

**Skjelettmuskelceller fra
lever X reseptor (LXR) α - og β -knockout-mus**

Optimalisering av metode for *in vitro* dyrking

Effekter av LXR-agonisten T0901317

Hovedfagsoppgave for graden candidata pharmaciae



Siri Slåttsveen Haugen

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

November 2006

**Skjelettmuskelceller fra
lever X reseptor (LXR) α - og β -knockout-mus**

**Optimalisering av metode for *in vitro* dyrking
Effekter av LXR-agonisten T0901317**

Siri Slåttsveen Haugen

Hovedfagsoppgave for graden candidata pharmaciae



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

November 2006

Veiledere

Professor Hege Thoresen

Professor Arild Chr. Rustan

Stipendiat Eili Tranheim Kase

Forord

Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden november 2005 til november 2006.

Jeg vil rette en stor takk til mine hovedveiledere, professor Hege Thoresen og professor Arild Chr. Rustan for god oppfølging, rådgivning og støtte gjennom hele hovedfagsåret. Jeg vil også takke veileder og stipendiat Eili Tranheim Kase for å ha instruert meg i metoden for real-time PCR, i tillegg til å ha svart på alle mine små og store spørsmål både i forbindelse med metoden og underveis i skriveprosessen. Takk for inspirerende engasjement fra alle tre!

Spesielt stor takknemlighet rettes til Mari-Ann Baltzersen for å ha lært meg metoder og rutiner for å håndtere celler, i tillegg til å reise til Sverige for å isolere knockout-celler fra mus. Takk for uvurderlig hjelp i prosessen med opprensing og etablering av cellebank.

Takk til Andreas J. Wensaas for hjelp til å skaffe muskelceller fra villtype-mus, samt lære oss metoden for isolering av muskelceller fra mus.

Jeg ønsker også å takke Muskelbunten for interessante mandagsmøter i sofaen, samt hele 4. etasje for et trivelig arbeidsmiljø!

Petter; tusen takk for at du har tatt turen fra 2. til 4. hver gang bittesmå og ganske store dataproblemer har oppstått! Tusen takk for korrekturlesing og oppmuntring. Tusen takk for at du har vært halvparten av vårt super-team gjennom 5 arbeidsomme, men morsomme, uforglemmelige og opplevelsesrike år! Tusen takk for alt du har lært meg, og tusen takk for alt vi har lært oss sammen. Tusen takk for all kjærlighet, og for at du er min beste venn!

Blindern, oktober 2006, Siri Slåttsveen Haugen

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
Sammendrag	6
Forkortelser	8
1. Innledning	10
1.1 Type 2 diabetes	10
1.2 Glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel	13
1.3 Kjernereseptorer	15
1.4 Lever X reseptorer	16
1.4.1 Kolesterolmetabolisme	18
1.4.2 Lipogenese	19
1.4.3 Glukosemetabolisme	20
1.5 LXR i skjelettmuskel	22
1.6 LXR-knockout(KO)-celler	25
1.7 Mål	28
2. Materialer og metoder	30
2.1 Materialer	30
2.2 Metoder	31
2.2.1 Cellemodell	31
2.2.2 Isolering av satellittceller fra mus	31
2.2.3 Opprensing av satellittceller	32
2.2.4 Utsåing av satellittceller	32
2.2.5 Splitting	33
2.2.6 Dyrking og differensiering av satellittcellene til myotuber	33
2.2.7 Dyrkningsbetingelser	34
2.2.8 LXR-KO-mus	34
2.2.9 Palmitinsyreopptak	35
2.2.10 Glukosetransport	36
2.2.11 Acetat-inkorporering i lipider	36
2.2.12 Ekstraksjon og separering av lipider	37
2.2.13 Proteinmåling	38

2.2.14 RNA isolering og kvantifisering	38
2.2.15 Revers transkripsjon Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	39
2.2.16 Real-time RT-PCR	39
3. Resultater.....	43
3.1 Optimalisering av metode for opprensing og dyrking av skjelettmuskelceller fra mus.	43
3.1.1 Opprensing av skjelettmuskelceller fra mus	43
3.1.2 Dyrkningsbetingelser	44
3.2 Effekter av T0901317 på skjelettmuskelceller fra villtype-mus	50
3.2.1 Effekter av T0901317 på glukoseopptak	50
3.2.2 Doseresponskurve for glukoseopptak etter T0901317-behandling.....	52
3.2.3 Effekter av T0901317 på palmitinsyre(PA)opptak	53
3.2.4 Doseresponskurve for palmitinsyre(PA)opptak etter T0901317-behandling	55
3.2.5 Effekter av T0901317 på acetat-inkorporering i lipider.....	57
3.2.6 Effekter av T0901317 på ekspresjon av ABCA1, SREBP-1c og LXR α	60
3.3 Effekter av T0901317 på genekspresjon i skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β - KO-mus	62
3.3.1 Endogene kontrollgener ved real-time PCR.....	62
3.3.2 Effekter av T0901317 i LXR α -KO/WT- og LXR β -KO/WT-celler.....	63
4. Diskusjon.....	70
4.1 Dyrking av skjelettmuskelceller fra mus.....	70
4.2 Effekter av T0901317 på glukosetransport	71
4.3 Effekter av T0901317 på lipidmetabolisme	73
4.4 Effekter av T0901317 på ekspresjon av relevante gener	75
5. Konklusjon og fremtidsutsikter	79
Litteraturhenvisninger	81
Appendiks.....	85

Sammendrag

Lever X reseptorer (LXR) er ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer og viktige regulatorer av kolesterol og lipidmetabolisme, i tillegg til at de nylig er blitt identifisert som viktige faktorer involvert i glukosemetabolisme. LXR-familien består av to isoformer, LXR α og LXR β . Endogene ligander for LXR er oksysteroler, og på samme måte som den syntetiske LXR-agonisten T0901317 skiller de ikke mellom de to isoformene av LXR. Fordi det er ønskelig å studere selektiv aktivering av hver av de to isoformene av LXR med det mål å finne mulige forskjeller i de to isoformenes funksjoner, har utvikling av selektive LXR α - og LXR β -knockout(KO)-mus vært viktig. Ved å isolere skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β -singel-KO-mus og deretter behandle disse med den uselektive LXR-agonisten T0901317, har man et verktøy for å undersøke de to LXR isoformenes funksjoner i skjelettmuskel.

Skjelettmuskelceller fra mus ble isolert og opprenset i flere trinn, og metoden for *in vitro* dyrking av skjelettmuskelceller ble optimalisert med hensyn til blant annet vekstmedium, coating og celletetthet ved utsåing. Fordi det ikke tidligere var jobbet med myotuber fra mus i vårt laboratorium, ble ulike forsøksoppsett testet, hvor cellene ble utsatt for ulik varighet av vekstperiode, differensiering og preinkubering med LXR-agonist. Myotuber fra villtype-mus viste økt glukoseopptak som respons på T0901317-behandling. Det var også en tendens til at fettsyreopptak i skjelettmuskelceller fra villtype-mus økte etter T0901317-behandling, selv om resultatene var noe varierende. Selv om antall forsøk er få, kan det se ut til at effektene av T0901317 på metabolske prosesser som glukosetransport og fettsyreopptak i myotuber fra mus er de samme som i humane skjelettmuskelceller. Viktige målgener av LXR som sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) og ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) ble markant oppregulert etter T0901317-behandling av myotuber fra villtype-mus. I skjelettmuskelceller fra LXR α -KO-mus var effekten av T0901317 på SREBP-1c-ekspressjon nesten halvert sammenlignet med celler fra villtype-mus, mens effekten av T0901317 på SREBP-1c-ekspressjon var omtrent lik i LXR β -KO- og villtype-celler. Disse resultatene indikerer at ekspressjon av SREBP-1c er mest avhengig av LXR α -aktivering. Effekten av T0901317 på ABCA1-ekspressjonen var økt i LXR α -KO sammenlignet med celler fra villtype, mens T0901317-responsen var markant redusert i LXR β -KO sammenlignet med celler fra villtype-mus. Dette antyder at ABCA1-ekspressjon er mest avhengig av LXR β -aktivering. Det er tidligere gjort studier som tyder på at LXR α spiller en viktig rolle for akkumulering av

triglyserider (lipogenese) i lever assosiert med SREBP-1c-induksjon, samtidig som LXR β ser ut til å være mindre viktig for lipogenese, men derimot er assosiert med revers kolesteroltransport koblet til økt ABCA1-ekspresjon. Resultatene i denne oppgaven kan tyde på at de to isoformene av LXR har samme effekter i skjelettmuskel som i andre målvev for LXR. Fordi det er ønskelig å separere de gunstige effektene av LXR-aktivering på kolesterolmetabolisme (antiaterogene effekter) og glukosemetabolisme (antidiabetiske effekter) fra de uønskede effektene på lipidmetabolisme (lipogene effekter), kan LXR β -selektiv aktivering se ut til å være fordelaktig.

Forkortelser

36B4	Human acidic ribosomal phosphoprotein PO
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ACBP	Acyl-CoA bindende protein
ACC	Acyl-CoA karboksylase
ApoAI/E	Apolipoprotein AI/E
ATP	Adenosin trifosfat
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovint serum albumin
CD36/FAT	Fettsyretransportør
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CE	Kolesterolester
CETP	Kolesterylester transport protein
Cyp	Cytokrom P-450
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Dietylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
ECM	Ekstracellulær matriks gel
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
ES-celler	Embryo-stamceller
FABP	Fettsyrebindende protein
FAS	Fettsyresyntase
Fbp1	Fruktosebifosfatase
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Fri fettsyre
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfatase dehydrogenase
GK	Glukokinase
GLUT	Glukosetransportør
G-6-Pase	Glukose-6-fosfatase
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution

HDL	High density lipoprotein
KO	Knockout
LPL	Lipoprotein lipase
LXR	Lever X reseptor
LXRE	Lever X reseptor responselementer
M	Molar (mol/liter)
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
OD	Optical density
PA	Palmitinsyre
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCR	Polymerase chain reaction
PEPCK	Fosfoenolpyruvat karboksykinase
PL	Fosfolipid
PLTP	Fosfolipid transfer protein
PPAR	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor
RNA	Ribonukleinsyre
RT	Revers transkripsjon
RXR	Retinoid X reseptor
SCD-1	Stearoyl-CoA desaturase-1
SEM	Standard Error of the Mean
SkGM	Skeletal growth medium
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein-1c
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triacylglyserol
TLC	Tynnnsjikkromatografi
WT	Villtype

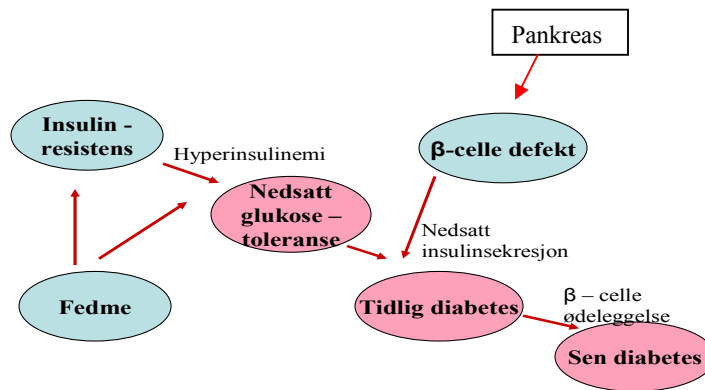
1. Innledning

1.1 Type 2 diabetes

Diabetes mellitus er et globalt helseproblem som ser ut til å nå pandemiske proporsjoner. Prevalensen er sterkt økende. Det finnes på verdensbasis mer enn 150 millioner mennesker med diabetes, og dette antallet er forventet å dobles innen år 2025 (1; 2). Type 2 diabetes (T2D) rammer mer enn 90 % av alle mennesker med diabetes og er en kompleks og kronisk metabolsk sykdom karakterisert av økte glukosenivåer i plasma. Den metabolske forstyrrelsen er et resultat av både utilstrekkelig insulinsekresjon og/eller hemmet insulineffekt, såkalt insulinresistens (3-5). Insulinresistens innebærer at den glukosesenkende effekten av en gitt insulinkonsentrasjon er mindre enn normalt. For senking av glukosekonsentrasjonen kreves høyere nivåer av insulin hos individer med insulinresistens. Som kompensasjon frisettes mer insulin fra endokrin pankreas. Hyperinsulinemi er derfor en markør for insulinresistens (4). Selv om cirka to av tre individer med insulinresistens ikke utvikler T2D, har de omtrent samme økte risiko for kardiovaskulære hendelser som individer med T2D (6). T2D er assosiert med økt risiko for makrovaskulære komplikasjoner som hjerte-kar sykdom, perifer vaskulær sykdom og slag, i tillegg til mikrovaskulære komplikasjoner i organer som øyne, nyrer og nerver (7). Kardiovaskulær sykdom er to til fire ganger mer vanlig hos pasienter med T2D enn hos ikke-diabetiske individer (8). Opphopning av risikofaktorer for hjerte- og karsykdom, karakterisert av begrepet metabolsk syndrom, er en viktig forløper i utviklingen av T2D. Sentralt for begrepet metabolsk syndrom er den underliggende insulinresistensen, sammen med tilstedeværelse av en eller flere av faktorene abdominal fedme, hypertensjon, dyslipidemi (høye triglyseridnivåer og lav HDL-konsentrasjon) og høy plasmaglukose. Fordi abdominale fettdepoter er nært beslektet med utvikling og progresjon av insulinresistens og T2D (9), er vekttap hos overvektige eller fete individer kanskje den mest effektive måten å bedre insulinsensitiviteten på. Kosthold og fysisk aktivitet er derfor viktige intervensjonsfaktorer for å redusere insidensen av T2D (2). Standard medikamentell behandling av T2D har så langt ikke vært effektiv når det gjelder å forandre den dårlige prognosen. Årsaken til dette er at forsøkene på behandling kun retter seg mot å senke glukosenivåer, noe som bare er en del av insulinresistens-syndromet. Hvis prognosen skal

bedres, må behandlingen rettes mot den underliggende patofysiologiske defekten, det vil si insulinresistens. Dersom insulinsensitiviteten bedres, vil også de aterogene effektene som følger med insulinresistens og metabolsk syndrom bedres (2). Ved å kartlegge de grunnleggende mekanismer involvert i insulinresistensutvikling og fedme kan man øke mulighetene for å forhindre sykdomsutviklingen og forbedre behandlingen av T2D.

Skjelettmuskel er det viktigste vevet for insulinstimulert glukosetransport, og insulinresistens i skjelettmuskel er en vanlig funn hos overvektige individer og ofte et tidlig tegn i utviklingen av T2D. I tillegg spiller skjelettmuskel en viktig rolle i lipidmetabolisme. Det er en sterk sammenheng mellom nedsatt insulinstimulert glukosemetabolisme (hyperglykemi og insulinresistens) og økte intramuskulære lipidansamlinger. I tillegg er forstyrrelser i fettsyreoksidasjon og mitokondriell dysfunksjon, faktorer som begge kan føre til redusert glukosemetabolisme, observert hos overvektige og diabetiske pasienter, sammen med akkumulering av intracellulære lipider (10). Hyperglykemi og insulinresistens er derfor assosiert med forstyrrelser i lipidmetabolismen. Selv om mekanismen bak insulinresistens ikke er kjent i detalj, er økte nivåer av frie fettsyrer (FFA) i plasma en viktig faktor som er assosiert med insulinresistens og utvikling av T2D. Forstyrrelser i fettsyremetabolismen med resulterende økte nivåer av FFA og triacylglyserol (TAG) er i en rekke studier vist å være assosiert med insulinresistens (11). Insulinresistens i skjelettmuskel er karakterisert av nedsatt insulinstimulert glukoseopptak, glykogensyntese og glukoseoksidasjon, redusert lipidoksidasjon, økte nivåer av lipider som TAG, diacylglyserol (DAG) og acyl-CoA, i tillegg til mitokondriell dysfunksjon og nedregulering av gener involvert i oksidativ fosforylering.



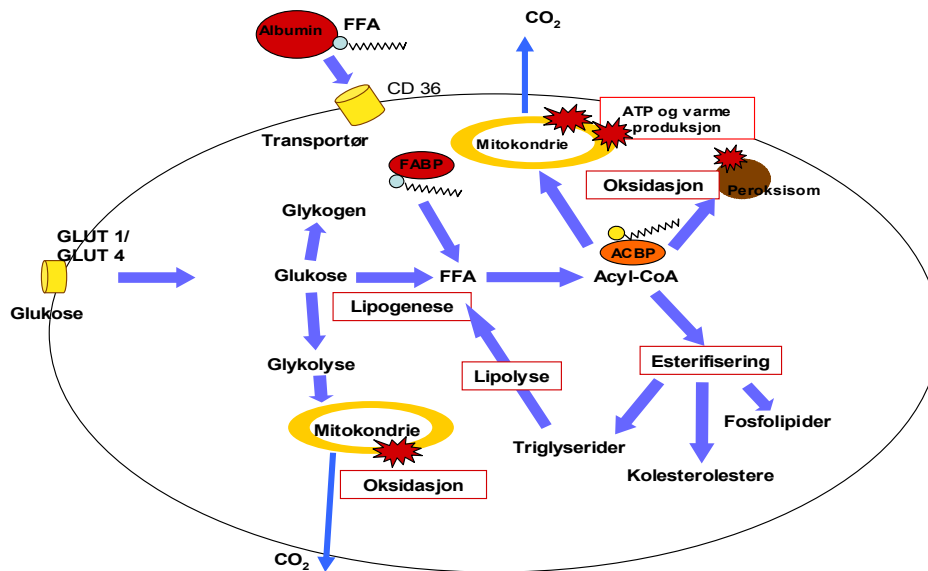
Figur 1.1 Skjematisk fremstilling av utvikling av T2D. Abdominal fedme bidrar til insulinresistens og nedsatt glukosetoleranse med hyperinsulinemi. Pankreas β -celledefekt gir nedsatt insulinsekresjon, og sammen med nedsatt glukosetoleranse gir dette en tidlig form for diabetes. Når β -cellene senere er helt ødelagt, utvikles sen insulinavhengig diabetes.

1.2 Glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel

Figur 1.2 illustrerer viktige trinn i generell metabolisme av glukose og lipider i skjelettmuskelceller.

Skjelettmuskel utgjør cirka 40 % av kroppsvekten og er et av de viktigste organene for metabolisme av glukose og lipider, sammen med lever og fettvev. Frie fettsyrer (FFA) tas opp i skjelettmuskelceller hovedsakelig via protein-transportører (carriers) i plasmamembranen (fettsyretranslokase – CD36/FAT) og transporteres intracellulært via fettsyrebindende proteiner (FABP). FFA aktiveres av acyl-CoA syntetaser til acyl-CoA, som går videre via acyl-CoA bindende protein (ACBP) til mitokondrier eller peroksisomer for β -oksidasjon (nedbrytning og dannelse av energi i form av ATP og varme), eller til endoplasmatisk retikulum for esterifisering til forskjellige lipidklasser, som TAG, DAG, fosfolipider (PL) og kolesterolistere (CE). Insulin fremmer syntesen av lipider (lipogenese), og hemmer nedbrytningen. Studier tyder på at mange av prosessene som bidrar til dette er avhengig av en økning i transkripsjonsfaktoren sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP1c) (12).

Glukose tas opp i skjelettmuskelceller via glukosetransportørene GLUT1 eller GLUT4. GLUT1 er den hyppigst uttrykte isoformen av glukosetransportørene, den påvirkes ikke av insulin og medvirker til basalt glukoseopptak. GLUT4 eksisterer kun i insulinfølsomt vev, hovedsakelig skjelettmuskel og fettvev, og er den viktigste transportøren involvert i insulinstimulert glukoseopptak. Ved fravær av insulin befinner GLUT4 seg i intracellulære lagre. Økning i glukosetransporten som respons på insulinstimulering skjer ved translokering av GLUT4 til plasmamembranen, hvor den inkorporeres i membranen (eksocytose) og fungerer som en glukosekanal (12). Glukose kan omdannes til fettsyrer (lipogenese) hvis det er overskudd av glukose i skjelettmuskelcellen. Insulin stimulerer glykogendannelse i muskel gjennom økning i glukosetransport og glykogensyntese (12).



Figur 1.2 Metabolisme av glukose og lipider i skjelettmuskelceller. GLUT 1/4, glukosetransportør 1/4; CD36/FAT, fetttsyretransportør; FABP, fetttsyrebindende protein; FFA, frie fettstyrer; ACBP, acyl-CoA bindende protein.

1.3 Kjernereseptorer

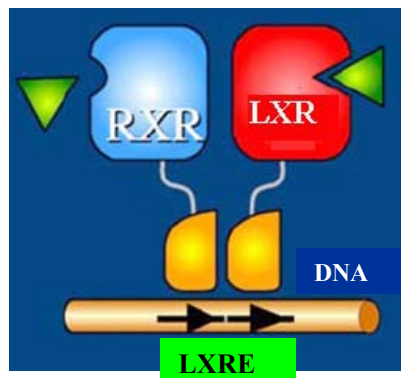
Kjernereseptorer er en av de vanligste klassene transkripsjonsfaktorer hos dyr (13). Kjernereseptor-superfamilien beskriver en rekke beslektede, men forskjellige transkripsjonsfaktorer, som inkluderer kjernereseptorer og orfane ("foreldreløse") kjernereseptorer. Kjernereseptorer er reseptorer hvor hormonelle ligander har blitt identifisert, mens orfane kjernereseptorer er reseptorer med ukjente ligander (14). Kjernereseptor-familien består av en gruppe beslektede transkripsjonsfaktorer som regulerer ekspresjon av utvalgte målgener. De er ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer, og fungerer derfor som en direkte link mellom signalmolekyler som regulerer ulike prosesser og transkripsjonsresponsen (13). Reseptorene opererer i cellekjernen ved å binde til responselementer lokalisert oppstrøms i promoterregionen på spesifikke gener. Når de aktiveres av binding av en passende ligand, fremmer de gentranskripsjon ved å interagere med faktorer i transkripsjonsprosessen. Kjernereseptorer kan basert på DNA-binding og dimeriseringsegenskaper videre klassifiseres i fire grupper (15):

- steroidreseptorer (homodimere)
- retinoid X-reseptor (RXR)-heterodimere
- monomere orfan-reseptorer
- dimere orfan-reseptorer

Retinoid X-reseptor-heterodimere er kjernereseptorer som dimeriserer med RXR. Ligand-aktivatoren for RXR er 9-cis-retinsyre, og etter kompleks dimerisering med aktiverte kjernereseptorer, fremmes gentranskripsjonen synergistisk (16).

1.4 Lever X reseptorer

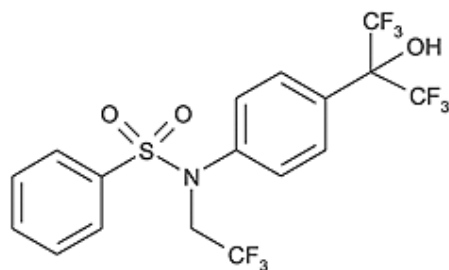
Lever X reseptorer (LXR) er medlemmer av kjernereseptor-superfamilien og er ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer. De ble opprinnelig karakterisert som orfane kjernereseptorer, fordi deres naturlige ligander ikke var kjent (17; 18). De ble imidlertid ”adopterte” orfane reseptorer etter at det ble oppdaget at kolesterolmetabolitter – oksysteroler – binder og aktiverer disse reseptorene ved fysiologiske konsentrasjoner (18; 19). LXR er kjernereseptorer av typen RXR-heterodimere. De binder til DNA som obligate heterodimere med RXR, og regulerer genekspressjon via LXR responselementer (LXRE) (figur 1.3) (16; 18).



Figur 1.3 RXR-heterodimer. RXR dimeriserer med LXR. Etter aktivering ved binding til sine respektive ligander, bindes komplekset til LXRE på DNA og fremmer genekspressjon. Figuren er tilpasset fra Olefsky et al. (14).

