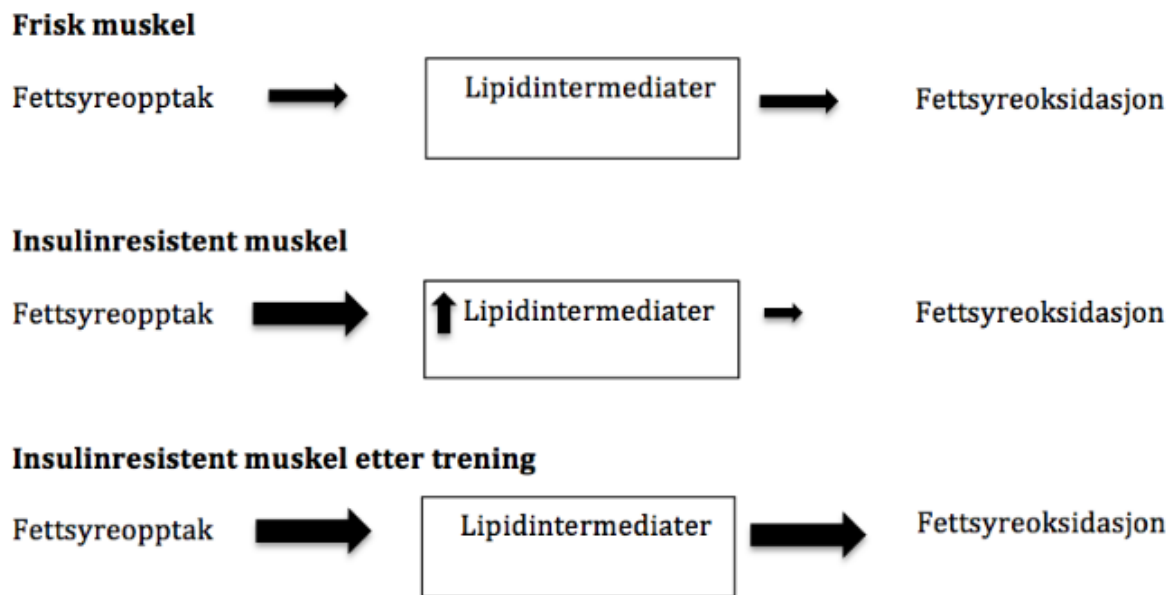
En hypotese for akkumuleringen av lipidintermediater beskrevet ovenfor er redusert fettsyreoksidasjon og økt fettsyreopptak i insulinresistent muskel [22]. Ved fedme synes det å være en slik ubalanse mellom opptak og oksidasjon av fettsyrer i skjelettmuskel [31].

Flere studier foreslår at mitokondriell funksjon kan ha en viktig rolle i patofysiologien av insulinresistens, og har vist at mitokondrielt innhold, mitokondriell funksjon og oksidativ kapasitet er redusert i insulinresistente individer med type 2-diabetes og fedme [32]. Det er videre sett en redusert mitokondriell tetthet i insulinresistent skjelettmuskel i avkom av type 2-diabetikere. Det er dermed foreslått at en nedsatt mitokondriell oksidativ kapasitet kan være en arvet defekt og tidlig markør for utviklingen av insulinresistens [32].

1.3 Trening

Fysisk inaktivitet har bidratt til den globale økningen av fedme, og er også en prediktor for type 2-diabetes [16]. Det er velkjent at fysisk aktivitet er assosiert med redusert risiko for blant annet fedme og type 2-diabetes [33, 34]. Fysisk aktivitet forbedrer insulinsensitiviteten og øker glukoseopptak, glykogensyntese og fettsyreoksidasjon i skjelettmuskel [22, 34], men de molekylære mekanismene for de positive helseeffektene fysisk aktivitet har vist er ikke fullstendig forstått [34].

Trening vil øke fettsyreoksidasjonen i insulinresistent muskel, slik at det gjenoprettes en likevekt mellom fettsyreoksidasjon og fettsyreopptak (figur 1.1) [22].



Figur 1.1: Figur over ubalansen mellom fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon i insulinresistent muskel. Modifisert fra [22].

Det har blitt vist at en moderat økning i energiforbruk ved rask gange i 150 min per uke sammen med en moderat reduksjon i energiinntak, har vært effektiv i forebygging og utvikling av insulinresistens hos type 2-diabetikere, individer med fedme og type 2-diabetikere med fedme [22].

Trening fører til forandring av egenskapene til muskelfibrene [35]. Utholdenhetstrening omfatter treningsøkter av lang varighet og lav intensitet. Løping, sykling og svømming er eksempler på utholdenhetstrening. Utholdenhetstrening fører til økt arbeidskapasitet ved å indusere en økning i maksimal oksygenopptak og ved at skjelettmuskel får en økt evne til å generere energi via oksidativ metabolisme. Muskelfibrene får evnen til å opprettholde en høyere aktivitet over lengre tid og evnen til å motstå tretthet. Ved utholdenhetstrening vil ikke muskelstyrken forbedres. Styrketrening omfatter aktivitet av kort varighet med høy eller maksimal treningsintensitet, og fører til en økning i muskelmasse og muskelstyrke.

Vektløftning er et eksempel på styrketrening. Muskelfibrene får flere myofilamenter, økt diameter og større kontraksjonskraft, men musklene blir ikke mer utholdende [35, 36].

Trening fører til både akutte og kroniske responser. Cellulære forandringer som oppstår etter en enkelt treningsøkt kalles for akutte responser, mens forandringer i muskelceller som vedvarer over en lengre periode, som følge av regelmessig trening, kalles for kroniske

responser [37]. En enkelt treningsøkt øker translokasjonen av glukosetransportøren GLUT4 til plasmamembranen, og er en akutt respons av trening [38].

1.3.1 Elektrisk pulsstimulering som en modell for trening

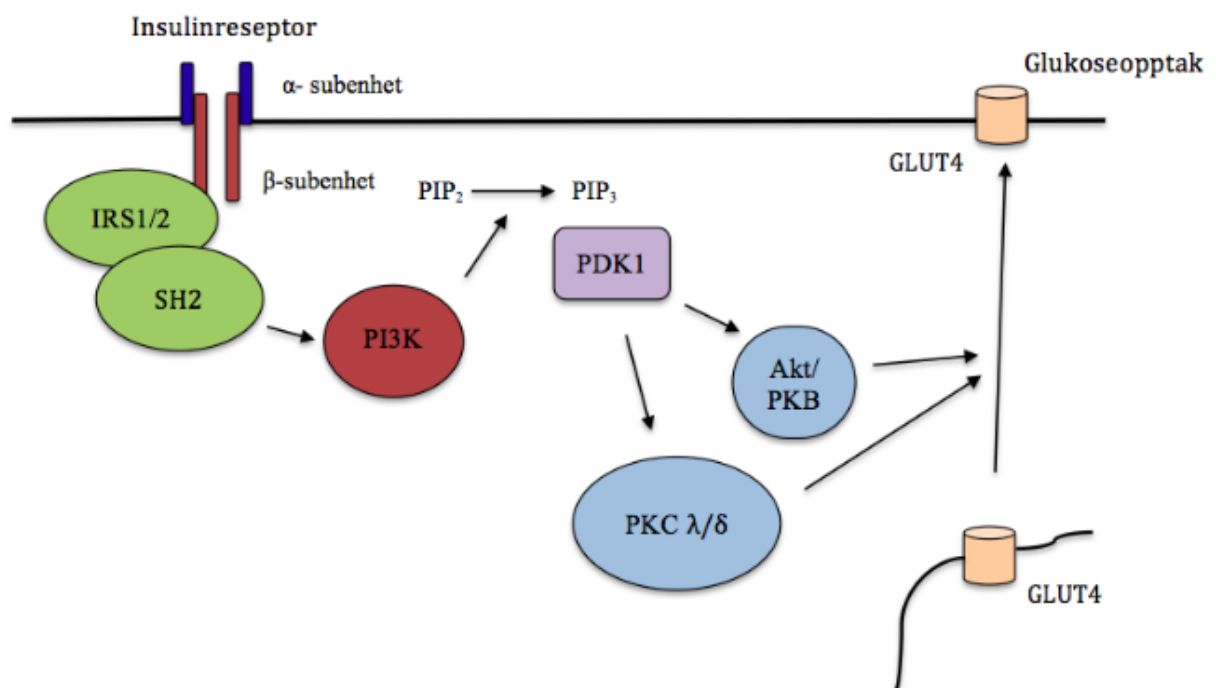
En motorisk nervecelle (motornevron) danner forbindelser med flere muskelfibre. En motornevron og muskelfibrene den danner forbindelser med kalles for en motorisk enhet, og skjelettmuskel består av mange motoriske enheter. Nerveimpulser i de motoriske nervefibrene utløser aksjonspotensialer i skjelettmuskelfibrene, som fører til kontraksjon av muskelfibrene i den motoriske enheten [35]. For myotuber i kultur kan elektrisk pulsstimulering (EPS) brukes som en modell for aktivering av motornevroner i muskelfibre [39].

1.4 Glukosemetabolisme i skjelettmuskel

Insulin er det viktigste hormonet for regulering av glukosekonsentrasjoner i blodet [27, 40]. Når konsentrasjonen av blodsukker øker, sekreterer β -cellene i bukspyttkjertelen insulin [40]. Insulin stimulerer glukoseopptak i muskel og fett, og fremmer på den måten lagring av sukker som intracellulære triglyserider og glykogen i muskel og fett. Insulin vil også hemme hepatisk glukoseproduksjon [27, 40].

Skjelettmuskel utgjør 40 % av kroppsmassen og betraktes som det viktigste organet for insulinstimulert glukoseopptak og glukosehomeostasen [41]. Glukosetransport i skjelettmuskel er mediert av glukosetransportører som tilhører GLUT-familien. GLUT1-transportøren er ansvarlig for basalopptaket av glukose i skjelettmuskel, mens GLUT4-transportøren er ansvarlig for insulinstimulert glukoseopptak i skjelettmuskel og fettvev. Insulin stimulerer translokasjon av GLUT4 fra intracellulære vesikkelbeholdere til plasmamembranen ved å aktivere insulinreseptoren [40, 42]. Insulinreseptoren tilhører reseptortyrosinkinase-familien og består av to α -subenheter og to β -subenheter [27]. Reseptoren aktiveres ved at insulin binder seg til den ekstracellulære α -subenheten, etterfulgt av en autofosforylering av de transmembrane β -subenhetene. Dette fører til fosforylering av insulinreseptorsubstrater (IRS) [40, 42]. IRS-1 og IRS-2 er hovedisoformene uttrykt i skjelettmuskel, hvorav IRS-1 er den mest dominerende formen og er ansvarlig for insulinstimulert glukosetransport [42]. Fosforylert IRS fungerer som et bindingssete for

proteiner med Src Homology 2 (SH2)-domener, og binding av slike proteiner fører til fosforylering og aktivering av fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K). Aktivering av PI3K fører til aktivering og fosforylering av fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat (PIP₃) fra fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat (PIP₂), og aktivering av 3- fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK-1). PDK-1 fosforylerer og aktiverer nedstrøms proteiner som atypisk proteinkinase C λ/δ (PKC λ/δ) og Akt/PKB (protein kinase B), noe som fremmer translokasjon av GLUT4 til plasmamembranen (figur 1.2) [40, 42].



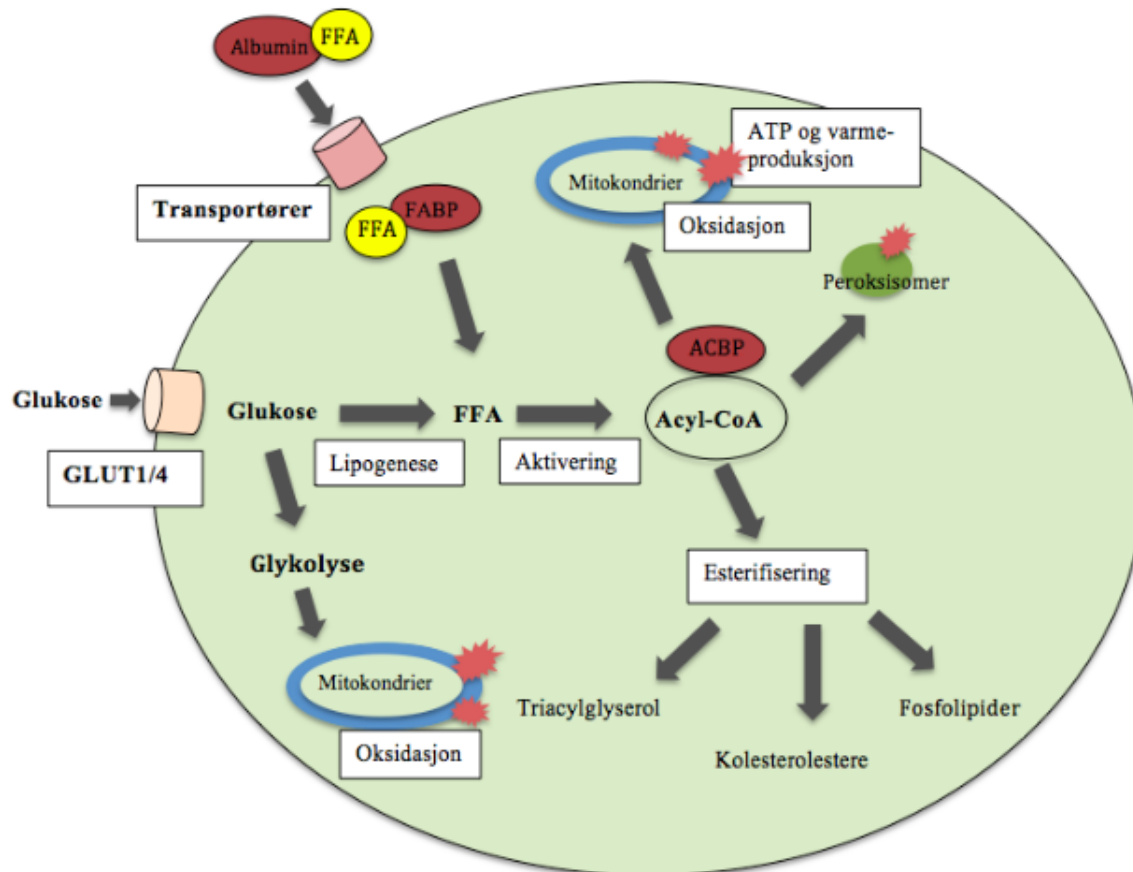
Figur 1.2: Insulinstimulert glukoseopptak. IRS1/2, Insulinreceptorsubstrat; SH2, Src homologi 2; PI3K, fosfatidylinositol 3-kinase; PIP₂, fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat; PIP₃, fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat; PDK-1, fosfor-3-fosfoinositid-avhengig-kinase-1; PKC λ/δ, proteinkinase C λ/δ; Akt/ PKB, protein-kinase-B; GLUT 4, glukosetransportør. Modifisert fra [40, 42].

Når glukose entrer cytosol blir det omdannet til pyruvat via glykolysen. Pyruvat vil i mitokondrien omdannes til acetyl-CoA, som deretter entrer Krebszyklus og oksideres til CO₂ (figur 1.3) [43].

1.5 Fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Fettsyrer er en viktig energikilde for skjelettmuskel [44]. Opptak av fettsyrer skjer enten via passiv diffusjon eller via protein-mediert transport i plasmamembranen (figur 1.3). Flere plasmamembran-assosierte proteiner er identifisert som kandidater for protein-mediert transport, hvorav fettsyre translokase FAT/CD36, plasmamembranbundet fettsyrebindende-protein (FABPm) og fettsyretransportprotein (FATP) spiller en fremtredende rolle [45].

Inne i cellen blir fettsyrer transportert av fettsyrebindende proteiner (FABP) [46]. Acyl-CoA syntase katalyserer aktiveringen av fettsyrer til acyl-CoA i den ytre mitokondrielle membranen [44, 47], og gjør de aktiverte fettsyrene tilgjengelig for β -oksidasjon eller konvertering til komplekse lipider [48]. Acyl-CoA bindende protein (ACBP) binder acyl-CoA og antas å være den dominerende bæreren for acyl-CoA i cellene [48]. ACBP transporterer acyl-CoA til mitokondrier eller peroxisomer for β -oksidasjon eller til endoplasmatisk retikulum for esterifisering til triacylglycerol, fosfolipider og kolesterylestere (figur 1.3) [46]. For β -oksidasjon i mitokondriene må de aktiverte fettsyrene krysse mitokondriens ytre og indre membraner [45]. Et transportsystem bestående av tre proteiner, karnitin palmitoyltransferase I (CPTI), acylkarnitin:karnitin translokase (CACT) og karnitin palmitoyltransferase II (CPTII) står for transport av de aktiverte fettsyrene inn i mitokondriene. CPTI katalyserer omdannelsen av aktiverte fettsyrer til acyl-karnitiner i den ytre mitokondrielle membranen. CACT, et protein i den indre membranen, katalyserer translokasjon av acyl-karnitiner til mitokondriell matriks, hvor CPTII står for konvertering av acyl-karnitinstere til acyl-CoA [44, 47]. Malonyl-CoA regulerer mitokondriell fettsyreoksidasjon ved å hemme CPTI [44]. I mitokondrien gjennomgår acyl-CoA β -oksidasjon og oksideres til acetyl-CoA, som videre metaboliseres i Krebszyklus [49].