LXR familien består av to identifiserte medlemmer, LXR α og LXR β . De har blitt identifisert i mennesker, mus og rotte (20). Mens LXR β uttrykkes i de fleste vev, er LXR α kun uttrykt i vev som involverer lipidmetabolisme, som lever, fettvev, tynntarm, nyrer, makrofager og skjelettmuskel (17; 18; 21; 22). De endogene ligandene for både LXR α og LXR β er intermediater eller sluttprodukter av kolesterolmetabolisme, det vil si oksysteroler (oksygenererte derivater av kolesterol) slik som 22-(R)-hydroksykolesterol, 24-(S)-25-epoksykolesterol, 24-(S)-hydroksykolesterol og 27-hydroksykolesterol (23). Disse oksysterolene forårsaker allosteriske forandringer i ligandbindings-omenene som regulerer

interaksjoner med koaktivator- og korepressor-komplekser og forandrer transkripsjon av målgener. Verken fritt kolesterol eller kolesterolestere ser ut til å være fysiologiske ligander for LXR. Videre bindes og aktiveres begge isoformene av LXR av syntetiske ikke-steroide LXR-ligander, som T0901317 (figur 1.4) (24). De syntetiske ligandene er et resultat av omfattende struktur-aktivitetsstudier på de endogene ligandene. Selektive ligander for LXR α og LXR β er enda ikke beskrevet.



Figur 1.4 Strukturen til den syntetiske LXR-agonisten T0901317.

Studier de siste 10 år har vist at LXR regulerer gener involvert i kolesterol-, lipid- og glukosemetabolisme, i tillegg til inflammatoriske responser. Funksjonen til LXR i kolesterol- og lipidmetabolisme i lever, fettvev og makrofager er i stor grad studert, mens LXR sin rolle i lipid- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel er mindre definert. Lever, muskel og fettvev er også viktige målorgan for insulins virkning, hvor insulin stimulerer opptak av overskudd glukose fra blod og inhiberer glukoseproduksjon i lever (glukoneogenese). Insulinresistens er en avgjørende faktor i utvikling av T2D, som fører til hyperglykemi og hyperlipidemi. Dette er patologiske tilstander hvor LXR kan være en sentral aktør (25). I tillegg er det vist at ekspresjon av LXR α induseres av insulin i hepatocytter (26), noe som tyder på at LXR kan være en viktig mediator i insulinvirking. Det er dermed mulig at LXR ikke bare spiller en nøkkelrolle i metabolsk regulering, men også kan være direkte involvert i de metabolske forandringene som fører til T2D (27). En annen viktig faktor er at peroksisom proliferator-aktivert reseptor (PPAR) γ -agonister (glitazoner), etablert som behandling for T2D da de øker insulinsensitiviteten og bedrer glykemisk kontroll, induserer LXR α -ekspresjon (28). Dette indikerer at noen av de positive effektene som sees ved bruk av PPAR γ -agonister kan være medierte via LXR, noe som kan gi håp om at LXR-agonister kan gi lignende gunstige effekter som glitazonene.

1.4.1 Kolesterolmetabolisme

Oppdagelsen av oksysteroler som fysiologiske ligander for LXR pekte mot en mulig rolle for disse reseptorene i kolesterolmetabolisme (19; 23). LXR virker som sensorer for kolesterolmetabolitter, og responderer på økte sterolnivåer ved å aktivere en rekke gener involvert i transport, katabolisme og eliminering av kolesterol. Et svært viktig verktøy i oppdagelsen av LXRs funksjoner har vært utvikling av LXR-knockout(KO)-mus, det vil si mus som mangler LXR-genet. Undersøkelser av mus hvor begge LXR isoformene er fjernet (dobbel-KO, se 1.6) har påvist et fysiologisk behov for LXR i vedlikehold av kolesterolhomeostase (29). LXR α -KO-mus foret med en kolesterolrik diett utviklet massive akkumuleringer av kolesterol i leveren, mens villtype(kontroll)-mus var resistente mot kolesteroldietten (29; 30). Denne fenotypen førte til oppdagelsen av cyp7a1, et medlem av cytokrom-P450-familien og det hastighetsbestemmende enzymet i gallesyresyntese, som det første direkte målgen for LXR. LXR α -KO-mus sin manglende evne til å inducere cyp7a1-uttrykk i lever resulterer i svekket evne til å metabolisere kolesterol til gallesyre, og dermed akkumulering av kolesterolestere. LXRE som sitter på cyp7a1 promoteren hos rotter er ikke funnet igjen hos mennesker (31). LXR β er også uttrykt i lever, men LXR β -KO-mus viste seg å være resistente mot den kolesterolrike dietten, uten akkumulering av kolesterol i leveren (30). Dette indikerer at LXR α er den dominante isoformen i dette vevet.

Senere studier har vist at LXR også regulerer en rekke gener involvert i revers kolesteroltransport, det vil si transporten av overskudd kolesterol i form av HDL fra perifere vev til leveren, hvor kolesterolet kan sekreseres direkte til galle eller omdannes til gallesyre (32). *In vivo* aktivering av LXR med en syntetisk ligand økte HDL-nivåer og netto kolesterolsekresjon, i tillegg til å gi hemmet kolesterolabsorpsjon i tarmen hos mus (33). Disse gunstige effektene på systemisk kolesterolhomeostase er antatt å ha fordelaktige effekter med tanke på prevensjon av kardiovaskulær sykdom. Aktivitetene er for en stor del avhengig av LXRs evne til å kontrollere ekspresjon av medlemmer av ATP-binding cassette transporter(ABC)-superfamilien av membrantransportører, inkludert blant annet ABCA1 (33). ABC-transportører er integrerte membranproteiner som kopler hydrolysen av ATP til transport av forskjellige substanser over cellemembraner. Et spesielt viktig LXR målgen er ABCA1. Det er nå kjent at ABCA1 fremmer effluks av kolesterol og fosfolipider til lipid-

fattige apolipoproteiner (for eksempel apoAI), det første steget i revers kolesteroltransport (34). En rekke studier har slått fast at LXR spiller en sentral rolle i kontroll av ABCA1-ekspressjon og kolesteroleffluks (33; 35-37). Repa et al. (33) fastslo at LXR/RXR heterodimere er nøkkelregulatorer av ABCA1-ekspressjon *in vivo* og viste at ligand-aktivering av LXR inhiberer kolesterolabsorpsjon i tarmen hos mus. De viste også at oksysteroler og syntetiske LXR-aktivatorers evne til å stimulere ABCA1 ekspressjon er tapt hos mus som mangler LXR. Costet et al. (35) identifiserte et LXRE i promoteren til ABCA1-genet. Evnen LXR har til å stimulere kolesteroleffluks er direkte beslektet med evnen til å kontrollere ABCA1 fordi effekten av LXR-ligander ikke er tilstede i fibroblaster fra pasienter med Tangiers sykdom, en sykdom som forårsakes av mutasjoner i ABCA1-genet (34). Revers kolesteroltransport er spesielt viktig i makrofager, fordi for mye kolesterol i disse cellene kan føre til dannelsen av skumceller, og dermed føre til aterosklerose. LXR er derfor viktig for å hindre kolesterolakkumulering i makrofager i arterieveggen (27). Mekanismen involverer oppregulering av ABC-transportører og er viktig med tanke på prevensjon av kardiovaskulær sykdom/aterosklerose.

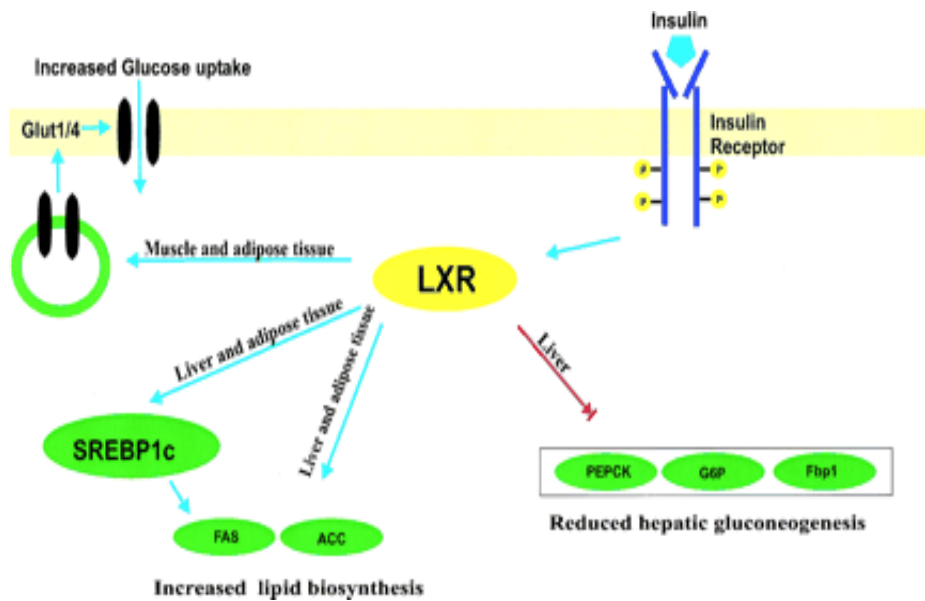
1.4.2 Lipogenese

LXR er også en viktig regulator av lipogenese. Behandling av mus med syntetiske LXR-agonister øker triglyseridnivåene i leveren, i tillegg til forbigående i plasma, en effekt som naturlig nok er en hindring med tanke på utvikling av disse forbindelsene som legemidler til mennesker (24). Den lipogene aktiviteten til LXR skyldes oppregulering av hovedregulatoren av hepatisk lipogenese, sterol regulatory element-binding protein-1c, (SREBP-1c) (38), i tillegg til induksjon av fettsyresyntase (FAS) (39), acyl-CoA karboksylase (ACC) og stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 (34). LXR induserer SREBP-1c ekspressjon via en LXRE i promoteren som er identifisert hos mus (38). Behandling av mus med syntetiske LXR-agonister *in vivo* er vist å øke mRNA-nivået av SREBP-1c i leveren, en effekt som er fraværende i LXR-KO-mus (38). SREBP-1c er også observert oppregulert i adipocytter fra mus etter *in vitro* behandling med LXR-agonist (40). SREBP-1c-genet koder for en membranbundet transkripsjonsfaktor i basic-helix-loop-helix-leucine zipper familien, som regulerer transkripsjon av gener involvert i fettsyrebiosyntese, det vil si lipogene enzymer, som FAS, ACC og SCD-1 (38). FAS, ACC og SCD-1 er på denne måten trolig både direkte

og indirekte (via SREBP-1c) målgener av LXR. Mange LXR-målgener, slik som SREBP-1c og SCD-1 er også regulert av insulin. Dette kan tyde på at LXR kan mediere noen av insulineffektene på disse genene. LXR er også en positiv regulator av mange enzymer involvert i lipoprotein remodellering, som lipoprotein lipase (LPL), kolesterylester transport protein (CETP) og fosfolipid transport protein (PLTP), og det er sannsynlig at LXR gjennom regulering av disse enzymenes virkning også gir effekter på plasma lipoproteiner (34).

1.4.3 Glukosemetabolisme

Glukosemetabolisme påvirkes også av LXR-aktivitet. Ved faste stimulerer insulin perifert glukoseopptak, undertrykker hepatisk glukoseproduksjon og stimulerer *de novo* lipogenese. Forstyrrelser i lipidmetabolismen kan føre til svekkelser i perifer glukoseutnyttelse og utvikling av insulinresistens og T2D. Mye tyder på at LXR spiller en rolle i å regulere samspillet mellom glukose- og lipidmetabolisme (41). Syntetiske LXR-agonister har vist å bedre glukosetoleransen i diabetiske mus (41) og rottmodeller (42). Denne effekten er assosiert med undertrykking av hepatiske glukoneogenetiske-gener som fosfoenolpyruvat karboksykinase (PEPCK) og glukose-6-fosfatase (G-6-Pase), og med induksjon av glukokinase (GK), som fremmer hepatisk glukoseutnyttelse. Disse forandringene vil normalt resultere i nedsatt hepatisk glukoseproduksjon og økt hepatisk glukoseutnyttelse (43). Den insulinavhengige glukosetransportøren GLUT4 har blitt påvist som et direkte målgen for LXR i fettvev. Aktivering av LXR fører til induksjon av GLUT4, en effekt som er fraværende i LXR-KO-mus samt i hepatocytter fra LXR-KO-mus (41). Induksjon av GLUT4 vil normalt resultere i økt opptak og utnyttelse av glukose i fettvev (41; 44). Nyere studier har også vist at LXR spiller en rolle i pankreas, hvor aktivering av LXR øker glukoseavhengig insulinsekresjon (45). Dette indikerer at LXR-effekter på β -celler i pankreas er relevante i forhold til å senke blodglukose.



Figur 1.5 Samspill mellom metabolske effekter av insulin og LXR. Figuren er hentet fra Steffensen et al. (25). Aktivisering av LXR fører til økt glukoseopptak i muskel og fettvev via GLUT-transportører. I lever og fettvev fremmer LXR syntese av lipider ved å indukere ekspresjon av lipogene enzymer. LXR undertrykker glukoneogenese i leveren ved å inhibere viktige glukoneogenetiske enzymer. Det er også kjente effekter av insulin. Insulin inducerer ekspresjon av LXR α , noe som indikerer en viktig rolle for LXR i insulinsignalering. Insulin utøver sin effekt via insulinreseptoren som blir autofosforylert, og videre fosforylerer insulinreseptorsubstratene. Den molekylære mekanismen bak LXR α -induksjon av insulin er ikke kjent. ACC, acyl-CoA karboksylase; FAS, fettsyresyntase; Fbp1, fruktosebifosfatase 1; G6Pase, glukose-6-fosfatase (25).

1.5 LXR i skjelettmuskel

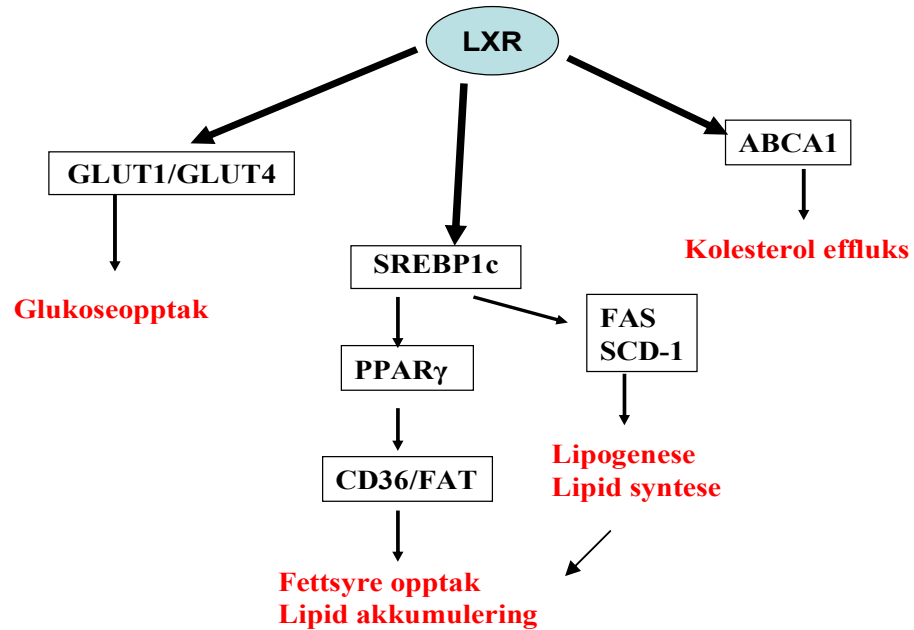
Skjelettmuskel har nylig blitt beskrevet som et viktig målorgan hvor LXR er involvert i lipid- og karbohydratmetabolisme (46-49). Den funksjonelle rollen til LXR i skjelettmuskel er imidlertid ikke fullstendig klarlagt.

Forandringer i lipidmetabolisme i skjelettmuskel, karakterisert av redusert evne til å oksidere fettsyrer og intramyocellulær akkumulering av triglyserider, er som nevnt tidligere kjennetegn ved insulinresistens og T2D. I tillegg er insulinresistens i skjelettmuskel et svært vanlig funn ved T2D, og det perifere glukoseopptaket i muskel er redusert. Fordi LXR er involvert i kontroll av lipid- og glukosemetabolisme, er studier av LXR sin rolle i skjelettmuskel relevant med tanke på å kunne utvikle potensielle legemidler mot T2D. Det er flere grunner til at skjelettmuskel er et viktig vev med tanke på å undersøke forholdet mellom LXR og T2D:

- Insulinresistens i skjelettmuskel er et tidlig tegn på utvikling av T2D.
- Skjelettmuskel står for mer enn 80 % av kroppens glukoseforbruk og er storforbruker av fettsyrer.
- Insulinresistens assosieres med redusert lipidoksidasjon og økte lagre av lipider i andre vev enn fettvev, som skjelettmuskel.
- Insulinresistens i muskel er ofte et tidlig tegn på T2D.
- Andre tidlige tegn på T2D er mitokondriell dysfunksjon og nedregulering av gener involvert i oksidativ fosforylering. Begge faktorer fører til endret lipidoksidasjon og lagring av lipider i skjelettmuskel.

Både LXR α og LXR β uttrykkes i skjelettmuskel, men LXR β er den hyppigst uttrykte formen og er 30 ganger mer vanlig enn LXR α (46). Det er ikke vist forandring i uttrykket av LXR i vev fra pasienter med T2D (46). Studier har vist at LXR stimulering med T0901317 i skjelettmuskel oppregulerer kjente LXR målgener som SREBP-1c, FAS, SCD-1, CD36/FAT, apolipoprotein E, ABCA1, PPAR γ og glukosetransportørene GLUT1 og GLUT4 (46-48). SREBP-1c er vist kraftig oppregulert som respons på LXR-agonisten T0901317 i humane skjelettmuskelceller i kultur (46; 48), mens behandling av mus med T0901317 *in vivo* er vist å øke ekspresjon av SREBP-1c og ABCA1 i skjelettmuskel (47). Det er usikkert om LXR har

en direkte effekt på SREBP-1c målgenene FAS og SCD-1, eller om dette er indirekte effekter via SREBP-1c. Fettsyretranslokasen CD36/FAT er et målgen av PPAR γ , og CD36/FAT induseres trolig enten direkte eller via induksjon av PPAR γ . PPAR γ induseres sannsynlig via SREBP-1c (48). I tillegg er LXR α -genet vist oppregulert av T0901317 (46). Autoregulering av genet som koder for LXR α er også tidligere vist for makrofager (50), med identifisering av flere LXRE i promoteren (51). Kase et al. (48) viste nylig at kronisk (4 dager) LXR-aktivering med T0901317 øker palmitatopptak og lipidakkumulering i humane myotuber, i tillegg til økt fettsyreoksidasjon. Det er sannsynlig at økt fettsyreopptak og lipidakkumulering er et resultat av LXR sin evne til å øke ekspresjon av lipogene enzymer som SREBP-1c og fettsyretranslokasen CD36/FAT. Det ble av Kase et al. (48) også vist økt glukoseopptak og glukoseoksidasjon i skjelettmuskelceller etter T0901317-behandling, sammen med induksjon av glukosetransportørene GLUT1 og GLUT4 (48). I tillegg viste myotuber fra pasienter med T2D etter LXR-aktivering økt opptak og inkorporering av palmitat til komplekse lipider, men fravær av palmitat-oksidering. Dette kan tyde på at økt intramyocellulært lipidinnhold i T2D pasienter kan involvere en endret respons på aktivering av komponenter i LXR-signalveien (48). Senere studier har vist at T0901317 kan fremme *de novo* lipogenese i muskelceller ved tilstedeværelse av høye glukosekonsentrasjoner (46). LXR-agonisten T0901317 er også vist å øke revers kolesteroltransport i muskelceller fra mus, en effekt som mest sannsynlig medieres via induksjon av ABCA1 (47). Studiene tyder på at aktivering av LXR kan ha positive effekter på sirkulerende fettsyrer og glukosekonsentrasjoner ved å øke deres opptak og metabolisme i muskelceller, i tillegg til en gunstig effekt på kolesterolsekresjon. Induksjon av lipogenese og økt opptak av fettsyrer fører imidlertid til akkumulering av triglyserider i muskelceller, noe som er assosiert med insulinresistens. Til tross for økt syntese av triglyserider, har ikke LXR-aktivering vist noen endret insulinvirkning i muskelceller. LXR-aktivering er heller ikke vist å bedre insulinresponsen i myotuber fra pasienter med T2D, noe som tyder på at det ikke er noen direkte effekt av LXR på insulinvirkning i humane skjelettmuskelceller (46).



Figur 1.6 LXR's rolle i fettsyre-, kolesterol- og glukosemetabolisme i skjelettmuskel hos mennesker. GLUT1/4, glukosetransportør 1/4; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein-1c; PPAR γ , peroksisom proliferator-aktivert reseptor γ ; CD36/FAT, fettsyretransportør; FAS, fettsyresyntase; SCD-1, stearyl-CoA desaturase-1; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1.

1.6 LXR-knockout(KO)-celler

Et svært viktig verktøy i oppdagelsen av LXRs funksjoner har vært utvikling av LXR-KO-mus, det vil si mus som mangler LXR-genet. Studier av mus hvor både LXR α og LXR β har manglet (dobbel-KO), har gitt mange viktige svar på LXR sin rolle i kolesterol-, lipid- og glukosemetabolisme. Det er også produsert LXR-singel-KO-mus, hvor bare en av isoformene er fjernet. Hensikten med dette er å studere funksjonen til hver av LXR isoformene. Nåværende LXR-modulatorer har ingen kjent spesifisitet for verken LXR α eller LXR β . Man antar at både de endogene oksysterolene og syntetiske ligander påvirker begge isoformene av LXR. Unntatt fra dette er en LXR α -selektiv agonist nylig beskrevet av Lund et al. (52). En viktig metode for å kunne studere effektene av aktivering av kun en av LXR isoformene er derfor produksjon av singel-KO-mus med kun den ene isoformen intakt, etterfulgt av behandling med LXR-modulatorer som antas å aktivere begge isoformene. Resultatet av dette blir aktivering av LXR α (i LXR β -KO-mus) eller LXR β (i LXR α -KO-mus). Studier med LXR-agonister kan gjøres både *in vivo* på levende mus og *in vitro* på celler isolert fra KO-dyr.

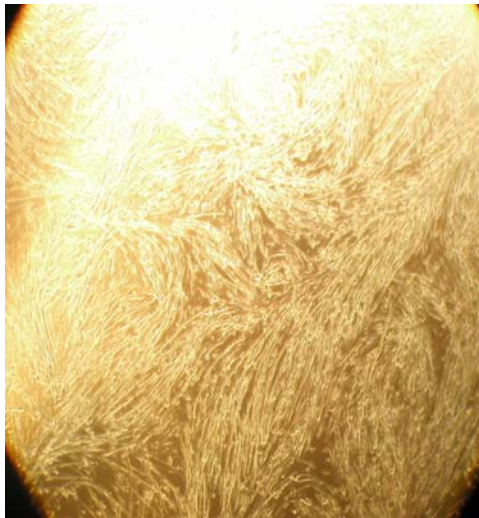
LXR stimulerer transkripsjon av en rekke gener involvert i kolesterol-, lipid- og glukosemetabolisme, noe som resulterer i oppregulering av revers kolesteroltransport, økt opptak og oksidasjon av glukose og fettsyrer, samt økt lipogenese. Oppregulering av lipogenese via induksjon av lipogene enzymer som SREBP-1c og FAS resulterer i økte triglyseridnivåer og er det største problemet med tanke på LXR som farmakologisk mål. Dette er årsaken til at det søkes farmakologiske modulatorer som separerer de gunstige effektene av LXR-aktivering på revers kolesteroltransport (antiaterogene effekter) og glukosemetabolisme (antidiabetiske effekter) fra de uønskede effektene på triglyseridsyntese (lipogene effekter). En aktuell strategi er selektiv modulering av LXR isoformene.

Etter hva man har sett av fenotypiske effekter av KO-mus i tidligere studier, er det sannsynlig at de to LXR isoformene ikke spiller identiske roller *in vivo*. LXR α -KO-mus viste akkumulering av kolesterol i leveren da de ble foret med en kolesterolrik diett, mens villtype-mus og LXR β -KO-mus var resistente mot den samme dietten (29; 30). Dette tyder på at LXR α spiller en viktig rolle i kolesterolmetabolisme i lever, og at LXR α kan være den viktigste isoformen i dette vevet. LXR α -KO-mus foret med den samme kolesterol-dietten ga også lavere hepatiske triglyseridnivåer sammenlignet med villtype-mus (29), noe som kan

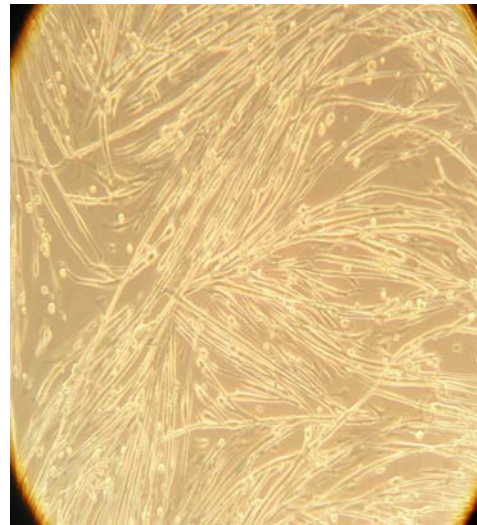
tyde på at LXR α er nødvendig for den lipogene effekten i lever. Disse studiene indikerer at LXR α -isoformen kontrollerer lipogenese i lever via aktivering av SREBP-1c-transkripsjon (29). Ingen lignende observerbar fenotype er sett på LXR β -KO-mus, men det er rapportert at LXR β -aktivering gir mindre lipogenese enn LXR α (48). LXR β er implisert i kontroll av basal ABCA1-ekspressjon i makrofager og regulering av kolesteroleffluks (33). Lund et al. rapporterte nylig om at selektiv aktivering av LXR β ved hjelp av LXR α -KO-mus ga redusert triglyseridakkumulering i lever sammenlignet med villtype-mus. Økt kolesteroleffluks i makrofager via induksjon av ABCA1 ble imidlertid observert både i LXR α - og LXR β -KO-mus. De benyttet også en LXR α -selektiv agonist som styrket teorien om at de lipogene effektene av LXR er mediert via LXR α (52). Disse studiene kan tyde på at LXR β -selektiv aktivering kan gjøre at de uønskede lipogene effektene i lever som domineres av LXR α kan unngås, samtidig som de positive effektene fra ABCA1-aktivering og økt kolesteroleffluks i makrofager beholdes. LXR β -spesifikke agonister er foreløpig ikke tilgjengelig.

Effekten av aktivering av LXR i LXR α - og LXR β -singel-KO-mus, eller i celler fra disse, er så vidt meg bekjent kun studert i andre vev enn muskel, og det er til dags dato derfor ingen kjennskap til de to LXR isoformenes roller i skjelettmuskel.

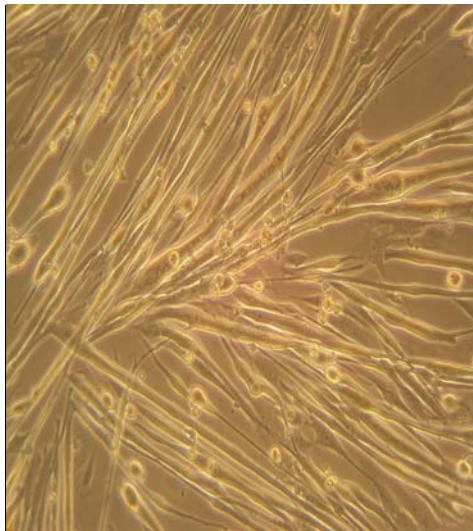
I dette arbeidet ble det brukt muskelceller isolert fra LXR-singel-KO-mus, LXR α - og LXR β -KO-dyr, og deres kontroller (villtype, WT) produsert ved AstraZeneca i Sverige, i tillegg til muskelceller fra C57-mus (villtype). Alle forsøk ble utført *in vitro* på disse muskelcellene. Cellene ble etter isolering og opprensing som beskrevet i metoder (2.2.2, 2.2.3) dyrket i kultur, og satellittcellene ble differensiert til flerkjernede myotuber (figur 1.7). Skjelettmuskelceller i kultur kan fungere som en god modell for å studere metabolisme i muskel, for å utforske mekanismer involvert i utvikling av insulinresistens og T2D, og for identifikasjon av nye angrepspunkter for behandling av fedme, insulinresistens og T2D.



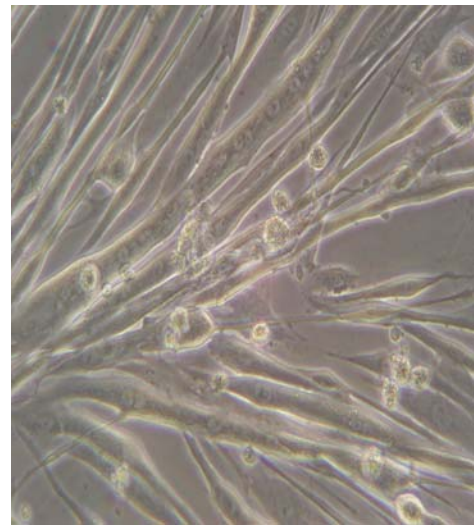
A (4 x)



B (10 x)



C (20 x)



D (40 x)

Figur 1.7 Myotuber fra villtype C57-mus etter 3 dagers differensiering. Bildene viser differensierte myotuber ved forskjellige forstørrelser; A: 4 x, B: 10 x, C: 20 x, D: 40 x.

1.7 Mål

Hovedmålet med denne oppgaven har vært å etablere en metode for dyrking av skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β -KO-mus og deres respektive kontroller for å studere effekten av aktivering av hver av LXR isoformene i skjelettmuskel. Det er ut fra dette ønskelig å undersøke funksjonen til de to isoformene av LXR i skjelettmuskel, samt se på eventuelle forskjeller.

For å få til dette var det nødvendig å først etablere og optimalisere en metode for dyrking av skjelettmuskelceller fra mus, før skjelettmuskelceller kunne isoleres fra LXR α - og LXR β -KO-mus og deres kontroller og deretter dyrkes.

Det var ønskelig å studere viktige regulatoriske trinn i glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β -KO-mus. Før dette kunne gjøres, var det et mål å gjennomføre funksjonelle og genetiske studier på skjelettmuskelceller fra villtype-mus, for å undersøke om disse responderte som humane celler på LXR-aktivering med agonisten T0901317. Det var deretter ønskelig å studere effekter av LXR-agonisten T0901317 på genekspressjon i skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β -KO-celler og deres respektive kontroller for å undersøke de to isoformenes funksjoner i skjelettmuskel hos mus.

Hovedmål med underliggende delmål:

- Etablere kulturer av myotuber fra LXR α - og LXR β -KO og deres kontroller (WT) for å studere effektene av hver av reseptor-isoformene
 - Etablere kulturer og optimalisere dyrkningsbetingelser for villtype-muskelceller fra mus
 - Isolere og reddyke muskelceller fra KO- og WT-mus
 - Etablere kulturer av muskelceller fra KO/WT-mus
 - Etablere cellebank av KO/WT-celler for videre studier

- Studere viktige regulatoriske trinn i glukose- og lipidmetabolisme i disse cellene etter LXR-aktivering
 - Studere metabolske effekter av LXR-agonisten T0901317 på glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskelceller fra villtype-mus. Responderer skjelettmuskelceller fra mus som humane celler?
 - Studere effekter av LXR-agonisten T0901317 på genekspressjon i skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β -KO-mus og deres kontrollere (WT).

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM/Glutamax), Ham's F10 medium, 0,05 % Trypsin/EDTA, L-glutamin, Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), Føtalt Kalve Serum (FCS), hestenserum, collagenase II, bovint serum albumin (BSA), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), fungizone og penicillin/streptomycin (10 000 U/ml - 10 000 µg/ml) ble innkjøpt fra Gibco, Paisly, Storbritannia. Ultrosor G ble skaffet fra BioSerpa, Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc., Paris, Frankrike. L-karnitin, 2-deoksy-D-glukose (umerket), N-[2-hydroxyetyl]piperazin-N'-[2-etansulfon syre] (hepes), dimetylsulfoksid (DMSO), dietylpyrokarbonat (DEPC), palmitinsyre (PA), lipid standarder (di- og triacylglyserol, frie fettsyrer og kolesterolestere), tris, fibronektin og ekstracellulær matriks gel (ECM) ble skaffet fra Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. [1-¹⁴C]-palmitinsyre og [2-³H]-deoksyglukose ble kjøpt fra American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA. Insulin Actrapid[®] kom fra Novo Nordisk, Bagsværd, Danmark. T0901317 ble levert fra Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA. Ultima Gold[®] ble skaffet fra Perkin Elmer, Boston, MA, USA. Alle primere (LXR α , LXR β , SREBP1c, ABCA1, GAPDH, β -aktin og 36B4) ble kjøpt fra Invitrogen (www.invitrogen.com). Absolute alcohol prima[®] ble skaffet fra Arcus Produkter A/S, Oslo, Norway. Bio-Rad Protein assay Dye reagent Concentrate ble levert fra BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA. NaCl, KCl, NaOH, CaCl₂ og MgSO₄ ble kjøpt fra Merck, Darmstadt, Tyskland. Lysis løsning, nuclease-fritt vann og kit til RNA isolering, Agilent Total RNA Isolation Protocol[®], ble skaffet fra Agilent Technologies, Inc., Wilmington, USA. TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents og SYBR GREEN PCR master mix ble levert fra Applied Biosystems, Woolston, Storbritannia. Clonetics[®] Skeletal growth medium (SkGM) ble kjøpt fra Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA. Blendzyme ble levert fra Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA. PFMR-4 medium ble skaffet fra Biofluids Inc., Rockville, MD, USA. Collagen I og Falcon flasker og brett til celledyrking ble skaffet fra BD Biosciences, Bedford, MA, USA. Corning brett til celledyrking ble levert fra Corning Inc., NY, USA. Alle andre kjemikalier brukt var standard kommersielle materialer av analytisk kvalitet.

2.2 Metoder

2.2.1 Cellemodell

I første del av arbeidet med å etablere og optimalisere metoden for dyrking av muskelceller fra mus ble det benyttet muskelceller fra C57-mus (villtype) som beskrevet av Carlsen et al. (53). Disse ble levert nedfrosset i cryotuber fra Avdeling for ernæringsvitenskap, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo. Cellene ble nedfrosset i nitrogentank og sådd ut som beskrevet under. LXR β -KO- og WT-celler ble isolert fra muskelvev fra KO- og WT-mus produsert ved AstraZeneca, Sverige, som beskrevet under. Isoleringen ble foretatt i Sverige, før cellene ble fraktet til Norge. LXR α -KO- og WT-celler ble isolert av personell ved AstraZeneca i Sverige og deretter fraktet til Norge ferdig isolert i flasker. Det ble etablert en cellebank.

2.2.2 Isolering av satellittceller fra mus

Skjelettmuskel fra mus ble dissekert ut under aseptiske forhold. Fettvev og bindevev ble fjernet, og muskelen kuttet opp i så små biter som mulig ved hjelp av to sterile skalpell. Muskelvevet ble inkubert i DMEM/Glutamax med 2 % collagenase II (nok til å dekke muskelvevet) ved 37 °C i 90 minutter, etterfulgt av vasking med vekstmedium for å fjerne collagenase. Fordøyd muskel ble videre oppløst til enkle muskelfibre ved repeterende triturering, før det ble sentrifugert ved 1800 rpm i 1 minutt. Etter at supernatanten var fjernet, ble fibrene vasket to ganger med PBS, etterfulgt av sentrifugering. Satellittceller ble dannet ved ytterligere fordøyelse av muskelfibrene med PBS med Blendzyme 0,038 WU/ml, 37 °C i 30 minutter. 10 % FCS ble tilsatt for å stoppe proteolysen, etterfulgt av sentrifugering ved 1800 rpm i 1 minutt for å fjerne uønsket fiberavfall. Supernatanten ble deretter filtrert gjennom et 70 mikron filter og sentrifugert ved 3600 rpm i 5 minutter, for å samle satellittcellene i pelleten. Cellene ble resuspendert i vekstmedium og sådd ut på BioCoat Collagen I flasker fra Falcon (25 cm²).

2.2.3 Opprensing av satellittceller

I løpet av de første passasjene av primærkulturen ble satellittcellene opprenset ved hjelp av ”preplating” for å fjerne blant annet fibroblaster. Cellene ble først vasket med 2 ml HBSS 3 ganger, før det ble tilsatt 1 ml trypsin-EDTA til hver flaske. Deretter ble flaskene inkubert i 1 minutt ved 37 °C (for at cellene skulle løsne fra bunnen). Cellene ble sjekket under mikroskop for å sikre at de var løsnet fra bunnen av flasken. 2 ml vekstmedium ble tilsatt, etterfulgt av repeterende pipettering og skylling over bunnen for å få med alle cellene. Alt ble deretter overført til 50 ml sentrifugerør. Flaskene ble etterskylt med 2 ml vekstmedium som også ble tilsatt sentrifugerørene, og disse ble deretter sentrifugert ved 2500 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellepelleten resuspendert i 1 ml vekstmedium ved repeterende triturering. Cellene ble sådd ut på ordinære dyrkningsflasker (uten collagen I-coat), tilsatt 3 ml vekstmedium og inkubert i 30 minutter ved 37 °C for at fibroblastene skulle feste seg til bunnen av flaskene (satellittcellene vil ikke feste seg til disse flaskene). Mediet med cellene som ikke hadde festet seg ble deretter sådd ut på nye flasker med BioCoat Collagen I-coat. En annen metode for opprensing av satellittceller ble også benyttet. I flasker som var svært tette med fibroblaster ble medium med løse satellittceller, det vil si celler som ikke hadde festet seg til flasken etter noen dagers dyrking, sådd ut på nye flasker. Etter at cellene var rensset gjennom flere passasjer ble de frosset ned i nitrogentank.

2.2.4 Utsåing av satellittceller

En cryotube inneholdende satellittceller ble tatt ut fra cellebanken (lagret i flytende nitrogen), og rask tinet på vannbad. Cellene ble overført til et 50 ml sentrifugerør, og 5 ml vekstmedium ble tilsatt celledensiteten dråpevis, før det ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten med toksisk DMSO (brukt til cryo-konservering) ble fjernet. Cellepelleten ble tilsatt 1 ml vekstmedium og homogenisert ved hjelp av triturering med pipette. Suspensjonen ble overført til et nytt rør inneholdende samme volum vekstmedium, etter hva man trengte til utsåing. Etter nøye risting ble cellene sådd ut på enten 75 cm² flasker (12 ml), 6-brønnersbrett (1 ml per brønn) eller 12-brønnersbrett (0,5, 0,7 eller 1 ml per brønn).

2.2.5 Splitting

Etter noen ukers dyrking på 75 cm² flasker ble cellene splittet. Medium ble fjernet før cellene ble vasket tre ganger med 4 ml HBSS. 2 ml trypsin ble tilsatt, og flasken ble inkubert i 1 minutt, etterfulgt av dunking i flasken for å løsne cellene. 5 ml vekstmedium ble tilsatt, og dette ble overført til sentrifugerør. Flasken ble deretter skylt med ytterligere 5 ml vekstmedium som ble tilsatt sentrifugerøret, etterfulgt av sentrifugering ved 2500 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellene resuspendert i vekstmedium. Etter farging med tryptanblått, ble cellene telt i 12 diagonale kvadrater i et Bürker tellekammer. Riktig antall celler ble sådd ut på flasker (25 cm² eller 12,5 cm²) eller brett (12- eller 6-brønner).

2.2.6 Dyrking og differensiering av satellittcellene til myotuber

Vekstmedium ble skiftet hver 2.-3. dag til cellene nådde cirka 70-80 % konfluens. Ved dette tidspunktet ble vekstmedium byttet ut med differensieringsmedium, og cellene startet å differensiere til flerkjernede myotuber. Differensieringsmedium ble skiftet cirka hver 2. dag. Ved de metabolske forsøkene med skjelettmuskelceller fra villtype C57-mus ble forsøkene utført på dag 4 etter differensiering. LXR-agonisten T0901317 ble tilsatt cellene sammen med differensieringsmediet de siste 3 døgn (fra dag 1 etter differensiering) eller 24 timer (fra dag 3 etter differensiering) av differensieringen. Ved forsøk med genekspressjon (real-time PCR) ble cellene behandlet fra dag 2 etter differensiering til cellene ble høstet på dag 5 etter differensiering, det vil si 3 døgns forbehandling med LXR-agonist. Ved real-time PCR på celler fra LXR-KO- og WT-mus ble cellene forbehandlet i 2 døgn, fra dag 1 etter differensiering, og høstet på dag 4. Cellene ble observert visuelt ved hjelp av mikroskop i løpet av vekst og differensieringsperioden, og det ble tatt bilder av cellene for å dokumentere eventuelle uregelmessigheter. Det ble prøvd forskjellige vekstmedier for å optimalisere vekstbetingelsene for muse-satellittcellene, og visuell observering og bildetaking var viktig i denne prosessen.

2.2.7 Dyrkningsbetingelser

Vekstmedium for muse-satellittcellene bestod av Ham's F10 med glutamin tilsatt 20 % FCS (føtalt kalveserum) og 5 ng/ml bFGF. Differensieringsmedium bestod av DMEM/Glutamax tilsatt 2 % hesteserum. Begge mediene inneholdt også penicillin G (200 U/ml) og streptomycin (200 µg/ml) (appendiks 1.1 og 1.2). BioCoat flasker og brett fra Falcon med 0,01 % collagen I-coating ble benyttet. Cellene ble inkubert i en fuktig 5 % CO₂ atmosfære ved 37 °C.

I prosessen for å komme frem til disse vekstbetingelsene for musecellene ble en rekke andre vekstbetingelser utprøvd. Andre vekstmedier (humant M2- og SkGM-medium) samt andre typer coating (ECM, THLE og brett uten coating) ble forsøkt benyttet. Det ble også gjort forsøk hvor man prøvde forskjellige typer brett (6- og 12-brønner) og flasker (12,5, 25 og 75 cm²), samt ulik celletetthet per flaske/brønn ved utsåing. I tillegg ble det forsøkt utsåing med ulike volum vekstmedium med likt antall celler til hver brønn på 12-brønnersbrett.

2.2.8 LXR-KO-mus

LXR α - og LXR β -homozygote-KO- (LXR α ^{-/-} og LXR β ^{-/-}) og WT-mus ble skaffet fra AstraZeneca, Sverige. Gen-knockout-mus produseres ved rekombinante DNA teknikker. Kun prinsippet for teknikken er her beskrevet. I den første delen av prosedyren settes et DNA fragment inneholdende det ønskede mutante genet (eller et DNA fragment designet for å slå av målgenet) inn i en vektor, og introduseres deretter for en spesiell linje av embryo-deriverte musestamceller, som kalles embryo-stamceller (ES-celler). Etter en periode med celleproliferasjon, isoleres de få koloniene med celler hvor det har skjedd genutbytting etter homolog rekombinasjon. De riktige koloniene, som inneholder rekombinante DNA sekvenser hvor det innsatte fragmentet har erstattet det normale genet, identifiseres ved hjelp av PCR eller Southern blotting. Enkle celler fra disse koloniene tas opp i en fin mikropipette og injiseres inn i et tidlig museembryo. Cellene inkorporeres i den voksende embryoen, og mus produsert av en slik embryo vil inneholde noen somatiske celler som bærer det mutante genet. Noen av musene vil også inneholde kjønnsceller som inneholder det mutante genet. Når disse musene avles med en normal mus, vil noen av avkommene inneholde det mutante genet i alle

cellene. Avkommene testes for tilstedeværelse av genet, og heterozygote avkom (med en normal og en mutant kopi av genet) parres for å produsere homozygote transgene mus (en fjerdedel av avkommene). Hvis genet som settes inn er ikke-funksjonelt (et "null" allel), vil parring av heterozygote transgene mus gi en stamme med KO-mus som er homozygote på det ikke-funksjonelle genet (begge kopier av genet har blitt slått av). Fordi noen gener er vitale ved embryoutvikling, er det mulig å produsere betingete mutanter, hvor et spesielt gen blir forandret/slått av i et spesifikt vev eller ved et spesifikt tidspunkt i utviklingen. Denne strategien bruker et sete-spesifikt rekombinasjonssystem for å koble ut målgenet på et bestemt sted eller til en bestemt tid. Systemet som er brukt for LXR-KO musene kalles Cre/lox. Målgenet i ES-cellene erstattes av en funksjonell versjon av genet, flankert av et par korte DNA-sekvenser, lox seter, som kan gjenkjennes av et Cre-rekombinase-protein. De resulterende transgene musene er fenotypisk normale. Musene parres så med transgene mus som uttrykker Cre-rekombinase-genet under kontroll av en induserbar promoter. I de spesifikke cellene eller vevene hvor Cre slås på, katalyserer Cre-rekombinasjon mellom lox-sekvensene, slik at alt DNA mellom de to lox-setene fjernes. Målgenet (LXR) blir på denne måten fjernet og mister dermed sin aktivitet (54). For detaljer om hvordan LXR-KO-musene er laget henvises det til Alberti et al. (30).

2.2.9 Palmitinsyreopptak

Forsøket startet med at differensieringsmedium ble byttet ut med forsøksmedium (0,5 ml per brønn på 12-brønnersbrett), som bestod av serumfri DMEM/Glutamax, [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitinsyre (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM), L-karnitin (1 mM), +/- insulin (1 μM) som positiv kontroll. Cellene ble inkubert i 4 timer. Etter inkubering ble brettene satt på is, forsøksmediet raskt fjernet, og hver brønn vasket tre ganger med iskald PBS (0,5 ml). Deretter ble cellene lysert med 0,05 M NaOH (300 $\mu\text{l/brønn}$ i minimum 30 minutter ved romtemperatur), og lysatene ble deretter samlet i eppendorfrør etter nøye skraping med celleskraper. Lysatene ble sonikert ved hjelp av ultralyd i 10 sekunder, for å sikre en homogen blanding.

Fra hver prøve ble 200 μl overført til scintillasjonsrør og tilsatt 2 ml Ultima Gold[®] scintillasjonsvæske. Radioaktiviteten i cellefraksjonen ble kvantifisert ved hjelp av en β -

scintillasjonsteller (Packard Tri-Carb 1900 TR). Proteinmengden i cellene ble kvantitert ($2 \times 10 \mu\text{l}$).

2.2.10 Glukosetransport

Differensieringsmedium ble byttet med serumfri DMEM/Glutamax. Bestemte brønner ble tilsatt $1 \mu\text{M}$ insulin som positiv kontroll, og brettene ble inkubert i en fuktig 5 % CO_2 -atmosfære ved 37°C i 30 minutter. Brettene ble så vasket to ganger med oppvarmet (37°C) opptaksbuffer, og hver brønn tilsatt 0,5 ml (12-brønnersbrett) oppvarmet (37°C) forsøksmedium, som bestod av opptaksbuffer, $[2\text{-}^3\text{H}]$ -deoksyglukose ($1 \mu\text{Ci/ml}$, $10\mu\text{M}$), +/- insulin ($1 \mu\text{M}$), for å studere basal og insulin-mediert glukose opptak. Cellene ble så inkubert i nøyaktig 15 minutter. Etter inkubering ble brettene plassert på is, forsøksmediet ble raskt fjernet, og hver brønn ble vasket tre ganger med iskald PBS (0,5 ml). Deretter ble cellene lysert med 0,05 M NaOH (300 μl /brønn i minimum 30 minutter ved romtemperatur), og lysatene ble samlet i eppendorfrør etter nøye skraping med celleskrape. Lysatene ble sonikert i 10 sekunder, for å sikre en homogen blanding.

Fra hver prøve ble 200 μl overført til scintillasjonsrør og tilsatt 2 ml Ultima Gold[®] scintillasjonsvæske, og radioaktiviteten i cellefraksjonen ble kvantifisert ved hjelp av β -scintillasjonstellersen. Proteinmengden i cellene ble kvantitert ($2 \times 10 \mu\text{l}$).

2.2.11 Acetat-inkorporering i lipider

Differensieringsmedium ble byttet ut med forsøksmedium (0,5 ml per brønn for 12-brønnersbrett), bestående av serumfri DMEM/Glutamax og $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ acetat ($1 \mu\text{Ci/ml}$, $100 \mu\text{M}$). Cellene ble inkubert i 4 timer for å studere lipogenese. Cellene ble høstet som beskrevet over (måling av palmitinsyreopptak) og lipidene ble ekstrahert og separert ved tynnsjikt-kromatografi (se 2.2.12). Radioaktiviteten ble kvantifisert ved hjelp av β -scintillasjonstellersen. Proteinmengden i cellene ble kvantitert ($2 \times 10 \mu\text{l}$).