Figur 1.3: Fettsyre- og glukosemetabolismen. FABP, fettsyrebindende protein; ACBP, acyl-CoA bindende protein; GLUT, glukosetransportør; CD36/FAT, fettsyretransportør. Modifisert fra [46].

1.6 Effekter av trening på glukosemetabolismen

Trening øker glukoseopptaket i kontraherende skjelettmuskel, og GLUT4 spiller en viktig rolle i reguleringen av glukosetransport i muskel under trening [50]. Trening er vist å øke innhold av GLUT4-protein i skjelettmuskel hos både rotter og mennesker [51]. En studie utført av Huomard et al. [52] undersøkte om kortsiktig trening ga en økning i GLUT4-innhold. Studien viste at 1 times sykling i 7 dager ga tre gangers økning i proteininnholdet av GLUT4 i human skjelettmuskel [52]. Kennedy et al. [38] undersøkte effektene av akutt trening på GLUT4-innholdet i skjelettmuskel hos type 2-diabetikere. Det ble vist økt proteininnhold av GLUT4 i plasmamembranen som respons på 45-60 minutter med trening. Denne studien viser at GLUT4-translokasjon er en viktig cellulær mekanisme bak det økte glukoseopptaket i skjelettmuskel hos type 2-diabetikere under trening [38].

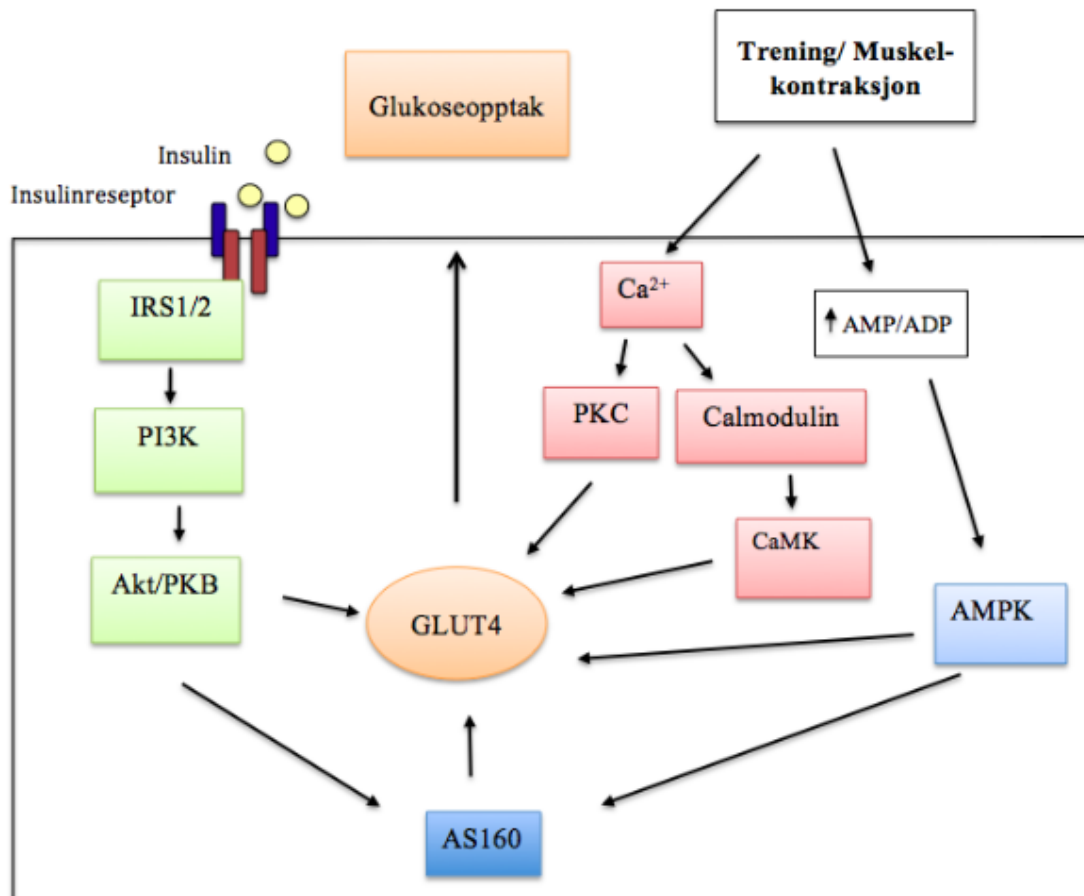
1.6.1 Mekanismer bak treningsindusert glukoseopptak

Kontraksjoner kan stimulere glukosetransport i fravær av insulin, og det er foreslått at insulin og kontraksjoner stimulerer glukosetransport via to ulike signalveier [53, 54]. I motsetning til insulin, har trening eller kontraksjon i muskel ikke vist å ha noen effekt på tyrosinfosforyleringen av insulinreseptoren og IRS1 eller PI3-kinaseaktivitet [54]. Noen studier foreslår at insulin og trening stimulerer forskjellige intracellulære vesikkelbeholdere av GLUT4 [54]. De første trinnene i signalveien for kontraksjonsstimulert glukosetransport er identifisert [53], og to hovedintracellulære mekanismer er foreslått å forklare den kontraksjonsavhengige glukosetransporten [53, 55]. Den ene mekanismen involverer frigjøring av kalsium fra sarkoplasmatiske retikulum (SR), mens den andre mekanismen involverer AMP-aktivert protein kinase (AMPK) (figur 1.4) [53-55].

Kontraksjoner av skjelettmuskel fører til frigjøring av kalsium fra SR, og denne økte konsentrasjonen i myocellulær kalsium er blitt foreslått å være et startsignal for kontraksjonsstimulert glukosetransport og GLUT4-translokasjon [54]. Mekanismen for hvordan kalsium regulerer treningsstimulert glukosetransport er ukjent, men det er usannsynlig at kalsium aktiverer glukosetransport direkte. Dette fordi glukosetransport forblir økt i en betydelig periode etter at en kontraksjon avsluttes, selv om kalsiumkonsentrasjonen i cytoplasma kun er forhøyet i en brøkdel av et sekund etter en muskelkontraksjon. En hypotese er at kalsiumregulerte intracellulære proteiner kan føre til GLUT4-translokasjon [54]. To potensielle proteiner som er identifisert er Ca^{2+} /calmodulin-avhengig protein kinase (CaMK) og protein kinase C (PKC) (figur 1.4) [54, 55]. Studier viser at hemming av Ca^{2+} -frigjøring fra SR eller hemming av CaMK hemmer Ca^{2+} -indusert økning i glukosetransport [53]. Isoformer av PKC klassifiseres i de tre subfamiliene, konvensjonelle PKC, ”nye” PKC og atypiske PKC (aPKC) [54, 55]. Ved bruk av en PKC-hemmer er det observert reduksjon i kontraksjonsindusert glukosetransport, og det er foreslått at konvensjonelle og ”nye” PKC har en rolle i kontraksjonsstimulert glukoseopptak. Resultatene må likevel tolkes med forsiktighet da en uspesifikk hemmer av PKC-isoformene ble benyttet [54-56]. Selv om studier tyder på at konvensjonelle og ”nye” PKC er involvert i kontraksjonsindusert glukoseopptak, er det nødvendig med flere studier for å oppklare rollen til PKC [56].

AMPK er et heterotrimert kompleks og består av α -, β - og γ - subenheter. α -subenheten er katalytisk, mens β - og γ - subenheterne er regulatoriske [54, 57]. AMPK aktiveres av en økning i AMP/ATP- og kreatin/fosfokreatin-forholdet, og kontraksjoner kan redusere konsentrasjoner

av både ATP og fosfokreatin og dermed indusere aktivering av AMPK (figur 1.4) [54]. AMPK-aktivitet er vist å være økt i skjelettmuskel under trening eller kontraksjon [56], og det er blitt observert en korrelasjon mellom en økning i AMPK-aktivitet og glukosetransport i pasienter med type 2-diabetes etter trening [55]. Grad av AMPK-aktivering er avhengig av intensiteten av treningen [56]. Av den AMPK-medierte signalveien og Ca^{2+} -aktiverte signalveien ser den Ca^{2+} -aktiverte signalveien ut til å være den viktigste, ettersom den forekommer i både type-I- og type-II-fibre, mens den AMPK-medierte signalveien kun forekommer i type II-fibre [53]. Akt er en serin/treonin kinase og finnes i isoformene Akt1, Akt2 og Akt3, hvorav alle er uttrykt i skjelettmuskel [54]. Akt aktiveres ved fosforylering nedstrøms for insulinsignalveien [40]. Aktivering av Akt fører til translokasjon av GLUT4 til plasmamembranen, og stimulerer på den måten glukoseopptaket [40, 58]. Noen funn tilsier at muskelkontraksjoner øker Akt-fosforylering og Akt-aktivitet, men hvilken rolle aktivering av Akt har i kontraksjonsmediert glukoseopptak er ukjent [54]. AS160 er et Akt-substrat og er foreslått å være involvert i insulin- og kontraksjonsstimulert GLUT4 translokasjon [54]. En hypotese er at AS160 er en viktig nedstrøms regulator for AMPK [55].



Figur 1.4: Teorier for mekanismer bak treningsindusert glukoseopptak. IRS1/2, insulinreseptorsubstrat; PI3K, Fosfatidylinositol 3-kinase; Akt/PKB, proteinkinase B; GLUT, glukosetransportør; PKC, proteinkinase C; CaMK, calmodulin-avhengig proteinkinase; AMPK, AMP-avhengig kinase; AMP, adenosin monofosfat; ATP, adenosintrifosfat; Ca²⁺, kalsium. Modifisert fra [54].

1.6.2 Pyruvat-dehydrogenasekinase 4 (PDK4)

Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) består av en α -subenhet og en β -subenhet, hvorav kinaseaktiviteten ligger i α -subenheten og β -subenheten er en regulatorisk subenhet [59]. Det er identifisert fire PDK-isoformer i menneske, PDK1-4, hvorav PDK4 er uttrykt i skjelettmuskel og hjerte [59, 60]. Pyruvat dehydrogenase-kompleks (PDC) er det hastighetsbestemmende trinnet i reguleringen av glukoseoksidasjon, og katalyserer dekarboksylering av pyruvat til acetyl-CoA [59, 61]. PDK4 fosforilerer og hemmer PDC, og reduserer dermed glukoseoksidasjon ved å hindre konvertering av pyruvat til acetyl-CoA og CO₂. Dette hindrer glykolytiske intermediater å entre mitokondriene for oksidasjon [60, 62, 63]. PDK4 er en viktig faktor som er involvert i det metabolske skiftet fra oksidasjon av karbohydrater til oksidasjon av fettsyrer [62].

Pilegaard et al. [63] undersøkte effektene av en 4 timers treningsøkt på PDK4-transkripsjon. Ved avsluttet treningsøkt var det over 10 gangers økning i PDK4-transkripsjon, og 2-4 timer etter avsluttet treningsøkt var det over 20 gangers økning i PDK4-transkripsjonen. Effektene av 60-90 minutters trening i 5 sammenhengende dager ble også undersøkt [63]. Det var 5 gangers økning i PDK4 transkripsjonen umiddelbart etter siste treningsøkt og PDK4-transkripsjonen forble forhøyet 2 timer etter avsluttet treningsøkt. 22 timer etter den fjerde treningsøkten gikk nivåene av transkripsjon tilbake til kontroll-nivåer, noe som betyr at aktivering av transkripsjonen var forbigående [63].

1.7 Effekter av trening på fettsyremetabolismen

Trening har vist å øke fettsyreopptaket i muskel, og sammenlignet med hviletilstand kan mild til moderat trening gi 3-10 ganger økt fettsyreoksidasjon [22]. Fettsyreopptak er mediert av transportproteiner i plasmamembranen, og en økning i fettsyreopptak er antatt å være ledsaget av en økning i fettsyretransportører som CD36 eller FABP_{PM} i plasmamembranen [22]. En økning i fettsyreoksidasjon medfølger økt kapasitet for fettsyreopptak i skjelettmuskel, og påfølgende mitokondrietransport og β -oksidasjon. Økningen i fettsyreopptak og fettsyreoksidasjon ved trening er assosiert med oppregulering av membranassosierte fettsyretransportproteiner, FABP_{PM}, FAT/CD36 og CPTI [64].

FAT/CD36 er også identifisert i mitokondriemembranen i skjelettmuskel i studier utført i rotter og mennesker, og er vist å være nødvendig for fettsyreoksidasjon. Elektrisk stimulerte muskelkontraksjoner i rotter har vist å øke konsentrasjoner av FAT/CD36 i mitokondrier, og det er blitt foreslått at FAT/CD36 translokeres til mitokondrier som respons på trening da total-innholdet av FAT/CD36 i muskel var uforandret [65]. En to-timers treningsøkt har vist å gi økning i mitokondrielt innhold av CD36 i humant skjelettmuskel, og denne økningen korrelerte med en økning i fettsyreoksidasjon [66]. Den treningsinduserte økningen i fettsyreoksidasjon var ikke tilstede i CD36 knockout-mus [66]. Det er dermed foreslått at FAT/CD36 translokasjonen til mitokondrier er viktig for den økte fettsyreoksidasjonen som er observert ved trening, men mekanismen bak den økte fettsyreoksidasjonen er ukjent [66]. Utholdenhetstrening har dessuten vist å indusere ca. 37 % økning i proteininnholdet av FABP_{pm} i mennesker [67]. Hemming av denne plasmamembran-fettsyretransportøren

reduserer fetttsyreopptaket [68]. Fetttsyretransportprotein FATP4 er uttrykt i skjelettmuskel, og det er foreslått at den induserer aktivering av fetttsyre til acyl-CoA. Det er vist at FATP er lokalisert i endoplasmatiske membraner, og det er foreslått at det er en viktig intracellulær regulator for fetttsyre. Oppregulering av FATP4-uttrykk i skjelettmuskel ble vist etter 8 uker med utholdenhetstrening, og var assosiert med en økning i fetttsyreoksidasjon. Dette tyder på at FATP4 kan ha en rolle i fetttsyreoksidasjon i skjelettmuskel under trening [67].

Malonyl-CoA regulerer fetttsyreoksidasjon ved å hemme CPTI [44]. Trening har vist å redusere konsentrasjoner av malonyl-CoA ved å aktivere AMPK [69]. AMPK regulerer konsentrasjoner av malonyl-CoA ved å fosforylere og hemme acetyl-CoA karboksylase (ACC), et enzym som katalyserer dannelsen av malonyl-CoA fra acetyl-CoA og CO₂ [69, 70]. Reduserte konsentrasjoner av malonyl-CoA som følge av trening har vist å øke insulinsensitiviteten, og disse forandringene i malonyl-CoA tilskrives endringer i ACC-aktiviteten. Muskelkontraksjoner i gnagere har vist reduksjon i malonyl-CoA-konsentrasjon som følge av aktivering av AMPK og fosforylering av ACC [70]. Denne reduksjonen i malonyl-CoA kan være involvert i den økte fetttsyreoksidasjonen ved trening [70]. Studier i rotter foreslår at konsentrasjoner av malonyl-CoA også kan være regulert av AMPK-indusert økning i malonyl-CoA dekarboksylase (MCD). MCD er et enzym som er ansvarlig for omsetningen av malonyl-CoA [69]. En studie av Kuhl et al. [69] undersøkte effektene av et 12 ukers langtidstreningprogram med styrketrening på reguleringen av malonyl-CoA i humane skjelettmuskler. Konsentrasjonene av malonyl-CoA i muskel var signifikant reduserte 24-36 timer etter siste treningsrunde. Denne nedgangen var assosiert med økt uttrykk og aktivitet av MCD, og det ser ut til at MCD kan være hovedregulatoren av malonyl-CoA da det ikke ble funnet noen forandringer i ACC [69]. CPTI er det hastighetsbestemmende trinnet for fetttsyreoksidasjon og hemmes reversibelt av malonyl-CoA [49]. 9 dager med 60 minutters trening med moderat intensitet ga en signifikant økning i CPTI-uttrykk. Det ble også observert en økt fetttsyreoksidasjon, hvorav denne økte fetttsyreoksidasjonen var assosiert med økt CPTI-uttrykk [71].

1.7.1 Muskelfibertyper

Skjelettmusklene betegnes som tverrstripet muskulatur og er fordelt på ca. 600 separate muskler, hvorav hver muskel består av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver.

Skjelettmuskelceller betegnes også som muskelfibrer. Det indre av muskelfibrene består av

myofibriller som utgjør omtrent 80 % av muskelfibrenes masse. Myofibriller er tynne, sylindriske strukturer som går gjennom hele muskelfiberen, og består av to typer myofilamenter. Myofilamentene er bygd opp av proteinene aktin og myosin. Under en muskelkontraksjon vil ATP bindes til myosin og hydrolyseres til ADP og fosfat. Når ATP spaltes frigjøres det energi som går over til mekanisk arbeid. Når en muskelfiber kontraherer vil den raskt kunne øke energiomsetningen opptil 1000 ganger. Fettsyrer og glukose er de viktigste kildene for produksjonen av ATP. ATP-produksjonen under muskelkontraksjoner skjer ved følgende mekanismer: glykolyse, overføring av en fosfatgruppe fra kreatininfosfat til ADP og oksidativ fosforylering av ADP i mitokondriene [35].