2.2.12 Ekstraksjon og separering av lipider

Resten av det homogeniserte cellelysatsat i eppendorfrørene etter proteinmåling ble overført til glassrør. Eppendorfrørene ble vasket med 100 µl metanol som ble overført til de samme glassrørene. 50 µl serum (FCS) som umerket lipid bærer (carrier) og 5 ml kloroform:metanol (2:1) ble tilsatt ("Folch" ekstraksjon). Etter risting på whirl-mikser og minimum 30 minutters henstand, ble 1,0 ml 0,9 % NaCl-buffer (pH 2) tilsatt. Dette ble ristet på whirl-mikser og satt i avtrekk over natten. Neste dag ble den øvre kombinerte vann/metanol-fasen (dannet etter tilsetning av den vandige bufferen til kloroform/metanol-fasen) suget av. Mellom vann/metanol-fasen og kloroform-fasen, ble det dannet et tynt proteinsjikt, og dette ble også forsiktig fjernet ved hjelp av vakuumsug. Kloroform-fasen med varierende mengde vann/metanol ble deretter dampet inn under nitrogen mens glassrørene stod i vannbad ved 45 °C. Lipidekstraktet, som nå var dampet inn, ble resuspendert i 110 µl heksan, ristet på whirl-mikser og satt på is. Hele blandingen fra hver prøve ble applisert på forskjellige steder på tynnsjiktplater med silikagel. En varmeplate ble brukt for å øke hastigheten på fordampingen av heksan. Standarder inneholdende TAG, DAG, FFA og CE ble også applisert på prøvene på tynnsjiktplaten. Silikaplatene med lipidekstrakter ble plassert i et lukket kammer inneholdende 100 ml av et upolart løpemiddel; heksan:dietyleter:iseddik (100 %) (65:35:1). Løsningsmiddelet beveget seg oppover på platen ved hjelp av kapillærkrefter. Lipidene kan separeres på bakgrunn av forskjellig affinitet til silikagelen og løsningsmiddelet. Platene ble tatt ut av kammeret etter at løsningsmiddelet hadde nådd toppen og tørket. Platene ble deretter plassert i et lukket kammer med krystallinsk jod i bunnen. Jod er ustabil i krystallinsk form og sublimerer, noe som fører til at kammeret blir fylt med jod i gassform. De forskjellige lipidstandardene blir farget gule fordi jod reagerer med umettede bindinger i hydrogenkarbonkjedene i lipidene. Reaksjonen visualiserte standardene, og viste hvor langt de forskjellige lipidklassene hadde migrert og blitt separert fra hverandre. CE, som er mest lipofil, migrerer nesten på toppen, fulgt av TAG, FFA, DAG og fosfolipider (PL). Platene ble kuttet etter lipidstandardene, fordi man antar at [¹⁴C]-merkede lipider fra cellelysatsatene migrerer i samme grad som standardene. Hver del av platen som inneholdt en lipidfraksjon ble kuttet til mindre biter og samlet ved hjelp av en trakt i scintillasjonsrør. 2 ml Ultima Gold[®] scintillasjonsvæske ble tilsatt hvert rør og de forskjellige lipidene kvantifisert ved væskescintillasjons-telling.

2.2.13 Proteinmåling

En mengde på 2 x 10 µl homogenisert cellelysate fra hver prøve ble sammen med protein standarder overført til et 96-brønnersbrett. Proteinstandardene var laget fra BSA og 0,05 M NaOH til kjente konsentrasjoner. Hver brønn (standarder og prøver) ble tilsatt 200 µl standard proteinfarge (Bio-Rad), fortynnet med en faktor på 5 i destillert vann. Brettene stod i 5 minutter med fargereagens, før absorbansen ved 595 nm ble målt ved hjelp av Wallac Victor™ mikroplateleser (Perkin Elmer). Totalprotein ble kalkulert ved hjelp av standardkurven. Målingene ble gitt i mg protein/ml.

2.2.14 RNA isolering og kvantifisering

Høsting og isolering av RNA ble utført med hansker og sterilt utstyr for å hindre forurensning. Cellene ble dyrket i BioCoat Collagen I flasker, 75/25 cm². Ved høsting ble cellene vasket med 3 x 4 ml (75 cm² flasker) eller 1 ml (25 cm²) HBSS, før de ble trypsinert, tilsatt vekstmedium og sentrifugert ved 2500 rpm i 5 min. Pelleten ble vasket med HBSS, før den ble lysert i 350 µl Agilent Technologies' Lysis Solution®, for deretter å fryses ned ved –70 °C.

RNA isolering ble utført i henhold til Agilent Total RNA Isolation Protocol. Alle prøvene ble spunnet gjennom en miniprefiltrasjons-kolonne ved 16 000 g, slik at store cellefraksjoner ble sittende i kolonnen, mens RNA gikk i gjennom filteret og ned i oppsamlingsrøret. Et likt volum av 70 % etanol (350 µl) ble tilsatt filtratet, blandet og inkubert i 5 minutter. Blandingen ble satt på en ny miniisolasjons-kolonne og etter sentrifugering ved 16 000 g ble RNA sittende igjen i filteret i miniisolasjons-kolonnen. Deretter ble kolonnen vasket to ganger med Agilent Technologies Wash Solution® etterfulgt av sentrifugering for å spinne kolonnen tørr, før total RNA ble eluert ved tilsetning av 15 µl nuklease-fritt vann. Mengde RNA i prøvene ble bestemt ved hjelp av OD-måling, alternativt ble utbyttet raskt frosset ned ved –70 °C.

For å kvantitere RNA, ble det utført OD(optical density)-målinger ved hjelp av et spektrofotometer (Gene Quant Pro DNA/RNA Calculator®, Amersham Pharmacia Biotech).

Målingene ble gjort på 1:50 fortynninger av prøvene. Det ble utført OD-målinger ved 230, 260, 280, 320, 595 og 600 nm, men bare målingene ved 260 nm ble brukt i beregningene, da disse svarer til RNA-konsentrasjoner. Ved hjelp av følgende formel ble konsentrasjonene beregnet:

$$\text{Konsentrasjon av RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{fortynningsfaktor (50)}}{1000}$$

En RNA-konsentrasjon på 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gir en optisk tetthet (OD) lik 1 ved 260 nm og med cellelengde 10 mm.

2.2.15 Revers transkripsjon Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Revers transkripsjon ble utført ved hjelp av TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents kit (Applied Biosystems). Hvert rør av typen MicroAmp[®] Reaction tubes (Applied Biosystems) ble tilsatt DEPC-dH₂O og TaqMan[®] reaksjonsmiks (appendiks 3.2), før det ble tilsatt 2 μg av de ulike total RNA-prøvene. Totalvolumet i hvert rør var 20 μl . Revers transkripsjon ble utført ved hjelp av GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). Følgende RT-betingelser ble benyttet: 25 °C i 10 min (heksamere/templat priming), 37 °C i 60 min (cDNA syntese), 99 °C i 5 min (enzymaktivering). Prøvene med DNA ble tilslutt satt i kjøleskap ved 4 °C.

2.2.16 Real-time RT-PCR

Primere ble designet ved hjelp av Primer Express[®]. Fullstendige gensekvenser for de aktuelle genene ble hentet opp fra sekvensdatabasen Genbank og deretter brukt i Primer Express til å designe primerpar tilpasset real-time PCR systemet. Primerne ble levert i form av frysetørret pulver. Dette ble løst i DEPC-dH₂O og fortynnet til en arbeidsløsning på 30 μM .

Siden primere til mus aldri var brukt i forskningsgruppen før, ble de testet ved hjelp av real-time PCR for å sikre at de var funksjonelle, ga riktige responskurver, dissosiasjonskurver (for å utelukke amplifisering av uønsket produkt) og gode standardkurver. Som referanse-gen

(intern standard) ble glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (GAPDH), β -aktin og human acidic ribosomal phosphoprotein PO (36B4) forsøkt benyttet. Det viste seg at GAPDH og 36B4 samvarierte, mens det med β -aktin ikke ble oppnådd samme resultater.

Tabell 2.1: PCR primere for mus. F: forward primer, R: reverse primer

GEN	SEKVENS	GEN BANK NR.
LXR α , primer 1 (*)	F: 5'-GAG TTC TCC AGA GCC ATG AAT GA-3' R: 5'-CAG AGA AGA TGC TGA TGG CAA T-3'	NM 013837
LXR α , primer 2 (*)	F: 5'-CGA CAG AGC TTC GTC CAC AA -3' R: 5'-GCT CGT TCC CCA GCA TTT T -3'	NM 013837
LXR β , primer 1 (*)	F: 5'-CAA CGC TTT GCC CAC TTC A-3' R: 5'-AAG AAC CCT GGC ACC TGC TT-3'	NM 009473
LXR β , primer 2 (*)	F: 5'-AAG CAG GTG CCA GGG TTC TT -3' R: 5'-TCA ARG GTG GAC GCC TTC A -3'	NM 009473
SREBP1c	F: 5'-TCA GGG CCC ATT AGT GAG TAG ACT-3' R: 5'-GCC GAC CAG ATT CCC TA AGG-3'	NM 011480
ABCA1	F: 5'-CAA CCC CTG CTT CCG TTA TC-3' R: 5'-GAC CTT GTG CAT GTC CTT AAT GC-3'	NM 013454
GAPDH	F: 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC T-3' R: 5'-TGA TGT CAT CAT ACT TGG CAG GTT-3'	NM 001001303
B-aktin	F: 5'-GGC GCT TTT GAC TCA GGA TT-3' R: 5'-GGG ATG TTT GCT CCA ACC AA-3'	NM 007393
36B4	F: 5'-ATC TCC AGA GGC ACC ATT GAA-3' R: 5'-TCG CTG GCT CCC ACC TT-3'	NM 007475

* Primer 1 for LXR α og LXR β ble brukt ved de to første PCR-forsøkene. Primer 2 ble brukt ved det siste PCR-forsøket (se 3.3.1).

22,5 μ l PCR-miks inneholdende 2 x SYBR Green Master mix, forward primer, reverse primer og DEPC-dH₂O (appendiks 3.3) ble sammen med 2,5 μ l av hver cDNA prøve, standard eller negativ kontroll (DEPC-dH₂O) tilsatt sine respektive brønner i 96-brønnersbrett, MicroAmp[®] Optical Reaction Plate (Applied Biosystems), slik at totalvolumet per brønn ble 25 μ l. Standarder ble laget ved å blande cDNA prøvene og fortynne dem 1:5 i DEPC-dH₂O, for

deretter å fortynne 1:2 i en serie på fire konsentrasjoner (standard 1000-500-250-125). Av resultatene på disse målingene ble det laget en standardkurve, og denne ble brukt til å kalkulere mengden amplifisert cDNA for hver prøve/primer. Real-time PCR analysen ble utført ved hjelp av ABI PRISM 7000[®] (Applied Biosystems). Før kjøringen ble det valgt en dissosiasjonsprotokoll på 60 °C.

PCR er en metode som tillater logaritmisk kopiering av deler av et DNA-molekyl. Protokollen som ble kjørt med ABI PRISM 7000[®] inkluderer inkubering i 2 minutter ved 50 °C, deretter 10 minutter ved 95 °C for å varmedenaturere DNA-molekylet (trådseparasjon). Deretter følger DNA amplifisering i 40 sykler, hver bestående av:

- Denaturering av templat DNA ved 95 °C i 15 sekund
- Hybridisering av primere til templat DNA ved 60 °C i 1 minutt
- Polymerisering

De to oligonukleotidene som brukes som primere for DNA-syntese har ulik sekvens og er komplementære til sekvenser som ligger på DNA-fragmentet som skal kopieres. Fordi syklusen av denaturering, primer-hybridisering og polymerisering gjentas flere ganger, får man en amplifisering av cDNA-templatet i regionen mellom primersettene. Reaksjonen er eksponentiell, slik at mengden kopiert cDNA teoretisk dobles i hver syklus (ved en amplifikasjonseffektivitet på 2). Etter n sykler vil DNA derfor være kopiert 2ⁿ ganger. Selv om DNA-polymerasen er termostabil, vil cDNA denatureres etter 25-35 sykler og reaksjonen når et platå.

Ved real-time PCR kan man på en nøyaktig og sensitiv måte estimere endring i genekspresjon. SYBR GREEN er et fluorescerende reagens som binder seg til dobbelttrådet cDNA i prøven og fluorescerer. Etter hver amplifisering i PCR måles fluorescensen, og denne er proporsjonal med mengde cDNA som er blitt kopiert.

ABI Prism 7000 SDS Software[®] ble brukt til å kalkulere standardkurver for genene. Før dette måtte man sette en terskelverdi som representerer den valgte spesifikke fluorescensintensiteten ved et punkt hvor amplifikasjonen av cDNA er lineær i alle prøvene og ved forskjellige sykluser. Krysningpunktet, eller Ct-verdien, settes lik syklusnummeret der

fluorescens krysser terskelen. Ct-verdien ble deretter brukt til å estimere relativ mengde av enkelttrådet cDNA som ble tilsatt prøven.

En mulig svakhet ved metoden er at SYBR GREEN vil binde seg til all dobbeltrådet cDNA i prøven, deriblant mulige primer dimere og eventuelle uspesifikke produkter. For å utelukke at fluorescens som er detektert ikke stammer fra en forurensing i prøven, ble det foretatt en smeltepunkts-analyse med smeltekurver (dissosiasjonskurver) av kopierte produkter under real-time PCR reaksjonen. Ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®] ble smeltepunktskurvene kalkulert. Mer enn en topp i smeltekurven er et tegn på at det er dannet flere produkter i samme reaksjon, enten på grunn av mispriming eller DNA-forurensing. Eventuell primer-dimer dannelse vil kunne gi en egen topp på smeltekurven, og denne vil kunne detekteres før hovedproduktet fordi primerne er korte med lavt smeltepunkt.

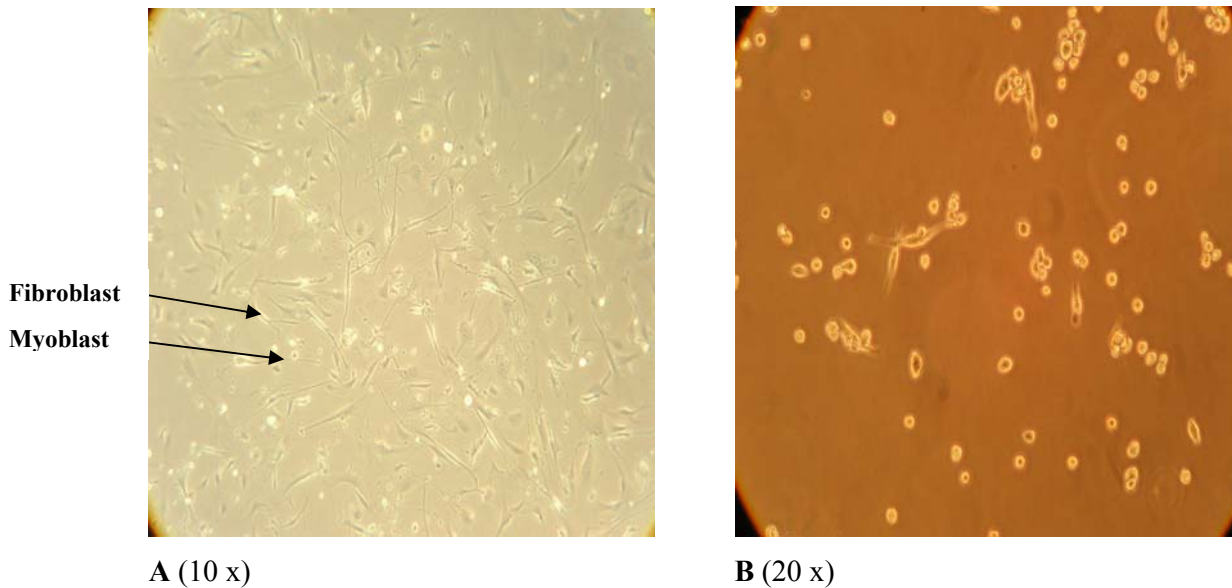
3. Resultater

3.1 Optimalisering av metode for opprensning og dyrking av skjelettmuskelceller fra mus

Siden det aldri tidligere var jobbet med skjelettmuskelceller fra mus ved vårt laboratorium, var det nødvendig å etablere og optimalisere en metode for opprensning og dyrking av cellene i laboratoriet. For å optimalisere dyrkningsbetingelsene for skjelettmuskelceller fra mus ble cellene observert visuelt i mikroskop, og det ble tatt bilder i løpet av vekstperioden.

3.1.1 Opprensning av skjelettmuskelceller fra mus

Opprensning viste seg å være en omfattende og tidkrevende prosess. Prosedyren for ”preplating” som beskrevet i metoder (2.2.3) ble benyttet. Det var høy tetthet av fibroblaster i cellekulturen, og det så ut til at fibroblastene undertrykket veksten av satellittcellene (figur 3.1 A). Prosedyren for opprensning ble gjennomført flere ganger for hver cellekultur. Fordi satellittceller trolig løsner lettere enn fibroblaster fra flasker med collagen I-coat, ble det forsøkt en variant av prosedyren hvor det ble tilsatt trypsin-EDTA kun i noen sekunder (uten inkubering i varmeskap). Dette var et forsøk på å kun få med seg noen satellittceller videre, med færrest mulig fibroblaster, og metoden fungerte bedre med så kort inkubering. For flasker med svært høy tetthet av fibroblaster ble det også benyttet en annen metode for opprensning. Med denne metoden ble medium med løse satellittceller, det vil si celler som etter noen dagers dyrking ikke hadde festet seg til flasken, sådd ut på nye flasker. Bruk av denne metoden gjorde at kun satellittceller uten fibroblaster ble med videre. Selv om det var få celler, dannet disse etter litt tid fine og rene kolonier av satellittceller i den nye flasken (figur 3.1 B). Dette fungerte derfor som en god metode for å få rene kulturer med satellittceller og er en metode som sannsynligvis kan brukes ved senere isolering og opprensning av muskelceller fra mus.



Figur 3.1 Bilder av cellene i oppreningsprosessen. Bilde **A** (10 x forstørrelse) viser en kultur hvor fibroblastene er dominerende. Bilde **B** (20 x forstørrelse) viser en ren kultur av satellittceller som er rensset ved utsåing av medium med løse celler. Resultatet er få, men rene satellittceller i kultur.

3.1.2 Dyrkningsbetingelser

Cellene ble forsøkt sådd ut på ulike typer 6- og 12-brønnersbrett fra forskjellige forhandlere, i tillegg til forskjellige 75, 25 og 12,5 cm² flasker. Generelt vokste cellene dårlig på brett, med mye celler langs ytterkanten og lite celler i midten av hver brønn. Resultatet var ujevn cellevekst og varierende antall celler i hver brønn, noe som vanskeliggjorde forsøk med disse cellene.

For å optimalisere vekstbetingelsene ble det gjort et forsøk hvor satellittceller ble sådd ut på 6- og 12-brønnersbrett med ulike typer coating (THLE, ECM, Falcon-brett uten coating og Falcon BioCoat Collagen I) og tilsatt ulike vekstmedier (vekstmedium mus, M2-medium humane celler og SkGM-medium) (tabell 3.1 og figur 3.2). Til THLE- og ECM-coating ble det benyttet brett fra Corning.

Tabell 3.1 Utprøving av ulike typer coating/brett og ulike typer vekstmedium. Observasjonene under er gjort etter en vekstperiode på 8 dager. Det ble benyttet vekstmedium for mus til alle brettene de første 2 dager av vekstperioden, hvorpå det ble skiftet til de respektive medier spesifisert under. De ulike vekstmedier ble deretter skiftet på hver 2. dag. Tetthet ved utsåing: 15000 celler/brønn på 12-brønnersbrett, 38000 celler/brønn på 6-brønnersbrett. Den lave tettheten ved utsåing ga lang vekstperiode.

Vekstmedium Coating Type brett	Vekstmedium- mus	M2-medium- humane celler	SkGM- medium
THLE 6-brønnersbrett	+++ Bilde A	++ (**) Bilde B	++ (**) Bilde C
12-brønnersbrett	++ Bilde D	-	-
ECM 6-brønnersbrett	++ Bilde E	+ (**) Bilde F	++
12-brønnersbrett	++	-	-
Falcon uten coating 6-brønnersbrett	+++ (*) Bilde G	+ Bilde H	+
12-brønnersbrett	+++ (*) Bilde I	-	-
Biocoat Collagen I 6-brønnersbrett	+++	++ (**)	Ikke testet
12-brønnersbrett	++ Bilde J	++ (**) Bilde K	Ikke testet

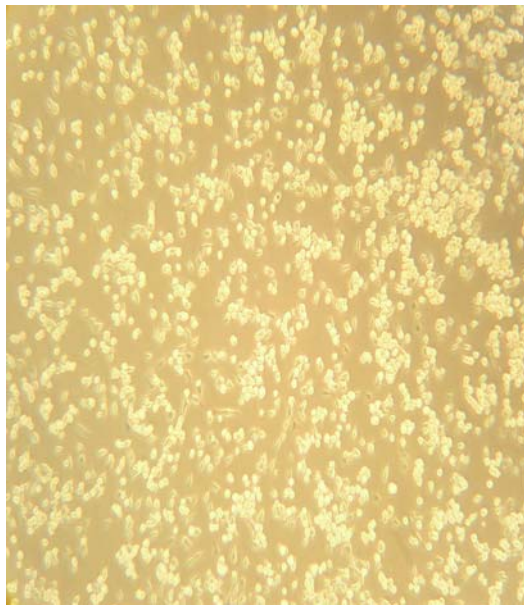
For forklaringer til tabell; se neste side.

+++ , jevn cellevekst; ++, ujevn vekst; +, dårlig vekst; -, lite eller ingen celler.

* Cellene differensierte ikke etter tilsetning av differensieringsmedium.

** Cellene spontandifferensierte før tilsetning av differensieringsmedium.

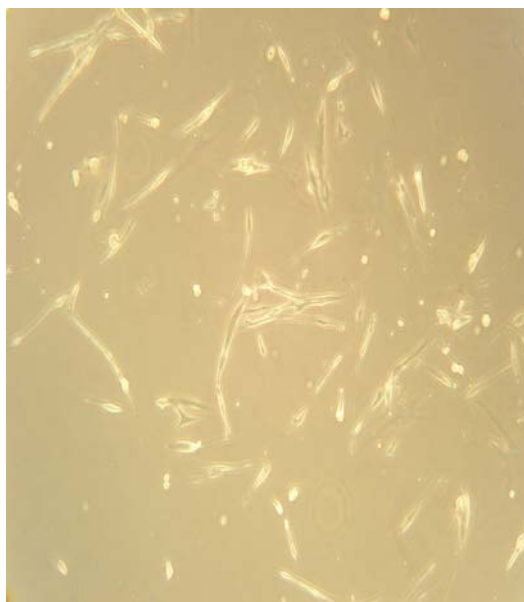
For beskrivelse av vekstmedier og coating, se appendiks.