Muskelfibrer deles inn i type I-(langsomme) og type II-(raske) muskelfibrer, hvorav type I-fibre utøver langsomme kontraksjoner og type II-fibre utøver raske kontraksjoner [35, 72]. Type II-fibre deles inn i type IIa-, type IIb- og type IIx-fibre [73]. Type I-fibre er langsomme og oksidative, type IIa-fibre er raske og oksidative, mens type IIx-fibre og type IIb-fibre er raske og glykolytiske [74]. De oksidative fibre danner ATP hovedsakelig ved oksidativ fosforylering, mens glykolytiske fibre i korte perioder er i stand til å dekke ATP-behovet ved glykolyse [35]. Type I-fibre har et høyt innhold av oksidative enzymer, mitokondrier og kapillær forsyning [72, 74], mens type IIx-fibre har et høyt innhold av glykolytiske enzymer og lavt innhold av mitokondrier og kapillær forsyning [74]. Type IIb-fibre er raskere og mer glykolytiske enn type IIx-fibre [74]. De langsomme oksidative fibre er nødvendig for opprettholdelse av kroppsholdning og utholdenhet. De raske glykolytiske fibre er derimot nødvendig for bevegelser som omfatter hastighet og styrke [72].

Det er velkjent at utholdenhetstrening fremmer fenotypiske forandringer i skjelettmuskel mot en mer oksidativ fenotype. Utholdenhetstrening har vist å fremme fibertype-transformasjon fra glykolytisk til oksidativ fenotype i de raske fibertypene ved å fremme transformasjon fra type IIb- eller IIx-fibre til type IIa-fibre [74]. Tanner et al. [75] har vist at individer med fedme har lavere innhold av muskelfibertype I og høyere innhold av muskelfibertype IIb enn normalvektige kontroller. Studier har også vist at type 2-diabetikere har lavere innhold av type I-fibre og høyere innhold av type IIb-fibre sammenlignet med kontroller uten type 2-diabetes [76]. Basert på dyrestudier er det foreslått at type I-fibre er mer insulinsensitive enn type IIa-fibre, som igjen er mer insulinsensitive enn type IIb-fibre [77].

1.8 Interleukin-6 (IL-6)

Skjelettmuskel er identifisert som et endokrint organ, og produserer og frigjør cytokiner ved skjelettmuskelkontraksjoner. Cytokiner som frigjøres fra skjelettmuskel blir kalt for myokiner, og inkluderer IL-6, IL-8 og IL-15 [78]. IL-6-mRNA oppreguleres under skjelettmuskelkontraksjoner, og trening kan gi opptil 100 gangers økning av IL-6 i sirkulasjonen [78, 79]. Produksjon av IL-6 er relatert til både intensitet og varighet av treningen, og kan påvises etter 30 minutter med trening [78, 80]. I en tidligere studie ble det foreslått at økningen av IL-6 i sirkulasjonen under trening er relatert til muskelskader [81], men nyere studier avkrefter denne teorien [82].

Det er blitt foreslått at IL-6 kan være involvert i å mediere glukoseopptak under trening, og det er blitt vist at forhøyede nivåer av IL-6 under trening er assosiert med økt glukoseopptak [83]. *In vivo*-studier utført av Carey et al. [84] viste at IL-6 økte basal og insulinstimulert glukoseopptak ved å øke GLUT4 translokasjonen til plasmamembranen. Disse resultatene var ikke tilstede i celler transfektert med AMPK dominant negativt adenovirus. Studier har vist at IL-6 også kan øke lipidoksidasjonen, og *in vitro*-effektene av IL-6 på glukose- og lipidmetabolisme ser ut til å være AMPK-medierte. Det er vist at IL-6 aktiverer AMPK [84]. Aktivering av AMPK fører til stimulering av fettsyreoksidasjonen [78]. AMPK fosforylerer og hemmer ACC, noe som fører til en reduksjon i malonyl-CoA og en redusert hemming av CPT1 og dermed økt fettsyreoksidasjon [84].

1.9 Cytokrom C (CytC)

Elektrontransportkjeden (ETC) befinner seg i den indre mitokondrelle membranen, og driver dannelsen av ATP gjennom en rekke elektronoverføringer. ETC er sammensatt av fire elektronbærer-komplekser (kompleks I-IV), hvorav cytokrom c (CytC) er en komponent i kompleks III [43, 85]. Cytokrom c kan benyttes som en markør for å følge endringer i mitokondrie-innhold i muskel [86].

1.10 Formål med oppgaven

Tidligere har det blitt utviklet en *in vitro*-modell for trening av humane myotuber i kultur ved å anvende kronisk, lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS). Nikolić et al. [87] har vist at 48 timer med EPS ga økt mitokondrie-innhold og oksidativ kapasitet i humane myotuber i kultur. Målet med denne oppgaven var å undersøke eventuelle forskjeller i effekter av EPS på humane skjelettmuskelceller fra ulike donorgrupper: normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D). Det var ønskelig å undersøke om donorkarakteristika ble reflektert i metabolske effekter av EPS. Følgende delmål for oppgaven ble satt:

- Undersøke effekten av EPS på glukoseopptak og -oksidasjon i humane myotuber fra de tre donorgruppene
- Undersøke effekten av EPS på insulineffekter ved å undersøke glukoseopptak og fosforylert Akt/PKB i humane myotuber fra de tre donorgruppene
- Undersøke effekten av EPS på fettsyreopptak og -oksidasjon i humane myotuber fra de tre donorgruppene
- Undersøke effekten av EPS på uttrykk av gener involvert i fettsyre- og glukosemetabolismen i humane myotuber fra de tre donorgruppene
- Undersøke effekten av EPS på mitokondrie-innhold og lipiddråper i humane myotuber fra de tre donorgruppene

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I), føtalt kalveserum, penicillin-streptomycin, fungizone (amfotericin B) og Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS med Ca^{2+} og Mg^{2+}) ble innkjøpt fra Gibco Invitrogen (Gibco, Life Technologies Paisley, UK). Ultroser G ble innkjøpt fra BioSerpa (Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc, Paris Frankrike). 6-brønners brett Corning® 6 Well Cell Culture Cluster og 25 cm² cellekultur flasker var innkjøpt fra Corning Inc (Corning, NY, USA). 6 brønners brett med glassbunn var fra MatTek (Ashland, MA, USA). Insulin Actrapid® ble innkjøpt fra NovoNordisk, (Bangsværd, Danmark). Glukose, ekstracellulær matriks (ECM) gel, dimetylsulfoksid (DMSO), L-karnitin hydroklorid, bovint serumalbumin (BSA), oljesyre, HEPES og cytochalin B ble innkjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). [¹⁴C] oljesyre (55 mCi/mmol) og D-[¹⁴C (U)]glukose (5 mCi/mmol) kom fra NEN Radochemicals, PerkinElmer (Boston, MA). [³H]deoksyglukose (10 Ci/mmol) kom fra American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA). TopSeal®-A film og OptiPhase Supermix ble innkjøpt fra PerkinElmer (Shelton, Scotland, USA). Ecoscint A scintillasjonsløsning var fra National diagnostics (Hessle, England, UK). Phenethylamine ble kjøpt fra Aldrich chemistry. Metanol og natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3) ble kjøpt fra Merck (Darmstadt, Germany). Agilent Total RNA isoleringskit ble kjøpt inn fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Quant-iT™ RNA BR Assay kit ble kjøpt inn fra invitrogen (USA). High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, SYBR green master mix og MicroAmp® Optical Reaction Plate ble innkjøpt fra Applied Biosystem (Warrington, UK). Primere (GAPDH, CytC, MHCI, MHCIIa, PDK4 og IL-6) ble innkjøpt fra Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). β -merkaptoetanol ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Bodipy 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a, 4a- diaza-s-indacene), MitoTracker Red FM, og Hoechst 33258 ble kjøpt inn fra Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Pierce BCA™ Protein Assay kit ble innkjøpt fra Boule Nordic AS (Ski, Norge). Goat anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugate, 4-20% Tris-HCl Criterion™ Gel, Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards, Immun-Star™ WesternC™ Chemiluminescent kit, 10xTGS (Tris/Glycine/SDS buffer) og 10xTG (Tris/Glycine buffer) ble innkjøpt fra BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS (Levanger, Norge). Akt antibody (#9272) Phospho-Akt (Ser473) antibody ble kjøpt fra Cell Signaling Technology™ (Beverly, MA, USA).

2.2 Donorkarakteristika

Til forsøkene ble det benyttet humane skjelettmuskelceller isolert fra biopsier fra *Musculus obliquus internus abdominis* (indre, skrå bukmuskel) fra normalvektige (NV) og ekstremt overvektige (EO) pasienter med normal glukosetoleranse eller type 2-diabetes.

Muskelbiopsier fra de normalvektige (NV) ble hentet ut fra nyredonorer, mens muskelbiopsier fra de ekstremt overvektige (EO) pasientene ble hentet ut under bariatrisk kirurgi. Celler fra tre ulike donorgrupper ble benyttet: normalvektige (NV) (tabell 2.1), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) (tabell 2.2) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes mellitus (EO-T2D) (tabell 2.3).

Tabell 2.1: Oversikt over donorkarakteristika: Normalvektige (NV).

Donorkode	Alder (år)	Kjønn (M/K)	KMI (kg/m ²)	Fastende glukose (mmol/L)
LD 10	38	K	22,8	6,0
LD 11	28	M	-	4,5
LD 16	33	M	23,0	5,5
LD 23	61	M	21,8	4,8
LD 28	48	K	31,8	4,9
LD 29	35	M	19,6	4,9
LD 32	34	K	22,3	5,1
LD 35	37	K	19,1	4,5
Gjennomsnitt ± SEM	39,3 ± 3,7		22,9 ± 1,6	5,0 ± 0,18

Forkortelser: LD: lean donor, M: mann, K: kvinne, KMI: kroppsmasseindeks, SEM: standardfeil

Tabell 2.2: Oversikt over donorkarakteristika: Ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT).

Donorkode	Alder (år)	Kjønn (M/K)	KMI (kg/m ²)	Fastende glukose (mmol/L)	HbA1c (%)
EO 7	39	K	51	-	-
EO 31	49	K	40	5,4	5,5
EO 36	26	K	36	4,6	5
EO 58	48	K	40	5,1	5,2
Gjennomsnitt ± SEM	40,5 ± 5,3		41,8 ± 3,2	5,0 ± 0,23	5,2 ± 0,15

Forkortelser: EO: ekstremt overvektig, M: mann, K: kvinne, KMI: kroppsmasseindeks, SEM: standardfeil

Tabell 2.3: Oversikt over donorkarakteristika: Ekstremt overvektige med type 2-diabetes mellitus (EO-T2D).

Donorkode	Alder (år)	Kjønn (M/K)	KMI (kg/m ²)	Fastende glukose (mmol/L)	HbA1c (%)
EO 3	63	M	44	-	-
EO 33	51	M	37	8,1	6,5
EO 45	58	M	45	8,4	7
EO 46	48	K	49	7,6	6,5
EO 53	54	M	37	7,2	6,1
EO 57	34	K	54	8	7,7
Gjennomsnitt ± SEM	51,3 ± 4,1		44,3 ± 2,7	7,9 ± 0,21	6,8 ± 0,27

Forkortelser: EO: ekstremt overvektig, M: mann, K: kvinne, KMI: kroppsmasseindeks, SEM: standardfeil

2.3 Celledyrkning

Metoden benyttet til celledyrkingen er utført i henhold til prosedyrene til Gaster et al [88].

2.3.1 Utsåing av satellittceller

Ampuller med satellittceller ble tatt opp fra nitrogentanken og tint raskt i vannbad ved 37 °C.

Cellesuspensjonen ble overført til et 50 ml sentrifugeringsrør og det ble dråpevis tilsatt 5 ml utsåingsmedium. Deretter ble celsuspensjonen sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter.

Toksisk dimetylsulfoksid (DMSO) ble fjernet ved å suge av supernatanten og cellepelletten ble deretter resuspendert i 1 ml utsåingsmedium. Celletettheten ble bestemt ved hjelp av

CountlessTM automated cell counter fra Invitrogen ved å blande like volum av

cellesuspensjonen og 0,4 % tryptanblått i et eppendorfrør. Utsåingsmedium (appendiks 1.1)

ble tilsatt celsuspensjonen til ønsket celletetthet og blandet godt. Celler ble sådd ut på 6-

brønners brett (enten corning[®] CellBIND[®] surface eller brett coatet med ekstracellulær

matriks (ECM)). Det ble sådd ut 100 000 celler i 2 ml utsåingsmedium per brønn. Cellene ble deretter inkubert i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.2 Proliferasjon av satellittceller og differensiering til myotuber

Etter 24 timer ble utsåingsmediet byttet ut med proliferasjonsmedium (appendiks 1.2).

Proliferasjonsmedium ble skiftet hver 2. -3. dag til cellene var ca. 80 % konfluente. Ved

konfluens ble proliferasjonsmedium byttet ut med differensieringsmedium (appendiks 1.3).

Myoblastene begynte da å differensiere til flerkjernede myotuber. Differensieringsmediet ble skiftet hver 2. -3. dag inntil behandling med elektrisk pulsstimulering (EPS) ble igangsatt.

2.4 Elektrisk pulsstimulering (EPS) av muskelceller

De flerkjernede myotubene ble stimulert via karbonelektroder ved bruk av en elektrisk muskelstimulator laget ved Elektronikklaboratoriet, Kjemisk institutt, Universitetet i Oslo. Karbonelektroder festet på lokk som var tilpasset 6-brønnersbrett ble plassert i 6-brønnersbrettene og myotubene ble påført kronisk, lavfrekvent stimulering med enkeltpulser på 2 ms, 30 V og frekvens på 1 Hz de siste 48 timene av den 7-8 dager lange differensieringstiden. Under stimuleringen ble det brukt 2,2 ml differensieringsmedium per brønn slik at karbonelektrodene kom i kontakt med mediet. Differensieringsmediet ble skiftet hver 12. time under stimuleringen.

2.5 Substratopptaks- og oksidasjonsforsøk

Metoden som er brukt i oppgaven er beskrevet av Nikolić et al. [87]. Substratopptaks- og oksidasjonsforsøk ble benyttet for å måle opptak og oksidasjon av de radioaktivt-merkede substratene D-[¹⁴C(U)]glukose og [1-¹⁴C]oljesyre, og opptak av [³H]deoksyglukose i humane myotuber.

2.5.1 Substrat-oksidasjonsforsøk med oljesyre og glukose

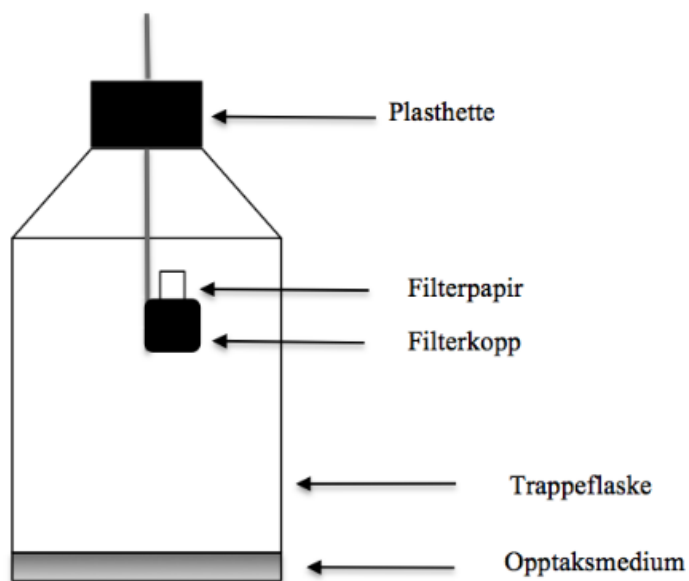
På forsøksdagen, dag 7-8 av differensieringstiden, ble differensieringsmedium byttet ut med opptaksmedium (appendiks 2.1-2.2) inneholdende en av følgende radioaktivt-merkede substrater:

- [1-¹⁴C]oljesyre (1 µCi/ml, 18,3 µM)
- D-[¹⁴C(U)]glukose (0,5 µCi/ml, 172,4 µM)

Cellene ble tilsatt 1 ml opptaksmedium per brønn og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 2 timer. For å unngå tap av CO₂ ble brettene dekket med plastfolie. Deretter ble 500 µl av akuttmedium fra hver brønn overført til hver sin trappeflaske. Trappeflaskene ble gjort lufttette med plasthetter og 300 µl av 1:1 fenyletylamin:metanol ble bruk til å fukte et sammenbrettet filter i brønnen i plasthetten. Deretter ble 100 µl 1M perklorsyre (PCA) tilsatt med kanyle gjennom plasthetten til mediet i bunnen av flasken (figur 2.1). Flaskene ble

inkubert ved romtemperatur i 2 timer for å trappe radiomerket CO_2 . Deretter ble brønnene med filter overført til tellerør. Hvert tellerør ble tilsatt 3 ml Optiphase supermix eller Ecoscint A scintillasjonsløsning og ristet godt. Radioaktivitet ble målt i 1900 TR, Liquid Scintillation Analyzer.

Mengde celleassosiert radioaktivitet (CA) i cellene ble målt ved at opptaksmediet ble fjernet og cellene vasket tre ganger med 1 ml iskald PBS-buffer med en pH-verdi på 7,4. Deretter ble cellene lysert med 500 μl 0,1 M NaOH. Lysatet ble fryst ned ved $-20\text{ }^\circ\text{C}$, og tatt opp igjen noen dager etter for å måle celleassosiert radioaktivitet. Cellelysatet ble først skrapet løs og 250 μl av homogenisert lysat fra hver brønn ble så overført til egne tellerør. Hvert tellerør ble tilsatt 3 ml Optiphase supermix eller Ecoscint A scintillasjonsløsning og ristet godt. 2 x 50 μl av akuttmedium ble overført til tellerør og tilsatt 3 ml Optiphase supermix. Radioaktivitet ble deretter målt i 1900 TR, Liquid Scintillation Analyze.