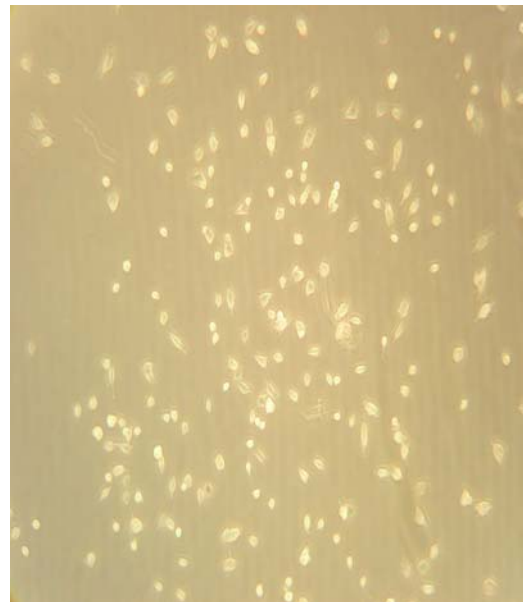
A (10 x)



B (10 x)



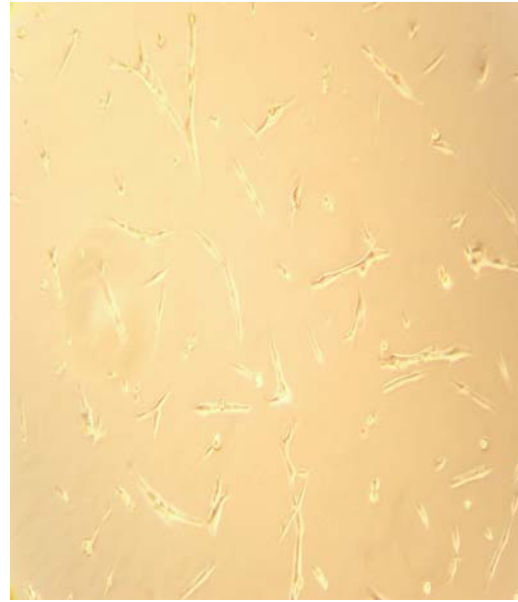
C (10 x)



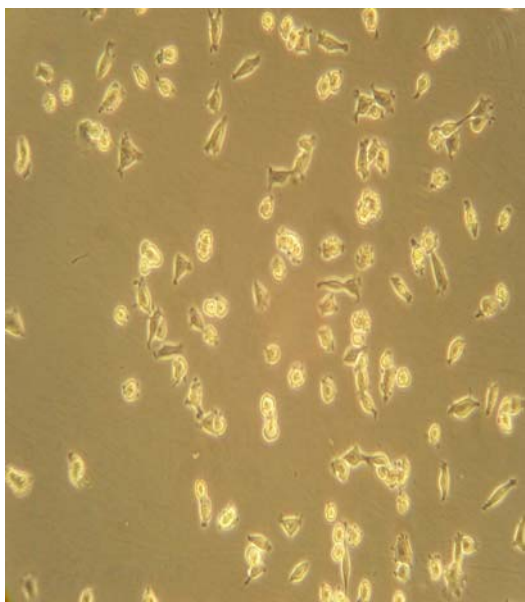
D (10 x)



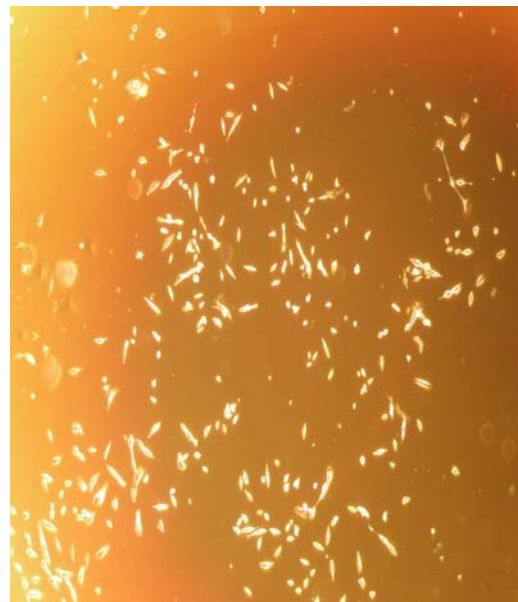
E (4 x)



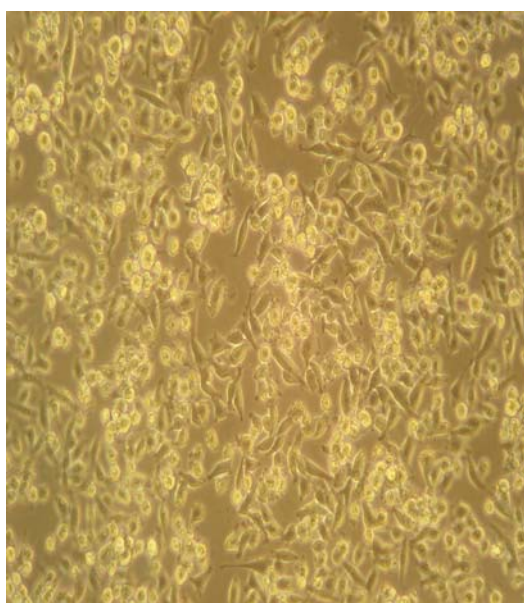
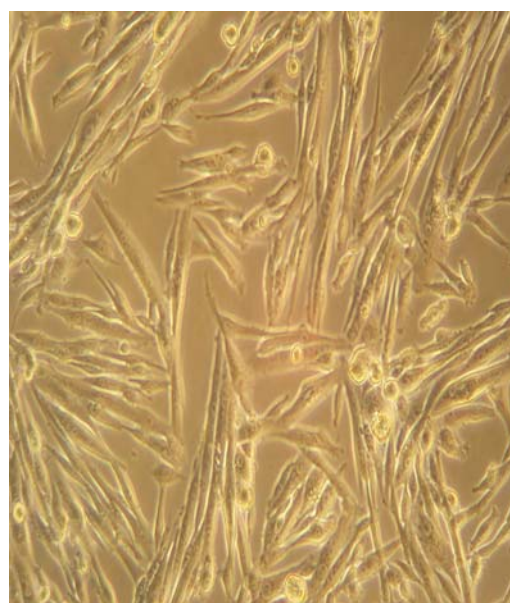
F (10 x)



G (20 x)



H (4 x)

**I (4 x)****J (20 x)****K (20 x)**

Figur 3.2 Bilder av cellene ved utprøving av forskjellige typer coating og vekstmedier. Bildene er tatt ved forskjellige forstørrelser (se under hvert bilde). For forklaringer på hva hvert enkelt bilde viser, se tabell 3.1.

Cellene viste generelt bedre vekst på 6- enn på 12-brønnersbrett, da alle 6-brønnersbrett inneholdt celler (tabell 3.1 og figur 3.2). Med THLE-coating spontandifferensierte cellene på 6-brønnersbrett med M2- og SkGM-medium (tabell 3.1 og figur 3.2 B og C). På 12-

brønnersbrett vokste cellene best på Falcon-brett uten coating og Falcon BioCoat Collagen I (tabell 3.1 og figur 3.2 I og J). Av mediene fungerte vekstmedium for mus best (tabell 3.1). Det ble forsøkt å differensiere cellene som vokste på Falcon-brett uten coating og Falcon BioCoat Collagen I. Resultatet var at cellene på Falcon-brettene uten coating ikke differensierte, mens cellene differensierte til myotuber på Falcon BioCoat Collagen I (tabell 3.1). Falcon-brettene uten coating var derfor uegnet, mens Falcon BioCoat Collagen I var de brettene som fungerte best for dyrking av skjelettmuskelceller fra mus, sammen med vekstmedium for mus.

Som en følge av disse resultatene ble det benyttet 75 cm² flasker av typen Falcon BioCoat ved utsåing av cellene. Cellene ble fra disse flaskene splittet til 12-brønnersbrett (ved de funksjonelle forsøkene) og 25 cm² flasker (ved real-time PCR) av samme type. Ved bruk av denne typen brett og flasker viste cellene ved senere dyrking og forsøk tilfredsstillende vekst, selv om vekst og spesielt differensiering av cellene var noe uregelmessig. Det ble også forsøkt benyttet 12,5 cm² flasker av typen Falcon uten coating til de funksjonelle forsøkene, men her ble resultatet det samme som med disse brettene ovenfor (tabell 3.1); cellene vokste bra, men differensierte ikke.

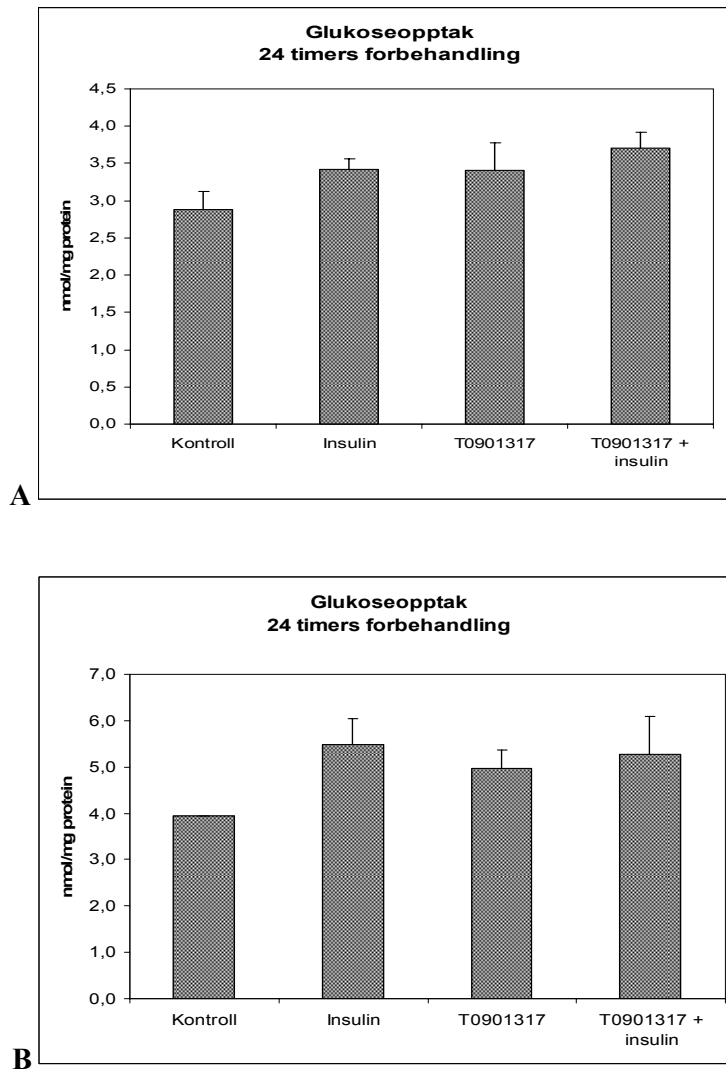
Det ble i tillegg forsøkt utsåing med forskjellig volum og celletetthet. På 12-brønnersbrett ga utsåing av 0,7 eller 1 ml medium med samme antall celler per brønn et bedre resultat (jevnere vekst) enn utsåing av 0,5 ml per brønn. Det ble også oppnådd bedre vekst av cellene ved utsåing med høy celletetthet per brønn. Dette gjør at vekstperioden for cellene blir kortere, noe som innebærer færre skift av medium. Fordi cellene hadde en tendens til å løsne fra brettene/flaskene etter en viss tid, spesielt ved skifte av medium, ble det sett på som en fordel å gjøre vekstperioden så kort som mulig. Ved utsåing av 50 000 celler/brønn på 12-brønnersbrett og 600 000 celler/25 cm² flaske ble resultatet bedre, med tettere cellevekst, kortere tid til konfluens, færre skift og mindre tap av celler.

3.2 Effekter av T0901317 på skjelettmuskelceller fra villtype-mus

Det var ønskelig å undersøke om effektene av LXR-agonisten T0901317 på villtype-skjelettmuskelceller fra C57-mus var de samme som tidligere er blitt observert i forsøk med humane skjelettmuskelceller i vårt laboratorium (48). Fordi det aldri var jobbet med skjelettmuskelceller fra mus i vårt laboratorium tidligere, ble det testet ut ulike forsøksoppsett, varighet av differensiering og forbehandling med T0901317. Det ble både gjort funksjonelle forsøk ved å måle glukosetransport, fettsyreopptak og acetat-inkorporering i komplekse lipider, i tillegg til at effekten på genekspressjon ble studert ved real-time PCR.

3.2.1 Effekter av T0901317 på glukoseopptak

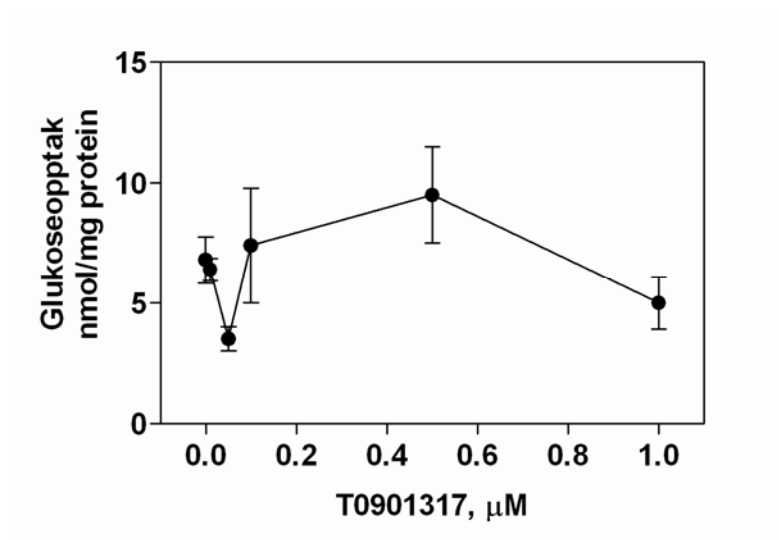
Basalt og insulinstimulert glukoseopptak ble undersøkt etter 24 timers behandling med T0901317 (figur 3.3). Det ble utført to forsøk. I det første forsøket var det en økning i det basale glukoseopptaket på nærmere 20 %, mens det insulinstimulerte glukoseopptaket økte med 10 % etter behandling med T0901317 sammenlignet med kontroll (figur 3.3 A). I det andre forsøket var økningen etter T0901317-behandling på 25 % for basalt glukoseopptak, mens det insulinstimulerte glukoseopptaket var uforandret etter T0901317-behandling (figur 3.3 B). Det insulinstimulerte glukoseopptaket var høyere enn basalopptaket for både kontroll og T0901317-behandlede celler i begge forsøkene (10-40 %).



Figur 3.3 Glukoseopptak etter 24 timers forbehandling, kontroll/T0901317 (1 μ M) \pm insulin akutt (1 μ M). Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved at cellene først ble inkubert i 30 minutter med serumfri DMEM/glutamax \pm insulin. Cellene ble deretter inkubert i 15 minutter med serumfri DMEM/glutamax inneholdende [2-³H]-deoksyglukose (1 μ Ci/ml, 10 μ M). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM. **A:** Forsøk I, **B:** Forsøk II.

3.2.2 Doseresponskurve for glukoseopptak etter T0901317-behandling

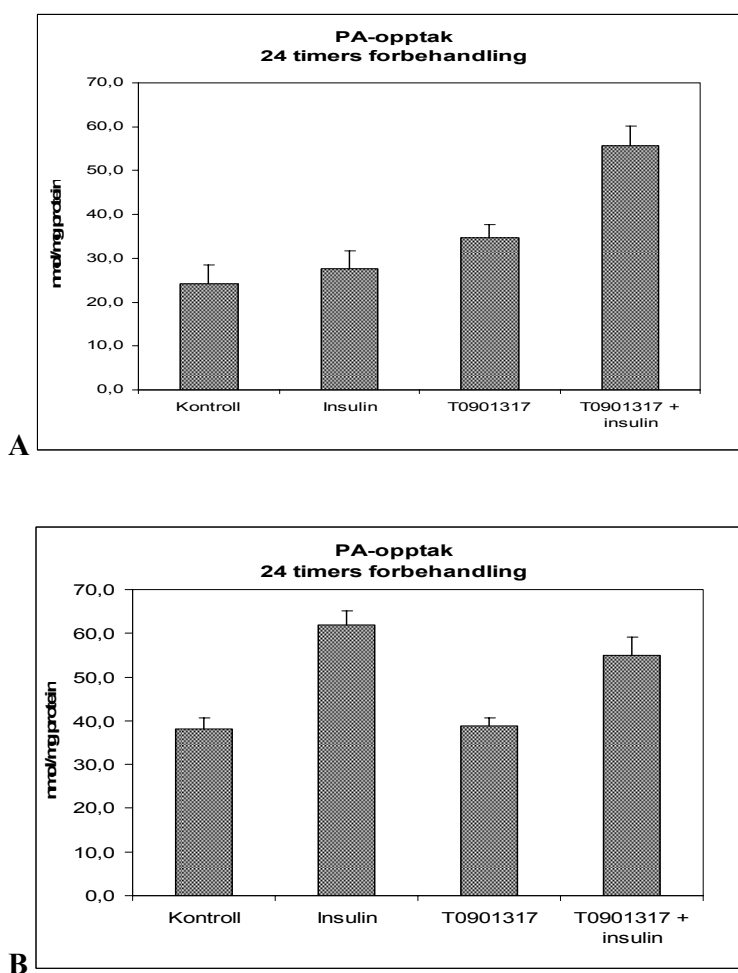
Kronisk behandling (3 døgn) med ulike konsentrasjoner T0901317 ga en doseresponskurve som vist i figur 3.4. Glukosetransporten så ikke ut til å øke på en doseavhengig måte. Ved konsentrasjoner av T0901317 på 0,01 og 0,05 μM ble glukoseopptaket redusert, mens det økte ved konsentrasjoner på 0,1 μM (10 %) og 0,5 μM (40 %) sammenlignet med kontroll. Ved 1 μM falt glukoseopptaket til et nivå 25 % under kontroll.



Figur 3.4 Glukoseopptak etter 3 døgns forbehandling med økende konsentrasjoner T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved at cellene først ble inkubert i 30 minutter med serumfri DMEM/glutamax \pm insulin. Cellene ble deretter inkubert i 15 minutter med serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$2\text{-}^3\text{H}$]-deoksyglukose (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 10 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.

3.2.3 Effekter av T0901317 på palmitinsyre(PA)opptak

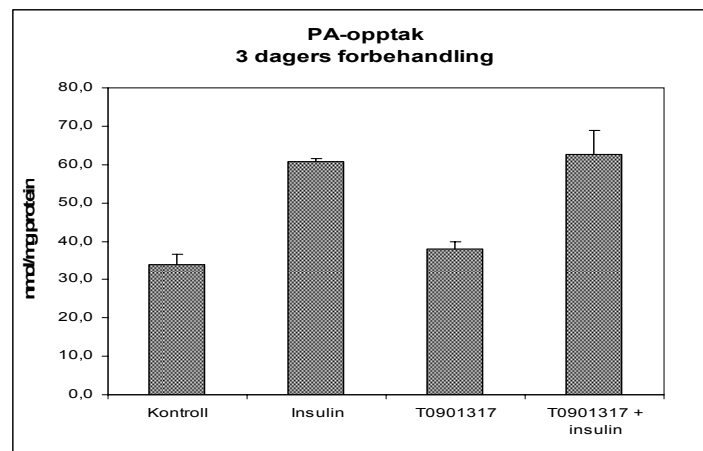
Effekt av T0901317 på PA-opptak i cellene varierte i ulike forsøk (figur 3.5 og 3.6). Det første forsøket (figur 3.5 A) viste en markert økning i PA-opptak som respons på T0901317. Det basale lipidopptaket økte med 40 % etter T0901317-behandling, mens det insulinstimulerte lipidopptaket ble doblet etter T0901317-behandling sammenlignet med kontroll. Insulinstimulert PA-opptak var høyere enn basalopptaket både for kontroll (15 %) og T0901317-behandlede celler (60 %). Det andre forsøket med 24 timers preinkubering viste en sterk insulineffekt, hvor insulinstimulert PA-opptak var 60 og 40 % høyere enn basalopptaket for henholdsvis kontroll og T0901317-behandlede celler. Det var imidlertid ingen effekt av T0901317 på verken basalt eller insulinstimulert PA-opptak (figur 3.5 B).



Figur 3.5 Palmitinsyre(PA)opptak etter 24 timers forbehandling, kontroll/T0901317 (1 μ M) \pm insulin akutt (1 μ M). Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og

varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitinsyre ($0,5\ \mu\text{Ci/ml}$, $100\ \mu\text{M}$). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM. **A**= Forsøk I, **B**: Forsøk II

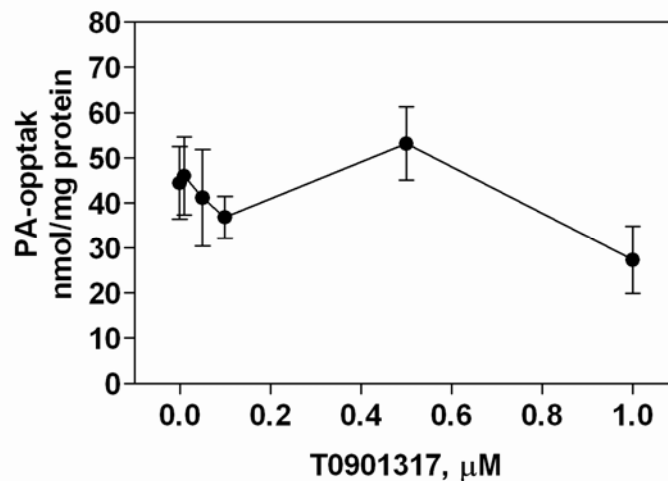
3 døgns forbehandling med T0901317 ga lignende resultater som i figur 3.5 B. Det var en markant effekt av insulin på PA-opptaket med en økning i lipidopptak på 80 og 65 % for henholdsvis kontroll og T0901317-behandlede celler. Heller ikke her var det noen tydelig effekt av T0901317 på PA-opptaket, med en økning på rundt 10 % for basalopptak, samt en liten økning i insulinstimulert PA-opptak (3 %) (figur 3.6).



Figur 3.6 Palmitinsyre(PA)opptak etter 3 døgns forbehandling, kontroll/T0901317 ($1\ \mu\text{M}$) \pm insulin akutt ($1\ \mu\text{M}$). Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitinsyre ($0,5\ \mu\text{Ci/ml}$, $100\ \mu\text{M}$). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) ($n=1$) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.

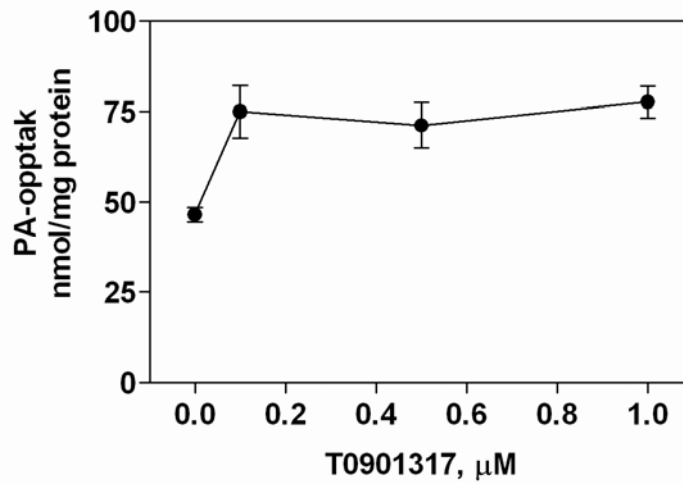
3.2.4 Doseresponskurve for palmitinsyre(PA)opptak etter T0901317-behandling

Kronisk behandling (3 døgn) med økende konsentrasjoner T0901317 ga doseresponskurver som vist i figur 3.7 og 3.8. I det første forsøket så PA-opptaket ikke ut til å øke på en doseavhengig måte. Ved T0901317-konsentrasjoner på 0,01, 0,05 og 0,1 μM var PA-opptaket tilnærmet uforandret eller litt redusert. Ved 0,5 μM økte lipidopptaket i forhold til kontroll (20 %), mens det ved 1 μM T0901317 var redusert med 40 % sammenlignet med kontroll (figur 3.7).



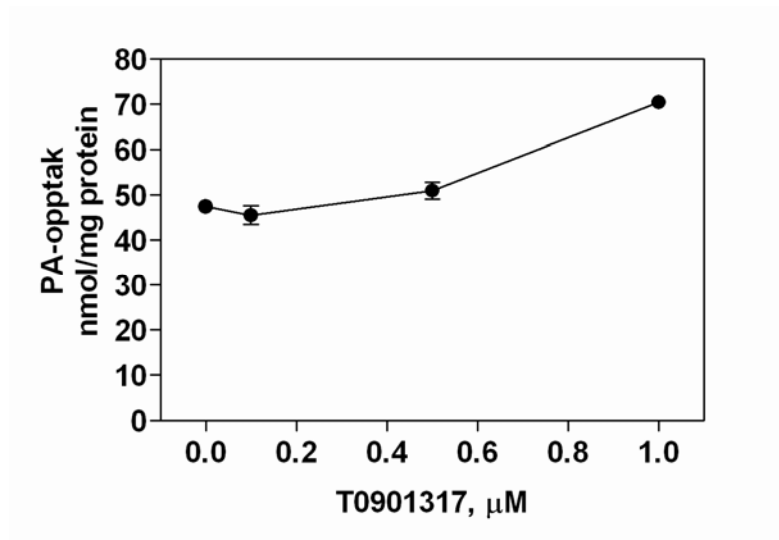
Figur 3.7 Palmitinsyre(PA)opptak etter 3 døgns forbehandling med økende konsentrasjoner T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitinsyre (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.

Det andre forsøket med 3 døgns forbehandling viste økt PA-opptak etter behandling med alle konsentrasjoner av T0901317. PA-opptaket var ikke konsentrasjonsavhengig i de testede konsentrasjoner. PA-opptaket var økt med rundt 60 % etter T0901317-behandling sammenlignet med kontroll (figur 3.8).



Figur 3.8 Palmitinsyre(PA)opptak etter 3 døgns forbehandling med økende konsentrasjoner T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-palmitinsyre (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.