Figur 2.1: Trappeflaske.

2.5.2 Deoksyglukoseopptak

Forsøk ble gjort på dag 7-8 av differensieringstiden ved å tilsette opptaksmedium inneholdende følgende radioaktivt-merkede substrat:

- [³H]deoksyglukose (1μCi/ml, 0,1 μM)

På forsøksdagen ble differensieringsmedium byttet ut med 1 ml pre-inkuberingsmedium med og uten 100 nM insulin og med og uten 20 μM cytochalin B (appendiks 2.3) per brønn, og cellene ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 1 time. Deretter ble pre-inkuberingsmediet erstattet med 1 ml opptaksmedium med og uten 100 nM insulin og med og uten 20 μM cytochalin B (appendiks 2.4) per brønn, og inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂ i 1 time. Mediet ble da fjernet og cellene vasket tre ganger med 1 ml iskald PBS-buffer med en pH-verdi på 7,4 og lysert med 500 μl 0,1M NaOH. Cellelysatet ble fryst ned ved - 20 °C. Lysatet ble tatt opp igjen etter noen dager for å måle opptak av [³H]deoksyglukose. Cellelysatet ble først skrappt løs og deretter ble 300 μl av homogenisert lysat fra hver brønn overført til egne tellerør. Hvert tellerør ble tilsatt 3 ml Optiphase supermix eller Ecoscint A scintillasjonsløsning. 2 x 50 μl av opptaksmediene ble også overført til egne tellerør og tilsatt 3 ml Optiphase supermix eller Ecoscint A scintillasjonsløsning. Radioaktiviteten ble deretter målt i 1900 TR, Liquid Scintillation Analyzer. Cytochalin B hemmer det spesifikke glukoseopptaket. Det uspesifikke opptaket ble bestemt ved bruk av cytochalin B og ble trukket fra de presenterte resultatene.

2.5.3 Proteinmåling

Metoden benyttet til proteinmåling er utarbeidet av Bradford [89]. Homogenisert cellelysat fra hver brønn ble overført til 96-brønners-mikrotitrerplate (10 μl per brønn). Det ble laget en standardkurve bestående av BSA i ulike konsentrasjoner løst i 0,1 M NaOH.

Konsentrasjonene av BSA som ble benyttet for å lage standardkurven var 0, 10, 20, 40, 80 og 160 μg/ml. Deretter ble hver brønn tilsatt 200 μl Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate fortynnet 1:5 i destillert vann. Prøvene ble hensatt i 5 minutter i romtemperatur før absorbansen ble målt ved bølgelengde 595 nm i Wallac VictorTM mikroplateleser.

Proteinkonsentrasjoner i prøvene ble beregnet basert på de kjente proteinkonsentrasjonene i standardkurven.

2.6 Revers- transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real- time-PCR)

Revers-transkriptase-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR) er en metode som benyttes for å måle mRNA-uttrykk. I denne oppgaven ble RT-real-time-PCR brukt til å måle eventuelle endringer i genuttrykk i de 3 donorgruppene og eventuelle endringer etter behandling med EPS.

Ved real-time-PCR amplifiseres DNA. PCR er en syklus på tre trinn, hvorav det første trinnet er en denatureringsfase (95 °C) i 15 sekunder, hvor det dobbeltrådede DNA-et blir separert til enkelttrådet DNA. Videre senkes temperaturen til 60 °C i 60 sekunder for at primere kan binde til templat DNA, og etterfølges av en amplifikasjonsfase (72 °C) hvor DNA amplifiseres. Denne syklusen gjentas 40 ganger [90]. Mengden amplifisert DNA kvantifiseres ved hjelp av det fluorescerende stoffet SYBR Green I i SYBR Green Master-mix. SYBR Green I binder seg til dobbeltrådet DNA, og grad av fluorescens øker proporsjonalt med DNA-konsentrasjonen. I de første syklusene vil ikke fluorescenssignal kunne skilles fra bakgrunnsignal. Etter hvert som mengde produkt øker dannes det et signal som øker eksponentielt med mengde DNA som amplifiseres. Antall sykluser som kreves for å nå terskelverdien kalles Ct (Cycle treshold) og representerer når fluorescens detekteres (den laveste detekterbare grensen). Jo større mengde cDNA i prøven, desto lavere er Ct-verdien [91].

2.6.1 Høsting av celler

Cellene ble høstet på dag 7-8 av differensieringen. Høstingen ble utført ved å vaske cellene to ganger med 1xPBS i DEPC-dH₂O og deretter ble cellene fra tre brønner lysert med 450 µl lysisbuffer fra Agilent Technologies. Cellelysatet ble skrapet og overført til autoklaverte eppendorfrør, og deretter fryst ned ved -70 °C.

2.6.2 RNA-isolering og kvantifisering

Fremgangsmåten for RNA-isolering er beskrevet av Agilent Technologies®. Cellelysatet ble tatt ut av fryseren og tint på varmeblokk i 20 minutter ved 37 °C. Til RNA-isoleringen ble det brukt et kit fra Agilent Technologies®. I dette kittet fulgte det med nukleasefritt vann, vaskeløsning og ulike kolonner. 450 µl lysat ble overført til miniprefiltreringskolonner og

sentrifugert ved 16 000 g i 3 minutter. Ved dette trinnet ble større cellefraksjoner fjernet fra filtratet. Filtratet ble tilsatt et like stort volum 70 % etanol, blandet godt og inkubert i 5 minutter i romtemperatur. Deretter ble 450 µl av løsningen overført til en mini-isolasjonskolonne og sentrifugert ved 16 000 g i 30 sekunder. Ved dette trinnet satt RNA festet i kolonnen. Resterende 450 µl filtrat ble overført til mini-isolasjonskolonnen og igjen sentrifugert ved 16 000 g i 30 sekunder. Kolonnen ble deretter vasket to ganger med 500 µl vaskeløsning og sentrifugert ved 16 000 g i 30 sekunder. For å fjerne siste rest av vaskeløsningen ble mini-isolasjonskolonnen sentrifugert ved 16 000 g i 2 minutter. Til slutt ble RNA eluert ut ved å tilsette 15 µl nukleasefritt vann til kolonnen og deretter sentrifugert i 1 minutt ved 16 000 g.

For å kvantifisere RNA ble det benyttet et kit fra Invitrogen™ med Quant-it™ reagent, Quant-it™ buffer og to standarder. Det ble laget en Quant-it™ arbeidsløsning ved å fortynne Quant-it™ reagent med Quant-it™ buffer i forholdet 1:200. 10 µl av hver av standardene fra kittet ble fortynnet med 190 µl arbeidsløsning, mens prøvene ble fortynnet 1:200 med arbeidsløsning. Mengde RNA ble kvantifisert ved hjelp av Qubit™ fluorometer. Både standarder og prøver ble satt inn og lest av i Qubit™ fluorometer.

2.6.3 cDNA syntese

mRNA isolert fra celler kopieres til cDNA (komplementær dobbeltrådet DNA) ved revers transkripsjon [92] for å kunne undersøke endringer i mRNA-uttrykket ved hjelp av real-time-PCR.

0,5-2 µg total RNA fra de ulike prøvene ble overført til hvert sitt mini-eppendorfrør (MicroAmp®). DEPC-dH₂O ble tilsatt prøvene til sluttvolum på 10 µl. Deretter ble det tilsatt reaksjonsmedium for komplementær cDNA syntese (appendiks 3.1). Prøvene ble satt inn i Thermal Cycler 9600 Perkin-Elmer hvor cDNA syntese ble igangsatt. I synteseapparatet ble prøvene først utsatt for 25 °C i 10 minutter (hexamer i templatpriming), så 37 °C i 80 minutter (revers transkriptase), og tilslutt 85 °C i 5 sekunder (revers transkriptase-inaktivering).

2.6.4 Real-time-PCR

Det ble laget standarder for hvert gen ved å blande lik mengde av de ulike cDNA-prøvene til en cDNA miks, og deretter fortynne dette 1:5 i DEPC- dH₂O i 4 ulike konsentrasjoner (1000, 200, 40, 8). Denne fortynningsrekken ble brukt til å lage en standardkurve. Standardkurven ble anvendt til å beregne mengde amplifisert cDNA i de ulike prøvene. Deretter ble det laget en SYBR Green PCR Master-mix (appendiks 3.2) for hvert gen, bestående av 2 x SYBR Green Master-mix, forward og revers primer (tabell 2.4) og DEPC-dH₂O til et totaltvolum av 22,5 µl per prøve. Prøvene ble først fortynnet 1:10 eller 1:5 i DEPC-dH₂O avhengig av hvilket gen som skulle undersøkes. 2,5 µl av hver standard, negativ kontroll og hver fortynnet cDNA-prøve ble overført til MicroAmp® Optical Reaction Plate i hver sin brønn. Deretter ble det tilsatt 22,5 µl SYBR Green PCR Master-mix per brønn. MicroAmp® Optical Reaction Plate ble så satt inn i ABI PRISM 7000 Applied Biosystems. Resultatene ble normalisert mot den endogene kontrollen GAPDH.

Tabell 2.4: Primere brukt ved RT-Real-Time-PCR.

Gener	Genbank nummer	Primere
GAPDH	J04038/M33197	F: 5`TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3` R: 5`-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3`
MHCI	NM005963	F: 5`-CCA GAC TGT GTC TGC TCT CTT CA-3` R: 5`-ATG GAG CAT GAG CTT GTC CTG-3`
MHCIIa	NM017534	F: 5`-AGG TCG GCA ATG AGT ATG TCA-3` R: 5`-GAA GAT GTT CCT GTG-3`
IL-6	NM000600	F: 5`-CGG GAA CGA AAG AGA AGC TCT AT-3` R: 5`-AGG CGC TTG TGG AGA AGG A-3`
Cytokrom C	NM001916	F: 5`-CTG CCA ACA ACG GAG CAT T-3` R: 5`-CGT GAG CAG GGA GAA GAC GTA-3`
PDK4	BC040239	F: 5`-TTC CAG ACC AAC AAA TTC ACA-3` R: 5`-TGC CCG CAT TGC ATT CTT A-3`

Forkortelser: F: forward, R:revers

2.7 Live imaging

Metoden benyttet i oppgaven er beskrevet av Nicolic et al. [87] og Hessvik et al. [93]. Cellene ble sådd ut på 6-brønners brett med glassbunn. Før utsåing ble brettene coatet med ECM. Cellene ble på dag 7-8 av differensieringen inkubert ved 37 °C, 5 % CO₂ i 10 minutter med 500 µl BODIPY 493/503 (2 µg/ml) per brønn for å farge lipiddråper. BODIPY 493/503 er en lipofil fargeløsning som farger lipiddråper ved å gå inn i den upolare lipidkjernen. Myotubene ble deretter inkubert i 15 minutter med 500 µl MitoTracker®Red FM (100 nM) per brønn for å farge mitokondrier og i 20 minutter med 500 µl Hoechst 33258 (2,5 µg/ml) per brønn for å farge kjerner. Cellene ble vasket med 0,75 ml PBS per brønn mellom hver inkubering og etter siste farging ble det vasket 2 ganger og tilsatt 1,75 ml fargeløst medium før den levende bildebehandlingen (totalt 2 ml i brønnen). Olympus Scan^R platform ble benyttet til live imaging. Plattformen inkluderte et Olympus IX81 invertert fluorescens-mikroskop som basis for plattformen, og det ble benyttet til visualisering av lipiddråper, kjerner og mitokondrier ved bruk av standard filtersett med eksitasjonsvindu for BODIPY 493/503 (grønn fluorescens ved 488 nm), Hoechst 33258 (blå fluorescens ved 405 nm) og MitoTracker®Red FM (rød fluorescens ved 559 nm), samt et trippelt båndfilter for emisjon. Det ble brukt et 20X objektiv og bilder ble tatt ved 25 posisjoner per brønn i 7 rammer i z-retning med en avstand på 1 µm, og det ble lagret et projeksjonsbilde av disse snittene. Dette ble gjort for hver fargekanal og ved hver posisjon. Scan^R analysis software ble benyttet til å analysere og kvantifisere antall kjerner, lipiddråper og mitokondrie-innhold (intensitet av MitoTracker®Red FM) per bilde.

2.8 Immunblotting (Westernblotting)

Immunblotting eller westernblotting er en metode som benyttes til å detektere og kvantifisere spesifikke proteiner. Proteinene detekteres på en membran ved hjelp av antistoff.

Gelelektroforese ble brukt til å separere proteinene i et elektrisk felt på bakgrunn av molekylstørrelse. Til gelelektroforesen ble det benyttet en 4-20 % Tris-HCl CriterionTM Gel fra BioRad, som er en polyakrylamid-gradientgel. Etter gelelektroforesen overføres de separerte proteinene til en membran som er inkubert i et primært antistoff for det proteinet man ønsker å detektere. Membranen binder proteiner uspesifikt og legges derfor først i

tørrmelk før primært antistoff tilsettes, for å hindre uspesifikk binding av antistoff. Videre inkuberes membranen i et primært antistoff mot det proteinet man ønsker å detektere. Deretter vaskes membranen og det tilsettes et sekundærtantistoff bundet til pepperrot-peroksidase (HRP) som bindes til primærtantistoffet. Enhanced kjemiluminescens ble benyttet til å detektere immunoreaktive bånd. Metoden baserer seg på reaksjonen mellom et oksiderende middel og luminol, et kjemiluminescerende substrat, og katalyseres av HRP [94]. Det produseres lys og enhancer blir benyttet til å øke varigheten og intensiteten av lyssignalet [94]. Relativ lysintensitet er relatert til proteinmengde og brukes som et mål på kvantifisering.

I denne oppgaven ble westernblotting brukt til å undersøke EPS-effekten på insulin-indusert Akt-fosforylering i de tre donorgruppene. Optisk tetthet for fosforylert og total Akt ble målt, og brukt til å beregne andelen fosforylert Akt av total Akt. Andelen fosforylert Akt/total Akt i myotubene ble bestemt for å si noe om behandling med EPS gir forskjeller i insulinsensitiviteten i donorgruppene.

2.8.1 Høsting av celler

Cellene ble på dag 7-8 av differensieringen stimulert med 100 nM insulin eller kontroll (PBS), som ble tilsatt til differensieringsmediet, i 15 minutter. Differensieringsmediet ble så sugd av og cellene vasket to ganger med 1 ml PBS per brønn, før de ble lysert i 100 µl sample buffer (appendiks 4.1) per brønn. Deretter ble cellene skrapet løs og overført til rør som tålte koking og kokt på vannbad i 5 minutter. Koking av prøvene og SDS i sample bufferen fører til denaturering av proteinene i prøven. Denatureringen forårsaker at proteinet mister sin tredimensjonale konfirmasjon og får en negativ ladning. Det ble tatt ut 25 µl fra hver prøve til proteinmåling og fryst ned ved -20 °C. 10 % beta-mercaptoetanol ble så tilsatt prøvene for å bryte disulfidbindinger. Ved å bryte disulfidbindinger forhindres nydannelse av den tredimensjonale konfirmasjonen. Disulfidbindingene sørger for proteinets tredimensjonale konfirmasjon og beta-merkaptoetanol vil hindre gjengdannelsen av disse disulfidbindingene. Det ble videre tilsatt 5 % bromfenolblått i prøvene for farging. Prøvene ble så kokt i fem minutter og fryst ved -20 °C.

2.8.2 Proteinmåling

Proteinmålingen ble utført ved bruk av standardisert BCATM Protein Assay Kit fra Pierce. Prøvene ble fortynnet i forholdet 1:7 ved å tilsette 5 µl prøve til 30 µl destillert vann. Det ble laget standardkurve ut ifra 2 mg/ml BSA i samplebuffer som videre ble fortynnet 1:7 i destillert vann. 35 µl av standardløsningene ble tilsatt 0,7 ml og ble sammen med prøvene inkubert på varmeblokk ved 60 °C i 30 minutter for så å bli avkjølt. Deretter ble 300 µl av hver prøve og standard fordelt i en mikrotiterplate med 2 paralleller av hver. Prøvenes absorbans ble målt ved bølgelengde 595 nm i Wallac VictorTM mikroplateleser, og de ukjente proteinkonsentrasjonene ble beregnet ved hjelp av standardkurven.

2.8.3 Gelelektroforese

Gelplatene ble lagt i et gelkar fylt med elektroforesebuffer (appendiks 4.2) i midtkammeret mellom gelplatene og i resten av gelkaret. Det ble tilsatt 5 µl standard (Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color standards) i den første brønnen. Prøvene ble så tilsatt i hver brønn i et prøvevolum som var korrigert for proteinkonsentrasjonen, slik at konsentrasjonen ble lik i alle brønnene. Elektroforesen ble deretter satt i gang og kjørt på 200 V i ca. 50 min.

2.8.4 Blotting

Brønnskammene ble først fjernet fra hver gelplate, og deretter ble gelplatene fuktet i blottebuffer (appendiks 5.3) i 5-10 minutter. Det ble deretter laget en sandwich av filterpapir, membran og gel etter Hoefers metode i blottemaskinen. Mellom hvert lag i sandwichen ble det fuktet med blottebuffer og eventuelle luftbobler ble fjernet med en rulle. Blotting, hvor proteiner og standard fra gelen ble overført til membranen, ble utført ved at strøm ble satt på 100 mA i ca 45 minutter.