Forsøk med 24 timers forbehandling viste økende PA-opptak med økende konsentrasjoner av T0901317. Ved T0901317-konsentrasjoner på 0,5 og 1 μM var PA-opptaket økt med henholdsvis 10 % og 50 % sammenlignet med kontroll (figur 3.9).

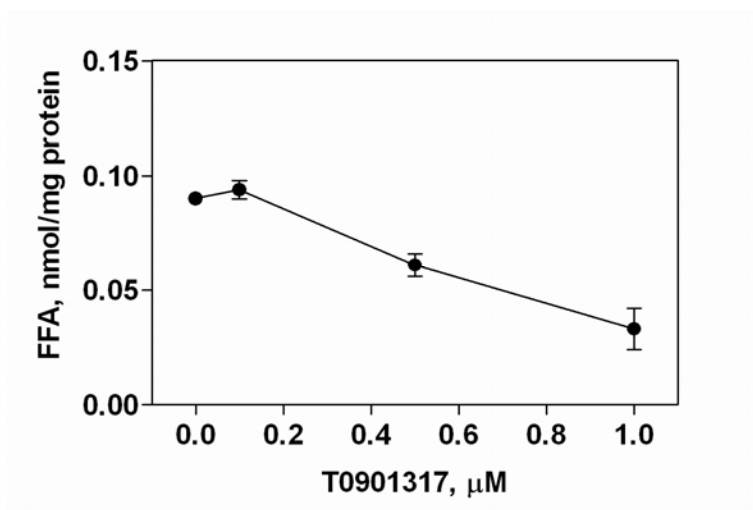


Figur 3.9 Palmitinsyre(PA)opptak etter 24 timers forbehandling med økende konsentrasjoner T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [^{14}C]-palmitinsyre (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.

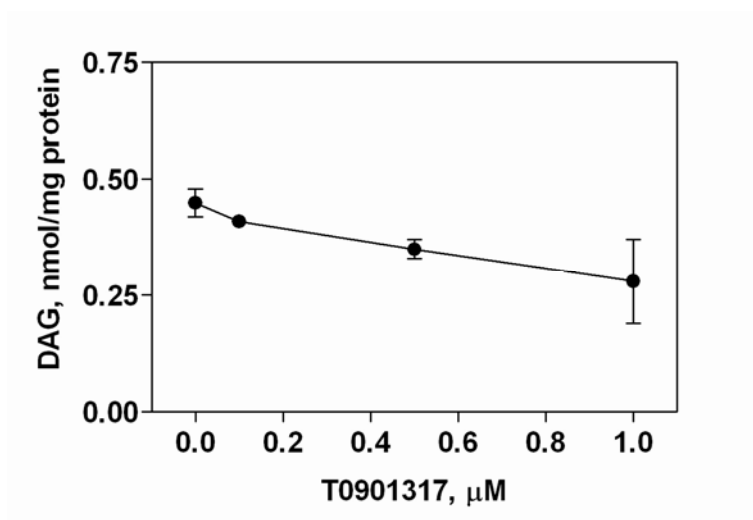
3.2.5 Effekter av T0901317 på acetat-inkorporering i lipider

Myotuber ble eksponert for ^{14}C -acetat for å studere lipogenese og inkorporering i cellulære lipider. Ved lipogenese blir fettsyrer syntetisert fra acetyl-CoA og videre omdannet til DAG, TAG og andre komplekse lipider.

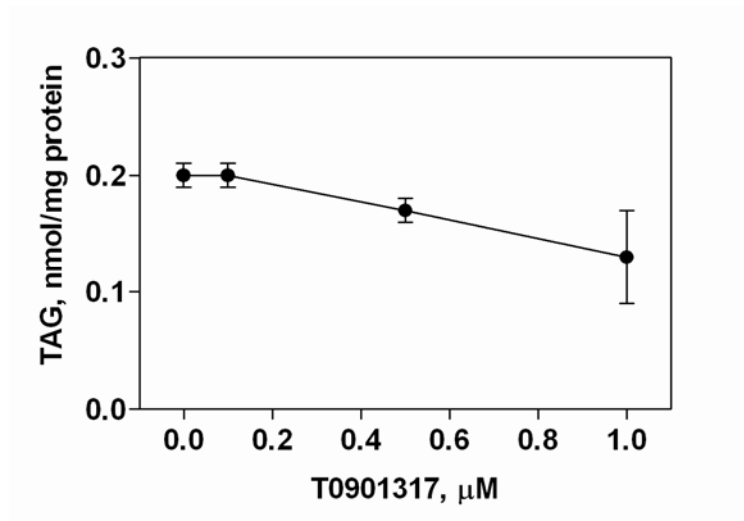
Cellene ble eksponert for samme konsentrasjoner av T0901317 som i forsøket beskrevet over (figur 3.9), og forsøket med inkorporering av acetat i komplekse lipider ble utført samtidig som forsøket med PA-opptak. Til tross for at det ble vist økt fettsyreopptak med økende konsentrasjoner T0901317, økte ikke de cellulære nivåene av FFA, TAG, DAG, CE og PL etter eksponering for økende konsentrasjoner T0901317. For alle lipidklassene så det ut til å være redusert dannelse etter T0901317-behandling (figur 3.10-3.14).



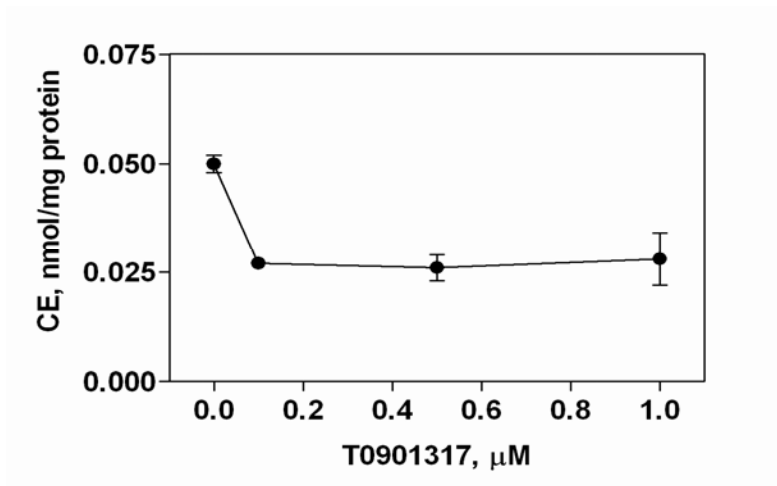
Figur 3.10 Inkorporering av acetat til FFA etter 24 timers forbehandling med T0901317 i ulike konsentrasjoner. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [^{14}C]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.



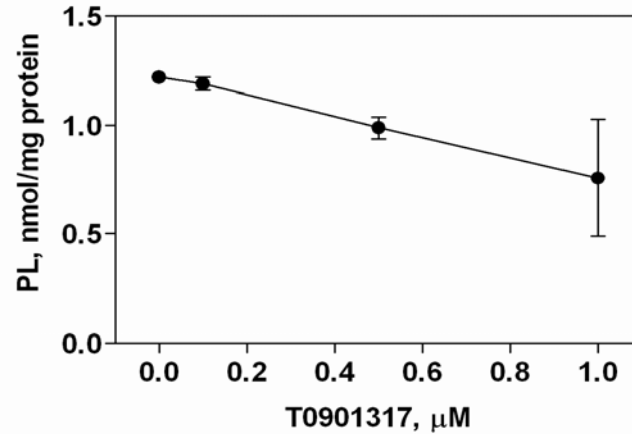
Figur 3.11 Inkorporering av acetat til DAG etter 24 timers forbehandling med T0901317 i ulike konsentrasjoner. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [^{14}C]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.



Figur 3.12 Inkorporering av acetat til TAG etter 24 timers forbehandling med T0901317 i ulike konsentrasjoner. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [^{14}C]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.



Figur 3.13 Inkorporering av acetat til CE etter 24 timers forbehandling med T0901317 i ulike konsentrasjoner. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [^{14}C]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.



Figur 3.14 Inkorporering av acetat til PL etter 24 timers forbehandling med T0901317 i ulike konsentrasjoner. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 3. dag etter differensiering og varte til dag 4 da forsøket ble gjennomført. Forsøket ble utført ved å inkubere cellene i 4 timer i serumfri DMEM/glutamax inneholdende [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetat (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM). Resultatene viser gjennomsnitt for 3 paralleller (triplikater) i nmol/mg celleprotein, \pm SEM av ett forsøk.

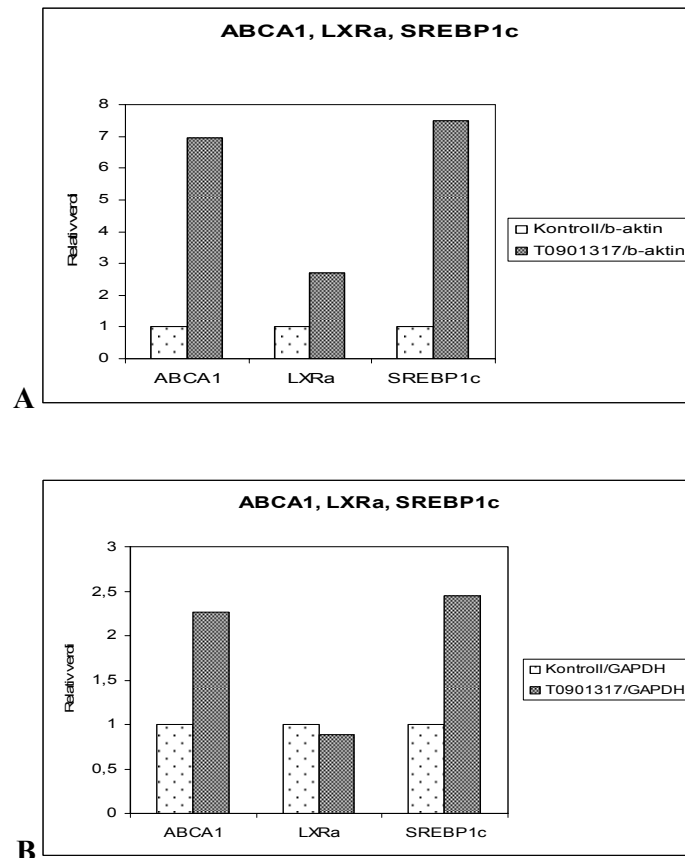
Det ble også forsøkt å utføre acetat-inkorporering til lipider som vist over med 3 døgns forbehandling med T0901317 (resultater ikke vist). Dette førte til at cellene løsnet fra brettene, noe som kan indikere en for lang differensieringsperiode og/eller forbehandling med T0901317.

3.2.6 Effekter av T0901317 på ekspresjon av ABCA1, SREBP-1c og LXR α

Effekten av T0901317 på ekspresjon av noen relevante LXR-målgener ble undersøkt i celler fra villtype C57-mus. Skjelettmuskelceller ble dyrket som beskrevet i metoder (2.2.6). Forbehandling med T0901317 (1 μM) ble initiert på dag 2 etter differensiering, før cellene ble høstet på dag 5 etter differensiering (5 døgns differensiering). Revers transkripsjon og real-time PCR ble utført som tidligere beskrevet. De konstitutivt uttrykte genene β -aktin og GAPDH ("housekeeping"-gener) ble brukt som endogene kontrollere.

De endogene kontrollgenene β -aktin og GAPDH samvarierte ikke (figur 3.15). Uttrykket av LXR-målgene ABCA1 og SREBP-1c økte imidlertid betydelig etter behandling med T0901317 relativt til begge endogene kontrollere. Med GAPDH som endogen kontroll ble

ekspresjonen av både ABCA1 og SREBP-1c mer enn doblet etter T0901317-behandling sammenlignet med kontroll (figur 3.15 B). Relativt til β -aktin var det en 7 gangers økning i ekspresjon av både ABCA1 og SREBP-1c (figur 3.15 A). Uttrykket av LXR α ble doblet etter T0901317-behandling med β -aktin som endogen kontroll, mens LXR α -uttrykket relativt til GAPDH ble svakt redusert (10 %) (figur 3.15).



Figur 3.15 Ekspresjon av ABCA1-, LXR α - og SREBP-1c-mRNA relativt til de endogene kontrollene β -aktin (A) og GAPDH (B) etter 3 døgns forbehandling med T0901317 (1 μ M). Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 2. dag etter differensiering og varte til cellene ble høstet på dag 5 etter differensiering. Revers transkripsjon på isolert RNA-materiale (2 μ g) ga cDNA til real-time PCR. Resultatene ble behandlet ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®], og kalkulert fra gjennomsnittsverdien av 3 paralleller (triplikater) i ett forsøk. Gjennomsnittlig relativ ekspresjon av genene er vist. Gjennomsnittlig ratio av kontroll/endogen kontroll (venstre søyler) er for alle genene definert som 1, og T0901317/endogen kontroll ratioene er relative til denne verdien.

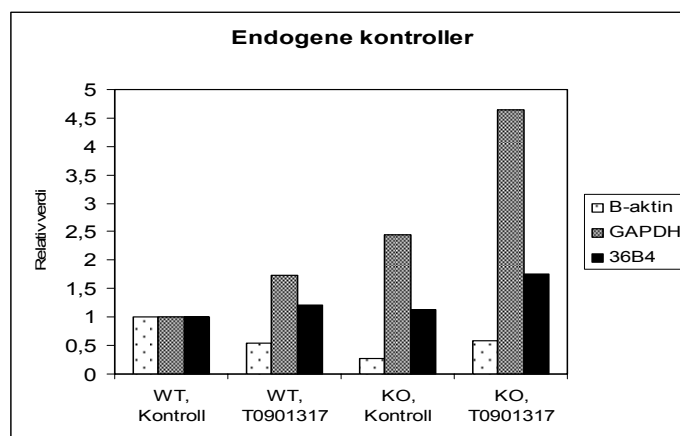
3.3 Effekter av T0901317 på genekspresjon i skjelettmuskelceller fra LXR α - og LXR β -KO-mus

Arbeidet med optimalisering av dyrkningsbetingelser for skjelettmuskelceller fra villtype C57-mus, samt de metabolske forsøkene på celler fra de samme musene, viste at skjelettmuskelceller fra mus er mindre robuste enn humane celler. Cellene viste en klar tendens til å løsne fra flaskene/brettene etter en del dagers dyrking, og spesielt i differensieringsperioden forekom dette hyppig. Det ble også observert visuelt i mikroskop at skjelettmuskelcellene kontraherte, noe som øker sjansen for at de løsner. I forsøkene med genekspresjon i LXR-KO/WT-celler ble det derfor forsøkt et forsøksoppsett hvor forbehandlingen ble initiert på dag 1 etter differensiering, hvorpå cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering, det vil si 2 døgn forbehandling (3 døgn differensiering).

3.3.1 Endogene kontrollgener ved real-time PCR

Fordi de endogene kontrollgenene β -aktin og GAPDH viste dårlig samvariasjon, ble uttrykket av de to genene sammen med en tredje endogen kontroll, 36B4, undersøkt og sammenlignet i LXR α -KO- og WT-celler (kontroll og T0901317-behandlede) ved hjelp av real-time PCR. Hensikten var å se hvilke av de tre genene som ga best samvariasjon.

Uttrykket av β -aktin var høyt i WT-kontroll-celler (ikke vist) og ble redusert i forhold til kontroll etter T0901317-behandling. 36B4 og GAPDH hadde en lavere og jevnere ekspresjon i WT-kontroll-celler (ikke vist), og uttrykket økte noe etter T0901317-behandling. I KO-celler var det spredning i uttrykket av alle de tre genene, men uttrykket av 36B4 og GAPDH lå relativt jevnt også her (figur 3.16). Fordi 36B4 og GAPDH viste størst samvariasjon, ble disse benyttet som endogene kontroller i videre forsøk.



Figur 3.16 Ekspresjon av de endogene kontrollgenene β -aktin, GAPDH og 36B4 i LXR α -WT/KO-celler etter 2 døgns forbehandling med T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering. Revers transkripsjon på isolert RNA-materiale (2 μ g) ga cDNA til real-time PCR. Resultatene ble behandlet ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®], og kalkulert fra gjennomsnittsverdien av 3 paralleller (triplikater) i ett forsøk. Gjennomsnittlig relativ ekspresjon av genene er vist. Gjennomsnittlig ratio av de tre endogene kontrollene i WT kontroll er definert som 1, og de andre ratioene er relative til denne verdien.

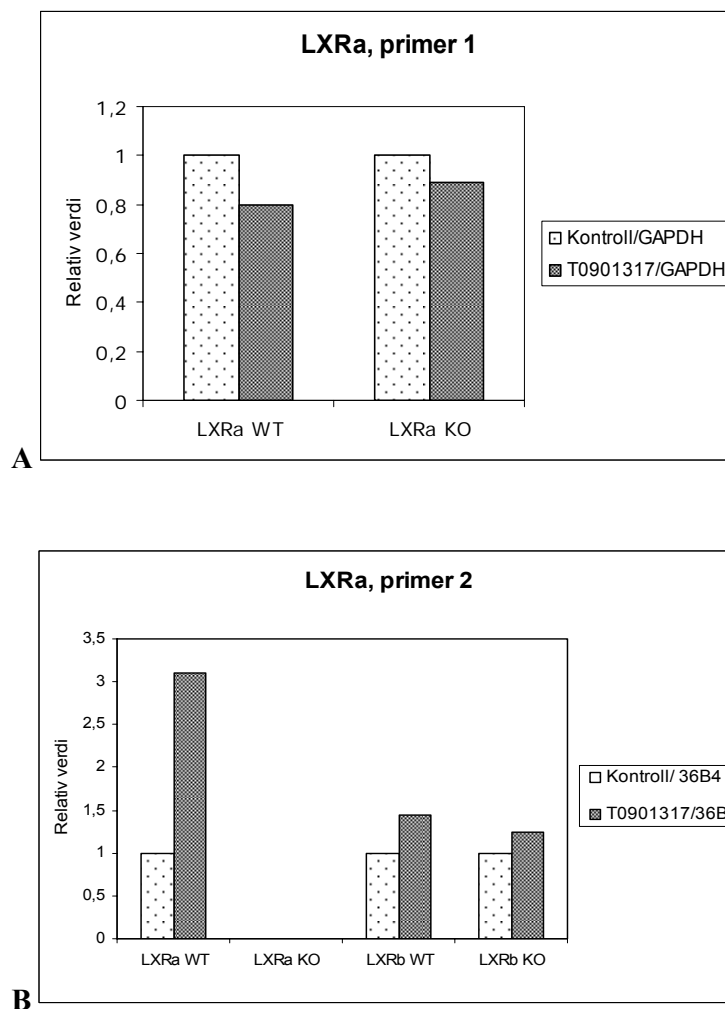
3.3.2 Effekter av T0901317 i LXR α -KO/WT- og LXR β -KO/WT-celler

Effektene av T0901317 på ekspresjon av genene LXR α , LXR β , SREBP-1c og ABCA1 ble undersøkt i celler fra LXR α -KO og LXR β -KO og sammenlignet med deres respektive WT. I første forsøk med celler fra kun LXR α -KO/WT-mus ble β -aktin (resultater ikke vist) og GAPDH benyttet som endogen kontroll. Fordi GAPDH i forsøket beskrevet over viste god samvariasjon med en tredje endogen kontroll, 36B4 (figur 3.16), er kun resultatene relative til GAPDH vist her (figur 3.17 A, 3.18 A, 3.19 A og 3.20 A). I andre forsøk med både LXR α -KO/WT og LXR β -KO/WT ble GAPDH (resultater ikke vist) og 36B4 benyttet som endogen kontroll. Disse viste god samvariasjon. Kun resultater relative til 36B4 er vist her (figur 3.17 B, 3.18 B, 3.19 B og 3.20 B).

Figur 3.17 A viser at LXR α var uttrykt i LXR α -KO-celler. Årsaken til dette er at primeren for LXR α (primer 1) var designet uten kjennskap til hvilke deler av LXR α som var ”knokket ut”/fjernet ved produksjon av de transgene musene. Knockout av LXR α -genet var utført slik at kun en del av genet var fjernet, mens en ikke-funksjonell del av genet fortsatt var tilstede i

cellene. For LXR α - og LXR β -KO var ekson 2-7 fjernet. De primerne som først ble benyttet (primer 1) for LXR α og LXR β bestod av gensekvenser etter ekson 8. Gensekvensen i primer 1 for LXR α svarte derfor til en del av LXR α -genet som fortsatt var intakt i cellene. Det ble av den grunn designet nye primere for LXR α og LXR β (primer 2 for LXR α og LXR β , se 2.2.16) som svarte til de gensekvenser som var fjernet i genene. Disse ble benyttet ved senere forsøk.

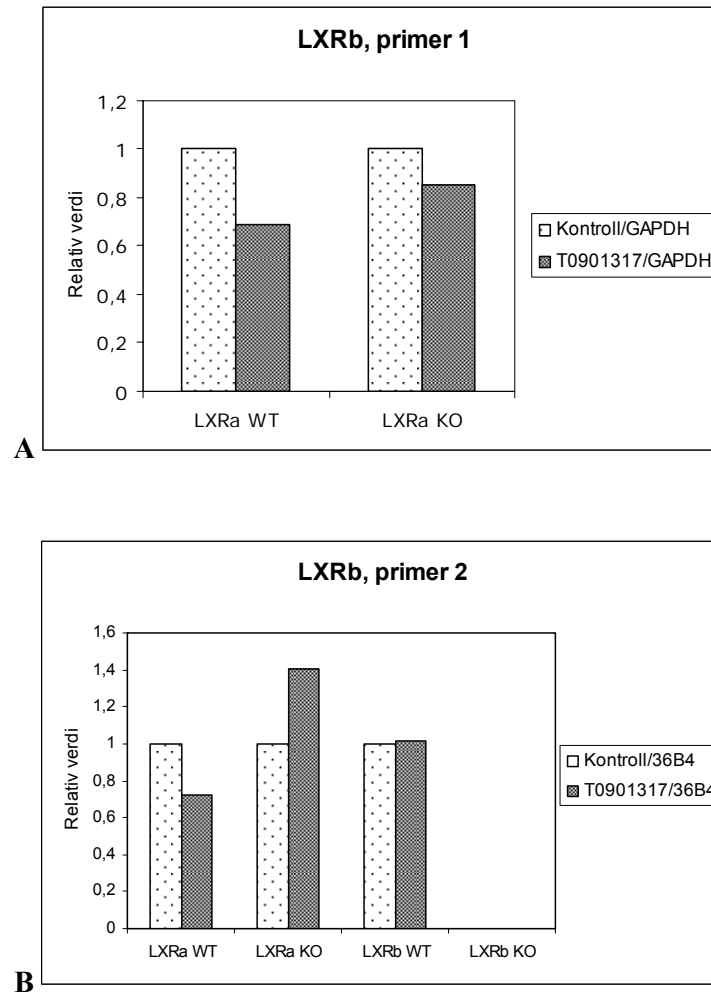
Da riktig primer (primer 2) ble benyttet var LXR α som forventet ikke uttrykt i LXR α -KO-celler (figur 3.17 B). Uttrykket av LXR α økte som respons på T0901317 sammenlignet med kontroll i de andre celletypene. Økningen i ekspresjon av LXR α etter T0901317-behandling i forhold til kontroll var større i LXR β -WT (over 40 %) enn i LXR β -KO (25 %) (figur 3.17 B).



Figur 3.17 Ekspresjon av LXR α -mRNA i celler fra LXR α -WT/KO (A) og LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO (B) relativt til de endogene kontrollene GAPDH (A) og 36B4 (B) etter 2 døgns forbehandling med T0901317.

Primer 1 for LXR α svarer til en del av LXR α -genet som ikke var fjernet og viser derfor ekspresjon av den delen av LXR α -genet som ikke var ”knoeket ut”. Primer 2 svarer til den delen av LXR α -genet som var ”knoeket ut” (ekson 2-7). Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering. Revers transkripsjon på isolert RNA-materiale (2 μ g) ga cDNA til real-time PCR. Resultatene ble behandlet ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®], og kalkulert fra gjennomsnittsverdien av 3 paralleller (triplikater) i ett forsøk. Gjennomsnittlig relativ ekspresjon av genet er vist. Gjennomsnittlig ratio av kontroll/endogen kontroll (venstre søyler) er for alle celletypene (LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO) definert som 1, og T0901317/endogen kontroll ratioene er relative til denne verdien.

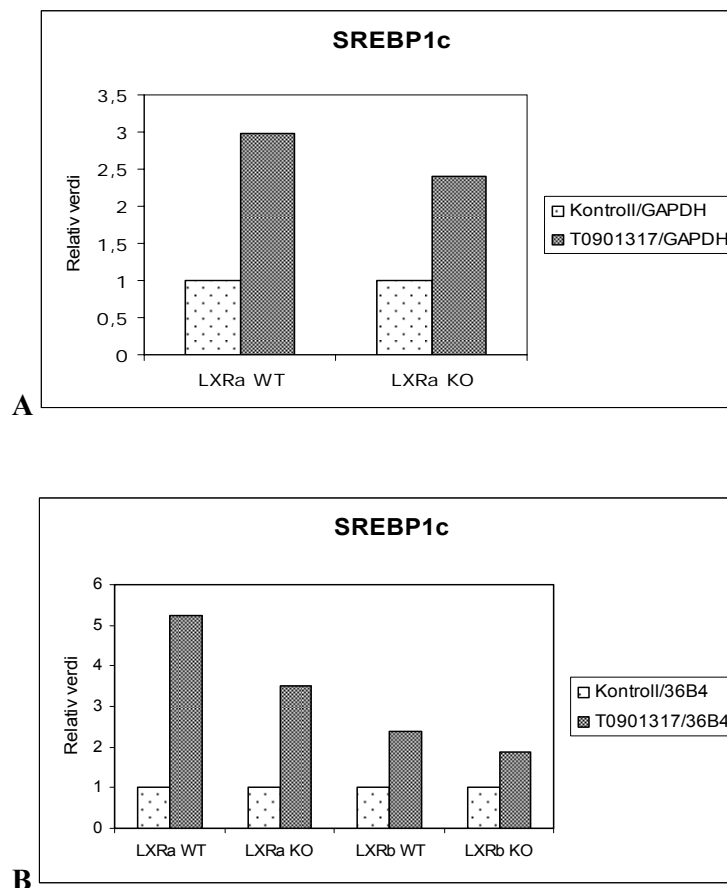
Primer 1 for LXR β -genet ble i første forsøk benyttet for å studere ekspresjonen av LXR β i LXR α -WT/KO-celler (figur 3.18 A). Fordi det ikke er noen KO i LXR β -genet i disse cellene, fungerer primer 1 for LXR β tilfredsstillende. Det var ingen effekt av T0901317 på uttrykket av LXR β i verken LXR α -KO- eller WT-celler, snarere ble ekspresjonen av LXR β redusert etter behandling med T0901317 (figur 3.18 A). Det andre forsøket viste også manglende effekt av T0901317 på LXR β -ekspresjon i LXR α - og LXR β -WT, mens effekten var tilstede i LXR α -KO (40 % økning) (figur 3.18 B). LXR β var som forventet ikke uttrykt i LXR β -KO-celler (figur 3.18 B).



Figur 3.18 Ekspresjon av LXR β -mRNA i celler fra LXR α -WT/KO (A) og LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO (B) relativt til de endogene kontrollene GAPDH (A) og 36B4 (B) etter 2 døgns forbehandling med T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering. Revers transkripsjon på isolert RNA-materiale (2 μ g) ga cDNA til real-time PCR. Resultatene ble behandlet ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®], og kalkulert fra gjennomsnittsverdien av 3 paralleller (triplikater) i ett forsøk. Gjennomsnittlig relativ ekspresjon av genet er vist. Gjennomsnittlig ratio av kontroll/endogen kontroll (venstre søyler) er for alle celletypene (LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO) definert som 1, og T0901317/endogen kontroll ratioene er relative til denne verdien.

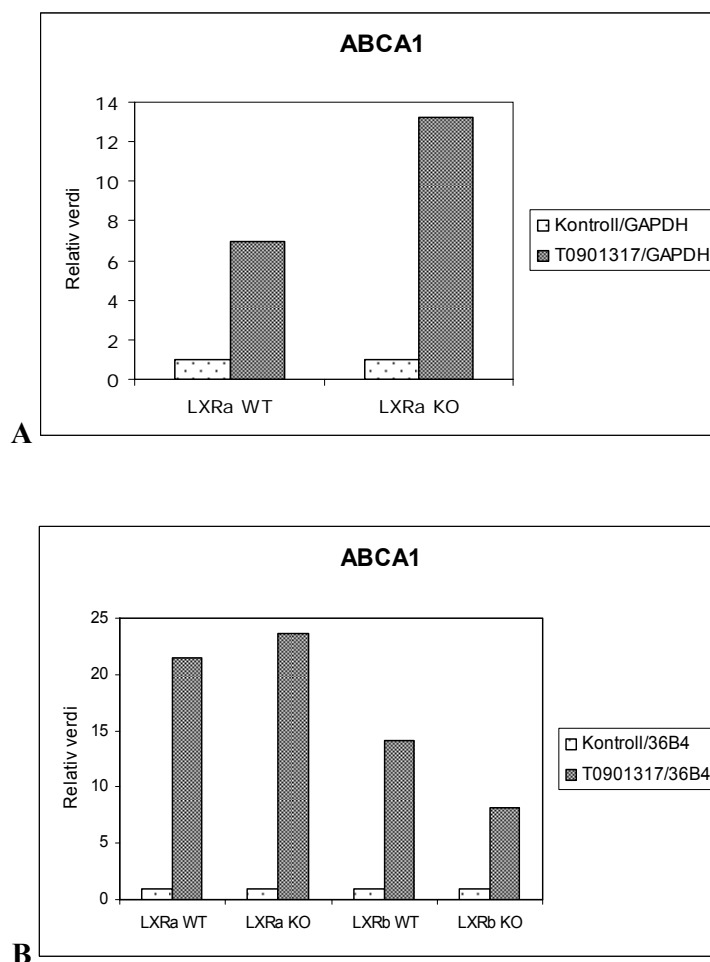
Uttrykket av LXR-målgenet SREBP-1c økte etter T0901317-behandling både i LXR α -WT (3 ganger) og -KO (2 ganger) sammenlignet med kontroll i det første forsøket (figur 3.19 A). Responsen på T0901317-behandling, det vil si prosentvis økningen i SREBP-1c-ekspresjon, var nesten dobbelt så stor i LXR α -WT sammenlignet med -KO. I andre forsøk økte også uttrykket av SREBP-1c som respons på T0901317 i alle celletyper (figur 3.19 B). I LXR α -

WT-cellene var det en 5 gangers økning i ekspresjon etter T0901317-behandling sammenlignet med kontroll, mens i LXR α -KO var økningen på 3 ganger (figur 3.19 B). Økningen i ekspresjon av SREBP-1c etter T0901317-behandling i forhold til kontroll var nesten dobbelt så stor i LXR α -WT sammenlignet med LXR α -KO også i dette forsøket. I LXR β -WT-celler var det mer enn dobling i ekspresjon av SREBP-1c etter T0901317-behandling, mens det for LXR β -KO-celler var litt under dobling (figur 3.19 B). Responsen av T0901317 på SREBP-1c-ekspresjon var derfor omtrent lik i LXR β -KO og WT.



Figur 3.19 Ekspresjon av SREBP-1c-mRNA i celler fra LXR α -WT/KO (**A**) og LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO (**B**) relativt til de endogene kontrollene GAPDH (**A**) og 36B4 (**B**) etter 2 døgns forbehandling med T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering og varte til cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering. Revers transkripsjon på isolert RNA-materiale (2 μ g) ga cDNA til real-time PCR. Resultatene ble behandlet ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®], og kalkulert fra gjennomsnittsverdien av 3 paralleller (triplikater) i ett forsøk. Gjennomsnittlig relativ ekspresjon av genet er vist. Gjennomsnittlig ratio av kontroll/endogen kontroll (venstre søyler) er for alle celletypene (LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO) definert som 1, og T0901317/endogen kontroll ratioene er relative til denne verdien.

LXR-målgenet ABCA1 viste også effekter av T0901317-behandling i form av økt ekspresjon i både LXR α -WT (7 ganger) og -KO (13 ganger) sammenlignet med kontroll i første forsøk (figur 3.20 A). Responsen på T0901317 i forhold til kontroll var dobbelt så stor i LXR α -KO som i WT. Også i andre forsøk økte uttrykket av ABCA1 i betydelig grad i alle celletypene som respons på T0901317. I LXR α -WT-cellene var det en 21 gangers økning i ekspresjon av ABCA1 etter T0901317-behandling, mens det var en 24 gangers økning i ekspresjon for LXR α -KO-cellene (figur 3.20 B). Responsen på T0901317-behandling i forhold til kontroll var her 10 % høyere for LXR α -KO sammenlignet med WT. For LXR β -KO/WT var resultatet motsatt. Her økte ABCA1-uttrykket 14 ganger i LXR β -WT-cellene, mens økningen var på 8 ganger i LXR β -KO (figur 3.20 B). Økningen i ABCA1-ekspresjon etter T0901317-behandling i forhold til kontroll var 80 % høyere i LXR β -WT sammenlignet med LXR β -KO.



Figur 3.20 Ekspresjon av SREBP-1c-mRNA i celler fra LXR α -WT/KO (**A**) og LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO (**B**) relativt til de endogene kontrollene GAPDH (**A**) og 36B4 (**B**) etter 2 døgns forbehandling med T0901317. Cellene ble dyrket som beskrevet ovenfor. Forbehandlingen ble initiert på 1. dag etter differensiering

og varte til cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering. Revers transkripsjon på isolert RNA-materiale (2 μ g) ga cDNA til real-time PCR. Resultatene ble behandlet ved hjelp av ABI Prism 7000 SDS Software[®], og kalkulert fra gjennomsnittsverdien av 3 paralleller (triplikater) i ett forsøk. Gjennomsnittlig relativ ekspresjon av genet er vist. Gjennomsnittlig ratio av kontroll/endogen kontroll (venstre søyler) er for alle celletypene (LXR α -WT/KO og LXR β -WT/KO) definert som 1, og T0901317/endogen kontroll ratioene er relative til denne verdien.

4. Diskusjon

4.1 Dyrking av skjelettmuskelceller fra mus

Fordi det aldri tidligere hadde vært jobbet med skjelettmuskelceller fra mus i vårt laboratorium, var det nødvendig å teste ut ulike forsøksoppsett. Cellene ble forbehandlet med LXR-agonisten T0901317 i ulike konsentrasjoner og med forskjellig varighet, i tillegg til at varigheten av differensieringsperioden varierte.

Det ble ved de funksjonelle forsøkene benyttet 4 døgns differensiering og 24 timer eller 3 døgns preinkubering med LXR-agonist. I flere av disse forsøkene ble det observert at 3 døgns inkubering med 1 μ M T0901317 førte til redusert lipid-/glukoseopptak eller at cellene løsnet, noe som kan tyde på T0901317 kan være toksisk for skjelettmuskelceller fra mus ved for lang forbehandling. Dersom varigheten av preinkuberingen er helt på grensen av hva som er toksisk, vil det i enkelte forsøk kunne observeres toksisitet kun ved høyeste konsentrasjon (1 μ M), i noen tilfeller vil det forekomme ved alle konsentrasjoner av T0901317, mens det i andre forsøk sannsynligvis ikke vil forekomme noen toksiske effekter. Det vil være nødvendig med flere forsøk for å si noe sikkert om hvilke konsentrasjoner av T0901317 som er optimale med tanke på effekter på glukose- og lipidopptak i skjelettmuskelceller fra mus. Det er i tillegg nødvendig å forsøke de ulike konsentrasjoner med ulik varighet av preinkuberingen, da det kan være stor forskjell på hva som vil være toksiske konsentrasjoner av LXR-agonister ved ulik varighet av preinkubering.

Det ble i forsøkene med genekspressjon på villtype-museceller (C57-mus) benyttet lengre differensieringstid enn i de funksjonelle forsøkene. Forbehandlingen ble initiert en dag senere (2. dag etter differensiering) og varte til dag 5 (3 døgn). Ett forsøk er alene ikke nok til å si om økt differensieringstid i lengden vil føre til at flere celler løsner fra brettene. 3 døgns forbehandling med T0901317 så i dette ene forsøket ikke ut til å ha toksiske effekter på cellene.

Erfaringen med dyrking av skjelettmuskelceller fra villtype-mus gjorde at det for KO-celler ble valgt et forsøksoppsett hvor differensieringsperioden var så kort som mulig, men likevel ga tette myotuber, samt en varighet av T0901317-eksponering som ikke var toksisk, men likevel ga effekter på genekspresjon. Siden de funksjonelle forsøkene kunne tyde på at 3 døgns forbehandling med T0901317 var på grensen av hva musecellene kunne tåle, ble det her forsøkt med 2 døgns preinkubering. Forbehandlingen ble som for de funksjonelle forsøkene initiert på 1. dag etter differensiering, før cellene ble høstet på dag 3 etter differensiering. Ved bruk av dette forsøksoppsettet løsnet ingen celler fra flaskene, cellene viste jevn og god vekst. Det ble samtidig observert induksjon av forventede målgener av LXR. Disse faktorene tyder på at forsøksoppsettet fungerte tilfredsstillende. Det forekom imidlertid i enkelte tilfeller noe dårlig differensiering av cellene, noe som kan være et tegn på for kort differensieringsperiode. Det er ut ifra forsøkene utført i denne oppgaven ikke mulig å si noe om cellene ville tålt lengre differensieringsperiode og eventuelt lengre forbehandling med LXR-agonist. Fordi cellene ved forsøkene med genekspresjon ble dyrket i flasker og ikke brett, er det mulig at de kunne tålt lengre differensierings- og preinkuberingsperiode enn hva som var tilfellet ved de funksjonelle forsøkene med villtype-celler, hvor brett ble benyttet til dyrking. For å undersøke dette, er det imidlertid nødvendig med ytterligere forsøk hvor effektene av ulik varighet av differensiering og preinkubering undersøkes.

4.2 Effekter av T0901317 på glukosetransport

Kase et al. (48) har tidligere vist at T0901317 øker glukoseopptaket i humane skjelettmuskelceller. Det var ønskelig å undersøke om de samme effektene var tilstede i skjelettmuskelceller fra mus. Med 24 timers forbehandling økte det basale glukoseopptaket med rundt 20 % etter behandling med T0901317 (1 μM) i begge forsøk vist i figur 3.3, mens det insulinstimulerte glukoseopptaket økte litt (10 %) kun i det første forsøket. Det var insulinrespons på glukoseopptaket i begge forsøk (figur 3.3). Forsøk med forbehandling av cellene med ulike konsentrasjoner T0901317 i 3 døgn viste ingen doseavhengig økning i glukosetransporten som respons på T0901317 (figur 3.4). Glukoseopptaket var redusert ved konsentrasjoner på 0,01 og 0,05 μM T0901317, mens opptaket økte ved 0,1 μM (10 %) og 0,5 μM (40 %). Ved 1 μM falt imidlertid glukosetransporten til et nivå 25 % under kontroll (figur 3.4). Disse resultatene kan samlet tyde på at effekten av T0901317 på glukoseopptak er

tilstede i skjelettmuskelceller fra mus. For humane skjelettmuskelceller er effektene på glukoseopptak etter 4 døgns preinkubering vist med T0901317 i samme konsentrasjonsområde som i denne oppgaven (0,1, 0,5 og 1 μM), og effekten av T0901317 var omtrent lik i de tre konsentrasjonene (48). Det er derfor ikke uventet at forsøket med myotuber fra mus ikke viste noen stigende doseresponskurve. Konsentrasjonene 0,01 og 0,05 μM T0901317 kan være for lave til å gi forventede effekter på glukoseopptak. Resultatet for 1 μM kan indikere at en så høy konsentrasjon T0901317 med 3 døgns inkubering kan være toksisk for musecellene. Det er imidlertid ingenting som tyder på at forbehandling med 1 μM T0901317 i 24 timer er toksisk (figur 3.3).

Den observerte økningen i glukosetransport etter T0901317-behandling kan skyldes de økte mRNA-nivåer av GLUT1 (60-80 %) og GLUT4 (5,5-6,5 ganger) som er observert som respons på T0901317 i humane skjelettmuskelceller (48). T0901317 er også rapportert å bedre glukosetoleransen *in vivo* i mus (41), og denne observasjonen kan være et resultat av økt glukoseopptak i skjelettmuskel. Ut ifra de tydelige økningene i ekspresjon av GLUT1 og GLUT4 kunne man imidlertid forvente en mer markant økning i glukosetransport etter T0901317-behandling enn hva som ble observert i denne oppgaven. Siden både GLUT1 og GLUT4 er vist induert, burde man forvente økninger i både basalt og insulinstimulert glukoseopptak. Kun det ene forsøket viste effekter av T0901317 på insulinstimulert glukoseopptak, og effekten var ikke markant (10 %). Heller ikke effektene på basalt glukoseopptak var store (10-40 %). For humane skjelettmuskelceller var imidlertid også effektene av T0901317 på glukoseopptak moderate (gjennomsnittlig 30 %) (48), og resultatene i denne oppgaven antyder derfor at effektene av T0901317 på glukoseopptak i myotuber fra mus er de samme i som i humane skjelettmuskelceller.

Metoden for glukoseopptak benyttet av Kase et al. (48) involverte 4 timers inkubering, mens det i denne oppgaven ble utført 15 minutters glukoseopptak. Det er også i andre upubliserte data fra vår forskningsgruppe vist effekter av T0901317 på glukoseopptak ved 4 timers inkubering, samtidig som det ved glukoseopptak med 15 minutters inkubering ikke ble funnet effekter av T0901317. Dette kan tyde på at effektene av T0901317 er mest uttalt ved glukoseopptak målt etter 4 timer. Det er derfor mulig at de små effektene av T0901317 på glukoseopptak som ble observert i denne oppgaven kunne vært større ved måling av glukoseopptak med 4 timers inkubering.

4.3 Effekter av T0901317 på lipidmetabolisme

Tidligere *in vivo* dyrestudier og cellekultur-forsøk har vist at LXR spiller en viktig rolle for lipidakkumulering. *In vivo* forsøk hvor syntetiske LXR-agonister er blitt gitt til mus har vist økte triglyseridnivåer i leveren, i tillegg til forbigående i plasma (24). Den lipogene aktiviteten til LXR kan skyldes oppregulering av viktige enzymer involvert i biosyntese og opptak av fettsyrer (38). Kase et al. (48) har tidligere vist at kronisk T0901317-behandling resulterer i økt opptak av lipider i myotuber fra humane donorer. Det er blitt observert oppregulering av mRNA-nivåer av CD36/FAT etter T0901317-behandling, mulig via SREBP-1c og PPAR γ (48). Siden CD36/FAT er en viktig faktor involvert i fettsyreopptak og intracellulær transport i skjelettmuskelceller, kan oppregulering av dette genet forklare det økte lipidopptaket. Det var ønskelig å undersøke om effekten av T0901317 på lipidopptak gjentok seg i myotuber fra mus. Effektene var i denne oppgaven noe varierende i de ulike forsøkene. Mens det første forsøket med 24 timers forbehandling med 1 μ M T0901317 viste en markant økning i både basalt (40 %) og insulinstimulert (dobling) PA-opptak, viste det andre forsøket ingen effekt av T0901317 på verken basalt eller insulinstimulert PA-opptak (figur 3.5). Celler forbehandlet med 1 μ M T0901317 i 3 døgn viste kun en liten økning i basalt og insulinstimulert PA-opptak sammenlignet med kontroll (figur 3.6). Ved 3 døgns forbehandling av cellene med ulike konsentrasjoner T0901317 viste det første forsøket at lipidopptaket kun var økt ved en konsentrasjon på 0,5 μ M (figur 3.7), mens det andre forsøket viste økt lipidopptak (rundt 60 %) ved alle konsentrasjoner av T0901317 (figur 3.8). Ved 24 timers preinkubering ble det vist økende PA-opptak med økende konsentrasjoner T0901317 (figur 3.9), noe som samsvarer med resultatene for fettsyreopptak i humane celler (48).

Måling av fettsyreopptak i humane celler ble av Kase og kollegaer (48) utført med 4 døgns forbehandling med T0901317 i forskjellige konsentrasjoner, økningen var doseavhengig og på 45 % ved 1 μ M. Man kunne derfor forvente at lipidopptaket i muse-myotuber skulle være større ved 3 døgns forbehandling enn ved 24 timers eksponering, noe som ikke viste seg å være noe gjennomgående trend i disse forsøkene. Et uforandret eller litt redusert opptak ved lave konsentrasjoner T0901317 i 3 døgn kan tyde på at disse er for lave til å gi effekter selv med 3 døgns preinkubering. Disse observasjonene stemmer med hva som ble sett ved ulike konsentrasjoner T0901317 ved forsøk med glukoseopptak og antyder at konsentrasjonen av

T0901317 må være 0,5 μM eller høyere for å gi effekt på glukose- og fettsyreopptak. Ved behandling med ulike konsentrasjoner T0901317 i 3 døgn ble lipidopptaket redusert (40 %) ved 1 μM i første forsøk, noe som styrker antagelsen om at denne konsentrasjonen kan være toksisk i 3 døgn. Forsøk med kun én konsentrasjon T0901317 (1 μM) i 3 døgn ga kun en liten økning både i basalt- og insulinstimulert lipidopptak. Det er mulig at denne effekten er et resultat av en kombinasjon av effekt på lipidopptak og toksisitet av T0901317, og at effekten på lipidopptak kunne vært større dersom forbehandlingen hadde vært kortere/mindre toksisk. I andre forsøk med ulike konsentrasjoner var imidlertid 0,1 μM T0901317 tilstrekkelig for å gi markant effekt på lipidopptak, samtidig som 1 μM ga samme effekt. Resultatene er motstridende i forhold til tendensene som er sett i de tidligere forsøkene angående optimal konsentrasjon av T0901317 ved 3 døgns forbehandling, og det er derfor nødvendig med flere studier for å undersøke effektene av ulike konsentrasjoner T0901317 med 3 døgns preinkubering. Ved 24 timers preinkubering ga 0,1 μM ingen effekter på lipidopptak, noe som tyder på at dette er en for lav konsentrasjon med så kort inkubering. 0,5 og 1 μM T0901317 ga henholdsvis 10 og 50 % økning i lipidopptak, noe som antyder at 1 μM T0901317 ikke er toksisk ved kun 24 timers preinkubering.

Acetat-inkorporering til komplekse lipider viste, til tross for økt lipidopptak i samme forsøk, ingen økt dannelse av de ulike lipidklassene etter T0901317-behandling i 24 timer (figur 3.10-3.14). Tidligere studier har vist at LXR har en nøkkelrolle i regulering av cellulært lipidinnhold gjennom aktivering av SREBP-1c, som er involvert i FFA, TAG og PL syntese via aktivering av transkripsjon av viktige lipogene enzymer som ACC, FAS og SCD-1 (46-48). Disse genene er også påvist å være målgener av LXR i skjelettmuskelceller fra humane donorer (48). Dersom ekspresjonen av de lipogene enzymene også reguleres av LXR i skjelettmuskel i mus, vil T0901317-behandling trolig gi lipogene effekter med økt dannelse av komplekse lipider. Kase et al. (49) viste nylig at kronisk T0901317-behandling økte inkorporering av acetat til komplekse lipider som FFA, DAG og TAG i humane myotuber. Resultatet fra forsøket utført i denne oppgaven samsvarer ikke med resultatene for humane skjelettmuskelceller produsert av Kase og kollegaer. Det er kjent at behandling av mus med syntetiske LXR-agonister øker lipidakkumulering i leveren, men det er ikke kjent om denne lipidakkumuleringen skjer via økt lipogenese eller økt opptak av lipider. Det er heller ikke kjent hvordan skjelettmuskel reagerer på LXR-aktivering *in vivo*. Siden det her bare er gjort

ett enkelt forsøk, kan man ikke utelukke at T0901317-behandling av skjelettmuskelceller fra mus fører til økt dannelse av lipider.