2.8.5 Deteksjon av immunoblott og fremkalling

Etter dette ble membranen tatt ut av sandwichen og rullet sammen i et sentrifugerør, hvor membranen ble blokkert med 5 % tørrmelk (appendiks 5.4) i en time under vipping ved romtemperatur. Tørrmelken vil blokkere uspesifikke bindingssteder i membranen. Etter en time erstattes tørrmelken med primært antistoff (tabell 2.6) i tørrmelk og T-TBS (tween trisbufret saltløsning). Dette ble inkubert over natten under vipping ved 4 °C i kjølerom. Etter endt

inkubering ble primærantistoffet helt av og membranen vasket 3 ganger med T-TBS i 5-15 minutter. Sekundært antistoff (tabell 2.5) i tørrmelk og T-TBS ble så tilsatt membranen og inkubert i 60 minutter under vipping ved romtemperatur, og deretter vasket 3 ganger med T-TBS i 5-15 minutter.

Til fremkallingen ble det brukt Immun-StarTM Western CTM Chemiluminescent kit fra BioRad. Peroxide solution og luminol/enhancer solution fulgte med kittet, hvorav det ble laget fremkallervæske ved å blande løsningene i forholdet 1:1. Membranen ble inkubert i fremkallervæske i 3-5 minutter og deretter satt in i Molecular Imager[®] ChemiDocTM XRS+ fra BioRad for eksponering og fremkalling. Image LabTM Software 4 ble brukt til kvantifisering.

Tabell 2.5: Oversikt over primære og sekundære antistoff brukt til deteksjon av fosforylert og total Akt.

Mål protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundærantistoff	Fortynning
Fosforylert Akt/PKB	Kanin-antiFosfo-Akt	1:500	Geit-antikanin	1:3000
Total Akt/PKB	Kanin-antiAkt	1:500	Geit-antikanin	1:3000

2.9 Statistiske analyser

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

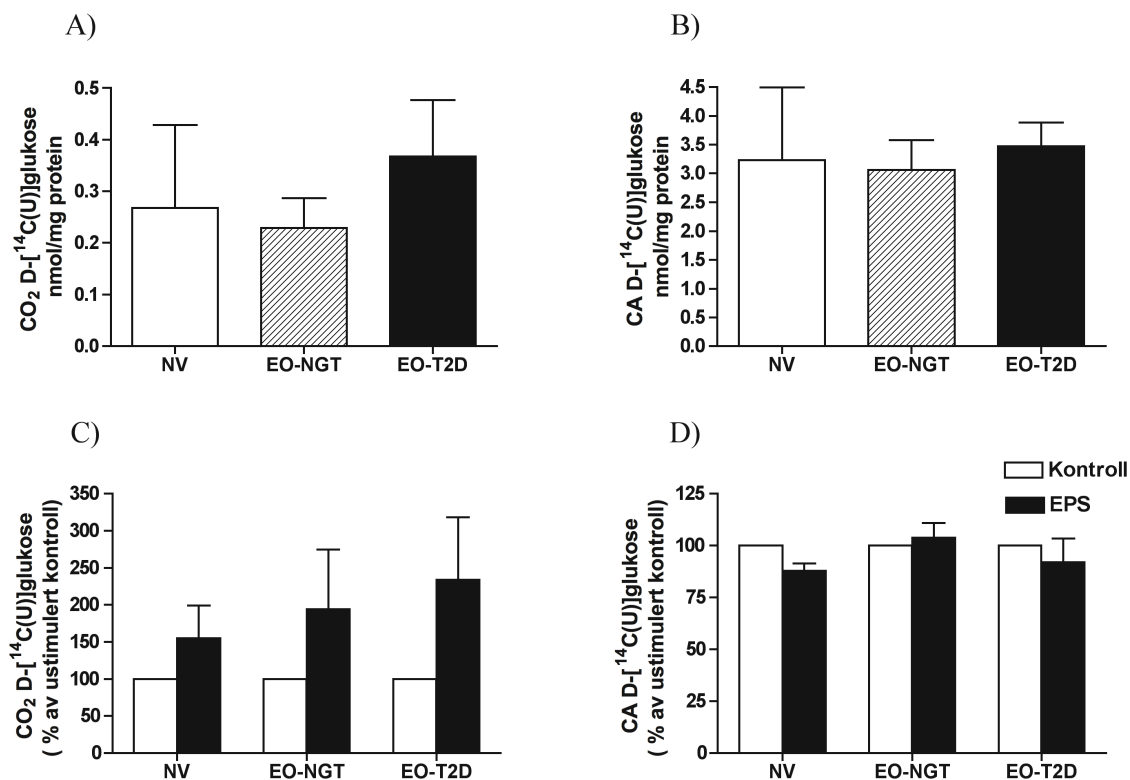
Gjennomsnittsverdien for hver donor er beregnet fra 3 paralleller i RT-real-time PCR, 2 paralleller i live imaging og westernblotting, 2-3 paralleller i deoksyglukoseopptaket og 3 paralleller i glukose- og oljesyreopptak. 3 paralleller ble slått sammen til en prøve i substratoksidasjonsforsøkene. Statistiske analyser ble utført ved bruk av tosidig Student's t-test i GraphPad Prism 4 for Mac. I denne oppgaven ble det brukt et signifikansnivå på 0,05 ($\alpha = 0,05$). Korrelasjonsanalysene ble gjennomført ved bruk av Pearson korrelasjon og Spearman korrelasjon i GraphPad Prism 4 for Mac.

3 Resultater

3.1 Glukosemetabolismen

3.1.1 Glukosemetabolismen og effekt av EPS

Nikolić et al. [87] har vist at behandling med EPS ga økt glukosemetabolisme i muskelceller isolert fra normalvektige donorer. Vi ønsket å undersøke basalkapasitet for glukoseopptak og glukoseoksidasjon i muskelceller fra de tre ulike donorgruppene; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D). Det var også ønskelig å undersøke hvilke effekter kronisk, lavfrekvent EPS hadde på glukosemetabolismen i myotuber fra de tre ulike donorgruppene, og om det var forskjeller mellom gruppene. EPS ble påført myotubene i de siste 48 timene av differensieringsperioden og ustimulerte celler ble benyttet som kontroll. Glukoseopptak og glukoseoksidasjon ble undersøkt ved å inkubere myotubene med D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) i 2 timer og måle CO_2 og celleassosiert radioaktivitet (CA). Det var ingen forskjell mellom de tre donorgruppene på basalkapasiteten for glukoseoksidasjon (CO_2) og celleassosiert radioaktivitet (CA) (figur 3.1 A og B). Det var tendenser til økt glukoseoksidasjon (CO_2) i myotuber fra alle tre donorgruppene etter behandling med EPS (figur 3.1 C). Behandling med EPS så ikke ut til å ha effekt på celleassosiert radioaktivitet (CA) i noen av de tre donorgruppene (figur 3.1 D).



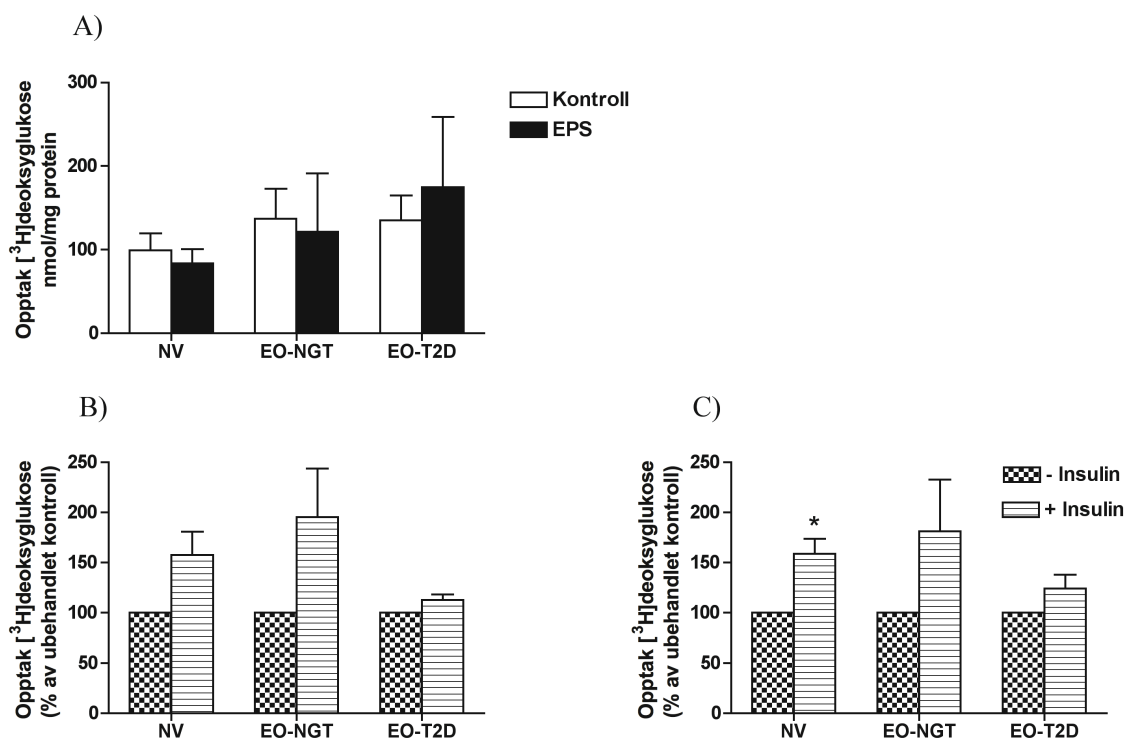
Figur 3.1: Basalkapasitet for glukoseoksidasjon og -opptak og effekter av EPS på glukoseoksidasjon og -opptak. Basalkapasitet for CO₂ (A) og CA (B), og effekter av EPS på CO₂ (C) og CA (D) i de tre donorgrupperne; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). På forsøksdagen ble myotubene inkubert i 2 timer med D-[¹⁴C(U)]glukose (0,5 1μCi/ml). Myotubene ble behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden og betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz (1 EO-NGT-donor og 1 EO-T2D-donor fikk ved en feil en frekvens på 4 Hz under stimuleringen). Data er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n=3-4 for NV-gruppen, n=4 for EO-gruppene. Data for basalkapasitet er oppgitt i absolutte verdier, og data for behandling med EPS er relaterte til ustimulert kontroll.

3.1.2 Opptak av deoksyglukose og effekter av insulin og EPS

Videre var det ønskelig å undersøke basalkapasiteten og effekten av kronisk, lavfrekvent EPS på glukoseopptaket i muskelceller fra de tre ulike donorgrupperne ved å benytte [³H]-deoksyglukose. EPS ble påført myotubene i de siste 48 timene av differensieringsperioden og myotuber som ikke fikk EPS ble brukt som ustimulert kontroll. Vi ønsket også å undersøke effekten av insulinstimulering på glukoseopptaket ved basalsituasjon og ved kronisk, lavfrekvent EPS. Ved dette tilfellet ble myotuber som ikke fikk insulin brukt som kontroll. Myotubene ble inkubert med [³H]deoksyglukose (1μCi/ml) med og uten 100 nM insulin i 1

time. Det så ikke ut til å være forskjell mellom de tre donorgruppene på basalkapasiteten for glukoseopptaket, og ingen effekt av EPS ble sett på glukoseopptaket (figur 3.2 A).

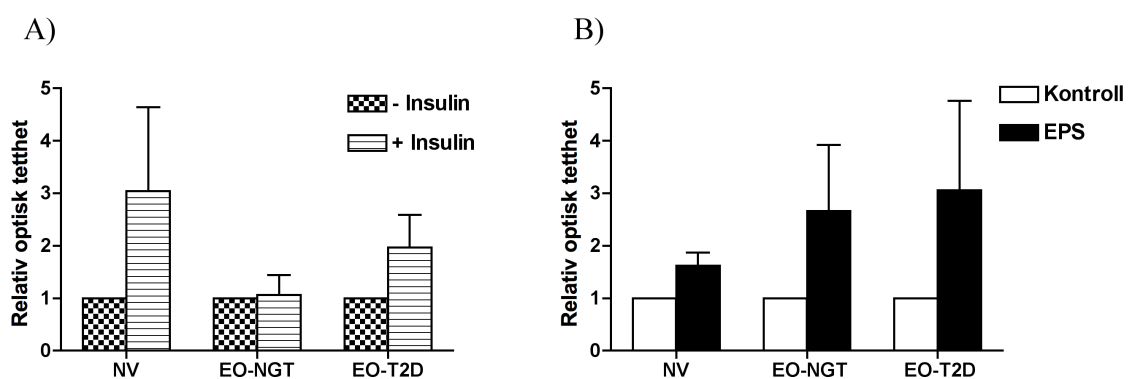
Ved basalsituasjonen var det tendenser til at insulin stimulerte glukoseopptak i NV- og EO-NGT-gruppen, men ikke i EO-T2D-gruppen (figur 3.2 B). I myotubene som fikk behandling med EPS var det en signifikant stimulerende effekt av insulin på glukoseopptaket i NV-gruppen (figur 3.2 C), og tendenser til effekt av insulin i EO-NGT-gruppen (figur 3.2 C). Insulin så ikke ut til å ha noen effekt på glukoseopptaket i EO-T2D-gruppen, hverken ved basalsituasjonen eller ved EPS-behandling (figur 3.2 B og C). EPS så ikke ut til å påvirke insulineffekten (figur 3.2 B og C).



Figur 3.2: Effekt av EPS på glukoseopptaket, og effekt av insulin ved basalsituasjon og ved EPS. Basalkapasitet og effekt av EPS for glukoseopptak (A), insulineffekt ved basalsituasjon (B) og insulineffekt etter behandling med EPS (C) i de tre donorgruppene; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). På forsøksdagen ble myotubene inkubert i 1 time med [³H]deoksyglukose (1μCi/ml) ± 100 nM insulin. Myotubene ble behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden og betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. Data er illustrert som gjennomsnitt ± SEM, n= 4 for alle tre donorgrupper. Data for basalkapasitet og behandling med EPS er oppgitt som absolutte verdier, og data for insulinstimulert effekt ved basalsituasjonen og ved EPS-behandling er relaterte til ubehandlede kontrollceller (uten insulin). *: p ≤ 0,05 mot ubehandlede kontrollceller (uten insulin).

3.1.3 Deteksjon av fosforylert Akt ved bruk av Westernblotting

Akt er en proteinkinase i insulinsignalveien som aktiveres ved fosforylering [40]. Aktivisering av Akt fører til translokasjon av GLUT4 til plasmamembranen, og stimulerer på den måten glukoseopptaket [40, 58]. Westernblotting ble benyttet til å måle både fosforylert Akt og total Akt slik at vi fikk et mål på andelen av total Akt som ble fosforylert. Resultatene er basert på fosforylert Akt/total Akt ratio, og brukes som et mål på insulinstimulert fosforylering av Akt. Vi ville undersøke insulinstimulert fosforylering av Akt i de tre donorgruppene og om det var eventuelle forskjeller mellom dem. Vi ville også undersøke om behandling med EPS induerte en økning i insulinstimulert fosforylering av Akt, og om det var eventuelle forskjeller mellom de tre donorgruppene. EPS ble påført myotubene i de siste 48 timene av differensieringsperioden og ustimulerte celler ble benyttet som kontroll. Ved basalsituasjonen var det tendenser til effekt av insulin på fosforylering av Akt i NV- og EO-T2D-gruppen, men ikke i EO-NGT-gruppen (figur 3.3 A). Behandling med EPS så ut til å induere en økning i insulinstimulert fosforylering av Akt i alle tre donorgruppene (figur 3.3 B).

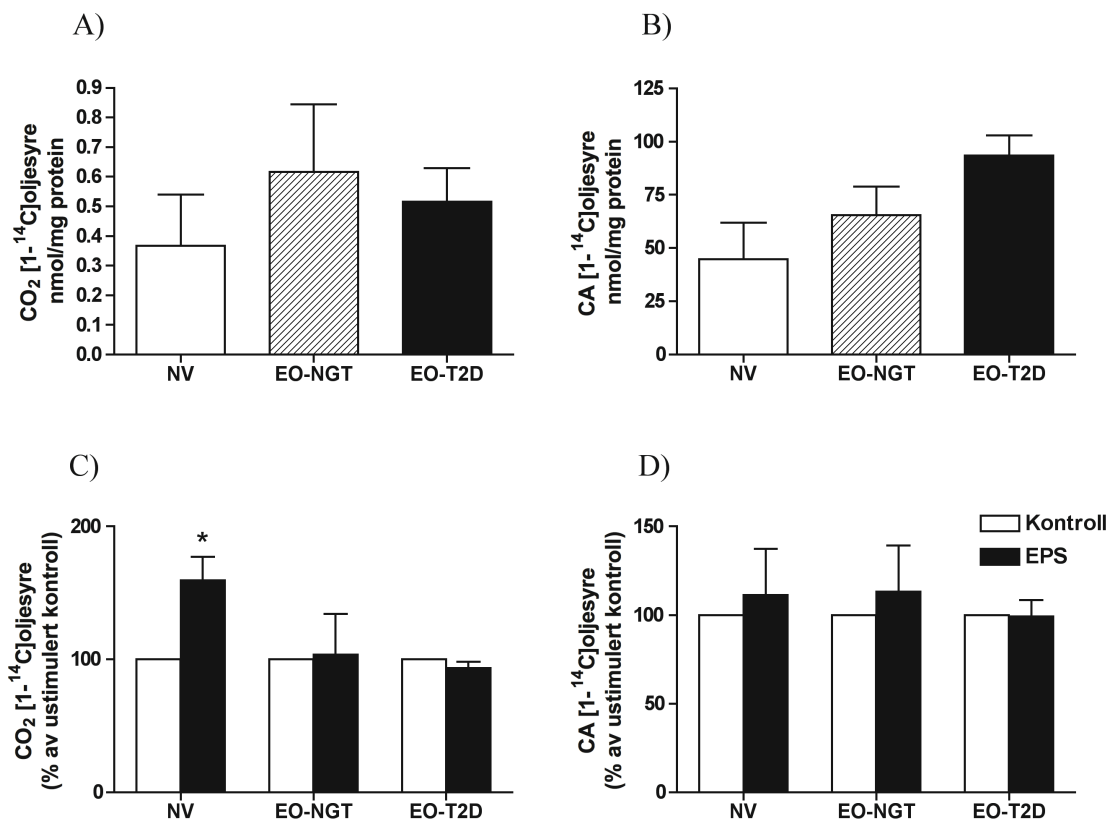


Figur 3.3: Deteksjon av insulinstimulert Akt fosforylering. Insulinstimulert fosforylering av Akt (A) og EPS-indusert økning i insulinstimulert fosforylering av Akt (B) i de tre donorgruppene; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). Myotubene ble stimulert med 100 nM insulin eller kontroll (PBS) i 15 minutter. Myotubene ble behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden og betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. Data er basert på fosforylert Akt/total Akt ratio og er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, n=3 for NV, n=2 for EO-NGT og n=4 for EO-T2D. A: Data er oppgitt i relative verdier hvor kontroll uten insulin i hver donorgruppe er satt til 1. B: Data er oppgitt i relative verdier hvor insulinstimulert Akt fosforylering uten EPS-behandling i hver donorgruppe er satt til 1.