4.4 Effekter av T0901317 på ekspresjon av relevante gener

Studier har vist at stimulering av LXR i skjelettmuskel med ikke-selektive agonister som T0901317 oppregulerer kjente målgener som SREBP-1c og ABCA1. Kase et al. (48) viste en kraftig økning i SREBP-1c-ekspresjon (6-8 ganger) som respons på T0901317-eksponering av humane skjelettmuskelceller i kultur, det samme er vist av Cozzone et al. (46). Muscat et al. (47) viste at behandling av mus med T0901317 *in vivo* økte ekspresjon av genene SREBP-1c (8 ganger) og ABCA1 (4,5 ganger) i skjelettmuskel. Hensikten med å studere LXR α - og LXR β -singel-KO-mus er å studere funksjonen til hver av LXR isoformene. Fordi effekten av aktivering av LXR i LXR α - og LXR β -KO-mus kun er studert i andre vev enn muskel, er det i dag ingen kjennskap til de to isoformenes enkeltroller i skjelettmuskel. Det er tidligere rapportert om at LXR α -KO-mus akkumulerte kolesterol i leveren etter foring med kolesterolrik diett, noe villtype-mus og LXR β -KO-mus var resistente mot (29; 30). Det er samtidig vist at den samme kolesterol-dietten ga lavere triglyserider i leveren i LXR α -KO-mus enn hva som var tilfellet i villtype mus (29). Disse studiene kan indikere at LXR α er den viktigste isoformen av LXR i lever, og at LXR α er viktig i kontroll av lipogenese i lever via aktivering av SREBP-1c. Samtidig foreligger det studier som viser at LXR β er mindre viktig i lipogenese (48), i tillegg til at denne isoformen er ansett som viktig i regulering av ABCA1-ekspresjon og revers kolesteroltransport i makrofager (33). Det er observert at selektiv aktivering av LXR β ved hjelp av LXR α -KO-mus har gitt redusert triglyseridakkumulering i lever sammenlignet med villtype (52). Disse studiene tyder på at det er sannsynlig at de to isoformene av LXR har noe forskjellige roller *in vivo*. Fordi ingen av observasjonene gjelder for skjelettmuskel, var det ønskelig å se om tendensen gjentok seg i skjelettmuskelceller i kultur.

Responser av T0901317 på ekspresjon av LXR α , LXR β , SREBP-1c og ABCA1 ble i denne oppgaven sammenlignet i celler fra LXR α - og LXR β -singel-KO- og deres respektive WT-mus. LXR α var som forventet ikke uttrykt i LXR α -KO-celler da riktig primer ble benyttet (figur 3.17 B) Cozzone et al. (46) har tidligere rapportert om at T0901317, som aktiverer både

LXR α og LXR β , i humane myotuber økte mRNA-nivået av LXR α , men derimot ikke hadde noen effekt på ekspresjon av LXR β . I denne oppgaven varierte effekten av T0901317 på LXR α -ekspresjonen i celler fra de forskjellige villtype-musene, samt avhengig av hvilken endogen kontroll uttrykket ble relatert til (figur 3.15 og 3.17). Selv om uttrykket ikke økte med GAPDH som endogen kontroll, er tendensen økt uttrykk av LXR α etter T0901317-behandling, og dette samsvarer med hva som er funnet i humane skjelettmuskelceller. Økningen i LXR α -ekspresjon var noe større i LXR β -WT (over 40 %) enn i LXR β -KO (25 %) (figur 3.17 B), noe som kan tyde på at T0901317-responsen på LXR α reduseres når LXR β blir fjernet. Det er derfor mulig at LXR β bidrar til den økte ekspresjonen av LXR α som observeres etter T0901317-behandling.

LXR β var som forventet ikke uttrykt i LXR β -KO-celler (figur 3.18 B). I LXR α -WT/KO-celler var det ingen effekt av T0901317 på LXR β -ekspresjonen i første forsøk (figur 3.18 A), mens det i andre forsøk var en økt ekspresjon av LXR β på 40 % i LXR α -KO-celler, samtidig som T0901317-effekten var fraværende i LXR α -WT (figur 3.18 B). Cozzzone et al. (46) har som tidligere nevnt gjort studier hvor T0901317 økte ekspresjonen av LXR α , men ikke av LXR β , dette til tross for at T0901317 er agonist for begge isoformer av LXR. Kase et al. (48) har derimot vist effekter av T0901317 på ekspresjon av begge isoformer av LXR, selv om responsen var mye høyere for LXR α (7,5 ganger) enn LXR β (60 %). I en helt fersk studie utført av Kase et al. (49) ble det imidlertid ikke funnet effekter av T0901317 på LXR β , i motsetning til LXR α , hvor ekspresjonen var 4 ganger økt. Resultatet kan tyde på at LXR β -genet i liten grad er oppregulert av T0901317, i motsetning til hva som er tilfellet med LXR α .

Det er vist at ekspresjonen av SREBP-1c er kraftig økt etter T0901317-eksponering i humane myotuber (48). Det samme er også tidligere vist for skjelettmuskel ved *in vivo* forsøk utført på mus (47). I denne oppgaven økte ekspresjon av LXR-målgenet SREBP-1c etter T0901317-eksponering i alle celletyper fra mus (figur 3.15 og 3.19). Økningen i mRNA-nivåer av SREBP-1c tyder på en lipogen effekt av T0901317 også i myotuber fra mus. Økningen i SREBP-1c-ekspresjon var nesten doblet i LXR α -WT-celler sammenlignet med LXR α -KO-celler for begge forsøkene som ble utført med LXR α -KO-celler (figur 3.19 A og B). Resultatene viser at effekten av T0901317 på ekspresjon av SREBP-1c faller betydelig når LXR α er fjernet, noe som tyder på at uttrykket av SREBP-1c i skjelettmuskelceller er avhengig av LXR α . Responsen av T0901317 på SREBP-1c-ekspresjon var omtrent lik i

LXR β -KO og WT (figur 3.19 B). Dette tyder på at responsen av T0901317 på uttrykket av SREBP-1c ikke er avhengig av LXR β , siden effekten ikke reduseres når LXR β fjernes. Sammen kan disse resultatene antyde at uttrykket av SREBP-1c i skjelettmuskelceller i mus er mest avhengig av LXR α . LXR α har tidligere blitt rapportert å være den viktigste isoformen involvert i lipogenese og akkumulering av triglyserider i lever assosiert med SREBP-1c induksjon (29; 30; 52), og resultatene av forsøkene utført i denne oppgaven kan tyde på at de samme tendensene er tilstede i skjelettmuskel.

In vivo forsøk utført i mus har vist at ABCA1 uttrykket etter T0901317-behandling er markant økt i skjelettmuskulatur (47). Forsøkene i denne oppgaven viste også kraftige effekter av T0901317 på ekspresjon av LXR-målgenet ABCA1 i alle celletyper fra mus (figur 3.15 og 3.20). Økte ABCA1-nivåer er et uttrykk for induksjon av revers kolesteroltransport i myotuber fra mus som respons på T0901317, noe som også tidligere er vist ved funksjonelle forsøk utført av Muscat et al. (47). Uttrykket av ABCA1 økte i betydelig grad for både LXR α -KO og WT etter T0901317-behandling (figur 3.20). Responsen var høyere i LXR α -KO sammenlignet med WT i både første (dobling) (figur 3.20 A) og andre (10 %) (figur 3.20 A) forsøk utført med LXR α -KO-celler. Resultatene viser at responsen på T0901317 øker etter fjerning av LXR α , noe som antyder at effekten av T0901317 på ABCA1-ekspresjon ikke er avhengig av LXR α . Samtidig var økningen i ABCA1-ekspresjon etter T0901317-behandling høyere (80 %) i LXR β -WT sammenlignet med LXR β -KO (figur 3.20 B), noe som forteller oss at effekten av T0901317 er kraftig redusert etter fjerning av LXR β . Dette resultatet kan tyde på at LXR β er nødvendig for å opprettholde responsen av T0901317 på ABCA1-ekspresjon i skjelettmuskelceller. Resultatene antyder at ABCA1-ekspresjon i skjelettmuskelceller i mus er mest avhengig av LXR β . LXR β er tidligere knyttet til revers kolesteroltransport og kontroll av ABCA1-ekspresjon i makrofager (33). Siden ABCA1 også er uttrykt i skjelettmuskulatur (47), har det vært ønskelig å undersøke om det er forskjeller i de to LXR isoformenes regulering av ABCA1 i dette vevet. Disse resultatene antyder at også i skjelettmuskulatur er LXR β den viktigste isoformen med tanke på ekspresjon av ABCA1.

Selektiv aktivering av LXR β ved hjelp av LXR α -KO-mus er tidligere vist å gi redusert triglyseridakkumulering i lever sammenlignet med villtype-mus (52). Triglyseridakkumulering skjer trolig via SREBP-1c-mediert lipogenese. Selektiv LXR β -aktivering fører til redusert lipidakkumulering fordi mindre SREBP-1c induseres når LXR α -

stimulering unngås. Bruk av dagens uselektive LXR-agonister på villtype-mus/celler innebærer aktivering av begge isoformer av LXR, og medfører på grunn av LXR α -stimulering større grad av SREBP-1c-mediert lipogenese. Dette er fra et terapeutisk synspunkt uønsket. Det er derimot ønskelig å søke farmakologiske modulatorer som separerer de gunstige effektene av LXR-aktivering på kolesterolmetabolisme (antiaterogene effekter) og glukosemetabolisme (antidiabetiske effekter) fra de uønskede effektene på lipidmetabolisme (lipogene effekter). Tidligere studier i andre vev enn muskel har vist en tydelig tendens til at LXR β -selektiv aktivering kan gjøre at de uønskede lipogene effektene i lever som domineres av LXR α kan unngås, samtidig som de positive effektene fra ABCA1-aktivering og økt kolesteroleffluks i makrofager beholdes. Resultatene i denne oppgaven antyder at de samme effektene er tilstede i skjelettmuskel. LXR β -selektiv stimulering av skjelettmuskel vil ut ifra resultatene vist i denne oppgaven gi induksjon av revers kolesteroltransport via ABCA1-ekspresjon, mens de lipogene effektene av SREBP-1c induksjon vil reduseres i forhold til villtype fordi man ikke aktiverer LXR α . Dette indikerer at det vil kunne være et primært mål for fremtiden å utvikle LXR β -selektive-agonister. Revers kolesteroltransport gir fordelaktige effekter med tanke på primær prevensjon av kardiovaskulær sykdom gjennom økte HDL-nivåer og netto kolesterolsekresjon. Fordi LXR sin rolle i glukosemetabolisme til nå er begrenset studert, er det ikke kjent om ekspresjon av glukosetransportørene GLUT1 og GLUT4 reguleres av LXR α , LXR β eller begge. Dersom LXR β -spesifikk aktivering også øker ekspresjon av glukosetransportørene og øker glukoseopptak inn i celler, er det sannsynlig at LXR β -spesifikk aktivering kan ha gunstige effekter med tanke på prevensjon og behandling av T2D, kardiovaskulær sykdom og metabolsk syndrom.

5. Konklusjon og fremtidsutsikter

Det er i denne oppgaven blitt etablert en metode for å studere LXR α - og LXR β -selektiv aktivering i skjelettmuskel ved bruk av skjelettmuskelceller isolert fra LXR α - og LXR β -singel-KO-mus. Ved utprøving av ulike vekstbetingelser er det kommet frem til en metode for dyrking av skjelettmuskelceller fra mus som fungerer tilfredsstillende. Metoden er imidlertid ikke optimal i forhold til uregelmessig vekst og differensiering av cellene, og kan optimaliseres ytterligere.

Skjelettmuskelceller fra villtype-mus viste økt glukoseopptak som respons på LXR-agonisten T0901317. Det var også en tendens til at fettsyreopptak i skjelettmuskelceller fra villtype-mus økte etter T0901317-behandling, selv om resultatene var noe varierende. Acetat-inkorporering til lipider viste i ett enkelt forsøk ingen økning etter T0901317-eksponering. Antall forsøk er for få til å konkludere om de metabolske effektene av T0901317 i myotuber fra mus, men de antyder likevel at effektene av T0901317 på metabolske prosesser som glukosetransport og fettsyreopptak som tidligere er vist i humane myotuber (48) også er tilstede i skjelettmuskelceller fra mus. Viktige målgener av LXR som SREBP-1c og ABCA1 ble markant oppregulert etter T0901317-behandling i myotuber fra villtype-mus. I skjelettmuskelceller fra LXR α -KO-mus var effekten av T0901317 på SREBP-1c-ekspressjon nesten halvert sammenlignet med celler fra WT-mus, mens effekten av T0901317 på SREBP-1c-ekspressjon var omtrent lik i LXR β -KO- og WT-celler. Disse resultatene indikerer at ekspresjonen av SREBP-1c er mest avhengig av LXR α -aktivering. Effekten av T0901317 på ABCA1-ekspressjonen var økt i LXR α -KO sammenlignet med celler fra WT, mens T0901317-responsen var markant redusert i LXR β -KO sammenlignet med WT-celler. Dette antyder at ABCA1-ekspressjon er mest avhengig av LXR β -aktivering.

Det er tidligere gjort studier som tyder på at LXR α spiller en viktig rolle i triglyseridakkumulering i lever assosiert med SREBP-1c-induksjon (29; 30), samtidig som LXR β er vist å være mindre viktig i lipogenese, men derimot assosiert med revers kolesteroltransport i makrofager koblet til økt ekspresjon av ABCA1 (33; 48; 52). Det er utført for få forsøk til at det er mulig å konkludere om de to LXR isoformenes roller i

regulering av SREBP-1c og ABCA1 i skjelettmuskel, men resultatene antyder at de to isoformene av LXR har samme effekter i skjelettmuskel som i andre målvev for LXR.

Det vil fremover være nødvendig å gjøre flere forsøk som undersøker ekspresjon av LXR-målgener i LXR α - og LXR β -singel-KO-celler fra skjelettmuskel, herunder effekter på ekspresjon av SREBP-1c og ABCA1, samt glukosetransportørene GLUT1 og GLUT4. Disse forsøkene bør følges opp av funksjonelle forsøk med glukose- og fetttsyreopptak samt glukose- og fetttsyreoksidasjon, for å etablere de to LXR isoformenes roller i skjelettmuskel. Det er i forkant av disse forsøkene kanskje nødvendig å prøve forskjellige forsøksoppsett for å optimalisere vekstforhold og forbehandling av skjelettmuskelceller fra mus. Fordi det er ønskelig å separere de gunstige effektene av LXR-aktivering på kolesterolmetabolisme (antiaterogene effekter) og glukosemetabolisme (antidiabetiske effekter) fra de uønskede effektene på lipidmetabolisme (lipogene effekter), kan LXR β -selektiv aktivering være fordelaktig. Dersom forsøk hvor det skjer en LXR β -selektiv aktivering gir samme resultater på kolesterol- og lipidmetabolisme som antydnet i denne oppgaven, og i tillegg viser seg å gi fordelaktige effekter på glukosemetabolisme i form av økt ekspresjon av glukosetransportører, er det sannsynlig at LXR β -selektive-agonister kan ha svært gunstige effekter med tanke på prevensjon og behandling av T2D, kardiovaskulær sykdom og metabolsk syndrom. Et primært mål for fremtiden vil derfor kunne være utvikling av selektive LXR β -agonister. Fremtidige utfordringer kan derfor rettes mot utvikling av selektive LXR β -agonister.

Litteraturhenvisninger

1. King H, Aubert RE, Herman WH: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431, 1998
2. Abuissa H, Bell DSH, O'Keefe JH: Strategies to prevent type 2 diabetes. *Current Medical Research and Opinion* 21:1107-1114, 2005
3. Giorgino F, Laviola L, Leonardini A: Pathophysiology of type 2 diabetes: rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes research and clinical practice* 68 Suppl1:S22-29, 2005
4. Statens legemiddelverk: Terapi anbefaling: Behandling av type - 2 diabetes. 03:1-92, 2001
5. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 104:787-794, 1999
6. Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais G, Moorjani S, Lupien P: Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *New England Journal of Medicine* 334:952-057, 1996
7. Younis N, Soran H, Farook S: The prevention of type 2 diabetes mellitus: recent advances. *QJM* 97:451-455, 2004
8. Zimmet P, Alberti K, Shaw J: Global and societal implications of the diabetes epidemic *Nature* 414:782-787, 2001
9. Valverde AM, Benito M, Lorenzo M: The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta physiologica Scandinavica* 183:59-73, 2005
10. Aas V, Rokling-Andersen M, Wensaas AJ, Thoresen GH, Kase ET, Rustan AC: Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycemia. *Acta physiologica Scandinavica* 183:31-41, 2005
11. Boden G: Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Current diabetes reports* 6:177-181, 2006
12. Saltiel AR, Kahn R: Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001
13. Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V: The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* 116:585-586, 2003
14. Olefsky JM: Nuclear Receptor Minireview Series *The Journal of biological chemistry* 276:36863-36864, 2001
15. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schultz G, Umesono K, Blumberg M, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839, 1995
16. Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA: LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascular pharmacology* 38:249-256, 2002
17. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, G S, Pfahl M: A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Molecular and cellular biology* 14:7025-7035, 1994

18. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ: LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes and development* 9:1033-1045, 1995
19. Lehmann JM, Kliewer S, Moore L, Smith-Oliver T, Oliver B, Su J, Sundseth S, Winegar D, Blanchard D, Spencer T, Wilson T: Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of biological chemistry* 272:3137-3140, 1997
20. Alberti S, Steffensen KR, Gustafsson J-A: Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene* 243:93-103, 2000
21. Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ: Orphan Nuclear Receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *The Journal of biological chemistry* 276:37735-37738, 2001
22. Song C, Kokontis JM, Huupakka RA, Liao S: Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10809-10813, 1994
23. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ: An oxysterol signaling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731, 1996
24. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina J, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig K, Shan B: Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes and development* 14:141-149, 2000
25. Steffensen KR, Gustafsson J-A: Putative Metabolic Effects of the Liver X Receptor (LXR). *Diabetes* 53:S36-42, 2004
26. Tobin KA, Ulven SM, Schuster GU, Steineger HH, Andersen SM, Gustafsson J-A, Nebb HI: Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis *The Journal of biological chemistry* 277:10691-10697, 2002
27. Geyeregger R, Zeyda M, Stulnig TM: Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:524-539, 2006
28. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte B, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss L, Evans RM, Tontonoz P: A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular and cellular biology* 7:161-171, 2001
29. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ: Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704, 1998
30. Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Pettersson S, Gustafsson J-A: Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice *The Journal of Clinical Investigation* 107:565-573, 2001
31. Chiang JY, Kimmel R, Stroup D: Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 262:257-265, 2001
32. Lewis GF, Rader DJ: New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation research* 96:1221-1232, 2005
33. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JM, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy J, Mangelsdorf DJ: Regulation of absorption and ABCA1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524-1529, 2000
34. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ: Liver X Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Disease. *Molecular Endocrinology* 17:985-993, 2003

35. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall A: Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor *The Journal of biological chemistry* 275:28240-28245, 2000
36. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP: ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274:794-802, 2000
37. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz D, Edwards PA, Tontonoz P: Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12097-12102, 2000
38. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown M, Goldstein J, Mangelsdorf DJ: Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes and development* 14:2819-2830, 2000
39. Joseph SB, Laffitte BA, Patel P, Watson MA, Matsukuma K, Walczak R, Collins J, Osborne T, Tontonoz P: Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *The Journal of biological chemistry* 277:11019-11025, 2002
40. Juvet LK, Andresen SM, Schuster GU, Dalen KT, Tobin KAR, Hollung K, Haugen F, Jacinto S, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson J-A, Nebb HI: On the Role of Liver X Receptors in Lipid Accumulation in Adipocytes. *Molecular Endocrinology* 17:172-182, 2003
41. Laffitte B, Chao L, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Wilpitz D, Mangelsdorf DJ, Collins J, Saez E, Tontonoz P: Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5419-5424, 2003
42. Cao G, Liang Y, Broderick C, Oldham B, Beyer T, Schmidt R, Zhang Y, Stayrook K, Suen C, Otto K, Miller A, Dai J, Foxworthy P, Gao H, Ryan T, Jiang X, Burris T, Eacho P, Etgen G: Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *The Journal of biological chemistry* 278:1131-1136, 2003
43. Zelcer N, Tontonoz P: Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 116:607-614, 2006
44. Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson J-A, Nebb HI: Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor α . *The Journal of biological chemistry* 278:48283-48291, 2003
45. Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, Gromada J: Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 53:S75-S78, 2004
46. Cozzone D, Debard C, Dif N, Ricard N, Disse E, Vouillarmet J, Rabasa-Lhoret R, Laville M, Pruneau D, Rieusset J, Lefai E, Vidal H: Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. *Diabetologia* 49:990-999, 2006
47. Muscat GEO, Wagner BL, Hou J, Tangirala RK, Bischoff ED, Rohde P, Petrowski M, Li J, Shao G, Macondray G, Schulman IG: Regulation of Cholesterol Homeostasis and Lipid Metabolism in Skeletal Muscle by Liver X Receptors *The Journal of biological chemistry* 277:40722-40728, 2002

48. Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, Højlund K, Levin K, Thoresen GH, Beck-Nielsen H, Rustan AC, Gaster M: Skeletal Muscle Lipid Accumulation in Type 2 Diabetes May Involve the Liver X Receptor Pathway. *Diabetes* 54:1108-1115, 2005
49. Kase ET, Andersen B, Nebb HI, Rustan AC, Thoresen GH: 22-hydroxycholesterols regulate lipid metabolism differently than T0901317 in human myotubes. *Biochimica et biophysica acta* In Press, 2006
50. Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi C, Maglich J, Wilson J, Willson T, Collins J, Kliewer S: Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRalpha gene in human macrophages. *The Journal of biological chemistry* 276:43509-43515, 2001
51. Laffitte B, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz D, Collins J, Tontonoz P: Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Molecular and cellular biology* 21:7558-7568, 2001
52. Lund EG, Peterson LB, Adams AD, Lam MHN, Burton CA, Chin J, Guo Q, Huang S, Latham M, Lopez J, Menke J, Milot D, Mitnaul L, Rex-Rabe S, Rosa R, Tian J, Wright S, Sparrow C: Different roles of liver X receptor α and β in lipid metabolism: Effects of an α -selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochemical Pharmacology* 71:453-463, 2006
53. Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, Blomhoff R: In Vivo Imaging og NF-kB Activity. *The Journal of Immunology* 168:1441-1446, 2002
54. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular biology of the cell*, Garland Science, 2002

Appendiks

1. Celledyrking

1.1

Vekstmedium mus

400 ml Ham's F10 med L-glutamin
100 ml Føtalt kalveserum (FCS)
2,5 ml Penicillin-Streptomycin
5 ng/ml Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF)

1.2

Differensieringsmedium mus

500 ml DMEM/Glutamax
10 ml Hesteserum
2,5 ml Penicillin-Streptomycin

1.3

M2-medium, proliferasjonsmedium humane celler

500 ml DMEM/Glutamax
10 ml Føtalt kalveserum (FCS)
10 ml Ultrosor G
2,5 ml Penicillin-Streptomycin
2,5 ml Fungizone

1.4

THLE-coating

5 mg fibronektin
5 ml Collagen I
1,66 ml Bovint serum albumin(BSA)-oppløsning (3 %)
500 ml PFMR-4-medium
Sterilfiltreres 0,22 µm

2. Glukosetransport, palmitinsyreopptak og acetat-inkorporering i lipider

2.1

Høstebuffer (PBS) (pH 7.2-7.4)

8 g NaCl
 0,2 g KH₂PO₄
 2,9 g Na₂HPO₄
 0,2 g KCl
 1000 ml dH₂O tilsettes

2.2

Opptaksbuffer (pH 7.4)

140 mM NaCl
 20 mM Hepes
 5 mM KCl
 2,5 mM MgSO₄
 1 mM CaCl₂

3. Revers transkripsjon og real-time PCR

3.1

DEPC-dH₂O, 0.1 %

1 ml DEPC
 1000 ml destillert H₂O tilsettes

3.2

TaqMan reverse transcription reaction mix

Reagens	Volum per prøve i µl	Endelig konsentrasjon
10 x TaqMan RT buffer	2,0	1 x
25 mM MgCl ₂	4,4	5,5 mM
10 mM dNTP mix	4,0	0,5 mM
50 µM Random hexamers	1,0	2,5 µM
RNase inhibitor (20 U/µl)	0,4	0,4 U/µl
Multiscribe reverse transcriptase (50 U/µl)	0,5	1,25 U/µl
TaqMan reaksjonsmiks	12,3 µl	

TaqMan reaksjonsmiks	12,3 µl
DEPC-dH ₂ O + prøve (2 µg)	7,7 µl
Totalt volum i hver prøve	20 µl

3.3

SYBR Green Real-Time PCR Mix

Reagens	Volum per prøve i µl
2 x SYBR Green Mix	12,5
Primer Forward	0,25
Primer Reverse	0,25
DEPC-H ₂ O	9,5
Total SYBR Green PCR Mix	22,5

Total SYBR Green PCR Mix	22,5 µl
cDNA prøve eller standard	2,5 µl
Totalt volum i hver prøve	25 µl