3.2 Oljesyremetabolismen

3.2.1 Oljesyremetabolismen og effekt av EPS

Studier utført av Nikolić et al. [87] har vist at EPS ga en økning i oljesyreoksidasjon i muskelceller isolert fra normalvektige. Vi ønsket å undersøke basalkapasitet for oljesyreopptak og oljesyreoksidasjon i muskelceller fra de tre ulike donorgruppene. Det ble også undersøkt hvilke effekter kronisk, lavfrekvent EPS hadde på oljesyremetabolismen i de tre ulike donorgruppene for å se om det var eventuelle forskjeller mellom gruppene. EPS ble påført myotubene i de siste 48 timene av differensieringsperioden og ustimulerte celler ble benyttet som kontroll. Oljesyreopptak og oljesyreoksidasjon ble undersøkt ved å inkubere myotubene med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre ($1\mu\text{Ci/ml}$) i 2 timer og måle CO_2 og celleassosiert radioaktivitet (CA). Ved basalsituasjon ble det observert en tendens til høyere oljesyreoksidasjon (CO_2) og celleassosiert radioaktivitet (CA) i EO-NGT- og EO-T2D-gruppen sammenlignet med NV-gruppen (figur 3.1 A og B). Behandling med EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen (CO_2) i NV-gruppen sammenlignet med ustimulert kontroll (figur 3.1 C). EPS hadde derimot ingen effekt på oljesyreoksidasjonen (CO_2) i EO-NGT- og EO-T2D-gruppen (figur 3.1 C). Det var ingen effekt av EPS på celleassosiert radioaktivitet (CA) i noen av donorgruppene (figur 3.1 D).

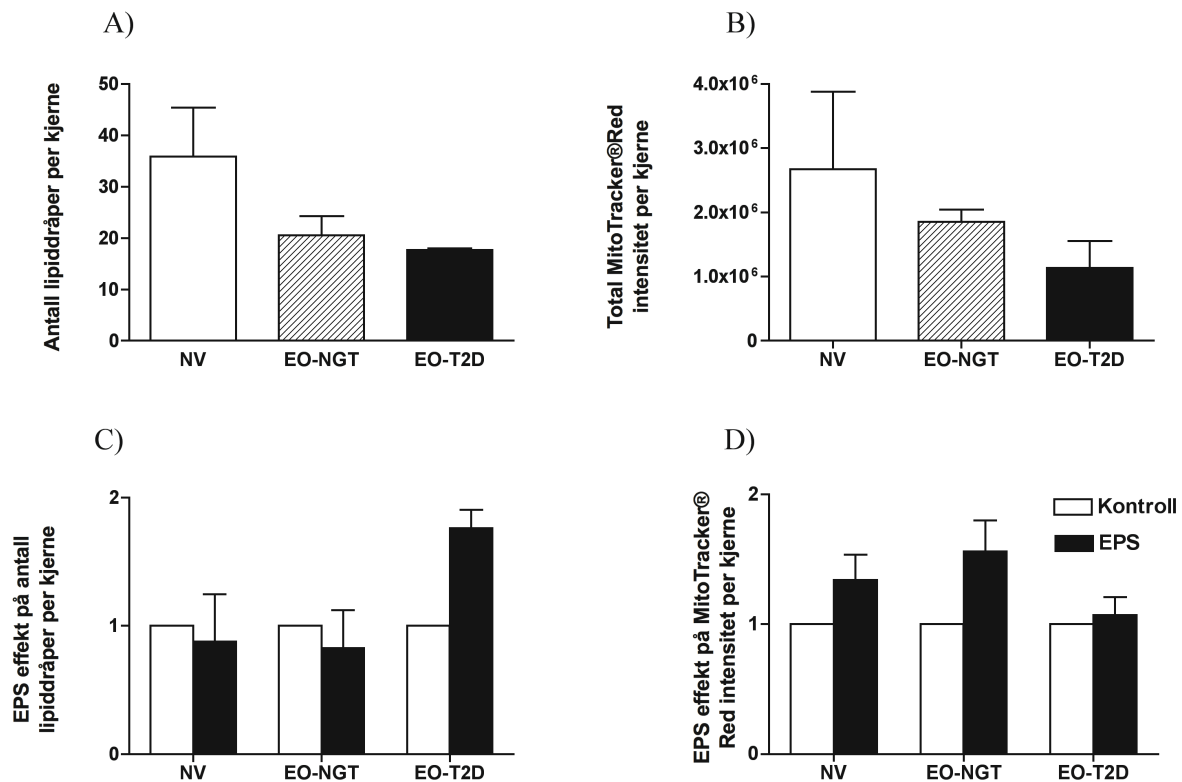


Figur 3.4: Basalkapasitet for oljesyreoksidasjon og -opptak og effekter av EPS på oljesyreoksidasjon og -opptak. Basalkapasitet for CO₂ (A) og CA (B), og effekter av EPS på CO₂ (C) og CA (D) i de tre donorgruppene; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). På forsøksdagen ble myotubene inkubert i 2 timer med [1-¹⁴C]oljesyre (1 μCi/ml). Myotubene ble behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden og betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz (1 EO-NGT-donor i CO₂-forsøket, og 1 EO-NGT- og 1 EO-T2D-donor i CA-forsøket fikk ved en feil en frekvens på 4 Hz under stimuleringen). Data er illustrert som gjennomsnitt ± SEM, n=3-4 for EO-NGT-gruppen, n=4 for NV- og EO-T2D-gruppen. A og B: Data for basalkapasitet er oppgitt i absolutte verdier. C og D data for behandling med EPS er relaterte til ustimulerte kontroller. *: p ≤ 0,05 mot ustimulert kontroll.

3.2.2 Mitokondrie-innhold og lipiddråper, og effekter av EPS

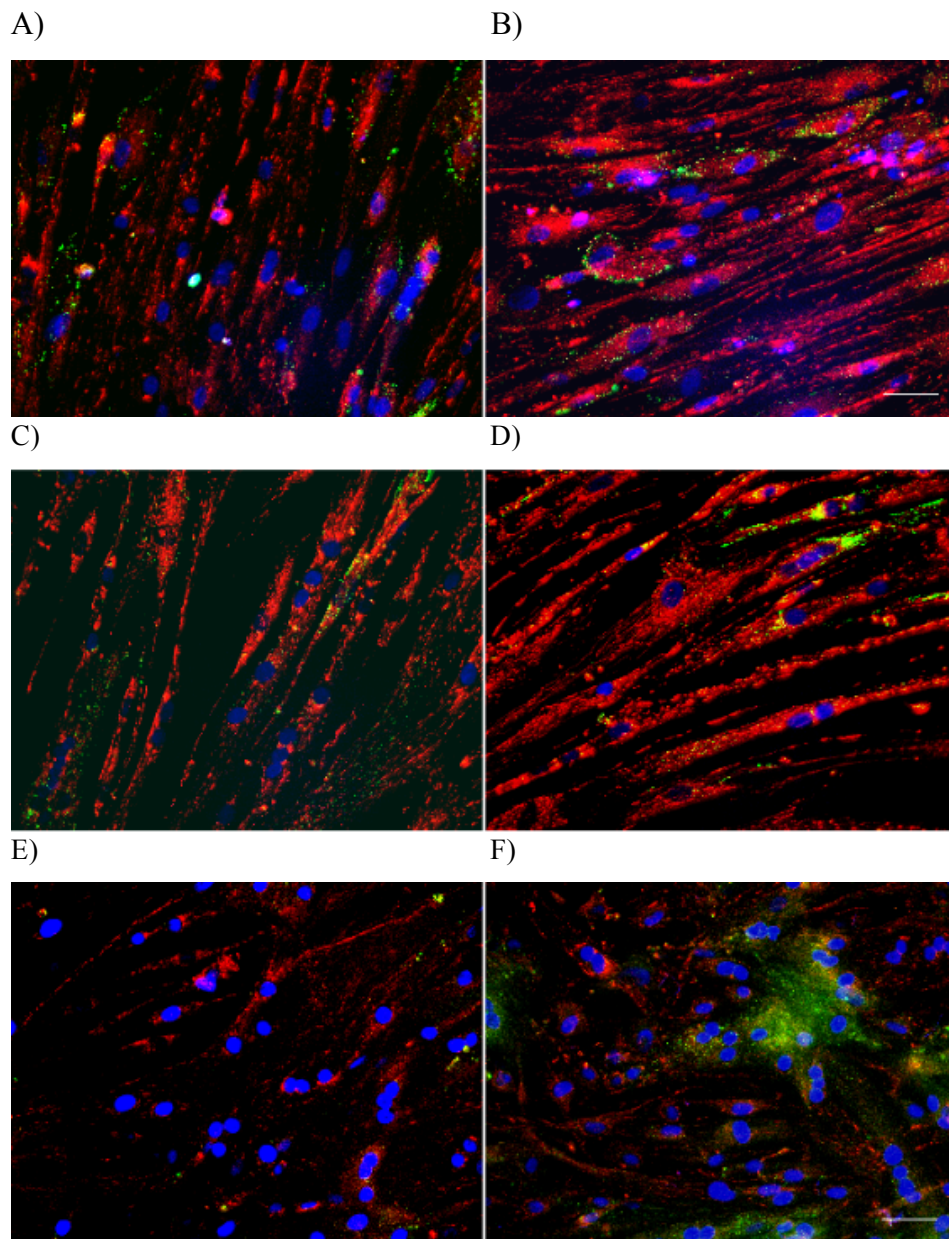
Nikolić et al. [87] har tidligere vist at EPS øker mitokondrie-innhold målt som intensitet av MitoTracker®Red per kjerne i muskelceller isolert fra normalvektige. I dette forsøket ønsket vi derfor å undersøke eventuelle forskjeller med hensyn på mitokondrie-innhold og antall lipiddråper i muskelceller fra de tre donorgruppene, og undersøke effekt av behandling med EPS på mitokondrie-innhold og antall lipiddråper i de tre donorgruppene. EPS ble påført myotubene i de siste 48 timene av differensieringsperioden og ustimulerte celler ble brukt

som kontroll. Mitokondrier ble farget røde med MitoTracker®Red FM, lipiddråper ble farget grønne med BODIPY 493/503 og kjerner ble farget blå med Hoechst 33258. Bilder ble tatt med et fluorescensmikroskop som beskrevet under 2.7, og Scan[^]R analysis software ble brukt til å kvantifisere antall kjerner, lipiddråper og total intensitet av MitoTracker®Red per bilde. Intensitet av MitoTracker®Red ble brukt som et mål på mitokondrie-innhold. I ubehandlede myotuber var det en tendens til lavere antall lipiddråper per kjerne i EO-NGT- og EO-T2D-gruppen sammenlignet med NV-gruppen (figur 3.5 A). Behandling med EPS ga tendens til økt antall lipiddråper per kjerne i EO-T2D-gruppen sammenlignet med ustimulert kontroll (figur 3.5 C). Total intensitet av MitoTracker®Red per kjerne så ut til å være lavere i EO-NGT- og EO-T2D-gruppen enn i NV-gruppen i basalsituasjonen (figur 3.5 B). Behandling med EPS viste en tendens til å øke totalintensiteten av MitoTracker®Red i NV- og EO-NGT-gruppen sammenlignet med ustimulert kontroll (figur 3.5 D).



Figur 3.5 Mitokondrie-innhold og lipiddråper, og effekt av EPS. Antall lipiddråper per kjerne i basalsituasjonen (A), mitokondrie-innhold i basalsituasjonen (B), effekt av EPS på antall lipiddråper per kjerne (C) og effekt av EPS på mitokondrie-innhold (D) i de tre donorgruppene; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). Myotubene ble sådd ut på 6-brønnersbrett med glassbunn, og behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden. Betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. Kjerner ble farget blå, lipiddråper ble farget grønne og mitokondrier ble farget rød. Data er illustrert som gjennomsnitt ± SEM (n=3-5 for NV-og EO-NGT-gruppen, n=2-4 for EO-T2D-gruppen). C og D: For data med behandling med EPS er ustimulert kontroll satt til 1.

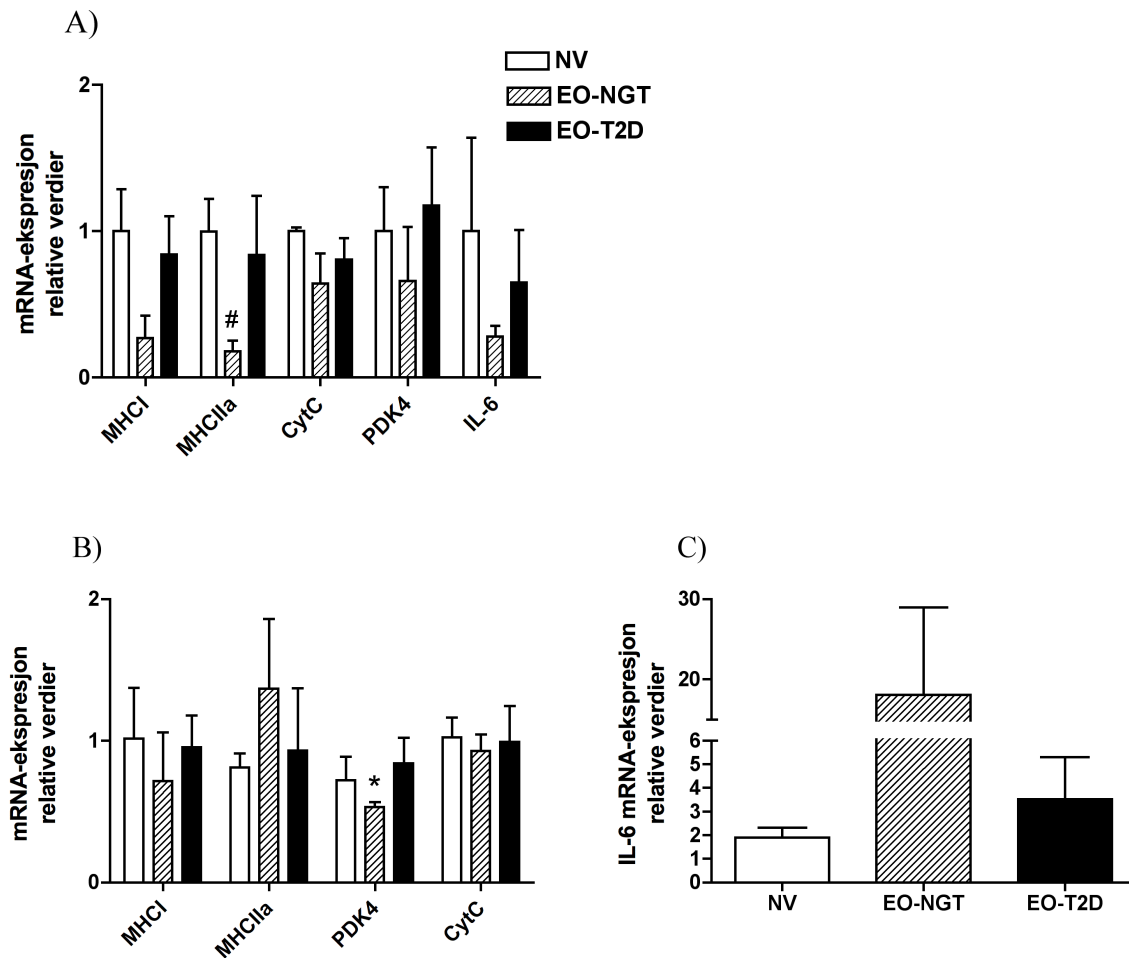
Figur 3.6 viser representative bilder fra et av forsøkene med myotuber fra NV, EO-NGT og EO-T2D.



Figur 3.6: Effekt av EPS på mitokondrie-innhold og lipiddråper. Representative bilder av ustimulerte kontroll-myotuber fra NV (A), EO-NGT (C) og EO-T2D (E), og etter behandling med EPS fra NV (B), EO-NGT (D) og EO-T2D (F). Myotubene ble sådd ut på 6-brønnersbrett med glassbunn og behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden. Betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. Kjerner ble farget blå, lipiddråper ble farget grønne og mitokondrier ble farget rød. Bilder ble tatt med et fluorescens mikroskop som beskrevet under metoder. Skalabaren er 50 μm .

3.3 Genuttrykk og effekter av EPS

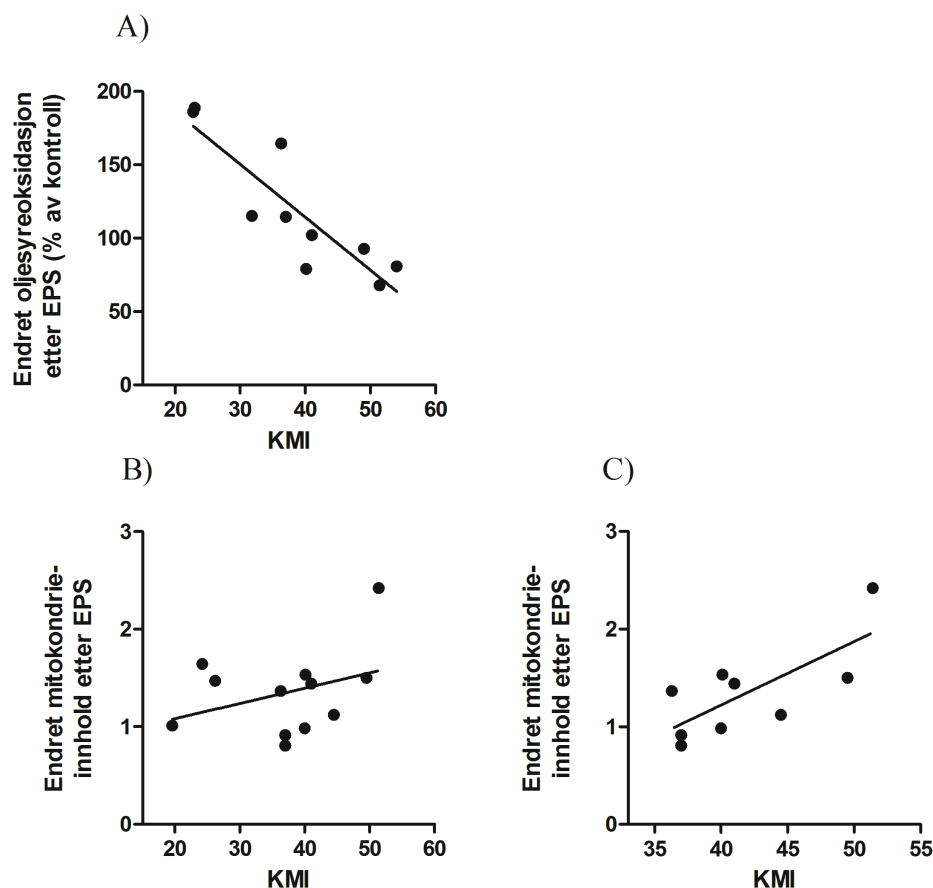
Videre var det ønskelig å undersøke eventuelle forskjeller i mRNA-uttrykk av gener involvert i fetttsyre- og glukosemetabolismen mellom de tre donorgruppene, samt å se om behandling med EPS påvirket mRNA-uttrykket i de tre donorgruppene sammenlignet med ustimulert kontroll. Dette ble undersøkt ved bruk av RT-real-time-PCR. Resultatene er relatert til den endogene kontrollen GAPDH. EPS ble påført myotubene i de siste 48 timene av differensieringsperioden og ustimulerte celler ble benyttet som kontroll. Resultatene ved basalsituasjonen (figur 3.7 A) er normalisert mot NV-gruppen for hvert gen. Resultatene for EPS-effekt (figur 3.7 B og C) er basert på forholdet: EPS-behandlede celler/ustimulerte myotuber, og gir et uttrykk på effekten av EPS på mRNA-ekspressjon. Ved basalsituasjonen viste resultatene signifikant lavere uttrykk av MHCIIa, og en tendens til lavere uttrykk av MHCI og IL-6 i EO-NGT-gruppen sammenlignet med NV-gruppen (figur 3.7 A). Det så ikke ut til å være forskjeller mellom EO-T2D- og NV-gruppen i basalsituasjonen (figur 3.7 A). Behandling med EPS ga en signifikant reduksjon i mRNA-uttrykk av PDK4 i EO-NGT-gruppen sammenlignet med ustimulert kontroll (figur 3.7 B). Det var en tendens til EPS-indusert økning i mRNA-uttrykk av MHCIIa i EO-NGT-gruppen sammenlignet med ustimulert kontroll (figur 3.7 B). Videre var det en tendens til EPS-indusert økning i mRNA-uttrykk av IL-6 i alle tre donorgruppene sammenlignet med ustimulert kontroll, hvorav den EPS-induserte økningen så ut til å være størst i EO-NGT-gruppen (figur 3.7 C).



Figur 3.7 Genuttrykk og effekter av EPS. mRNA-uttrykk av MHC I, MHC IIa, PDK4, CytC og IL-6 (A), EPS effekt på mRNA-uttrykk av MHC I, MHC IIa, PDK4 og CytC (B) og EPS effekt på mRNA-uttrykk av IL-6 (C) i de tre donorgruppene; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2 diabetes (EO-T2D). Myotubene ble behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden og betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. Data er illustrert som gjennomsnitt \pm SEM, $n=4$ for NV- og EO-T2D-gruppen, og $n=3$ for EO-NGT-gruppen. #: $p \leq 0,05$ mot NV, *: $p \leq 0,05$ mot ustimulert kontroll. Data er oppgitt i relative verdier (A) hvor NV er satt til lik 1 og (B og C) ustimulert kontroll er satt til lik 1.

3.4 Korrelasjonsanalyse

Det ble utført korrelasjonsanalyser for å undersøke om de observerte effektene av 48 timer med kronisk, lavfrekvent EPS på myotuber *in vitro* korrelerte med *in vivo*-karakteristika av de individuelle donorene (tabell 3.1). Pearson korrelasjon og Spearman korrelasjon, en ikke-parametrisk test, ble benyttet til korrelasjonsanalysen. Korrelasjonene er utført på enten alle tre donorgruppene samlet eller begge EO-gruppene samlet. Det var en negativ korrelasjon mellom KMI og endring i oljesyreoksidasjon etter EPS når korrelasjonen ble utført på alle tre donorgruppene samlet (figur 3.8 A). Videre var det en positiv korrelasjon mellom KMI og endring i mitokondrie-innhold etter EPS når korrelasjonen ble utført på kun EO-gruppene samlet (figur 3.8 C), men ikke når korrelasjonen ble utført på alle tre donorgruppene samlet (figur 3.8 B).



Figur 3.8 Korrelasjonsanalyse av oljesyreoksidasjon og mitokondrie-innhold etter EPS *in vitro* mot KMI til donorene: Figuren viser korrelasjon mellom oljesyreoksidasjon og KMI på alle tre donorgruppene samlet (A), korrelasjon mellom mitokondrielt innhold og KMI på alle tre donorgruppene samlet (B) og korrelasjon mellom mitokondrielt innhold og KMI på begge EO-gruppene samlet (C). Myotubene ble behandlet med EPS i de siste 48 timene av differensieringsperioden og betingelsene for kronisk, lavfrekvent elektrisk stimulering var: enkeltpulser på 2 ms, 30 V og en frekvens på 1 Hz. (n = 9-12).

Tabell 3.1: Korrelasjonsanalyse av *in vitro*-data mot KMI. Tabellen viser korrelasjon for enten alle tre donorgruppene samlet eller begge EO-gruppene samlet. *: statistisk signifikant.

	Pearson korrelasjon		Spearman korrelasjon	
Oljesyreoksidasjon (CO₂)				
-KMI (alle tre donorgruppene)	r = -0,874	p= 0,001 *	r = -0,879	p= 0,0016 *
Mitokondrie-innhold				
-KMI (alle tre donorgruppene)	r = 0,347	p= 0,269	r = 0,284	p= 0,366
-KMI (EO-gruppene)	r = 0,736	p= 0,024 *	r = 0,078	p= 0,0503

4 Diskusjon

Flere studier er blitt utført med elektrisk pulsstimulering av myotuber fra mus [39, 95, 96], og av humane myotuber [34, 87]. Nikolić et al. [87] har vist at 48 timer med EPS ga økt mitokondrie-innhold og oksidativ kapasitet i humane myotuber i kultur. Det var ønskelig å undersøke de metabolske effektene av en *in vitro*-modell for trening i humane myotuber fra ulike donorgrupper; normalvektige (NV), ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse (EO-NGT) og ekstremt overvektige med type 2-diabetes (EO-T2D). Kronisk, lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (frekvens på 1 Hz, enkeltpulser på 2 ms og 30 V) i 48 timer ble benyttet for å etterligne trening. Sammenligning av effekter av EPS *in vitro* i myotuber fra de tre ulike donorgruppene er så vidt vi kjenner til ikke vært utført tidligere.

Både treningsintensitet og -varighet spiller en viktig rolle for effekter av trening *in vivo*, og er forskjeller som må tas hensyn til når vi sammenligner resultatene av vår *in vitro*-treningsmodell med *in vivo*-treningseffekter.

4.1 Glukosemetabolismen og effekter av EPS

Studier har vist at elektrisk pulsstimulering ga økt glukoseoksidasjon i humane myotuber [34, 87]. Dette er i samsvar med resultatene i denne oppgaven som viste tendenser til økt glukoseoksidasjon i myotuber fra NV, EO-NGT og EO-T2D etter kronisk, lavfrekvent EPS. Trening øker glukoseopptaket i kontraherende skjelettmuskel *in vivo* [55], og har vist å forbedre reguleringen av glukosehomeostasen både i friske og type 2-diabetikere [41]. Nikolić et al. [68] har vist at EPS øker glukoseopptak i muskelceller isolert fra normalvektige, men denne effekten så vi ikke i noen av donorgruppene i våre forsøk. Treningsintensiteten har innvirkning på glukoseopptaket, og kan avhengig av intensiteten øke glukoseopptaket 7-20 ganger [97], men Nikolić et al. [87] har vist økt glukoseopptak med samme treningsmodell som er brukt i denne oppgaven, så dette kan ikke forklare den manglende effekten på glukoseopptak i våre forsøk. Det er nødvendig med flere forsøk for å kunne si noe sikkert om EPS effekt på glukoseopptaket. Vi så ingen forskjell mellom gruppene med hensyn på glukoseopptak eller -oksidasjon etter behandling med EPS, og det er nødvendig med flere forsøk for å kunne trekke konklusjoner.

In vitro-studier av Lambernd et al. [34] viste insulinstimulert økning av glukoseopptak i humane skjelettmuskelceller. I samsvar med dette viste resultatene i denne oppgaven tendenser til økt insulinstimulert glukoseopptak ved basalsituasjonen i myotuber fra NV- og EO-NGT-gruppen, men ikke i myotuber fra EO-T2D-gruppen. Dette kan muligens forklares med at det er en forskjell på insulinfølsomhet mellom myotubene fra de tre donorgruppene. Det er vist økning i insulinstimulert glukoseopptak etter EPS i humane skjelettmuskelceller [34]. I motsetning til dette påvirket ikke EPS insulineffekten i våre forsøk, men EPS alene ga heller ingen effekt på glukoseopptaket i våre forsøk så det er nødvendig med flere forsøk for å kunne si noe sikkert om EPS-indusert økning i insulinstimulert glukoseopptak. Trening i rotter er vist å øke Akt-fosforylering [98]. Resultatene presentert i denne oppgaven viste at behandling med EPS tenderte til en økning i insulinstimulert fosforylering av Akt i alle tre donorgruppene. Dette kan muligens bidra til å forklare det økte glukoseopptaket i muskelceller etter EPS observert av Nikolić et al. [87]. Det er vanskelig å konkludere i hvilken donorgruppe EPS hadde størst effekt da det var stor spredning i resultatene, og det er nødvendig med flere forsøk for å kunne si noe om en eventuell forskjell mellom gruppene.

4.2 Oljesyremetabolismen og effekter av EPS

Resultatene presentert i denne oppgaven viste at EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjonen i myotuber fra NV-gruppen. Dette stemmer overens med studier utført av Nikolić et al. [87] som har vist at EPS gir en økning i oljesyreoksidasjon i muskelceller isolert fra normalvektige, og *in vivo*-studier som har vist at trening kan gi 3-10 ganger økt fetttsyreoksidasjon [22]. EPS hadde derimot ingen effekt på oljesyreoksidasjon i EO-gruppene, noe som stemmer overens med studier som har vist at individer med fedme har redusert treningsindusert fetttsyreoksidasjon sammenlignet med normalvektige kontroller [99]. *In vivo*-studier av Blaak et al. [100] har vist at fetttsyreoksidasjon av fettsyrer fra plasma er lavere både ved basalsituasjonen og under trening i type 2-diabetikere med fedme sammenlignet med individer med fedme uten type 2-diabetes. I våre forsøk så vi derimot ingen forskjell på fetttsyreoksidasjon mellom myotuber fra EO-NGT- og EO-T2D-gruppen etter behandling med EPS. Det er nødvendig med flere forsøk for å kunne si noe om eventuell forskjell mellom gruppene. Korrelasjonsanalysene viste at effekt av EPS på oljesyreoksidasjon i myotuber korrelerte negativt med KMI. Dette kan tyde på at individer med fedme responderer dårlig på

trening med hensyn på fettsyreoksidasjon. Resultatene presentert i denne oppgaven viste at EPS ikke hadde noen effekt på fettsyreopptaket (målt som celleassosiert radioaktivitet, CA) i myotuber fra noen av donorgruppene. Det ble heller ikke vist noen effekt av EPS på fettsyreopptak i muskelceller i studier utført av Nikolić et al. [87]. Disse resultatene er ikke i samsvar med *in vivo*-studier som har vist at trening øker fettsyreopptaket i muskel [101]. Bonen et al. [102] viste at kronisk elektrisk stimulering av muskel i rotte *in vivo* økte fettsyretransport og fettsyreoksidasjon. I denne studien fikk muskel i rotter elektrisk stimulering kontinuerlig i syv dager, og det ble benyttet en frekvens på 10 Hz. Dette skiller seg fra vår modell først og fremst ved at elektrisk pulsstimulering i våre forsøk er utført *in vitro* på humane myotuber i kultur, mens i studien til Bonen et al. [102] er elektrisk stimulering utført *in vivo* i rotter. Videre ble cellene våre stimulert i 48 timer med en frekvens på 1 Hz. Den manglende effekten på oljesyreopptak i våre forsøk kan forklares med at både varighet og intensitet av treningen kan ha innvirkning på fettsyreopptaket [22].

In vitro-studier har vist at fettsyreoksidasjon er lavere i skjelettmuskelceller fra individer med fedme sammenlignet med kontrollceller fra slanke [103]. Videre er det i *in vitro*-studier observert lavere fettsyreoksidasjon i skjelettmuskelceller fra type 2-diabetikere med fedme sammenlignet med kontrollceller fra individer med fedme uten type 2-diabetes [104]. Basaldata for oljesyreoksidasjon og CA tenderte til å være høyere i myotubene fra begge EO-gruppene sammenlignet med NV-gruppen. Det kan kanskje tyde på at myotuber fra de to EO-gruppene har tilpasset seg et miljø med høyere eksponering av fettsyrer, eller at de av andre grunner har en annen kapasitet for fettsyremetabolisme enn NV-donorene. Vi så ingen forskjell mellom de to EO-gruppene, og det er nødvendig med flere forsøk for å kunne si noe sikkert om eventuell forskjell mellom gruppene.

In vivo-studier har vist at type 2-diabetikere har høyere intramyocellulært lipid (IMCL)-innhold sammenlignet med stillesittende individer [105]. Akkumulering av lipider i skjelettmuskel er assosiert med insulinresistens ved type 2-diabetes og ved fedme [105]. I celler som ikke var eksponert for fettsyrer viste resultatene presentert i denne oppgaven, i motsetning til det som er vist *in vivo* [105], tendenser til redusert antall lipiddråper i myotuber fra begge EO-gruppene sammenlignet med NV-gruppen. Hvorfor dette er tilfellet er usikkert, og det er dessuten ikke helt mulig å sammenligne våre resultater fra *in vitro*-forsøk med *in vivo*-situasjonen. Studier har vist at utholdenhetstrete atleter har høyere IMCL-innhold enn stillesittende individer [105, 106]. Dette beskrives som "athlete's paradox" [105, 107]. Det er

vist at økningen i IMCL-tetthet ved utholdenhetstrening er forårsaket av økning i antall lipiddråper og ikke en økning i lipidstørrelsen [108]. Resultater presentert i denne oppgaven viste at EPS-behandlede myotuber fra EO-T2D-donorere tenderte til økt antall lipiddråper sammenlignet med ustimulert kontroll. Denne effekten ble ikke sett i myotuber fra NV- og EO-NGT-donorere. Årsaken til dette er ukjent, og det er nødvendig med flere forsøk for å kunne si noe sikkert.

Det er tidligere blitt observert at mitokondrier fra type 2-diabetikere og individer med fedme er mindre i størrelse enn mitokondrier fra normalvektige [109]. I samsvar med dette har vi observert en tendens til lavere mitokondrie-innhold i myotuber fra begge EO-gruppene. Resultatene presentert i denne oppgaven viste også tendenser til økt mitokondrie-innhold i myotuber fra NV- og EO-NGT-gruppen etter EPS. Dette var i samsvar med studier av Nikolić et al. [87] som har vist at EPS ga dobling av mitokondrie-innhold i muskelceller isolert fra normalvektige. Det er uklart hvorfor EPS så ut til å øke mitokondrie-innhold i myotuber fra NV- og EO-NGT-gruppen, men ikke i myotuber fra EO-T2D-gruppen. Korrelasjonsanalysene viste at effekt av EPS på mitokondrie-innhold korrelerte positivt med KMI når korrelasjonen ble utført på kun EO-gruppene samlet. Dette kan tyde på at effekten av EPS på mitokondrie-innhold øker med økende KMI i ekstremt overvektige, selv om det ikke reflekteres i økt oksidasjon i våre stimulerede celler. Flere forsøk må til for å kunne trekke en konklusjon.

4.3 Genuttrykk og effekter av EPS

Studier viser at individer med fedme har lavere innhold av muskelfibertype I [75, 110] og høyere innhold av muskelfibertype IIb enn normalvektige kontroller [75]. Det er også vist at type 2-diabetikere har lavere innhold av type I-fibre og høyere innhold av type IIb-fibre sammenlignet med kontroller uten type 2-diabetes [76, 110]. Type I-fibre er langsomme og oksidative, mens type IIa-fibre er raske og oksidative og type IIb-fibre er raske og glykolytiske [74]. MHCI og MHCIIa er gen-markører for henholdsvis type I- og type IIa-fibre [111]. I samsvar med det som er blitt vist tidligere *in vivo* [75, 110] viste resultatene presentert i denne oppgaven tendenser til lavere MHCI-uttrykk i myotuber fra EO-NGT-donorere sammenlignet med myotuber fra NV-donorere, men ikke i myotuber fra EO-T2D-donorere. Resultatene viste også signifikant lavere uttrykk av MHCIIa i myotuber fra EO-

NGT-donorers sammenlignet med myotuber fra NV-donorers, men ikke i myotuber fra EO-T2D-donorers. He et al. [77] har vist at innen hver fibertype av type I-, type IIa- og type IIb-fibre hadde skjelettmuskel fra individer med fedme og type 2-diabetikere lavere oksidativ enzymaktivitet en slanke individer. Studien viste også at type I-fibre hadde høyere oksidativ enzymaktivitet enn type IIa fibre, og at type IIb-fibre hadde lavest oksidativ enzymkapasitet [77]. Det observerte lavere uttrykket av MHCIIa og tendensen til lavere uttrykk av MHCI tyder på lavere innhold av henholdsvis fibertype IIa og fibertype I, som muligens kan føre til redusert oksidativ kapasitet i musklene, men dette er usikkert da vi ikke så en reduksjon av MHCI og MHCIIa i EO-T2D og da det ikke reflekteres i redusert oksidasjon i våre celler.

Studier av Nikolić et al. [87] har vist økt PDK4-uttrykk i muskelceller fra normalvektige donorer etter 24 timer med EPS, men resultater presentert i denne oppgaven viste en signifikant reduksjon i uttrykk av PDK4 i myotuber fra EO-NGT-donorers etter 48 timer med EPS sammenlignet med ustimulert kontroll. Økning i PDK4 fører til at metabolismen i skjelettmuskel skifter fra glukose- til fettsyreoksidasjon [112]. Den observerte reduksjonen i PDK4-uttrykk etter EPS kan muligens forklare den manglende effekten av EPS på oljesyreoksidasjonen i myotuber fra EO-NGT-donorers, men dette er usikkert da vi ikke observerte tilsvarende reduksjon av PDK4-uttrykk i myotuber fra EO-T2D-donorers.

In vivo-studier har vist at plasmakonsentrasjoner av IL-6 øker under trening [113]. Nikolić et al. [87] fant tendens til økt IL-6-uttrykk i muskelceller fra normalvektige donorer etter EPS-behandling. Dette er i samsvar med resultatene presentert i denne oppgaven som viste tendens til en EPS-indusert økning i IL-6-uttrykk i myotuber fra alle tre donorgruppene. Denne observerte økningen i IL-6 er trolig en indikasjon på at kontraksjon av myotubene er tilstede i modellen vår og at EPS-modellen vår etterligner treningseffekter.

5 Konklusjon

Kronisk, lavfrekvent elektrisk pulsstimulering (EPS) tenderte til å gi økt glukoseoksidasjon i myotuber fra alle tre donorgruppene: normalvektige, ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse og ekstremt overvektige med type 2-diabetes. Ved basalsituasjonen var det tendenser til høyere insulinstimulert glukoseopptak i myotuber fra normalvektige og ekstremt overvektige med normal glukosetoleranse, sammenlignet med myotuber fra ekstremt overvektige med type 2-diabetes, men EPS så ikke ut til å påvirke insulineffekten. Videre så EPS ut til å indusere en økning i insulinstimulert fosforylering av Akt i myotuber fra alle tre donorgruppene. EPS ga en signifikant økning i oljesyreoksidasjon i myotuber fra normalvektige, men hadde ingen effekt i myotuber fra ekstremt overvektige. Flere forsøk er nødvendig for å kunne trekke klare konklusjoner om eventuelle forskjeller i effekt av EPS på myotuber fra de tre ulike donorgruppene.

Litteraturliste

1. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. James, P.T., *Obesity: the worldwide epidemic*. Clin Dermatol, 2004. **22**(4): p. 276-80.
3. World Health Organization. *BMI classification*. 2012; Available from: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.
4. Haskell, W.L., et al., *Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(8): p. 1423-34.
5. Arner, P., *Obesity--a genetic disease of adipose tissue?* Br J Nutr, 2000. **83 Suppl 1**: p. S9-16.
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. Smyth, S. and A. Heron, *Diabetes and obesity: the twin epidemics*. Nat Med, 2006. **12**(1): p. 75-80.
8. Panunti, B., A.A. Jawa, and V.A. Fonseca, *Mechanisms and therapeutic targets in type 2 diabetes mellitus*. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2004. **1**(2): p. 151-157.
9. Bemelmans, R.H., et al., *Increased visceral adipose tissue is associated with increased resting heart rate in patients with manifest vascular disease*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(4): p. 834-41.
10. Bergman, R.N. and M. Ader, *Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(9): p. 351-6.
11. Duvnjak, L. and M. Duvnjak, *The metabolic syndrome - an ongoing story*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 7**: p. 19-24.
12. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
13. Jellinger, P.S., *Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance*. Clin Cornerstone, 2007. **8 Suppl 7**: p. S30-42.
14. Zimmet, P., J. Shaw, and K.G. Alberti, *Preventing Type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view*. Diabet Med, 2003. **20**(9): p. 693-702.
15. World Health Organization. *Diabetes*. 2011; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
16. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention*. Diabet Med, 2007. **24**(5): p. 451-63.
17. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2010*.
18. Mahler, R.J. and M.L. Adler, *Clinical review 102: Type 2 diabetes mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(4): p. 1165-71.
19. Meece, J., *Pancreatic islet dysfunction in type 2 diabetes: a rational target for incretin-based therapies*. Curr Med Res Opin, 2007. **23**(4): p. 933-44.
20. 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.
21. Chow, L., A. From, and E. Seaquist, *Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction*. Metabolism, 2010. **59**(1): p. 70-85.

22. Turcotte, L.P. and J.S. Fisher, *Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise*. Phys Ther, 2008. **88**(11): p. 1279-96.
23. Peppas, M., et al., *Skeletal muscle insulin resistance in endocrine disease*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 527850.
24. Gastaldelli, A., *Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S60-5.
25. Jin, W. and M.E. Patti, *Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(2): p. 99-111.
26. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.
27. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
28. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(3): p. 177-81.
29. Hulver, M.W. and G.L. Dohm, *The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 375-80.
30. Griffin, M.E., et al., *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade*. Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1270-4.
31. Venables, M.C. and A.E. Jeukendrup, *Physical inactivity and obesity: links with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25 Suppl 1**: p. S18-23.
32. Martins, A.R., et al., *Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 30.
33. O'Donovan, G., et al., *The ABC of Physical Activity for Health: a consensus statement from the British Association of Sport and Exercise Sciences*. J Sports Sci, 2010. **28**(6): p. 573-91.
34. Lambernd, S., et al., *Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways*. Diabetologia, 2012. **55**(4): p. 1128-39.
35. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 1 ed. Vol. 4. 2007, Oslo: Gyldendal Norske Forlag AS.
36. Nader, G.A., *Concurrent strength and endurance training: from molecules to man*. Med Sci Sports Exerc, 2006. **38**(11): p. 1965-70.
37. Hawley, J.A., *Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(3): p. 218-22.
38. Kennedy, J.W., et al., *Acute exercise induces GLUT4 translocation in skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes*. Diabetes, 1999. **48**(5): p. 1192-7.
39. Burch, N., et al., *Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e10970.
40. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
41. Froisig, C. and E.A. Richter, *Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17 Suppl 3**: p. S15-20.
42. 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.

43. Bruce Alberts, D.B., Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Essential cell biology*. 2 ed 2004, New York: Garland Science.
44. Kerner, J. and C. Hoppel, *Fatty acid import into mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(1): p. 1-17.
45. Koonen, D.P., et al., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1736**(3): p. 163-80.
46. 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.
47. 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.
48. Mashek, D.G. and R.A. Coleman, *Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(3): p. 274-8.
49. Spriet, L.L., *Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans*. Med Sci Sports Exerc, 2002. **34**(9): p. 1477-84.
50. Hayashi, T., J.F. Wojtaszewski, and L.J. Goodyear, *Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle*. Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. E1039-51.
51. Holmes, B. and G.L. Dohm, *Regulation of GLUT4 gene expression during exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2004. **36**(7): p. 1202-6.
52. Houmard, J.A., et al., *Seven days of exercise increase GLUT-4 protein content in human skeletal muscle*. J Appl Physiol, 1995. **79**(6): p. 1936-8.
53. Holloszy, J.O., *Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity*. J Appl Physiol, 2005. **99**(1): p. 338-43.
54. Jessen, N. and L.J. Goodyear, *Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2005. **99**(1): p. 330-7.
55. Santos, J.M., et al., *Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake*. Int J Sports Med, 2008. **29**(10): p. 785-94.
56. Rose, A.J. and E.A. Richter, *Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated?* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 260-70.
57. Ruderman, N.B., et al., *Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome*. Diabetes, 2006. **55 Suppl 2**: p. S48-54.
58. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
59. Sugden, M.C. and M.J. Holness, *Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(5): p. E855-62.
60. Hildebrandt, A.L., H. Pilegaard, and P.D. Neuffer, *Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(5): p. E1021-7.
61. Wende, A.R., et al., *PGC-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 10684-94.
62. Buck, M.J., T.L. Squire, and M.T. Andrews, *Coordinate expression of the PDK4 gene: a means of regulating fuel selection in a hibernating mammal*. Physiol Genomics, 2002. **8**(1): p. 5-13.
63. Pilegaard, H., et al., *Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(4): p. E806-14.

64. Tunstall, R.J., et al., *Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(1): p. E66-72.
65. Holloway, G.P., et al., *Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise*. J Physiol, 2006. **571**(Pt 1): p. 201-10.
66. Schwenk, R.W., et al., *Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 149-54.
67. Jeppesen, J., et al., *Enhanced fatty acid oxidation and FATP4 protein expression after endurance exercise training in human skeletal muscle*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29391.
68. Talanian, J.L., et al., *Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women*. J Appl Physiol, 2007. **102**(4): p. 1439-47.
69. Kuhl, J.E., et al., *Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(6): p. E1296-303.
70. Roepstorff, C., et al., *Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E133-42.
71. Tunstall, R.J., et al., *Reduced plasma free fatty acid availability during exercise: effect on gene expression*. Eur J Appl Physiol, 2007. **99**(5): p. 485-93.
72. Bassel-Duby, R. and E.N. Olson, *Signaling pathways in skeletal muscle remodeling*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 19-37.
73. Wang, Y.X., et al., *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta*. PLoS Biol, 2004. **2**(10): p. e294.
74. Yan, Z., et al., *Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle*. J Appl Physiol, 2011. **110**(1): p. 264-74.
75. Tanner, C.J., et al., *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(6): p. E1191-6.
76. Marin, P., et al., *Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM*. Diabetes Care, 1994. **17**(5): p. 382-6.
77. He, J., S. Watkins, and D.E. Kelley, *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity*. Diabetes, 2001. **50**(4): p. 817-23.
78. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
79. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism*. J Appl Physiol, 2007. **103**(3): p. 1093-8.
80. Pedersen, B.K., A. Steensberg, and P. Schjerling, *Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects*. J Physiol, 2001. **536**(Pt 2): p. 329-37.
81. Bruunsgaard, H., et al., *Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage*. J Physiol, 1997. **499** (Pt 3): p. 833-41.
82. Toft, A.D., et al., *Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C289-95.
83. Pedersen, B.K., et al., *The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor?* Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 263-7.

84. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. *Diabetes*, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
85. Lehninger, A., D. Nelson, and M. Cox, *Principles of Biochemistry*. 2 ed1993, New York: Worth Publishers.
86. Booth, F.W. and J.O. Holloszy, *Cytochrome c turnover in rat skeletal muscles*. *J Biol Chem*, 1977. **252**(2): p. 416-9.
87. Nikolić, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33203.
88. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *APMIS*, 2001. **109**(11): p. 735-44.
89. 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.
90. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
91. Stratagene, *Introduction to Quantitative PCR: methods and applications guide* 2004.
92. Lutfalla, G. and G. Uze, *Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments*. *Methods Enzymol*, 2006. **410**: p. 386-400.
93. 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.
94. Scott, R.A.W., *Enhanced Chemiluminescence Immunoassay*, in *The Proteins Protocol Handbook*2002.
95. Fujita, H., T. Nedachi, and M. Kanzaki, *Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes*. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(9): p. 1853-65.
96. Park, H., et al., *Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. **2**(5): p. 279-87.
97. Sato, Y., et al., *Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. **228**(10): p. 1208-12.
98. Sakamoto, K., et al., *Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(5): p. E1081-8.
99. Thyfault, J.P., et al., *Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **287**(6): p. E1076-81.
100. Blaak, E.E., et al., *Impaired oxidation of plasma-derived fatty acids in type 2 diabetic subjects during moderate-intensity exercise*. *Diabetes*, 2000. **49**(12): p. 2102-7.
101. Turcotte, L.P., E.A. Richter, and B. Kiens, *Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(6 Pt 1): p. E791-9.
102. Bonen, A., et al., *Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(4 Pt 1): p. E642-9.
103. Kim, J.Y., et al., *Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **279**(5): p. E1039-44.
104. Gaster, M., et al., *Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes*. *Diabetes*, 2004. **53**(3): p. 542-8.
105. 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.

106. van Loon, L.J., et al., *Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(3): p. E558-65.
107. Dube, J.J., et al., *Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(5): p. E882-8.
108. Tarnopolsky, M.A., et al., *Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(3): p. R1271-8.
109. Kelley, D.E., et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2944-50.
110. Hickey, M.S., et al., *Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 1): p. E453-7.
111. Nikolić, N., et al., *Overexpression of PGC-1alpha Increases Fatty Acid Oxidative Capacity of Human Skeletal Muscle Cells*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 714074.
112. Ehrenborg, E. and A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol Rev, 2009. **61**(3): p. 373-93.
113. Toft, A.D., A. Falahati, and A. Steensberg, *Source and kinetics of interleukin-6 in humans during exercise demonstrated by a minimally invasive model*. Eur J Appl Physiol, 2011. **111**(7): p. 1351-9.

Appendiks

1. Celledyrkning

1.1 Utsåingsmedium

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

1.2 Proliferasjonsmedium

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

2. Akuttmedier og pre-inkuberingsmedium til substratoksidasjons- og opptaksforsøk

2.1 Oljesyre i DPBS med HEPES

82 μM kald oljesyre
18,3 μM [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$)
7,2 μM BSA
3700 mg/L eller 44,05 mol/L NaHCO_3

2.2 Glukose i DMEM m/ GLUTAMAX-I

172,4 μM D- ^{14}C (U)glukose (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$)

2.3 Pre-inkuberingsmedium (per brønn)

1 ml DMEM med GLUTAMAX-I

2.4 Deoksyglukose i DMEM m/ GLUTAMAX-I

0,1 μM [^3H]deoksyglukose (1 $\mu\text{Ci/mL}$)

3. cDNA-syntese og real-time-PCR**3.1 Reaksjonsmedium til cDNA syntese (per prøve)**

10 μl RNA (prøve)

3,2 μl DEPC-dH₂O

2 μl 10xTaqMan RT Buffer

0,8 μl 25xdNTP mix

2 μl 10xRT Random Primers

1 μl RNase inhibitor

1 μl Multiscribe Reverse Transcriptase

3.2 Medium til PCR-reaksjon (per prøve)

2,5 μl fortynnet cDNA prøve

12,5 μl 2xSYBR Green Master Mix

0,25 μl 30 μM Primer F (framover)

0,25 μl 30 μM Primer R (revers)

9,5 μl DEPC-dH₂O

4. Westernblotting**4.1 2xSample 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 Elektroforesebuffer

100 ml 10 x TGS (Tris/Glycine/SDS buffer)

900 ml dH₂O

4.3 Blottebuffer

100 ml 10 x TGS (Tris/Glycine/SDS buffer)
200 ml metanol
700 ml dH₂O

4.4 T-TBS (Tween-Trisbufret saltløsning) 2 L

10 nM Tris base (2,42 g)
100 mM 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)

